

ELEKTROFORETSKO ISPITIVANJE TRANSPORTA KALCIJA U PLAZMI

V. JOVANOVIĆ i I. ŠIMONVIĆ

*Institut za medicinska istraživanja i medicinu rada
Jugoslavenske akademije znanosti i umjetnosti, Zagreb*

(Prilježeno 19. V 1967)

Elektroforetskim metodama ispitivana je uloga proteina plazme u transportu kalcija. Plazma je bila 12 sati inkubirana s radioaktivnim kalcijem kod 37° C. Elektroforeza označene plazme vršena je u barbituratnom mediju, diskontinuiranom i kontinuiranom tehnikom. Metodom ultrafiltracije određivana je količina radioaktivnog kalcija vezanog na proteine plazme.

Diskontinuiranom elektroforezom vršena je separacija radioaktivnog kalcija u plazmi, ultrafiltratu i ugušćenoj plazmi koja zaostaje nakon ultrafiltracije. Elektroforeza je rađena uz jakost polja od 7 V/cm u vremenu od 2 sata, tako da se na elektroforetskoj traci nalazi i zona kalcija koja odgovara ionskom kalciju. U proteinskoj zoni zaostaje znatno manje kalcija nego što odgovara proteinski vezanom kalciju dobivenom metodom ultrafiltracije. Kontinuiranom elektroforetskom tehnikom dobiveni su slični rezultati.

U ovom radu primijenili smo i jednu modifikaciju metode za ispitivanje transporta kalcija na proteinima plazme. U toku kontinuirane elektroforeze u barbituratnom mediju putovala je, naime, preko separiranih zona proteina zona kalcija-45.

U određenim uvjetima ispitivanja pokazalo se da u transportu kalcija mogu sudjelovati albumini, beta i gama globulini.

Kalcij u krvi nalazi se u tri različita kemijska oblika: u ionskom obliku (Ca^{++}), vezan u komplekse i vezan na proteine. Čini se da je samo ionski kalcij fiziološki aktivan. Danas se za određivanje pojedinih frakcija kalcija koriste ove separacione metode:

- a) ultrafiltracija
- b) ultracentrifugiranje
- c) dijaliza
- d) elektroforeza

Ultrafiltracijom se određuje frakcija kalcija (Ca-difuzibilni) koja nije vezana na proteine i zato prolazi kroz polupropusne membrane. Difuzibilni kalcij sadrži ionski kalcij i Ca-komplekse. Ultrafiltracija je danas

najraširenija metoda, a naročito modifikacija koju je dao *Toribara* (16). Ta metoda zahtijeva konstantne radne uvjete s obzirom na temperaturu, a pH plazme i ultrafiltrata treba održavati u fiziološkim granicama. To se postiže radom u atmosferi 5% CO₂. *Toribara* i suradnici (15) našli su da je 70% kalcija ultrafiltrabilno kod 25 °C i 65% kod 37 °C. Kasnije je *Walser* (17) primijenio metalindikatorske boje (EBT i mureksid) za spektrofotometrijsko određivanje ionskog kalcija u ultrafiltratu. Isti autor (18) našao je, ispitujući plazmu normalnih osoba, 47,5% kalcija kao Ca⁺⁺, 46% vezanog na proteine, a ostatak od 6,5% je u obliku kompleksa.

U usporedbi s ultrafiltracionom metodom relativno je u literaturi opisano malo radova u kojima se navodi određivanje difuzibilnog kalcija pomoću ultracentrifuge. Jednostavnost ultrafiltracije i mogućnost istovremenog rada s više uzoraka prednosti su ultrafiltracije pred radom s ultracentrifugom. Rezultati za difuzibilni kalcij u skladu su s podacima dobivenim ultrafiltracijom. *Loken* i suradnici (7) našli su pomoću ultracentrifuge da se vrijednosti za difuzibilni kalcij kod normalnih ispitanika kreću u granicama od 49,7% do 57,8%.

Dijaliza se relativno malo upotrebljava za određivanje difuzibilnog kalcija. Postoji nekoliko radova (2, 3, 6) s tehnikom ravnotežne dijalize, u kojima su autori ispitivali kapacitet izoliranih serumskih proteina za vezivanje kalcija. *Martin* i *Perkins* (8) pokazali su da vezanje kalcija na albumin varira ovisno o metodi preparacije.

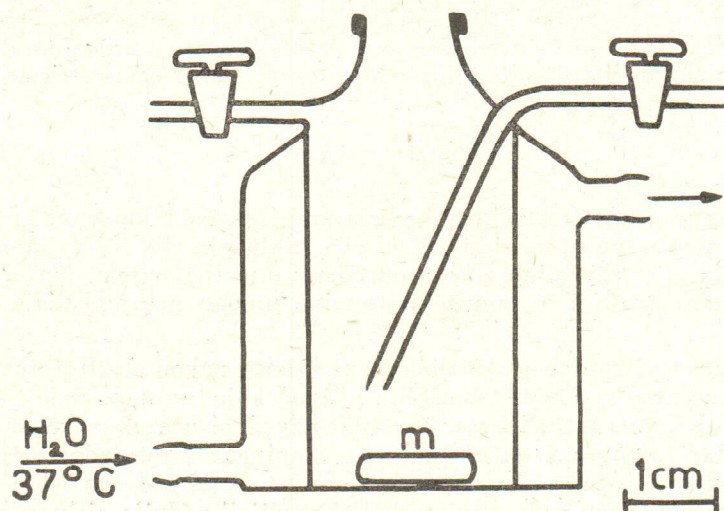
Elektroforeza se ne primjenjuje za određivanje difuzibilnog kalcija, ali ta metoda može dati odgovor na to koji proteini plazme sudjeluju kod transporta kalcija ili, drugim riječima, na koje je proteine plazme kalcij vezan. Podaci iz literature o kalciju koji je vezan na proteine ljudske plazme nisu potpuni i ne podudaraju se. Tako se npr. većina autora slaže da je kalcij vezan na albumine i globuline, no ne postoji slaganje u kvantitativnom odnosu. *Rawson* i *Sunderman* (13) navode da albumini i globulini vežu podjednako kalcij 0,84 mg Ca/g proteina. *McLean* i *Hastings* (9) navode da je odnos kalcija vezanog na albumine prema kalciju vezanom na globuline 1,7 i, konačno, *Neuman* i *Neuman* (11) navode odnos 3,8. *Johnson* i suradnici (5) našli su kontinuiranom elektroforetskom tehnikom da prealbuminska frakcija veže kalcij mnogo jače od albumina. U pogledu globulinskih frakcija koje sudjeluju kod transporta kalcija u plazmi, situacija je također nejasna. Prema *Buchsu* (1) kalcij je vezan na alfa i gama globuline, a po *Guerinu* (4) na beta globuline. Ta su određivanja rađena papirnom elektroforezom u barbituratnom mediju.

Iz navedenog prikaza je očigledno da o transportu kalcija na proteinima plazme postoje različiti podaci i različita mišljenja. U ovom radu pokušali smo utvrditi da li se u određenim eksperimentalnim uvjetima mogu pomoću elektroforeze razjasniti neka pitanja o transportu kalcija na proteinima plazme.

U prvoj fazi ispitivali smo elektromigrafiju kalcija vezanog na proteine plazme. Kako bismo izbjegli poteškoće kemijskog određivanja odnosa količina kalcija na pojedinim proteinskim frakcijama, plazmu smo prethodno inkubirali s radioaktivnim kalcijem. Plazmu je trebalo označiti »in vitro« zbog premale specifične aktivnosti humane plazme označene »in vivo«. Elektroforetska ispitivanja smo odlučili provesti u barbituratnom puferu pH 8,6, jer je to standardni pufer za proteinske separacije.

METODE RADA

Krv je uzimana od zdravih osoba i pri tom smo nastojali da ne dolazi do izlaženja CO_2 , čuvanjem krvi i plazme pod parafinskim uljem. Plazmu smo stavljali u posudicu za inkubaciju s radioaktivnim kalcijem (sl. 1). Obično smo inkubirali 5 ml plazme sa $150 \mu\text{C}$ Ca-45 ili $100 \mu\text{C}$



Sl. 1. Shema posude za inkubiranje proteina plazme s radioaktivnim kalcijem.
m: magnetski mješač

Ca-47. Ukupna količina dodanog stabilnog kalcija iznosila je pri tom 0,5 mg, tako da je koncentracija kalcija u inkubiranoj plazmi iznosila oko 20 mg⁰/_o.

Ultrafiltracija je rađena kao što je opisano kod Samachsona i Lederera (14). Za određivanje vezanog radioaktivnog kalcija mjerili smo aktivitet plazme i aktivitet ultrafiltrata.

Kontinuirana elektroforeza rađena je u aparaturi po Pučaru (12) uz barbituratni pufer pH 8,6. Ionska jakost pufera i ostali uvjeti dani su

uz svaku pojedinu sliku separacije. Izgled proteinskih frakcija separiranih kontinuiranom elektroforezom dan je na sl. 2. Uz navedene uvjete lipoproteini putuju u području albumina i beta globulina.

Diskontinuirana papirna elektroforeza rađena je uz jakost električnog polja od 7 V/cm u vremenu od 2 sata, kako bi na elektroforetskoj traci ostala i zona kationski pokretljivog kalcija. Mjesto aplikacije uzorka bilo je na anionskoj strani trake, tako da je migracija proteina bila pod značajnim utjecajem elektrolitnog toka. Diskontinuirana i kontinuirana elektroforeza rađena je na papiru Munktel 20/150.

S obzirom na to što smo kod elektroforetske separacije proteina u svim puferskim sistemima našli da sav radioaktivni kalcij migrira u jednoj zoni s kationskom pokretljivošću, u sve sisteme dodavali smo kalcij. Količina dodanog kalcija navedena je uz svaku sliku separacije.

Radioaktivnost na elektroforetskim trakama lokalizirana je autoradiografski i »scanningom«. Aktivnost kalcija 45 mjerena je GM brojačem za tekuće uzorke tvrtke »20 Century Electronic« u volumenu od 10 ml. Kalcij 47 i skandij 47 određivan je u »well« brojaču s kristalom 2"×2" Nuclear Chicago i amplitudnim analizatorom 132-B od iste firme.

REZULTATI

Diskontinuirane elektroforetske separacije plazme inkubirane sa Ca-47 i Ca-45 prikazane su na sl. 3 i 4. U oba je slučaja oko 50% radioaktivnosti bilo ultrafiltrabilno, što je određeno ultrafiltracijom. Na elektroforeogramu zaostaje u području proteina mnogo manje kalcija, 10% (sl. 3).

Na slici 4 prikazana je distribucija aktivnosti nakon elektroforeze plazme inkubirane sa Ca-45, ugušćene plazme koja zaostaje nakon ultrafiltracije i samog ultrafiltrata. Za svaki navedeni uzorak prikazan je na slici elektroforeogram, koji je nakon »scanninga« i autoradiografije bio raspolovljen i jedna polovica obojena na proteine, a druga na lipoproteine. Uz navedene radne uvjete kalcij se dijeli u dvije elektroforetske zone kod rada s plazmom i ugušćenom plazmom. Kod separacije ultrafiltrata postoji samo jedna zona kalcija. Zona kalcija u kojoj se nalazi pretežno sav kalcij (90%) migrira s kationskom pokretljivošću. Tačnijom usporedbom autoradiografije i lipidograma može se vidjeti da oblik zacrnjenja na autoradiogramu odgovara obliku lipoproteinske mrlje.

Rezultati kontinuirane elektroforetske separacije plazme inkubirane s radioaktivnim kalcijem prikazani su na sl. 5 i 6. Sl. 5 prikazuje autoradiogram kontinuirane elektroforetske separacije, gdje je plazma inkubirana sa Ca-47. Otopina je sadržavala i veće aktivnosti Sc-47. Na taj smo način mogli ispitati elektroforetsko ponašanje Ca-47 i Sc-47. Na slici 5 se vidi da Ca-47 ima pretežno kationsku pokretljivost, dok je

mali dio vezan na albumin i beta globuline. U tim uvjetima Sc-47 ima anionsku pokretljivost i također je vezan na albumin i beta globuline. Autoradiogram inkubirane plazme sa Ca-45 prikazan je na slici 6.

Kod obje kontinuirane elektroforetske separacije plazme inkubirane s radioaktivnim kalcijem mali dio aktivnosti migrira u području albumina i beta globulina. U tim proteinskim zonama uz naše uvjete separacije migriraju i lipoproteini.

Kod obje separacije kationska je zona prekinuta u katodnom području. To je posljedica povišenog pH (oko 12) u tom području.

Osim toga, sposobnost pojedinih proteina za transport kalcija u barbituratnom mediju ispitivali smo kontinuiranom elektroforezom, tako da je zona Ca-45 putovala preko kontinuirano separiranih zona proteina (sl. 7). Nakon autoradiografije isjekli smo papir na kojem je rađena kontinuirana elektroforetska separacija, tako da je obuhvaćena zona putovanja Ca-45. »Scanningom« te trake vidi se na kojem mjestu dolazi do povećanja Ca-45 i prema tome se može odrediti i proteinski nosač (sl. 8).

DISKUSIJA I ZAKLJUČAK

Metodom ultrafiltracije nakon inkubiranja radioaktivnog kalcija s proteinima plazme dobili smo oko 50% radioaktivnosti na proteinima. Kod elektroforeze migrira značajno manje kalcija u proteinskom području.

Mi smo u preliminarnim eksperimentima potvrdili neka prijašnja zapažanja (10) da sav kalcij iz proteinskih zona migrira u jednoj kationskoj zoni ako u elektroforetskom pufer-sistemu nema kalcija. Takvo ponašanje je posljedica reverzibilne reakcije između proteina plazme i kalcija. To se može prikazati izrazom:

$$K = \frac{(\text{Ca}^{++}) (\text{prot.})}{(\text{Ca prot.})} \quad (1)$$

Gornja jednadžba može se prikazati i izrazom:

$$(\text{Ca prot.}) = \frac{(\text{Ca}^{++})}{K} (\text{prot.}) \quad (2)$$

Iz jednadžbe (2) možemo zaključiti da će se sav kalcijev proteinat disocirati u toku elektroforeze, ako u pufer-sistemu nema dodanog kalcija. Ako je kalcij dodan u pufer-sistem, koncentracija kalcijeva proteinata bit će proporcionalna koncentraciji proteina. S obzirom na to što kod elektroforeze dolazi do smanjenja koncentracije proteina, doći će i do smanjenja koncentracije kalcijeva proteinata. Na taj bi se način

moglo tumačiti zašto kod elektroforeze ugušćene plazme zaostaje više kalcija u proteinskoj zoni u usporedbi s elektroforezom same plazme (sl. 4).

Pri radu sa Ca-47 u barbituratnom mediju koji sadrži 7 mg⁰/₀ Ca, u proteinskom dijelu elektroforetske trake našli smo tek oko 10⁰/₀ kalcija. Kontinuiranom elektroforezom pokazali smo da je kalcij u barbituratnom mediju vezan na albumin i beta globuline (sl. 5 i 6). S obzirom na to što i lipoproteini putuju u tim uvjetima separacije u albuminskom i beta globulinskom području, to bi moglo značiti da je kalcij vezan na lipoproteine.

Migracija Ca-45 preko kontinuirano separiranih proteinskih zona pokazuje da albuminska i gama globulinska frakcija vežu kalcij. Te rezultate moglo bi se pokušati protumačiti tako da se kod migracije kalcija preko separiranih zona proteina pokazuju samo oni proteinski nosači koji su u stanju brzo uspostavljati ravnotežu s kalcijem. Kad je plazma prethodno inkubirana s kalcijem, pokazuju se nosači koji »čvršće« vežu kalcij. Prema tome bi gama globulini i albumini bili sposobni za brze ravnoteže, a beta globulini (ili lipoproteini) vezivali bi kalcij »čvršće«.

Što se tiče transporta na proteinima, čini se da sudjeluju albumin, beta i gama globulini. S obzirom na specifičnosti pojedinih metoda pomoću kojih su razni autori (1, 4, 5, 13) nastojali riješiti pitanje transporta kalcija na proteinima i s obzirom na kompleksnost samog pitanja, teško je kritički ocijeniti podatke pojedinih autora.

Ovim radom nije rasvijetljena uloga lipoproteina kod transporta kalcija.

Literatura

1. Buchs, J.: These - Université de Genève, 1963.
2. Carr, C. W.: Arch. Biochem., 46 (1953) 424.
3. Carr, C. W.: Proc. Soc. Biol. Med., 89 (1955) 546.
4. Guerin, M. Th., Guerin, R. A.: Pathologie-Biologie, 13 (1965) 297.
5. Johnson, P. C., Smith, W. O., Wolf, B.: J. Appl. Physiol., 14 (1959) 859.
6. Katz, S., Klotz, I. M.: Arch. Biochem. Biophys., 44 (1953) 351.
7. Loken, H. F., Havel, R. J., Gordon, C. S., Whittington, S. L.: J. Biol. Chem., 235 (1960) 3654.
8. Martin, N. H., Perkins, D. J.: Biochem. J., 47 (1950) 323.
9. McLean, F., Hastings, A. B.: J. Biol. Chem., 107 (1934) 337.
10. Müller, E.: Naturwissenschaften, 40 (1953) 442.
11. Neuman, W. P., Neuman, M. W.: The Chemical Dynamics of Bone Mineral, Unif. of Chicago Press, Chicago, Illinois, 1958.
12. Pučar, Z.: Croat. Chem. Acta, 28 (1956) 195.
13. Rawson, A. J., Sunderman, F. W.: J. Clin. Invest., 27 (1948) 82.
14. Samachson, J., Lederer, H.: Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 98 (1958) 867.
15. Toribara, T. Y., Terepka, R., Dewey, P. A.: J. Clin. Invest., 36 (1957) 738.
16. Toribara, T. Y.: Anal. Chem., 25 (1959) 1286.
17. Walser, M.: Anal. Chem., 32 (1960) 711.
18. Walser, M.: J. Clin. Invest., 40 (1961) 723.

*Summary*ELECTROPHORETIC INVESTIGATION OF THE PLASMA
CALCIUM TRANSPORTATION

The role of plasma proteins in the calcium transportation was studied with electrophoretic methods. The plasma was 12 hours incubated with radioactive calcium at 37°C. Labelled plasma electrophoresis was carried out in the barbiturate medium with the aid of discontinual and continual technique. The amount of plasma protein bound radioactive calcium was determined by the method of ultrafiltration.

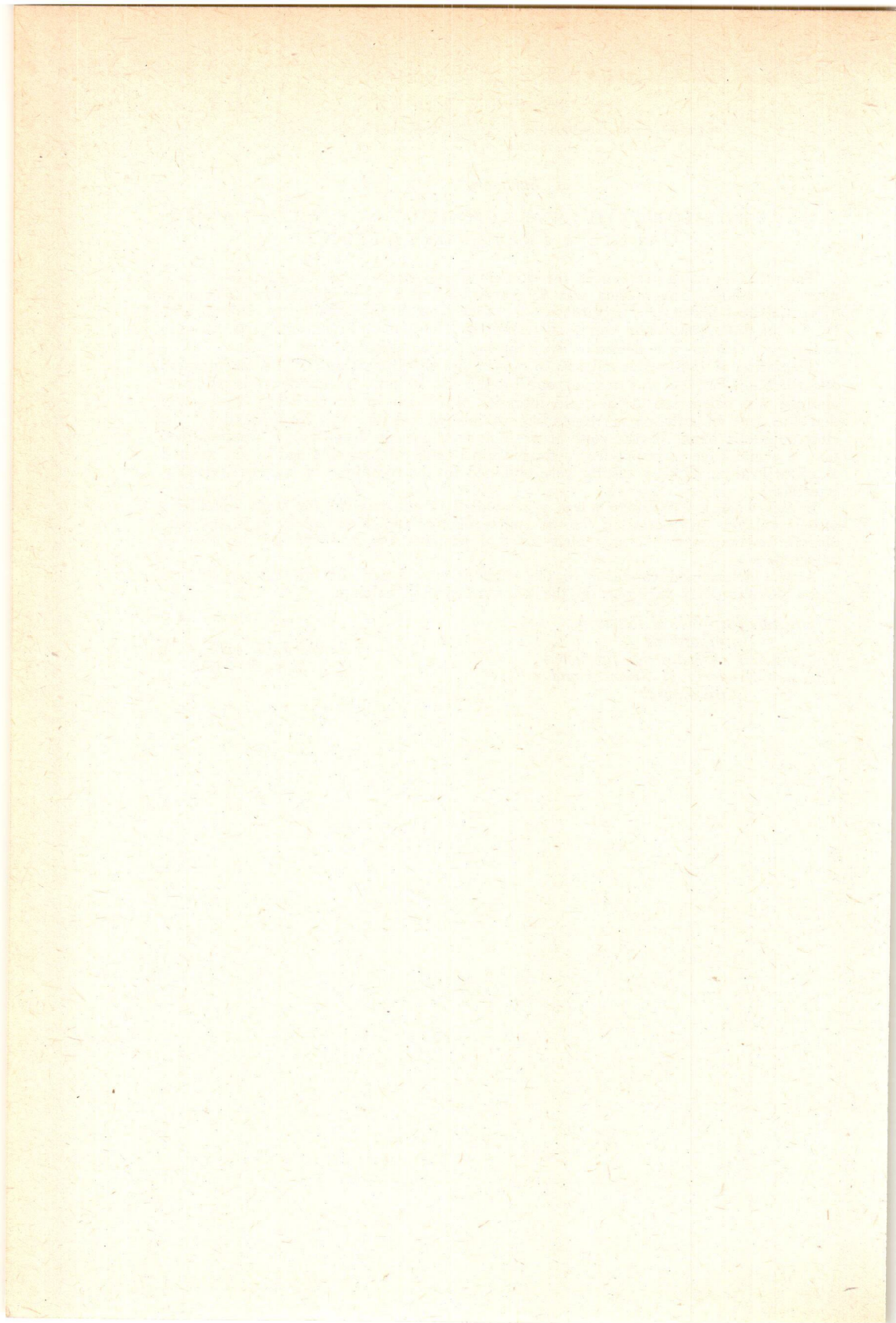
Separation of radioactive calcium in plasma, in ultrafiltrate and in the concentrated ultrafiltration residue was carried out by the discontinued electrophoresis. Electrophoresis was performed at the field intensity of 7 V/cm in the period of 2 hours so that the zone of calcium corresponding to ionized calcium was also found on the electrophoretic band. In the zone of proteins considerably less calcium was retained than it would have corresponded to the protein bound calcium obtained by the method of ultrafiltration. Similar results were obtained by the technique of continual electrophoresis.

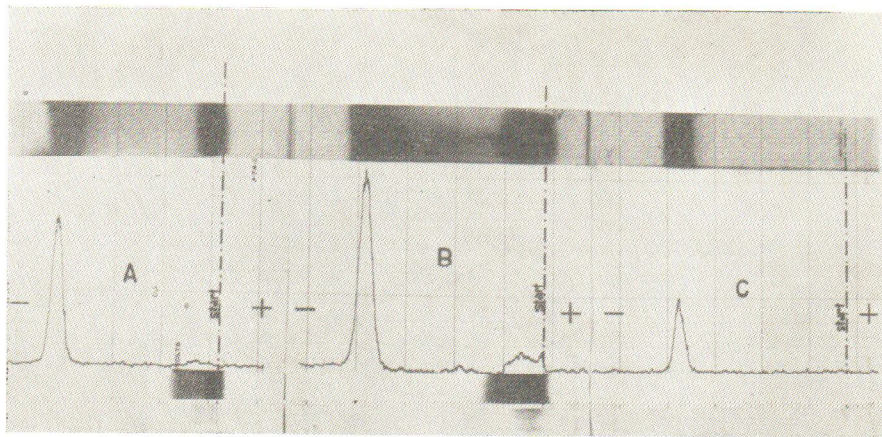
In this work a modification was also applied of the method for study of plasma protein calcium transportation. In the course of continual electrophoresis in the barbiturate medium over the separated zones of proteins has, namely, run the zone of calcium-45.

At the determined condition of the study it was shown that albumins, beta and gamma globulins may take part in the transportation of calcium.

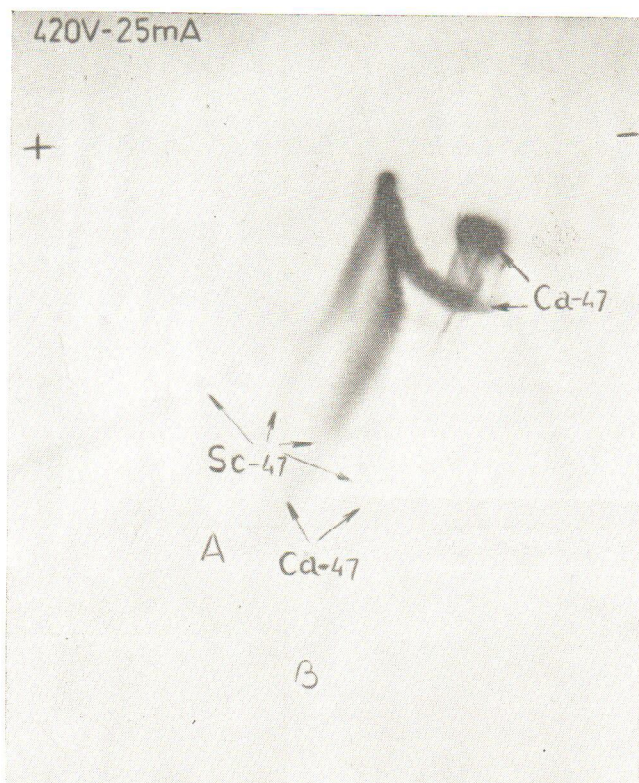
*Institute for Medical Research
incorporating
The Institute of Industrial Hygiene,
Yugoslav Academy of Sciences and
Arts, Zagreb*

*Received for publication
May 19, 1967*





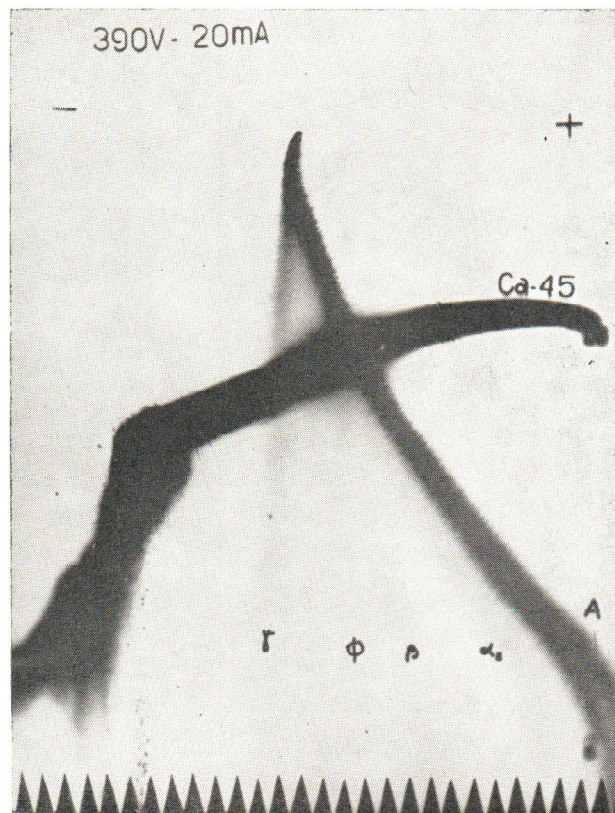
Sl. 4. Autoradiogram, elektroforeogram i »scanning« diskontinuirane elektroforetske separacije plazme inkubirane sa Ca-45. A) Plazma inkubirana sa Ca-45, B) Ultrafiltrat plazme pod A, C) Ugušćena plazma koja zaostaje nakon ultrafiltracije. Pufer: barbiturat pH 8,6; μ 0,05 + 7 mg‰ Ca



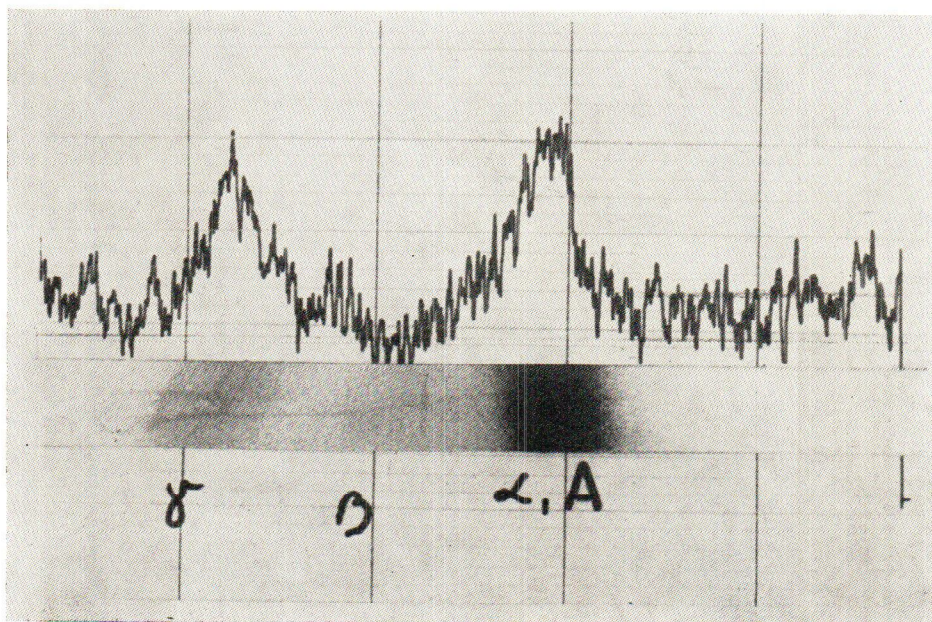
Sl. 5. Autoradiogram kontinuirane elektroforetske separacije plazme inkubirane sa Ca-47 i Sc-47. Pufer: barbiturat pH 8,6; μ 0,025 + 11 mg‰ Ca



Sl. 6. Autoradiogram kontinuirane elektroforetske separacije plazme inkubirane sa $Ca-45$. Pufer: barbiturat pH 8,6; μ : 0,025 + 7 mg⁰/_o Ca



Sl. 7. Autoradiogram i elektroforeogram kontinuirano separiranih proteina plazme preko kojih je migrirala zona kalcija-45. Pufer: barbiturat pH 8,6; μ : 0,025



Sl. 8. »Scanning« isječka elektroforetske zone proteina preko kojih je putovao Ca^{45}