

УДК: 577.12:577.112:577.24

**ВКЛАД КОМПЛЕКСА Ca^{2+} /КАЛЬМОДУЛИН В ПЕРЕДАЧУ СИГНАЛА
О МЕХАНИЧЕСКОМ НАПРЯЖЕНИИ В СОЕДИНИТЕЛЬНОЙ ТКАНИ**
Ю.Г.Кот

Харьковский национальный университет имени В.Н.Каразина (Харьков, Украина)

Изучена возможность конкретной связи между активностью комплекса Ca^{2+} /кальмодулин, интенсивностью синтеза коллагена и степенью его поперечного связывания. Для выяснения характера этой связи исследовали синтез коллагена при «выключенном» состоянии комплекса Ca^{2+} /кальмодулин, а также в условиях повышения количества активных комплексов Ca^{2+} /кальмодулин. Проведенные исследования однозначно указывают на существование обратнопропорциональной зависимости между числом активных комплексов Ca^{2+} /кальмодулин и индукцией синтеза коллагена в коже крыс.

Ключевые слова: Ca^{2+} /кальмодулин, коллаген, механическое напряжение, хлорпромазин, ЭГТА.

Введение

Способность фибробластов к усиленному синтезу коллагена, в ответ на механическое напряжение, показана в довольно большом количестве работ (Taraes, 1968; Sundberg, Rubin, 1996; Гарбузенко, 1997). Цепь переноса сигнала о механическом напряжении в соединительной ткани от места его приложения к синтетическому аппарату клетки состоит из вне- и внутриклеточных участков, каждый из которых содержит ряд взаимодействующих молекулярных звеньев. Однако окончательной модели пути реализации такой ответной реакции к настоящему времени нет. Известно, что одним из звеньев регуляции синтеза белка является кальмодулин. Это кальций-зависимый регуляторный белок, молекула которого содержит четыре участка связывания Ca^{2+} . Связывание Ca^{2+} по всем четырем участкам ведет к изменению конформации белка. Эти конформационные переходы определяют способность кальмодулина, а точнее комплекса Ca^{2+} /кальмодулин, активировать или инактивировать определенные ферменты, а также оказывать регуляторное влияние на функционирование многих структурных элементов в клетке (Scharff, 1981; Deldham, 1982). Конечным пунктом такой регуляторной активности кальмодулина является активация или инактивация транскрипционных факторов, и как следствие, индукция или ингибирование синтеза белка в клетке. Однако определенно не выяснено, играет ли комплекс Ca^{2+} /кальмодулин «классическую» роль регулятора белкового синтеза в цепи передачи сигнала о механическом напряжении на белоксинтезирующий аппарат клетки. Необходимо заметить, что работы, указывающие на такую роль Ca^{2+} /кальмодулин в реализации ответной реакции соединительной ткани на механическое напряжение существуют (Means, 1982; Komuro, 1994), однако данных, отображающих конкретную связь между активностью этого комплекса и стадиями обмена коллагена, в настоящее время недостаточно. В данной работе представлены результаты изучения возможного участия комплекса Ca^{2+} /кальмодулин на синтез и степень поперечного связывания коллагена кожи крыс *in vitro*.

Материалы и методы

Исследования были проведены на коже 3-месячных крыс линии Вистар. Образцы дермы размером 20 мм x 5 мм инкубировали в растворе Рингера-Кребса, содержащего ^3H -пролин с радиоактивностью 0,4 мБк/мл в течение 6 часов при 37°C (Замараева, 1977; Martens, 1989). После инкубации образцов коллаген I типа экстрагировали из кожи раствором 1М NaCl (Лебедев, 1978). Концентрацию коллагена в образцах рассчитывали по содержанию в них оксипролина (Stegemann, 1967). Интенсивность синтеза коллагена оценивали по удельной радиоактивности ^3H -оксипролина в нем. Количество коллагена, экстрагированного с использованием 1М NaCl, обратно пропорционально степени его поперечного связывания (Никитин, 1977; Гарбузенко, 1997). Для выяснения связи между активностью комплекса Ca^{2+} /кальмодулин и интенсивностью синтеза коллагена использовали CaCl_2 , а также антикальмодулиновые агенты - хлорпромазин и этиленгликольтриамин (ЭГТА) до конечных концентраций 0,1мМ, 5мМ, 1,5 мМ соответственно (Swierenga, 1981; Шаповалов, 1995). Хлорпромазин, в использованной нами концентрации, свободно проникает в клетки, где блокирует участки связывания Ca^{2+} в кальмодулине (Klee, 1980). Другой агент – ЭГТА, в выбранной нами концентрации, полностью связывает весь кальций межклеточного пространства. В результате возникающего концентрационного градиента Ca^{2+} часть ионов Ca^{2+} покидает клетку (Шаповалов, 1995). Использование указанных агентов позволило нам изучить характер синтеза коллагена при «выключенном» комплексе Ca^{2+} /кальмодулин. В таком случае, естественно, большой интерес также

представляло бы изучение синтеза коллагена при увеличении активности комплексов Ca^{2+} /кальмодулин. Для достижения такой цели образцы дермы инкубировали в гиперкальциевой среде для создания которой и был использован CaCl_2 (Means, 1982; Stockbridge, 1988). Известно, что в клеточной мембране кроме энергозависимых кальциевых каналов, существуют и каналы, сквозь которые ионы кальция проходят в результате пассивной диффузии (Broun, 1989; Левицкий, 1997). В гиперкальциевой среде концентрация Ca^{2+} в межклеточном пространстве превышает его внутриклеточную концентрацию. Поэтому в результате концентрационного градиента часть этих ионов проникает в клетки, благодаря чему внутриклеточная концентрация кальция резко повышается. В результате этого должно увеличиваться количество активных комплексов Ca^{2+} /кальмодулин.

Полученные результаты обрабатывали статистически (Иванов, 1990).

Результаты и обсуждение

Показано, что добавление в инкубационную среду хлорпромазина приводит к достоверному увеличению удельной радиоактивности ^3H -оксипролина в свежесинтезированном коллагене кожи крыс. При использовании ЭГТА в исследуемой ткани также наблюдается интенсификация синтеза коллагена (Табл.1).

Таблица 1.

Влияние хлорпромазина, ЭГТА и Ca^{2+} на удельную радиоактивность ^3H -оксипролина в свежесинтезированном коллагене кожи крыс после инкубации

	имп./мин./мг коллагена $\times 10^3$
Контроль	18 ± 1.1
Хлорпромазин	23 ± 1.4
ЭГТА	21 ± 1.2
Ca^{2+}	15 ± 1.6

Как видно из табл.2, внесение в инкубационную среду как хлорпромазина, так и ЭГТА, приводит к значительному увеличению концентрации коллагена в коже крыс после инкубации. При инкубации ткани в гиперкальциевой среде концентрация коллагена заметно снижается. Так как концентрация коллагена в ткани является результатом взаимоотношения его синтеза и распада, полученный результат может указывать на то, что интенсивность распада коллагена под влиянием хлорпромазина и ЭГТА остается в пределах нормы, что и приводит к изменению концентрации, совпадающему с изменением синтеза. Таким образом, комплекс Ca^{2+} /кальмодулин, по-видимому, не влияет на процесс деградации коллагена.

Таблица 2.

Влияние хлорпромазина, ЭГТА и Ca^{2+} на концентрацию коллагена кожи крыс после инкубации

	мг коллагена/100 мг сухой ткани
Контроль	57 ± 7.2
Хлорпромазин	75 ± 6.4
ЭГТА	70 ± 5.1
Ca^{2+}	39 ± 4.3

Ни хлорпромазин, ни гиперкальциевая среда не оказывают влияния на растворимость коллагена после инкубации (табл.3). Однако внесение в среду инкубации ЭГТА резко (в 2 раза) увеличивает растворимость коллагена кожи крыс. Такое действие ЭГТА может быть объяснено тем, что ионы кальция образуют координационные связи в коллагене, а также являются инициатором образования поперечных ковалентных связей между коллагеновыми и неколлагеновыми белками в межклеточном матриксе (Sears, Morrow, 1986). Связывая ионы Ca^{2+} внеклеточного пространства, ЭГТА тем самым способствует уменьшению количества таких связей, и, соответственно, дестабилизации структуры коллагена.

Проведенные исследования однозначно указывают на однонаправленное действие хлорпромазина и ЭГТА, заключающееся в повышении синтеза коллагена, в то время как избыток ионов кальция действует в направлении его снижения. Полученные результаты позволяют говорить о существовании обратнопропорциональной зависимости между числом активных комплексов Ca^{2+} /кальмодулин и индукцией синтеза коллагена в коже крыс. Полученные нами результаты в полной мере согласуются с данными ранних исследователей (Гарбузенко, 1997; Кузьмис, 2001), и

Таблица 3.

Влияние хлорпромазина, ЭГТА и Ca²⁺ на растворимость коллагена кожи крыс после инкубации

	Свежесинт. коллаген/ общий коллаген
Контроль	2.1 ± 0.1
Хлорпромазин	2.0 ± 0.05
ЭГТА	4.8 ± 0.5
Ca ²⁺	2.3 ± 0.6

могут служить подтверждением выдвинутого ими предположения того, что именно выявленная зависимость лежит в основе интенсификации синтеза коллагена при действии механического напряжения. Подтверждение высказанному предположению прослеживается и в литературе. Показано (Meldolesi, 1987; Stockbridge, 1988; Petrov, 1994), что в результате действия механического напряжения, возникающая деформация соединительной ткани, а, следовательно, находящихся в ней фибробластов, вызывает открытие дополнительных пор в их мембране. При этом в межклеточное пространство выходит часть Ca²⁺, а их внутриклеточная концентрация снижается. В результате происходит уменьшение числа активных комплексов Ca²⁺/кальмодулин. В свою очередь, снижение числа активных комплексов Ca²⁺/кальмодулин, по-видимому, приводит к изменению степени полимеризации белков цитоскелета, структуры «стрессового волокна» и, соответственно, всей структурно-функциональной связи между компонентами цепи передачи сигнала от межклеточного матрикса к ядру (Akiyama, Nagata, 1990). Поэтому можно предположить, что механическое напряжение вызывает изменения структурно-функциональных свойств «стрессового волокна», связанных с инактивацией комплексов Ca²⁺/кальмодулин.

Список литературы

- Гарбузенко О.Б., Емец Е.Б., Перский Е.Э. Влияние деформации на обмен белков и механические свойства аорты и кожи крыс *in vitro* // Вестн. пробл. биол. и мед. – 1997. – №25. – С. 19-26.
- Замараева Т.В. Современные методы в биохимии. – М.: Медицина, 1977. – С. 265-270.
- Иванов Ю.И., Погорелюк О.Н. Статистическая обработка результатов медико-биологических исследований на микрокалькуляторах по программам. – М.: Медицина, 1990. – 224с.
- Кузьмис А.Э., Гарбузенко О.Б. и др. Влияние Ca²⁺ и хлорпромазина на синтез и процессинг коллагена в коже и аорте крыс *in vitro* // Биол. вестник Харьковского национального университета. – 2001. – Вып.5, № 1-2. – С. 100-102.
- Лебедев Д.А. Методы изучения обмена коллагена в коже человека // Вопросы мед. химии. – 1978. – №5. – С. 708-712.
- Левицкий Д.О. Кальций и биологические мембраны. – М.: Высшая школа. –1997. – 127с.
- Никитин В.Н., Перский Е.Э., Утевская Л.А. Возрастная и эволюционная биохимия коллагеновых структур. – К.: Наук. думка. – 1977. – 279с.
- Шаповалов А.М., Шуба М.Ф., Шаповалова М. В. и др. Неактомиозиновый компонент термоиндуцированного сокращения сосудистой стенки при гипертензии // Бюл. эксп. биол и мед. – 1995. – Т.119, №1. – С. 345-347.
- Akiyama S.K., Nagata K., Yamada K. Cell surface receptors for extracellular matrix components // Biochim. Biophys. Acta. – 1990. – Vol.1031. – P. 91-110.
- Broun A.M., Docherty R.J., McFadzean J. Calcium channels in vertebrate neurons // Ann.N.Y.Acad.Sci.-1989. – Vol.560. – P. 358-372.
- Deldham S.B. Calmodulin: its role in calcium-mediated cellular regulation // Mineral Electolyte Metlab. – 1982. – Vol.8. – P. 1-10.
- Klee C.B. Crouch T.H., Richman P.G. Calmodulin // Ann. Rev. Biochem. – 1980. – Vol.49. – P. 485-515.
- Komuro I., Yarak Y. Intercellular signaling pathways in cardiomyocytes induced by mechanical stress // Trends Cardiovasc. Med. – 1994. – Vol.4. – P. 117-121.
- Martens M., Hendriks T. Collagen synthesis in explants from rat intestine // Biochem. Biophys. Acta., Gen. Subj. – 1989. – Vol.993, № 2-3. – P. 250-252.
- Means A.R., Tash J.S., Chafouleas G.S. et al. Regulation of the cytoskeleton by Ca²⁺/calmodulin and cAMP // Ann. N.Y.Acad. Sci. Part II. Endosytosis and cytoskeleton. – 1982. – Vol.383. – P. 69-77.
- Meldolesi J., Pozzan T. Pathways of calcium influx at the plasma membrane: voltage-, receptor-, and second messenger -operated channels // Exp.Cell.Res. – 1987. – Vol.171. – P. 271-283.
- Petrov A.G., Usherwood P.N. Mechanosensitivity of cell membranes // Eur. J. Physiol. – 1994. – Vol.23. – P. 1-19.
- Sears B.W., Morrow J.S., Marchest V.T. A calmodulin and alpha subunit binding domain in human erythrocyte spectrin // Biochim.Biophys.Acta. – 1986. – Vol.870. – P. 432-442.

- Scharff O. Calmodulin and its role in cellular activation // Cell Calcium. - 1981. - Vol.2. - P. 1-8.
- Stegemann H., Stalder K. Determination of hydroxiprolin // Clin. Chem. Acta. - 1967. - Vol.18, №2. - P. 267-273.
- Stockbridge L.L., French A.S., Stretch-activated cation channels in human fibroblasts // Biophys. J. - 1988. - Vol.54. - P. 187-190.
- Sundberg G., Rubin K. Stimulation of beta I integrins on fibroblasts induced PDGF independent tyrosine phosphorylation of PDGF beta receptors // J.Cell.Bioll. - 1996. - Vol.12. - P. 1681-1692.
- Swierenga S. H., Goette R., Macream N. Changes in cell surface morphology, fibronectinmatrix formation and cytoskeleton organization of normal and tumorigenic rat liver cell in low calcium medium // Proc. Fed. Biol. Soc. - 1981. - Vol.19. - P. 254-257.
- Taraes J., Verzar F. Macromolecular aging of collagen III. Stimulation of collagen production in skin and uterus // Gerantologia. - 1968. - Vol.14, №2. - P. 126-132.

**ВНЕСОК КОМПЛЕКСУ Ca^{2+} /КАЛЬМОДУЛІН У ПЕРЕДАЧУ СИГНАЛУ ПРО МЕХАНІЧНЕ
НАПРУЖЕННЯ У СПОЛУЧНІЙ ТКАНИНІ**
Ю.Г.Кот

Вивчена можливість конкретного зв'язку між активністю комплексу Ca^{2+} /кальмодулін, інтенсивністю синтезу колагену та рівнем його поперечного зв'язування. Для визначення характеру цього зв'язку досліджували синтез колагену при „вимкненому” стані комплексу Ca^{2+} /кальмодулін, а також в умовах підвищення кількості активних комплексів Ca^{2+} /кальмодулін. Проведені дослідження вказують на існування зворотно-пропорційного зв'язку між кількістю активних комплексів Ca^{2+} /кальмодулін й індукцією синтезу колагену в шкірі щурів.

Ключові слова: Ca^{2+} /кальмодулін, колаген, механічне напруження, хлорпромазін, EGTA.

**ROLE OF COMPLEX Ca^{2+} /CALMODULIN IN SIGNAL TRANSDUCTION ABOUT MECHANICAL
STRESS-STRAIN INTO CONNECTIVE TISSUES**
Yu.G.Kot

The investigation of chlorpromazine, EGTA and Ca^{2+} influence on collagen synthesis, concentration and level of collagen cross-linking in skin of 3-month rats in vitro has been done. It was obtained that the in noncalcium environment and in the presence of chlorpromazine the increasing of collagen synthesis occurs. In the hypercalcium environment the decreasing of collagen synthesis occurs. At the incubation with EGTA the sharp increasing of collagen solubility was observed. All data point to the clear dependency between complex Ca^{2+} /calmodulin activity and collagen synthesis.

Keywords: Ca^{2+} /calmodulin, collagen, mechanical stress-strain, chlorpromazine, EGTA.

Представлено Ф.С.Леонтієвою
Рекомендовано до друку В.А.Бондаренко