

ВЛИЯНИЕ ДЕФИЦИТА КАЛЬЦИЯ И МАГНИЯ НА СОДЕРЖАНИЕ ПЕПТИДНЫХ СОЕДИНЕНИЙ В ЭРИТРОЦИТАХ ЧЕЛОВЕКА ПРИ ИНКУБАЦИИ *IN VITRO*

© 2011 А.В. Исаева, Р.О. Кленов, Н.А. Кленова¹

Изучено содержание пептидных соединений внутри эритроцитарных клеток и в инкубационной среде в условиях присутствия и отсутствия ионов кальция и магния, действия 1,3-диметилксантина и АТФ. Выявлены увеличение содержания пептидов внутри эритроцитов в условиях блокирования L-кальциевых каналов и АТФ и уменьшение их содержания в инкубационной среде, не содержащей ионов кальция.

Ключевые слова: эритроциты, пептидные соединения, влияние кальция.

Пептидные соединения являются самой многочисленной группой регуляторов с широким спектром биологической активности [1]. Установлено, что образование пептидных молекул различной молекулярной массы тканеспецифично и представляет собой результат протеолитической деградации функционально важных белков: гемоглобина, актина, ряда внутриклеточных ферментов. Это привело к формированию положения о существовании тканеспецифических пептидных пулов, играющих существенную роль в процессах регуляции как на уровне клеток, так и на уровне всего многоклеточного организма [2; 3].

Процессы образования пептидных соединений в клетках предположительно осуществляются в протеосомах и, в свою очередь, строго регулируются [4]. Обнаружено, что в эритроцитах человека также происходит процесс деградации гемоглобина и ряда других белков, при этом пептидные соединения с различной биологической активностью поступают в плазму крови [3].

Проведенные нами ранее исследования показали, что процесс образования пептидов внутри эритроцитов зависит от уровня производства цАМФ, состояния рецепции и возраста клеток [5], то есть может осуществляться в сохраняющихся в эритроцитах человека протеосомах. Однако нельзя исключить, что деградация гемоглобина, актина и других белков в данных клетках ускоряется за счет активации каспаз при реализации апоптоза (эриптоза). Одним из механизмов реализации эриптоза служит вход кальция внутрь клеток через неспецифический кальцевый канал [6].

Изучение влияния кальция на процессы деградации белков в эритроцитах может прояснить вопрос о приоритетном участии в этом ферментов протеасом или системы каспаз.

¹Исаева Анна Викторовна (antima2008@rambler.ru), Кленов Роман Олегович (rklenov@yandex.ru), Кленова Наталья Анатольевна (kln.ssu@rambler.ru), кафедра биохимии Самарского государственного университета, 443011, Российская Федерация, г. Самара, ул. Акад. Павлова, 1.

Целью данного исследования стало изучение влияния ионов кальция и магния, АТФ и 1,3-диметилксантина на содержание пептидных соединений в эритроцитах и инкубационной среде.

1. Материалы и методы исследования

Свежая донорская кровь любезно предоставлена Самарской областной станцией переливания крови. Фракцию чистых эритроцитов получали с помощью 4-кратной отмывки холодным раствором PBS. Эритроциты инкубировали в растворе Рингера-Локка (1:1) (полный состав) — контроль; а также в отсутствии ионов кальция (без кальция) и магния (без магния). При инкубации эритроцитов в растворе Рингера-Локка полного состава в опытные пробы добавляли АТФ в конечной концентрации 100 мкг/мл и/или 1,3-диметилксантин в концентрации 20 мкг/мл. Инкубацию проводили в течение 60 мин при встряхивании каждые 5 мин, АТФ и 1,3-диметилксантин добавляли за 10 мин до окончания инкубации.

В инкубационной среде и эритроцитах определяли содержание пептидных соединений по методу Лоури [7]. Эритроциты депротенировали с помощью 10 %-ной ТХУ кислоты. В инкубационной среде учитывали выход гемоглобина по экстинкции проб на 540 нм. Измерения осуществляли на спектрофотометре СФ-46 (Россия).

2. Результаты и их обсуждение

Известно, что 1,3-диметилксантин (1,3-ДМК) блокирует пуриновые рецепторы и Ca^{2+} -каналы L-типа, а также ингибирует все виды фосфодиэстераз циклических нуклеотидов эритроцитов [8; 9]. АТФ в эритроцитах является основным донором энергии, а также субстратом для биосинтеза цАМФ. Образование цАМФ из АТФ в небольших количествах — процесс постоянный даже без внешних сигналов. Образование АТФ в эритроцитах ограничено процессом гликолиза, и его повышение в клетках повысит и продукцию цАМФ, что может привести к увеличению образования пептидных молекул. Кроме того, показано, что АТФ, как и другие адениловые нуклеотиды, способны регулировать многие внутриклеточные процессы посредством влияния на специфические пуриновые рецепторы. К АТФ более чувствительны пуриновые рецепторы P_2 типа [10].

Добавление АТФ (100 мкг/мл) в отсутствие и присутствии 1,3-диметилксантина сопровождалось увеличением содержания пептидных соединений внутри эритроцитарных клеток (табл. 1).

Таблица 1
Содержание пептидных соединений (мкг/мл) в эритроцитах человека при действии АТФ и /или 1,3-диметилксантина (n=10)

Контроль	АТФ, 100 мкг/мл	1,3-диметилксантин, 20 мкг/мл	АТФ + 1,3-диметилксантин
210,0±12,5	245,0±13,5*	270,5±12,0**	302,0±17,5***

* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ по отношению к контролю; *** $P < 0,01$ по отношению к пробам с добавлением АТФ.

Полученные данные свидетельствуют о зависимости процесса протеолитической деградации белков в эритроцитах от уровня цАМФ, так как блокирование пуриновых рецепторов и всех видов фосфодиэстераз в клетках с помощью 1,3 ДМК в присутствии АТФ (предшественник цАМФ) сопровождается значительным увеличением пептидных соединений внутри эритроцитов (на 43,8 % против контроля и на 23,3 % по отношению к действию только АТФ). Причем в данном процессе не имеет значения вход в клетки Ca^{2+} через L-каналы.

Инкубация эритроцитов в среде, не содержащей ионов Ca^{2+} , однако, сопровождается уменьшением выхода пептидных соединений в инкубационную среду (табл. 2) по сравнению с контролем на 26,3 %, тогда как отсутствие ионов Mg^{2+} , необходимого для активации АТФ и цАМФ, выявляет только тенденцию к снижению.

Таблица 2

Содержание пептидных соединений (мкг/мл) и выход гемоглобина в инкубационную среду (ОП₅₄₀ × 1000) в условиях отсутствия и присутствия Ca^{2+} и Mg^{2+} (n=15)

Показатель	Контроль	Без Ca^{2+}	Без Mg^{2+}
1. Содержание пептидов, мкг/мл	0,120 ± 0,007	0,095 ± 0,005*	0,105 ± 0,006
2. Выход гемоглобина, (ОП ₅₄₀ × 1000)	51 ± 8	79 ± 11*	42 ± 5

Кроме того, отсутствие Ca^{2+} в инкубационной среде сопровождалось достоверным усилением выхода гемоглобина из клеток в среду инкубации (табл. 2), тогда как отсутствие магния не влияет на интенсивность выхода гемоглобина.

Представленные данные могут косвенно свидетельствовать о продукции пептидных соединений в эритроцитах в основном в протеосомных комплексах, однако выход их в окружающую среду может зависеть от входа ионов кальция в клетки через неселективные катионные каналы, активируемые в условиях перехода клеток в состояние реализации эриптоза. При этом нельзя исключить изменения пула пептидных соединений, а, следовательно, и их биологической активности. Решение данного вопроса требует дальнейших исследований.

Литература

- [1] Шатаева Л.К., Хавинсон В.Х., Ряднова И.Ю.. Пептидная саморегуляция живых систем (факты и гипотезы). СПб.: Наука, 2003. 222 с.
- [2] Карелин А.А., Иванов В.Т. Пептидомика — новое направление постгеномных технологий // Вестник Российской академии наук. 2005. Т. 75. № 2. С. 139–148.
- [3] Фрагменты функциональных белков в переживающей культуре эритроцитов человека / М.М. Филиппова [и др.] // Биоорганическая химия. 2008. Т. 34. № 2. С. 160–170.
- [4] Сорокин А.В., Ким Е.Р., Овчинников Л.П. Протеасомная система деградации и процессинга белков // Успехи биологической химии. 2009. Т. 40. С. 3–76.
- [5] Кленов Р.О., Кленова Н.А. Действие цАМФ на образование пептидов в эритроцитах человека в зависимости от возраста клеток // Бюл. эксперим. биол. и мед. 2010. Т. 149. № 6. С. 644–648.

- [6] Mechanisms of Suicidal Erythrocyte Death / K.S. Lang [et al.] // Cell Physiol Biochem. 2005. V. 15. P. 195–202.
- [7] Protein measurement with the Folin phenol reagent / O.H. Lowry [et al.] // J. Biol. Chem. 1951. V. 193. P. 265–275.
- [8] Машковский М.Д. Лекарственные средства. М.: Новая волна, 1996. Т. 2. 685 с.
- [9] Метаболизм пуринов в эритроцитах человека / В. Дудиньска [и др.] // Биохимия. 2006. Т. 71. Вып. 5. С. 581–591.
- [10] Козловский В.А., Шмалый В.И. АТФ как мессенджер и мессенджер как мишень терапевтического воздействия // Ліки України. 2008. № 3(119). С. 48–51.

Поступила в редакцию 1/IX/2011;
в окончательном варианте — 1/IX/2011.

INFLUENCE OF DEFICIENCY OF CALCIUM AND MAGNESIUM ON MAINTENANCE OF PEPTIDE CONNECTIONS IN HUMAN ERYTHROCYTES AT THE INCUBATION *IN VITRO*

© 2011 A.V. Isaeva, R.O. Klenov, N.A. Klenova²

The maintenance of peptide connections inside red blood cells and in the incubatory environment in the conditions of presence and absence of ions of calcium and magnesium, action of 1,3-dimethylxanthine and ATP is studied. The increase in the maintenance of peptides inside erythrocytes in the conditions of blocking L-calcium of channels and ATP and reduction of their maintenance in the incubatory environment which is not containing ions of calcium is revealed.

Key words: erythrocytes, peptide connections, influence of calcium.

Paper received 1/IX/2011.
Paper accepted 1/IX/2011.

²Isaeva Anna Viktorovna (antimo2008@rambler.ru), Klenov Roman Olegovich (rklenov@yandex), Klenova Natalia Anatolievna (kln.ssu@rambler.ru), the Dept. of Chemistry, Samara State University, Samara, 443011, Russian Federation.