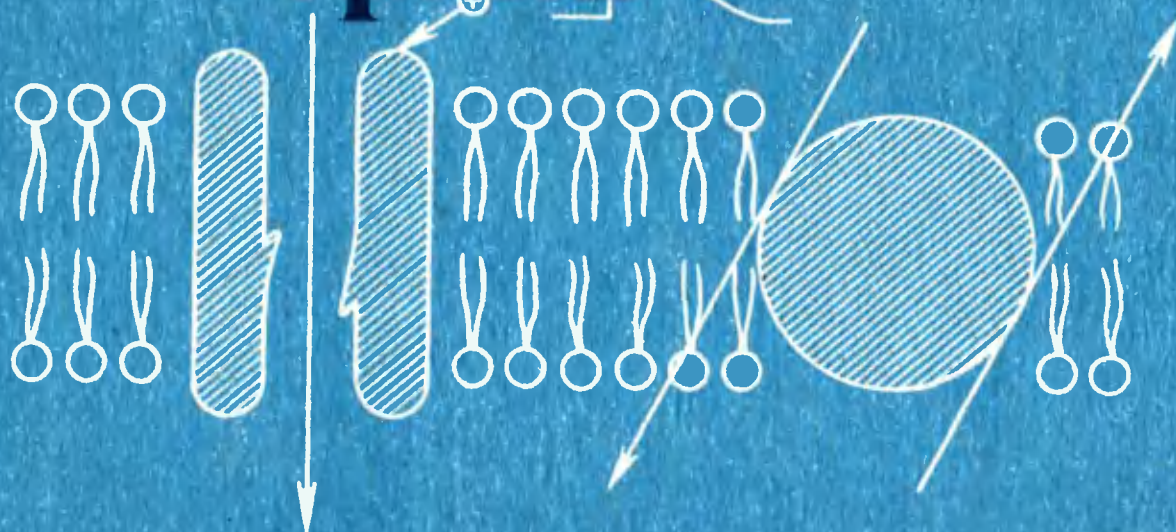


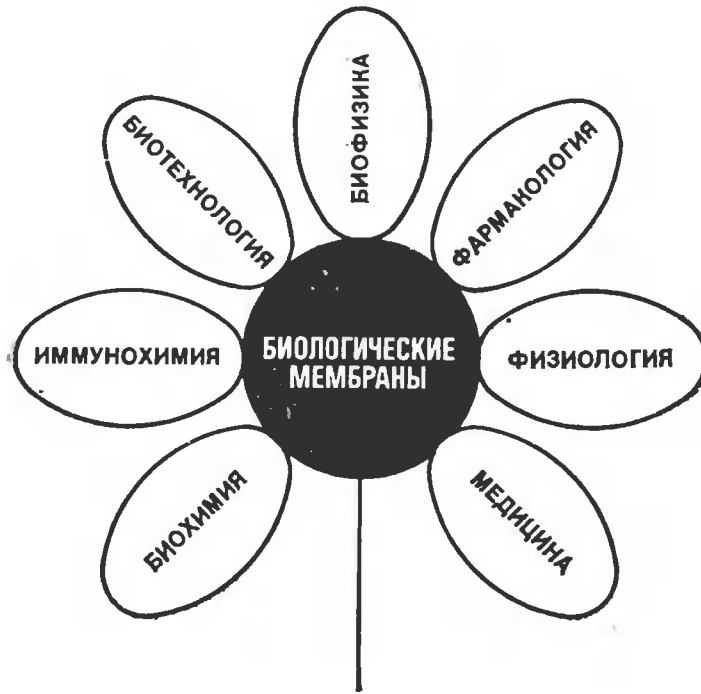
Б. 76  
А. 34

# БИОХИМИЯ МЕМБРАН

Д.О. ЛЕВИЦКИЙ

## Кальций и биологические мембраны





# **БИОХИМИЯ МЕМБРАН**

Под редакцией  
А.А. Болдырева

**Книга 7**

Д.О.ЛЕВИЦКИЙ

# Кальций и биологические мембраны



МОСКВА  
«ВЫСШАЯ ШКОЛА» 1990

ББК 28.05

Б 63

УДК 577.1

Рекомендовано Государственным комитетом СССР по народному образованию для использования в учебном процессе

Рецензенты:

кафедра гистологии, цитологии и эмбриологии 1-го Московского медицинского института им. И. М. Сеченова (зав. кафедрой проф. Ю. А. Афанасьев);

д-р биол. наук Н. Б. Гусев (Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова)

Б 1903010000(4309000000)—464—20—90  
001(01)—90

ISBN 5-06-000466-X

© Д. О. Левицкий, 1990

---

## Предисловие

---

Настоящее издание представляет собой седьмую книгу продолжающейся серии «Биохимия мембран», задачей которой является освещение современного состояния новой области естествознания — биомембранологии. Исследование процессов межклеточных взаимодействий, механизмов, которые используются клетками для изменения интенсивности и характера их метаболизма в соответствии с условиями среды, привело к обнаружению категории новых регуляторов — вторичных посредников или мессенджеров (second messengers). В роли таких посредников выступают как быстро метаболизирующие соединения — диацилглицерин, фосфоинозитиды, циклические нуклеотиды, так и неметаболизирующие (стабильные), которые управляют метаболизмом посредством изменения концентрации, доступной специальным белкам-мишеням.

Вторичным посредником такого рода является кальций. Изучение способов регуляции концентрации ионизированного кальция в клетке, выяснение механизмов, управляющих его взаимодействием со связывающими его белками, а также характер и способ трансформации сигнала от вторичного мессенджера на исполнительные механизмы клетки открывает принципиально новые возможности «настройки» клеточного метаболизма.

Биомембраны обладают уникальными возможностями для реализации Са-индуцируемых регуляторных процессов, важных для всех проявлений жизнедеятельности, включая клеточный цикл, пролиферацию тканей, возбудимость нервных и мышечных клеток и т. д.

Без рассмотрения Са-чувствительности метаболизма проблематика биохимии мембран была бы неполной. В центре внимания проблем, обсуждаемых в данном пособии, находятся общие механизмы регуляции уровня Са<sup>2+</sup> в клетках. Кроме того, рассмотрено участие Са<sup>2+</sup> и других вторичных мессенджеров в регуляции важнейших процессов жизнедеятельности, среди которых тромбообразование, сокращение мышц, оплодотворение, экзоцитоз и секреция. Подчеркивается важная роль

мембран и интегральных мембранных белков в передаче и восприятии «кальциевого сигнала».

Значительное внимание уделено и методическим подходам к изучению механизмов перераспределения ионов кальция между внеклеточной средой и цитоплазмой и во внутриклеточном пространстве. Рассмотрены свойства и применение в биомембранологии кальциевых ионофоров и Са-индикаторов для изучения биомембран и мембранных (канальных и транспортных) структур. Представлены новые данные о строении и особенностях функционирования мембранных кальцийпереносящих систем, в том числе Са-АТФаз, Са-селективных каналов и Са-переносчиков. Фактический материал, обобщенный в настоящем изложении, дополняет и углубляет представления, систематически излагаемые в продолжающейся серии «Биохимия мембран».

Книга может быть полезна студентам, аспирантам и молодым ученым, специализирующимся в области мембранной регуляции метаболизма по специальностям «биохимия», «биофизика», «физиология» и «молекулярная биология».

*Автор*



---

## Введение

---

**Кальций** — один из наиболее распространенных элементов живой материи. По относительному содержанию в организме млекопитающих он уступает лишь водороду, углероду, азоту, кислороду и натрию. Из этого вытекает очевидный вывод об исключительной важности  $\text{Ca}^{2+}$  в биологических системах. Следует, однако, принимать во внимание, что, во-первых, примерно 90% всего кальция сосредоточено в костных тканях и не может быть быстро мобилизовано. Во-вторых, внутриклеточная концентрация «свободного», т. е. не ассоциированного с белками и низкомолекулярными веществами  $\text{Ca}^{2+}$  в десятки тысяч раз ниже концентраций таких, например, катионов, как  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$  или  $\text{Mg}^{2+}$ . Именно благодаря чрезвычайно низкой концентрации кальция в цитоплазме клеток и существованию высоких градиентов  $\text{Ca}^{2+}$  на клеточных мембранах этот ион играет *ключевую роль* в жизнедеятельности практически всех животных и растительных организмов.

Впервые на важную функцию кальция как внутриклеточного регулятора указали результаты классических опытов английского физиолога С. Рингера, показавшие, что механическая активность сердца резко тормозится в условиях, когда кальций удаляют из внешней среды. С момента этого открытия прошло уже 100 лет, однако интерес естествоиспытателей к  $\text{Ca}^{2+}$  не только не ослабевает, но растет год от года. С 1981 г. выходит в свет специальный международный журнал «Клеточный кальций» — периодическое научное издание, целиком посвященное биологической функции отдельного иона. Почему, несмотря на многообразие кальцийзависимых процессов в организмах, оказалось возможным объединение статей в одном журнале? Можно задать и более общий вопрос: исходя из каких структурных свойств именно кальций в ходе эволюции живой материи был выбран Природой в качестве посредника и регулятора самых различных функций и метаболических реакций клеток? В ходе последующего изложения мы постараемся дать ответ на эти вопросы.



---

# Кальций как универсальный регулятор внутриклеточных процессов

---

# 1

## 1.1. Распределение кальция в организме и клетках

Концентрация кальция в крови (10 мг%, или 2,5 мМ) меняется не более чем на 3% и поддерживается в основном с помощью паратгормона, витамина D и тирокальцитонина, которые обеспечивают адсорбцию этого катиона кишечником, выведение из организма или отложение в костях. Основная масса кальция сосредоточена в костном скелете, который служит как бы буфером для ионов, циркулирующих в кровотоке. По крайней мере половина кальция в крови связана с белками плазмы, главным образом с *альбумином*. Общее содержание  $\text{Ca}^{2+}$  в клетках тканей может достигать 10 ммоль/кг, т. е. уровня, превышающего его концентрацию во внеклеточной жидкости. Большая его часть связана внутри клеток с растворимыми лигандами (нуклеотидами, неорганическим фосфатом, цитратом, белками, например кальмодулином) и клеточными мембранами или аккумулярована во внутриклеточных депо.

Различают *три состояния  $\text{Ca}^{2+}$  в клетке*: 1)  $\text{Ca}^{2+}$ , локализованный внутри клеточных органелл, в том числе в сети эндоплазматического ретикулума, в ядрах, митохондриях, секреторных гранулах, лизосомах; 2) хелатированный  $\text{Ca}^{2+}$ , т. е. тот, который ассоциирован с анионом или молекулой цитоплазматического белка, и 3) свободный, или ионизированный  $\text{Ca}^{2+}$ , находящийся в равновесии с хелатированным  $\text{Ca}^{2+}$ .

Именно *свободный  $\text{Ca}^{2+}$  является регулятором разнообразных внутриклеточных процессов*. Методы оценки его концентрации будут изложены в гл. 3.

## 1.2. Барьерная функция плазматических мембран

В покоящихся клетках, т. е. в клетках, не воспринявших специфического внешнего сигнала, концентрация свободного (ионизированного) кальция чрезвычайно мала — 0,01 — 0,1 мкмоль/л (мкМ); иными словами, в 1 мкм<sup>3</sup> цитоплазматического пространства содержится от 6 до 60 ионов кальция. Во внеклеточной среде концентрация  $\text{Ca}^{2+}$  достигает 1,5—2,5 ммоль/л. В соответствии с этим: 1) поверхностная мембрана клетки (плазмалемма) обладает весьма низкой проницаемостью для кальция; 2) в клетке существуют системы кальциевых насосов, обладающие высоким сродством к кальцию и выводящие его против высокого концентрационного градиента во внеклеточное пространство (этот процесс является энергозависимым); 3) кальций является эффективным регулятором метаболических процессов во всех клетках, где существуют системы, реагирующие на небольшие изменения концентрации  $\text{Ca}^{2+}$ .

Как правило, мишени для кальция внутри клеток — это белки, способные активироваться при изменениях его концентрации в диапазоне от 0,1 до 10 мкмоль/л. В настоящее время выявлено по меньшей мере 100 кальцийсвязывающих белков, и список их, по-видимому, далеко не полон. В их числе такие хорошо изученные «растворимые» белки, как широко распространенный *кальмодулин*, *парвальбумин* (мышцы и нервная ткань), *кальцинейрин* (мозг), *тропонин С* (поперечно-полосатые мышцы), *миозин*. Естественно, что высоким сродством к кальцию обладают и ферменты биомембран, обеспечивающие удаление этого катиона из внутриклеточного пространства.

## 1.3. Теория «вторичного мессенджера»

В 1980 г. Г. Расмуссен сформулировал концепцию, согласно которой  $\text{Ca}^{2+}$  выполняет функцию «вторичного посланника», или «вторичного мессенджера» («первичный посланник» — это гормон, нейромедиатор, фактор роста, свет, т. е. любой агент, воздействующий на наружную поверхность клетки и передающий ей соответствующий сигнал из внешней среды).

Суть концепции вторичных мессенджеров состоит в следующем. Действие большинства первичных мессенджеров обусловлено их связыванием со специфическими рецепторами на поверхностных мембранах клеток. Формирование комплексов рецептор—лиганд обеспечивает проведение специфического трансмембранного сигнала в клетку благодаря образованию или изменениям концентрации внутриклеточных вторичных

мессенджеров ( $\text{Ca}^{2+}$ , циклических нуклеотидов, диацилглицерина, инозиттрисфосфата). Ряд внеклеточных факторов вызывает увеличение концентрации циклического аденозинмонофосфата (цАМФ), в большинстве же случаев механизм передачи сигнала через мембрану обеспечивается метаболизмом фосфоинозитидов в мембране и увеличением внутриклеточной концентрации  $\text{Ca}^{2+}$ .

В любой клетке концентрация кальция непостоянна: она меняется под действием определенного стимула извне. При этом увеличение концентрации кальция в клетке вызывается активацией специфических *кальцевых каналов* в плазмалемме или во внутриклеточных мембранах. Каналы находятся в открытом состоянии до тех пор, пока не прекратится активирующее воздействие или не произойдет «самоинактивация» канала. Благодаря высокому концентрационному градиенту ионы  $\text{Ca}^{2+}$  из среды поступают в клетку, и уровень кальция во внутриклеточном пространстве увеличивается до 1—10 мкмоль/л. Это приводит к насыщению участков связывания  $\text{Ca}^{2+}$  на соответствующих цитоплазматических белках. Модифицированные кальцием белки-регуляторы связываются с другими белками-мишенями и активируют различные ферментативные процессы. После прекращения действия внешнего сигнала системы кальцевых насосов понижают концентрацию кальция в цитоплазме до исходного уровня и подготавливают клетку к восприятию нового сигнала. Наиболее яркий пример такой последовательности событий — это циклическое перераспределение  $\text{Ca}^{2+}$  в сокращающейся клетке сердца (см. гл. 6).

*Кальций — единственный универсальный вторичный мессенджер клеток животных и растений.* Другие вторичные мессенджеры — цАМФ, инозиттрисфосфат и диацилглицерин — функционируют, по всей видимости, преимущественно в клетках животных. Наиболее распространенным рецептором для  $\text{Ca}^{2+}$  в большинстве клеток является низкомолекулярный белок *кальмодулин* (Км). Этот белок не претерпел существенных изменений в ходе эволюции, поэтому физико-химические свойства Км, выделенного из разных источников, практически идентичны. Кальмодулин содержит четыре Са-связывающих участка с константами диссоциации ( $K_d$ ) от 4 до 20 мкМ. В результате связывания  $\text{Ca}^{2+}$  происходит изменение конформации белка (см. разд. 2.2) и его активация. После этого комплекс Км— $\text{Ca}^{2+}$  связывается с белками-мишенями, в том числе мембранными, *стимулируя* (аденилатциклаза, Са-АТФазы плазматической мембраны, киназа фосфорилазы, фосфолипаза  $A_2$ , цАМФ-фосфодиэстераза) или *ингибируя* (15-оксипростагландиндегидрогеназа, гликогенсинтетаза) их активность.

В последние годы наблюдается повышенный интерес к диацилглицерину, инозиттрисфосфату и протеинкиназе С. Он воз-

ник после того, как было обнаружено, что форболовые эфиры, которые способствуют развитию опухолей и влияют на целый ряд реакций, связанных с пролиферацией и дифференциацией клеток, используют в качестве мишени некую фосфолипидзависимую протеинкиназу. Сродство наиболее активного форболового эфира — ТФА (рис. 1) к протеинкиназе чрезвычайно высоко: значения соответствующих констант диссоциации комплекса достигают 60 пМ.

Рецептор форболовых эфиров обнаружен во всех исследованных тканях животных. Его концентрация наиболее высока в мозгу, кишечнике и селезенке. Форболовые эфиры связываются со всеми мембранными фракциями (преимущественно с микросомальной), но не взаимодействуют с компонентами цитозоля. Из этого, однако, не следует, что рецепторы этих эфиров отсутствуют в цитозоле. Установлено, что *рецептор существует в двух формах*: растворимой и мембраносвязанной, его переход во вторую форму осуществляется под воздействием  $\text{Ca}^{2+}$  и кислых фосфолипидов. Важность этого наблюдения трудно переоценить. Действительно, если в клетке происходят периодические изменения концентрации  $\text{Ca}^{2+}$ , то этот рецептор, проявляющий протеинкиназную активность, может оказывать *регуляторное воздействие на ферменты мембран за счет их фосфорилирования*.

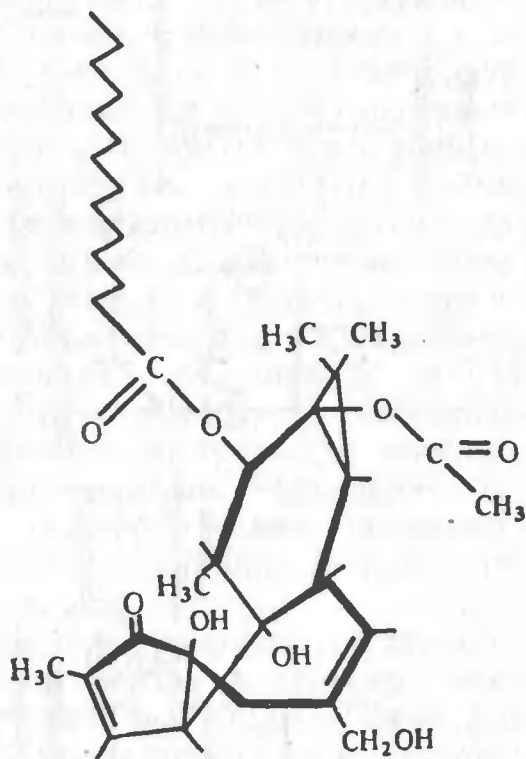


Рис. 1. Структура наиболее активного форболового эфира—12-*о*-тетрадеканойлфорбол-13-ацетата (ТФА)

Рецептор форболовых эфиров —  $\text{Ca}$ -активируемая, фосфолипидзависимая протеинкиназа была названа *протеинкиназой С* (Y. Takai et al., 1979). Она активируется  $\text{Ca}^{2+}$ , фосфатидилсеринем, форболовыми эфирами и 1, 2-диацилглицерином (причем моно- и триацилглицериды неактивны). Диацилглицерин образуется из инозитольных фосфолипидов (рис. 2); он способен активировать протеинкиназу в отсутствие  $\text{Ca}^{2+}$ . Находясь в среде вместе с  $\text{Ca}^{2+}$ , диацилглицерин усиливает его действие на протеинкиназу, повышая, как форболовые эфиры, сродство фермента к  $\text{Ca}^{2+}$ .

Предполагают, что протеинкиназа С — мишень для многих гормонов, факторов роста и других стимулов, вызывающих



изменения в клетке путем модуляции превращений инозитольных фосфолипидов.

Наиболее распространенный инозитсодержащий фосфолипид — *фосфатидилинозит* — содержит *миоинозит*, присоединенный к фосфату фосфатидной кислоты через гидроксильную группу в 1-м положении. При последовательном присоединении к нему двух фосфатных остатков, катализируемом соответствующими киназами, образуется фосфатидилинозит-4, 5-бисфосфат (рис. 2). Гидролиз фосфатидилинозит-4, 5-бисфосфата катализирует особая фосфодиэстераза типа фосфолипазы С. Этот фермент активируется при связывании рецепторов клетки с различными гормонами и нейромедиаторами (например, катехоламинами). Продуктами расщепления фосфатидилинозит-4, 5-бисфосфата являются два ключевых вторичных мессенджера — *инозиттрисфосфат* (инозит-1, 4, 5-трисфосфат, ИФ<sub>3</sub>) и *диацилглицерин*.

Инозиттрисфосфат вызывает мобилизацию внутриклеточного  $\text{Ca}^{2+}$  в различных органах и тканях (см. разд. 6.3 и 7.1), а диацилглицерин активизирует протеинкиназу С. Активированная протеинкиназа С встраивается в мембраны и фосфорилирует различные мембранные белки-мишени. Увеличение концентрации внутриклеточного  $\text{Ca}^{2+}$ , образование комплекса  $\text{Км} - \text{Ca}^{2+}$  и фосфорилирование соответствующих белков обеспечивают специфические ответы клеток.

Систему обмена фосфоинозитидов регулируют многие факторы, что обеспечивает тонкую «настройку» клеточного метаболизма. Как было указано выше, активирующий эффект диацилглицерина на протеинкиназу С усиливается под действием  $\text{Ca}^{2+}$ . В последние годы получены данные о том, что в регуляции метаболизма фосфатидилинозитидов участвуют *ГТФ-связывающие белки* (*G*-белки) — универсальные посредники передачи внутриклеточных сигналов. В случае аденилатциклазы регуляторный контроль осуществляется с помощью стимулирующего *G*-белка ( $G_s$ ) и ингибирующего *G*-белка ( $G_i$ ). Предполагают, что клеточные рецепторы, ответственные за мобилизацию  $\text{Ca}^{2+}$ , взаимодействуют с особым *G*-белком ( $G_p$ ), активирующим фосфолипазу С и образование инозиттрисфосфата и диацилглицерина. Этот белок работает по такому же принципу, как и *G*-белки, регулирующие активность аденилатциклазы.

Следует упомянуть, что диацилглицерин содержит, как правило, во втором положении остаток арахидоновой кислоты. Образующаяся под действием фосфолипазы С свободная арахидоновая кислота представляет собой исходный материал для синтеза физиологически активных соединений — *простагландинов*. Они, в свою очередь, способны эффективно модулировать разнообразные реакции активированной клетки.

Естественно, что концентрация любого вторичного мессенджера в клетке не постоянна во времени. Внутриклеточный уро-



вень  $\text{Ca}^{2+}$  регулируется при помощи систем кальциевых насосов и кальциевых каналов. Цикличность регуляторного воздействия диацилглицерина обеспечивается тем, что он в присутствии АТФ фосфорилируется до фосфатидной кислоты, из которой под действием ЦТФ ресинтезируется фосфатидилинозит (рис. 3).

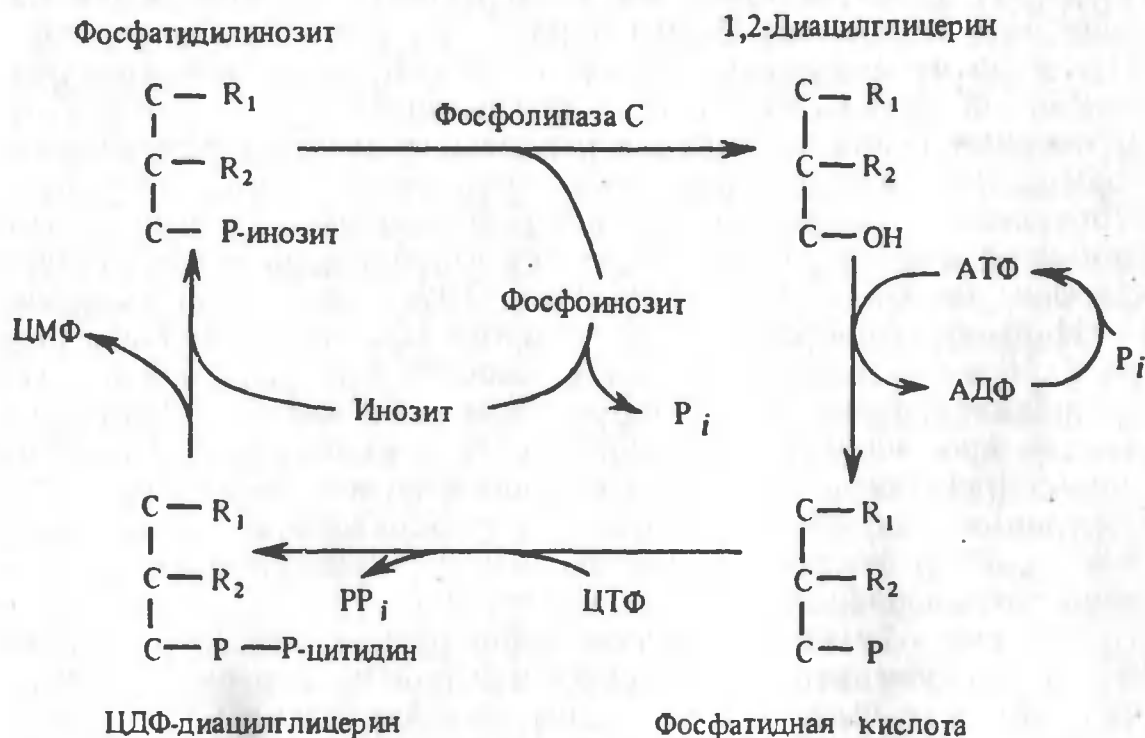


Рис. 3. Фосфоинозитидный обмен в клетках

Данная схема применима также для метаболизма полифосфатидилинозитов, т. е. процесса, связанного с образованием инозитбисфосфата, инозиттрисфосфата и др. Последние дефосфорилируются с помощью соответствующих фосфатаз



---

# Физико-химические свойства кальция

---

2

В ходе эволюции кальций стал ключевым и универсальным вторичным мессенджером. Это произошло потому, что лишь тот компонент морской воды мог стать ионом-регулятором для одноклеточных организмов, возникших в первичном океане, который существует там в достаточно высокой концентрации. Действительно, только в этом случае может быть обеспечен его высокий градиент по обе стороны клеточной мембраны. Внеклеточная жидкость и плазма крови некоторых организмов, например лягушки (А. А. Болдырев, 1986), по составу весьма близки морской воде. Поэтому возможно предположить, что основные принципы ионной регуляции у первых одноклеточных были без изменений реализованы и в многоклеточных организмах.

## 2.1. Структура иона кальция

Существует несколько основных «кандидатов» на роль иона — вторичного посредника в клетке. Сульфат, бикарбонат и фосфат — очень крупные многоатомные анионы, а анион хлора обладает сравнительно большим радиусом и несет, к тому же, всего один заряд. Поэтому эти анионы не способны к прочному связыванию с макромолекулами, в частности с белками. Калий также имеет относительно большой ионный радиус. Ион натрия, хотя и обладает радиусом, близким радиусу иона кальция (соответственно 0,102 и 0,100 нм при координационном числе 6), но, как и ион калия, однозаряден. Большие размеры анионов и единичный заряд у калия и натрия, по-видимому, затрудняют формирование достаточно прочных их связей с белковыми лигандами.

Таким образом, Природа должна была осуществить выбор только между  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{Mg}^{2+}$ . Различия между этими ионами сводятся к следующему. Ион кальция по размерам крупнее магния и именно поэтому ему свойственно образование большего числа координационных связей — преимущественно 8 и 7,

реже 6 (координационное число соответствует числу атомов, способных непосредственно взаимодействовать с данным атомом за счет формирования донорно-акцепторных и ион-дипольных связей). Для магния характерно координационное число 6. С учетом катионных чисел, оптимальных для каждого из рассматриваемых двухвалентных катионов, кальций имеет на 0,04 нм больший эффективный радиус по сравнению с магнием.

Длина связи, образуемой  $\text{Ca}^{2+}$  при взаимодействии с лигандом, варьирует в гораздо большей степени, чем длина связи, образуемой  $\text{Mg}^{2+}$ . Например, длина связи  $\text{Ca}—\text{O}$  может составлять от 0,23 до 0,26 нм, а связи  $\text{Mg}—\text{O}$  — от 0,20 до 0,21 нм. Таким образом,  $\text{Mg}^{2+}$  предпочитает образовывать правильные шестикординационные октаэдрические комплексы со связями вполне определенной длины, а  $\text{Ca}^{2+}$  формирует лабильные комплексы с более высоким и изменяющимся координационным числом и различной длиной связей. Кроме того,  $\text{Ca}^{2+}$  в отличие от  $\text{Mg}^{2+}$  предпочитает не образовывать связей с атомами азота в составе белковых молекул.

Ион магния не использует полностью свою способность к образованию шести координационных связей с белком, поскольку часть их «расходуется» на взаимодействие с водой. Уменьшение числа связей с белковыми лигандами значительно уменьшает их сродство к  $\text{Mg}^{2+}$ . В то же время  $\text{Ca}^{2+}$  имеет больший запас координационных связей, и это позволяет ему осуществлять шестикординационную связь с белком. Наконец, благодаря большему размеру и способности формировать шесть, семь и восемь связей  $\text{Ca}^{2+}$  может подстраиваться под меняющуюся структуру участка связывания, а  $\text{Mg}^{2+}$  как бы заставляет участок подлаживаться под его жестко детерминированную структуру. Следует также отметить, что  $\text{Ca}^{2+}$  способен замещаться в комплексе с лигандом примерно в 1000 раз быстрее, чем  $\text{Mg}^{2+}$ .

Вероятно, в силу всех изложенных причин живые системы «избрали» *ион кальция на роль вторичного мессенджера* в регуляции метаболизма. Естественно, что изложенные выше соображения относительно выбора иона — вторичного посредника, основаны на том допущении, что исследователь, опираясь на нынешний уровень познания, способен решить одну из многочисленных загадок Природы. В истории, однако, было слишком много случаев, когда внешне привлекательные концепции оказывались несостоятельными. Вполне возможно, например, что выбор вторичного мессенджера был сделан совершенно случайным образом.

## 2.2. Связывание $\text{Ca}^{2+}$ и других катионов с различными лигандами

Ион кальция оказывает существенное влияние на структуру и стабильность мембран.

Согласно современным воззрениям липидный компонент биомембран представляет собой не консервативный матрикс для интегральных и периферических белков, а *динамическую структуру*, в которой постоянно происходят фазовые переходы, связанные, в частности, с формированием *кластеров липидных молекул*. В процессе кластеризации кислых фосфолипидов и ганглиозидов активно участвуют ионы кальция. Предполагают, что ганглиозиды, представляющие собой амфифильные липиды, играют определенную роль в восприятии и передаче сигнала через плазматическую мембрану клетки. Переход молекул ганглиозидов в кластеризованное состояние зависит от их концентрации в мембране и существенно ускоряется в присутствии физиологических концентраций  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{Mg}^{2+}$ , но не одновалентных катионов. Считают, что кластеризующее действие  $\text{Ca}^{2+}$  обусловлено сдвигом равновесия при обратимой ассоциации кластеров за счет снижения сил электростатического отталкивания между молекулами сахаров, выступающих из мембраны (G. Tettamanti, M. Masserini, 1987). Таким образом,  $\text{Ca}^{2+}$  играет роль агента, «сшивающего» *индивидуальные липиды в мембране*.

Способность липидных и белковых компонентов мембран к обратимым переходам (в плоскости мембраны) из неупорядоченного состояния в гетерогенное, формированию и исчезновению кластеров имеет прямое отношение к передаче информации через мембрану. Согласно одной из гипотез (Y. Schiffman, 1982) *мембрана, будучи в активном состоянии и в состоянии покоя, различается структурно*. Гомогенное, или случайное, распределение мембранных компонентов соответствует так называемому *базальному состоянию мембраны*. Под действием лигандов, вызывающих латеральные перемещения (т. е. в плоскости мембраны), происходит кластеризация молекул. Это соответствует созданию упорядоченной мембранной структуры — организации по типу «решетки». Предполагают, что формирование кластеров или короткоживущих микродоменов в мембране может обеспечивать быстрые функциональные ответы мембранных рецепторов. Описываемая модель удовлетворительно объясняет сложные ответы клетки на внешний сигнал, предполагающие кооперативные взаимодействия, например сигмоидальные и гиперболические зависимости ответа клетки от концентрации эффекторов.

Данная гипотеза подтверждается некоторыми экспериментальными данными. Так, при изучении щелевых контактов в

нервной ткани краба методом замораживания — скалывания (см. разд. 5.1) установлено, что ионы кальция вызывают агрегацию внутримембранных частиц (С. Peracchia, A. F. Dulhunty, 1976). Помещение образца в раствор с низкой концентрацией  $\text{Ca}^{2+}$  приводит к нарушению упорядоченности мембранных компонентов.

Упорядоченность биомембран проявляется не только в плоскости бислоя, но и в трансмембранном распределении фосфолипидов различных типов. Что обуславливает асимметрию биомембран и в чем ее физиологическая значимость? В любых клетках существуют более чем 1000-кратные трансмембранные кальциевые градиенты. В связи с этим возникло предположение, что именно  $\text{Ca}^{2+}$  обеспечивает асимметрическое распределение липидов в мембранном бислое, «притягивая» отрицательно заряженные фосфолипиды, например фосфатидилсерин, к поверхности плазматической мембраны, обращенной во внеклеточное пространство. С другой стороны, асимметрия бислоя могла бы поддерживаться ионами кальция и во внутриклеточных мембранах. Действительно, *кардиолипин* — чисто митохондриальный кислый фосфолипид, обладающий высоким сродством к  $\text{Ca}^{2+}$  — локализуется на поверхности внутренней мембраны митохондрий, которая обращена в матрикс (J. J. R. Krebs et al., 1979).

Однако заманчивая гипотеза, предполагающая зависимость распределения кислых фосфолипидов в мембране от градиента  $\text{Ca}^{2+}$ , не получила однозначного подтверждения в ряде экспериментов, выполненных на изолированных внутриклеточных мембранах. Кроме того, в исследованиях локализации фосфолипидов в мембране эритроцитов (просто устроенных клеток) установлено иное распределение молекул липидов: *холинсодержащие липиды* (фосфатидилхолин и сфингомиелин) локализовались преимущественно на внешней поверхности мембраны, а *аминофосфолипиды* (фосфатидилсерин и фосфатидилэтаноламин) — на внутренней. В то же время показано, что в процесс создания асимметрии бислоя мембраны эритроцитов вовлечен белок — *аминофосфолипидтранслоказа*. При этом перенос фосфолипидов осуществляется энергозависимым образом, в результате гидролиза АТФ специальной фосфатазой (M. Seigneuret et al., 1984).

Ионы кальция способны взаимодействовать с фосфатидной кислотой и изменять проницаемость мембран, содержащих этот фосфолипид. Если липосомы загрузить анионами, например сульфатом, то под действием 1—2 мМ  $\text{Ca}^{2+}$  (но не  $\text{Mg}^{2+}$ ) наблюдается усиленный выход аниона в среду, причем этот процесс удается обратить в присутствии кальциевого комплекса — этиленгликоль-бис-( $\beta$ -аминоэтил) N, N'-тетраацетата (ЭГТА). Таким образом, изменение проницаемости мембран,

содержащих фосфатидную кислоту,—результат обратимого взаимодействия  $\text{Ca}^{2+}$  с мембранными пузырьками.

Модификация липидного бислоя неизбежно отражается на его проницаемости для ионов кальция. Например, сапонины, специфически взаимодействующие с холестерином плазматической мембраны, увеличивают силу сокращения сердца, что обусловлено повышением внутриклеточного уровня  $\text{Ca}^{2+}$ . Этот эффект связан с воздействием сапонинов на упорядоченность ацильных цепей фосфолипидов. Однако сапонин не только увеличивает пассивный трансмембранный перенос  $\text{Ca}^{2+}$ , но и стимулирует активность системы  $\text{Na}/\text{Ca}$ -обмена через сарколемму сердца (Y. Yamasaki et al., 1987).

Стимулирующее воздействие на систему  $\text{Na}/\text{Ca}$ -обмена, описанную в гл. 4, а также на  $\text{Ca}$ -зависимый потенциал действия в сердце оказывает фосфолипаза D, расщепляющая фосфолипиды с образованием фосфатидной кислоты. Следовательно, изменения структуры и состава липидного бислоя приводят к модификации свойств различных кальцийтранспортирующих мембранных систем.

Однако основную функцию вторичного мессенджера ион кальция выполняет, взаимодействуя не с липидным бислоем мембран, а с белками, в том числе мембранными. Список  $\text{Ca}$ -связывающих белков растет с каждым годом. Анализ аминокислотной последовательности нескольких  $\text{Ca}$ -связывающих белков (тропонина С, кальмодулина, киназы легких цепей миозина, парвальбумина и витамин D-зависимого кальцийсвязывающего белка) выявил высокую степень гомологии их первичной структуры.

Это позволило предположить (Goodman et al., 1979), что все они произошли от одного предшественника. В то же время изменения этих белков в процессе эволюции происходили с очень низкой скоростью (для кальмодулина время индукции 1% точечных мутаций составляло около 400 млн. лет). Предполагают, что каждый из данных белков содержит участок, связывающий  $\text{Ca}^{2+}$  с высоким сродством, который имеет структуру спираль — петля — спираль (R. H. Kretzinger, 1976). Петля, обеспечивающая связывание  $\text{Ca}^{2+}$ , включает 12 аминокислотных остатков, из которых 6 образуют координационные связи с  $\text{Ca}^{2+}$  за счет боковых карбоксильных или гидроксильных групп.

Кальмодулин и тропонин С способны связывать четыре иона кальция, киназа легких цепей миозина — один, парвальбумин — два. Связывание четырех ионов кальция с кальмодулином осуществляется последовательно и с положительной кооперативностью, т. е. при взаимодействии первого иона кальция с молекулой кальмодулина облегчается связывание второго иона кальция за счет изменения конформации белка. Для полной



активации кальмодулина достаточно насытить кальцием три из четырех участков связывания.

Взаимодействие  $\text{Ca}^{2+}$  с кальмодулином обнажает гидрофобные участки, с которыми связываются ингибирующие лиганды, такие, как верапамил, большая группа фенотиазинов, включая трифторперазин (рис. 4, А). Сродство фенотиазинов к кальмо-

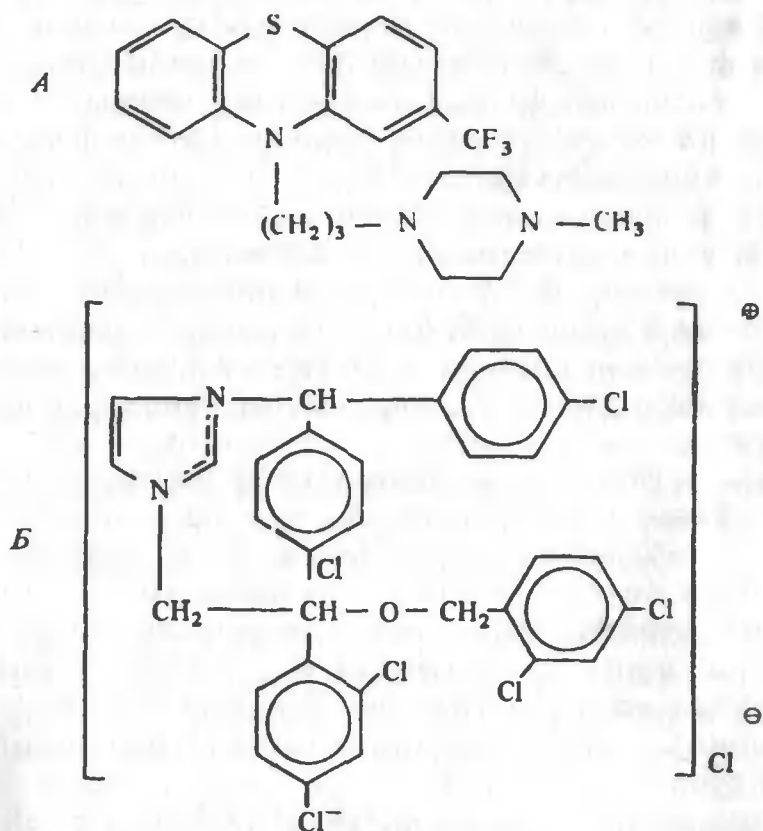


Рис. 4. Структура ингибиторов кальмодулина: трифторперазина (А) и кальмидазолия (Б)

дулину целиком определяется степенью их гидрофобности. Наиболее широко в биохимических исследованиях используют **трифторперазин**. Так как часть внутриклеточного кальмодулина прочно связана со своими белками-мишенями, большинство данных о его вовлеченности в те или иные физиологические ответы и метаболические реакции клетки получено с помощью кальмодулиновых ингибиторов, в частности трифторперазина.

К сожалению, до сих пор нельзя утверждать со всей определенностью, что все наблюдаемые эффекты фенотиазинов обусловлены именно их связыванием с кальмодулином, а не с мембраной, которая заметно модифицируется этими гидрофобными соединениями. В концентрациях, сравнимых с используемыми для ингибирования кальмодулина, фенотиазины блокируют  $\text{Na}$ ,  $\text{K}$ -АТФазу, а еще в более низких концентрациях (от 0,5 до

10 мкмоль/л) они подавляют проведение нервного импульса (эффект местного анестетика), высвобождение дофамина, обратный захват норадреналина, дофамина и серотонина (В. D. Roufogalis, 1982). Сравнительно недавно описано соединение — кальмидазолий (рис. 4, Б), обладающее по сравнению с трифторперазином в 500 раз большим сродством к кальмодулину.

Механизм действия ингибиторов кальмодулина объясняется тем, что гидрофобный участок белка, экспонируемый при занятии  $\text{Ca}$ -связывающих центров, взаимодействует как с кальмодулинзависимыми белками, так и с ингибиторами.

В гл. 4 на примере  $\text{Ca}$ -АТФазы эритроцитов будет рассмотрен механизм активации кальцийзависимого мембранного фермента комплексом  $\text{Km} - \text{Ca}^{2+}$ , а в гл. 7 представлено объяснение терапевтического действия фенотиазинов как психотропных агентов.

Кальмодулин, по всей видимости, — не единственный внутриклеточный  $\text{Ca}$ -связывающий белок, способный выполнять функцию вторичного мессенджера. С использованием аффинной хроматографии, где в качестве лиганда использовали фенотиазины, открыт новый класс кальцийсвязывающих белков. Эти белки — *кальцимедины*, извлеченные из экстрактов ряда тканей, отличаются от кальмодулина по молекулярной массе, изоэлектрической точке и ряду других свойств. К кальцимединам близки калелектрины из некоторых тканей млекопитающих и электрического органа ската, сингипин и белки I, II, III из печени и кишечника свиньи и др.

До сих пор не установлена функция *парвальбуминов* — кислых глобулярных белков, имеющих, как правило, молекулярную массу 10—12 кД и способных к высокоаффинному связыванию  $\text{Ca}^{2+}$  ( $Kd = 0,1 - 1$  мкМ). Интерес к парвальбуминам обусловлен тем, что в ряде мышц концентрация парвальбумина может достигать 50—100 мкмоль/л, т. е. соизмерима с концентрацией кальцийсвязывающего белка — тропонина С. В цитоплазме кальцийсвязывающие участки парвальбуминов всегда насыщены катионом: магнием, при концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  около  $10^{-7}$  моль/л, или кальцием, вытесняющим магний после активации мышцы. Несомненно, что парвальбумины принимают участие во внутриклеточном перераспределении  $\text{Ca}^{2+}$ , особенно в быстрых мышцах беспозвоночных, где их концентрация особенно высока (о возможной роли парвальбуминов см. гл. 6).

Роль  $\text{Ca}^{2+}$  не ограничивается активацией цитоплазматических и мембранных белков и соответствующим влиянием на клеточный метаболизм. Изолированы белки, способные в присутствии микромолярных концентраций  $\text{Ca}^{2+}$  связываться с мембраной. Такое связывание может, в свою очередь, оказывать воздействие на различные трансмембранные белки, в том числе ферменты и рецепторы, и являться промежуточной ста-



дией между активирующим сигналом и физиологическим ответом.

Один из таких белков, *протеин II* из эпителия желудка свиньи, как полагают, участвует в формировании цитоскелета клетки. Изменения в цитоскелете лежат в основе таких важных процессов, как секреция и движение. Протеин II (32 кД) в присутствии  $\text{Ca}^{2+}$  связывается не только с клеточной мембраной, но и с липосомами, приготовленными из чистого фосфатидилсерина (но не других фосфолипидов). Аналогичным свойством обладает Са-связывающий белок из лейкоцитов (K. Utsumi et al., 1986), имеющий близкую молекулярную массу (33 кД.) Механизм такого связывания не установлен. Возможно, оно обеспечивается кальцием, ассоциированным с отрицательно заряженным фосфолипидом. С другой стороны, поскольку взаимодействие протеина II ингибируется трифторперазином, вероятно, что  $\text{Ca}^{2+}$  вызывает конформационные перестройки в самом белке, обнажая его гидрофобные участки. Тем самым обеспечивается контакт белка с неполярной фазой липида.

---

# Ионофоры и индикаторы ионов кальция

---

3

Поступление  $\text{Ca}^{2+}$  в цитоплазму через поверхностную мембрану или из внутриклеточных депо приводит к «запуску» биохимических реакций и соответствующему физиологическому ответу данной клетки. Совершенно очевидно, что биологическая роль  $\text{Ca}^{2+}$  должна быть изучена на интактных клетках — в суспензиях или монослоях первичной либо переживающей культуры. При этом необходимо или изменять уровень внутриклеточного кальция с помощью веществ, избирательно переносящих  $\text{Ca}^{2+}$  через клеточную мембрану (должны обладать растворимостью в гидрофобной фазе мембраны), или, используя специфические кальциевые «метки» (должны быть водорастворимы), регистрировать колебания концентрации этого катиона в ответ на определенный внеклеточный стимул. После длительного поиска такие вещества были и обнаружены, и синтезированы; они введены в практику биохимических исследований. В настоящее время наиболее широко используют *кальцевый ионофор A23187 и кальцевый хромофор Квин-2.*

## 3.1. Антибиотик A23187 и другие переносчики $\text{Ca}^{2+}$

Карбоксильный полиэфирный *антибиотик A23187*, или *кальцимицин* (рис. 5), выделенный из мицелия одного из штаммов стрептомицетов, способен образовывать в гидрофобной фазе комплексы с щелочно-земельными металлами (в соотношении 2:1) и с ионами водорода (1:1). Этот антибиотик опосредует электронейтральный трансмембранный перенос двухвалентного катиона в обмен на другой двухвалентный катион или два протона (P. Reed, 1976). Его сродство к двухвалентным катионам уменьшается в ряду  $\text{Mn}^{2+} > \text{Ca}^{2+} > \text{Mg}^{2+} \gg \text{Sr}^{2+} \gg \text{Ba}^{2+}$ ; связывание антибиотика с одновалентными катионами чрезвычайно мало.

Чем обусловлена высокая специфичность связывания A23187 с металлами? Для ответа на этот вопрос D. Pfeiffer и

Н. Lardy (1976) исследовали экстракцию комплексов A23187 —  $\text{Me}^{2+}$  из водной среды в толуол-бутанольную фазу, в определенной степени моделирующую гидрофобную область биомембран.

Как видно из рис. 6, зависимость константы экстракции ( $K$ ) от ионного радиуса совсем не тривиальна. Стабильность комплекса в органической фазе увеличивается линейно (в полулогарифмических координатах) с уменьшением ионного радиуса от  $\text{Ba}^{2+}$  до  $\text{Zn}^{2+}$ . Затем эта тенденция резко изменяется и экстракция в органическую фазу снижается в ряду от  $\text{Zn}^{2+}$  до  $\text{Mg}^{2+}$ . Как оказалось, энергия сольватации (энергия взаимодействия ионов с растворителем) не влияет на стабильность комплекса (D. R. Pfeiffer, H. A. Lardy, 1976). (Сольватация и ее частный случай, гидратация — экзотермический процесс.) Чем ниже энергия сольватации, тем в большей степени облегчается эндотермический процесс диссоциации комплекса. Значительное уменьшение энергии сольватации при переходе от  $\text{Ba}^{2+}$  к  $\text{Zn}^{2+}$  (на 1575 кДж/моль) должно обеспечивать меньшую стабильность комплекса ионофора с  $\text{Zn}^{2+}$  в органической фазе. В действительности наблюдается обратное (рис. 6), поэтому можно заключить, что селективность в комплексообразовании определяется чисто стерическими факторами.

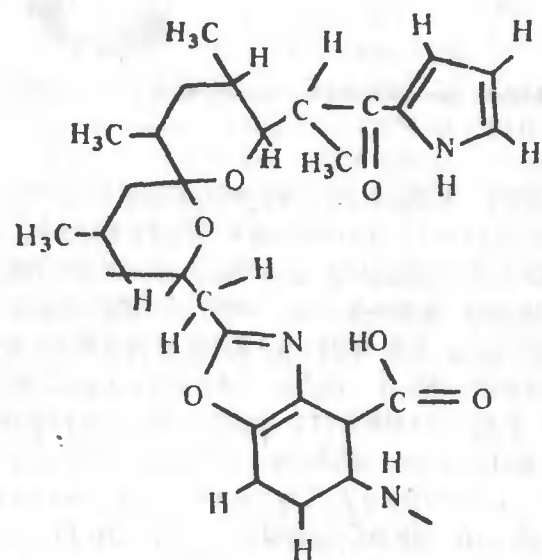


Рис. 5. Структура кальциевого ионофора A23187

Структура молекулы A23187 соответствует этим представлениям (см. рис. 5). Предполагают, что место связывания катиона формируется с участием шести лигандов в двух молекулах A23187: четырьмя атомами кислорода и двумя гетероциклическими атомами азота. Размер полости, в которой локализуется катион, таков, что он оптимален для связывания  $\text{Zn}^{2+}$ . Увеличение полости, необходимое для связывания более крупных катионов, сопровождается неблагоприятными изменениями в других частях комплекса и возникновением своеобразного напряжения. В то же время падение стабильности комплексов для катионов, меньших цинка, может быть обусловлено неспособностью шести лигандов одновременно взаимодействовать с такими катионами.

Возникает, однако, вопрос, почему такой одновалентный катион, как  $\text{Li}^+$ , имеющий почти такой же ионный радиус, как

улулогарифмических координатах) с уменьшением ионного радиуса от  $\text{Ba}^{2+}$  до  $\text{Zn}^{2+}$ . Затем эта тенденция резко изменяется и экстракция в органическую фазу снижается в ряду от  $\text{Zn}^{2+}$  до  $\text{Mg}^{2+}$ . Как оказалось, энергия сольватации (энергия взаимодействия ионов с растворителем) не влияет на стабильность комплекса (D. R. Pfeiffer, H. A. Lardy, 1976). (Сольватация и ее частный случай, гидратация — экзотермический процесс.) Чем ниже энергия сольватации, тем в большей степени облегчается эндотермический процесс диссоциации комплекса. Значительное уменьшение энергии сольватации при переходе от  $\text{Ba}^{2+}$  к  $\text{Zn}^{2+}$  (на 1575 кДж/моль) должно обеспечивать меньшую стабильность комплекса ионофора с  $\text{Zn}^{2+}$  в органической фазе. В действительности наблюдается обратное (рис. 6), поэтому можно заключить, что селективность в комплексообразовании определяется чисто стерическими факторами.

$Mg^{2+}$  (соответственно 0,06 и 0,065 нм), переносится антибиотиком (А) в органическую фазу, по крайней мере, в 100 раз хуже? Можно предположить, что заряженный комплекс  $A_2Li^-$  плохо растворяется в органической среде, а нейтральный комплекс  $ALi^-$  из-за небольшого размера «клешней» молекулы А23187 и меньшего числа лигандов, участвующих в связывании, гораздо менее стабилен по сравнению с комплексом  $A_2Mg$ .

Антибиотик А23187 — сильно флуоресцирующее соединение. Это облегчает исследование механизмов его взаимодействия с ионами кальция и распределения комплексов в водной и органической фазах, однако в ряде случаев мешает измерениям концентрации  $Ca^{2+}$  при использовании флуоресцентных красителей. Таким свойством не обладает нефлуоресцирующее производное антибиотика — 4-бром-А23187, в присутствии которого можно без особых затруднений оценивать изменение концентрации внутриклеточного ионизированного  $Ca^{2+}$  (С. М. Deber et al., 1985).

В интактной клетке перенос  $Ca^{2+}$  через мембрану обеспечивается механизмами, далекими от электронейтрального обмена кальция на протон или магний, осуществляемого в присутствии А23187. Тем не менее, действие этого антибиотика на клеточные функции во многих случаях оказывается сходным с эффектом активации клетки. Так, А23187 вызывает сокращение изолированных гладких и скелетных мышц, деполяризацию клеточных мембран, изменяет уровень циклических нуклеотидов в клетках. При воздействии ионофора происходят секреция ферментов, запасенных в гранулах макрофагов, агрегация тромбоцитов и нейтрофилов, слияние эритроцитов, изменения их формы и осмотической устойчивости.

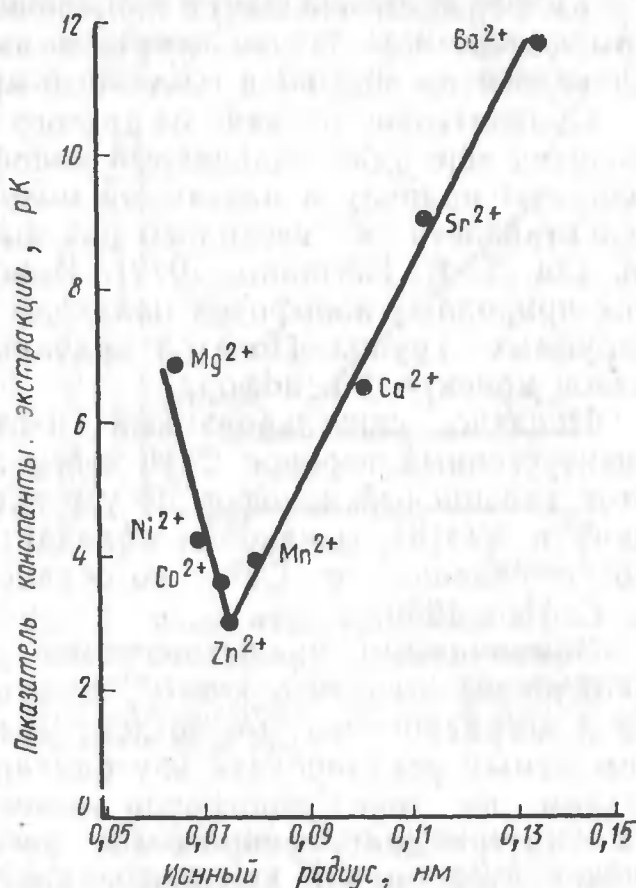


Рис. 6. Зависимость константы экстракции (K) двухвалентных катионов в комплексе с антибиотиком А23187 от ионных радиусов металлов (по D. Pfeiffer, H. Lardy, 1976)

Уменьшение значения pK соответствует увеличению стабильности комплексов

A23187 усиливает продукцию супероксидного радикала  $O_2^-$  и  $H_2O_2$ , потребление кислорода клетками, сократимость различных типов мышц, в частности сердца, экзоцитоз аминов и нейромедиаторов, включая серотонин, дофамин, адреналин, норадреналин и ацетилхолин, влияет на синтез белка и РНК. Таким образом, используя кальциевый ионофор, можно в каждом конкретном случае делать выводы о вовлеченности ионов кальция в тот или иной клеточный процесс.

Сравнительно недавно из другого штамма стрептомицета был выделен еще один кальциевый ионофор, имеющий также полиэфирную природу и названный *иономицином*. Его  $Ca^{2+}/Mg^{2+}$ -селективность в несколько раз выше, чем у A23187 (С.—М. Liu, Т. Е. Hermann, 1978). Иономицин отличается от других природных ионофоров наличием двух (а не одной) ионизируемых групп. По этой причине ион кальция связывается одной молекулой ионофора.

Недавно синтезированный пептид *децил-2Е* опосредует электрогенный перенос  $Ca^{2+}$  через мембраны. По активности этот кальциевый ионофор не уступает антибиотикам иономицину и A23187, однако он обладает большей селективностью по отношению к  $Ca^{2+}$  по сравнению с  $Mn^{2+}$  (С. М. Deber, L. С. Hsu, 1986).

Заманчивыми представляются попытки найти *эндогенные кальциевые ионофоры клеток*, которые способны синтезироваться и деградировать при воздействии определенных стимулов и тем самым регулировать внутриклеточное распределение  $Ca^{2+}$ . Одним из таких ионофоров может быть *фосфатидная кислота* — интермедиат превращения фосфоинозитидов. При добавлении фосфатидной кислоты к клеткам или при индукции ее внутриклеточного синтеза действительно наблюдается увеличение концентрации свободного  $Ca^{2+}$  в цитоплазме. Для того чтобы установить механизм действия фосфатидной кислоты (через активизацию существующих кальциевых каналов или путем формирования новых), было исследовано ее действие на распределение  $Ca^{2+}$  в двух фазах: водной и бензольной, которая по величине диэлектрической постоянной (2,28) приближается к липидной фазе. С помощью такой простой модели было показано, что фосфатидная кислота, а также *кардиолипин* являются типичными кальциевыми ионофорами, обеспечивающими накопление этого катиона в гидрофобной фазе. Предполагают, что перенос  $Ca^{2+}$  в этом случае осуществляется в форме дегидрированного координационного комплекса с фосфатидной кислотой.

С помощью подобной системы удалось показать, что ионофорную активность проявляют и простагландины  $PGI_2$ ,  $PGE_2$  и  $PGF_{2\alpha}$ ; они вызывают также выход  $Ca^{2+}$  из нагруженных им липосом. Это, однако, происходит лишь при повышении темпе-

ратуры до 37°C. Следовательно, простагландины способны проявлять действие кальциевых ионофоров в условиях более жидкой мембраны. И все же маловероятно, что данные простагландины представляют собой эндогенные ионофоры, поскольку они эффективны при миллимолярной концентрации, т. е. в 100—1000 раз большей их физиологической концентрации.

Переносчиками  $\text{Ca}^{2+}$  через мембраны могут быть продукты перекисного окисления липидов (ПОЛ). Старение липида и накопление продуктов ПОЛ

(что происходит, например, при прогоркании масла) или индукция ПОЛ двухвалентным железом и аскорбиновой кислотой (рис. 7) вызывает существенное увеличение ионной (преимущественно кальциевой) проводимости липидных мембран (А. V. Lebedev et al., 1982). Этот эффект может быть снят в присутствии веществ — антиоксидантов, из которых наиболее известен  $\alpha$ -токоферол (витамин Е).

Предполагают, что при перекисном окислении липидной мембраны в ней формируются гидрофильные поры, способные пропускать ионы кальция. Неясно, в какой степени продукты ПОЛ *in vivo* участвуют в регуляции внутриклеточного  $\text{Ca}^{2+}$  (хотя такое предположение выдвинуто для тромбоцитов, см. гл. 7). От повреждающего действия перекисного окисления клетки защищены тем же витамином Е и ферментными антиоксидантными системами, в том числе каталазой и супероксиддисмутазой.

Недавно был предложен принципиально иной способ создания повышенной концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  внутри клеток, связанный с введением в клетку комплекса кальцевого хелатора с кальцием. Этот хелатор представляет собой нитропиперонильное производное Са-селективного комплексона БАФТА и называется нитр-2 (R. Y. Tsien, R. S. Zucker, 1986). Под действием света он способен к изомеризации, сопровождаемой значительным снижением сродства к  $\text{Ca}^{2+}$  (рис. 8). После воздействия света в ближней ультрафиолетовой области константа диссоциации комплекса увеличивается с 0,63 до 18 мкМ. Это обеспечивает высвобождение части ионов кальция из комплекса с нитр-2 в цитоплазму и позволяет регистрировать соответствующий физиологический ответ клетки.

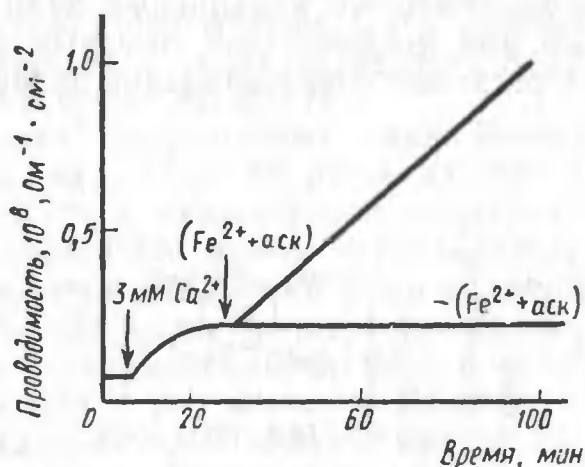


Рис. 7. Увеличение кальцевой проводимости бислойных липидных мембран под действием прооксидантной системы — двухвалентного железа и аскорбиновой кислоты (аск)



Использование света для высвобождения  $\text{Ca}^{2+}$  из комплекса с фотолабильным хелатором в принципе имеет преимущества перед другими способами увеличения внутриклеточной концентрации этого катиона. В частности, вспышки света можно варьировать по длительности и интенсивности. В то же время из-за сравнительно медленного высвобождения  $\text{Ca}^{2+}$  из этого комплекса (с константой времени 200—250 мс), обусловленного предшествующей лимитирующей стадией — отщеплением метанола, фотолабильный кальциевый хелатор не может быть использован для исследования быстрых ответов клеток, например для регистрации сократительной активности миоцитов.

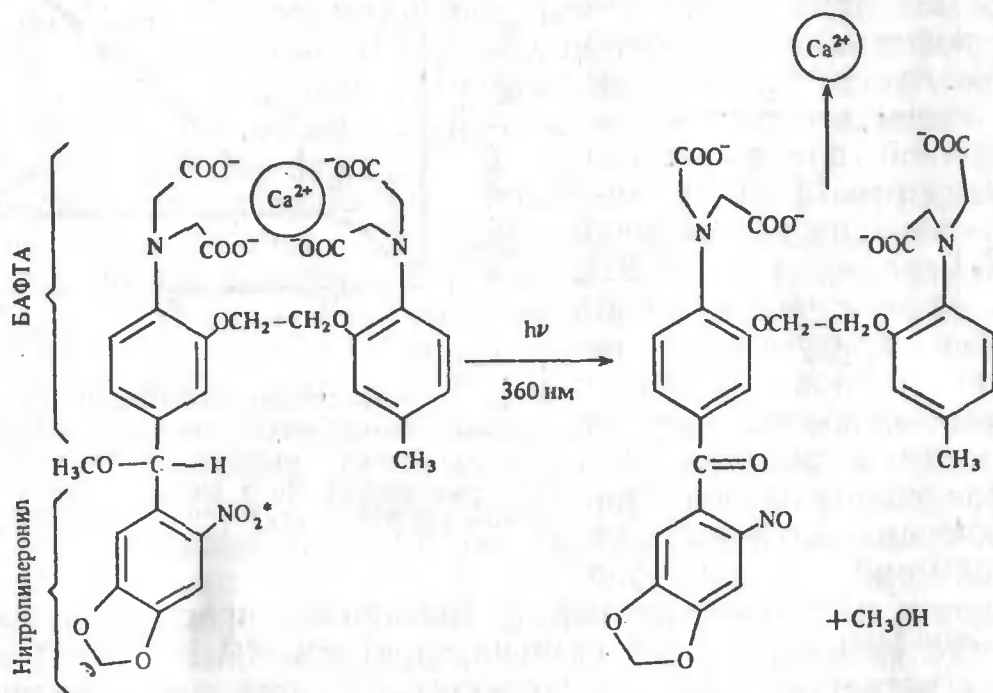


Рис. 8. Структура кальциевого хелатора нитр-2 и предполагаемый механизм отщепления  $\text{Ca}^{2+}$  от комплексона под действием света (по R. Y. Tsien, R. S. Zucker, 1986)

Ион кальция исходно заключен в своеобразную ячейку, образованную четырьмя карбоксильными группами. При этом один из атомов кислорода (отмечен звездочкой) переносится на связь  $\text{C}-\text{H}$ , затем происходит высвобождение метанола и понижение средства комплексона к  $\text{Ca}^{2+}$

### 3.2. Методы регистрации изменений концентрации $\text{Ca}^{2+}$ в биологических экспериментах

При измерениях сдвигов в концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  внутри клеток или перераспределения этого катиона между средой и изолированными клеточными органеллами используют преимущественно  $\text{Ca}^{2+}$ -селективные электроды и индикаторы ионов  $\text{Ca}^{2+}$ .



*Кальциевые электроды* привлекают своей простотой и возможностью однозначной калибровки ответа в соответствии с *уравнением Нернста*:

$$E = \frac{RT}{2F} \ln \frac{[c]_2}{[c]_1},$$

где  $R$  — универсальная газовая постоянная,  $T$  — температура по Кельвину,  $F$  — число Фарадея,  $[c]_1$  и  $[c]_2$  — начальная и конечная концентрации иона кальция.

При десятикратном изменении концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  в среде при стандартных условиях и комнатной температуре потенциал электрода должен измениться примерно на 30 мВ.

Существенными недостатками современных кальциевых электродов являются достаточно медленная скорость их ответа на изменения концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  и относительно невысокая катионная селективность. В настоящее время исследователи практически отказались от попыток измерений концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  внутри клеток с помощью микроэлектродов. Во-первых, электрод отвечает на изменения концентрации катиона в области, непосредственно примыкающей к его кончику. Во-вторых, трудно исключить, что при внедрении электрода в клетку нарушается целостность клеточной мембраны и из-за наличия большого трансмембранного кальциевого градиента уровень  $\text{Ca}^{2+}$  в клетке увеличивается. Тем не менее, при работе с изолированными клеточными органеллами кальциевые электроды имеют несомненное преимущество (особенно, когда скорость транспорта  $\text{Ca}^{2+}$  невелика) перед другими методами, включая регистрацию поглощения изотопа кальция ( $^{45}\text{Ca}^{2+}$ ) после осаждения фрагментов мембран на мембранных фильтрах или использование металлохромных индикаторов.

Работа различных *индикаторов кальция* связана с их способностью подобно кальциевому комплексону ЭГТА образовывать с кальцием комплексы, имеющие специфические спектральные характеристики.

Константы диссоциации комплекса индикатор —  $\text{Ca}^{2+}$  важны при выборе индикатора для конкретного исследования. Если концентрация  $\text{Ca}^{2+}$  существенно превышает  $K_d$ , то чувствительность метода падает: большая часть индикатора находится в связанной форме, и дальнейшее повышение концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  в среде вызовет меньшие изменения в светопропускании. Однако при концентрации  $\text{Ca}^{2+}$ , гораздо меньшей  $K_d$ , количество свободного индикатора оказывается весьма близким его общему количеству и изменения в оптической плотности практически пропорциональны изменениям концентрации свободно-го кальция.

Наибольшее распространение получили следующие индикаторы ионов кальция: мурексид, арсеназо III, антипирилазо

III, хлортетрациклин, экворин, квин-2 и фура-2. Кальциевый индикатор *мурексид* (пурпурат аммония) применяют уже четверть века в основном в опытах с изолированными клеточными органеллами. Высокое значение  $K_d$  комплекса мурексид с  $\text{Ca}^{2+}$  (3 мМ) позволяет пренебречь буферной способностью данного индикатора, но в то же время ограничивает его применение диапазоном концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  выше 10 мкмоль/л. Чаще всего мурексид используют в опытах на изолированных митохондриях, Са-транспортирующая система которых имеет относительно низкое сродство к  $\text{Ca}^{2+}$  (см. гл. 4).

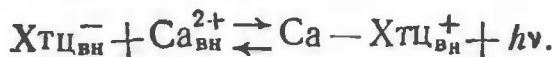
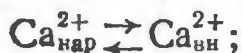
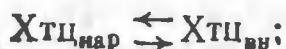
*Арсеназо III* и *антипирилазо III* обладают большей чувствительностью к  $\text{Ca}^{2+}$  ( $K_d$  соответствующих комплексов двух молекул индикатора с одной молекулой  $\text{Ca}^{2+}$  составляют  $10^{-9}$  и  $10^{-8}$  М<sup>2</sup>). Важно, что их ответ на  $\text{Ca}^{2+}$  линеен в широком диапазоне концентраций катиона. По чувствительности к  $\text{Ca}^{2+}$  арсеназо III примерно в 50 раз превосходит мурексид. Хотя, как и другие металлохромные индикаторы, арсеназо III и антипирилазо III образуют комплексы с  $\text{Mg}^{2+}$ , можно подобрать такие длины волн, при которых снижение чувствительности к  $\text{Ca}^{2+}$  в магнийсодержащей среде будет минимальным.

Недостаток обоих индикаторов состоит в том, что оптическая плотность самих этих веществ и их сродство к  $\text{Ca}^{2+}$  сильно меняются в зависимости от величины рН. Естественно, что при работе с суспензией мембран можно использовать высокую концентрацию буфера, исключаящую сдвиги рН. Однако если данные индикаторы применяют для регистрации изменений внутриклеточного  $\text{Ca}^{2+}$ , возможность артефактов в измерениях исключить нельзя. Наконец, оба вещества проявляют свойства кальциевых буферов и способны связываться с содержимым цитоплазмы, что затрудняет калибровку ответа; из-за значительного неспецифического связывания, характерного, впрочем, для большинства индикаторов, может также замедляться время ответа. Калибровке в случае антипирилазо III мешает и то обстоятельство, что этот индикатор образует различные комплексы с  $\text{Ca}^{2+}$  в стехиометрии 1:1, 1:2 и, возможно, 2:2.

Индикатор  $\text{Ca}^{2+}$  *хлортетрациклин* несколько отличается от остальных индикаторов тем, что с его помощью измеряют не свободный, а *связанный* с клеточными органеллами  $\text{Ca}^{2+}$ . Флуоресценция этого хелатора двухвалентных ионов существенно возрастает при увеличении уровня  $\text{Ca}^{2+}$ , ассоциированного с мембранами.

Однако с помощью хлортетрациклина измеряют кальций, не ассоциированный с участками связывания на внутримембранных белках, а находящийся в мембране (в комплексе с красителем) в равновесии с водной фазой. Например, действие  $\text{Ca}^{2+}$  на флуоресценцию хлортетрациклина можно продемонстрировать и на лецитиновых (электронейтральных) мем-

бранах, заведомо не способных к связыванию  $\text{Ca}^{2+}$ . Таким образом, изменения флуоресценции внутримембранного комплекса хлортетрациклин —  $\text{Ca}^{2+}(\text{Ca} - \text{Хтц}^{+\text{вн}})$  отражают сдвиги в концентрации ионизированного  $\text{Ca}^{2+}$  около мембраны ( $\text{Ca}^{2+}_{\text{нар}}$ ):



Недостатком хлортетрациклина как кальциевого ионофора является его более высокая чувствительность в отношении магния. В то же время хлортетрациклин незаменим в тех исследованиях, когда изменяется концентрация  $\text{Ca}^{2+}$  снаружи клеточных органелл. Если, например, пузырьки саркоплазматического ретикулума уже загружены  $\text{Ca}^{2+}$ , то с помощью флуоресценции хлортетрациклина может быть зарегистрирован выход этого катиона из пузырьков даже в присутствии кальциевого комплекса ЭГТА.

В 1962 г. появилось сообщение о выделении из медузы *Aequorea aequorea* белка, испускающего свет в присутствии  $\text{Ca}^{2+}$ . Этот белок, получивший название *экворин*, отличали высокая чувствительность и специфичность по отношению к  $\text{Ca}^{2+}$ . Возникла мысль использовать его в качестве индикатора кальциевых ионов внутри клеток. До самого последнего времени экворин широко применяли в исследованиях на самых различных одиночных клетках.

Реакция экворина с кальцием протекает следующим образом:



Биолюминесцентный белок, как правило, вводят в клетку с помощью микроинъекций. Люминесценцию регистрируют с помощью фотоумножителя очень высокой чувствительности.

Наиболее информативными были исследования (D. G. Allen, J. R. Blinks, 1978), в которых сравнивали кинетику изменения сигнала экворина и цикл сокращения — расслабления волокон скелетной и сердечной мышц. Обращает на себя внимание, что при одноразовой электрической стимуляции мышцы люминесцентный сигнал достигает своего максимума менее чем за 10 мс после импульса (рис. 9). Все это время мышца находится в покое; затем происходит медленное уменьшение сигнала и рост силы мышечного сокращения. Лишь в тот момент, когда интенсивность люминесценции вновь близка к исходной, развивается максимальный сократительный

ответ. Из этих данных следует, что процесс сокращения мышцы лимитируется не поступлением  $\text{Ca}^{2+}$  из его внутриклеточных резервуаров в миоплазму, а превращениями в самом сократительном аппарате клетки.

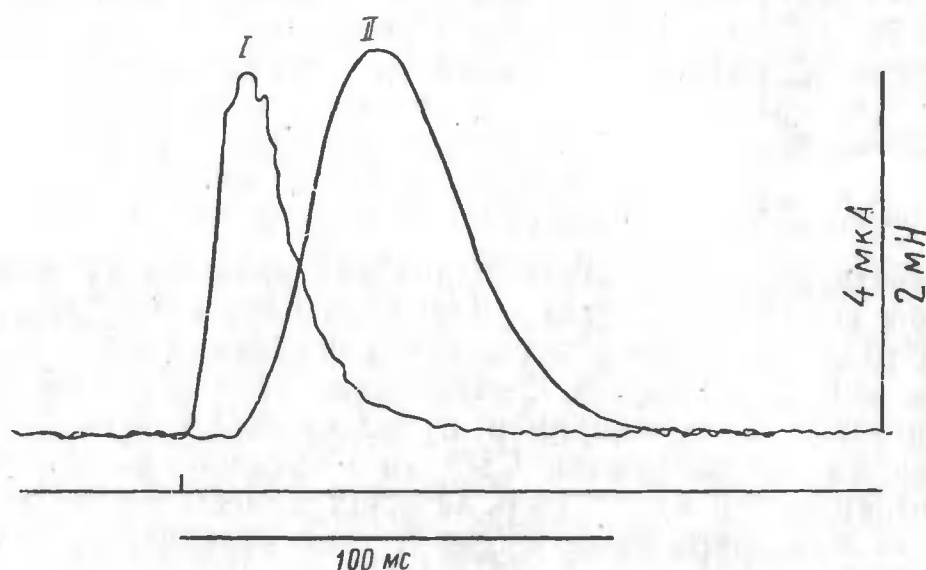


Рис. 9. Люминесцентный (I) и механический (II) ответы при одиночном сокращении волокна скелетной мышцы лягушки после инъекции экворина (по Д. Бликсу и др., 1981)

К интерпретации результатов опытов с экворином, однако, следует подходить с осторожностью. Интенсивность его люминесценции при активации клетки увеличивается по крайней мере в 1000 раз. В то же время концентрация свободного кальция при этом меняется не более чем в 40 раз. Кроме того, следует учитывать, что в возбужденной клетке существует градиент по ионам кальция (рис. 10). Поскольку кривая зависимости люминесценции экворина от  $\text{Ca}^{2+}$  характеризуется значительной крутизной в области концентрации катиона от 0,1 до 1,0 мкМ, нельзя исключить, что основной сигнал поступает от областей с высокой локальной концентрацией  $\text{Ca}^{2+}$ , т. е. от участков, непосредственно примыкающих к кальциевым резервуарам.

В настоящее время наиболее популярны индикаторы ионов кальция нового поколения квин-2, фура-2 и индо-1 (рис. 11). Они являются производными кальциевого комплексона БАФТА (см. рис. 8) и обладают очень высокой специфичностью по отношению к  $\text{Ca}^{2+}$  в сравнении с  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$  и  $\text{H}^+$ .

При связывании одной молекулы квина-2 с одним ионом кальция наблюдается шестикратное усиление флуоресцентного сигнала. Флуоресценция фура-2 и индо-1 в кальциевой среде возрастает в 30 раз; поэтому эти красители можно использо-

вать в меньших концентрациях, чем квин-2. Особенность фура-2 состоит в том, что он обладает высокой чувствительностью к  $\text{Ca}^{2+}$  как при волне возбуждения около 350 нм (в этом случае интенсивность эмиссии при 500 нм в среде с  $\text{Ca}^{2+}$  увеличивается), так и при возбуждении более длинными волнами — 380—385 нм (эмиссия в кальциевой среде снижается). Выраженный

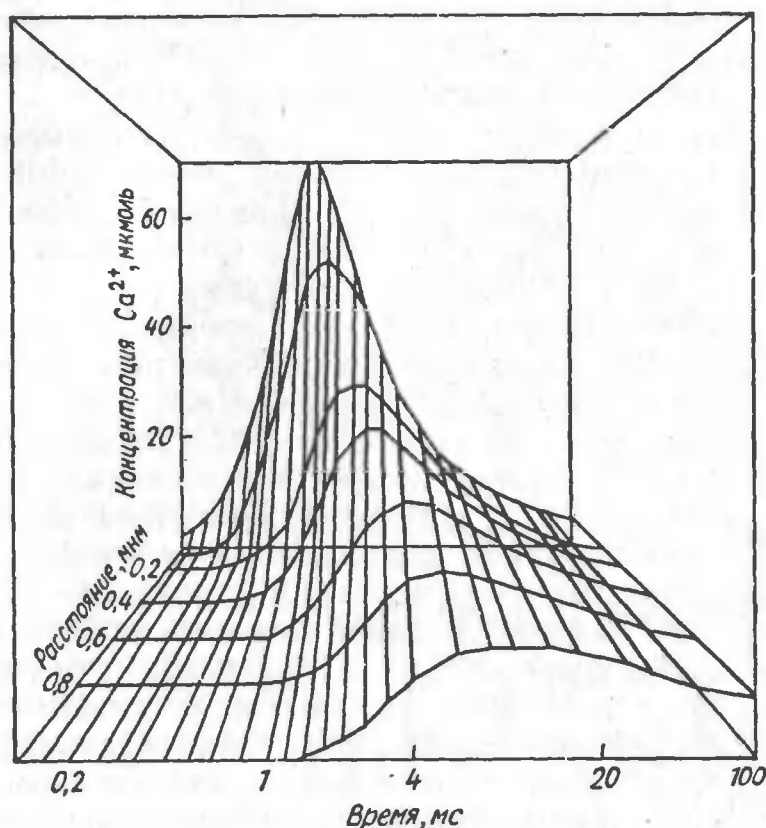


Рис. 10. Трехмерное изображение изменений концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  в пресинаптическом окончании нервного волокна кальмара в зависимости от времени и расстояния от плазматической мембраны (по С. Е. Creutz, 1984)

ответ квина-2 на  $\text{Ca}^{2+}$  проявляется при длинах волн возбуждения строго в диапазоне 339—350 нм. В связи с этим фура-2 более применим в исследованиях с использованием флуоресцентных микроскопов с обычной стеклянной оптикой, «гасящей» свет в области, близкой к ультрафиолетовой.

Преимущества фура-2 и индо-1 перед квином-2 заключаются также в более высокой кальциевой селективности по отношению к другим двухвалентным катионам, а также в меньшей константе диссоциации для  $\text{Ca}^{2+}$ .

Одна из основных проблем, мешавших широкому использованию металлохромных индикаторов для определения концентрации ионов в цитоплазме интактной клетки, была связана с

трудностью их «доставки» внутрь клетки. Например, квин-2, обладающий четырьмя карбоксильными группами, очень слабо проникает через мембраны.

После анализа многих производных было найдено, что неполярный *ацетометиловый эфир квина-2* ( $\text{ROCH}_2\text{OCOCCH}_3$ ) проникает через клеточные мембраны и с достаточно высокой

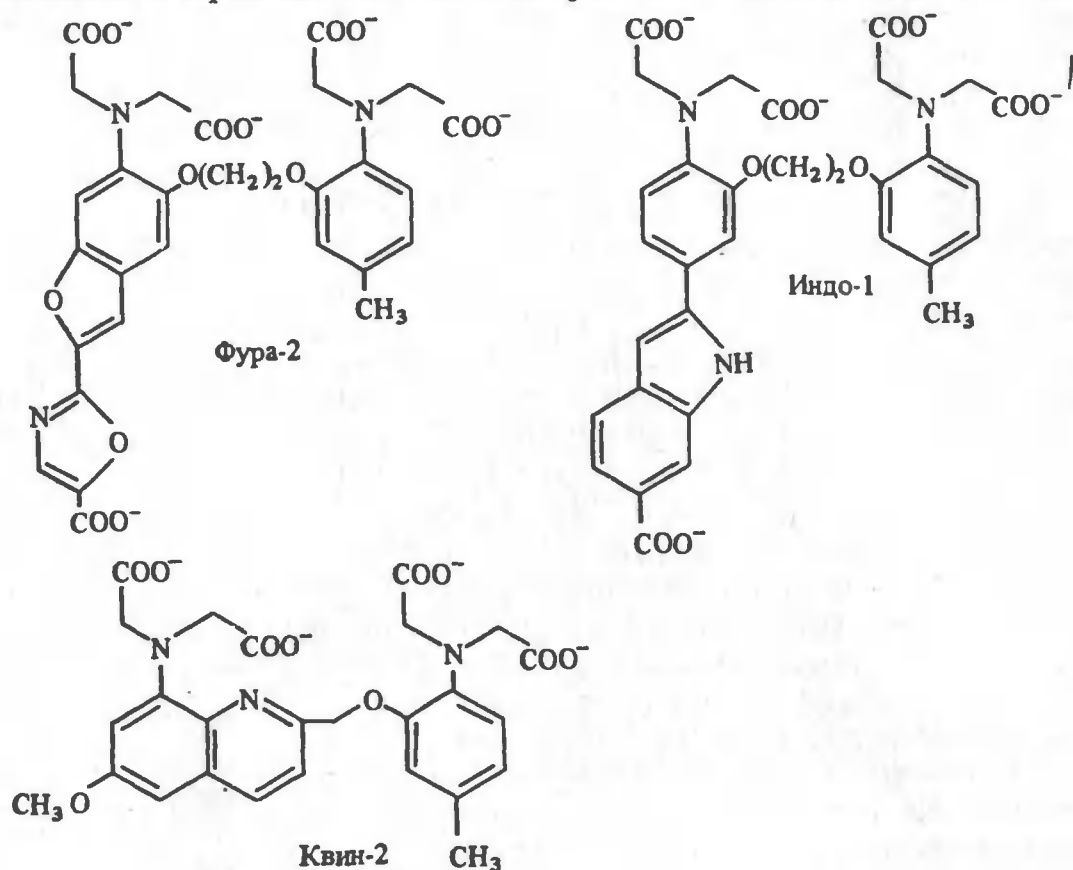


Рис. 11. Флуоресцентные индикаторы ионов кальция — производные кальциевого комплексона БАФТА

скоростью гидролизуется внутриклеточными ацетилэстеразами (R. Y. Tsien, 1981). Концентрация квина-2 в клетке при такой его доставке может достигать 10 ммоль/л. Важно, что квин-2 при этом локализуется именно в цитоплазме: обработка клеток дигитонином, увеличивающим проницаемость поверхностной мембраны, приводила к полному выходу квина-2 из клеток.

В ряде случаев опыты с квином-2 и фура-2 могут привести к артефактам. Например, в загруженных квином-2 тромбоцитах существенного повышения концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  в клетках (см. разд. 7.1) удастся достичь лишь с использованием тромбина, но не других агонистов. В опытах с фура-2 повышение концентрации внутриклеточного  $\text{Ca}^{2+}$  наблюдается не только при добавлении тромбина, но и под действием арахидоната и



адреналина. В то же время фура-2 не способен улавливать увеличение концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  в тромбоцитах, если в качестве агониста используют форболовый эфир — активатор протеинкиназы С. Данная реакция клетки может быть зарегистрирована лишь при использовании экворина (P. Erne et al., 1987). Далее, в присутствии 40 мкМ квина-2 (концентрация, лишь вдвое превышающая уровень красителя, который используют при измерении концентрации  $\text{Ca}^{2+}$ ) блокируется агрегация тромбоцитов, тогда как фура-2 даже в концентрации, в 10 раз превышающей ту, что необходима для измерения сдвигов в уровне  $\text{Ca}^{2+}$ , не влияет на агрегацию.

Квин-2 сам по себе способен модифицировать клеточные реакции. Так как этот хромофор обладает чрезвычайно высокой чувствительностью к  $\text{Ca}^{2+}$  ( $K_d=100$  нМ) и его используют, как правило, в концентрациях около 1 мМ, естественно, что значительное количество  $\text{Ca}^{2+}$  в клетке оказывается забуференным индикатором. Таким образом, квин-2 может лимитировать изменения концентрации свободного внутриклеточного кальция. Артефактов такого рода удается избежать при использовании более «ярких» красителей: фура-2 и индо-1, вводимых в клетку при меньших концентрациях.

Еще одна причина артефактов в опытах с квином-2 заключается в том, что при гидролизе его ацетометилового эфира образуется токсическое соединение — *формальдегид*. Возможно, этим объясняется повышенная проницаемость для  $\text{Ca}^{2+}$  мембран эритроцитов, загруженных квином-2. Кроме того, показано, что на флуоресценцию квина-2 оказывают влияние эндогенные тяжелые металлы. При этом уровень свободного внутриклеточного  $\text{Ca}^{2+}$ , особенно при использовании низких концентраций квина-2, может оказаться заниженным. Например, основываясь на результатах опытов с квином-2, было постулировано, что в клетках карциномы Эрлиха концентрация  $\text{Ca}^{2+}$  чрезвычайно низка — от 10 до 80 нмоль/л. (T. Pozzan et al., 1982). Однако измеряемый уровень свободного  $\text{Ca}^{2+}$  был тем выше, чем большее количество квина-2 было захвачено клетками. Во избежание подобного артефакта предложено использовать липидорастворимый хелатор *тетракис-(2-пиридилметил)-этилендиамин*, обладающий чрезвычайно высоким сродством к ионам тяжелых металлов и низким сродством к  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{Mg}^{2+}$ . Измерения, выполненные в присутствии этого вещества, показали, что истинная концентрация  $\text{Ca}^{2+}$  в клетках карциномы Эрлиха составляет 100—200 нмоль/л.

Таким образом, в зависимости от выбора индикатора кальциевых ионов экспериментатор, пытаясь выявить изменения внутриклеточной концентрации  $\text{Ca}^{2+}$ , может получить, или положительный, или отрицательный результат или зарегистрировать клеточный ответ в извращенном виде.



## Кальциевые каналы и переносчики кальция через биомембраны

### 4.1. Проницаемость мембран для кальция и других ионов

Один из важных факторов, влияющих на поведение клеток,— *избирательная ионная проницаемость их внешней мембраны*. Идеальная мембрана (*искусственная бислойная мембрана*), состоящая из немодифицированных молекул фосфолипида и не содержащая интегральных мембранных белков, практически не проницаема для катионов. Это обусловлено наличием в бислое гидрофобной границы, сформированной ориентированными остатками жирных кислот. Однако, если мембрана содержит некоторое количество фосфатидной кислоты, лизоформ фосфолипидов, продуктов перекисного окисления, проницаемость ее для ионов возрастает. Более того, в ряде случаев обнаруживается избирательность бислоя для катионов. Например, искусственная мембрана, сформированная из окисленного липида, обладает катионной селективностью, убывающей в ряду:  $\text{Ca}^{2+} > \text{Mg}^{2+} > \text{Ba}^{2+} > \text{Sr}^{+2} > \text{K}^{+} > \text{Rb}^{+} > \text{Cs}^{+} > \text{NH}_4^{+} > \text{Na}^{+} > \text{Li}^{+}$  (A. V. Lebedev et al., 1984). Можно предположить, что это свойство обусловлено нарушением упорядоченности липидного бислоя и формированием в гидрофобной области мембраны своеобразных катионных пор.

Естественно, что любая клеточная мембрана благодаря протеканию разнообразных метаболических процессов, в частности, связанных с превращением липидов, отличается по структуре от идеальной искусственной бислойной мембраны. Помимо метаболитов фосфолипидов и жирных кислот поверхностные мембраны содержат интегральные белки, некоторые из которых, являясь селективными ионными порами, существенно снижают величину электрического сопротивления бислоя. В частности, высокая проницаемость для хлора свойственна эритроцитарной мембране. Это объясняется тем, что основным интегральным белком мембраны эритроцитов (*белок полосы III*) выполняет функцию анионного канала.

Чем обусловлена селективность ионных каналов в биологических мембранах? В соответствии с простой и изящной теорией Эйзенмана (G. Eisenman, 1962), предложенной вначале для ионпроводящей мембраны ионселективных электродов, селективность определяют два основных фактора: радиус анионного центра связывания катиона в канале и энергия дегидратации катиона. В случае одновалентных катионов, например, величина энергии, необходимой для отщепления воды, увеличивается в ряду:  $\text{Cs}^+$  (281,5 кДж/моль)  $< \text{Rb}^+ < \text{K}^+ < \text{Na}^+ < \text{Li}^+$  (533,5 кДж/моль).

Для анионных центров наибольшего радиуса (сила электрического поля которых невелика) степень связывания катиона с участком канала определяется энергией дегидратации:  $\text{Cs}^+ > \text{Rb}^+ > \text{K}^+ > \text{Na}^+ > \text{Li}^+$ . В том случае, если радиус центра связывания очень мал, ряд селективности располагается в соответствии с электростатическим притяжением анионной группировки к катиону, т. е. оказывается обратным:  $\text{Li}^+ > \text{Na}^+ > \text{K}^+ > \text{Rb}^+ > \text{Cs}^+$ . Между этими крайними случаями (I и XI рядами, по Дж. Эйзенману) располагается девять промежуточных рядов, для которых в разной степени проявляется «энергетическая конкуренция» между силами электростатического притяжения и способностью катиона к гидратации. Дегидратация катиона необходима ввиду малых размеров катионной поры: чтобы войти в канал, катион должен сбросить с себя «водную шубу».

Теория Эйзенмана в первом приближении удовлетворительно объясняет проницаемость биомембран, содержащих катионные каналы белковой природы, и модельных мембран со встроенными в них каналообразователями. В ходе анализа катионной селективности различных мембран, проведенного А. А. Львом (1975, 1976), было, в частности, выяснено, что проницаемость канала раннего тока нервных волокон лягушки практически соответствует X ряду ( $\text{Na}^+ = \text{Li}^+ > \text{K}^+ > \text{Cs}^+ = \text{Rb}^+$ ), для мембраны, модифицированной валиномицином, характерен III ряд ( $\text{Rb}^+ > \text{K}^+ > \text{Cs}^+ > \text{Na}^+ > \text{Li}^+$ ), а макроциклическим антибиотиком тетранактином — V ряд ( $\text{K}^+ > \text{Rb}^+ > \text{Na}^+ > \text{Cs}^+ > \text{Li}^+$ ).

Немодифицированная искусственная мембрана обладает весьма низкой катионной избирательностью. Согласно А. А. Льву (1976), она соответствует ряду XI. Сопоставима ли проницаемость мембранных бислоев с проницаемостью мембран клеток в невозбужденном состоянии? Оказалось, что для мембран многих покоящихся клеток характерен IV ряд ( $\text{K}^+ > \text{Rb}^+ > \text{Cs}^+ > \text{Na}^+ > \text{Li}^+$ ), получивший название биологического ряда проницаемости (А. А. Лев, 1975). Этот ряд совпадает с тем, который характеризует избирательность для одновалентных катионов искусственной мембраны, содержащей продукты перекисного окисления липидов (А. В. Лебедев и др., 1984).

Нельзя исключить, что большая селективность плазматических мембран по отношению к калию по сравнению с натрием (как будет показано далее, это лежит в основе образования *потенциала покоя* в клетках) обусловлена наличием некоторого количества окисленных липидов в мембране.

**Таблица 1.** Распределение ионов по обе стороны поверхностной мембраны кардиомиоцита в состоянии покоя и равновесные потенциалы для некоторых ионов

Ион	Внеклеточная жидкость, мМ	Цитоплазма	Равновесный потенциал ( $E_p$ ), мВ	$E_n - E_p$ , мВ
Na <sup>+</sup>	145	15 мМ	+60	—140
K <sup>+</sup>	4	150 »	—94	+14
Cl <sup>—</sup>	120	6 »	—80	0
Ca <sup>2+</sup>	2	0,1 мкМ	+139	—209

Различная проницаемость клеточных мембран для Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup> и Cl<sup>—</sup> является основой для *регуляции физиологического ответа* клеток на сигнал, поступающий извне. Какова связь между ионной проницаемостью сарколеммы сердца и электрическими процессами на ней? Трансмембранный потенциал покоя клеток миокарда  $E_n$  составляет около —80 мВ (знак минус с внутренней стороны мембраны). Ионный состав внеклеточной среды (близкий составу плазмы крови) характеризуется высокой концентрацией Na<sup>+</sup> и Cl<sup>—</sup> и низкой концентрацией K<sup>+</sup>; концентрация Ca<sup>2+</sup> составляет около 2 ммоль/л (табл. 1).

Внутри клеток концентрация Na<sup>+</sup> и Cl<sup>—</sup> соответственно в 10 и 20 раз ниже, чем снаружи, концентрация K<sup>+</sup> почти в 40 раз выше: уровень свободного Ca<sup>2+</sup> составляет около 0,1 мкмоль/л. Формирующийся для каждого иона равновесный потенциал  $E_p$  может быть рассчитан согласно уравнению Нернста. Движущая сила транспорта иона представляет собой разность между потенциалом покоя  $E_n$  на мембране (—80 мВ) и равновесным потенциалом ( $E_n - E_p$ ). Отрицательное значение (составляющее, например, для Ca<sup>2+</sup> —209 мВ) означает, что движущая сила направлена внутрь клеток.

Каковы потоки четырех ионов через мембрану кардиомиоцита в состоянии покоя? Согласно закону Ома ток через мембрану пропорционален потенциалу (в приводимом случае  $E_n - E_p$ ) и проводимости мембраны  $g$ . Ток Cl<sup>—</sup>, как видно из табл. 1, в этих условиях отсутствует, поскольку движущая сила для этого иона равна нулю. Из-за сравнительно низкой концентрации во внеклеточной среде и относительно низкой проводимости в состоянии покоя распределение Ca<sup>2+</sup> почти не влияет на

потенциал покоя, и им можно пренебречь. Из этого следует, что для обеспечения стабильного потенциала на мембране по-коящейся клетки необходимо, чтобы потоки  $\text{Na}^+$  и  $\text{K}^+$  были уравновешены. В связи с тем, что величина  $E_{\text{п}} - E_{\text{р}}$  примерно в 10 раз выше для  $\text{Na}^+$ , чем для  $\text{K}^+$ , отношение  $g_{\text{K}}/g_{\text{Na}}$  составляет 10. Иными словами, *потенциал покоя клетки определяется преимущественно ионами калия.*

Возбуждение клетки резко меняет ситуацию на мембране: за счет открывания специфических натриевых и кальциевых каналов  $g_{\text{Na}}$  и  $g_{\text{Ca}}$  значительно увеличиваются, что вызывает падение потенциала на мембране и формирование так называемого *потенциала действия*. В дальнейшем трансмембранный потенциал возвращается к исходному в результате активации калиевых каналов, а градиенты концентрации  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  и  $\text{Ca}^{2+}$  восстанавливаются благодаря функционированию ионных насосов, и переносчиков ( $\text{Na}$ ,  $\text{K}$ -АТФазы,  $\text{Ca}$ -АТФазы и  $\text{Na}/\text{Ca}$ -обменника, см. разд. 4.3).

*Ион кальция является регулятором проницаемости мембран.* Еще 30 лет назад было установлено, что  $\text{Ca}^{2+}$  оказывает влияние на лизис эритроцитов, вызванный механическим или осмотическим воздействием. При помещении эритроцитов в растворы неэлектролитов, например декстрозы или лактозы, они быстро теряют калий и подвергаются гемолизу. Натрий лишь частично предотвращает гемолиз, при этом кальций обладает значительно более выраженным защитным действием. В настоящее время установлено, что кальций модифицирует также и проницаемость поверхностных мембран возбудимых клеток.

Следует отметить, что стабилизирующий эффект  $\text{Ca}^{2+}$  проявляется не только на биомембранах, но и на системах искусственных мембран — в липосомах и на бислойных липидных мембранах.

## 4.2. Кальциевые и кальцийзависимые каналы

Вход  $\text{Ca}^{2+}$  в клетки осуществляется либо в результате активации специфических кальциевых каналов, либо в обмен на ионы натрия. Различают *Ca-каналы, регулируемые мембранным потенциалом*, и каналы, *открываемые при связывании ряда агонистов с рецепторами* (например, никотиновыми рецепторами в клетках гладких мышц). Особенно важную роль потенциалзависимые каналы играют в клетках сердца и нервных клетках. В частности, плато потенциала действия, отличающее клетки сердечной мышцы от клеток скелетных мышц, обусловлено активацией так называемого «медленного» кальциевого тока.

Особенностью «медленных» Са-каналов является их чувствительность к величине потенциала на поверхностной мембране клетки: активация Са-каналов наблюдается, как правило, при величинах трансмембранного потенциала около —50 мВ, при положительных значениях потенциала каналы инактивируются.

Широкое использование техники измерения ионных токов на изолированных клетках, в частности кардиомиоцитах, привело за последние 5—7 лет к пересмотру основных представлений о свойствах кальциевых каналов. Так, выявлены каналы *L* и *T*-типа (соответственно *чувствительные* и не *чувствительные к дигидропиридинам* — см. ниже), которые различаются по чувствительности к ионам кадмия и никеля, мембранному потенциалу, скорости инактивации и величине генерируемого ими тока. Вопреки прежним представлениям оказалось, что эти каналы обладают существенно *большей кальцевой селективностью* (по сравнению с натриевой), а процесс инактивации кальциевых каналов регулируется не только мембранным потенциалом, но и концентрацией внутриклеточного  $\text{Ca}^{2+}$ . Для некоторых нервных клеток показано существование третьего типа кальциевых каналов — *N*-типа. Как и каналы *T*-типа, эти каналы не чувствительны к действию дигидропиридинов, однако, в отличие от первых, они активируются при значительной деполяризации мембраны.

Тем, кто желает ближе ознакомиться с электрофизиологическими характеристиками кальциевых каналов, особенностями их функционирования в различных клетках, можно рекомендовать исчерпывающую монографию П. Г. Костюка (1986). Ниже будут рассмотрены основные принципы регуляции этих каналов и последние биохимические данные, проливающие свет на их структуру.

Значительный вклад в изучение структуры и функции Са-каналов внесли исследования с *кальцевыми антагонистами* — большим классом низкомолекулярных соединений, блокирующих кальцевые токи (рис. 12). С помощью радиоактивно меченных блокаторов кальциевых токов удалось установить концентрацию кальциевых каналов в разных органах и тканях, изолировать в чистом виде фрагменты каналов *L*-типа и выяснить их структурную организацию.

Наиболее часто применяемыми кальцевыми антагонистами являются соединения из группы *дигидропиридинов* (рис. 12). Эффект блокатора кальциевых токов нитрендипина, как и функция самого канала, зависит от потенциала: этот кальцевый антагонист воздействует лишь на инактивированный канал. Удивительным является факт, что близкие структурные аналоги нитрендипина, напротив, увеличивают кальцевый ток. Исходя из данных опытов по измерению тока через одиночные



каналы, сделан вывод, что эти соединения увеличивают время нахождения Са-каналов *L*-типа в открытом состоянии. Более того, один из них (ВАУ К8644) проявляет свое антагонистическое или агонистическое действие в зависимости от мембранного потенциала.

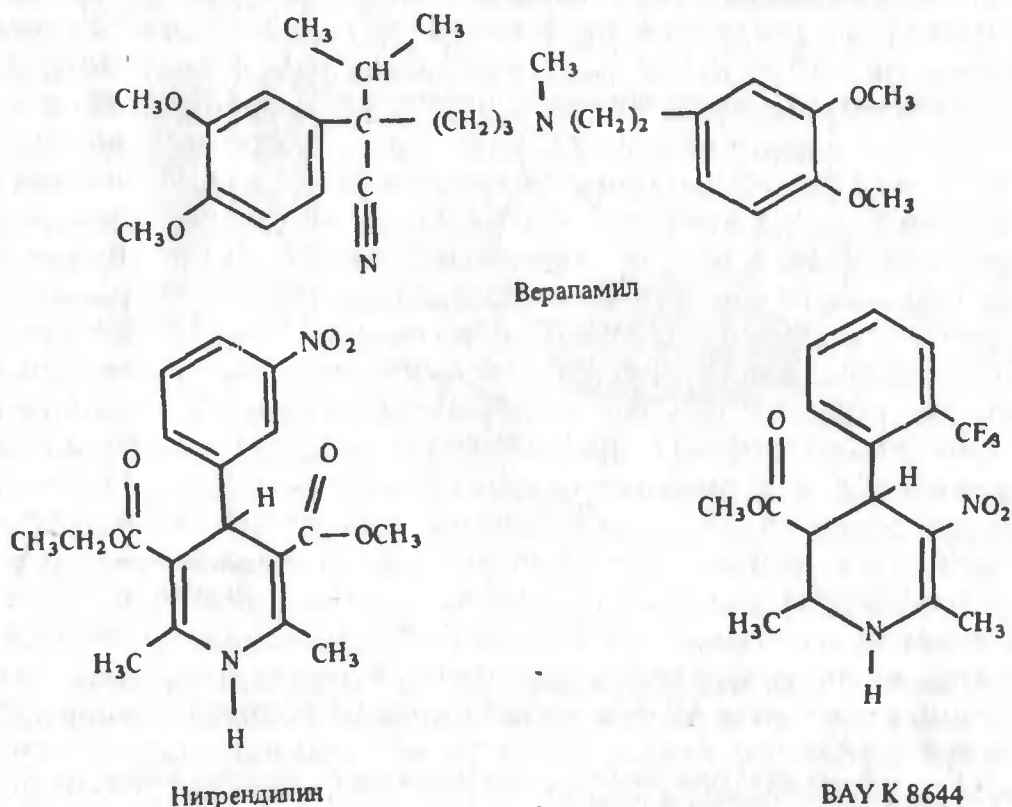


Рис. 12. Модификаторы потенциалзависимых кальциевых каналов  
Верапамил — наиболее известный кальцевый антагонист; нитрендипин — блокатор; ВАУ К8644 — активатор

Установлено, что Са-каналы обладают, по крайней мере, тремя типами высокоаффинных участков для кальциевых антагонистов, взаимодействующими с дигидропиридинами, верапамилом и дилтиаземом. При этом связывание верапамила и дилтиазема аллостерически воздействует на связывание дигидропиридинов.

Кальциевые каналы *L*-типа некоторых возбудимых клеток подвержены эффективной регуляции бета-адренергическими агентами. Под их действием увеличивается поступление  $\text{Ca}^{2+}$  в клетки. При этом бета-агонисты увеличивают не ток катиона через каждый отдельный канал, но вероятность нахождения канала в открытом состоянии. Этим, в частности, объясняется увеличение силы сердечных сокращений при поступлении в кровь катехоламинов. Взаимодействие двух вторичных мессенджеров —  $\text{Ca}^{2+}$  и цАМФ — на уровне кальциевого канала осуществляется следующим образом:



Связывание агониста (например, изопротеренола) с бета-рецептором → стимуляция аденилатциклазы → увеличение концентрации цАМФ → активация протеинкиназы → фосфорилирование специфического участка канала или специального регуляторного белка → изменение свойств канала *L*-типа → увеличение входа  $\text{Ca}^{2+}$  в клетку.

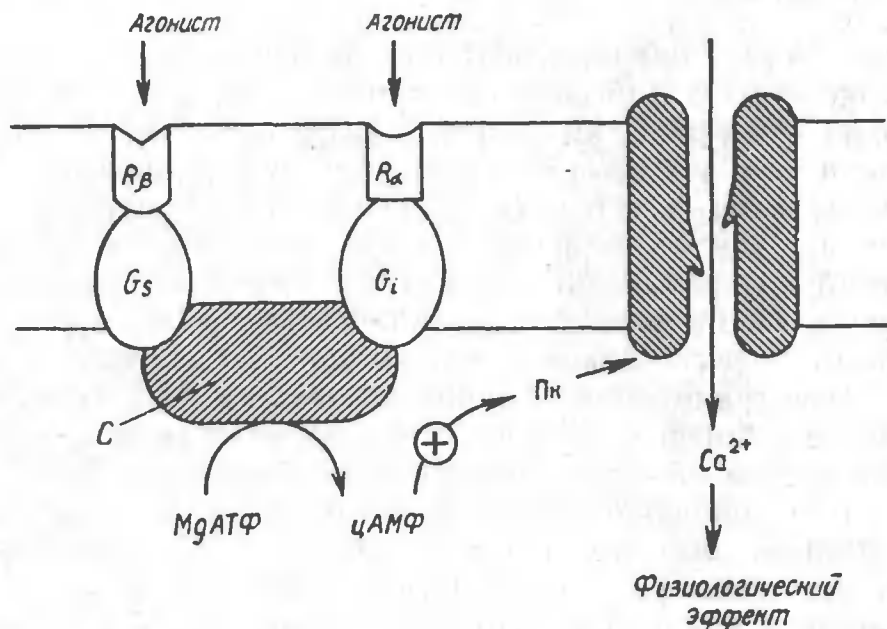


Рис. 13. Регуляция поступления  $\text{Ca}^{2+}$  в клетку через селективный канал под действием агонистов, связывающихся с рецептором (*R*):

*G* — ГТФ-связывающий белок, *C* — каталитическая единица аденилатциклазы, Пк — протеинкиназа

Более детальные исследования механизмов регуляции Са-каналов выявили участие в ней ГТФ-связывающих регуляторных компонентов (*G*-белков) аденилатциклазы. Эти внутри-мембранные белки образуют мостики между гормональными рецепторами, пронизывающими мембрану, и каталитической субъединицей с аденилатциклазы (рис. 13). Установлено, что рецепторы  $R_\beta$  и  $R_\alpha$  взаимодействуют с регуляторными белками двух типов —  $G_s$  и  $G_i$ , обеспечивающими соответственно активацию и ингибирование аденилатциклазы. В покое рецептор подавляет взаимодействие *G* с активатором аденилатциклазы — ГТФ. Связывание гормона с рецептором снимает это ингибирующее воздействие. ГТФ вытесняет из *G*-белка ГДФ и фермент инактивируется. Ход дальнейших событий показан на рис. 13.

Можно ли считать, что дигидропиридиновый рецептор представляет собой Са-канал или хотя бы его часть? Для ответа на этот вопрос была проведена очистка рецептора и его встраивание в искусственные бислоиные мембраны. Установлено, что рецептор дигидропиридина представляет собой глико-

протеин и имеет олигомерную структуру. Он состоит из трех типов субъединиц с молекулярными массами, равными 162, 50 и 33 кД. Существенно, что первые две субъединицы фосфорилируются под действием цАМФ-зависимой протеинкиназы. При встраивании дигидропиридинового рецептора в бислой наблюдается формирование ионных каналов, имеющих проводимость около 20 пСм, причем по основным регуляторным, биохимическим и фармакологическим свойствам они оказываются близки Са-каналам L-типа. Таким образом, исследования, выполненные с использованием дигидропиридинов, вплотную приблизили ученых к выяснению структуры Са-канала.

Кальций оказывает воздействие на потенциал плазматических мембран не только благодаря трансмембранному переносу через специализированные каналы, но также *регулируя активность других каналов*, в частности калиевых. Специфические Са-активируемые К-каналы выявлены в самых различных клетках. Физиологическая роль данных каналов для большинства клеток пока не установлена. Предполагают, что они участвуют в передаче гуморального сигнала и в Na-зависимом электрогенном транспорте аминокислот. При таком переносе происходит деполяризация поверхностной мембраны. Так как Са-зависимые К-каналы также открываются в результате деполяризации плазмалеммы, активация системы выведения  $K^+$  из клетки приводит к частичному восстановлению потенциала и поддержанию электрогенного входа аминокислот в цитоплазму.

Существуют данные о том, что в регуляции активности Са-зависимых К-каналов принимает участие специфический низкомолекулярный белковый регулятор — *кальмодулин*. Такой вывод основан на том, что антагонист кальмодулина — *трифторперазин*, ингибирует активность этих каналов.

### 4.3. Системы Na/Ca-обмена в клеточных мембранах

Установлено, что выделение  $Ca^{2+}$  из самых различных клеток во внешнюю среду зависит от присутствия во внеклеточном пространстве *ионов натрия*. На основании этого было высказано предположение, что в плазмалемме существует система, обеспечивающая сопряженный разнонаправленный *трансмембранный перенос ионов кальция и натрия*. Существование Na/Ca-обменного механизма было продемонстрировано вначале для сердца (H. Reuter, N. Seitz, 1968) и гигантского аксона кальмара (M. P. Blaustein, A. L. Hodgkin, 1968, 1969), а затем и для других возбудимых и невозбудимых тканей. Движущей силой переноса  $Ca^{2+}$  против его концентрационного градиента является не только градиент натриевых ионов, но и трансмем-

бранный потенциал, поскольку Na/Ca-обмен имеет *электрогенную природу*. Доказательством электрогенности процесса является сигмоидальная зависимость концентрации выходящего  $\text{Ca}^{2+}$  из клеток от концентрации находящегося во внешней среде  $\text{Na}^+$  (коэффициент Хилла равен трем). Предположение о стехиометрии обмена  $3\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  подтверждено на аксоне прямыми измерениями входящих и выходящих ионных потоков (M. P. Blaustein, J. M. Russel, 1975).

Na/Ca-обмен может обеспечивать как вход  $\text{Ca}^{2+}$  в клетку, так и его выброс в межклеточное пространство в зависимости от потенциала на мембране и соотношения градиентов Na и  $\text{Ca}^{2+}$ . Так, в цитоплазме возбужденной клетки концентрация свободного кальция в среднем увеличивается от 0,1 до 1 мкмоль/л и трансмембранный  $E_{\text{Ca}}$ , согласно уравнению Нернста (см. гл. 3), уменьшается примерно на 30 мВ, что создает условия для активации выброса  $\text{Ca}^{2+}$  из клетки. Из этих данных, однако, не следует, что два разнонаправленных обменных потока представляют собой полностью симметричные процессы. Оказалось, что в ряде органов и тканей, включая сердце, обмен катионов существенно активируется в присутствии АТФ с цитоплазматической стороны мембраны. С помощью аналога АТФ —  $[\gamma\text{-S}]\text{АТФ}$ , в котором кислород терминального фосфата заменен на серу и который по этой причине является субстратом протеинкиназ, но не АТФаз, показано четырехкратное ускорение процесса Na/Ca-обмена в гигантских аксонах кальмара (R. DiPollo, L. Beaube, 1987). Таким образом, данный процесс может быть подвержен чрезвычайно тонкой регуляции, опосредованной протеинкиназными реакциями фосфорилирования и дефосфорилирования самого переносчика или соседнего минорного белка.

Система Na/Ca-обмена, по-видимому, вносит значительный вклад в регуляцию уровня внутриклеточного  $\text{Ca}^{2+}$ . Хотя сродство переносчика к  $\text{Ca}^{2+}$  сравнительно невелико ( $K_d = 1,5\text{—}5\text{ мкМ}$ ), максимальная скорость кальциевого транспорта, измеренная на изолированных везикулах плазмалеммы, достигает 20 нмоль/мг белка в 1 с. Согласно предположениям на систему Na/Ca-обмена падает основная нагрузка в начальный момент после возбуждения клетки, когда велика концентрация свободного цитоплазматического  $\text{Ca}^{2+}$  (P. Caroni, E. Carafoli, 1981). При снижении уровня концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  в цитоплазме до 1 мкмоль/л удаление этого катиона из клетки обеспечивается за счет менее активной, но высокоаффинной Ca-АТФазы плазмалеммы.

#### 4.4. Транспорт $\text{Ca}^{2+}$ через митохондриальную мембрану

*Митохондрии* — клеточные органеллы, обладающие наибольшей емкостью по отношению к ионам кальция. В отличие от других внутриклеточных структур, использующих АТФ для аккумуляции  $\text{Ca}^{2+}$ , митохондрии транспортируют этот катион за счет трансмембранного электрического потенциала (около — 180 мВ), который генерируется системой переноса электронов и протонов в ходе окисления субстратов дыхания: глутамата, сукцината, пирувата, жирных кислот и т. д. Концентрация  $\text{Ca}^{2+}$ , перенесенного в митохондриальный матрикс, поддерживается в нем на низком уровне за счет связывания этого катиона с белками и неорганическим фосфатом.

Из какой бы ткани ни были выделены митохондрии, в каждом случае они обладали системой переноса  $\text{Ca}^{2+}$ . Этот факт, а также большая кальциевая емкость митохондрий, естественно, наталкивали на мысль, что митохондрии принимают непосредственное участие в регуляции внутриклеточного уровня  $\text{Ca}^{2+}$ .

Ниже рассмотрены *основные пути поглощения и выброса  $\text{Ca}^{2+}$  митохондриями*.

При дыхании митохондрий происходит электрогенный выброс в цитоплазму ионов водорода и генерация градиента рН и электрического потенциала на внутренней митохондриальной мембране (знак «—» внутри). Образующийся так называемый *электрохимический потенциал ионов водорода* ( $\Delta\mu\text{H}$  в соответствии с определением П. Митчела) является движущей силой транспорта катионов и слабых кислот внутрь органелл. На каждые два перенесенных по дыхательной цепи электрона внутрь митохондрии транспортируется два иона кальция. Данные о кинетических параметрах системы транспорта  $\text{Ca}^{2+}$  противоречивы. Однако можно сделать вывод, что величины кажущихся  $K_d$  и  $V_{\max}$  при транспорте составляют соответственно более 10 мкМ и 500 нмоль/мг митохондриального белка в 1 мин.

Поскольку перенос  $\text{Ca}^{2+}$  внутрь митохондрий блокируется рутениевым красным, естественно предположить, что митохондриальный переносчик ионов кальция по своей природе является *гликопротеином*. Из митохондрий выделено несколько гликопротеинов, обладающих относительно высоким сродством к  $\text{Ca}^{2+}$ . Водорастворимый гликопротеин *кальвектин* с молекулярной массой, равной 15 кД (G. Sottocasa et al., 1972), и гидрофобный *кальцифорин* с молекулярной массой, равной 3 кД (A. E. Shamoo et al., 1980, 1984), являются, пожалуй, наиболее вероятными претендентами на роль кальциевого переносчика.

Антитела против кальвектина, находящегося в межмембранном пространстве митохондрий, ингибируют энергозависимый транспорт  $\text{Ca}^{2+}$  в митохондрии печени. Не исключено, однако, что этот гликопротеин не участвует непосредственно в трансмембранном переносе  $\text{Ca}^{2+}$ , но «узнает» и связывает его в межмембранном пространстве. В то же время кальцифорин, способный связывать 1 ион кальция с  $Kd=15$  мкМ, в концентрации 5 мкмоль/л вызывает 100-кратное увеличение проводимости бислойных липидных мембран в кальцийсодержащей среде. Таким образом, возможно, что именно кальцифорин опосредует электрогенный перенос  $\text{Ca}^{2+}$ .

Кальциевая емкость митохондрий сердечной мышцы, измеряемая в присутствии фосфата, составляет около 3 мкмоль/мг белка, максимальная скорость аккумуляции  $\text{Ca}^{2+}$  — 500 нмоль/мг белка в 1 мин, а содержание митохондрий достигает 100 мг белка/г сырой массы. Однако при физиологических концентрациях  $\text{Mg}^{2+}$  (около 1 ммоль/л) и  $\text{Ca}^{2+}$  (около 1 мкмоль/л) скорость поступления  $\text{Ca}^{2+}$  в митохондрии не превышает 1 нмоль/мг белка в 1 мин. Отсюда следует, что в течение фазы расслабления митохондрии могут аккумулировать менее 1% всего  $\text{Ca}^{2+}$ , связанного с тропонином С (см. гл. 6).

Означают ли приведенные данные, что митохондриальная система транспорта  $\text{Ca}^{2+}$  создана Природой понапрасну? По всей видимости, нет. Кривая активации системы транспорта кальцием имеет сигмоидальную форму при увеличении концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  в микромолярном диапазоне. При переходе концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  от 1 до 5 мкмоль/л скорость поглощения этого катиона возрастает в десятки раз. Поэтому предполагают, что система митохондриального кальциевого транспорта включается тогда, когда происходит перегрузка клеток кальцием, например, в результате ишемии миокарда и последующей его реперфузии (см. гл. 7). В таком случае внутри митохондрий накапливаются значительные количества этого катиона, вследствие чего ингибируется АТФ/АДФ-обмен, уменьшается концентрация адениновых нуклеотидов, возникает конкуренция  $\text{Ca}^{2+}$  с  $\text{Mg}^{2+}$  за АТФ (истинным субстратом АТФ-синтетазы является  $\text{MgATP}$ ). В матриксе митохондрий происходит выпадение кристаллов фосфата кальция, и при далеко зашедшем процессе эти органеллы разрушаются. Таким образом, вместо выполнения своей основной функции — производства энергии — митохондрии, выключаясь из метаболизма, спасают клетку от гибели.

В некоторых других органах и тканях митохондрии и в нормальных условиях участвуют во внутриклеточном перераспределении  $\text{Ca}^{2+}$ . В аксоне, например, существуют по крайней мере две *кальцийаккумулирующие системы*, обеспечивающие понижение концентрации свободного  $\text{Ca}^{2+}$  в аксоплазме до



уровня около 0,1 мкмоль/л. Под действием ингибиторов митохондриальной продукции энергии концентрация  $\text{Ca}^{2+}$  увеличивается до 5 мкмоль/л (Р. F. Baker, Y. A. Umbach, 1987).

Согласно данным, полученным с помощью Са-селективного микроэлектрода, аксоплазма содержит две энергозависимые системы связывания  $\text{Ca}^{2+}$ , отличающиеся по чувствительности к рутениевому красному. Функционирование одной системы, блокируемой рутениевым красным (т. е. митохондриальной), обеспечивает понижение концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  до 0,1 мкмоль/л, функционирование второй — не чувствительной к этому соединению (предположительно локализованной в мембранах эндоплазматической сети) — до 0,2 мкмоль/л. Таким образом, существуют объекты, в которых сродство к  $\text{Ca}^{2+}$  у митохондрий выше, чем у эндоплазматического ретикулума.

Высказана гипотеза, что системы митохондриального и ретикулярного транспорта  $\text{Ca}^{2+}$  в клетках функционируют синхронно (G. Fiskum, A. Lehninger, 1982). Показано, что энергизованные митохондрии печени в суспензии понижают концентрацию свободного  $\text{Ca}^{2+}$  до 0,5 мкмоль/л, а внесение в среду печеночных микросом приводит к дальнейшему уменьшению уровня  $\text{Ca}^{2+}$  до 0,2 мкмоль/л. Аккумуляция  $\text{Ca}^{2+}$  препаратом эндоплазматического ретикулума сопровождалась снижением уровня митохондриального  $\text{Ca}^{2+}$  на 7 нмоль/мг белка. Таким образом, можно предположить, что в зависимости от уровня клеточного  $\text{Ca}^{2+}$  каждая из кальцийтранспортирующих систем (митохондрии или эндоплазматический ретикулум) в той или иной степени участвует в регуляции концентрации свободного  $\text{Ca}^{2+}$ .

Для ряда тканей, включая сердечную, показан физиологический механизм выхода  $\text{Ca}^{2+}$  из митохондрий, сопряженный с его обменом на  $\text{Na}^+$  (M. Crompton et al., 1978; H. Affolter, E. Carafoli, 1980). По всей видимости, этот обмен электрогенен ( $3\text{Na}^+/\text{1Ca}^{2+}$ ).

Таким образом, движущей силой обмена  $\text{Ca}^{2+}$  на  $\text{Na}^+$  может быть электрический потенциал на митохондриальной мембране (знак «—» внутри органеллы). Так как зависимость выхода  $\text{Ca}^{2+}$  из митохондрий от концентрации  $\text{Na}^+$  носит сигмоидальный характер, то при очень незначительных изменениях концентрации цитоплазматического  $\text{Na}^+$  может происходить существенная активация  $\text{Na}/\text{Ca}$ -обмена.

#### 4.5. Системы АТФ-зависимого выведения $\text{Ca}^{2+}$ из эритроцитов и мышечных клеток

Существование системы АТФ-зависимого выведения  $\text{Ca}^{2+}$  из цитоплазмы клеток во внеклеточное пространство впервые было показано для эритроцитов (H. J. Schatzman, 1966). Эту



функцию выполняет встроенная в клеточную мембрану Са-АТФаза, активируемая кальмодулином. В дальнейшем системы АТФ-зависимого транспорта  $\text{Ca}^{2+}$  через плазматическую мембрану были выявлены как в невозбудимых, так и возбудимых, в том числе мышечных (Р. Caroni, E. Carafoli, 1981), клетках.

Наиболее хорошо изучены структура и кинетические свойства кальмодулинзависимой Са-АТФазы эритроцитов. Этот фермент обладает высоким сродством к  $\text{Ca}^{2+}$  ( $K_d$  менее 1 мкМ) и способен понижать его концентрацию в клетке по крайней мере до уровня 0,1 мкмоль/л (Е. Carafoli, M. Zurini, 1982). В то же время каталитическая активность кальмодулинзависимой Са-АТФазы невелика: в интактном эритроците фермент транспортирует  $\text{Ca}^{2+}$  со скоростью около 30 нмоль/мг белка в 1 мин. Несмотря на низкую активность системы АТФ-зависимого выведения  $\text{Ca}^{2+}$  из эритроцитов, ее, по-видимому, хватает для поддержания низкой концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  в цитоплазме этих невозбудимых клеток.

Са-АТФаза эритроцитов в ходе гидролиза АТФ образует фосфолированное производное ( $E-P$ ) (Р. А. Knauf et al., 1974). Предполагают, что, как и в гомологичном ферменте из саркоплазматического ретикулума (см. разд. 5.2), фосфорилированный интермедиат образуется на аспартильном остатке АТФазы. На этом, впрочем, кончается сходство двух транспортных систем. Эритроцитарный фермент отличается большой молекулярной массой (140 кД), высокая чувствительность к ингибитору ванадату, способность непосредственно стимулироваться кальмодулином.

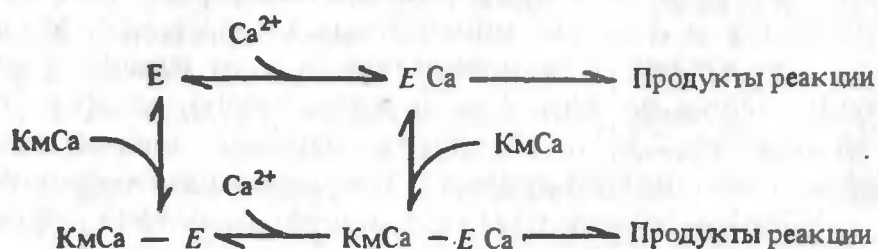
Образование  $E-P$  происходит лишь в Са-содержащей среде;  $\text{Mg}^{2+}$  ускоряет дефосфорилирование АТФазы. В то же время, если фосфобелок образуется в присутствии как  $\text{Ca}^{2+}$ , так и  $\text{Mg}^{2+}$ , то в безмагниевой среде он быстро распадается. Таким образом,  $\text{Mg}^{2+}$  воздействует на одну из промежуточных стадий реакции — до отщепления фосфата от фермента. Эти данные позволили предположить существование конформационной перестройки фосфобелка (переход  $E_1-P$  в  $E_2-P$ ).

Полагают, что АТФаза эритроцитов содержит два участка связывания АТФ (D. E. Richards et al., 1978; S. Muallem, S. J. D. Karlish, 1979) — высокоаффинный каталитический ( $K_m=2,5$  мкМ) и низкоаффинный регуляторный ( $K_m=200$  мкМ). Взаимодействие АТФ с низкоаффинным участком ускоряет расщепление фосфобелка. До сих пор окончательно не решен вопрос о соотношении скоростей гидролиза АТФ и транспорта  $\text{Ca}^{2+}$  этой системой. Опыты, выполненные на очищенной АТФазе, встроенной в фосфолипидные везикулы, указывают на то, что соотношение  $\text{Ca}^{2+}$ /АТФ составляет единицу (V. Niggli et al., 1982).

Увеличение концентрации свободного  $\text{Ca}^{2+}$  в клетке активирует Са-АТФазу эритроцитов двумя путями: за счет взаимодействия  $\text{Ca}^{2+}$  с участком каталитического центра, вовлеченным в перенос этого катиона, и при связывании комплекса кальмодулин —  $\text{Ca}^{2+}$  с регуляторным участком. В результате последнего взаимодействия увеличивается как максимальная скорость кальциевого транспорта (примерно втрое), так и сродство фермента к переносимому катиону (почти в 20 раз).

Кальмодулинсвязывающий участок фермента, свободный от регулятора (обращен, как и каталитический участок, внутрь клеток), оказывает, по-видимому, ингибирующее воздействие на каталитический участок. Под действием кислых фосфолипидов, ненасыщенных жирных кислот или ограниченного протеолиза, т. е. факторов, нарушающих структуру кальмодулинсвязывающего участка, АТФаза становится и нечувствительной к кальмодулину, и не отличимой по каталитическим параметрам от «нативного» фермента, обработанного кальмодулином.

Ниже на схеме показаны два различных механизма функционирования эритроцитарной Са-АТФазы в присутствии и в отсутствие кальмодулина (Км) (J. A. Cox et al., 1984):



Концентрация кальмодулина в эритроците существенно превышает кажущееся значение  $K_d$  для кальмодулина, оцененное по активации Са-АТФазы (7 мкМ и 3—4 нМ соответственно), а также концентрацию  $\text{Ca}^{2+}$  в этой клетке (1,6 мкМ). Поэтому ряд исследователей считают, что кальмодулин выполняет также функцию *цитоплазматического буфера кальциевых ионов*. Такой буфер может быть необходим эритроциту, который не содержит системы внутриклеточных мембран, подобной эндоплазматическому ретикулуму, во избежание кальциевой перегрузки в условиях ряда патологий.

Альтернативный способ защиты эритроцита от кальциевой перегрузки (K. K. Wang et al., 1988) связан с активацией Са-АТФазы внутриклеточной Са-зависимой протеиназой — *кальпаином*. Данный механизм может реализовываться в крайних ситуациях, когда концентрация  $\text{Ca}^{2+}$  в клетке существенно превышает  $10^{-6}$  М. При такой необратимой модификации фермент утрачивает способность к регуляции под действием кальмодулина.

Са-АТФаза сарколеммы сердца может также регулироваться под действием *цАМФ-зависимой системы протеинкиназа — протеинфосфатаза* (Р. Caroni, E. Carafoli, 1981). При этом происходит фосфорилирование самого фермента и при определенных концентрациях  $\text{Ca}^{2+}$  ускоряется гидролиз АТФ. Эффект фосфорилирования обусловлен преимущественно повышением сродства фермента к  $\text{Ca}^{2+}$ . Фосфорилированный продукт отличается от фосфобелкового интермедиата Са-АТФазы, образующегося в ходе каталитического цикла фермента. Физиологическая роль *цАМФ-зависимого фосфорилирования Са-АТФазы сарколеммы*, равно как и фосфорилирования фосфоламбана в саркоплазматическом ретикулуме под действием протеинкиназ, может заключаться в том, что с его помощью реализуется действие катехоламинов, направленное на достижение более быстрого расслабления миокарда (см. гл. 6).

Из библиотеки генов тератомы человека выделены ДНК, кодирующие полную аминокислотную последовательность Са-АТФазы плазматических мембран (А. К. Verma et al., 1988). Транслируемая последовательность содержит 1220 аминокислот; молекулярная масса фермента составляет 135 кД. Около С-концевого участка молекулы локализованы кальмодулинсвязывающий домен и домены, обогащенные глутаминовой и аспарагиновой кислотами и напоминающие по своей структуре кальмодулин. Один из них, как предполагают, может участвовать в связывании  $\text{Ca}^{2+}$ . В других участках молекулы также обнаружены последовательности, напоминающие характерную петлю в Са-связывающих областях кальмодулина, тропонина С и парвальбумина. При сравнении клонированной последовательности Са-АТФазы плазматической мембраны с последовательностью пептида Са-АТФазы эритроцитов выявлено значительное сходство в структуре, но не идентичность этих ферментов, поэтому считают, что Са-АТФазы плазматических мембран и мембраны эритроцитов представляют различные изозимы.

---

# Кальциевый насос мембран саркоплазматического ретикулума

---

# 5

Процесс поиска внутриклеточного фактора, обеспечивающего расслабление мышц, похож на детективную историю. Еще в 1942 г. А. Сент-Дьерди установил, что АТФ вызывает как сокращение, так и расслабление мышцы. Позднее в одной из фракций гомогената Дж. Бендоллом и Б. Маршем был обнаружен белковый фактор, который приводил к расслаблению мышцы в среде, содержавшей АТФ. Этим фактором была фракция саркоплазматического ретикулума, способная аккумулировать кальций из внешней среды.

К сожалению, долгие годы были потрачены на поиски растворимого низкомолекулярного фактора расслабления, способного прямо взаимодействовать с актомиозином. При этом упускали из виду возможность существования иного механизма, при котором от сократительных элементов удаляется «фактор сокращения». Не были сопоставлены два интересных наблюдения: во-первых, обнаружение (1958) фракции АТФазы из скелетной мышцы, отличной от актомиозиновой и осаждаемой примерно при 20 000 g, и, во-вторых, факт расслабления глицеринизированных мышц под действием ЭДТА даже в присутствии АТФ и избытка  $Mg^{2+}$ . Лишь в 1959 г. А. Вебер установила, что АТФаза актомиозина активируется низкими концентрациями  $Ca^{2+}$  и наблюдается параллелизм в  $Ca$ -связывающей способности хелаторов и их действии как расслабляющих агентов.

Дальнейшая идентификация фактора расслабления была уже делом техники. Показали, что данный фактор поглощает  $Ca^{2+}$  в присутствии АТФ, имеет мембранную природу и образуется из разветвленной эндоплазматической сети при получении мышечного гомогената. Наконец, было сделано предположение, которое легло в основу современной теории электрохимического сопряжения:  $Ca^{2+}$ , запасенный внутри трубочек и цистерн ретикулума, высвобождается в миоплазму под действием электрического поля, которое индуцируется деполяризацией поверхностной мембраны мышечной клетки.

Мембраны саркоплазматического ретикулума — удобная модель для изучения механизма преобразования энергии при активном транспорте ионов. Для исследования биохимических и структурных свойств саркоплазматического ретикулума используют преимущественно микросомальную фракцию, выделяемую из скелетных мышц кролика в результате гомогенизации ткани и последующего дифференциального центрифугирования. Под электронным микроскопом она выглядит как довольно гомогенная смесь замкнутых пузырьков диаметром от 50 до 200 нм. В мембранах такого препарата локализован высокомолекулярный белковый компонент — Са-АТФаза, на долю которого приходится от 70 до 90% всего белка. Благодаря исключительной простоте данной системы ионного транспорта она в настоящее время детально охарактеризована.

*Основные свойства системы кальцевого транспорта* заключаются в следующем. 1. Перенос двух ионов кальция сопряжен с гидролизом одной молекулы АТФ (A. Weber et al., 1966). При этом на мембране может быть создан более чем 1000-кратный градиент  $\text{Ca}^{2+}$ . 2. В ходе АТФазной реакции происходит образование фосфорилированного интермедиата  $E-P$  (T. Yamamoto, Y. Tomomaga, 1967). Для формирования фосфобелка необходим  $\text{Ca}^{2+}$ , для расщепления —  $\text{Mg}^{2+}$ . 3. Загруженные кальцием мембранные пузырьки в определенных условиях могут катализировать образование  $E-P$  при участии неорганического фосфата и выбрасывать  $\text{Ca}^{2+}$  наружу, синтезируя АТФ с той же стехиометрией  $\text{Ca}^{2+}/\text{АТФ}$ , как и при аккумуляции кальция (M. Makinose, W. Hasselbach, 1971; R. Panet, Z. Zelinger, 1972). Таким образом, данная система ионного транспорта является полностью обратимой.

## 5.1. Структура и состав мембран саркоплазматического ретикулума

При обработке криостатных срезов мышечной ткани антителами к Са-АТФазе саркоплазматического ретикулума и вторыми флуоресцирующими антителами выявляется густая внутриклеточная сеть. На поперечном срезе клетки скелетной мышцы видны до 1000 ячеек, напоминающих по форме пчелиные соты. Система саркоплазматического ретикулума оплетает каждую миофибриллу (рис. 14). Различают *свободный саркоплазматический ретикулум*, или мембранные трубочки, и *соединительный саркоплазматический ретикулум*, или терминальные цистерны, контактирующие с впячиваниями сарколеммы (*T*-трубочками) или с самой сарколеммой.

Структурная гетерогенность саркоплазматического ретикулума определяется различными функциями его отделов: мемб-



ранные трубочки поглощают  $\text{Ca}^{2+}$  из миоплазмы, терминальные цистерны способны к выбросу  $\text{Ca}^{2+}$  в ответ на деполяризацию сарколеммы.

Мембрана саркоплазматического ретикулума состоит на две трети из белка и на одну треть из липидов. Кроме основного белка с молекулярной массой около 100 кД (Са-АТФаза) в состав саркоплазматического ретикулума входят кальсеквест-

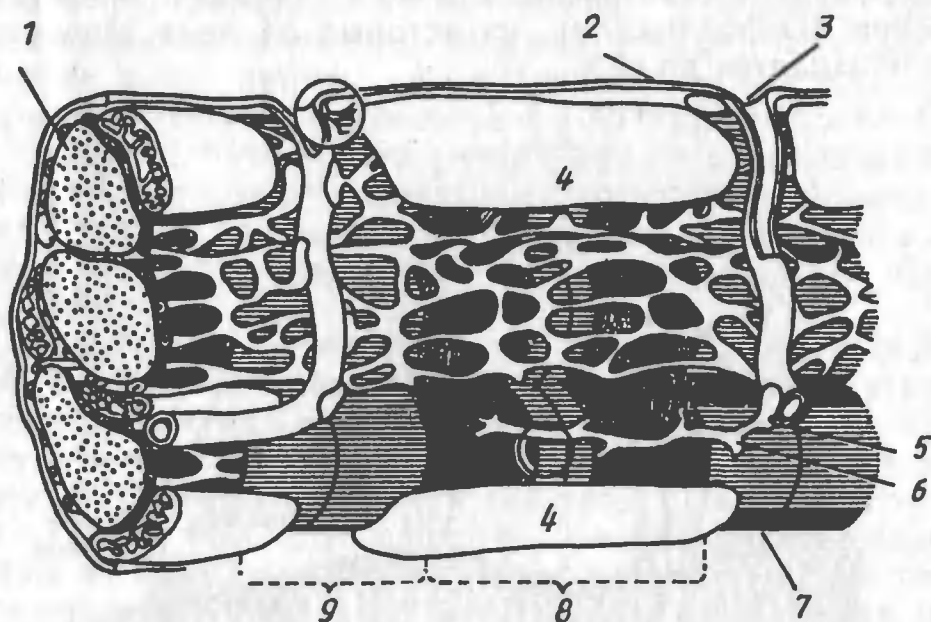


Рис. 14. Ультраструктурная организация участка миокардиальной клетки (по А. М. Katz, 1977):

1 — миофибрилла, 2 — сарколемма, 3 — T-трубочка, 4 — митохондрия, 5, 6 — терминальная цистерна и продольная сеть саркоплазматического ретикулума, 7 — Z-линия, 8 — A-полоса, 9 — I-полоса

рин (43 кД), кальцийсвязывающий белок с высоким сродством к  $\text{Ca}^{2+}$  (55 кД), гликопротеин и протеолипид (D. Н. MacLennan et al., 1974; рис. 15). Функции этих компонентов окончательно не выяснены, хотя имеются все основания предполагать, что кальсеквестрин, локализованный внутри терминальных цистерн (см. ниже), связывает большую часть кальция, поступающего в них в ходе АТФазной реакции (D. Н. MacLennan, P. T. S. Wong, 1971). Кальсеквестрин — кислый растворимый белок (40% в нем приходится на остатки глутаминовой и аспарагиновой кислот), в терминальных цистернах скелетных мышц он составляет до 20% всего белка. Одна молекула кальсеквестрина способна связать 43 иона кальция с кажущейся  $Kd=40$  мкМ.

Кроме того, с мембраной саркоплазматического ретикулума ассоциирован гликогенолитический комплекс, состоящий из гликогена, фосфоорилазы и киназы фосфоорилазы. Последние два компонента относятся к разряду периферических белков,



поскольку они легко отщепляются от мембран при солевой обработке. Тем не менее, по-видимому, имеет место определенное структурное взаимодействие гликогенолитического комплекса с Са-АТФазой, так как при его активации перенос  $\text{Ca}^{2+}$  через мембраны ретикулума ускоряется. В трубочках саркоплазматического ретикулума медленных мышц содержатся также и другие белки: флавопротеин *цитохром  $b_5$ -редуктаза*, *цитохром  $b_5$*  и *стеароил-КоА-бесатураза*. Фракция липидов представлена в основном фосфолипидами, из которых на долю *фосфатидилхолина* приходится до 60%.

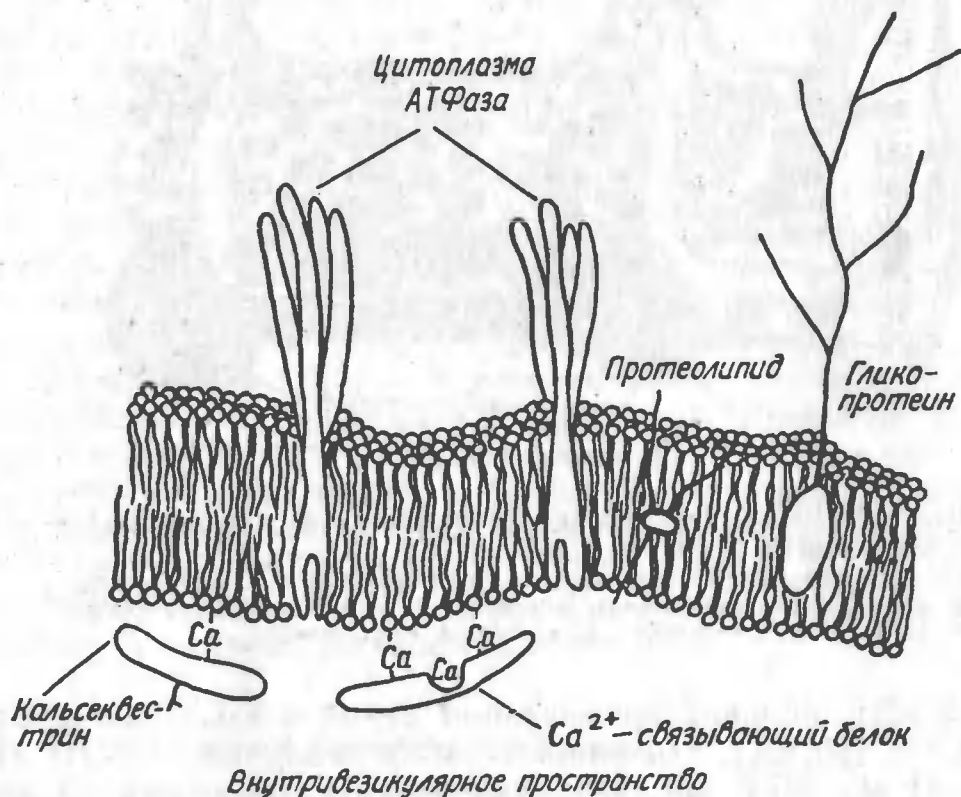


Рис. 15. Взаимное расположение основных компонентов саркоплазматического ретикулума скелетной мышцы кролика (по D. H. MacLennan, 1978)

С помощью иммунохимических методов доказано, что кальсеквестрин и белок с высоким сродством к  $\text{Ca}^{2+}$  локализуются во внутреннем объеме саркоплазматического ретикулума. Са-АТФаза пронизывает толщу мембраны и не менее чем на 1/3 выступает над цитоплазматической поверхностью липидного бислоя. Предполагаемая локализация в мембране основных компонентов саркоплазматического ретикулума скелетной мышцы показана на рис. 15.

Предпринимали много попыток выяснить вклад отдельных белковых компонентов, фосфолипидов и входящих в их состав жирных кислот в функционирование Са-транспортирующей си-

стемы ретикулума. Данную проблему удалось решить путем *реконструкции системы кальциевого транспорта в липосомах*. Оказалось, что транспорт кальция после солюбилизации Са-АТФазы детергентами, очистки фермента и последующего встраивания в липосомы из самых различных липидов (включая липиды растительного происхождения) восстанавливается практически полностью. Таким образом, АТФаза *саркоплазматического ретикулума* — *единственный компонент мембран, осуществляющий сопряжение гидролиза АТФ с переносом  $\text{Ca}^{2+}$* .

Тем не менее липиды абсолютно необходимы для проявления ферментативной активности Са-АТФазы. Обработка мембран саркоплазматического ретикулума фосфолипазами и последующее удаление продуктов расщепления фосфолипидов приводят к подавлению АТФазы; при внесении экзогенных липидов активность фермента восстанавливается (A. Martonosi et al., 1968).

Для выяснения специфичности фосфолипидов в поддержании АТФазной активности был использован метод замещения эндогенных липидных компонентов саркоплазматического ретикулума в ходе центрифугирования обработанных детергентом везикул в градиенте плотности сахарозы (G. B. Warren et al., 1974). Ответ был однозначным: фосфолипидное окружение АТФазы не оказывает специфического воздействия на АТФ-гидролитическую функцию. Для сохранения активности фермента требуется лишь, чтобы с ним было ассоциировано не менее 30 молекул фосфолипидов. Более того, почти все эти фосфолипидные молекулы без ущерба для функции могут быть замещены неионным детергентом (W. Dean, C. Tanford, 1977).

Мембрана саркоплазматического ретикулума имеет асимметричное строение и выглядит под электронным микроскопом при соответствующей обработке как *трехслойная структура*. При негативном окрашивании мембран на их внешней поверхности обнаруживаются выступы, соответствующие *гидрофильным участкам молекул Са-транспортирующего фермента* (рис. 16).

Наиболее демонстративное доказательство асимметричного расположения Са-АТФазы в нативной мембране получено при использовании метода «замораживания — скалывания» (D. Deamer, R. Baskin, 1969). Для этого образцы (изолированные мембраны, суспензии, кусочки ткани) помещают в глицерин, фиксируют глутаральдегидом и замораживают охлажденным фреоном. Замороженный образец раскалывают под вакуумом лезвием бритвы (бритва при этом не режет, но действует как молоток); затем производят напыление расщепленного образца платиной и создают его реплику.

Как видно из рис. 16, при этом удается как бы расщепить мембрану на два липидных монослоя. В результате обработки

этим методом нативных пузырьков внутримембранные частицы оказываются ассоциированными только с вогнутыми «полу-мембранами». В том случае, когда скалыванию подвергаются протеолипосомы со встроенной Са-АТФазой, частицы обнару-

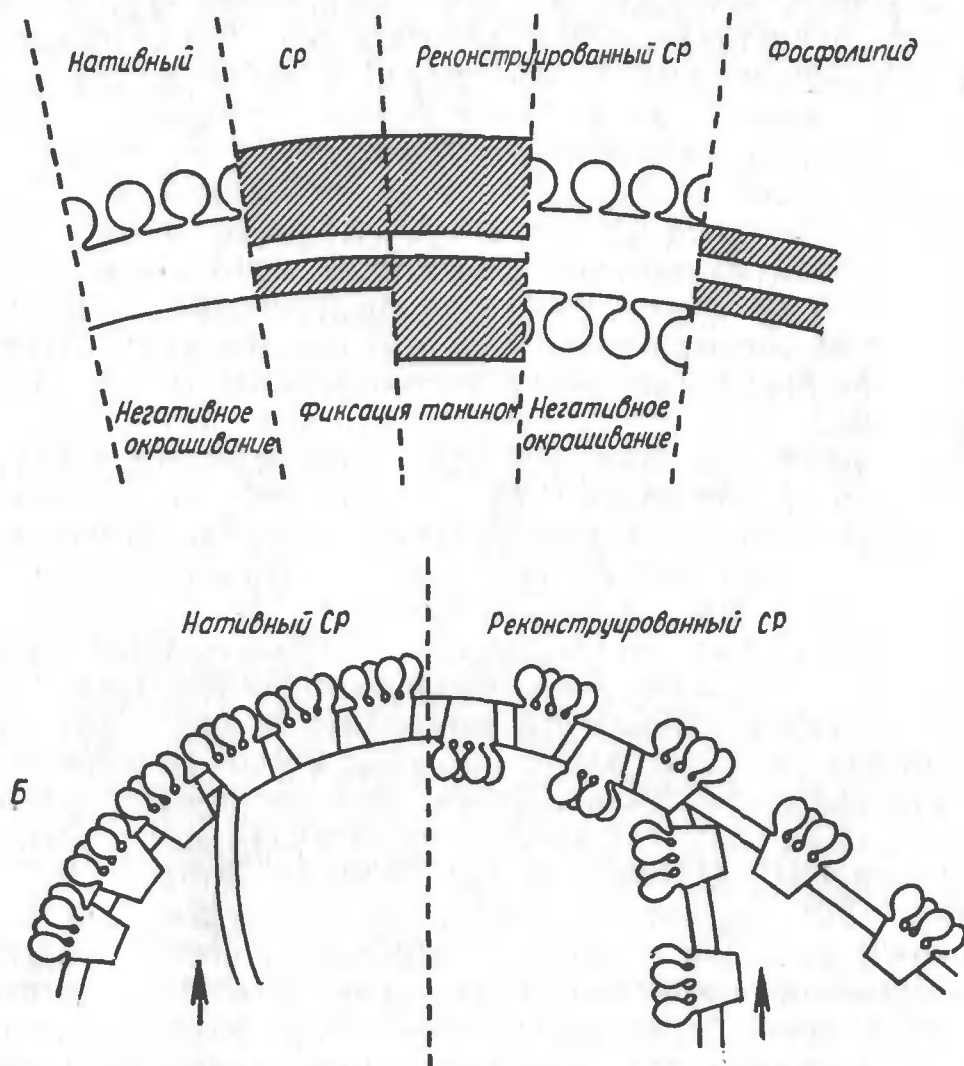


Рис. 16. Электронно-микроскопические способы анализа структуры мембран нативного и реконструированного саркоплазматического ретикулула (СР). А — стандартная электронная микроскопия; Б — процесс формирования сколов (показан стрелками) замороженных мембран (по С. Флайшеру и др., 1981)

живаются как на вогнутой, так и на выпуклой поверхностях. Таким образом, в ходе реконструкции саркоплазматического ретикулула АТФаза встраивается в бислой мембран случайным образом. Это неудивительно, поскольку и фосфолипиды в реконструированной системе равномерно распределены во внутреннем и наружном монослоях мембраны, в нативных же мембранах наблюдается асимметричное их распределение (А. А. Болдырев, 1986).

Основные события, связанные с перераспределением  $\text{Ca}^{2+}$  между цитоплазмой мышечной клетки и саркоплазматическим ретикуломом, происходят в области так называемых *триад*. Триады, свойственные скелетным мышцам, образуются поперечными трубочками (*T*-трубками), проникающими в цитоплазму и являющимися как бы продолжением сарколеммы, и терминальными цистернами. Между *T*-трубками и терминаль-

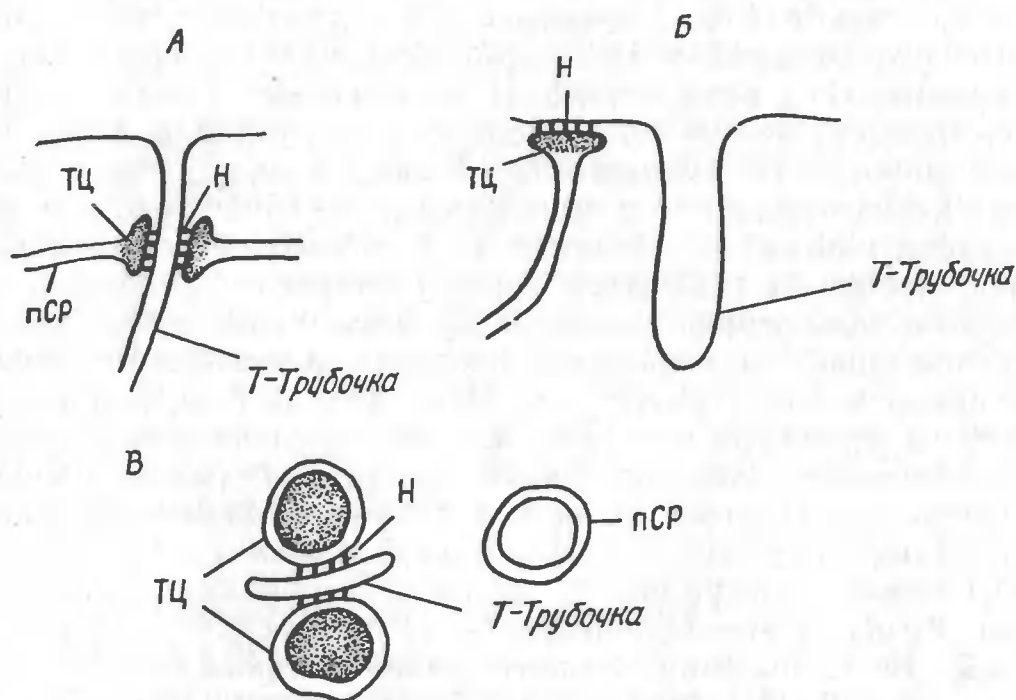


Рис. 17. Область контакта между терминальной цистерной (ТЦ) и *T*-трубочкой в клетках двух типов мышц (скелетной — А и сердечной — Б) и в реконструированном препарате ретикулярных мембран (В) (по А. М. Cornett et al., 1985): н — «ножка», соединяющая ТЦ и *T*-трубочку; пСР — продольный саркоплазматический ретикулум

ными цистернами, как показывают данные электронной микроскопии, существуют электронноплотные образования, своеобразные «ножки». Предполагают, что триадный контакт играет важную роль в сокращении мышцы и, в частности, обеспечивает передачу сигнала с поверхностной мембраны на терминальные цистерны и выброс из них ионов кальция. Для сердечных мышц характерно образование преимущественно диад, когда терминальные цистерны саркоплазматического ретикула примыкают не к *T*-трубкам, а к сарколеммальной мембране (рис. 17).

Сведения о существовании «ножек» между *T*-системой и терминальными цистернами были вначале встречены скептически. Действительно, с помощью электронного микроскопа ранее были «твердо доказаны» наличие непосредственного кон-

такта между митохондриями, саркоплазматическим ретикулулом и поверхностной мембраной, непрерывная связь ядра с мембранами саркоплазматического ретикулума и другие контакты между внутриклеточными мембранами. Все эти данные оказались артефактами. Тем не менее биохимики сразу предприняли попытки выделить триады из мышечной ткани.

Удалось не только изолировать структуры, подобные триадам, в которых по обе стороны мембранных трубочек локализовались мембранные пузырьки с электронноплотным содержанием (что указывало на их принадлежность к терминальным цистернам), но и осуществить их диссоциацию и последующую реконструкцию. Более того, после реконструкции области контактов между мембранными трубочками и пузырьками содержали «ножки», подобные выявляемым в триадах клеток. В формировании контакта участвует, по-видимому, белок с молекулярной массой 34 кД. Этот белок, очищенный до гомогенного состояния, обеспечивает *самосборку триад* (рис. 17). Пока не ясно, выполняет ли он просто функцию склеивающей субстанции, прикрепляя терминальные цистерны к *T*-трубочкам, или катализирует образование триады. Самое удивительное, однако, что этот фактор, способствующий самосборке триады, является не просто структурным белком, а типичным ферментом гликолиза — *глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназой*.

Основной интегральный белок в *T*-трубочках скелетных мышц *Mg-АТФаза* — полипептид с молекулярной массой 103—107 кД. Из-за высокой каталитической активности этого фермента (свыше 15 мкмоль  $P_i$ /мг белка в 1 мин в мембранных препаратах, обогащенных *T*-трубочками) и близости молекулярных масс *Са-АТФазы* саркоплазматического ретикулума и *Mg-АТФазы* долгое время предполагали, что *Mg-АТФаза*, присутствующая как примесь в препарате саркоплазматического ретикулума, представляет собой модифицированную *Са-АТФазу*. Этот фермент называли *базальной АТФазой ретикулярных мембран* (на фоне базальной АТФазы в препарате микросом дополнительно проявлялась активность *Са-стимулированной экстра-АТФазы*). Предполагали, что базальная и экстра-АТФазы способны к взаимному превращению. В пользу этого свидетельствовал тот факт, что при воздействии детергентов активность *Mg-АТФазы* исчезает, а активность *Са-АТФазы* увеличивается.

Использование адекватных методов разделения мембран саркоплазматического ретикулума и *T*-системы, однако, показало, что эти ферменты принадлежат различным мембранам. Кроме того, они различаются по ряду свойств. *Mg-АТФаза* — гликопротеин; в отличие от *Са-АТФазы* она связывает конканавалин А и агглютинин и значительно активируется ими; имеет изоэлектрическую точку в более кислой области и иные рН

и температурный оптимум. Этот фермент не чувствителен к ванадату. АТФаза Т-трубочек активируется миллимолярными концентрациями магния или кальция.

Одна из особенностей Mg-АТФазы заключается в том, что этот фермент не подчиняется кинетике Михаэлиса — Ментен, проявляя свойства отрицательной кооперативности по отношению к субстрату, и инактивируется в присутствии АТФ (М. Р. Multon et al., 1986). На первый взгляд, это свидетельствует в пользу олигомерной структуры фермента. Однако не исключено, что ингибирование фермента обусловлено взаимодействием АТФ с дополнительным (некаталитическим) участком на молекуле Mg-АТФазы. Этот процесс предотвращается конканавалином, после чего фермент обретает способность гидролизовать АТФ в соответствии с кинетикой Михаэлиса — Ментен.

Функция Mg-АТФазы пока не ясна, хотя, несомненно, что этот фермент должен участвовать в передаче сигнала с поверхностной мембраны к терминальным цистернам саркоплазматического ретикулума и регулировать выброс  $\text{Ca}^{2+}$  в цитоплазму. Предполагают, что Mg-АТФаза обеспечивает поддержание соответствующего градиента протонов (за счет гидролитического расщепления АТФ) по обе стороны мембраны Т-трубочки (М. Р. Moulton et al., 1986).

## 5.2. Кинетические схемы сопряжения гидролиза АТФ с переносом $\text{Ca}^{2+}$ в мембранах саркоплазматического ретикулума

На рис. 18 показан минимальный транспортный цикл Са-АТФазы саркоплазматического ретикулума. В принципе, он аналогичен циклу реакции Na, К-АТФазы (А. А. Болдырев, В. И. Мельгунов, 1986). Согласно схеме перенос  $\text{Ca}^{2+}$  сопровождается *переходами между двумя конформациями фермента* —  $E_1$  и  $E_2$ , имеющими различное сродство к  $\text{Ca}^{2+}$  и разную ориентацию в мембране. Преобразование энергии между участками фосфорилирования и связывания  $\text{Ca}^{2+}$  происходит при превращении  $E_1$  в  $E_2$ . Существование двух форм фосфорилированного и дефосфорилированного фермента было постулировано на основании опытов по связыванию лигандов и исследований промежуточных реакций.

Рассмотрим более детально превращения энергии в ходе транспортного цикла Са-АТФазы. Связывание субстрата (Mg-АТФ) и  $\text{Ca}^{2+}$  с ферментом осуществляются независимо друг от друга (стадии 1 и 2, рис. 18). Фосфорилирование фермента в присутствии микромолярного  $\text{Ca}^{2+}$  (стадия 2) приводит к образованию фосфобелка, чувствительного к АДФ (стадия 3). Ключевой момент — конформационное превращение фермен-



та, вызывающее переход АДФ-чувствительной формы фосфобелка в АДФ-нечувствительную. Этот процесс сопровождается уменьшением сродства фермента к  $\text{Ca}^{2+}$  (стадия 4), после чего  $\text{Ca}^{2+}$  отщепляется от фосфобелка и поступает во внутриретикулярное пространство (стадия 5). Затем фермент дефосфорилируется (стадии 6 и 7) и претерпевает второе конформационное изменение (стадия 8), при котором его сродство к  $\text{Ca}^{2+}$  вновь увеличивается. Для этой реакции необходим  $\text{Mg}^{2+}$ . Са-Связывающий участок фермента оказывается вновь экспонированным в цитоплазматическое пространство.

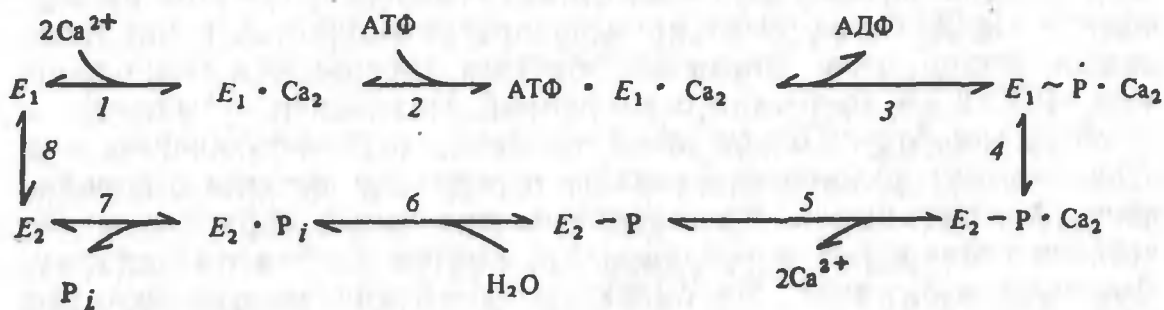


Рис. 18. Кинетическая схема, описывающая функционирование Са-АТФазы саркоплазматического ретикулула (по L. deMeis, A. L. Viana, 1979):

1—7 — стадии реакции (объяснение см. в тексте)

Данная схема объясняет также образование фосфобелка при взаимодействии фермента с неорганическим фосфатом. Это происходит в отсутствие ионов кальция в магнийсодержащей среде (стадии 7 и 6) и сопровождается образованием фосфобелка, не чувствительного к АДФ. При последующем добавлении миллимолярного  $\text{Ca}^{2+}$  (в этих условиях фермент обладает низким сродством к  $\text{Ca}^{2+}$ ) АДФ-нечувствительный фосфобелок превращается в форму, реагирующую с внешним АДФ (стадия 3) с образованием АТФ.

Как уже указано, схема постулирует, что АТФаза в ходе каталитического цикла претерпевает два конформационных перехода. Были предприняты попытки обеспечить стабилизацию фермента в двух основных конформационных состояниях и зарегистрировать их с помощью электронно-микроскопического метода. С этой целью использовали аналог неорганического фосфата *ванадат* и катионы из группы *лантанидов* (L. Dux et al., 1983—1985).

Ванадат, образующий с АТФазой нековалентный комплекс, обеспечивает кристаллизацию АТФазы и стабилизирует фермент в  $E_2$ -конформации. Лантаниды также потенцируют кристаллизацию фермента, но переводят его в  $E_1$ -конформацию. Различие между кристаллизационными формами фермента состоит в том, что в первом случае фермент находится в форме димера, во втором — преимущественно в виде мономеров.

Анализ реплик замороженных сколов мембран саркоплазматического ретикулула, предварительно обработанных ванадатом, показал, что на выпуклых «полумембранах» (см. рис. 16) возникают своеобразные вмятины, или углубления. Создается впечатление, что полипептид АТФазы был глубже «утоплен» в липидный матрикс. В то же время с помощью негативного окрашивания мембран установлено, что «ножка» АТФазы (см. рис. 16) после обработки саркоплазматического ретикулула ванадатом становится короче и основная часть фермента, выступающая в цитоплазму, локализуется ближе к мембране. Эти данные косвенно свидетельствуют о том, что при конформационном переходе АТФазы, связанном с изменением сродства к  $\text{Ca}^{2+}$ , происходит ее перемещение в глубь мембраны.

Наблюдаются ли существенные изменения во вторичной структуре Са-АТФазы при переходе из одного конформационного состояния в другое? Одним из наиболее адекватных методов оценки вторичной структуры ферментов является метод кругового дихроизма. В АТФазе саркоплазматического ретикулула 45% приходится на  $\alpha$ -спираль, 7% — на  $\beta$ -структуру, 13% — повороты полипептидной цепи, 35% — неупорядоченный клубок. Под действием  $\text{Ca}^{2+}$  либо ванадата, стабилизирующих фермент соответственно в состояниях  $E_1$  и  $E_2$ , соотношение данных структур не меняется (Р. Czermely et al., 1987). Таким образом, *конформационный переход Са-АТФазы не связан со значительными изменениями упаковки полипептидной цепи фермента.*

Цикл превращений Са-АТФазы, представленный на рис. 18, сводит вместе частные реакции, катализируемые ферментом. Однако ни в эту схему, ни в ее более усложненные варианты не укладывается одно важное наблюдение. Исходя из многочисленных данных, стационарный уровень фосфобелкового интермедиата Са-АТФазы саркоплазматического ретикулула (в некоторых препаратах более 90% белкового материала приходится на полипептид с молекулярной массой около 100 кД), образованного под действием  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$  АТФ, не превышает 4 нмоль/мг белка. Иными словами, фосфорилированию всегда подвергается примерно половина молекул Са-АТФазы. Одно из объяснений этому факту заключается в том, что кислотоустойчивые фосфобелковые интермедиаты  $E_1\text{P}$  и  $E_2\text{P}$  образуются поочередно в каждом из протомеров фермента, входящих в состав димерного комплекса.

Не исключено, что в процессе работы Са-АТФазы возникают не две, а более фосфобелковых форм. Такое предположение можно сделать, основываясь на исследованиях функций Na, K-АТФазы, сходной с Са-транспортирующим ферментом по многим кинетическим параметрам.

Na, K-АТФазе свойственны по крайней мере три фосфорилированных интермедата ( $E_1P$ ,  $E \cdot P$  и  $E_2P$ ), соответствующие АДФ-чувствительной и K-нечувствительной; АДФ- и K-чувствительной; K-чувствительной и АДФ-нечувствительной формам фермента (A. Yoda, S. Yoda, 1987). Соотношение этих форм зависит от микровязкости плазматической мембраны. Благодаря существованию множественных форм фосфобелка Na, K-АТФазная реакция, по всей видимости, способна осуществлять не один, а по крайней мере два различных реакционных цикла. Можно предложить, что несколько циклов может катализировать и Ca-АТФаза.

### 5.3. Структура Ca-АТФазы саркоплазматического ретикулума

На рис. 15 и 16 Ca-АТФаза саркоплазматического ретикулума представлена в виде тетрамера. Вывод о тетрамерной организации фермента был сделан в результате сопоставления концентрации частиц, выступающих на внешней поверхности мембраны пузырьков и выявляемых при негативном окрашивании, и внутримембранных частиц, обнаруживаемых методом замораживания — скалывания. Первых частиц оказывается в 3—4 раза больше, чем вторых.

Тем не менее до сих пор дискутируется вопрос, действительно ли кальцийтранспортирующий белок саркоплазматического ретикулума функционирует в состоянии олигомера. Предложены схемы, согласно которым мономер фермента не только осуществляет гидролиз АТФ, но и образует канал, селективный для  $Ca^{2+}$ . В пользу этого предположения свидетельствуют следующие данные.

В результате ограниченного трипсинолиза фермента из скелетной и сердечной мышц (рис. 19) образуются крупные фрагменты с кажущимися молекулярными массами около 55 и 45 кД (расщепление в участке  $T_1$ , фрагменты А и В соответственно). Более длительная обработка фермента трипсином приводит к появлению фрагментов с кажущимися молекулярными массами 30 и 20 кД (фрагменты  $A_1$  и  $A_2$  соответственно, расщепление в участке  $T_2$ ). На основе данных об аминокислотной последовательности фермента истинные молекулярные массы фрагментов составляют 55, 54, 33 и 20 кД. Фосфорилированный под действием  $[\gamma\text{-}^{32}P]$  АТФ интермедат АТФазы оказывается локализованным в А-фрагменте и его триптическом производном  $A_1$ -фрагменте (рис. 19).

Триптические фрагменты Ca-АТФазы могут быть разделены с помощью простой колоночной хроматографии или путем препаративного электрофореза в присутствии детергента додецил-

сульфата натрия. После встраивания фрагментов  $A$  и  $A_2$  в бислойные липидные мембраны их электрическое сопротивление резко падает. При этом наибольшее падение сопротивления наблюдается в присутствии ионов кальция (А. Е. Shamoo, D. H. MacLennan, 1974, 1975). Фрагмент  $B$  не проявляет высокой селективности по отношению к катионам, а фрагмент  $A_1$  практически не влияет на электрические свойства мембран. Важно, что именно в  $A_2$ -фрагменте локализован высокоаффинный участок связывания  $Ca^{2+}$ .

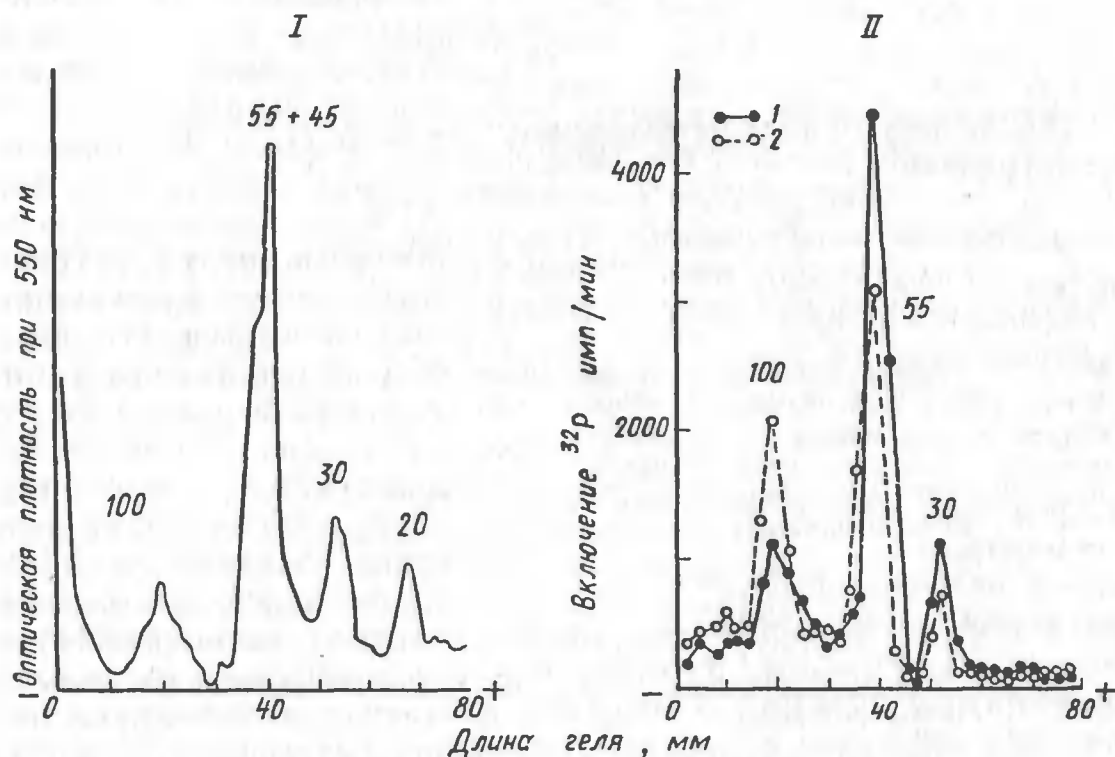


Рис. 19. Денситограмма разделенных в полиакриламидном геле триптических фрагментов Са-АТФазы с кажущимися молекулярными массами 55 ( $A$ ), 45 ( $B$ ), 30 ( $A_1$ ) и 20 ( $A_2$ ) кД (I) и включение меченого фосфата в  $A$ - и  $A_1$ -фрагменты АТФаз из сердечной (1) и скелетной (2) мышц (II)

Следует отметить, что до настоящего времени не известно, в каком направлении работает кальциевый канал АТФазы. Тем не менее приведенные данные свидетельствуют о принципиальной возможности *независимого функционирования мономеров Са-АТФазы*. Предполагаемое взаимное расположение фрагментов Са-АТФазы и структура канала представлены на рис. 20.

Обработка пузырьков ретикулула неионным детергентом додецилоктаэтиленгликолем ( $C_{12}E_8$ ) приводит к образованию мономерных форм Са-АТФазы. При этом гидролитическая активность фермента, а также основные его функциональные параметры сохраняются. Более того, после реконструкции

свободного от эндогенного липида фермента в протеолипосомы с сохранением его мономерной организации (за счет значительного «разбавления» белка липидом) оказывается возможным зарегистрировать АТФ-зависимый транспорт  $\text{Ca}^{2+}$  (J. P. Andersen et al., 1983).

Итак, каким способом осуществляет АТФаза интактного ретикулула гидролиз АТФ и перенос  $\text{Ca}^{2+}$ : функционируя как мономер или олигомер? Эта проблема может быть решена с

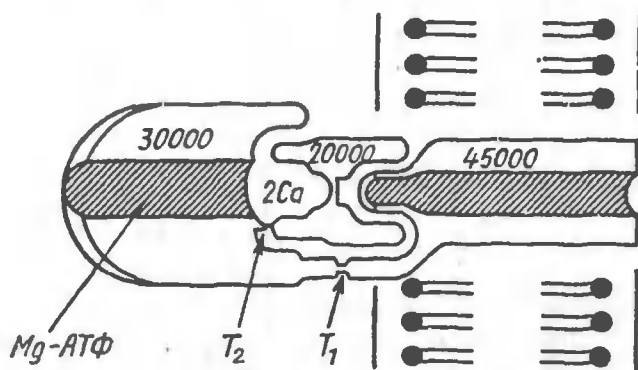


Рис. 20. Модель взаимного расположения триптических фрагментов Са-АТФазы ретикулула и предполагаемая структура кальциевого канала (заштрихована) (по А. Е. Shamoo, J. J. Abramson, 1977):

$T_1$  и  $T_2$  — места расщепления полипептидной цепи трипсином

использованием веществ, селективно связывающихся с одной из форм АТФазы, например с помощью антител к ферменту. Одно из моноклональных антител к Са-АТФазе блокирует на 90—95% перенос ионов  $\text{Ca}^{2+}$  внутрь ретикулярных пузырьков и на 80—85% гидролитическую активность фермента (D. O. Levitsky et al., 1985). Под действием детергента  $\text{C}_{12}\text{E}_8$  ингибирующее действие антитела на АТФазную активность исчеза-

ет. Из этого следует, что данное антитело взаимодействует только с ферментом, находящимся в олигомерном состоянии. Другой вывод состоит в том, что АТФазная активность в интактных везикулах саркоплазматического ретикулула, устойчивая к антителу (от 15 до 20%), обусловлена функционированием фермента в мономерной форме. Основная часть молекул АТФазы осуществляет свою функцию как олигомер.

Хотя кинетические аспекты Са-АТФазы исследованы достаточно детально, полный механизм функционирования фермента может быть установлен лишь на основании знания его первичной структуры, во многом детерминирующей более высокие уровни организации белка. Работу по выяснению первичной структуры Са-АТФазы саркоплазматического ретикулула скелетной мышцы путем анализа аминокислотных последовательностей отдельных фрагментов фермента осуществляли в течение ряда лет в нескольких группах США, Канады и Великобритании и ученые, казалось бы, были совсем близки к решению поставленной задачи. Из 1017 аминокислотных остатков, составляющих молекулу АТФазы, в общую последовательность не было включено лишь 180 аминокислот (G. Allen et al., 1980). Область белка с неустановленной первичной структурой являлась крайне



гидрофобной (только 31% аминокислот имел полярную природу), и все попытки дальнейшего разделения и анализа структуры гидрофобных пептидов были безуспешны.

Работа по секвенированию мембранных белков традиционными методами может длиться годами и в конце концов не привести к полной расшифровке их структуры. Существенным подспорьем для исследований первичной структуры служат *методы иммунохимического анализа родственных белков*. С их помощью можно определять степень иммунологической близости белков, изолированных из различных органов и тканей. Считают, что участки полипептидной цепи, локализованные во внутренней области белковой молекулы, весьма консервативны в процессе эволюции и близки (если не идентичны) у гомологичных ферментов различных животных: модификации (замене одной или нескольких аминокислот) подвергаются пептиды на поверхности белков. Именно там располагается большинство антигенных участков. На основании иммунологического индекса различия можно достаточно адекватно оценивать различия в аминокислотной последовательности белков в соответствии с эмпирической формулой (Е. М. Prager, А. С. Wilson):

$$X = 20 \lg I,$$

где  $X$  — процент различия в последовательностях,  $I$  — иммунологический индекс различия.

Исследование перекрестной реакции антисыворотки к Са-АТФазе скелетной мышцы кролика с препаратами саркоплазматического ретикулума из сердечных и скелетных мышц различных животных позволило оценить степень близости ферментов из разных мышц (Р. DeFoor et al., 1980). Индекс иммунологического различия показал, во сколько раз необходимо уменьшить разведение антисыворотки для достижения того же процента связывания комплемента (например, 50%), что и с препаратом из скелетной мышцы кролика. Как видно из рис. 21, тканевые иммунологические различия превосходят видовые: Са-АТФазы из скелетных мышц кролика и крысы практически идентичны, в то время как индекс различия между АТФазой саркоплазматического ретикулума из скелетной и сердечной мышц кролика превышает 5, что может соответствовать замене до 14% аминокислотных остатков в гомологичных белках.

В лаборатории Д. МакЛеннана была предпринята попытка подойти к выяснению первичной структуры фермента, исходя из последовательности комплементарной ей ДНК (D. MacLennan et al., 1985). Стратегия этого подхода заключалась в следующем. Библиотеки ДНК, содержавшие тысячи клонов, были проанализированы с помощью радиоактивно меченного олигонуклеотида, комплементарного небольшой последовательности аминокислотных остатков из гидрофобной порции Са-АТФазы



(именно эту порцию не удалось расшифровать с использованием традиционного подхода). Это привело к выделению двух клонов, способных к перекрестной гибридизации и кодирующих две формы фермента: из быстрых скелетных мышц и сердца. Один из клонов (3722 пар оснований) кодировал полную

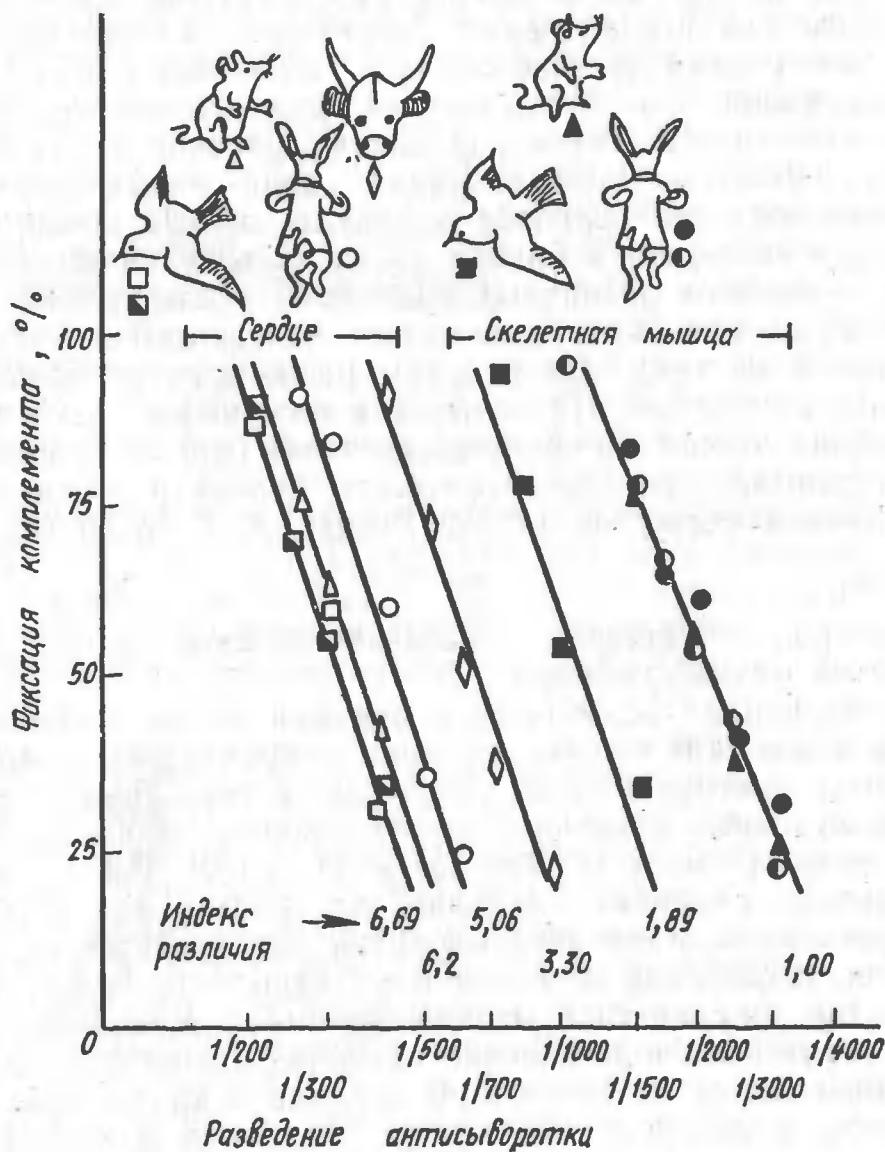


Рис. 21. Видовые и тканевые отличия Са-АТФаз саркоплазматического ретикулума, выявленные иммунологическим методом (по Р. DeFoog et al., 1980).

В качестве антитела использовали антисыворотку против Са-АТФазы скелетной мышцы кролика

последовательность аминокислот белка с молекулярной массой 109 763 Д, содержащего 997 аминокислотных остатков. Выявленная последовательность была в основном сходна с той, которая была определена в предыдущих исследованиях.

На основании анализа ДНК, кодирующей Са-АТФазу,

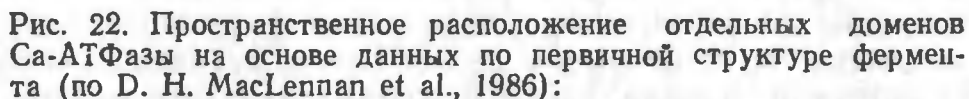
большого числа данных по кинетике, гидродинамике, электронной микроскопии и оптической дифракции, была предложена *модель взаимного расположения отдельных доменов фермента* (D. H. MacLennan et al., 1985; рис. 22). Структурно молекулу фермента можно разделить на четыре основные части: наиболее крупная (516 аминокислотных остатков, или 60% от общего количества аминокислот) выступает в цитоплазматическое пространство, небольшой домен (100 остатков) содержит участок связывания с высоким сродством к  $\text{Ca}^{2+}$  и непосредственно соприкасается с внутримембранным доменом (около 200 остатков), и, наконец, около 50 остатков участвует в связывании отдельных внутримембранных сегментов молекулы. Локализация Са-связывающего домена была постулирована благодаря большому числу сгруппированных в нем остатков глутаминовой кислоты. Предполагают, что группировки глутаминовой кислоты, выступающие в цитоплазму, могут соответствовать *участкам связывания с высоким сродством к  $\text{Ca}^{2+}$* , а локализованные в области, близкой к внутреннему объему саркоплазматического ретикулума, — *участкам с низким сродством*.

Ни одна из этих группировок не напоминала соответствующую петлю кальмодулина или тропонина С. Таким образом, окончательно доказано, что Са-связывающие участки Са-АТФазы и водорастворимых Са-связывающих белков, хотя и близки по своему сродству к  $\text{Ca}^{2+}$ , принципиально различаются по структуре.

Работа по проверке взаимного расположения функционально важных доменов АТФазы осуществляется в нескольких направлениях. Так, на основании результатов Д. МакЛеннана и сотрудников (1986) (рис. 22) функциональные центры АТФазы локализованы на различных триптических фрагментах фермента и отделены друг от друга десятками и сотнями аминокислотных остатков; однако, входя в состав активного центра, они должны быть пространственно близки. Эта близость может обеспечиваться наличием «петель» полипептидной цепи в цитоплазматическом домене фермента.

Действительно, под действием бифункциональных агентов удается «сшить» различные функциональные и структурные домены фермента дополнительно через остатки лизина (лиз-352 на А-фрагменте и лиз-514, участвующий в связывании АТФ и локализованный на В-фрагменте). После триптического расщепления АТФазы возникали фрагменты с молекулярными массами 22 и 88кД (D. C. Ross, D. B. McIntosh, 1987). При таком «точечном» воздействии на фермент его каталитическая активность полностью блокировалась. На основании этих данных можно заключить, что функционально важные аминокислотные остатки, расположенные на различных доменах, прост-

Для определения взаимного расположения отдельных частей молекулы белка широко используют и *метод переноса энергии флуоресценции (или люминесценции)* между двумя



As — ацетилированный N-концевой аминокислотный остаток;  $T_1$  и  $T_2$  — пункты расщепления фермента трипсином;  $\alpha$  и  $\beta$ -участки, соответствующие  $\alpha$ -спиральной конфигурации полипептида и  $\beta$ -структуре; в скобках указаны номера аминокислотных остатков или их количество

68

dez, 1986). По переносу энергии люминесценции в везикулах саркоплазматического ретикулула, обработанных  $Tb^{3+}$ , удалось установить, что расстояние между  $Ca$ -связывающим участком и липидным бислоем составляет всего 1,0 нм. Таким образом, не исключено, что АТФ- и  $Ca$ -связывающие центры удалены друг от друга не более чем на 3,0 нм.

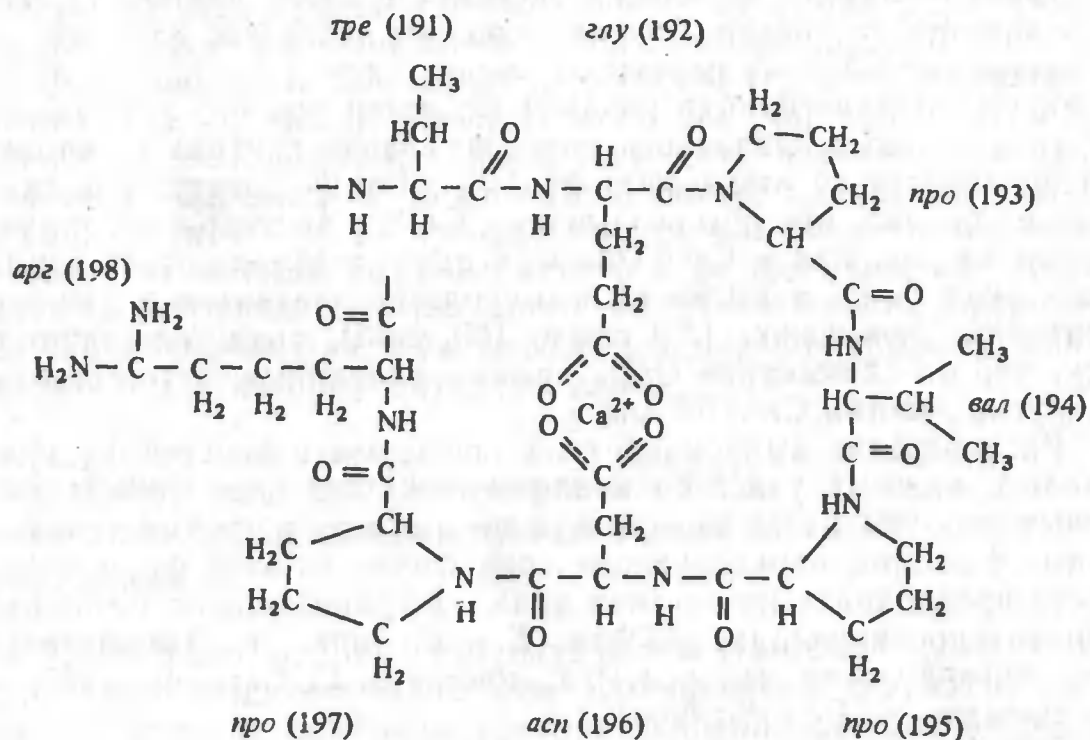


Рис. 23. Предполагаемая пространственная структура  $Ca$ -связывающего пептида  $Ca$ -АТФазы саркоплазматического ретикулула скелетной мышцы (по Р. Gangola, А. Е. Shamoov, 1986)

Можно ли, зная первичную последовательность фермента, предсказать не только взаимное расположение его отдельных функционально важных участков, но и структуру каждого из них? Такая попытка сделана в 1986 г. в лаборатории А. Е. Шаму для участка связывания, обладающего высоким сродством к  $Ca^{2+}$ . При внимательном рассмотрении аминокислотной последовательности фермента обнаруживается, что в цепи из восьми аминокислот, примыкающих ко второму ( $T_2$ ) участку триптического гидролиза (рис. 22), содержатся три остатка пролина, близко расположенных друг от друга (отделены одной аминокислотой). Как известно, именно пролин обеспечивает изгиб полипептидной цепи. Эта цепь из восьми аминокислот может образовать структуру почти круговой конфигурации. Важно также, что данная последовательность содержит остатки глутаминовой и аспарагиновой (в случае фермента из быстрой мышцы) или двух аспарагиновых (фермент из сердца или



Важно заметить, что именно остаток аспарагиновой кислоты заменен в ферменте *F*-типа (на треонин). Предполагают, что в АТФ-синтетазе можно заменить с помощью мутации остаток треонина на остаток аспарагиновой кислоты. Не станет ли измененная субъединица *F*-фермента образовывать фосфофермент, подобно транспортной АТФазе? Если это случится, то можно будет предположить, что  $\beta$ -субъединица фермента *F*-типа и АТФазы Р-типа имели общий ген-предшественник.

С помощью методов генетической инженерии представляется возможным также установить, какие из участков Са-АТФазы обеспечивают проявление различной каталитической активности этого фермента из медленной и быстрой скелетных мышц. Для этого необходимо проанализировать отличия в первичной последовательности двух ферментов и осуществить «точечные» мутации в участках генов, ответственных за синтез, например, Са-связывающих участков высокого и низкого сродства или в других областях полипептидных цепей.

#### 5.4. Регуляция системы переноса $\text{Ca}^{2+}$ через мембрану саркоплазматического ретикулума

Постоянная работа сети саркоплазматического ретикулума сердца по созданию более чем 1000-кратного градиента  $\text{Ca}^{2+}$  по обе стороны мембраны требует поддержания концентрации АТФ около активного центра АТФазной молекулы на достаточно высоком уровне. Несмотря на то что доля энерготрат, приходящихся на систему кальциевого насоса, от общего потребления энергии сердечной клеткой невелика, в случае полной блокады синтеза АТФ его расщепление ретикулярной АТФазой произошло бы за 1—2 мин. Самый факт локализации ретикулярной сети в непосредственной близости от других структур (миофибриллы), также потребляющих энергию, предполагает, что в определенных участках клетки может наступить истощение фондов АТФ.

Подобно другим АТФ-утилизирующим структурам кардиомиоцита (V. A. Saks et al., 1976, 1977), мембраны саркоплазматического ретикулума обладают эффективной системой регенерации АТФ. Ее функцию выполняют молекулы *креатинфосфокиназы*, локализованные на внешней поверхности мембраны саркоплазматического ретикулума, и *фосфокреатина*, концентрация которого в цитоплазме в несколько раз превышает концентрацию АТФ. При этом креатинфосфокиназа и Са-АТФаза работают как функционально сопряженная система, когда продукт одной реакции (АДФ в случае АТФазы и АТФ в случае креатинфосфокиназы) является субстратом другой.



В результате работы сопряженной системы происходит и кажущееся изменение кинетических параметров обоих ферментов из-за повышения локальной концентрации метаболитов около их активных центров (кажущееся значение  $K_m$  для АДФ в креатинфосфокиназной реакции, например, уменьшается в 20 раз). Тесное функциональное сопряжение между двумя ферментами обеспечивается, по всей видимости, близким расположением их активных центров (рис. 24). В результате этого

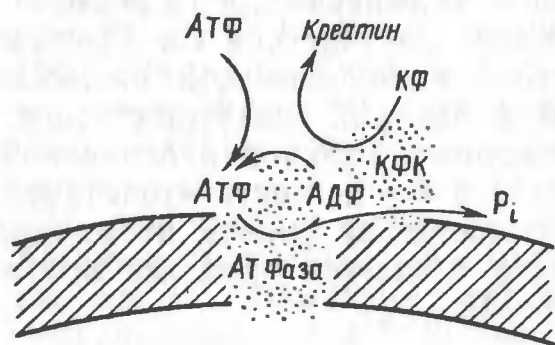


Рис. 24. Сопряжение Са-АТФазы и креатинфосфокиназы (КФК) в мембранах саркоплазматического ретикула сердца

АДФ, образованный АТФазой, попадает не в окружающую среду, а непосредственно на активный центр креатинфосфокиназы.

Активность системы кальциевого транспорта может изменяться в результате реакций фосфорилирования — дефосфорилирования белков саркоплазматического ретикула, отличных от Са-АТФазы. Известно, что катехоламины, увеличивая силу сокращения сердца, ускоряют и обеспечи-

вают более полное его расслабление. Согласно универсальной схеме (Е. W. Sutherland et al., 1965) действие катехоламинов на внутриклеточные процессы реализуется в цепи следующих событий, связанных с увеличением концентрации вторичного мессенджера — цАМФ: *взаимодействие катехоламина с  $\beta$ -рецептором на плазматической мембране  $\rightarrow$  активация аденилатциклазы  $\rightarrow$  увеличение уровня цАМФ в клетке  $\rightarrow$  активация цАМФ-зависимой протеинкиназы  $\rightarrow$  фосфорилирование белков-субстратов  $\rightarrow$  физиологический эффект.*

Под действием цАМФ-зависимой протеинкиназы и цАМФ увеличиваются скорость как гидролиза АТФ, так и аккумуляции  $\text{Ca}^{2+}$  саркоплазматическим ретикулумом сердца. При этом фосфорилируется мембранный белок с молекулярной массой порядка 25 кД — фосфоламбан (М. Tada et al., 1974, 1975). Попутно увеличивается сродство Са-АТФазы к  $\text{Ca}^{2+}$  (подобно тому, как это происходит в случае Са-АТФазы плазматических мембран в результате ее взаимодействия с кальмодулином; см. разд. 4.5). В медленных скелетных мышцах концентрация фосфоламбана существенно ниже, чем в сердце; в быстрых скелетных мышцах содержание этого белка крайне мало.

Ускорение транспорта  $\text{Ca}^{2+}$  происходит также и под действием *кальмодулина*, хотя в его присутствии в молекуле фосфоламбана фосфорилируется другой аминокислотный остаток. В результате анализа аминокислотной последовательности

участка фосфоламбана в области фосфорилирования (Н. К. В. Simmerman et al., 1986) было постулировано, что *аминокислотные остатки, фосфорилируемые под действием цАМФ-зависимой (серин) и  $\text{Ca}^{2+}$ /кальмодулинзависимой (треонин) протеинкиназ, локализованы рядом.* При этом фосфорилирование одного из остатков не влияет на способность белка к фосфорилированию другого. Таким образом, активность Са-АТФазы саркоплазматического ретикулула может увеличиваться при фосфорилировании одного и того же белка, но в результате активации различных метаболических путей, связанных с увеличением концентрации двух вторичных мессенджеров — цАМФ и  $\text{Ca}^{2+}$  и активацией цАМФ- и кальмодулинзависимых протеинкиназ.

Предполагают, что молекула фосфоламбана состоит из пяти идентичных протомеров с молекулярной массой около 5 кД, пронизывающих мембрану саркоплазматического ретикулула и входящих в тесный контакт друг с другом внутри мембраны (рис. 25). N-Концевые участки, выступающие в цитоплазму и содержащие фосфорилируемые аминокислотные остатки, в соответствии со схемой (рис. 25) не взаимодействуют между собой, когда фосфо-

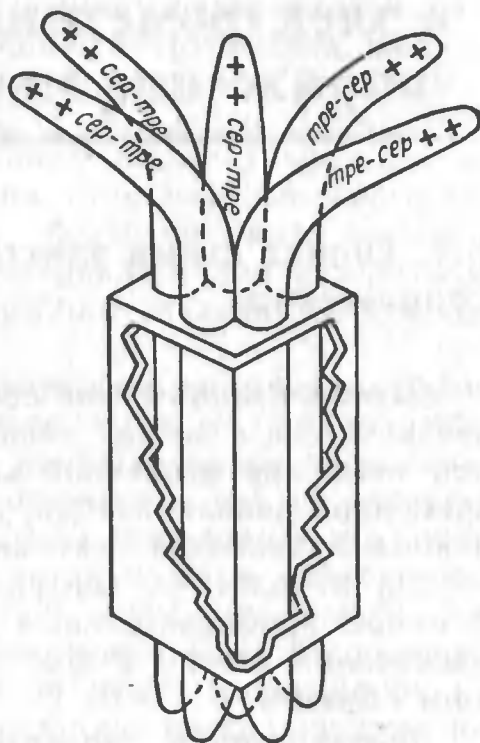


Рис. 25. Предполагаемое структурное расположение протомеров фосфоламбана в мембране и цитоплазматическом пространстве (по Н. К. В. Simmerman et al., 1986)

ламбан существует в фосфорилированной форме. Однако существует и противоположное мнение (М. Tada, 1987), согласно которому такая конформация белка возможна лишь при связывании с ним не менее десяти остатков фосфора, т. е. в условиях, когда возрастает отрицательный заряд молекул.

Предложена интересная гипотеза, объясняющая регуляторную роль фосфоламбана (А. Е. Shamoо et al., 1985). Предполагают, что в случае, когда оба аминокислотных фосфорилируемых остатка фосфоламбана ( $\text{P}_1$ - $\text{Ca}^{2+}$ -кальмодулинзависимый и  $\text{P}_2$ -цАМФ-зависимый) свободны от фосфата, Са-АТФаза работает вхолостую (не транспортируя  $\text{Ca}^{2+}$ ). В результате фосфорилирования  $\text{P}_1$  наблюдается «нормальный» транспорт  $\text{Ca}^{2+}$ , дальнейшее фосфорилирование  $\text{P}_2$  вызывает дополнительную стимуляцию АТФазы и переноса катиона.

---

# Кальций и электромеханическое сопряжение мышц

---

# 6

## 6.1. Общая схема электромеханического сопряжения

*Электромеханическое сопряжение* — процесс, который обеспечивает связь между электрическим сигналом на поверхностной мембране мышечной клетки, выражающемся в ее кратковременной деполяризации, и сократительным ответом, обусловленным активацией актомиозиновой АТФазы и передвижением тонких и толстых миофиламентов друг относительно друга. В самом приблизительном виде последовательность событий в мышечной клетке в этот период можно представить следующим образом.

*Деполяризация поверхностной мембраны → создание условий для выброса  $\text{Ca}^{2+}$  из внутриклеточных резервуаров → связывание  $\text{Ca}^{2+}$  с тропонином С → образование актомиозина → активация АТФазы миозина → сокращение волокна → поглощение  $\text{Ca}^{2+}$  внутриклеточными депо и его удаление из клетки посредством  $\text{Na}/\text{Ca}$ -обмена → понижение концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  до уровня покоя (около 100 нМ) за счет работы  $\text{Ca}$ -АТФазы сарколеммы → расслабление.*

В гладких мышцах сосудов эта последовательность несколько модифицируется: в результате увеличения внутриклеточной концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  образуется комплекс  $\text{Ca}$  — кальмодулин, который активирует киназу легких цепей миозина. Фосфорилирование легких цепей миозина вызывает активацию АТФазы актомиозина и увеличение напряжения гладкой мышцы. В период между сокращениями  $\text{Ca}^{2+}$  перераспределяется внутри саркоплазматического ретикулума — из продольных трубочек в терминальные цистерны.

В сердечной мышце важную роль в электромеханическом сопряжении играет вход  $\text{Ca}^{2+}$  из внеклеточной среды. Кальций, входящий в клетку сердца через потенциалзависимый кальциевый канал или посредством  $\text{Na}/\text{Ca}$ -обмена, перераспределяет-

ся между саркоплазматическим ретикулумом, митохондриями, тропонином С и кальмодулином.

В дополнение к перечисленным Са-связывающим органеллам и белкам в кардиомиоците, по всей видимости, существует еще один фонд ионов кальция неизвестной природы. Он выявляется после возобновления электрической стимуляции покоящегося сердца, в присутствии сердечных гликозидов и при понижении внеклеточной концентрации  $\text{Na}^+$  (очевидно, за счет активации натрий-кальциевого обмена). Этот пул очень медленно обменивается (М, С. Fintel, G. A. Langer, 1986). При соответствующих условиях в нем может сосредоточиваться до 1 мкмоль ( $\text{Ca}^{2+}$ /г сырой массы ткани (для максимального сокращения сердца необходимо не более 60 нмоль  $\text{Ca}^{2+}$ /г). Кальций, сосредоточенный в этом внутриклеточном резервуаре, однако, не влияет на напряжение мышцы, находящейся в состоянии расслабления.

Физиологическая роль этого кальциевого резервуара, равно как и его внутриклеточное расположение, не установлены. Предполагают, что он обеспечивает демпфирование периодически входящего в клетку  $\text{Ca}^{2+}$  и облегчает тем самым деятельность основных систем удаления  $\text{Ca}^{2+}$  из миоплазмы (кальциевых насосов саркоплазматического ретикулума и сарколеммы и системы  $\text{Na}/\text{Ca}$ -обмена). Разобщитель окислительного фосфорилирования блокирует увеличение уровня  $\text{Ca}^{2+}$  в медленно обмениваемом резервуаре. Тем не менее митохондрии не являются местом запасаения этого кальция, поскольку при понижении внеклеточного натрия ионы кальция накапливаются исключительно в области сарколеммы и диад (Е. S. Wheeler-Clark, J. M. Torguey, 1985). Таким образом, поступление  $\text{Ca}^{2+}$  в данный резервуар кардиомиоцита осуществляется энергозависимым способом, возможно, за счет работы системы кальциевого насоса, подобного насосу ретикулума.

## 6.2. Количественная оценка Са-транспортирующих системы сердца и скелетных мышц

Для выяснения механизма электромеханического сопряжения мышечной клетки, равно как и путей перераспределения  $\text{Ca}^{2+}$  в любой возбудимой и невозбудимой клетке, необходимо не только установить наличие в них тех или иных кальций-транспортирующих систем, но и оценить их относительную мощность. Эта простая, на первый взгляд, задача осложняется тем, что она сопряжена с разрушением клетки и дальнейшими процедурами фракционирования, неизбежно приводящими к деструкции мембранных систем. Во избежание этого в экспериментах по оценке общей активности отдельных систем тран-

спорта  $\text{Ca}^{2+}$  используют максимально щадящие способы разрушения ткани.

На основании результатов, полученных на интактном сердце, максимальное напряжение миокарда достигается при концентрации свободного кальция в миоците около 30 мкмоль/л (R. J. Solaro et al., 1974; табл. 2). При этом с сократительными белками связывается 70 нмоль  $\text{Ca}^{2+}$ /г сырой массы. Однако сердце в нормальных условиях не функционирует в режиме, обеспе-

Таблица 2. Зависимость между уровнем внутриклеточного кальция и степенью активации миофибрилл миокарда (по R. J. Solaro et. al., 1974)

Относительная активация напряжения, отн. ед.	Концентрация свободного $\text{Ca}^{2+}$ , мкМ	Уровень $\text{Ca}^{2+}$ , связанного с миофибриллами, нмоль/г	Общий уровень $\text{Ca}^{2+}$ , нмоль/г
0,0	0,17	7,6	7,7
0,5	2,00	20,9	22,4
0,9	5,00	31,4	35,1
0,95	9,00	41,8	48,6
1,0	30,00	70,3	92,8

чивающем его максимальное напряжение. Кроме того, показано, что концентрация свободного  $\text{Ca}^{2+}$  в кардиомиоците не превышает 5—10 мкмоль/л (см. гл. 3). При напряжении миокарда около 90% от максимального, когда концентрация свободного  $\text{Ca}^{2+}$  ниже 5 мкмоль/л, общее количество свободного и связанного  $\text{Ca}^{2+}$  уменьшается до 35 нмоль/г. Время расслабления сердца теплокровных, как правило, составляет 0,1—0,2 с. Итак, система расслабления, сосредоточенная в 1 г миокарда, должна удалять  $\text{Ca}^{2+}$  со скоростью 175—350 нмоль/с. Удовлетворяет ли саркоплазматический ретикулум сердца этим требованиям?

В результате многократных «мягких» экстракций микросомальных мембран из сердца удалось полностью извлечь везикулы, аккумулирующие  $\text{Ca}^{2+}$  в присутствии и в отсутствие кальцийпреципитирующего аниона (D. O. Levitsky et al., 1981). Каждая из изолированных 15 фракций содержала фосфобелок Са-АТФазы, что было выявлено по включению радиоактивной метки из концевой фосфата молекулы АТФ (рис. 26). Количество поглощенного за 1 с кальция для общей фракции микросомальных мембран составляло около 75 нмоль/г, т. е. было ниже того, которое удаляется из миоплазмы при расслаблении. Однако детальный анализ временной кривой поглощения  $\text{Ca}^{2+}$ , осуществленный с помощью метода быстрого смешивания реагентов и быстрой остановки реакции, показал, что аккумуляция  $\text{Ca}^{2+}$  представляет собой нелинейный процесс и

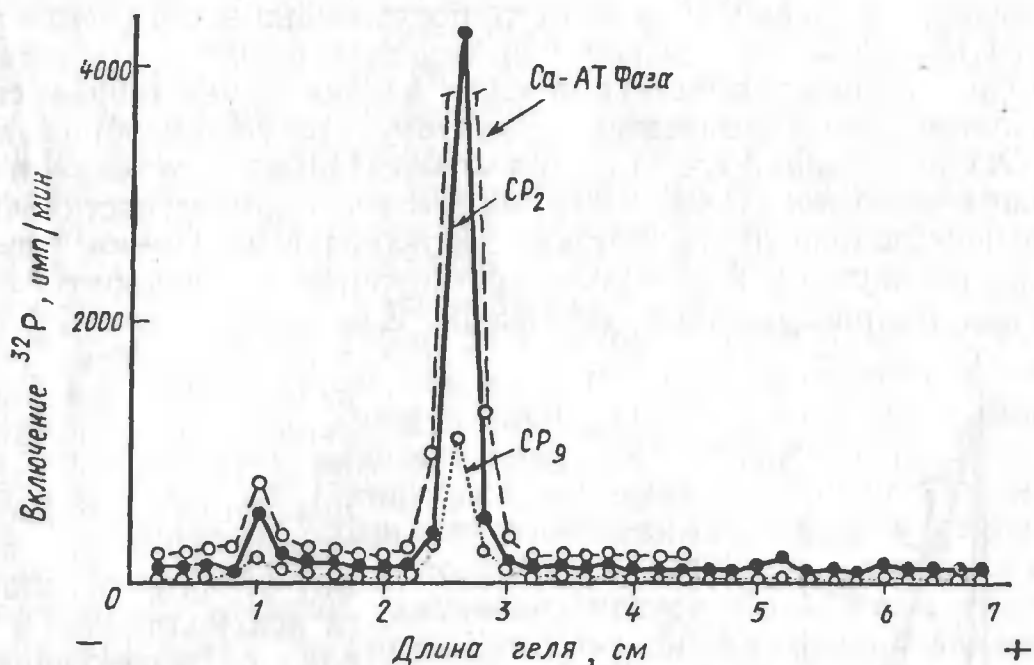


Рис. 26. Идентификация фосфорилированного интермедиата Ca-ATФ-азной реакции после электрофоретического разделения в полиакриламидных гелях очищенной Ca-ATФазы и препаратов мембран (CP<sub>2</sub>, CP<sub>9</sub>), полученных на второй и девятой стадиях полной экстракции саркоплазматического ретикулула из сердца

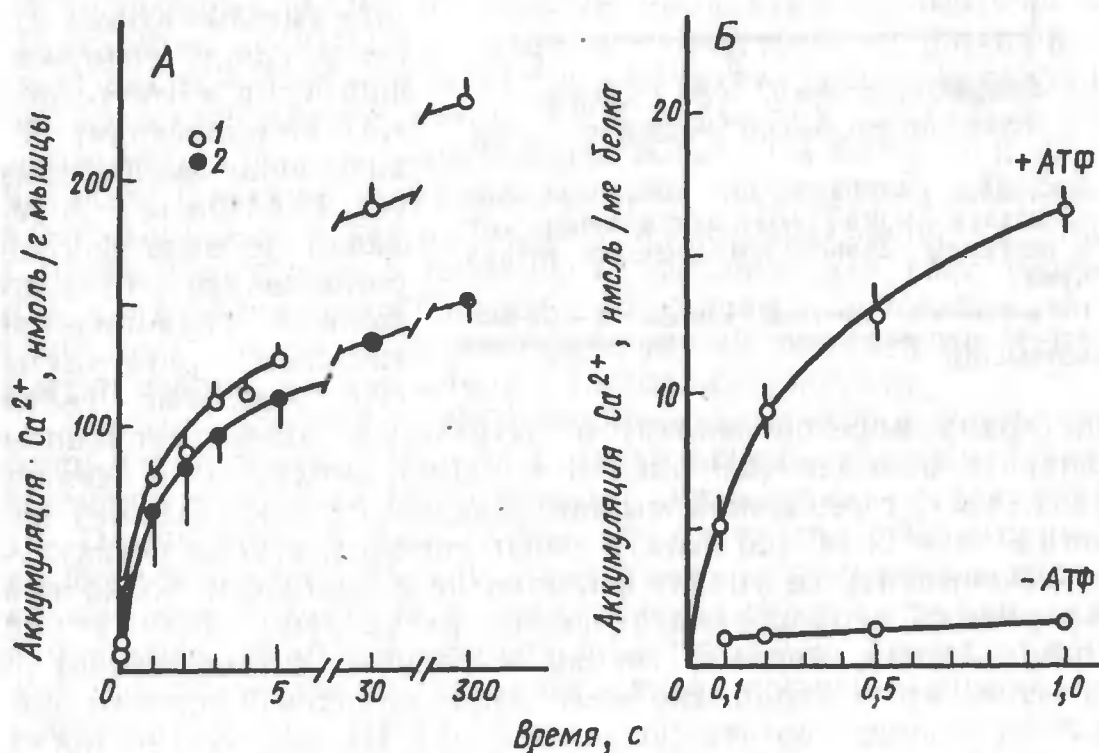


Рис. 27. Поглощение  $\text{Ca}^{2+}$  суммарной фракцией мембран саркоплазматического ретикулула из сердец голубя (1) и морской свинки (2) (А) и кинетика поглощения  $\text{Ca}^{2+}$  препаратом микросом сердца морской свинки в начальный промежуток времени (Б)



реальная начальная скорость поглощения в несколько раз выше (рис. 27). Исходя из этого был сделан вывод, что ретикулярная система аккумуляции  $\text{Ca}^{2+}$  вполне удовлетворяет требованиям, предъявляемым к фактору расслабления сердца.

Общее количество саркоплазматического ретикулула в мышечной ткани может быть определено при сопоставлении уровней Са-зависимого фосфорилирования в очищенном препарате ретикулула и в грубом ретикулярном препарате, полностью экстрагированном из мышцы. Как видно из рис. 26, при

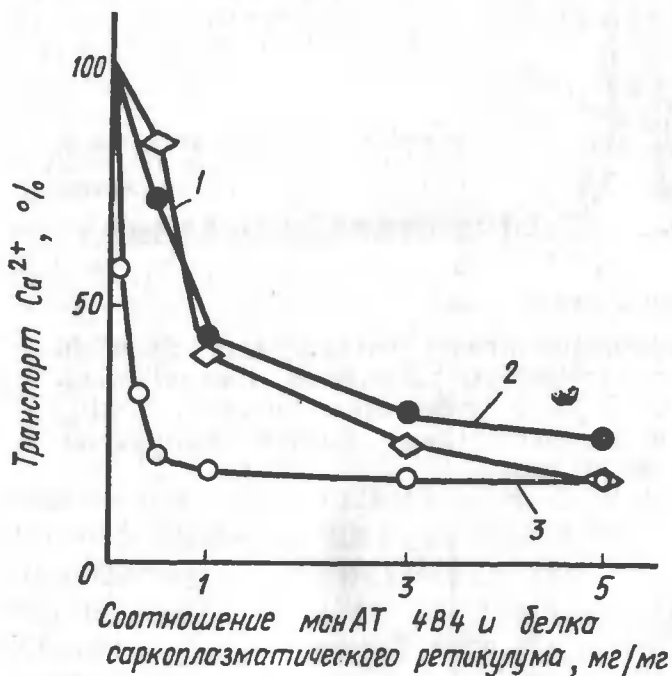


Рис. 28. Ингибирование моноклональным антителом (моАТ 4В4) аккумуляции  $\text{Ca}^{2+}$  в везикулы саркоплазматического ретикулула:

1 — микромысы скелетной мышцы, 2 — Са-оксалазный препарат сердца, 3 — микромысы сердечной мышцы

соответствующих условиях ( $0^{\circ}\text{C}$ , микромолярная концентрация АТФ, 15—20-секундная инкубация) радиоактивный концевой фосфат от АТФ включается исключительно в белок с молекулярной массой около 100 кД. В этом случае не наблюдается фосфорилирования за счет различных протеинкиназных систем. Кроме того, в среде, содержащей  $\text{K}^{+}$ , и в отсутствие  $\text{Na}^{+}$  не происходит образование фосфобелка Na, К-АТФазы. Определив уровень фосфорилирования в очищенном саркоплазматическом ретикулуле (2,8 нмоль/мг белка

для сердца морской свинки) и полностью экстрагированном препарате мембран (5,9 нмоль/г мышцы), можно было сделать вывод, что 1 г сердечной мышцы морской свинки содержит немногим более 2 мг (по белку) саркоплазматического ретикулула. Основываясь на уровне фосфобелка в препарате полностью извлеченного саркоплазматического ретикулула (5,9 и 7,8 нмоль/г сердец морской свинки и голубя соответственно) и учитывая, что фосфорилируется лишь половина молекул Са-АТФазы в пике, соответствующем белку 100 кД, можно также оценить и количество молекул Са-АТФазы в мышечной ткани. Оно составляет 1,3 и 1,7 мг в пересчете на 1 г сердечной мышцы морской свинки и голубя.

Количество Са-АТФазы в препаратах мембран из различ-

ных мышц может быть определено и с помощью моноклональных антител (монАТ), специфически ингибирующих ее активность. Как видно из рис. 28, 50%-ное ингибирование АТФазы в препарате саркоплазматического ретикулума из скелетной мышцы кролика достигается при существенно большем соотношении монАТ/белок саркоплазматического ретикулума, чем в стандартном препарате ретикулума из сердца собаки.

С учетом того, что сродство Са-АТФаз из различных источников к данному антителу одинаково, можно сделать вывод, что в препарате мембран из сердца концентрация АТФазы примерно в 5 раз ниже, чем в препарате из скелетной мышцы. Согласно этому критерию концентрации Са-АТФазы в микросомах из скелетной мышцы и в высокоочищенном препарате саркоплазматического ретикулума из сердца (получен высаждением мембранных пузырьков, утяжеленных оксалатом кальция) примерно одинаковы (рис. 28). С помощью такого своеобразного титрования активного центра Са-АТФазы высокоспецифическими ингибиторами, подобными моноклональному антителу, представляется возможным оценивать уровень фермента в гомогенатах не только мышц, но и других органов и тканей.

Активность кальциевого насоса саркоплазматического ретикулума достаточно высока для обеспечения расслабления сердца (в быстрых скелетных мышцах насос саркоплазматического ретикулума, по-видимому, является единственным расслабляющим фактором). Какой вклад в электромеханическое сопряжение миокарда вносят система Na/Ca-обмена и Са-АТФаза сарколеммы? Сродство сарколеммальной Са-АТФазы к ионам кальция чрезвычайно высоко, однако концентрация молекул этого фермента в кардиомиоците и, следовательно, их общая Са-транспортирующая активность невелика. По всей видимости, Са-АТФаза сарколеммы «подбирает» небольшое число свободных ионов кальция, которые остаются в цитоплазме клетки сердца, находящегося в состоянии диастолы.

Участие системы Na/Ca-обмена в электромеханическом сопряжении сердца недавно проанализировали по результатам экспериментов с изолированными пузырьками сарколеммы (K. D. Philipson, R. Ward, 1986). В частности, были приняты во внимание такие факторы, как величина потенциала на сарколеммальной мембране, концентрация внутриклеточного  $\text{Ca}^{2+}$  в систоле и диастоле сердца и конкуренция между  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{Mg}^{2+}$  за общие места связывания на обменнике с учетом стехиометрии  $1 \text{ Ca}^{2+}/3\text{Na}^{+}$ .

В результате анализируемых факторов был сделан ряд выводов. 1. В состоянии покоя клетки (диастола), когда потенциал на мембране отрицателен ( $-80 \text{ мВ}$ ), и в возбужденном состоянии, когда трансмембранный потенциал положителен, но

многократно увеличивается концентрация внутриклеточного  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Na/Ca}$ -обмен способен осуществлять лишь выброс  $\text{Ca}^{2+}$  из клетки. 2. Суммарный поток  $\text{Ca}^{2+}$ , опосредованный  $\text{Na/Ca}$ -обменником, при физиологической концентрации  $\text{Mg}^{2+}$  составляет менее 1 нмоль/г мышцы в 1 с, т. е. сопоставим по скорости с выбросом  $\text{Ca}^{2+}$ , который осуществляется  $\text{Ca-ATФазой}$  сарколеммы. Как видно из табл. 3, суммарная активность саркоплазматического ретикулула существенно превосходит активность трех других  $\text{Ca}$ -транспортирующих систем миокарда, поэтому именно саркоплазматический ретикулум в сердце, как и в быстрых скелетных мышцах, представляет собой *основной фактор расслабления*.

Таблица 3. Активность основных  $\text{Ca}$ -транспортирующих систем сердца, участвующих в процессе расслабления

Ca-Насос	Концентрация, мг белка/г, сердечной мышцы	Активность, нмоль $\text{Ca}^{2+}$ /с	
		на 1 г белка	на 1 г сердечной мышцы
Митохондрии	50	0,016	0,8
Саркоплазматический ретикулум	2	30	75
$\text{Na/Ca}$ -обменник	1—2,5	0,7	0,7—1,85
$\text{Ca}$ -Насос сарколеммы	1—2,5	1	1—2,5

Расчеты, представленные в табл. 3, основаны на данных о концентрации белка митохондрий, саркоплазматического ретикулула и сарколеммы в кардиомиоците и об активности систем кальциевых насосов, измеренной в условиях, максимально приближенных к физиологическим.

### 6.3. Механизмы выброса $\text{Ca}^{2+}$ из внутриклеточных резервуаров

Одна из принципиальных нерешенных проблем электромеханического сопряжения связана с выяснением механизма высвобождения  $\text{Ca}^{2+}$  из саркоплазматического ретикулула под действием электрического стимула, возникающего на поверхностной клеточной мембране. Не известны не только промежуточные реакции, обеспечивающие передачу этого стимула, но и структура канала, ответственного за выброс  $\text{Ca}^{2+}$  из саркоплазматического ретикулула.

В опытах *in vitro* выход  $\text{Ca}^{2+}$  из ретикулула можно индуцировать несколькими способами. Самый простой и, на первый взгляд, вполне «физиологичный» — достичь обращения  $\text{Ca-ATФ-}$

азной реакции (см. рис. 18). При внесении в среду АДФ, ЭГТА, неорганического фосфата и ионов магния действительно удается высвободить весь  $\text{Ca}^{2+}$ , аккумулированный везикулами саркоплазматического ретикулула. Этот процесс протекает со скоростью, соизмеримой с интенсивностью АТФ-зависимого поглощения этого катиона. При этом циклы высвобождения и поглощения  $\text{Ca}^{2+}$  удается воспроизводить многократно (рис. 29).

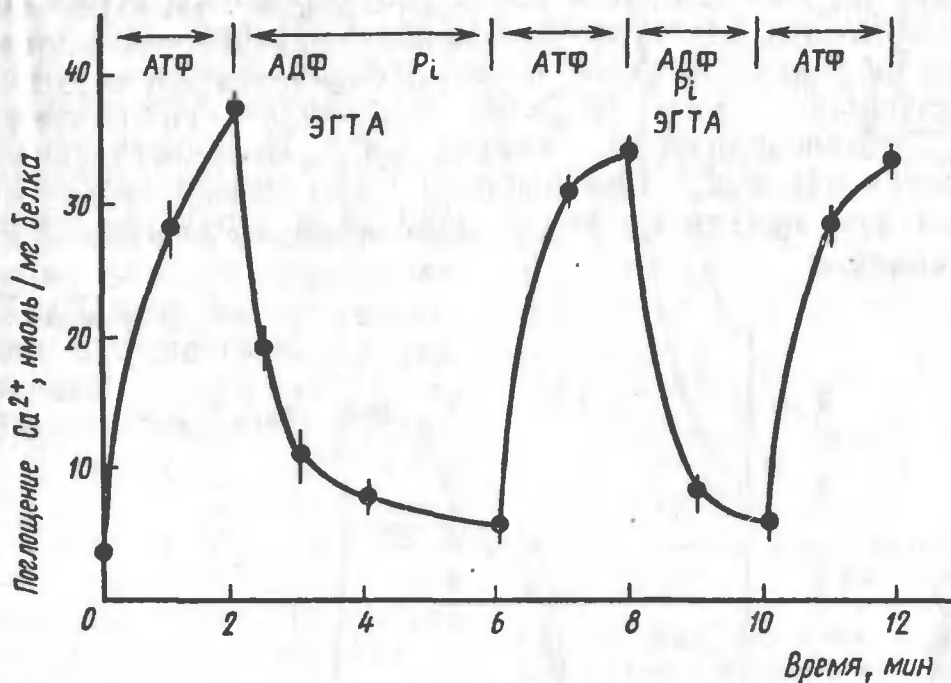


Рис. 29. Поглощение и выброс  $\text{Ca}^{2+}$  из пузырьков саркоплазматического ретикулула скелетной мышцы при инициации прямой и обратной АТФазных реакций

Следует, однако, учитывать, что скорость высвобождения  $\text{Ca}^{2+}$  из саркоплазматического ретикулула достигает 1—3 ммоль/мг ретикулярного белка и примерно в 100 раз превосходит АТФ-гидролитическую активность очищенной Са-АТФазы. Согласно оценкам проницаемость мембраны ретикулула для  $\text{Ca}^{2+}$  после возбуждения мышцы возрастает более чем в 100 раз. Маловероятно поэтому, что выброс  $\text{Ca}^{2+}$  опосредуется работой белка-переносчика, в том числе при обращении Са-АТФазной реакции. Несомненно, что данный процесс обеспечивается открытием в мембране селективных кальциевых каналов.

Выброс  $\text{Ca}^{2+}$  из саркоплазматического ретикулула можно вызывать повышением рН среды (рис. 30). защелачивание среды вызывает ионизацию отдельных аминокислотных остатков, участвующих в регуляции функции кальциевого канала или своеобразную «деполяризацию» канала. Однако с точки зрения физиологической значимости этого явления трудно пред-

ставить, что в цитоплазме мышц, имеющей мощную буферную систему для водородных ионов, периодически происходят ощутимые сдвиги pH.

Найдены вещества, способные индуцировать выброс  $\text{Ca}^{2+}$  из саркоплазматического ретикулума, например кофеин и ионы серебра (рис. 31). В последнем случае выброс  $\text{Ca}^{2+}$  связан с блокированием одной или нескольких сульфгидрильных групп в составе Са-АТФазы или иного интегрального белка саркоплазматического ретикулума. Выброс  $\text{Ca}^{2+}$  при этом потенцируется не только АТФ, но и его негидролизующим аналогом. Следовательно, само по себе связывание АТФ активирует канал, обеспечивающий выброс  $\text{Ca}^{2+}$ . Используя подобные соединения как индукторы выброса  $\text{Ca}^{2+}$ , можно приблизиться к выяснению механизма этого процесса и структуры кальциевого канала.

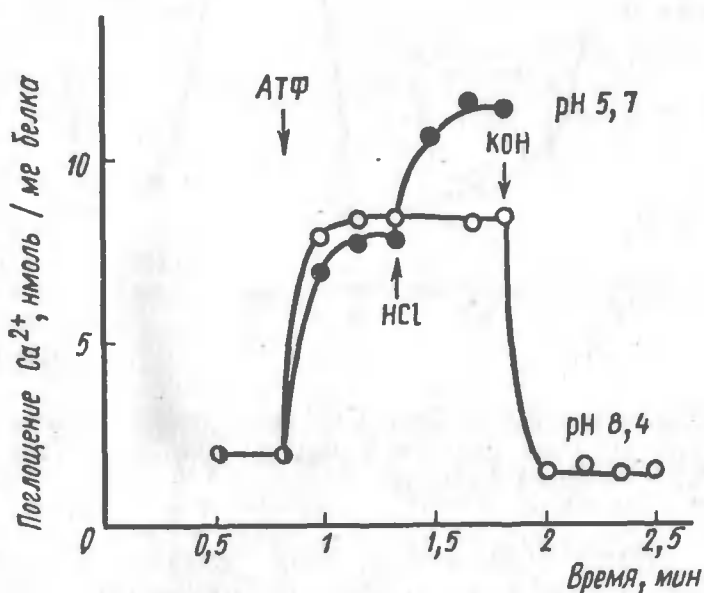


Рис. 30. Колебания уровня  $\text{Ca}^{2+}$  в пузырьках саркоплазматического ретикулума из сердечной мышцы в зависимости от pH среды

Наиболее подробно обсуждают два механизма высвобождения  $\text{Ca}^{2+}$  из саркоплазматического ретикулума: вследствие изменения потенциала на ретикулярной мембране и увеличения концентрации самого  $\text{Ca}^{2+}$  в цитоплазме.

Гипотеза об изменении электрического потенциала на мембране саркоплазматического ретикулума в ответ на деполяризацию поверхностной мембраны и ее внутриклеточных ответвлений (Т-трубочек) непротиворечиво объясняет быстрое увеличение концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  в цитоплазме активированной мышечной клетки (А. F. Huxley, F. E. Taylor, 1958; М. Endo, 1979). Терминальные цистерны ретикулума пространственно

приближены к поверхностной мембране и можно предположить, что локальное изменение заряда в области между этими структурами вызовет деполяризацию внутриклеточной мембранной системы. В принципе, концентрационный градиент  $\text{Ca}^{2+}$  по обе стороны мембраны саркоплазматического ретикулума в состоянии покоя мышцы ( $10^{-7}$  моль/л в цитоплазме и около  $10^{-3}$  моль/л во внутриретикулярном объеме) может обеспечить электрический потенциал более 100 мВ (см. уравнение Нернста).

Данную гипотезу в течение многих лет физиологи рассматривают как наиболее вероятную, если не единственную, несмотря на отсутствие данных о существовании электрического потенциала на мембране саркоплазматического ретикулума в состоянии покоя мышцы. Для проверки этой гипотезы были выполнены эксперименты по замене ионных сред в цитоплазме мышечных клеток, лишенных сарколеммы, или в суспензии ретикулярных пузырьков (L. Ford, R. J. Podolsky, 1970; M. Kasai, H. Miyamoto, 1976).

Принцип данного подхода основан на различной проницаемости мембраны саркоплазматического ретикулума для ряда анионов и катионов. При замене в среде слабопроникающего аниона (например, метансульфоната или глюконата) на анион, хорошо проникающий через мембрану ретикулума (например, хлора), при неизменной концентрации катионов во внутреннем пространстве саркоплазматического ретикулума  $\text{Cl}^-$  должен быстро аккумулироваться, что приведет к появлению избытка отрицательного заряда. Такие условия в самом деле вызывают быстрое высвобождение  $\text{Ca}^{2+}$  во внешнюю среду (Y. Makajima, M. Endo, 1973). Более того, опыты с потенциалчувствительными флуоресцентными зондами свидетельствовали о том, что в результате подобных манипуляций с ионным составом, а также при поглощении  $\text{Ca}^{2+}$  пузырьками или при его выходе в среду, индуцированном любыми другими способами, соответственно меняется и электрический заряд на внутренней поверхности ретикулярной мембраны (Martonosi et al., 1979).

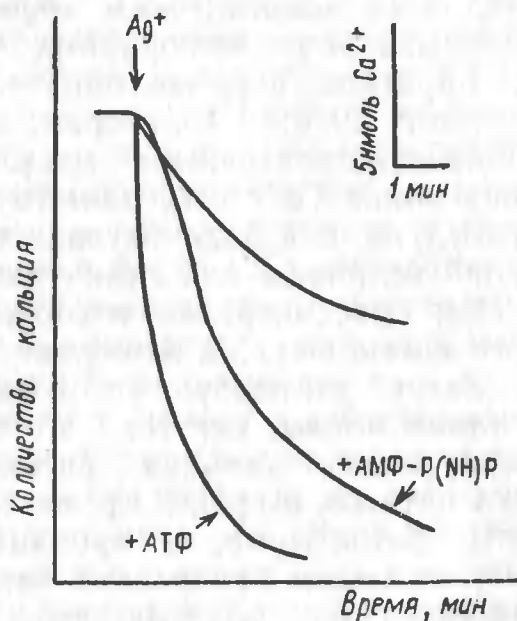


Рис. 31. Выброс  $\text{Ca}^{2+}$  из пузырьков саркоплазматического ретикулума под действием хлористого серебра

Выброс кальция возрастает под действием АТФ и его негидролизуемого аналога



Однако эти убедительные аргументы в пользу потенциалзависимого выхода  $\text{Ca}^{2+}$  из саркоплазматического ретикулума начали рассыпаться, как карточный домик, после соответствующих контрольных экспериментов. Во-первых, было обнаружено, что выход  $\text{Ca}^{2+}$  из саркоплазматического ретикулума при замене слабопроникающего аниона на хорошо проникающий обусловлен *осмотическим эффектом* (как бы одномоментным «схлопыванием» мембранных пузырьков), что наблюдается и при обратном порядке ионного замещения (G. Meissner, D. McKinley, 1976). Во-вторых, изменения флуоресценции «потенциалчувствительных» зондов происходят также при связывании ионов  $\text{Ca}^{2+}$  с соответствующими участками на мембране ретикулума и в ряде случаев никак не зависели от предполагаемой величины или знака трансмембранного потенциала.

При рассмотрении возможности существования электрического потенциала на мембране саркоплазматического ретикулума следует учитывать, что вещества, «шунтирующие» мембрану по таким ионам, как  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  и  $\text{H}^+$ , практически не влияют на аккумуляцию кальция ретикулумом и не вызывают выброс этого катиона в среду. Кроме того, мембрана саркоплазматического ретикулума, не проницаемая в обычных условиях для  $\text{Ca}^{2+}$ , свободно пропускает одновалентные катионы и анионы. Маловероятно поэтому, что потенциал, возникающий при энергозависимом поглощении  $\text{Ca}^{2+}$ , не компенсируется немедленно симпортом аниона или антипортом одновалентного катиона. Таким образом, до настоящего времени не получено однозначных доказательств не только потенциалзависимого выброса  $\text{Ca}^{2+}$  из саркоплазматического ретикулума, но и существования на мембране ретикулума стойкого электрического потенциала.

В настоящее время все большее внимание уделяется *Са-индуцированному высвобождению  $\text{Ca}^{2+}$  из саркоплазматического ретикулума*.

Если поместить изолированное сердце в бескальциевую среду, то уже через несколько секунд наблюдается прекращение его спонтанных сокращений. Из этого следует, что ионы кальция, поступающие в кардиомиоцит через медленные кальциевые каналы или посредством  $\text{Na/Ca}$ -обмена через сарколеммальную мембрану, участвуют в процессе электромеханического сопряжения.

Логично предположить, что входящий в клетку  $\text{Ca}^{2+}$  непосредственно связывается с тропонином С и тем самым активирует сократительный аппарат сердца. В принципе скорость распространения «кальциевой волны» в цитоплазме даже крупной клетки за счет простой диффузии достаточно высока (см. рис. 10). Однако количество  $\text{Ca}^{2+}$ , поступающего извне, составляет лишь несколько процентов от уровня, необходимого

для развития сокращения. В связи с этим была предложена гипотеза регенеративного высвобождения  $\text{Ca}^{2+}$  из саркоплазматического ретикулума, постулирующая, что локальное повышение концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  около терминальных цистерн (за счет  $\text{Ca}^{2+}$ , поступающего из межклеточного пространства) приводит к открытию селективного канала и быстрому выбросу этого катиона в миоплазму.

Кальцийиндуцируемый выброс  $\text{Ca}^{2+}$  может быть продемонстрирован как на лишенных сарколеммы волокнах сердца и скелетных мышц, так и на изолированных везикулах саркоплазматического ретикулума. Количество выходящего из ретикулума кальция определяется концентрацией этого катиона во внутреннем пространстве ретикулума, а также исходной и конечной концентрацией  $\text{Ca}^{2+}$  во внешней среде. Существенно, что при достижении концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  в среде выше определенного порогового уровня (от 3 до 5 мкмоль/л) выброс  $\text{Ca}^{2+}$  из саркоплазматического ретикулума уменьшается.

Наиболее серьезные аргументы в пользу физиологической значимости Са-индуцированного выброса  $\text{Ca}^{2+}$  из саркоплазматического ретикулума получены А. Фабиато на одиночных клетках сердца, лишенных сарколеммы (А. Fabiato, 1985). Этим ученым выполнены поистине ювелирные эксперименты с использованием нескольких микроманипуляторов и микропипеток, предназначенных для введения в клетку различных веществ и регистрации сократительной активности. Соответствующие сигналы, поступающие в результате изменений формы клетки и концентрации  $\text{Ca}^{2+}$ , регистрируемой по свечению экворина, обрабатывали с помощью компьютера.

Опыты были проведены на клетках Пуркинье сердца собаки, в которых все миофибриллы окружены плотным слоем саркоплазматического ретикулума, состоящего из трубочек и так называемого *соединительного ретикулума*. Последний способен к выбросу  $\text{Ca}^{2+}$ , но не имеет контакта с сарколеммой. Под контролем микропроцессора с помощью микроинъекций было возможно изменять концентрацию  $\text{Ca}^{2+}$  у поверхности саркоплазматического ретикулума за время около 1 мс. Оказалось, что спонтанные сокращения кардиомиоцита и сопутствующие им поглощение и выброс  $\text{Ca}^{2+}$  могут изменяться при дополнительном внесении  $\text{Ca}^{2+}$  в участок, непосредственно примыкающий к области цистерн. При этом, когда флуоресцентный сигнал экворина увеличивается (что соответствует увеличению концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  в цитоплазме), внешний  $\text{Ca}^{2+}$  вызывает дополнительное выделение этого катиона из саркоплазматического ретикулума; при затухающем сигнале красителя такой эффект от добавки катиона не наблюдается.

Результаты этого эксперимента снимают определенное внутреннее противоречие в современной схеме электромеханическо-

го сопряжения сердечной мышцы и, в частности, в механизме Са-индуцированного выброса  $\text{Ca}^{2+}$ . Действительно, почему увеличение концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  в миоплазме приводит к активации как его поглощения саркоплазматическим ретикуломом, так и выброса? Можно предположить, что существует или конкуренция за  $\text{Ca}^{2+}$  между насосом и каналом выброса катиона, или канал выброса инактивируется во времени.

Согласно А. Фабиато, увеличение концентрации свободного кальция у внешней поверхности саркоплазматического ретикулума вызывает выброс  $\text{Ca}^{2+}$ , когда скорость изменения концентрации катиона велика, но приводит к поглощению  $\text{Ca}^{2+}$  при медленном сдвиге его концентрации. Кроме того, канал выброса инактивируется не только во времени, но и при увеличении концентрации  $\text{Ca}^{2+}$ . Поэтому в рефрактерный период, после выброса очередной порции  $\text{Ca}^{2+}$ , ретикулум функционирует лишь как кальциевый насос. Таким образом, при поступлении  $\text{Ca}^{2+}$  в миоплазму через сарколеммальную мембрану лишь первый быстрый компонент кальциевого тока вызовет выброс  $\text{Ca}^{2+}$  из саркоплазматического ретикулума;  $\text{Ca}^{2+}$ , вошедший в клетку по «медленному» каналу, будет поглощен ретикуломом и вновь поступит в миоплазму при очередном возбуждении клетки.

Один из подходов к изучению процесса электромеханического сопряжения и функции канала выброса  $\text{Ca}^{2+}$  из терминальных цистерн связан с использованием веществ, воздействующих на силу сокращения мышц, в том числе кофеина, риа-нодина, рутениевого красного и инозиттрисфосфата. Среди этих веществ кофеин выделяется способностью вызывать контрактуру как покоящихся, так и возбужденных мышц, т. е. на фоне деполяризации клеточной мембраны. Исходя из данных, полученных в электрофизиологических экспериментах, увеличение силы мышечного сокращения под действием кофеина должно обуславливаться выбросом  $\text{Ca}^{2+}$  из саркоплазматического ретикулума. Однако вначале никак не удавалось заблокировать кофеином аккумуляцию  $\text{Ca}^{2+}$  изолированными фрагментами саркоплазматического ретикулума и обеспечить выброс его в среду. Это было достигнуто лишь после полной загрузки фрагментов саркоплазматического ретикулума.

Данный феномен получил в дальнейшем простое объяснение. Кофеин действительно взаимодействует с определенным белком (частью кальциевого канала) на поверхности мембраны саркоплазматического ретикулума. Однако рецептор для кофеина не располагается равномерно в сети ретикулума, а локализован в терминальных цистернах. Поэтому добавление кофеина к нефракционированному препарату микросом, к тому же не полностью насыщенному  $\text{Ca}^{2+}$ , вызывало выход катиона из фрагментов терминальных цистерн и не затрагивало  $\text{Ca}^{2+}$ ,

аккумулированный во фрагментах продольных трубочек. Вышедший в среду  $\text{Ca}^{2+}$  захватывался фракцией кофеиннечувствительных пузырьков. Такое свойство кофеина позволило произвести четкое препаративное разделение двух основных фракций ретикулярных мембран (М. К. Алиев и др., 1985).

Везикулы саркоплазматического ретикулума загружали  $\text{Ca}^{2+}$  в присутствии кофеина, а затем центрифугировали в градиенте плотности сахарозы. Утяжеленные кальцием, нечувствительные к кофеину мембранные пузырьки осаждались, а легкие, не загруженные кальцием, оставались в надосадочной жидкости. В первом препарате практически весь белок приходился на Са-АТФазу, во втором — практически в эквимольных количествах сосредоточивались кальцийтранспортирующий белок и кальсеквестрин. Таким образом, эти фракции соответствовали продольным трубочкам и терминальным цистернам.

Механизм действия кофеина тесно связан с процессом Са-индуцированного высвобождения  $\text{Ca}^{2+}$ . Во-первых, кофеин также оказывает действие на саркоплазматический ретикулум в области терминальных цистерн, во-вторых, эффект кофеина наиболее выражен при низких концентрациях  $\text{Ca}^{2+}$ . Концентрационная зависимость действия внешнего  $\text{Ca}^{2+}$  на выброс  $\text{Ca}^{2+}$  из ретикулума сдвигается в область более низких концентраций этого катиона в среде, содержащей кофеин. Таким образом, кофеин потенцирует действие внешнего  $\text{Ca}^{2+}$ .

До сих пор окончательно не решен вопрос, вызывает ли вторичный мессенджер — инозиттрисфосфат (см. разд. 1.3) выброс  $\text{Ca}^{2+}$  из ретикулума мышечных клеток. Показано, что выброс  $\text{Ca}^{2+}$  из пузырьков саркоплазматического ретикулума, изолированных из скелетной (P. Volpe et al., 1985), гладкой (E. Suematsu et al., 1984) и сердечной (M. Hirata et al., 1984) мышц, происходит при микромолярной концентрации инозиттрисфосфата. Для микросом из гладкой мышцы этот вывод представляется вполне обоснованным. В то же время в целом ряде исследований, проведенных на препаратах ретикулума из сердечной и скелетных мышц, действие инозиттрисфосфата не было продемонстрировано.

Объяснить эти явные противоречия можно предположением, что отрицательный результат обусловлен потерей в ходе выделительной процедуры специфического рецептора для инозиттрисфосфата.

Вывод о причастности того или иного агента к процессу электромеханического сопряжения, как бы то ни было, должен быть сделан в опытах на максимально интактной системе, например на целых клетках. При добавлении  $\text{MgATP}$  к кардиомиоцитам, обработанным сапонином для увеличения неспецифической проницаемости сарколеммы (M. A. Movsesian et al., 1985), происходит уменьшение концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  в среде до

0,18 мкмоль/л (рис. 32). Внесение 1,5 мкмоль/л инозиттрисфосфата действительно приводит к изменению сигнала квина-2, соответствующего увеличению в среде концентрации  $\text{Ca}^{2+}$ , хотя и очень незначительному (на 20 нмоль/л). Но даже этот эффект оказался артефактом ввиду того, что сигнал флуоресцентного красителя менялся таким же образом при внесении инозиттрисфосфата в среду без клеток. В то же время при истощении АТФ добавкой глюкозы и гексокиназы происходил быстрый выход  $\text{Ca}^{2+}$  из его внутриклеточного депо.

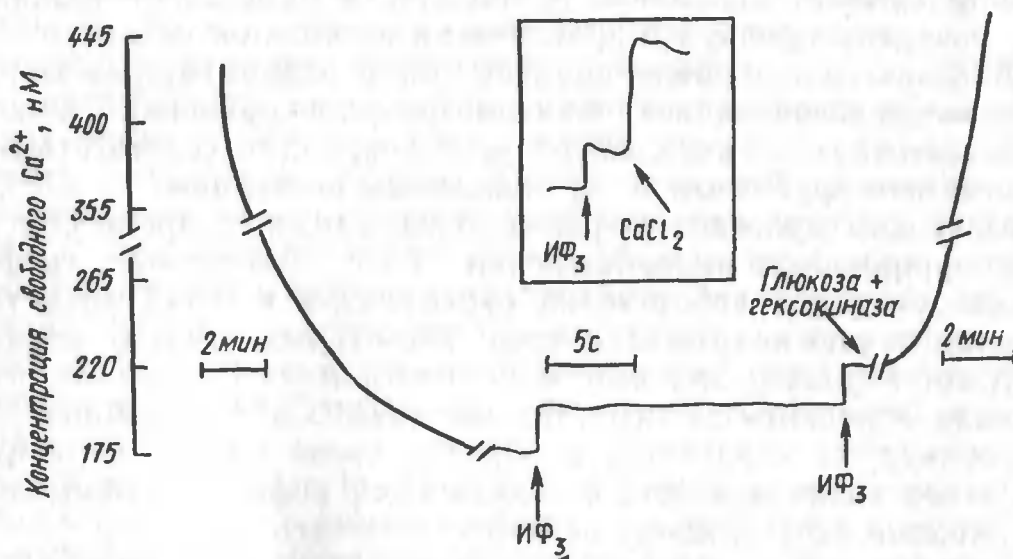


Рис. 32. Отсутствие действия инозиттрисфосфата (ИФ<sub>3</sub>) на высвобождение  $\text{Ca}^{2+}$  из кардиомиоцитов, обработанных сапонином (в рамке — контрольный опыт, проведенный в среде без миоцитов) (по М. А. Movsesian et al., 1985)

Вопрос о том, может ли инозиттрисфосфат вызывать выброс  $\text{Ca}^{2+}$  из саркоплазматического ретикулаума сердечной и скелетных мышц, имеет принципиальное значение для установления общих закономерностей и отличий систем, регулирующих мобилизацию внутриклеточного  $\text{Ca}^{2+}$  в различных клетках в ответ на разнообразные стимулы извне. Помимо клеток гладкой мускулатуры инозиттрисфосфат вызывает высвобождение  $\text{Ca}^{2+}$  из органелл, явно отличных от митохондрий (вероятнее всего, из *эндоплазматического ретикулаума*), в клетках поджелудочной железы, нейтрофилах, макрофагах, тромбоцитах, гепатоцитах, фибробластах и многих других клетках. Стимулирование каждой из этих клеток соответствующими агонистами сопровождается ускорением гидролиза фосфатидилинозит-4, 5-бисфосфата с образованием диацилглицерина и инозиттрисфосфата. В то же время в клетках сердца и скелетных мышц выброс  $\text{Ca}^{2+}$  инициируется исключительно электрическими процессами, протекающими на сарколемме, в частности, за счет актива-



ции быстрого Na-канала и (или) потенциалзависимого Са-канала.

В этой связи следует отметить, что активность протеинкиназы С в сердце и скелетных мышцах существенно ниже, чем в других исследованных органах и тканях, и составляет всего 5—10% от активности данного фермента в тромбоцитах (У. Takai et al., 1982). Можно предположить, что в саркоплазматическом ретикулуме скелетных и сердечных мышц отсутствует рецептор для инозиттрисфосфата и клетки этих постоянно сокращающихся мышц не используют механизм, связанный со значительным расходом кислых фосфолипидов.

Не дожидаясь выяснения природы основного фактора, обеспечивающего выброс  $\text{Ca}^{2+}$  из саркоплазматического ретикулума, исследователи делают попытки выделить канал кальциевого выброса. Один из подходов связан с изучением белков, связывающих агенты, которые модифицируют функцию кальциевого канала. В их числе алкалоид *рианодин*, специфически связывающийся с рецептором, который локализован в мембранах терминальных цистерн и влияет на механизм высвобождения  $\text{Ca}^{2+}$ , индуцированный  $\text{Ca}^{2+}$ .

Установлено, что рианодиновый рецептор представляет собой олигомер с молекулярной массой около  $10^6$  Д (I. N. Pessah et al., 1986). Он содержит рианодинсвязывающий центр и диссоциирует на белки с молекулярной массой более 200 кД и Са-АТФазу. Так как связывание рианодина и Са-индуцированный выброс  $\text{Ca}^{2+}$  в одинаковой мере зависят от таких факторов, как концентрация  $\text{Ca}^{2+}$  и ингибиторов (рутениевого красного и  $\text{Mg}^{2+}$ ), предполагают, что рианодин взаимодействует с каналом, открывающимся под воздействием самого кальция.

Предпринята также попытка выделить рецептор кофеина (А. М. Rubtsov, А. J. Murphy, 1988). После солюбилизации фрагментов саркоплазматического ретикулума, обогащенных терминальными цистернами, и элюции со специальной колонки белков супернатанта раствором с высокой концентрацией кофеина получен препарат, в котором доля белка с молекулярной массой 170 кД увеличивалась по сравнению с исходным материалом в 25—30 раз. Как было установлено ранее, этот компонент способен связывать кофеин и проявляет себя как кальцийсвязывающий белок, поэтому предполагают, что именно он является рецептором кофеина в канале выброса  $\text{Ca}^{2+}$  мембран саркоплазматического ретикулума скелетных мышц.

Другой подход к изучению молекулярной организации канала выброса  $\text{Ca}^{2+}$  заключается в идентификации компонентов мембран, фосфорилируемых под действием различных *протеинкиназ*. Известно, что ионные каналы, в том числе потенциалзависимые, а также Са-зависимые К-каналы, активируются или



ингибируются в результате фосфорилирования их субъединиц протеинкиназами. Можно предположить, что фосфорилирование белков представляет собой общий механизм регуляции активности канала. Таким белком-регулятором канала выброса  $\text{Ca}^{2+}$  из саркоплазматического ретикулума может быть белок с молекулярной массой 60 кД (B. S. Tuana, D. H. MacLennan, 1984). В присутствии кальмодулина фосфорилирование этого белка ускоряется, а выброс  $\text{Ca}^{2+}$ , индуцированный  $\text{Ca}^{2+}$  и регистрируемый по изменениям флуоресценции хлортетрациклина, тормозится. Затем происходит самопроизвольное дефосфорилирование белка (D. H. Kim, N. Ikemoto, 1985).

В процессе выброса  $\text{Ca}^{2+}$  из саркоплазматического ретикулума происходит также изменение конформации белка с молекулярной массой 32 кД. Важно, что содержание этого полипептида и фосфорилируемого белка во фракции терминальных цистерн практически одинаково (менее 1%), поэтому оба белка могут входить в состав одного и того же канала.

Каким образом осуществляется *регуляция канала кальциевого выброса*? Увеличение концентрации цитоплазматического  $\text{Ca}^{2+}$  в результате выхода катиона из саркоплазматического ретикулума активирует кальмодулинзависимую протеинкиназу, что приводит к фосфорилированию 60 кД-белка и переходу канала выброса в рефрактерное состояние (D. H. Kim, N. Ikemoto, 1985). При последующей аккумуляции  $\text{Ca}^{2+}$  ретикулумом и уменьшении концентрации свободного  $\text{Ca}^{2+}$  в цитоплазме регуляторный белок дефосфорилируется, так как в этих условиях активность фосфатазы превышает активность протеинкиназы. В результате каналы выброса вновь становятся способными реагировать на очередной сигнал.

Такой механизм регуляции функции канала представляется вполне логичным, однако следует иметь в виду, что реакции фосфорилирования и дефосфорилирования осуществляются довольно медленно (за времена до 10 с). Поэтому данный механизм не может быть вовлечен в быстрое открывание и закрывание каналов, а, скорее, участвует в долговременной их регуляции.

Канал выброса  $\text{Ca}^{2+}$  *стимулируется* кальцием и адениннуклеотидами и *ингибируется* магнием и рутениевым красным. Произведено встраивание солюбилизованных канальных белков в плоские фосфолипидные мембраны (Y. S. Smith et al., 1986), что позволило исследовать механизм функционирования канала. Для этого был использован препарат тяжелых мембран саркоплазматического ретикулума скелетных мышц, обогащенный терминальными цистернами, т. е. та часть сети ретикулума, которая специализирована для выброса  $\text{Ca}^{2+}$  в саркоплазму. Преимущество этого подхода перед другими состоит в том, что измерение электрического тока, протекающего через

модифицированный липидный бислой, позволяет зарегистрировать скачки тока, и следовательно, моменты открывания и закрывания одиночных каналов, а также оценить по величине тока количество каналов, находящихся в открытом состоянии.

Соединения, модифицирующие канал, который локализован в интактных пузырьках саркоплазматического ретикулума, оказались эффективными и в реконструированной системе. Кальций, добавленный в концентрации от 2 до 950 мкмоль/л с одной стороны мембраны, увеличивает вероятность открытия каналов, но не влияет на время их существования в открытом состоянии. АТФ также увеличивает вероятность нахождения канала в открытом состоянии, но при этом продлевает время его жизни. Наиболее вероятно, что АТФ оказывает активирующее действие, взаимодействуя с закрытым каналом в участке, отличном от Са-активируемого центра. Важно, что для полной активации каналов требуется присутствие обоих этих агентов. В результате совместного действия  $\text{Ca}^{2+}$  и АТФ канал может находиться в открытом состоянии длительное время. Предполагают, что каналу свойственны по крайней мере по шесть закрытых и открытых состояний, активируемых лигандами.

Таким образом, к настоящему времени раскрыты или близки к выяснению *ключевые моменты в механизме электрохимического сопряжения мышц*. Удаление  $\text{Ca}^{2+}$  из миоплазмы активированной мышцы обеспечивается АТФ-зависимой системой саркоплазматического ретикулума (быстрые скелетные мышцы), а также, дополнительно, Са-АТФазой и Na/Ca-переносчиком сарколеммы (медленные скелетные мышцы, гладкие мышцы, сердечная мышца). Выброс  $\text{Ca}^{2+}$  из саркоплазматического ретикулума в ответ на деполяризацию поверхностной мембраны обеспечивается открытием селективного кальциевого канала. Этот выброс запускается  $\text{Ca}^{2+}$ , входящим в миоцит через сарколеммальный медленный кальциевый канал или Na/Ca-обменник, и (или) за счет активации фосфоинозитидного обмена.

Эта стройная последовательность событий время от времени, однако, подвергается ревизии в литературе. В частности, некоторые исследователи утверждают, что в регуляции сокращения принимают существенно большее участие, чем предполагали ранее, *растворимые кальцийсвязывающие белки*, например парвальбумины, концентрация которых особенно высока в быстрых мышцах (см. гл. 3). Действительно,  $t_{1/2}$  процесса связывания  $\text{Ca}^{2+}$  парвальбумином из мышцы краба составляет примерно 14 мс (W. Wnuk et al., 1982). Таким образом, не исключено, что парвальбумин может увеличивать скорость расслабления, обеспечивая быстрое связывание  $\text{Ca}^{2+}$ . Связанный парвальбумином  $\text{Ca}^{2+}$  затем может быть полностью удален системой мембран саркоплазматического ретикулума.

В этой связи представляет интерес тот факт, что мышца продольного тела амфиокса осуществляет быстрые сокращения хотя в ней вообще отсутствует как *T*-система, так и саркоплазматический ретикулум (L. D. Peachey, 1961). Вполне вероятно, что в данном объекте электромеханическое сопряжение реализуется через парвальбумин. В мышцах большинства других животных, однако, основное внутриклеточное кальциевое депо локализовано в трубочках и цистернах саркоплазматического ретикулума. Парвальбумин, уровень которого коррелирует как со скоростью расслабления мышцы, так и с содержанием саркоплазматического ретикулума, выполняет, по-видимому, лишь вспомогательную функцию, обеспечивая временное связывание входящего в клетку  $\text{Ca}^{2+}$ .

---

# Кальциевая регуляция функциональной активности клеток

---

# 7

Еще 10—15 лет назад имело смысл составлять список клеток, основные функции которых регулируются изменениями концентрации цитоплазматического кальция. К настоящему времени этот перечень столь велик, что нужно ограничиться следующим заключением: для подавляющего большинства клеток характерны периодические изменения уровня свободного  $\text{Ca}^{2+}$  в цитоплазме от  $10^{-7}$  до  $10^{-6}$  М, причем они, как правило, сопровождают проявления или регулируют главные функции клетки. Подобный вывод делают всякий раз ученые, исследующие структурные и функциональные свойства изолированных клеток с помощью кальциевых ионофоров, комплексонов и индикаторов.

Универсальны, по всей видимости, и основные способы удаления  $\text{Ca}^{2+}$  из цитоплазмы, когда обеспечивается выход клетки из активированного состояния. Это *АТФ-зависимые кальциевые насосы*, локализованные в эндоплазматическом ретикулуме и плазматической мембране, и система *Na/Ca-обмена* через плазмалемму.

## 7.1. Коагуляция крови и тромбогенез

Регуляторная роль ионов кальция не ограничивается его воздействием на отдельные клетки; существует много примеров кальциевой регуляции сложных метаболических систем организма, в частности систем, обеспечивающих коагуляцию крови и образование тромбов. Эти процессы, вызывающие не только опасную для организма закупорку кровеносных сосудов (основная причина инфаркта миокарда), но и обеспечивающие заживление ран, протекают в первую очередь за счет активации тромбоцитов. Тромбоциты удивительным образом напоминают по структуре клетки мышц. В частности, в них содержится сократительный аппарат, мембраны, подобные саркоплазматическому ретикулуму и Т-трубочкам.

Сгусток крови образуется на внутренней поверхности измененного сосуда. В этом процессе участвуют различные факторы свертывания крови, в том числе витамин К-зависимые белки (витамин К обеспечивает синтез в печени  $\gamma$ -карбоксиглутаминовой кислоты, присутствующей в каждом из этих белков), в частности протромбин. В результате каскада протеолитической активации факторов свертывания на конечной стадии из протромбина образуется *тромбин*, который обеспечивает полимеризацию растворимого фибриногена в *нерастворимый фибрин*. Фибриновая сеть и захватывает элементы крови.

Образованию сгустка крови предшествуют *активация тромбоцитов* и их *агрегация*, а также прикрепление факторов свертывания к обнаженной поверхности сосуда — *адгезия*. При взаимодействии тромбоцитов с такими физиологическими агентами, как тромбин, адреналин, тромбоксан  $A_2$ , вазопрессин, АДФ, внутри клеток происходит быстрое увеличение концентрации свободного кальция, а также изменяется функциональное состояние тромбоцитов: меняется форма клеток, стимулируется секреция веществ из внутриклеточных гранул и агрегация.

Детальный механизм тромбообразования полностью еще не установлен. Показано, однако, что различные агонисты, т. е. вещества-активаторы тромбоцитов, взаимодействуют на мембране этих клеток со специфическими рецепторами. Например, тромбин — последняя протеиназа в каскадном процессе коагуляции крови, действует уже при чрезвычайно низких концентрациях — от 1 до 5 мкмоль/л. Он расщепляет на клеточной мембране единственный поверхностный гликопротеин. Хотя другие гликопротеины ингибируют активность тромбина, некоторые из них тем не менее необходимы для функции тромбоцитов, в частности для формирования фибриногенсвязывающих участков. В последние годы установлено, что активация тромбоцитов связана с фосфорилированием двух внутриклеточных белков по двум различным механизмам: легкой цепи миозина с молекулярной массой 20 кД (Са-кальмодулинзависимое фосфорилирование) и белка с молекулярной массой около 40 кД (Са-фосфатидилсеринзависимое фосфорилирование).

Таким образом, в обоих случаях активация должна обеспечиваться повышением уровня внутриклеточного  $Ca^{2+}$ . Есть все основания считать, что в активированных тромбоцитах происходит одновременная мобилизация нескольких вторичных мессенджеров —  $Ca^{2+}$  и продуктов расщепления фосфатидилинозитов: 1,2-диацилглицерина и инозиттрисфосфата. В регуляции функций тромбоцитов участвует еще один вторичный мессенджер — *цАМФ*. Этот циклический нуклеотид, напротив, ингибирует большинство функций тромбоцитов. Антитромбогенная активность простагландина  $PGI_2$  (*простациклина*), например,

связана именно с тем, что он стимулирует аденилатциклазу; цАМФ, образующийся в клетке под воздействием простагличина, препятствует повышению уровня других вторичных мес-сенджеров.

Как и при рассмотрении функции других клеток, естественно возникает вопрос об источнике  $\text{Ca}^{2+}$  в активированных тромбоцитах. Кроме того, так как концентрация свободного кальция внутри тромбоцитов составляет около 100 нмоль/л, что в 10 000 раз ниже уровня этого катиона в крови, то должны существовать системы его эффективного удаления из цитоплазмы. Ответ на первый вопрос был получен в результате простого опыта, в котором оказалось возможным осуществить активацию тромбоцитов тромбином в среде с ЭГТА. Следовательно, по крайней мере часть ионов кальция поступает из внутриклеточных резервуаров.

Существуют данные о том, что процесс поступления  $\text{Ca}^{2+}$  в цитоплазму может быть связан с протеканием свободнорадикальных реакций. В частности, установлено, что в обработанных аспирином тромбоцитах (аспирин блокирует реакции синтеза простагличидинов из арахидонової кислоты) активация и увеличение концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  под действием разных факторов значительно тормозятся при внесении в среду антиоксидантов (A. Alexandre et al., 1986).

Все попытки продемонстрировать существование системы Na/Ca-обмена или Ca-АТФазы в поверхностной мембране тромбоцитов пока не увенчались успехом, и не ясно, с помощью каких механизмов  $\text{Ca}^{2+}$ , периодически поступающий в эти клетки, выводится в кровоток. В то же время выделены и достаточно хорошо охарактеризованы мембраны из плотной тубулярной сети клеток, по свойствам близкие саркоплазматическому ретикулуму. В частности, эти мембранные везикулы, как и саркоплазматический ретикулум, поглощают  $\text{Ca}^{2+}$  в присутствии оксалата за счет энергий гидролиза АТФ и способны в определенных условиях к выбросу накопленного  $\text{Ca}^{2+}$ . В их состав входит белок, близкий по молекулярной массе Ca-АТФазе саркоплазматического ретикулума и способный фосфорилироваться под действием АТФ. Наконец, антитела к АТФазе саркоплазматического ретикулума перекрестно реагируют с данным белком тромбоцитов и ингибируют поглощение  $\text{Ca}^{2+}$  их микросомами.

Несмотря на некоторое сходство, система транспорта  $\text{Ca}^{2+}$  тромбоцитов по структуре, вероятно, не идентична Ca-транспортной системе саркоплазматического ретикулума. Во-первых, концентрация Ca-транспортирующего фермента в микросомах тромбоцитов невелика и, во-вторых, активность микросом из тромбоцитов в десятки раз уступает таковой в препаратах ретикулума. Как видно из рис. 33, процессы, обеспечивающие



мобилизацию  $\text{Ca}^{2+}$  в мышцах и тромбоцитах, совершенно различны.

Главной отличительной чертой системы внутриклеточной мобилизации  $\text{Ca}^{2+}$  в тромбоцитах является то, что сигнал от гормонов и медиаторов ускоряет в кровяных пластинках метаболизм фосфоинозитидов, локализованных на поверхностной мембране. Образующиеся под воздействием агониста диацилглицерин и инозиттрисфосфат запускают соответственно  $\text{Ca}$ -независимые и  $\text{Ca}$ -зависимые механизмы, которые синергично обеспечивают выделение из внутриклеточных гранул секретов,

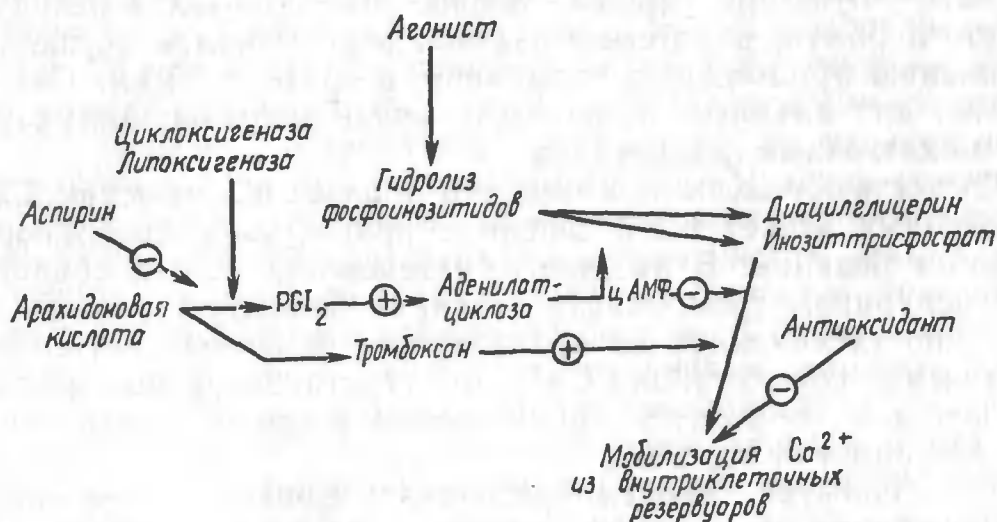


Рис. 33. Регуляция мобилизации кальция в тромбоцитах

вызывающих активацию тромбоцитов (рис. 33). Видимо, выброс  $\text{Ca}^{2+}$  из плотной тубулярной сети тромбоцита обусловлен открытием инозиттрисфосфатчувствительного кальциевого канала и регулируется  $\text{цАМФ}$ -зависимым фосфорилированием интегрального мембранного белка (23 кД) этой системы. Ввиду того, что фосфорилирование этого белка стимулируется инозиттрисфосфатом, предполагают, что данный белок является частью специфического рецептора (Y. Epouf et al., 1987).

Существуют данные, что некоторые агенты, увеличивающие концентрацию  $\text{Ca}^{2+}$  в тромбоцитах (например, кальциевый ионофор А23187 и диацилглицерин), активируют эти клетки гораздо эффективнее, если добавлены вместе, а не порознь. Это обусловлено тем, что диацилглицерин увеличивает чувствительность системы внутриклеточных секреторных гранул к ионам кальция. В определенных условиях активация тромбоцитов может быть обратимой. При этом снижается не только уровень свободного  $\text{Ca}^{2+}$  в цитоплазме (очевидно, за счет работы кальциевого насоса плотной тубулярной системы), но и концентрация диацилглицерина.

Механизм агрегации тромбоцитов еще далек от своего раскрытия, однако роль белковых факторов коагуляции крови исследована достаточно полно. Для того, чтобы произошел процесс коагуляции, необходимо взаимодействие этих факторов с фосфолипидными участками пораженного сосуда. Последнее, в свою очередь, обеспечивается ионами кальция. Как уже было указано, факторы свертывания крови содержат в своем составе  $\gamma$ -карбоксиглутаминовую кислоту, участвующую в связывании  $\text{Ca}^{2+}$ . При взаимодействии этих факторов с  $\text{Ca}^{2+}$  происходит изменение их конформации. Кроме того, ионы кальция служат как бы якорем, прикрепляющим белок к фосфолипиду. Поскольку наибольшим сродством к  $\text{Ca}^{2+}$  обладают кислые фосфолипиды, полагают, что это взаимодействие осуществляется за счет *фосфатидилсерина*.

Таким образом,  $\text{Ca}^{2+}$  играет ключевую роль в процессах коагуляции крови, действуя на внутри- и внеклеточном уровнях: при повышении его концентрации внутри тромбоцита и при связывании факторов свертывания крови с сосудом.

## 7.2. Экзоцитоз, секреция и движение клеток

Ионы кальция принимают непосредственное участие в функционировании секреторных клеток, синтезирующих специфический для данной железы секрет. Частично эта проблема рассмотрена применительно к тромбоцитам (см. разд. 7.1).

Концентрация свободного кальция в секреторной клетке может увеличиваться в результате открывания потенциалзависимых  $\text{Ca}$ -каналов в плазмалемме или высвобождения катиона из его внутриклеточных резервуаров, например из эндоплазматического ретикулума и митохондрий, под действием специфических нейромедиаторов. Так, выделение кислоты пристеночными клетками слизистой желудка стимулируется гастрином, карбамилхолином и гистамином. Это сопровождается увеличением концентрации свободного  $\text{Ca}^{2+}$  в клетках, что регистрируют по изменению флуоресценции квина-2. Чтобы определить источник  $\text{Ca}^{2+}$ , в среду вводят *олигомицин* (ингибитор митохондриальной АТФазы и, следовательно, энергозависимых процессов аккумуляции ионов митохондриями), а вместо агента, вызывающего секрецию, добавляют кальциевый ионофор. В этих условиях также происходит секреция кислоты. При этом первый ответ клеток на добавление гастрина или антибиотика А23187 не зависит от внешнего  $\text{Ca}^{2+}$ , а последующий — определяется уровнем  $\text{Ca}^{2+}$  снаружи клеток.

Таким образом, существуют два механизма секреции кислоты, требующие мобилизации внутриклеточного  $\text{Ca}^{2+}$  (очевидно,

из структуры, подобной эндоплазматическому ретикулуму) или внеклеточного  $\text{Ca}^{2+}$ . Подобные механизмы реализуются и в процессе высвобождения инсулина из  $\beta$ -клеток и амилазы (под действием ацетилхолина) из ацинарных клеток поджелудочной железы.

Высвобождение секрета из клеток может осуществляться в результате слияния мембраны внутриклеточных секреторных пузырьков с плазматической мембраной клетки. Такой процесс, называемый *экзоцитозом*, обеспечивает быстрое и одноразовое выделение секрета под действием стимула, например нейромедиаторов, гормонов, пищеварительных ферментов. В покоящейся клетке, где концентрация свободного  $\text{Ca}^{2+}$  составляет около 0,1 мкМ, секреторные пузырьки иммобилизованы в цитоплазме. При повышении концентрации внутриклеточного  $\text{Ca}^{2+}$  пузырьки движутся по направлению к плазмалемме, здесь происходит слипание поверхностей двух мембран, затем их слияние и образование поры, через которую секрет покидает клетку. После выделения секреторного продукта осуществляется отшнуровка части плазмалеммы (*эндоцитоз*) с регенерацией мембранных пузырьков (Р. Н. Глебов, 1987).

Молекулярный механизм экзоцитоза до конца не выяснен. Существует несколько гипотез, объясняющих роль  $\text{Ca}^{2+}$  в инициации движения секреторных пузырьков, их взаимного слияния и взаимодействия с поверхностной мембраной. Согласно одной из них, пузырьки иммобилизованы в цитоплазме покоящейся клетки благодаря существованию желеобразной структуры, состоящей из белков цитоскелета и kontrakтильных элементов, таких, как микротрубочки, филаменты актина и миозина. Образование таких гелей полностью ингибируется при концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  выше 1 мкМ. Поэтому предполагают, что увеличение концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  в клетке при ее активации и «разжижение» геля облегчают диффузию секреторных пузырьков.

Ионы кальция принято рассматривать как универсальный *триггер секреторного экзоцитоза*, однако существует и *Ca-независимая секреция*. Так, секреция из гранул тромбоцитов при их взаимодействии с коллагеном или под действием экзогенных форболовых эфиров и диацилглицерина может происходить и без изменения концентрации внутриклеточного  $\text{Ca}^{2+}$ . При этом секреция снижается с уменьшением уровня АТФ в клетке. Возможно, что секреторный ответ в этом случае обеспечивается за счет стимуляции протеинкиназы С и последующего фосфорилирования субстрата данного фермента (белка с молекулярной массой 40 кД), так как реакция фосфорилирования предшествует агрегации и секреции.

С помощью каких механизмов секреторные пузырьки сливаются друг с другом и сформированные при этом секреторные

макровакуоли взаимодействуют с плазмалеммой? Исследования, проведенные на хромаффинных клетках надпочечников (основных депо адреналина), показали, что их секреторные гранулы способны образовывать видимые под микроскопом крупные агрегаты, причем этот процесс целиком зависит от  $\text{Ca}^{2+}$  и от растворимого кальцийсвязывающего белка (молекулярная масса 47 кД), названного *синексином* (С. Е. Creutz et al., 1978). Хотя  $K_d$  комплекса синексин —  $\text{Ca}^{2+}$  довольно высока (200 мкМ), это не исключает его роли в обеспечении контакта между мембранами в живой клетке. Действительно, данный белок должен вызывать прикрепление везикулы к поверхностной мембране, т. е. в области, где локальная концентрация  $\text{Ca}^{2+}$ , возникающая после открытия Са-каналов, высока. Кроме того, пороговая концентрация  $\text{Ca}^{2+}$  для образования контакта, индуцированного синексином, не превышает 10 мкмоль/л.

Считают, что молекулы синексина связываются с мембранами двух секреторных пузырьков и обеспечивают тем самым их пространственное сближение. «Якорное» свойство синексина проявляется не только на биомембранах, но и на фосфолипидных пузырьках, состоящих из кислых фосфолипидов, в частности *фосфатидилсерина*. Предполагают, что последующее слияние мембран гранул обеспечивается *арахидоновой кислотой* или ее производными (С. Е. Creutz, 1981). Свободная арахидоновая кислота в хромаффинных клетках и тромбоцитах отщепляется от фосфолипидов под действием  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой фосфолипазы  $A_2$ . При добавлении этой кислоты или других полиненасыщенных жирных кислот к хромаффинным гранулам, агрегированным в присутствии синексина, происходит их быстрое слияние.

На основании измерений электрической емкости фосфатидилсериновых бислоев (Е. Rojas, Н. В. Pollard, 1987) предложен альтернативный механизм, согласно которому синексин обеспечивает не только пространственное сближение мембран, но и их *слияние*. Вначале синексин связывает  $\text{Ca}^{2+}$ , полимеризуется и переходит в активированную форму, способную связываться с кислыми фосфолипидами на поверхности мембраны. Затем синексин взаимодействует с близлежащей мембраной и как бы сшивает обе мембраны. Активированный синексин в дальнейшем внедряется в глубь мембраны (за счет более высокой липофильности кальцийактивированной формы) и создает своеобразный гидрофобный мостик между бислоями. Это, в свою очередь, способствует обмену фосфолипидов с внешней и внутренней сторон двух бислоев и исчезновению барьера между двумя мембранными отсеками. Не исключено, что такой простой механизм, включающий только один белок

(синексин), кальций и кислый фосфолипид, реализуется и в секретирующих клетках.

После слияния гранул происходит их набухание с образованием крупных вакуолей. Этот процесс является энергозависимым. Он обеспечивается работой АТФазы, транспортирующей протоны внутрь гранул против градиента их концентрации. Генерируемый при этом электрический трансмембранный потенциал снижается затем за счет переноса анионов хлора в гранулы. Это, в свою очередь, вызывает увеличение осмотического давления внутри гранул и разрыв мембраны в участке контакта, ослабленном синексином и арахидоновой кислотой. Таким образом усиливается процесс дальнейшего слияния пузырьков (R. P. Casey et al., 1976; C. E. Creutz, H. B. Pollard, 1980).

Представленную выше цепь событий не следует рассматривать как исчерпывающую схему процесса экзоцитоза. До сих пор не установлена роль других цитоплазматических белков, способных взаимодействовать с секреторными пузырьками при повышении концентрации  $\text{Ca}^{2+}$ . Хотя существуют данные об участии цАМФ-зависимой протеинкиназы, кальмодулина и протеинкиназы С в самых разнообразных процессах экзоцитоза, механизм их действия не исследован. Впрочем, необычайно быстрый прогресс в данной области позволяет надеяться, что к моменту выхода этой книги роль этих белков в регуляции секреции будет раскрыта.

### 7.3. Проведение нервного импульса

Передача нервного импульса обеспечивается в результате высвобождения из нервных окончаний специфического нейромедиатора, например *норадреналина* или *ацетилхолина*. Вначале наблюдается повышение в синаптическом пузырьке концентрации ионизированного кальция. Вход  $\text{Ca}^{2+}$  в пресинаптические нервные окончания происходит через «медленные» и «быстрые» кальциевые каналы типа *L* и *T*, а в ряде клеток — *N*-типа (см. разд. 4.2); кроме того, он стимулируется деполяризацией клеточной мембраны, например, в среде с высокой концентрацией  $\text{K}^+$ . Быстрая фаза входа  $\text{Ca}^{2+}$  завершается за время, как правило, не более 1 с, медленная — может длиться до 20 с; обе фазы блокируются *верапамилом* и не модифицируются под действием блокатора натриевых каналов *тетродотоксина*. Вход  $\text{Ca}^{2+}$  в нервную клетку может также обеспечиваться за счет  $\text{Na}/\text{Ca}$ -градиента на плазмалемме.

Рис. 34 иллюстрирует последовательность процессов, обеспечивающих выделение нейромедиатора из пресинаптического окончания. Потенциал действия, инициированный в теле нейрона, распространяется вдоль аксона и поступает в область синапса. Временная деполяризация мембраны открывает по-



тенциалзависимые  $\text{Ca}$ -каналы и вызывает увеличение входа  $\text{Ca}^{2+}$  в пресинаптическое окончание. Входящий кальциевый ток со временем инактивируется как потенциал-, так и токозависимым механизмом. Нейромедиатор выделяется под действием либо самого  $\text{Ca}^{2+}$ , либо в результате активации  $\text{Ca}$ -кальмодулинзависимой протеинкиназы. Он попадает в синаптическую щель, активирует постсинаптические рецепторы и вызывает возникновение потенциала на мембране противоположной клетки (например, на мембране мышечной клетки). Вошедший в пресинаптическое окончание кальций удаляется затем эндоплазматическим ретикулом, митохондриями и за счет  $\text{Na}/\text{Ca}$ -обмена через плазмалемму.

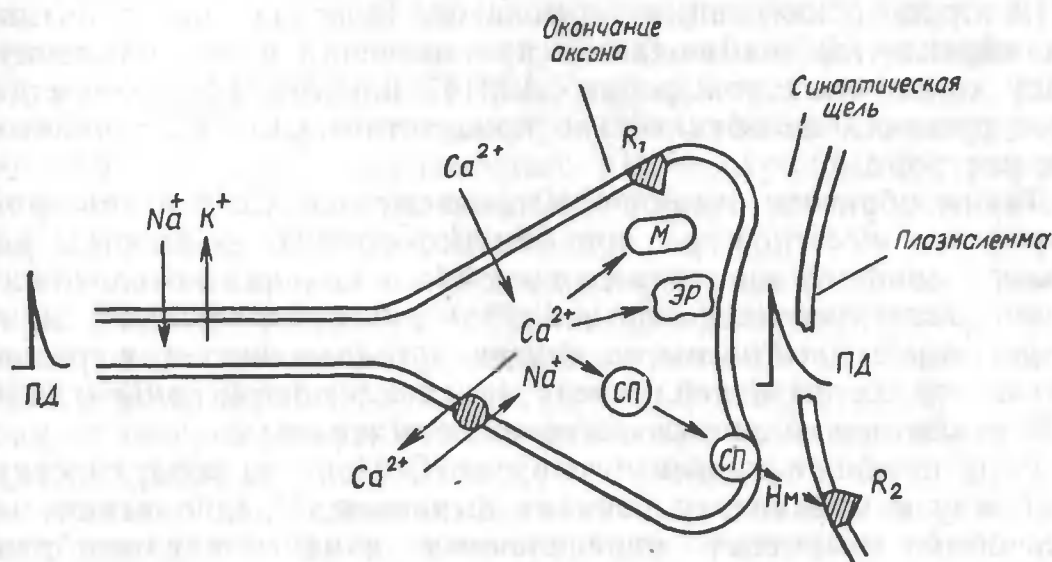


Рис. 34. Перераспределение  $\text{Ca}^{2+}$  в нервном окончании и выделение нейромедиатора (Нм) в синаптическую щель:

$R_1$  и  $R_2$  — пре- и постсинаптические рецепторы, М — митохондрия, ПД — потенциал действия, СП — синаптический пузырек, ЭР — эндоплазматический ретикулум

Процесс выделения медиатора в синаптическую щель подвержен тонкой регуляции, связанной с активацией различных пресинаптических рецепторов. При этом модуляции могут быть подвержены пресинаптический кальциевый и калиевый токи, поглощение  $\text{Ca}^{2+}$  во внутриклеточные резервуары и выброс этого катиона в цитоплазму. Под действием  $\alpha_2$ -адренергических и мускариновых агонистов, а также опиоидов, пуринов и простагландинов выход медиаторов подавляется, активация пресинаптических рецепторов  $\beta_2$ -адренергическими агонистами и ангиотензином усиливает их выброс. Во многих случаях тормозящий эффект обусловлен гиперполяризацией мембраны за счет увеличения ее калиевой проводимости.



## 7.4. Оплодотворение и развитие

Вопрос о том, с помощью каких механизмов осуществляется активация яйцеклетки при ее оплодотворении, в течение многих лет волнует биологов. Наиболее детальная информация о *механизме оплодотворения* получена в экспериментах на икре морских ежей. Несомненно, что в реализации сигнала от поверхностной мембраны к биосинтетическому аппарату оплодотворенной клетки участвуют ионы кальция, так как при оплодотворении наблюдается значительное увеличение его концентрации в цитоплазме. Через несколько минут концентрация  $\text{Ca}^{2+}$  восстанавливается до исходного уровня. При этом наблюдается деполяризация плазмалеммы за счет входящего внутрь клетки  $\text{Ca}^{2+}$ . При инъекции внутрь клеток кальциевого комплексона ЭГТА процесс активации тормозится. В то же время активация яйцеклетки наблюдается при внесении в инкубационную среду кальциевых ионофоров А23187 или X-537A, причем для этого процесса не обязательно присутствие  $\text{Ca}^{2+}$  во внеклеточном растворе.

Таким образом, очевидно, что, во-первых,  $\text{Ca}^{2+}$  *играет роль вторичного мессенджера при оплодотворении*; во-вторых, *увеличение концентрации внутриклеточного кальция обеспечивает как электрогенным током  $\text{Ca}^{2+}$  через поверхностную мембрану, так и его выбросом из внутриклеточных депо и, в-третьих, только вторая фаза увеличения внутриклеточной концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  ответственна за оплодотворение яйцеклетки.*

Роль потенциалзависимого входа  $\text{Ca}^{2+}$  через поверхностную мембрану в яйцеклетку пока не выяснена. Предполагают, что этот поток вызывает определенные изменения в мембране, препятствующие полиспермии. Такие изменения происходят за счет так называемой *кортикальной реакции*, сопряженной с массивным экзоцитозом содержимого многочисленных внутриклеточных гранул. Экзоцитоз инициируется в области взаимодействия со сперматозоидом и быстро распространяется по всей яйцеклетке. Секретируемые вещества (ферменты и структурные белки) изменяют структуру внеклеточных мембран, что как бы отталкивает уже не нужные сперматозоиды от плазматической мембраны после того, как происходит восстановление исходного мембранного потенциала. Не исключено также, что поступающий извне  $\text{Ca}^{2+}$  запускает процесс высвобождения  $\text{Ca}^{2+}$  из внутриклеточных резервуаров, подобный тому, который описан для мышечных клеток.

Пока еще нет полной ясности в вопросе о том, какие внутриклеточные компоненты являются мишенью для  $\text{Ca}^{2+}$  при активации и последующем делении яйцеклетки. Эксперименты с фенотиазинами свидетельствуют о том, что в кортикальной реакции принимает участие *кальмодулин*. Кроме того, показа-

но, что под действием  $\text{Ca}^{2+}$  активируется поглощение  $\text{O}_2$  гомогенатом икры морского ежа (Т. Hultin, 1950). Это связано с продукцией  $\text{H}_2\text{O}_2$  в результате взаимодействия  $\text{Ca}^{2+}$  с пигментами полигидроксинафтахиноновой природы, а также с *интенсификацией метаболизма арахидоновой кислоты* под действием *липоксигеназы* — фермента, генерирующего пероксиды. Механизм участия липоксигеназы в развитии оплодотворенной яйцеклетки пока не установлен. Сделано, тем не менее, предположение, что пероксиды липидной и неорганической природы могут играть роль вторичных мессенджеров, координируя не только дифференциацию, но и другие функции клеток (D. Erel, 1982).

Ионы кальция необходимы также для *активации сперматозоида для последующего оплодотворения*. Активация включает два основных процесса: увеличение подвижности клетки и индукцию акросомной реакции (экзоцитотической модификации плазматической мембраны), необходимой для слияния с яйцеклеткой и активации последней. Оба процесса активируются при повышении внутриклеточного рН, а акросомная реакция зависит также от поступления  $\text{Ca}^{2+}$  внутрь клетки сперматозоида через плазматическую мембрану.

Увеличение уровня  $\text{Ca}^{2+}$  в сперматозоиде приводит к активации фосфоинозитидного обмена, фосфолипаз С и  $\text{A}_2$ , увеличению концентрации фосфатидной кислоты (Р. У. Bennet et al., 1987). Как лизофосфолипиды, так и фосфатидная кислота и диацилглицерин могут участвовать в процессе дестабилизации акросомальной и плазматической мембран, необходимом для их слияния. После слияния ферменты, сосредоточенные в акросоме, выделяются во внеклеточное пространство и обеспечивают проникновение сперматозоида в яйцеклетку.

Предполагают, что активирующее действие  $\text{Ca}^{2+}$  на процессы, протекающие в сперматозоиде, реализуется посредством его связывания с кальмодулином. Так, трифторперазин в концентрации 1—2 мкмоль/л блокирует акросомную реакцию спермы морского ежа, индуцируемую мембраной яйцеклетки. То, что действие этого кальмодулинового ингибитора специфично, а не обусловлено повреждением мембран, доказывает отсутствие эффекта трифторперазина при других способах индукции акросомной реакции.

Аккумулированный сперматозоидом  $\text{Ca}^{2+}$  попадает либо в митохондрии (один из немногих примеров регуляторной роли митохондрий как кальциевых депо), либо выводится из клетки посредством Са-АТФазы плазматической мембраны. Тонкий молекулярный механизм кальциевой регуляции подвижности и активности сперматозоида, в частности координация изменения рН с внутриклеточным уровнем  $\text{Ca}^{2+}$ , еще ждет своего раскрытия.

## 7.5. Перенос $\text{Ca}^{2+}$ через мембраны простейших, бактерий и клеток растений

Существование одноклеточных организмов связано с их постоянным движением и изменениями формы. Свободноплавающие простейшие *Tetrahymena* и *Paramecium* (знаменитая инфузория-туфелька) отвечают на различные химические воздействия характерной отрицательной хемотаксической реакцией, проявляющейся во временном изменении мерцательных движений ресничек. Оказалось, что подобные двигательные ответы коррелируют с временным увеличением в их цитоплазме концентрации ионизированного кальция (У. Naitoch, Н. Кареко, 1972). Электрофизиологические исследования показали, что увеличение внутриклеточного  $\text{Ca}^{2+}$  опосредовано быстрым его входом через потенциалчувствительные Са-каналы на мембране ресничек.

Кальциевый сигнал и в этом случае реализуется через кальмодулин и, по-видимому, включает активацию кальмодулинактивируемой фракции гуанилатциклазы. Остается надеяться, что данный вывод, основанный на экспериментах с фенотиазинами, не будет опровергнут контрольными опытами, демонстрирующими неспецифическое действие этих кальмодулиновых ингибиторов (см. разд. 2.2).

На функционально важную роль кальмодулина в *Tetrahymena* и *Paramecium* указывает и специфическая его локализация в ресничках. При этом повышение концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  вызывает полное исчезновение свободного кальмодулина из этой области, что обусловлено, несомненно, его взаимодействием с белками-мишенями (К. Ohnishi et al., 1981). Кроме того, кальмодулин локализован в ротовом аппарате простейших, нормальная функция которого важна не только для поглощения пищи, но и для процесса деления. Ротовой аппарат представляет собой сложное образование из сплетения многочисленных микротрубочек, толстых микрофиламентов и мембранных органелл. Трифторперазин (наиболее широко используемый ингибитор кальмодулина) существенно тормозит захват питательных веществ тетрахименами и ингибирует экзоцитоз, из-за чего в этих простейших формируются крупные вакуоли. Интересно также, что под действием трифторперазина клетки тетрахимены начинают плыть «задом наперед» (У. Suzuki et al., 1980). Будущее покажет, возможно ли создание лекарства против болезнетворных простейших на основе трифторперазина или его аналогов. Во всяком случае, придется «заставить» тетрахимену избирательно накапливать кальмодулиновый ингибитор в своей цитоплазме.

Концентрация  $\text{Ca}^{2+}$  в клетках простейших увеличивается лишь на короткий пормежуток времени, поэтому логично пред-

положить, что в них должны существовать системы, понижающие концентрацию данного катиона. Действительно, удалось обнаружить систему активного транспорта  $\text{Ca}^{2+}$ , ассоциированную с фракцией микросомальных мембран. Изолированные мембраны не только аккумулировали  $\text{Ca}^{2+}$  за счет работы Са-АТФазы, обладавшей высоким сродством к этому катиону ( $K_d=0,4$  мкМ), но и высвобождали  $\text{Ca}^{2+}$  под действием трифторперазина. На первый взгляд, данные о действии трифторперазина свидетельствуют о плазмалеммальной природе выделенной Са-транспортирующей системы. Однако действующие концентрации этого соединения были очень высоки (100—200 мкмоль/л), а добавленный кальмодулин никак не влиял на систему кальциевого транспорта.

Исходя из анализа активностей маркерных ферментов, был сделан вывод, что данная фракция соответствует *эндоплазматическому ретикулуму*.

Роль ионов кальция в *регуляции метаболической активности бактерий* до сих пор не выяснена, хотя эти организмы также обладают системами аккумуляции и выведения  $\text{Ca}^{2+}$ . Необходимость в системах удаления  $\text{Ca}^{2+}$  из клеток бактерий обусловлена тем, что последние существуют в средах с высоким содержанием  $\text{Ca}^{2+}$  и должны поддерживать постоянно низкую (около  $10^{-7}$  моль/л) внутриклеточную концентрацию этого катиона. Предполагают, что  $\text{Ca}^{2+}$  поступает в бактерии за счет электрофоретического переноса под действием трансмембранного электрического потенциала.

Удаление  $\text{Ca}^{2+}$  из бактерий осуществляется либо за счет гидролиза АТФ (*Streptococcus faecalis*), либо путем обмена  $\text{Ca}^{2+}$  на другой катион: на  $\text{H}^+$  (*E. coli*, *Bacillus subtilis* и другие бактерии, обитающие в средах с низким содержанием  $\text{Na}^+$ ) или на  $\text{Na}^+$  (*Halobacterium halobium*).

Не всегда возможно легко определить, обеспечивает ли АТФ непосредственно перенос  $\text{Ca}^{2+}$  через поверхностную мембрану бактерии (как, например, в эритроцитах) или при этом происходит образование градиента другого иона и перемещение  $\text{Ca}^{2+}$  является вторичным процессом. Например, в анаэробной бактерии *S. faecalis* существует Н-АТФаза, транспортирующая ионы водорода во внеклеточное пространство, поэтому  $\text{Ca}^{2+}$ , в принципе, может удаляться из клетки в обмен на протоны. Тем не менее после снятия протонного градиента разобщителями окислительного фосфорилирования и подавления Н-АТФазы специфическим ингибитором дициклогексилкарбодимидом эти бактерии все же способны транспортировать  $\text{Ca}^{2+}$  во внешнюю среду, очевидно, за счет остаточного внутриклеточного АТФ (Н. Kobayashi et al., 1979). В то же время искусственное наведение градиента ионов водорода не вызывало выброса  $\text{Ca}^{2+}$ .

Под действием [ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ] АТФ в мембранах *S. faecalis* образуются два фосфорилированных продукта, чувствительные к гидроксиламину и содержащие ацилфосфатную связь, свойственную всем  $E_1$ — $E_2$ -ферментам. Удивительно, однако, что молекулярная масса этого возможного ацилфосфатного интермедиата Са-АТФазы составляет всего 53 кД, а его образование не ингибируется ЭГТА и ванадатом (Y. Burkler, M. Solior, 1982). Пока не ясно, можно ли отнести эту Са-АТФазу к новому классу кальцийтранспортирующих белков или ее фосфорилированный продукт есть результат протеолитического расщепления белка большей молекулярной массы.

В других бактериях энергия для выброса  $\text{Ca}^{2+}$  во внешнюю среду запасается в виде градиентов  $\text{Na}^+$  и  $\text{H}^+$ . При работе цепи переноса электронов в *E. coli* внутриклеточное пространство заряжается более отрицательно по отношению к внешней среде и имеет более высокое значение рН. Для того чтобы использовать силу мембранного потенциала для выведения двухвалентного катиона из клетки, бактерии осуществляют не электронейтральный, а электрогенный обмен, сопряженный с переносом внутрь клетки суммарного положительного заряда, возможно со стехиометрией  $3\text{H}^+/1\text{Ca}^{2+}$  (H. Tsujibo, B. P. Rosen, 1983). Естественно, что использовать мембранный потенциал со знаком «—» внутри клетки для выведения катиона можно и иным способом, а именно, транспортируя наружу вместе с катионом и анион, т. е. путем *симпорта* (А. А. Болдырев, 1986). Такой процесс описан, в частности, для клеток *E. coli*, удаляющих  $\text{Ca}^{2+}$  из клетки вместе с неорганическим фосфатом.

Для ряда микроорганизмов, например *Halobacterium halobium*, регуляторная роль  $\text{Ca}^{2+}$  охарактеризована достаточно полно. Эта бактерия каждые 10 с изменяет направление своего движения, что обеспечивается изменением чувствительности вращательных ресничек к стимулу — свету. Внешний сигнал воспринимается ретинальсодержащими фоторецепторами, а также хеморецепторами. Усиление желто-зеленого («аттрактивного») света увеличивает время между обращением мерцания ресничек, а усиление ультрафиолетового («репеллентного») — уменьшает это время. Предполагают, что в результате световых воздействий в цитоплазме меняется концентрация некоего регуляторного вещества-осциллятора (A. Schimz, E. Hildebrand, 1987). Связь между сигналом и двигательной функцией *H. halobium* осуществляется за счет обратимого метилирования мембранных белков. Оказалось, что уменьшение концентрации внешнего  $\text{Ca}^{2+}$  активирует метилирование и вызывает репеллентный ответ бактерий. Ингибирование метилирования обеспечивает аттрактивный ответ. В регуляции метилирования и движения бактерии участвует также цГМФ, действие которого противоположно влиянию ионов кальция.



Несмотря на то что даже садовод-любитель может сказать со всей определенностью, что ионы кальция влияют на рост и развитие растений, тонкие механизмы кальциевой регуляции внутри- и внеклеточных процессов растений до сих пор не выяснены. Кальций поступает в растения через корни и диффундирует латерально по внеклеточному (апопластическому) пространству. Основным барьером для дальнейшей диффузии  $\text{Ca}^{2+}$  являются утолщенные стенки эндодермиса. Предполагают, что вход  $\text{Ca}^{2+}$  в клетку растения осуществляется пассивным образом.

В покое клетках растений, как и в клетках животных и простейших, уровень цитоплазматического  $\text{Ca}^{2+}$  примерно в 1000 раз ниже, чем во внешней среде. Считают, что для предотвращения токсического действия высоких концентраций  $\text{Ca}^{2+}$  на внутриклеточный метаболизм растительные клетки используют системы выведения  $\text{Ca}^{2+}$  через внешнюю мембрану и запасаания во внутриклеточных органеллах. Имеются сведения, что выброс  $\text{Ca}^{2+}$  из клеток растений, опосредованный работой Са-АТФазы, может регулироваться кальмодулином.

В дополнение к традиционным внутриклеточным системам кальциевых насосов эндоплазматической сети и митохондрий, свойственным животным клеткам, зрелые растительные клетки содержат также крупную Са-аккумулирующую органеллу — *центральную вакуоль*, занимающую от 10 до 90% клеточного пространства. В вакуолях запасаются ионы, сахара, органические кислоты и гидролитические ферменты. Концентрация  $\text{Ca}^{2+}$  в вакуоли может достигать нескольких миллимолей на 1 л. Хотя в пластидах концентрация  $\text{Ca}^{2+}$  еще выше (до 15 ммоль/л), очевидно, что из-за большого объема именно центральная вакуоль осуществляет функцию аккумуляции и хранения основной части клеточного  $\text{Ca}^{2+}$ . Большая часть  $\text{Ca}^{2+}$ , сосредоточенного в центральной вакуоли, не может мобилизоваться и поступать в цитоплазму ввиду того, что в вакуоли высока концентрация оксалата, с которым  $\text{Ca}^{2+}$  образует мало-растворимый комплекс.

Вакуолярная мембрана (тонопласт) содержит систему АТФ-зависимого переноса  $\text{Ca}^{2+}$ . Так как этот перенос через мембрану активируют и ингибируют те же соединения, что и воздействующие на активность Н-АТФазы тонопластов, сделан вывод, что за этот перенос отвечает не Са-АТФаза, а  $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обменник (K. Schumaker, H. Sre, 1986). Движущей силой переноса  $\text{Ca}^{2+}$ , равно как и других веществ, через тонопласт в этом случае является *градиент водородных ионов*. Н-АТФаза тонопласта по ряду свойств отличается как от F-АТФаз (митохондриального типа), так и от Р-АТФаз эндоплазматического ретикула и плазмалеммы. АТФаза тонопласта не ингибируется ванадатом и азидом и блокируется  $\text{KNO}_3$  и  $\text{KSCN}$ . В ее состав



входят два основных типа полипептидов с молекулярной массой 66—89 кД (каталитическая субъединица) и 54—64 кД (регуляторная субъединица, содержащая нуклеотидсвязывающий центр). Вполне возможно, что этот фермент является представителем принципиально нового (третьего по счету) типа АТФаз (S. Mandala, L. Taiz, 1986).

## 7.6. Участие ионов кальция в патогенезе клеток и тканей

Кальций — универсальный регулятор внутриклеточных процессов, однако при определенных условиях (например, перегрузке им клеток) кальций становится губительным для метаболизма. Поэтому неудивительно, что снижение внутриклеточной концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  (либо блокирование его основной мишени — кальмодулина) дает успех в терапии при различных заболеваниях. Так, психотропное действие многих веществ (в том числе из группы фенотиазинов) объясняют взаимодействием с кальмодулином, ибо их фармакологическая активность коррелирует со способностью реагировать с этим белком.

В то же время до конца не разрешена проблема несоответствия терапевтических доз нейролептиков и их способностью блокировать функцию кальмодулина *in vitro*. Возможно, что реальная концентрация фенотиазинов в органе-мишени во много раз выше, чем в плазме крови, так как эти вещества могут накапливаться в клетках. Например, концентрация хлорпромазина и его активных аналогов может достигать в мозгу 15 мкмоль/кг (R. P. Maickel et al., 1974), что соответствует  $K_d$  хлорпромазина для кальмодулина (5 мкМ).

Кальмодулин воздействует на самые разнообразные внутриклеточные процессы, поэтому вопрос об основной мишени фенотиазинов при нервных заболеваниях остается открытым. В числе ферментов-мишеней рассматривают прежде всего *фосфодиэстеразу*, *аденилатциклазу* и *Са-АТФазу плазмалеммы*. Кроме того, фенотиазины подавляют активность таких ключевых ферментов, как *фосфолипаза  $A_2$* , *киназа легких цепей миозина*, *киназа фосфорилазы*, *киназа гликогенсинтазы*.

Представляет интерес тот факт, что в нервной ткани высока концентрация белков, способных, как и фенотиазины, связывать кальмодулин и подавлять его биологическую активность. Не исключено, что мозг содержит и эндогенные пептиды, обладающие психотропной активностью. Обнаружение этих регуляторов функции кальмодулина несомненно откроет новую страницу в борьбе с заболеваниями нервной системы.

Любое лекарство не свободно от недостатков. Одно из побочных действий психотропной терапии выражается в *ортоста-*

тической гипотонии. Этот эффект может быть объяснен блокадой кальмодулина, приводящей к ингибированию кальмодулин-зависимого сокращения гладких мышц сосудов.

К веществам, в течение многих десятилетий успешно применявшимся в медицине, относятся *сердечные гликозиды*, из которых наиболее хорошо известны, *убаин*, *строфантин* и *дигоксин*. Сердечные гликозиды из растения наперстянка и их синтетические аналоги до настоящего времени являются, пожалуй, единственным средством терапии *сердечной недостаточности*, позволяющим усиливать сократительную деятельность сердца. Данные соединения специфически ингибируют Na, K-АТФазу путем взаимодействия с Na-связывающим участком на цитоплазматической поверхности фермента. Каким образом этот фермент влияет на силу сердечных сокращений? В последние годы благодаря открытию системы Na/Ca-обмена удалось проследить связь между сердечными гликозидами и  $\text{Ca}^{2+}$ . Блокирование Na, K-АТФазы вызывает увеличение концентрации  $\text{Na}^+$  в миоплазме, в связи с этим активируется Na/Ca-обмен через сарколемму и увеличивается уровень  $\text{Ca}^{2+}$  около сократительного аппарата. К сожалению, длительная гликозидная терапия приводит к интоксикации всего организма. Поэтому крайне актуальными представляются поиски новых средств, обеспечивающих рост концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  в кардиомиоците (например, нетоксических кальциевых ионофоров) или увеличение средства кальцийсвязывающих клеточных систем к этому катиону.

При другой патологии сердца — *ишемии миокарда* — требуется не повышать, а понижать внутриклеточный уровень  $\text{Ca}^{2+}$ . Это заболевание приводит к структурным и функциональным нарушениям кардиомиоцитов. Если продолжительность данного периода невелика, то повреждения в клетках сердца удастся предотвратить восстановлением нормального кровотока через орган, например, с помощью тромболитической терапии. Такое воздействие (называемое *реперфузией*) уменьшает и размер некротической зоны ткани.

Однако в ряде случаев создается ситуация, когда при реперфузии сердце подвергается дальнейшему повреждению, сопровождаемому аритмиями, что приводит к его остановке (случаи внезапной смерти). Механизмы, приводящие к этим парадоксальным явлениям, до сих пор не выяснены. Блокаторы кальциевых каналов (или кальциевые антагонисты) широко используют в качестве терапевтических средств при ишемии и реперфузии миокарда, на основании этого было предположено, что *причиной повреждения сердца при ишемической болезни является кальциевая перегрузка*. В то же время последовательная перфузия изолированного сердца бескальциевым раствором и средой, содержащей нормальную концентрацию  $\text{Ca}^{2+}$ , также

вызывает серьезные повреждения в кардиомиоцитах. Этот феномен получил название «кальциевого парадокса»; он обусловлен поступлением значительных количеств  $\text{Ca}^{2+}$  из межклеточного пространства в цитоплазму через потенциалзависимые кальциевые каналы, посредством  $\text{Na}/\text{Ca}$ -обмена и через ионные каналы, возникающие в самом липидном бислое сарколеммальной мембраны. Последние могут образовываться в результате перекисного окисления липидов, протекающего даже при пониженном содержании (до 5% от нормального уровня) кислорода (D. S. Smith et al., 1980). В условиях восстановления кровотока, когда в ткани резко повышается концентрация кислорода, процессы генерации кислородных радикалов и перекисного окисления существенно интенсифицируются. Для предотвращения повреждающего действия реперфузии могут быть использованы кальциевые антагонисты, повышенная концентрация натрия, ингибиторы кальмодулина и антиоксиданты.

*Механизм нарушения функции сердца при его перегрузке кальцием*, как считают, включает нарушение ионной проводимости сарколеммы, активацию  $\text{Ca}$ -зависимых фосфолипаз и протеиназ. Согласно одной из гипотез образование лизоформ фосфолипидов, обладающих детергентным действием, и увеличенная протеиназная активность в клетках сердца могут вызывать солюбилизацию и инактивацию не только кальцийтранспортирующих белков, сколько белков-регуляторов и в их числе фосфоламбана (A. E. Shamoo et al., 1985). В этом может заключаться причина необратимых функциональных повреждений сердца через 20—30 мин глобальной ишемии. Даже после восстановления нормального кровоснабжения ткани и уменьшения концентрации и активности повреждающих агентов точная реконструкция исходной сложной системы регуляции транспорта  $\text{Ca}^{2+}$  представляется крайне маловероятной.

В последние годы накоплены убедительные данные, свидетельствующие о *ключевой роли  $\text{Ca}^{2+}$  в гипертонической болезни*. Повышение артериального давления связано с сужением мелких сосудов, что в свою очередь вызывается увеличением силы сокращения каждой гладкомышечной клетки сосуда. Механизм действия  $\text{Ca}^{2+}$  на степень напряжения сосудов опосредован  $\text{Na}^+$ . (Даже не сведущему в медицине известно, что гипертоникам рекомендуется ограничивать потребление поваренной соли.) Терапия натрийдиуретическими препаратами способствует понижению артериального давления. Влияние  $\text{Na}^+$  на концентрацию  $\text{Ca}^{2+}$  внутри гладкомышечной клетки и, следовательно, на активацию сократительных белков реализуется через изменение градиента  $\text{Na}^+$  и систему  $\text{Na}/\text{Ca}$ -обмена на плазматической мембране. Поскольку концентрация  $\text{Na}^+$  в плазме крови (около 150 ммоль/л) постоянна (поддерживается специальными регуляторными механизмами), натриевый гра-

диент может быть изменен путем увеличения или уменьшения внутриклеточного  $\text{Na}^+$ . Даже небольшое увеличение концентрации  $\text{Na}^+$  в цитоплазме гладкомышечной клетки с 10 до 10,5 ммоль/л (достигается, например, блокированием  $\text{Na}$ ,  $\text{K}$ -АТФазы сердечным гликозидом) может увеличить концентрацию  $\text{Ca}^{2+}$  на десятки наномоль в литре и вызвать заметное увеличение тонуса сосуда.

Таким образом, чтобы понизить артериальное давление, следует уменьшить концентрацию  $\text{Na}^+$  внутри гладкомышечной клетки. Возможно также проактивировать альтернативные пути удаления  $\text{Ca}^{2+}$  из цитоплазмы. В этой связи следует отметить, что известный лекарственный препарат — *нитроглицерин*, применяемый уже более 100 лет для лечения стенокардии и вызывающий расслабление гладких мышц сосудов, в очень низких концентрациях ( $10^{-7}$  моль/л) примерно вдвое увеличивает активность  $\text{Ca}$ -АТФазы из плазматической мембраны сосудистой клетки (L. M. Popescu et al., 1985).

Ввиду того, что  $\text{Ca}^{2+}$  наряду с гормонами и факторами роста играет важную роль в регуляции пролиферации клеток, предполагают, что в опухолевых клетках, т. е. клетках, вышедших из-под контроля, такая регуляция отсутствует или нарушена. Действительно, существуют данные об изменениях в чувствительности к внеклеточному  $\text{Ca}^{2+}$  в некоторых неопластических клетках (A. L. Boynton et al., 1977). Представления о роли  $\text{Ca}^{2+}$  в регуляции функций нормальной и патологической клетки с каждым годом углубляются.

---

## Заключение

---

Последние достижения биохимии, молекулярной и клеточной биологии, электрофизиологии, использование современных физико-химических методов позволили преодолеть фрагментарность в описании структуры и функции клеток. К настоящему времени клетка представляется уже не статической структурной единицей, включающей многочисленные строго специализированные органеллы, не «сосудом», в котором протекают независимые друг от друга ферментативные реакции, но относительно автономным образованием, отделенным от внешней среды плазматической мембраной и способным эффективно координировать свои функции посредством набора вторичных мессенджеров. Вторичные мессенджеры можно разделить на две группы: образующиеся в ходе ферментативных реакций (циклические нуклеотиды, диацилглицерин, инозиттрисфосфат) и проявляющие свое действие благодаря существованию собственного трансмембранного градиента (ионы кальция).

Особенностью  $\text{Ca}^{2+}$  как вторичного мессенджера является и то, что его мобилизация может осуществляться не только химическим путем (например, под действием инозиттрисфосфата), но и в результате электрических процессов на мембранах. Последние характеризуются чрезвычайно высокой скоростью; не ясно, какой альтернативный механизм, вместо электрического, мог бы выработаться в ходе эволюции для обеспечения столь быстрых процессов, как проведение нервного импульса и сократительная деятельность поперечно-полосатых мышц.

Мишенями для  $\text{Ca}^{2+}$  в клетке являются как «растворимые», так и интегральные мембранные белки. Взаимодействие  $\text{Ca}^{2+}$  с первыми, как правило, обеспечивает регуляцию различных метаболических процессов в клетке. Мембранные кальцийселективные каналы и Са-насосы предназначены для регуляции внутриклеточной концентрации этого катиона.

Несмотря на различные конечные эффекты кальция в тканях и органах, принципиальные механизмы передачи информации посредством  $\text{Ca}^{2+}$  сходны для разных клеток. На рис. 35





представлены процессы, протекающие в гипотетической клетке, которая подвержена регуляторному действию  $\text{Ca}^{2+}$ . Поступление  $\text{Ca}^{2+}$  в клетку извне регулируется величиной потенциала на плазматической мембране и осуществляется через селективные каналы и за счет  $\text{Na}/\text{Ca}$ -обмена. Каждый из процессов претерпевает дополнительное регуляторное воздействие — через цАМФ-зависимое фосфорилирование канала и при взаимодействии АТФ с катионообменником.

Другой источник  $\text{Ca}^{2+}$  — внутриклеточные мембранные системы (как правило, сеть эндоплазматического ретикулума, митохондрии, вакуоли растений, ядра). Выход  $\text{Ca}^{2+}$  из ретикулярных резервуаров осуществляется под действием электрического сигнала, передающегося с плазмалеммы (быстрые скелетные мышцы), самого  $\text{Ca}^{2+}$ , поступающие извне (сердце, медленные мышцы), инозиттрисфосфата (клетки гладких мышц, тромбоциты, большинство других клеток). Быстрый выброс  $\text{Ca}^{2+}$  из внутреннего объема ретикулума обеспечивается открытием селективных каналов.

Увеличение концентрации ионизированного  $\text{Ca}^{2+}$  в клетке от 0,01—0,1 до 1—5 мкмоль/л, т. е. до порога чувствительности растворимых белков (кальмодулина, легких цепей миозина, тропонина С), обеспечивает реализацию специфической функции клетки. Ответ клетки на сигнал проявляется до тех пор, пока не снизится внутриклеточная концентрация  $\text{Ca}^{2+}$ . Существуют три универсальных пути удаления  $\text{Ca}^{2+}$  из цитоплазмы клеток: поглощение сетью эндоплазматического ретикулума, АТФ-зависимый и потенциалзависимый перенос через плазматическую мембрану. Первые два процесса осуществляют кальцийпереносящие белки (Са-насосы), близкие по ряду функциональных свойств, но принципиально отличающиеся структурно. Третий процесс, обеспечиваемый электрогенным  $\text{Na}/\text{Ca}$ -переносчиком, в явном виде не зависит от источника энергии (АТФ), однако он реализуется за счет энергии, запасенной в неравновесном распределении ионов по обе стороны плазмалеммы. В зависимости от знака потенциала и соотношения трансмембранных градиентов  $\text{Na}^+$  и  $\text{Ca}^{2+}$  обмен этих ионов может осуществляться в обоих направлениях.

Исследователи еще далеки от выяснения интегрального механизма клеточной регуляции, в который вовлечены разнообразные агонисты и антагонисты, клеточные рецепторы, вторичные мессенджеры, фосфорилируемые белки-мишени. Своеобразным вызовом биохимикам является хитросплетение реакций фосфоинозитидного обмена. Гидролиз инозитных фосфолипидов приводит к образованию шести различных инозитфосфатов: циклических и нециклических фосфатных эфиров, соответствующих инозитмоно-, ди- и трифосфатам. Инозит-1,4,5-трифосфат превращается в инозит-1,3,4,5-тетраakisфосфат, он, в

свою очередь, преобразуется в инозит-1,3,4,-фосфат и т. д. К 1987 г. показано, что под действием различных киназ, эстераз и фосфатаз образуется по меньшей мере 14 подобных продуктов. Предстоит большая работа по выяснению функции каждого из фосфоинозитидов. Не исключено, что некоторые из них, как и инозиттрисфосфат, играют роль вторичных мессенджеров.

В то же время в клетках, видимо, существуют альтернативные механизмы (в дополнение к инозиттрисфосфатному), обеспечивающие выброс  $\text{Ca}^{2+}$  в цитоплазму. Для икры морского ежа, например, характерно существование трех (!) Са-мобилизующих агентов: инозиттрисфосфата и аналогов двух (НАД и НАДН) никотинамидадениндинуклеотидов (D. L. Clapper et al., 1987). Аналоги НАД и НАДН вызывают выброс  $\text{Ca}^{2+}$  при очень низкой концентрации (ниже 0,1 мкмоль/л). Самым поразительным является то, что каждое из трех веществ индуцирует выброс  $\text{Ca}^{2+}$  из независимых кальциевых депо. Если это наблюдение будет подтверждено в опытах на других клетках, то универсальная схема кальциевой регуляции будет нуждаться в основательной ревизии. Появится, в частности, необходимость принимать во внимание компартментализацию кальциевых резервуаров и возможность не диффузионных, но векторных потоков внутриклеточного  $\text{Ca}^{2+}$  и избирательной модуляции активности вполне определенных белков-мишеней.

Так или иначе, перефразируя известное изречение, можно утверждать: если бы компартментализация кальциевых пулов не была продемонстрирована, ее (или компартментализацию других вторичных мессенджеров и белков-мишеней) необходимо было бы постулировать. Действительно, для регуляции метаболической и функциональной активности разнообразные клетки используют одни и те же принципы. В то же время показана универсальность основных регуляторных принципов для самых различных клеток. Нельзя, например, исключить, что фосфатидилинозитный метаболизм важен для жизнедеятельности всех организмов, включая растения и простейшие эукариоты.

Если обозначить «ключевые слова», характеризующие необходимые компоненты процессов внутриклеточной регуляции, то в универсальный список попадут  $\text{Ca}^{2+}$ , Са-каналы, G-белки, цАМФ-зависимая протеинкиназа, протеинкиназа С, Са-АТФазы, эндоплазматический ретикулум, инозиттрисфосфат, диацилглицерин, кальмодулин. Из этого перечня следует, что механизмы, обеспечивающие проявление метаболической и функциональной активности любой клетки, как бы «подстроены» под ионы кальция. Более того, создается впечатление, что  $\text{Ca}^{2+}$  как универсальный вторичный мессенджер действует практически на все ключевые процессы клетки.

Возникает вопрос, почему метаболизм клетки при увеличении уровня свободного кальция не ввергается в хаос? Очевидно, что для согласованной регуляции клеточной активности, для реализации специфических сигналов извне необходимо, чтобы во времени и пространстве потоки метаболитов были разделены. Это может быть, в частности, обеспечено существованием множественных путей поступления  $\text{Ca}^{2+}$  в клетку (через селективные каналы, обменники), использованием разнообразных пространственно разделенных кальциевых депо эндоплазматического ретикулума (в некоторых клетках) и митохондрий и, наконец, наличием нескольких вторичных мессенджеров, выполняющих функцию инициаторов выброса  $\text{Ca}^{2+}$  из его внутриклеточных резервуаров. Столь сложная система кальциевой регуляции обеспечивается клеточными мембранами, способными поддерживать чрезвычайно высокие градиенты  $\text{Ca}^{2+}$  и одновременно проводить и модулировать специфические поступающие извне сигналы.

---

## Рекомендуемая литература

---

- Бендолл Дж. Мышцы, молекулы и движение. М., 1970.
- Биохимия мембран / А. А. Болдырев. Введение в биохимию мембран. М., 1986.
- Биохимия мембран / Р. Н. Глебов. Эндоцитоз и экзоцитоз. М., 1987.
- Болдырев А. А., Мельгунов В. И. Транспортные АТФазы // Итоги науки и техники. Сер. Биофизика. 1985. Т. 17.
- Воейков В. Л. Сопряжение рецепторов гормонов и нейромедиаторов с аденилатциклазой // Итоги науки и техники. Сер. Биоорганическая химия. 1984. Т. 2.
- Костюк П. Г. Кальций и клеточная возбудимость. М., 1986.
- Орлов С. Н. Кальмодулин // Итоги науки и техники. Сер. Общие проблемы физико-химической биологии. 1987. Т. 8.
- Ритов В. Б., Козлов Ю. П., Мурзахметова М. К. Молекулярная организация и функциональные свойства транспортной Са-зависимой аденозинтрифосфатазы саркоплазматического ретикулума. Иркутск, 1983.
- Ткачук В. А. Введение в молекулярную эндокринологию. М., 1983.
- Чизмаджев Ю. А., Пастушенко В. Ф. Электрохимия нервного импульса // Итоги науки и техники. Сер. Биофизика мембран. 1987. Т. 4.
- Biomembrane Structure and Function* / Ed. by D. Chapman. Weinheim, 1984.
- Calcium and Cell Function* / Ed. by W. Y. Chang. 1982. Vol. 2.
- Calcium and Its Role in Biology* / Ed. by H. Sigel. New York, 1984.
- Carafoli E. Membrane Transport of Calcium*. New York — London, 1982.
- Disorders of Mineral Metabolism* / Ed. by F. Bronner and J. W. Coburn. 1982. Vol. 2.
- Martonosi A. N. Transport of Calcium by Sarcoplasmatic Reticulum* // *Calcium and Cell Function*. 1982. Vol. 3.
- Metal Ions in Biological Systems* / Ed. by H. Sigel. New York, Basel. 1984.



---

# Предметный указатель

---

Агрегация тромбоцитов 94  
Адгезия тромбоцитов 94  
Аденилатциклаза, ГТФ-связывающие регуляторные компоненты 42  
— мишень для кальмодулина 108  
Аминофосфолипиды, локализация на мембране 18  
Антибиотик A23187 23  
— — активация клеток 25  
— — воздействие на тромбоциты 96  
— — структура молекулы 24\*  
Антиоксиданты 27  
Антипирилазо III 29, 30  
Арахидоновая кислота, участие в процессе оплодотворения 103  
— — — — — экзоцитоза 99  
— — — — — синтезе простагландинов 13  
Арсеназо III 29, 30  
Аспирин, воздействие на тромбоциты 95  
Ацетилхолин, передача нервного импульса 100

Белок полосы III 36  
BAУ K8644 41 \*

Валиномицин 37  
Ванадат 60  
Верапамил, блокада кальция 100  
— структура 41 \*

Витамин Е ( $\alpha$ -токоферол) 27

Глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа 58

ГТФ-связывающие белки (G-белки) 13

Диады мышцы сердца 57

Диацилглицерин 10, 12\*—14\*

— воздействие на тромбоциты 96

Дигидропиридиновый рецептор 42

Дигидропиридины 40

Дигоксин 109

Индикаторы кальция 23—35

Индо-1 32, 34\*, 35

Инозиттрисфосфат 10, 13

— влияние на высвобождение кальция 88

Ионные каналы, причины избирательности (теория Эйзенмана) 37

Иономицин, кальциевый ионофор 26

Ишемия миокарда 109

Калелектрины 21

Калий, потенциал покоя клетки 39

Кальвектин 45

- Кальмидазолий, структура 20\*, 21
- Кальмодулин 9, 19, 43, 72
  - связывание кальция 10
  - роль в жизнедеятельности одноклеточных 104
  - структура ингибиторов 20\*
  - участие в процессе оплодотворения 102
  - ферменты-мишени 108
- Кальмодулинзависимая кальциевая АТФаза эритроцитов 48
- Кальпаин 49
- Кальсеквестрин 53, 54 \*
- Кальциевая АТФаза, мишень для кальмодулина 108
  - — — — — независимое функционирование мономеров 63
  - — — — — определение количества 78, 79
  - — — — — саркоплазматического ретикула-ма, видовые и тканевые отличия 66\*
  - — — — — модель взаимного расположения отдельных доменов 67, 68\*
  - — — — — структура 54\*, 56\*, 62
  - — — — — транспортный цикл 59, 60\*
  - — — — — эритроцитов, активация свободным кальцием 49
  - — — — — участки связывания 47, 48
  - — — — — перегрузка сердца 109, 110
- Кальциевые антагонисты 40
  - индикаторы, сравнительная характеристика 32, 33
  - ионофоры 23, 26
  - каналы 10, 36, 39
  - — АТФазы 63, 64\*
  - — вход кальция 100
  - — высвобождение кальция 81
  - — механизм регуляции активности 14, 90, 91
  - — потенциалзависимые, модификаторы 41\*
  - — регулируемые потенциалом 39
  - — — — — связыванием агонистов с рецепторами 39
  - — — L-типа 40
  - — — T-типа 40
  - хроморофы 23
- электроды 29
- Кальциевый комплексон БАФТА 27, 32, 34\*
- — ЭГТА 18
- «парадокс» 110
- ток «медленный» 39
- транспорт активный, ассоциированный с эндоплазматическим ретикулом 105
- — — в липосомах, реконструкция 52, 55
- — — систем сердца, участие в расслаблении 80\*
- — — — — через мембрану митохондрий 45
- Кальций, активация сперматозоида 103
  - — — — — тромбоцитов 96\*
  - — — — — взаимозависимость потоков и основных метаболических процессов в клетке 113\*
  - — — — — влияние на одноклеточные организмы 104
  - — — — — секреторные клетки 97
  - — — — — внутриклеточный, мобилизация, механизмы секреции кислоты слизистой желудка 97
  - — — — — вторичный мессенджер при оплодотворении 102
  - — — — — выброс, влияние инозиттрисфосфата 88
  - — — — — из клеток, механизмы 80, 82, 83\*
  - — — — — канал 89
  - — — — — из саркоплазматического ретикула, воздействие кальция 84
  - — — — — — — — — — ионов серебра 82
  - — — — — — — — — — кофеина 82
  - — — — — — — — — — гипотеза регенеративного высвобождения 85
  - — — — — — — — — — механизмы 82
  - — — — — — — — — — физиологическая значимость 85
  - — — — — индикаторы 23—35
  - — — — — кластеризация фосфолипидов 17
  - — — — — ключевая роль в гипертонической болезни 110
  - — — — — жизнедеятельности организмов 7

- методы регистрации концентрации 18
- мишени 9
- основные пути поглощения и выброса митохондриями 45
- проницаемость липидного бислоя 19
- — мембраны 39
- распределение в организме 8
- регуляция внутриклеточных процессов 7, 8
- — кальциевого канала 42\*
- — процессов свертывания крови 93
- — системы переноса 71
- — функциональной активности клеток 93
- роль в метаболической активности бактерий 105, 106
- — — патогенезе 108
- — — регуляции пролиферации клеток 111
- свободный 8
- связь с альбумином 8
- — — клеточными мембранами 8
- — — растворимыми лигандами 8
- содержание в организме 7, 8
- способы индукции высвобождения 80, 81\*
- структура иона 15
- увеличение концентрации в тромбоцитах, агенты 96
- универсальный триггер секреторного экзоцитоза 98
- физико-химические свойства 15
- циклическое перераспределение в сокращающейся клетке сердца 10
- Кальцийаккумулирующая органелла растений 107
- Кальцийаккумулирующие системы в аксоне 46
- Кальцийзависимые каналы 39, 43
- Кальцийкальмодулинзависимая протеникиназа, влияние на нейромедиаторы 101
- Кальцийкальмодулинзависимое фосфорилирование 94
- Кальцийсвязывающие белки, гомоло-

- гия первичной структуры 19
- — эволюция 19
- Кальцийсвязывающий белок из лейкоцитов 22
- витамин D-зависимый белок 19
- пептид кальциевой АТФазы саркоплазматического ретикулума 69\*
- Кальцийфосфатидилсеринзависимое фосфорилирование 94
- Кальцимедины 21
- Кальцимицин 23, 24\*
- Кальцинейрин 9
- Кальцифорин 45
- Кардиолипид 18
- кальциевый ионофор 26
- Каталаза 27
- Катехоламин, действие на внутриклеточные процессы 72
- Квин-2 23, 30, 32, 34\*, 35
- Комплексообразование, селективность 24, 25\*
- Координационное число 16
- Кофенин, воздействие на силу сокращения мышц 86
- рецептор 89
- Креатинфосфокиназа 71
- сопряжение с кальциевой АТФазой 72\*

Лантаниды 60, 68, 70

- Магниева (базальная) АТФаза 58
- Мембрана, барьерная функция 9
- искусственная бислойная (идеальная) 36
- Мессенджеры вторичные 5, 15, 16, 19
- — образование 12\*, 13
- — теория 9
- первичные 9
- Миозин 9
- киназы легких цепей 19
- Миоинозит 13
- Мурексид 29, 30

Насосы кальциевые 10  
 — — АТФзависимые 93  
 — — регуляция уровня кальция 14  
 — — саркоплазматического ретикулу-  
 ма 51  
 Нериста уравнение 29  
 Нитр-2 27, 28\*  
 Нитрендипин 40, 41\*  
 Нитроглицерин 111  
 Норадреналин, передача нервного им-  
 пульса 100  
 Na/Ca-обмен 19, 93  
 — механизм 43  
 — участие в электромеханическом со-  
 пряжении 79  
 Na, K-АТФаза, фосфорилированные  
 интермедиаты 62  
  
 Олигомицин, ингибирование энергоза-  
 висимой аккумуляции ионов мито-  
 хондриями 97  
 Оплодотворения механизм 102  
 Ортостатическая гипотония 108  
  
 Парвальбумин 9, 19, 21  
 — регуляция сокращения мышц 91  
 Перекисное окисление липидов, пере-  
 нос кальция 27  
 Потенциал действия, трансмембранное  
 распределение ионов 39  
 Пресинаптические рецепторы, регуля-  
 ция выделения нейромедиаторов  
 101  
 Проницаемость ионная мембраны 36  
 — — — избирательная 36, 38\*  
 — — — — кальциевая регуляция 38  
 — ряд биологический 37  
 Простагландины 13, 26  
 Простациклины, антитромбогенная  
 активность 94  
 Протеинкиназа С 10—12\*  
 Протеинкиназы, фосфорилирование  
 компонентов мембраны 89

Протеины I, II, III 21, 22

Реперфузия 109

Рианодин 89

Сапонины 19

Саркоплазматический ретикулум, гли-  
 когенолитический комплекс 53

— — мембраны 52, 54\*

— — — гипотеза об изменении элек-  
 трического потенциала 82

— — — строение 55, 56\*

— — определение общего количества  
 в мышечной ткани 78

— — основной фактор расслабления  
 мышц 80

— — свободный 52

— — соединительный 52

— — сопряжение гидролиза АТФ с  
 переносом кальция 59

— — фосфобелок 48

Сердечная недостаточность, терапев-  
 тические средства 109

Сердечные гликозиды 109

Сингипин 21

Синексин, участие в процессах экзоци-  
 тоза 99

Сокращение мышц, регуляция 86

Сопряжение электромеханическое 74,  
 79

— — механизм 91

Строфантин 109

Супероксиддисмутаза 27

Терминальные цистерны 52, 53\*, 57,  
 74

Тетраakis-(2-пиридилметил)этиленди-  
 амин 35

Триады, самосборка 58

— скелетных мышц 57

Трифторперазин 43, 104

- психотропное действие 104
- структура 20\*
- Тромбин 94
- Тромбоциты 94
- агрегация 94
- — роль факторов свертывания 97
- адгезия 94
- воздействие аспирина 95
- — диацилглицерина 96
- регуляция с помощью цАМФ 94
- Тропонин С 9, 19, 21
- Трубочки продольные 74
- Т-трубочки 52, 53\*, 57

Убаин 109

Фенотиазины 21

- взаимодействие с кальмодулином 108
- ингибирование ключевых ферментов 108
- Фибрин 94
- Флуоресценцизотиоцианат (ФИТЦ) 68
- Форболовые эфиры 11
- — рецептор 11
- Фосфатидилинозит 12\*—14\*
- Фосфатидилсерин 97
- взаимодействие с кальцием в процессе свертывания крови 97

- участие в процессах экзоцитоза 99
- Фосфатидилхолин 54
- Фосфатидная кислота 26
- — кальциевый ионофор 26
- Фосфодиэстераза, мишень для кальмодулина 108
- Фосфоинозитидный обмен в клетках 14\*
- Фосфокреатин 71
- Фосфоламбан 72, 73\*, 110
- Фосфолипаза D, стимуляция Na/Ca-обмена 19
- Фура-2 30, 32, 34\*, 35

Хлортетрациклин 30

Холинсодержащие липиды, локализация на мембране 18

Н-АТФаза тонопласта 107

Цитохром  $b_5$  54

Цитохром  $b_5$ -редуктаза 54

ЭГТА 18, 29

Экворин 30—32\*

Экзоцитоз 98

Эндоцитоз 98

---

# Оглавление

---

Предисловие . . . . .	5
Введение . . . . .	7
Глава 1. Кальций как универсальный регулятор внутриклеточных процессов . . . . .	8
1.1. Распределение кальция в организме и клетках . . . . .	8
1.2. Барьерная функция плазматических мембран . . . . .	9
1.3. Теория «вторичного мессенджера» . . . . .	9
Глава 2. Физико-химические свойства кальция . . . . .	15
2.1. Структура иона кальция . . . . .	15
2.2. Связывание $\text{Ca}^{2+}$ и других катионов с различными лигандами . . . . .	17
Глава 3. Ионофоры и индикаторы ионов кальция . . . . .	23
3.1. Антибиотик A23187 и другие переносчики $\text{Ca}^{2+}$ . . . . .	23
3.2. Методы регистрации изменений концентрации $\text{Ca}^{2+}$ в биологических экспериментах . . . . .	28
Глава 4. Кальциевые каналы и переносчики кальция через биомембраны . . . . .	36
4.1. Проницаемость мембран для кальция и других ионов . . . . .	36
4.2. Кальциевые и кальцийзависимые каналы . . . . .	39
4.3. Системы $\text{Na}/\text{Ca}$ -обмена в клеточных мембранах . . . . .	43
4.4. Транспорт $\text{Ca}^{2+}$ через митохондриальную мембрану . . . . .	45
4.5. Системы АТФ-зависимого выведения $\text{Ca}^{2+}$ из эритроцитов и мышечных клеток . . . . .	47
Глава 5. Кальциевый насос мембран саркоплазматического ретикулума . . . . .	51
5.1. Структура и состав мембран саркоплазматического ретикулума . . . . .	52
5.2. Кинетические схемы сопряжения гидролиза АТФ с переносом $\text{Ca}^{2+}$ в мембранах саркоплазматического ретикулума . . . . .	59
5.3. Структура $\text{Ca}$ -АТФазы саркоплазматического ретикулума . . . . .	62
5.4. Регуляция системы переноса $\text{Ca}^{2+}$ через мембрану саркоплазматического ретикулума . . . . .	71
Глава 6. Кальций и электромеханическое сопряжение мышц . . . . .	74
6.1. Общая схема электромеханического сопряжения . . . . .	74
6.2. Количественная оценка $\text{Ca}$ -транспортирующих систем сердца и скелетных мышц . . . . .	75
6.3. Механизмы выброса $\text{Ca}^{2+}$ из внутриклеточных резервуаров . . . . .	80



<b>Глава 7. Кальциевая регуляция функциональной активности клеток . .</b>	<b>93</b>
7.1. Коагуляция крови и тромбогенез . . . . .	93
7.2. Экзоцитоз, секреция и движение клеток . . . . .	97
7.3. Проведение нервного импульса . . . . .	100
7.4. Оплодотворение и развитие . . . . .	102
7.5. Перенос $\text{Ca}^{2+}$ через мембраны простейших, бактерий и клеток растений . . . . .	104
7.6. Участие ионов кальция в патогенезе клеток и тканей . . . .	108
<b>Заключение . . . . .</b>	<b>112</b>
<b>Рекомендуемая литература . . . . .</b>	<b>117</b>
<b>Предметный указатель . . . . .</b>	<b>118</b>

*Учебное издание*

**Левицкий Дмитрий Олегович**

**КАЛЬЦИЙ И БИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕМБРАНЫ**

**Редактор А. С. Орлова**

**Младшие редакторы Е. В. Бурова, Е. И. Попова**

**Художник В. Н. Хомяков**

**Художественный редактор Т. А. Коленкова**

**Технический редактор Г. А. Виноградова**

**Корректор С. К. Завьялова**

**ИБ № 8587**

Изд. № Е-584. Сдано в набор 13.10.89. Подп. в печать 26.07.90 Т—12609.  
Формат 60×88<sup>1/16</sup>. Бум. офс. № 2. Гарнитура литературная. Печать офсетная.  
Объем 7,84 усл. печ. л. 8,09. усл. кр.-отт. 7,50 уч.-изд. л.  
Тираж 6800 экз. Заказ № 348. Цена 25 коп.

Издательство «Вышая школа», 101430, Москва, ГСП, Неглинная ул., д. 29/14.

Московская типография № 8  
Государственного комитета СССР по печати.  
101898, Москва, Центр, Хохловский пер., 7.

**Биохимия мембран. Кн. 7. Кальций и биологические  
Б63 мембраны: Учеб. пособие / Д. О. Левицкий; Под ред.  
А. А. Болдырева. — М.: Высш. шк., 1990. — 124 с.: ил.  
ISBN 5-06-000466-X**

Книга продолжает серию, посвященную изложению современного состояния биохимии мембран. В ней даны представления о механизмах кальциевой регуляции разнообразных процессов клеток и роли биомембран и мембранных белков в изменении внутриклеточной концентрации  $Ca^{2+}$ . Рассмотрены данные о структуре биомембран, биоорганической химии ионов, организации  $Ca$ -транспортирующих систем мембран и методических подходах к анализу распределения  $Ca^{2+}$  в клетках. Особое внимание уделено описанию структуры и свойств кальцийзависимых АТФаз.

**Б** 1903010000(4309000000)—464 20—90  
001(01)—90

**ББК 28.05  
57.04**

Издательство «Высшая школа» с 1986 г. выпускает серию учебных пособий «Биохимия мембран» под редакцией проф. А. А. Болдырева. Издано шесть книг:

*А. А. Болдырев. Введение в биохимию мембран (1986)*

Это первое в отечественной литературе систематизированное изложение проблем биомембранологии, включающее основные сведения о строении биомембран животных, растительных и бактериальных клеток, функционировании мембранных ферментов и способах их регуляции. Особое внимание уделено анализу принципов контроля активности мембранных олигомерных белков, обеспечиваемого со стороны их липидного окружения.

*Р. Н. Глебов. Эндоцитоз и экзоцитоз (1987)*

Книга посвящена изложению современных представлений о молекулярных механизмах эндоцитоза (захвата макромолекул и частиц внутрь клеток) и экзоцитоза (выброса веществ из клеток); описаны механизмы сопряжения возбуждения и секреции, слипания и слияния мембран, рециклизации мембран и их компонентов и т. д. В пособии учтены последние достижения биологии и медицины.

*А. М. Белоус, Е. А. Гордиенко, Л. Ф. Розанов.  
Замораживание и криопротекция (1987)*

В пособии изложены основные понятия и современные данные о влиянии пониженных (до 0°C) и низких (до 196°C) температур на мембранные структуры различного уровня организации. Описаны факторы, влияющие на структурно-функциональную целостность мембран, механизмы термального шока. Подробно рассмотрены способы и технические средства замораживания и криопротекции мембранных структур, их отогрева после замораживания. Приведены методики замораживания — отогрева различных мембранных структур, включая субклеточные органеллы и клетки в связи с их консервацией и длительным хранением.

**А. Я. Кульберг. Рецепторы клеточных мембран (1987)**

В книге впервые в отечественной литературе систематически изложены современные сведения о строении, биосинтезе и функциях рецепторов клеток эукариот, их значение для биологии клетки и многоклеточных организмов. Рассмотрены общие принципы организации рецепторов, строение их активных центров, структурные основы эффекторных функций. Приведены данные о молекулярной генетике рецепторов и регуляции процессов их биосинтеза и катаболизма. Освещены новые направления в изучении роли рецепторов в поддержании постоянства внутренней среды клетки, их участии в регуляции и биосинтезе белка.

**З. П. Кометиани, М. Г. Векуа. Кинетика мембранных транспортных ферментов (1988)**

В книге изложено современное состояние биохимии мембран. В ней в обобщенном виде освещается теория стационарной кинетики сложных ферментных систем и метод анализа формы кривых, включая статистическую обработку экспериментальных данных. Большое внимание уделено особенностям кинетики активного транспорта, определению минимальных моделей и регуляторных механизмов транспортных ферментов.

**В. П. Скулачев. Биоэнергетика. Мембранные преобразователи энергии (1989)**

В книге рассмотрено соотношение протонного потенциала и АТФ. Даны представления о белках-генераторах протонного потенциала: дыхательных ферментах, бактериородопсине и ферментах фотосинтетических редокс-цепей. Описаны проблемы механизма действия  $H^+$ -АТФ-синтазы и пространственной организации мембранной энергетики клетки. Приведены новейшие данные по «натриевой энергетике» бактерий. Рассмотрены эволюционный и регуляторный аспекты мембранной энергетики.

Предлагаемая книга Д. О. Левицкого — седьмая.

В ближайшее время готовятся к изданию:

**Б. А. Ташмухамедов, П. Б. Усманов. Нейротоксины в исследовании биологических мембран (1991).**

**Р. В. Петров, Р. И. Атауллаханов. Клеточные мембраны и иммунитет (1991).**



# БИОХИМИЯ МЕМБРАН

Книга продолжает серию учебных пособий по современным проблемам биохимии мембран и дает основные представления о кальциевой регуляции клеточных процессов.

