УДК 577.29

DOI: 10.21779/2542-0321-2018-33-2-95-102

П.М. Нурмагомедова, М.М. Абасова, Д.Н. Джанболатова

Активность Ca^{2+} -зависимых нейтральных протеиназ в печени бодрствующих и гибернирующих сусликов

Дагестанский государственный университет; Россия, 367001, г. Махачкала, ул. М. Гаджиева, 43а; Parizat1949@bk.ru

Исследована активность Ca^{2+} -зависимых нейтральных протеиназ (кальпаинов), которые, возможно, непосредственно или косвенно участвуют в реализации программы переживания зимней спячки гетеротермами. Определены активность и температурная зависимость кальпаинов в печени бодрствующих и гибернирующих сусликов. Температурная зависимость активности ферментов представлена при всех исследованных состояниях: бодрствующие суслики летом и осенью, середина баута первого, второго, третьего месяцев спячки, выход из спячки после третьего месяца спячки. Активность ферментов у бодрствующих летом (июль–август) и осенью (сентябрь) сусликов не высокая. Осенью она в 2 раза ниже, чем летом. В первый месяц спячки активность кальпаинов близка к уровню бодрствующих. С каждым месяцем пролонгирования спячки активность ферментов повышается и достигает максимальных значений в конце баута после трех месяцев спячки. График температурной зависимости активности фермента бодрствующих сусликов в сентябре и в период выхода из баута третьего месяца спячки имеет линейную зависимость. Энергия активации при этих состояниях 18.5 кДж и 19 кДж соответственно. В середине баута первого месяца спячки имеется излом при температуре 20 °С. Причем энергия активации ниже точки излома (17.2 кДж) незначительно отличается от таковой выше точки излома (18.7 кДж). Примерно такая же картина наблюдается в середине второго месяца спячки (энергия активации ниже и выше точки излома 17.5 и 19 кДж соответственно). Излом на графике – это один из примеров изменения функций мембранного фермента, а также фазового перехода в липидах мембран от жидкого кристаллического состояния до состояния геля, приводящее к увеличению энергии активации. Линейная прямая (с единственной энергией активации) в диапазоне физиологического изменения температур (2–37 °С) показывает холодостойкость исследованных ферментов, в то время как нелинейный график доказывает их холодостойкость.

Ключевые слова: *зимняя спячка, ферменты, кальпаины, температурная зависимость, энергия активации.*

Введение

Протеолиз играет важную роль в регуляции обмена веществ в организме [1], участвует во внутриклеточном распаде белков и регуляции их кругооборота, пищеварении, оплодотворении, морфогенезе, защитных реакциях, адаптационных перестройках обмена.

Кальпаины – Ca^{2+} -зависимые нейтральные протеиназы – являются одними из ферментов, которые путем ограниченного протеолиза изменяют биологическую активность различных белков [2].

На данный момент значение кальпаинов в клетках печени недостаточно изучено, мало экспериментальных данных по изучению их роли, в отличие от клеток других органов.

Известно, что кальпаины вызывают повреждение клеток несколькими механизмами. Они инициируют протеолиз клеточной мембраны и цитоскелетных структурных белков [3]. Инициирование протеолитического расщепления этих белков может привести к прогрессирующей клеточной травме и смерти. Образование пузырьков гепатоцитов [4] – распространенное проявление их травмы [5]. Это может быть и результатом повреждения цитоскелета самой клетки в результате повышенной активности кальпаина. Кальпаины также ведут себя как сигнальные протеазы, например, путем активации протеинкиназы С [6] могут приводить к активации процессов, приводящих к повреждению клеток.

Как же адаптируются клетки зимоспящих к температурным перепадам, наблюдаемым при вхождении в спячку, глубокой спячке и выходе из состояния спячки? Ранее было высказано предположение, что эти состояния контролируются триггерами спячки – пептидами [7].

Целью данной работы является исследование активности Ca^{2+} -зависимых нейтральных протеиназ которые путем ограниченного протеолиза, изменяют биологическую активность различных белков [2] и, возможно, непосредственно или косвенно участвуют в реализации программы переживания зимней спячки гетеротермами.

Материалы и методы исследования

Эксперименты проведены на малых кавказских сусликах (*Citellus pigmaeus* Pallas) массой 200–250 г – типичных представителях животных, которые впадают в спячку [8]. Исследованы суслики в бодрствующем состоянии летом и осенью, а также в состоянии зимней спячки, середины баута первого, второго, третьего месяцев спячки и выхода из спячки. Животных, находящихся в соответствующем состоянии, декапитировали, извлекали печень. Печень, выделенную на холоде, промывали в охлажденном физиологическом растворе и высушивали фильтровальной бумагой. Далее ткань измельчали, гомогенизировали в 50 мМ Трис-НСl буфере pH = 7.4 в соотношении 1:9 (ткань:среда), а затем фильтровали. Полученный фильтрат использовали в эксперименте. Ca^{2+} -зависимую активность нейтральных протеаз определяли по методам Baundry [9], Nilsson и Karlsson [10]. Активность фермента выражали в мкмоль тирозина/100 мг белка за 1 час.

Результаты и обсуждение

Активность кальпаинов (диаграмма 1) в печени бодрствующих летом (июль-август) и осенью (сентябрь) сусликов невысокая (в пределах 0.8–1.5 мМ). Осенью она ниже в 2 раза, чем летом. В первый месяц спячки активность кальпаинов близка к уровню бодрствующих. Активность ферментов с каждым месяцем пролонгирования спячки повышается и достигает максимальных значений в конце баута после трех месяцев спячки. Возможно, что с пролонгированием состояния гибернации повышается необходимость в апоптической ликвидации части клеток печени. Однако нельзя исключать и участие кальпаинов в активации внутриклеточных ферментов для перехода клетки на новый уровень метаболизма. Значительное увеличение активности кальпаинов коррелировало с продолжительностью ишемии (реперфузии) и было ингибировано более чем на 80 % ингибитором. Ингибирование кальпаина привело к значительному

снижению высвобождения трансаминаз, некроза тканей и предотвращению несудорожных ишемических состояний в условиях выживания. Эти данные свидетельствуют о том, что кальпаины играют ключевую роль в тепловом ишемическом реперфузионном повреждении печени крыс посредством модуляции апоптоза и некроза [11].

Диаграмма. Изменение активности Ca^{2+} -зависимых нейтральных протеаз печени сусликов в динамике зимней спячки (1 – 1-й месяц спячки, середина баута; 2 – 2-й месяц спячки, середина баута; 3 – 3-й месяц спячки, середина баута; 4 – 3-й месяц спячки, выход из баута; 5 – бодрствующие, в июле–августе; 6 – бодрствующие в сентябре

Кроме того, было показано, что в тромбоцитах человека автолиз кальпаина предшествует его транслокации к мембране. Поэтому остается невыясненным, какое влияние на процесс автолиза имеет взаимодействие кальпаина с плазматической мембраной.

При переходе к зимней спячке у животных изменяется жирнокислотный состав мембранных липидов, приспособляя свойства мембран к условиям среды и новым потребностям организма. Гипотеза адаптационной роли мембранных липидов была выдвинута и обоснована Е.М. Крепсом [12]. Согласно этой гипотезе при смене температур наиболее резкие различия в жирнокислотном составе и их наборе обнаруживают ганглиозиды (гликолипиды), в которых происходит повышение содержания полиненасыщенных жирных кислот. Эти данные свидетельствуют о том, что клетки очень чутко реагируют на изменение температуры, стремясь к тому, чтобы их мембрана постоянно оставалась в «жидком» состоянии. Как только снижается температура окружающей среды, бактерии заменяют насыщенные липиды в своих мембранах на ненасыщенные. Так же ведут себя и клетки других живых организмов. Организм человека и теплокровных животных обеспечивает «жидкое» состояние своих клеточных мембран, поддерживая строго постоянную температуру тела [13]. При подготовке к спячке мобилизуется система антиоксидантной защиты, и организм зверьков готовится к длительному пребыванию в состоянии спячки.

Так как температура является одним из наиболее важных факторов для поддержания жизнедеятельности любого организма, интерес представляет исследование температурной зависимости активности ферментов у представителей гетеротермных животных.

В митохондриальной мембране печени аррениусовские кривые сукцината, поддерживающего потребление кислорода, типично нелинейные у активных летних сусликов, в то время как у гибернирующих они имеют линейную структуру. Температурная зависимость активности сукцината митохондрий печени у весенних, летних и зимних активных сусликов имеет нелинейную кривую, в то время как у гибернирующих и пробуждающихся становится прямой [14]. Интересно, что у животных, активных зимой, не набирающих вес, на графике происходит смещение точки излома в область низких температур (от 20 к 11–13 °С) в отличие от летних сусликов. У животных с заметным набором веса точка излома находится в области 4 °С. Эти наблюдения дают основание предполагать, что сезонно зависимые изменения в термотропном поведении функций мембранных белков митохондрий происходят до впадения в спячку и сохраняются на протяжении всего периода гибернации. Снижение точки излома также наблюдалось в митохондриальных мембранах почек и печени сусликов. Все эти наблюдения повышают вероятность того, что могут произойти конкретные изменения в составе мембран, так что вязкость мембраны может быть увеличена при низкой температуре, чтобы обеспечить непрерывную функцию мембранных ферментов во время спячки [14].

Нами определена температурная зависимость активности Ca^{2+} -зависимых протеиназ при состояниях: бодрствующие суслики летом и осенью, середина баута первого, второго, третьего месяцев спячки, выход из спячки. График температурной зависимости активности ферментов бодрствующих сусликов в сентябре и в период выхода из баута третьего месяца спячки имеет линейную зависимость. Энергия активации при этих состояниях 18.5 кДж и 19 кДж соответственно (рис. 1).

График температурной зависимости активности Ca^{2+} -зависимых нейтральных протеаз печени сусликов в середине баута первого месяца спячки имеет излом при температуре 20 °С. Причем энергия активации ниже точки излома (17.2 кДж) незначительно отличается от таковой выше точки излома (18.7 кДж). Примерно такая же картина наблюдается в середине второго месяца спячки (энергия активации ниже и выше точки излома 17.5 и 19 кДж соответственно) (рис. 2).

Излом на графике – это один из примеров изменения функций мембранного фермента, а также фазового перехода в липидах мембран от жидкого кристаллического состояния до состояния геля, приводящих к увеличению энергии активации [15]. В нашем случае линейная прямая (с единственной энергией активации) в диапазоне физиологического изменения температур (2–37 °С) показывает холодостойкость исследованных ферментов, в то время как нелинейный график доказывает их холодостойкость.

Рис. 1. Температурная зависимость активности кальпаинов печени бодрствующих сусликов и при выходе из баута после трех месяцев спячки

Рис. 2. Температурная зависимость активности кальпаинов печени сусликов в середине баута первого, второго и третьего месяцев спячки

В большинстве клеток кальпаины находятся вблизи плазматической мембраны, мембран органелл, а не только в цитоплазме. К тому же локализация кальпаинов может меняться в зависимости от концентрации кальция внутри клетки. Было показано, что в отсутствие внешнего воздействия кальпастина и кальпаины в цитоплазме распределены диффузно. После обработки клеток ионофором увеличивается концентрация внутриклеточного кальция, кальпаин обнаруживается уже вблизи плазматической мембраны, причем на локализации кальпастина это воздействие не сказывается [16]. Возможно, что кальпаины взаимодействуют с фосфолипидами плазматической мембраны в непосредственной близости от кальциевого канала; это взаимодействие приводит к уменьшению уровня кальция, необходимого для автолиза. Некоторые исследования показали, что кальпаины связываются с белками, но не с фосфолипидами плазматической мембраны [17] и таким образом участвуют в апоптозе клетки.

Наблюдаемые нами изменения в аррениусовских кривых температурных зависимостей ферментов могут быть результатом конформационных изменений молекул

ферментов в связи с изменением их локализации и связывания с фосфолипидами или белками мембран.

Было показано, что аноксический стресс приводит к увеличению цитозольного кальция в результате высвобождения из внутриклеточных органелл [18], увеличения притока кальция из внеклеточных источников [19] и неспособности клетки вытеснить кальций из-за пониженного энергетического состояния [20]. Увеличение количества свободного цитозольного кальция было зарегистрировано при сохранении холода в синусоидальных эндотелиальных клетках и клетках Купфера [21]. Реоксигенация после аноксии или реперфузии после ишемии приводит к окислительному стрессу [19], связанному с увеличением концентрации свободного цитозольного кальция [20], и окислительный стресс в гепатоцитах приводит к активации кальпаина [22]. Было показано, что фосфолипазы активируют кальпаины при аноксическом повреждении гепатоцитов [23]. Известно, что блокаторы кальциевых каналов и ингибиторы протеаз оказывают благотворное влияние на поврежденную печень [24, 25].

Экспериментальное вмешательство с ингибиторами кальпаина существенно уменьшает прогрессирующее повреждение печени. В работе [26] была изучена роль кальпаинов в прогрессии повреждений печени после искусственного введения яда. Обнаружено, что кальпаины просачиваются вне некротических гепатоцитов и активируются во внеклеточной среде, гидролизуя белки плазматической мембраны соседних клеток, что ведет к прогрессии повреждения.

Заключение

Из нескольких механизмов, участвующих в активации кальпаина, наиболее вероятно увеличение концентрации кальция. Способность пережить состояние спячки и восстановить функции печени после столь серьезных потрясений, возможно, связана с эволюционно сложившимися адаптационными механизмами.

Судя по всему, что повышение активности ферментов кальпаиновой системы является необходимым условием переживания зимней спячки, а в состоянии бодрствования и пробуждения от спячки могут включаться иные механизмы регуляции кальпаинов, как автолиз ферментов или активация их ингибиторов или блокаторов кальциевых каналов. В то время как повышенный цитозольный кальций остается наиболее вероятной причиной активации кальпаина, могут быть задействованы и другие механизмы. Активация кальпаинов может возникать при минимальном увеличении концентрации кальция или в его отсутствие, в результате увеличения фосфолипаз и процесса деградации фосфолипидов.

Литература

1. Гомазков О.А. Современные тенденции в исследовании физиологически активных пептидов // Успехи совр. биологии. – 1996. – Т. 116, № 1. – С. 60–68.
2. Croall D.E., Demartino G.N. Calcium-activated neutral protease (calpain) system: Structure, function and regulation // *Physiological Reviews*. – 1991. – Vol. 71, № 3. – P. 2345–2354.
3. Friedrich P., Papp H., Halasy K., Farkas A., Farkas B., Tompa P. Differential distribution of calpain small subunit and 2 in rat brain // *Eur. J. Neurosci*. – 2004. – Vol. 19. – P. 1819–1825.
4. Dear T.N., Moller A., Bohem T. Calpn 11: a calpain with high mRNA levels in testis and located on chromosome 6 // *Genomics*. – 1999. – № 59. – P. 243–247.
5. Zatz M., Staving A. Calpains and diseases // *N. Engl. J. Med*. – 2005. – Vol. 352. – P. 2413–2423.

6. Kroemer G., Reed J.C. Mitochondrial control of cell death // *Nat. Med.* – 2000. – Vol. 6. – P. 513–519.
7. Зиганишин Р.Х., Свиряев В.И., Васбковский Б.В., Михалева И.И., Сухова Г.С. Биологически активные пептиды, выделенные из мозга зимоспящих сусликов // *Биоорганическая химия*. – 1994. – Т. 20, № 8–9. – С. 899–916.
8. Калабухов Н.И. Спячка млекопитающих. – М.: Наука, 1985. – 258 с.
9. Baudry M., Bundman M.C., Smith E.K., Lynch G. Micromolar calcium stimulates proteolysis and glutamate binding in rat brain synaptic membranes // *Science*. – 1981. – Vol. 212. – P. 937–938.
10. Nilsson E., Karlsson J.O. Characterization of brain calpains // *J. Neurochem.* – 1986. – № 4. – P. 1086–1090.
11. Kohli V., Madden J.F., Bently R.C., Clavien P.A. Calpain mediated ischemic injury of the liver through modulation of apoptosis and necrosis // *Gastroenterology*. – 1999. – Vol. 111, № 1. – P. 168–178.
12. Крепс Е.М. Липиды клеточных мембран. Эволюция липидов мозга. Адаптационная функция липидов. – М.: Наука, 1981. – 340 с.
13. Болдырев А.А., Кяйвяряйнен Е.И., Илюха В.А. Биомембранология. – Петрозаводск: Изд-во Кар. НЦ РАН. – 2006. – 226 с.
14. Gil-Parrado S., Popp O., Knoch T.A., Zahler S., Bestvater F., Felgenträger M., Holloschi A., Fernández-Montalván A., Auerswald E.A., Fritz H., Fuentes-Prior P., Machleidt W., Spiess E. Subcellular localization and in vivo subunit interactions of ubiquitous μ -calpain // *J. Biol. Chem.* – 2003. – Vol. 18, № 16. – P. 336–346.
15. Saido T.C., Shibata M., Takenawa T., Murofushi H., and Suzuki K. Positive regulation of μ -calpain action by polyphosphoinositides // *J. Biol. Chem.* – 1992. – Vol. 267. – P. 24585–24590.
16. Wang L. Ecological, physiological and biochemical aspects of torpor in mammals and birds // *Advances in Comparative and Environmental Physiology*. – 1989. – Vol. 4. – P. 361–401.
17. Raison J.K., Lyons J.M. Hibernation: alteration of mitochondrial membranes as a requisite for metabolism at low temperature // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 1971. – Vol. 68. – P. 2092–2094.
18. Qiu K., Su Y., Block E. Use of recombinant calpain-2 siRNA adenovirus to assess calpain-2 modulation of lung endothelial cell migration and proliferation // *Mol. Cell. Biochem.* – 2006. – Vol. 292. – P. 69–78.
19. Moldoveanu T., Hosfield C.M., Lim D., Jia Z., Davies P.L. Ca^{2+} switch aligns the active site of calpain // *Cell*. – 2002. – Vol. 108. – P. 649–660.
20. Glading A., Lauffenburger D.A., Wells A. Cutting to the chase: calpain proteases in cell motility // *Trends. Cell. Biol.* – 2002. – Vol. 12. – P. 46–54.
21. Letarernier B., Zafrani L., Nassar D., Pevez J., Levi C., Bellocq A. Calpains contribute to vascular repair in rapidly progressive form of glomerulonephritis: proteinal role of their externalization // *Arterioscler Thromb. Vasc. Biol.* – 2012. – Vol. 32. – P. 335–342.
22. Geesink G.H., Nonneman D., Koonmaraie M. An improved purification protocol for heart and skeletal muscle calpastatin reveals two isoforms resulting from alternative splicing // *Arch. Biochem. Biophys.* – 1998. – Vol. 356. – P. 19–24.
23. Kang H., Kwak H.I., Kaunas R., Bayless K.J. Fluid shear stress and sphingosine 1-phosphate activate calpain to promote membrane type 1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP) membrane translocation and endothelial invasion into three dimensional collagen matrices // *J. Biol. Chem.* – 2011. – Vol. 286. – P. 42017–42026.

24. Dayton W.R., Reville W.J., Goll D.E., Srtomer M.H. A calcium ion-activation protease possibly involved in myofibrillar protein turnover. Partial characterization of the purified enzyme // *Biochemistry*. – 1976. – Vol. 15. – P. 2159–2167.

25. Sorimachi H., Ishiura S., Suzuki K. Structure and physiological function of calpains // *Biochem J.* – 1997. – Vol. 328. – P. 721–732.

26. Mehendale H.M., Limaye P.B. Calpain: a death protein that mediated progression of liver injury // *Trends Pharmacol. Sci.* – 2005. – Vol. 26, № 5. – P. 232–236.

Поступила в редакцию 15 февраля 2018 г.

UDC 577.29

DOI: 10.21779/2542-0321-2018-33-2-95-102

The activity of Ca^{2+} -dependent neutral proteinases in the liver of awake and hibernating ground squirrels

P.M. Nurmagomedova, M.M. Abasova, D.N. Dzhanbolatova

Dagestan State University; Russia, 367001, Makhachkala, M. Gadzhiev st., 43a; Parizat1949@bk.ru

The activity of Ca^{2+} -dependent neutral proteinases (calpains), which may directly or indirectly participate in the realization of the program of winter hibernation by heterotermes, has been studied. The activity and temperature dependence of calpains in the liver of awake and hibernating ground squirrels is determined. The temperature dependence of enzyme activity is presented in all investigated states: awake ground squirrels in summer and autumn, the middle of the bout of the first, second, third months of hibernation, the exit of hibernation after the third month of hibernation. The activity of enzymes in summer (July–August) and autumn (September) ground squirrels is not high. In autumn it is 2 times lower than in summer. In the first month of hibernation, the activity of the calpain is close to the level of the awake. With each month of prolongation of hibernation, the activity of enzymes rises and reaches the maximum values at the end of the bout after three months of hibernation. The graph of the temperature dependence of the activity of the enzyme of the waking gophers in September and during the period of emergence from the bout of the third month of hibernation is linear. The activation energy for these states is 18.5 kJ and 19 kJ, respectively. In the middle of the bout of the first month of hibernation, there is a break at a temperature of 20 °C. Moreover, the activation energy below the salient point (17.2 kJ) is slightly different from that above the salient point (18.7 kJ). Approximately the same picture is observed in the middle of the second month of hibernation (the activation energy is lower and higher than the salient point of 17.5 and 19 kJ, respectively). The break in the graph is one of the examples of changes in the functions of the membrane enzyme, as well as the phase transition in membrane lipids from the liquid crystalline state to the state of the gel, leading to an increase in the activation energy. A linear straight line (with single activation energy) in the range of physiological temperature change (2–37 °C) shows cold resistance of the enzymes studied, while a nonlinear graph proves the cold sensitivity.

Keywords: *hibernation, enzymes, calpains, temperature dependence, activation energy.*

Received 15 February, 2018