

О. Д. ЛОПИНА, А. А. БОЛДЫРЕВ

**ВЛИЯНИЕ ДИПЕПТИДОВ КАРНОЗИНА И АНЗЕРИНА
НА АККУМУЛЯЦИЮ Ca^{2+} ФРАГМЕНТАМИ
САРКОПЛАЗМАТИЧЕСКОГО РЕТИКУЛУМА**

(Представлено академиком С. Е. Севериным 11 XI 1974)

Анализ влияния гистидинсодержащих дипептидов на процессы возбуждения и сокращения в скелетной мускулатуре позволяет установить, что их действие локализовано на уровне электромеханического сопряжения⁽¹⁻³⁾. Показано, что дипептиды карнозин и анзерин увеличивают эффективность аккумуляции Ca^{2+} фрагментами саркоплазматического ретикулума (ф.с.р.) кролика⁽²⁾. Усиление этого процесса (возрастание коэффициента $\text{Ca}/\text{АТФ}$) происходит за счет увеличения скорости транспорта Ca^{2+} . При этом скорость гидролиза АТФ Са-зависимой АТФазой изменяется незначительно. Было высказано предположение, что дипептиды влияют на Са-аккумулирующую функцию с.р., изменяя соотношение между входом и выходом Ca^{2+} из везикул в сторону уменьшения его выхода. Мы продолжили эти исследования.

Фракцию с.р. из мышц задних конечностей лягушки и кролика выделяли методом, описанным ранее⁽⁴⁾. АТФазную активность и скорость аккумуляции Ca^{2+} в присутствии оксалат-иона измеряли непрерывно^(5, 6). В качестве регистрирующего прибора использовали ФЭК-56, соединенный с самописцем КСП. Изменения рН среды при проведении опыта не превышали 0,1 ед. рН. Опыты проводили при температуре 20° (с.р. лягушки) и 37° С (с.р. кролика). Среда инкубации содержала 100 мМ NaCl или KCl, 2 мМ MgCl_2 , 2 мМ АТФ Na_2 , 1,5—6 мМ оксалата натрия (или калия) и 10 мМ буферного раствора при рН 7,2. Концентрация белка с.р. составляла 20—40 мкг/мл (концентрацию белка определяли по методу Лоурри, растворяя суспензию ф.с.р. в 1% дезоксихолате натрия). При добавлении в пробу суспензии ф.с.р. в присутствии АТФ концентрация примесного кальция снижалась до $<10^{-6}$ М. Последующие добавки CaCl_2 составляли 80—160 нмоль на 1 пробу (объем пробы 4 мл). В работе использовали АТФ и гистидин фирмы «Reanal», трис фирмы «Merk». Карнозин и анзерин выделены на кафедре биохимии животных МГУ методом ионообменной хроматографии⁽⁷⁾. Остальные реактивы фирмы «Союзреактив», NaCl и KCl перекристаллизованы. Концентрацию MgCl_2 определяли титрованием с эриохромом черным Т, CaCl_2 — с мурексидом⁽⁸⁾. Для расчета скорости входа Ca^{2+} ($V_{\text{вх}}$) и скорости его выхода ($V_{\text{вых}}$) пользовались следующими формулами⁽²⁾:

$$V_{\text{вх}} = \frac{\text{Ca}}{\text{АТФ}_{\text{max}}} \cdot V_{\text{АТФ}}, \quad (1)$$

где $V_{\text{АТФ}}$ — скорость гидролиза АТФ Са-чувствительной АТФазой, а $\text{Ca}/\text{АТФ}_{\text{max}}=2$ ⁽²⁾.

$$V_{\text{вых}} = \left(\frac{\text{Ca}}{\text{АТФ}_{\text{max}}} - \frac{\text{Ca}}{\text{АТФ}_{\text{экс}}} \right) \cdot V_{\text{АТФ}}, \quad (2)$$

где $Ca/ATФ_{\text{эсп}}$ — отношение скорости аккумуляции Ca^{2+} к скорости гидролиза АТФ, определяемое экспериментально. Концентрацию Ca^{2+} внутри везикул рассчитывали из произведения растворимости для оксалата кальция и концентрации оксалат-иона.

Ранее при исследовании действия дипептидов на Ca -транспортную систему с.р. в качестве контрольных буферных растворов обычно использовали растворы трис-НСI равной концентрации (1, 2). Однако рК для триса и анзерина (или карнозина) различны, поэтому растворы дипептидов и триса той же концентрации имеют различную буферную емкость.

Таблица 1

Эффективность аккумуляции Ca^{2+} ф.с.р. кролика в среде с анзерином и трис-НСI

Условия	$V_{\text{акк}}Ca^{2+}$, нмоль/мин	$V_{\text{АТФ}}$, нмоль/мин	$Ca/ATФ$	$Ca/ATФ$, %
Трис-НСI 10 мМ, NaCl 100 мМ	$69,7 \pm 5,2$	$198,0 \pm 7,6$	0,351	100
Трис-НСI 26 мМ, NaCl 79 мМ	$62,0 \pm 1,0$	$161,8 \pm 8,8$	0,382	109
Анзерин 10 мМ, NaCl 100 мМ	$90,7 \pm 5,7$	$157,0 \pm 6,4$	0,577	164

Примечание. Оксалат натрия 3 мМ, белок 110 мкг в пробе. Остальные условия даны в тексте. Значения $V_{\text{акк}}$ и $V_{\text{АТФ}}$ рассчитаны на общее количество белка в пробе.

Таблица 2

Эффективность аккумуляции Ca^{2+} фрагментами с.р. лягушки и кролика в среде с различными буферными растворами

Буферный раствор, 10 мМ	Лягушка			Кролик		
	$V_{\text{акк}}$	$V_{\text{АТФ}}$	$Ca/ATФ$	$V_{\text{акк}}$	$V_{\text{АТФ}}$	$Ca/ATФ$
Трис-НСI	$47,0 \pm 0,3$	$39,5 \pm 0,5$	1,19	$138,0 \pm 0,0$	$343,0 \pm 3,5$	0,400
Гистидин-НСI	$41,5 \pm 0,5$	$39,0 \pm 0,1$	1,06	$127,5 \pm 3,5$	$372,0 \pm 7,2$	0,342
Анзерин	$44,3 \pm 1,9$	$33,0 \pm 0,1$	1,34	$174,0 \pm 0,0$	$343,0 \pm 3,5$	0,508
Карнозин	$38,8 \pm 0,3$	$19,3 \pm 1,1$	1,91	$154,5 \pm 1,6$	$295,0 \pm 0,3$	0,512

Примечание. Белок: 60 мкг (с.р. кролика), 82 мкг (с.р. лягушки). Оксалат натрия 3 мМ. Остальные условия указаны в тексте. Значения $V_{\text{акк}}$ и $V_{\text{АТФ}}$ даны в нмоль/мин на белок в пробе.

В таком случае увеличение эффективности транспорта Ca^{2+} в среде с дипептидами могло быть неспецифическим. Мы использовали в качестве контрольных два раствора трис-НСI: 1) раствор, концентрация триса в котором равна концентрации анзерина, 2) раствор трис-НСI, равный раствору анзерина по буферной емкости и ионной силе (100 мМ NaCl, 10 мМ анзерина и 79 мМ NaCl, 26 мМ трис-НСI). Из табл. 1 видно, что в обоих случаях коэффициент $Ca/ATФ$ в присутствии анзерина выше, чем в присутствии трис-НСI, и влияние ионной силы и буферной емкости на этот параметр незначительно (табл. 1). Сравнение влияния нескольких буферных растворов на величину $Ca/ATФ$ для с.р. из различных объектов позволяет выявить специфичность действия дипептидов. В табл. 2 даны величины $Ca/ATФ$ для четырех буферных растворов. Наибольшее значение $Ca/ATФ$ при аккумуляции Ca^{2+} фрагментами с.р. из мышц лягушки наблюдается в присутствии карнозина, тогда как при использовании с.р. из мышц кролика значения $Ca/ATФ$ в карнозине и анзерине почти одинаково.

вы. Следует упомянуть, что скелетные мышцы лягушки содержат только карнозин, тогда как в мышцах кролика присутствуют оба дипептида (3).

Известно, что в процессе аккумуляции Ca^{2+} фрагментами с.р. осуществляется быстрый (не диффузный) выход Ca^{2+} из везикул (9). Этот процесс, как и вход Ca^{2+} , подчиняется кинетике Михаэлиса — Ментен (2) и

$$V_{\text{вх}}/V_{\text{вых}} = 1 + \frac{K_{\text{вых}}}{[\text{Ca}^{2+}]_{\text{вн}}}, \quad (3)$$

где $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{вн}}$ — концентрация Ca^{2+} внутри везикул, задаваемая концентрацией оксалат-иона в среде, $K_{\text{вых}}$ — та концентрация Ca^{2+} внутри везикул, при которой скорость быстрого выхода Ca^{2+} из ф.с.р. равна половине максимальной.

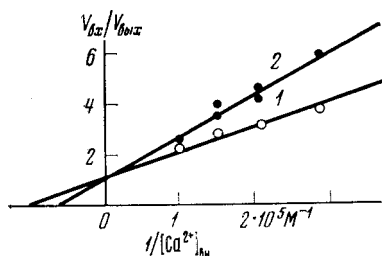


Рис. 1. Зависимость $V_{\text{вх}}/V_{\text{вых}}$ от $1/[\text{Ca}^{2+}]_{\text{вн}}$ в трис-НСI буфере и карнозине. Условия опыта описаны в тексте. Белок — 48 мкг в пробе. 1 — трис-НСI 10 мМ, 2 — карнозин 10 мМ

Рассчитывая отношение $V_{\text{вх}}/V_{\text{вых}}$ при различных концентрациях Ca^{2+} внутри везикул, мы определили, что для с.р. лягушки это отношение также как ранее было показано для с.р. кролика, линейно зависит от величины, обратной концентрации Ca^{2+} в везикулах, причем прямая отсекает на оси ординат отрезок, длина которого равна 1 (рис. 1). Таким образом, вход и выход Ca^{2+} из везикул с.р. осуществляется, по-видимому, через одну систему, и максимальная скорость выхода кальция равна скорости его входа. Эти результа-

ты подтверждают данные, полученные ранее на ф.с.р. из мышц кролика (2). Действие карнозина на транспорт Ca^{2+} фрагментами с.р. из мышц лягушки выражается в увеличении эффективности аккумуляции. При определении $K_{\text{вых}}$ в различных буферных растворах мы обнаружили, что при одинаковых концентрациях трис-НСI и карнозина (10 мМ) $K_{\text{вых}}$ в присутствии карнозина выше, чем при использовании трис-НСI буфера. Ниже приведены величины $K_{\text{вых}}$, определенные на нескольких препаратах с.р.

Буфер	Значения $K_{\text{вых}}$ (различные препараты)					Средние значения $K_{\text{вых}}$
Трис	7 мМ	5 мМ	6 мМ	10 мМ	9 мМ	$7,2 \pm 1,4$ мМ
Карнозин	12 мМ	14,5 мМ	—	—	13,5 мМ	$13,5 \pm 0,7$ мМ

В среднем в присутствии карнозина $K_{\text{вых}}$ почти в два раза превышает значение $K_{\text{вых}}$ в трис-НСI буфере. Таким образом, увеличение эффективности аккумуляции Ca^{2+} в присутствии карнозина связано с уменьшением скорости выхода Ca^{2+} за счет возрастания величины $K_{\text{вых}}$.

В настоящее время считают, что перенос Ca^{2+} через мембрану с.р. в обоих направлениях осуществляется с помощью переносчика (10). Для того, чтобы в результате его работы создавался градиент Ca^{2+} по обе стороны мембраны, переносчик должен циклически изменять свое сродство к Ca^{2+} , причем с паружной стороны $K_{\text{дис}}$ для комплекса Ca^{2+} — переносчик должна быть на несколько порядков выше, чем с внутренней стороны везикул. Если выход Ca^{2+} осуществляется через ту же систему, что и вход, то скорость выхода определяется значением $K_{\text{дис}}$ с внутренней стороны везикул. Соотношение значений $K_{\text{дис}}$ по обе стороны мембраны будет определять величину градиента Ca^{2+} в с.р. Исходя из этих представлений, можно считать, что изменение $K_{\text{дис}}$ для Ca^{2+} будет приводить как к изменению скорости и эффективности аккумуляции, так и к изменению градиента Ca^{2+} по обе стороны мембраны.

Из представленных экспериментальных данных мы рассчитывали концентрацию Ca^{2+} внутри везикул, при которой выход его равен половине

максимального ($K_{\text{вых}}$). Если считать, что выход Ca^{2+} пропорционален его связыванию с переносчиком, то определяемая в наших экспериментах $K_{\text{вых}}$ может отражать сродство переносчика к Ca^{2+} с внутренней стороны везикул. Поскольку изменение $K_{\text{вых}}$ влияет как на градиент Ca^{2+} в с.р., так и на скорость его аккумуляции из внешней среды, то присутствие дипептидов в мышце должно приводить к двум различным эффектам. Во-первых, ускорение аккумуляции кальция будет при тех же затратах АТФ обеспечивать более быстрое расслабление мышцы. Во-вторых, увеличение концентрации Ca^{2+} внутри с.р. может увеличить количество его, выбрасываемое в миоплазму в ответ на последующее возбуждение, что приведет к ускорению сокращения.

Известно, что после денервации быстрых скелетных мышц происходят существенные изменения в характере сократительного ответа и Ca^{2+} -аккумулирующей способности с.р., а также уменьшается содержание карнозина и анзерина. Мы использовали препараты с.р., выделенные из икроножной и плантарной мышц кролика на 25-й день после денервации. Такие препараты характеризовались пониженной способностью создавать градиент Ca^{2+} и более высокой скоростью его пассивной утечки в окружающую среду. Анзерин не оказывал статистически достоверного влияния (по сравнению с трис-буфером той же емкости) на величину $\text{Ca}/\text{АТФ}$ для ретикулула из мышц денервированной конечности, но увеличивал в полтора раза этот коэффициент для препаратов из мышц контрольной конечности. Надо отметить, что стимулирующее влияние анзерина на создание кальциевого градиента исчезает к тому моменту после денервации, когда характер мышечного сокращения уже изменяется, но убыль анзерина еще не наступает⁽³⁾. Это показывает, что проявление эффекта дипептидов требует определенных механизмов, возникающих на конкретной стадии онтогенеза и исчезающих в определенное время после денервации. Идентификация этих механизмов требует дальнейших исследований.

Московский государственный университет
им. М. В. Ломоносова

Поступило
31 X 1974

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ В. Б. Петухов, Автореф. канд. дисс., М., 1974. ² А. А. Boldyrev, W. B. Ritow, In: Reaction Mechanisms and Control Properties of Phosphotransferases, Leipzig – Berlin, 1973, p. 125. ³ С. Е. Северин, Вестн. Моск. ун-ва., т. 1, 1 (1972). ⁴ А. А. Болдырев. В сб.: Транспортные АТФазы, 1975, стр. 30. ⁵ А. А. Болдырев, А. В. Лебедев, В. Б. Рогов, Вопр. мед. химии, № 6, 622 (1969). ⁶ А. Fairhurst, D. Jenden, Anal. Biochem., v. 16, 294 (1966). ⁷ В. Б. Рогов, Вопр. мед. хим., № 1, 90 (1974). ⁸ Р. Прибил, Комплексоны в химическом анализе, М., 1960. ⁹ А. Weber, R. Herz, J. Reiss, Biochem. Zs., B. 345, 329 (1966). ¹⁰ E. Racker, J. Biol. Chem., v. 247, № 24, 8198 (1972).