

СТАН ІОНІВ КАЛІЮ, НАТРІЮ І КАЛЬЦІЮ В СУБКЛІТИННИХ СТРУКТУРАХ СКЕЛЕТНИХ М'ЯЗІВ

З. О. Сорокіна, Ю. Д. Холодова

Інститут фізіології ім. О. О. Богомольця АН УРСР, Київ

Нашими раніше проведеними дослідженнями в субклітинних фракціях скелетних м'язів були виявлені міцно утримувані іони, які не замінюються на іони середовища і не беруть участі в осмотичних процесах [14, 16].

Дане дослідження є далішим продовженням вивчення стану калію, натрію і кальцію в субклітинних структурах. Ми вивчали вплив на електролітний склад органоїдів ряду реагентів, як аніонні детергенти, відокремлювачі процесів окислення і фосфорилування, сполуки, що руйнують водневі зв'язки і утворюють хелати, та іони важких металів. Проведено визначення кількостей іонів, що вилучаються разом з білками, ліпідами, нуклеїновими кислотами й екстрагуються з ліофілізованих органоїдів абсолютними неполярними розчинниками з низькою діелектричною сталою. В ІЧ-спектрах, одержаних з метою ідентифікації імовірної структури зв'язку іонів в екстрактах, були виявлені смуги поглинання, характерні для істинних комплексів досліджуваних іонів.

Методика досліджень

Досліди провадились на скелетних м'язах жаб *Rana ridibunda* і *Rana temporaria*. Субклітинні фракції виділяли за методом, описаним нами раніше [15]. Всі операції по виготовленню гомогенату і його центрифугуванню, а також інкубації препаратів фракцій провадились при температурі 0,4°С. Як середовище для центрифугування й інкубації препаратів було взято 0,2 М розчин сахарози (рН 7,4). Дослідження стану іонів провадилося на фракціях міофібрил, ядер, двох фракціях мітохондрій, позначених умовно MXI і MXII, перша з яких становить власне мітохондрії, а друга є змішаною фракцією, в яку потрапляють поверхневі мітохондріальні мембрани, ендоплазматичний ретикулум і мікросоми. Мінералізація проб, висушених при 105°С до постійної ваги, провадилась концентрованою азотною кислотою. Вміст у фракціях неорганічних іонів визначали на полум'яному фотометрі. Концентрації іонів виражали в мг або мкєв/г сухої ваги фракції.

При дослідженні впливу на стан іонів у фракціях мембранних детергентів, відокремлювачів процесів окислення і фосфорилування, реагентів, що руйнують водневі зв'язки, та іонів важких металів готували розчини сахарози з відповідною концентрацією цих речовин. Після 30-хвилинної інкубації фракції осаджували центрифугуванням і промивали двічі бідистильованою водою.

Екстракція ліпідів провадилась сумішшю хлороформ-метиловий спирт у співвідношенні 2:1. Екстракції фракції струшували з сумішшю на протязі 30 хв, центрифугували, і процедура екстракції провадилась удруге. Екстракт упарювали, а органічний залишок озольали азотною кислотою.

Для осаджування білків до суспензії фракцій у розчині сахарози при 0°С додавали рівний об'єм 10%-ного розчину трихлороцтової кислоти (ТХА) або перегнаного ацетону. Через 30 хв суспензії центрифугували. Одержані осадки білка промивали центрифугуванням два рази відповідно льодяним 5%-ним розчином ТХА або ацетоном, а згодом ще два рази бідистильованою водою.

3 метою виділення ДНК оса, хлористого натрію. Після 10-хвилин осади промивали три рази бідистильовали на протязі 20 хв до утворення теїдів, а потім обробляли їх хлорцентрифугуванням, а до надосадої в осад, при перемішуванні намоту у воді й осаджували спиртом; при РНК до водних суспензій фракції випадали в осад, видаляли центрифугуванням, яка вміщує ДНК і чистили два об'єми спирту і через 10 хв двічі розчиненням у воді і переосади.

Екстракція неполярними абсолютами (гексан, бензол, хлористий вуглець) здійснювалась на колонці з сорбентом P_2O_5 . Екстракція проводилась за зміни розчинника видаляли осад, який залишався на колонці, нічний осад мінералізували нагріванням до кипіння, а потім застосовували спектрофотометр.

Резул

Вміст Na^+ , K^+ та Са в структурах. Концентрації фракції і в препаратах, які льодяному розчині сахарози значне зниження у всіх дослі-

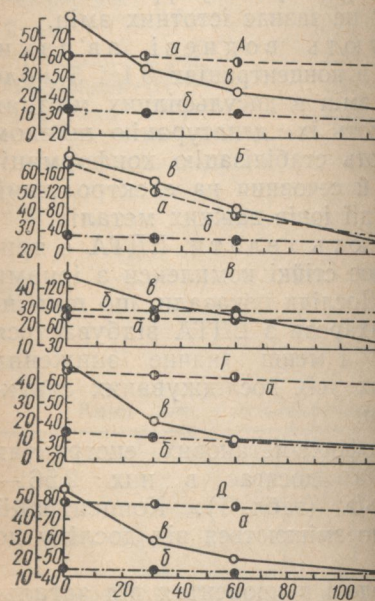


Рис. 1. Зміни електролітного складу субклітинних фракцій скелетних м'язів при інкубації в розчинах розп.

По вертикалі — вміст у препаратах у ммоль/г сухої ваги; зліва — концентрат натрію (а) і кальцію (б), справа — (в). По горизонталі — час у хв. А — митри, Б — ядра, В — мітохондрії I, Г — мітохондрії III, Д — мікросо-

З метою виділення ДНК осаді фракцій суспензували в ізотонічному розчині хлористого натрію. Після 10-хвилинної інкубації фракції центрифугували, а одержані осаді промивали три рази бідистильованою водою. Водні суспензії фракцій струшували на протязі 20 хв до утворення густого в'язкого розчину дезоксирибонуклеопро-теїдів, а потім обробляли їх хлороформом. Білки, що денатурували, осаджували центрифугуванням, а до надосадової рідини додавали спирт. ДНК, що випадала в осад, при перемішуванні намотувалась на скляну паличку. Її знов розчинювали у воді й осаджували спиртом; процес очистки повторювали двічі. При виділенні РНК до водних суспензій фракцій додавали рівну кількість фенолу. Білки, що випадали в осад, видаляли центрифугуванням. З надосадової рідини видаляли фенольну фазу, яка вміщує ДНК і частину розчинних білків. До водної фази додавали два об'єми спирту і через 10 хв центрифугували осад РНК. Осад промивали двічі розчиненням у воді і переосадженням спиртом.

Екстракція неполярними абсолютними розчинниками (бензол, ефір, чотирихлористий вуглець) здійснювалась на ліофілізованих препаратах. Розчинники спочатку перегоняли над P_2O_5 . Екстракція провадилась на шутель-апараті. Після триразової зміни розчинника видаляли осад, що не розчинявся, а розчинник відгоняли. Органічний осад мінералізували нагріванням з азотною кислотою. Для знімання ІЧ-спектрів застосовували спектрофотометр UR-10.

Результати досліджень

Вміст Na^+ , K^+ та Ca^{++} в ізольованих субклітинних структурах. Концентрації іонів у свіжоізольованих препаратах фракції і в препаратах, які зберігалися на протязі 30, 60 і 120 хв в льодяному розчині сахарози, наведено на рис. 1. Привертає увагу значне зниження у всіх досліджуваних структур концентрацій K^+ , а в

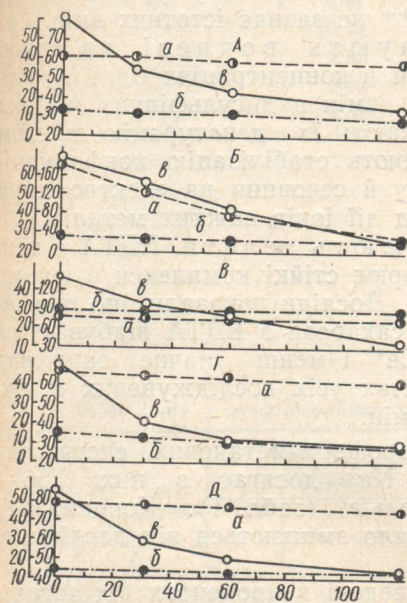


Рис. 1. Зміни електролітного складу субклітинних фракцій скелетних м'язів при інкубації в розчинах сахарози.

По вертикалі — вміст у препаратах іонів у ммоль/г сухої ваги; зліва — концентрації натрію (а) і кальцію (б), справа — калію (в). По горизонталі — час у хв. А — міофібрили, Б — ядра, В — мітохондрії I і II, Г — мітохондрії III, Д — мікосоми.

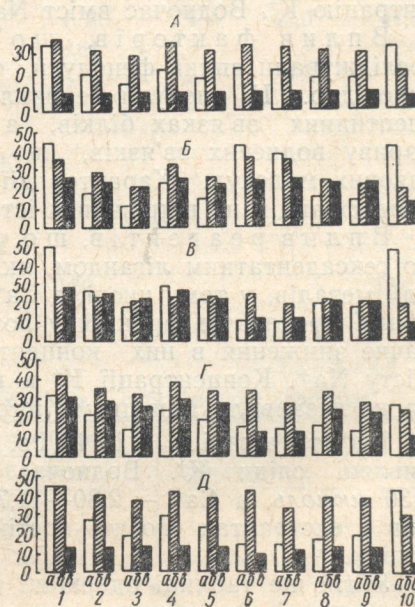


Рис. 2. Зміни електролітного складу субклітинних фракцій скелетних м'язів під дією різних впливів.

По вертикалі: вміст іонів у препаратах в ммоль/г сухої ваги. По горизонталі: 1 — контроль, 2 — $HgCl_2$ ($0.5 \cdot 10^{-4}$ моль), 3 — $HgCl_2$ ($1 \cdot 10^{-4}$ моль), 4 — $BaCl_2$ ($0.5 \cdot 10^{-3}$ моль), 5 — $BaCl_2$ ($1 \cdot 10^{-3}$ моль), 6 — ДНФ ($5 \cdot 10^{-4}$ моль), 7 — дезоксихолат (0.25%-ний розчин), 8 — фенол (0.1 моль), 9 — сечовина (5 моль) 10 — ЕДТА; а — К, б — Na, в — Ca. А — міофібрили, Б — ядра, В — мітохондрії I і II, Г — мітохондрії III, Д — мікосоми.

УДК 612.014

ЯЗІВ

нних фрак-
які не за-
нних проце-

стану ка-
чали вплив
онні deter-
ва, сполуки,
важких ме-
ється разом
ся з ліофі-
чинниками
з метою
тах, були
плексів до-

на tempora-
ше [15]. Всі
ож інкубація
для центри-
Н 7,4). До-
фракціях мі-
власне міто-
ві мітохонд-
вація проб,
азотною кис-
фотометрі.

детергентів,
інують вод-
відповідною
ували цент-

спрт у спів-
хв, центри-
али, а орга-

зи при 0°C
А) або пе-
осади білка
чином ТХА

ядрах також Na^+ . Проте, вміст Na^+ і Ca^{++} в міофібрилах, мітохондріях і мікросомах не зазнає істотних змін.

Дія відокремлюючих агентів мембранних детергентів. Згідно з літературними даними, відокремлюючі агенти викликають збільшення проникності поверхневої цитоплазматичної мембрани, а також мембран мітохондрій до ряду неорганічних іонів. В наших дослідах інкубація препаратів фракцій у розчині з 2:4 ДНФ (5×10^{-4} моль, рН 7,0) призводила до значного зменшення в них концентрації K^+ (рис. 2). Найбільш значні зміни вмісту K^+ спостерігались на фракціях мітохондрій і мікросом. 30-хвилинна інкубація цих препаратів приводила до виходу з них 75—83% K^+ . В дещо меншій мірі знижувалась концентрація Ca^{++} — на 30—60%. Проте, вміст Na^+ у препаратах всіх досліджуваних структур змінювався порівняно мало.

Як аніонний детергент нами було застосовано 0,25%-ний розчин дезоксихолату. Вплив його на електролітний склад міофібрил і ядер виявився аналогічним дії ДНФ. Щодо інших фракцій, то в них спостерігалось більш значне зниження концентрацій K^+ і Ca^{++} та зменшення вмісту Na^+ .

Вплив на електролітний склад фракцій солей важких металів. Солі важких металів викликають осадження білків внаслідок утворення комплексів з їх основними (найчастіш SH) групами, що спричиняється до зміни структури молекули білка. Як видно з даних, наведених на рис. 2, іони Hg^{++} і Ba^{++} в кінцевих концентраціях $0,5 \times 10^{-4}$ — $1,0 \times 10^{-3}$ моль значно зменшують у фракціях концентрацію K^+ . Водночас вміст Na^+ і Ca^{++} не зазнає істотних змін.

Вплив факторів, що руйнують водневі зв'язки. Досліджували вплив фенолу й сечовини в концентраціях 0,1 і 5 моль відповідно. Ці сполуки не викликають змін в дисульфідних містках і пептидних зв'язках білків, а викликають їх денатурацію шляхом розриву водневих зв'язків, що здійснюють стабілізацію конформації білкових молекул. Характер дії фенолу й сечовини на електролітний склад фракцій не відрізнявся істотно від дії іонів важких металів.

Вплив реагентів, що утворюють хелати. ЕДТА є три- або гексадентатним лігандом, який утворює стійкі комплекси з іонами ряду металів, у тому числі, з Ca^{++} і Na^+ . Досліди показали, що при інкубації препаратів фракцій у розчинах сахарози з ЕДТА відбувається значне зниження в них концентрації Ca^{++} і менш значне зниження вмісту Na^+ . Концентрації K^+ в препаратах усіх досліджуваних структур не зазнавали при цьому істотних змін.

Екстракція ліпідів. У хлороформ-метанових екстрактах виявлені сліди K^+ . Водночас вміст Na^+ досягає в них 2,56—28,30 мкмоль, а Ca^{++} — 2,80—11,70 мкмоль/г (табл. 1). Концентрації іонів в екстрактах досить постійні й мало змінюються від досліду до досліду.

У тій же таблиці одержані дані наведені в процентах від загальної кількості відповідного іона в зразках препаратів фракцій до екстракції. Як видно, найбільша кількість Na^+ і Ca^{++} , зв'язаних з ліпідами, міститься в мембранних структурах клітини, а саме, в мембранах мітохондрій й ендоплазматичного ретикулуму, а також в мікросомах, які являють собою уламки плазмолемі поверхневої клітинної мембрани.

Осадження білків. В білкових осадах виявлені значні кількості іонів Na^+ і Ca^{++} , які досягають 42—64% загального вмісту цих іонів у фракціях. Концентрація K^+ в білку порівняно незначна в мембранних фракціях. Так, у мікросомах вона становить 2,52—2,69 мкмоль,

Вміст неорганічних іонів у ліпідах

Фракція	Концентрація (мкмоль)
	K^+

А. Хлороформ

Міофібрили	Сліди
Ядра	Сліди
Мітохондрії I і II	Сліди
Мітохондрії III	Сліди
Мікросоми	Сліди

Б.

Міофібрили	6,39
Ядра	18,81
Мітохондрії I і II	2,88
Мітохондрії III	2,38
Мікросоми	2,69

В.

Міофібрили	6,31
Ядра	16,46
Мітохондрії I і II	2,88
Мітохондрії III	2,45
Мікросоми	2,52

Ядра

Ядра

Вміст іонів у ліофілізованих

Препарат	Розчинник	Концентрація	
		До екстракції	
		K^+	Na^+

<i>m. sartorius</i>	гептан	17,94	2,64
<i>m. sartorius</i>	бензол		
<i>m. sartorius</i>	ефір		
<i>m. sartorius</i>	CCl_4		
Міофібрили	гептан	2,68	0,77
Ядра	гептан	6,88	1,19
Мітохондрії I і II	гептан	5,36	0,57
Мітохондрії III	гептан	2,34	0,95
Мікросоми	гептан	3,43	1,17

Таблиця 1

Вміст неорганічних іонів у ліпідах і білках субклітинних фракцій скелетних м'язів

Фракція	Концентрація іонів у екстракті (мкмоль/г сухої ваги)			Вміст іонів в екстракті (% від загальної кількості)		
	K ⁺	Na ⁺	Ca ⁺⁺	K ⁺	Na ⁺	Ca ⁺⁺

А. Хлороформ-метанолові екстракти

Міофібрили	Сліди	2,56		6,4		
Ядра	Сліди	6,60	2,80	10,1	10,0	
Мітохондрії I і II	Сліди	12,80	5,60	51,2	20,0	
Мітохондрії III	Сліди	28,30	11,70	61,5	73,1	
Мікросоми	Сліди	25,20	9,60	51,4	80,0	

Б. Осад білка (ТХА)

Міофібрили	6,39	1,48	0,7	7,8	37,0	64,0
Ядра	18,81	2,77	1,31	9,6	42,0	44,0
Мітохондрії I і II	2,88			2,0		20,2
Мітохондрії III	2,38	1,65	0,56	3,4	36,0	16,6
Мікросоми	2,69			3,2		

В. Осад білка (ацетон)

Міофібрили	6,31	1,48		7,7	37,0	
Ядра	16,46	2,83	1,31	8,4	43,0	44,0
Мітохондрії I і II	2,88		0,61	2,0		22,0
Мітохондрії III	2,45	1,65		3,5	36,0	
Мікросоми	2,52			3,0		

Г. ДНК

Ядра		0,75			27,0	
------	--	------	--	--	------	--

Д. РНК

Ядра		0,50			18,4	
------	--	------	--	--	------	--

Таблиця 2

Вміст іонів у ліофілізованих препаратах м'язів і субклітинних структур

Препарат	Розчинник	Концентрація іонів в мг/г сухої ваги						Молярні відношення	
		До екстракції			Екстракт			До екстракції	Екстракт
		K ⁺	Na ⁺	Ca ⁺⁺	K ⁺	Na ⁺	Ca ⁺⁺	Na ⁺ /K ⁺ /Ca ⁺⁺	Na ⁺ /K ⁺ /Ca ⁺⁺
<i>m. sartorius</i>	гептан	17,94	2,64	0,89	0,41	0,44	0,23		1,8 : 1 : 0,55
<i>m. sartorius</i>	бензол				0,42	0,47	0,26	0,24 : 1 : 0,04	1,9 : 1 : 0,6
<i>m. sartorius</i>	ефір				0,46	0,52	0,29		1,9 : 1 : 0,6
<i>m. sartorius</i>	CCl ₄				0,39	0,46	0,24		2,0 : 1 : 0,6
Міофібрили	гептан	2,68	0,77	0,49	0	0,05	0,03		1,5 : 1 : 0,70
Ядра	гептан	6,88	1,19	0,98	0	0,11	0,09	—	—
Мітохондрії I і II	гептан	5,36	0,57	1,25	0,26	0,24	0,19	0,2 : 1 : 0,16	1,5 : 1 : 0,70
Мітохондрії III	гептан	2,34	0,95	0,74	0,44	0,57	0,40	0,6 : 1 : 0,21	2,1 : 1 : 0,9
Мікросоми	гептан	3,43	1,17	0,48	0,45	0,53	0,32	0,5 : 1 : 0,13	2,0 : 1 : 0,8

міофібриляр-
відповідно
кількість
(табл. 1).
В ДНК

ми роз-
в табл. 2.
м'язів і з
лілому м'язі
у формі,
різну екст-
ол, гептан,
гептаном.
м'язів і з
різняються
виявлено
внянні від-
бклітинних
на різниця.
олярне від-
сть — вісім
бклітинних
внаслідок
центрифу-

змісту Na^+
в. Очевид-
ду, в екст-
ані з ме-
зв'язані
неіонним

в екстрак-
тувались
жків були
до дослі-
окремих

м'язів, ек-
залишків.
ільки він
зрушення
утворю-
(+1), де
претації

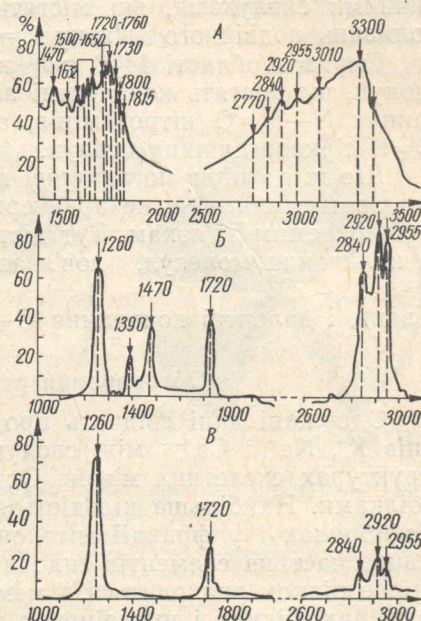
високоча-
770 cm^{-1}
70 cm^{-1} .
увалась
астотних
погли-
ш висо-
спектрах

екстрактів препаратів різних субклітинних структур не спостерігалось. Виняток становить лише фракція міофібрил, в якій відсутні смуги при 1390 і 1470 cm^{-1} та значно знижена інтенсивність піків триплету. Що ж до неекстрагованих залишків, то характер їх ІЧ-спектрів був таким же, як і у ліофілізованого м'яза. Знижувалася лише інтегральна інтенсивність усіх смуг поглинання.

Як приклад, на рис. 3 наведено ІЧ-спектри ліофілізованого м'яза, м'язового екстракту і екстракту з міофібрил. Цікаво відзначити, що після зберігання ліофілізованих препаратів на протязі кількох днів при температурі 0—4°С відсутні смуги при 1720 і 1260 cm^{-1} та дещо знижується інтенсивність піків при 1470 і 1380 cm^{-1} . Проте триплет залишається без змін.

Рис. 3. Інфрачервоні спектри ліофілізованого м'яза (А), м'язового екстракту в CCl_4 (Б) і екстракту з міофібрил у CCl_4 (В).

По вертикалі — % поглинання, по горизонталі — частота в cm^{-1} .



Одержані дані можна інтерпретувати так [3, 7, 9]. В області високих частот (2850—3400 cm^{-1}) знаходяться смуги, які відповідають коливанням груп, що містять легкий атом водню. Це групи C—H, O—H, N—H білків, поліпептидів і амінокислот. Коливання їх є переважно валентними. Найбільш високі частоти належать до групи N—H, яка бере участь в утворенні внутрімолекулярного водневого зв'язку. Крім того, піки поглинання валентних коливань N—H і O—H при 3300 і 3300—2500 cm^{-1} характеризують відповідно наявність координаційного зв'язку металів з аміногрупами і зв'язану групу OH карбонових кислот. Що ж до смуг при 2770—3010 cm^{-1} , то вони можуть відповідати валентним коливанням C—H і O—H при водневому зв'язку сполук хелатного типу, які виникають при координації металами аміногруп α -амінокислот.

Область 1720—1400 cm^{-1} відповідає коливанням сполук з подвійними зв'язками, C=C, C=O і C=N. Тут же розташовані смуги поглинання пептидних зв'язків білків — Амід I (1650 cm^{-1}), що відповідають валентним коливанням зв'язку C=O, і Амід II (1550 cm^{-1}), зумовлені деформаційними коливаннями зв'язку N—H і валентними коливаннями C—N зв'язку пептидних груп. Як, правило, найбільш інтенсивне коливання карбонільної групи C=O, що міститься у великій кількості органічних сполук, які є проміжними продуктами метаболічних процесів, або входять до складу більш складних внутріклітинних сполук. До них належать граничні аліфатичні альдегіди, циклічні й ациклічні кетони, карбонові кислоти, складні ефіри, амідні, α -амінокислоти і β -дикарбонові кислоти. Смука при 1720 cm^{-1} відноситься звичайно до вільної карбонільної групи. Проте, спектри солей містять сильні смуги

асиметричних валентних коливань COO^- при $1650\text{--}1510\text{ см}^{-1}$. В цьому ж інтервалі частот розташовані смуги поглинання координаційних сполук карбонільних лігандів з металами, що значно утруднює інтерпретацію одержаних спектрів. При утворенні хелатних кілець, а також подвійних зв'язків різного типу найбільш інтенсивне поглинання спостерігається в області $1900\text{--}1600\text{ см}^{-1}$. π -комплекс металів з неграничними сполуками, які містять сірку, виявляють частоти валентних коливань подвійного зв'язку $\text{C}=\text{C}$ при $1650\text{--}1500\text{ см}^{-1}$.

Смуга в області 1470 см^{-1} належить валентним коливанням $\text{N}=\text{O}$ сполук, що містять ковалентні азот-кисневі зв'язки, зокрема, в угрупованнях $\text{N}-\text{N}=\text{O}$ нітрозамінів, а також валентним коливанням $\text{S}=\text{O}$ і $\text{C}=\text{S}$ сіркоорганічних сполук.

Що ж до піків поглинання при $1400\text{--}1245\text{ см}^{-1}$, то в цій області, яка зветься областю нехарактеристичних частот, немає смуг, що належать окремим зв'язкам. Тут дістають відображення переважно скелетні коливання молекул, пов'язані з присутністю різних атомних угру-

повань, і валентні коливання $\text{C}-\text{O}$, $\text{C}-\text{N}$, $\text{N}-\text{O}$ і $\text{N}=\text{O}$.

Обговорення результатів досліджень

Одержані дані свідчать про те, що існує специфіка у розподілі іонів K^+ , Na^+ і Ca^{++} між сполуками, локалізованими в субклітинних структурах скелетних м'язів. Основна маса Na^+ зв'язана з ліпідами і білками. Найбільша кількість білкового Na^+ спостерігається в ядрах, міофібрилах і у фракції мітохондріальних мембран, в які потрапляє значна частина елементів ендоплазматичного ретикулулу. Ліпідний Na^+ майже цілком знаходиться в мембранних структурах; Ca^{++} виявляється в ліпідах, білках і нуклеїнових кислотах. Що ж до K^+ , то, на відміну від Na^+ і Ca^{++} , він розподілений, мабуть, більш рівномірно між різними внутріклітинними сполуками.

Зв'язок Na^+ і Ca^{++} з мембранами виявляється при гістохімічному дослідженні клітин [6, 8, 36, 48, 50]. Посередньо про це свідчать останні дані по вимірювання активності Na^+ катіон-селективними мікроелектродами [27].

Наявність Na^+ і K^+ у фосфоліпідах і ліпопротеїнах виявлена на клітинах мозку, нирок, деяких пухлин, калієвих еритроцитах [2, 13, 37, 38, 44, 49]. Можливість зв'язування Na^+ і Ca^{++} , а також K^+ білками виявлена останнім часом в цілому ряді праць [10, 23, 25, 26, 41, 47].

За даними проведеного дослідження була складена діаграма (рис. 4), на якій представлений розподіл K^+ , Na^+ і Ca^{++} між різними субклітинними структурами і сполуками, що входять до їх складу. Діаграма свідчить про те, що значна частина іонів знаходиться в м'язових волокнах у вільному стані. Дійсно, препарати субклітинних структур втрачають під час гомогенізації, центрифугування і при інкубації великі кількості іонів. Вміст у фракціях K^+ значно зменшується під впливом іонів важких металів, мембранних детергентів і агентів, які роз'єднують процеси дихання й фосфорилювання та руйнують водневі зв'язки. Ці впливи спричиняють порівняно невеликий ефект на вміст в органoїдах іонів Na^+ і Ca^{++} . Одержані дані дають підставу вважати, що основна маса K^+ і значні кількості Na^+ й Ca^{++} , які становлять відповідно 79 і 42%, утворюють іонні зв'язки з кислотними групами клітинних електролітів.

Проте, поряд з вільними іонами в м'язах є деяка кількість міцно утримуваних іонів, що дозволяє вважати, що в цьому випадку утворюються зв'язки ковалентного типу. Зв'язування іонів здійснюється

внутріклітинними органoїдами і лейнових кислотах.

Такого же роду дані були а також на мітохондріях ряду т

Цілком імовірно, що зв'яз нейтральними лігандами клітин тись двома шляхами: 1) утво в яких іон металу є складовою (тимчасовою) взаємодією іон

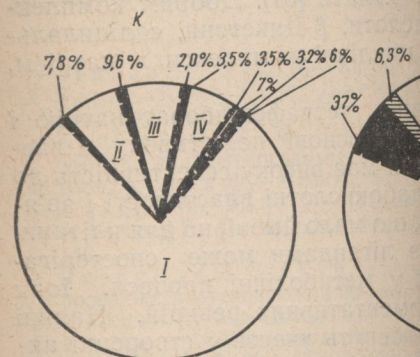


Рис. 4. Розподіл калію, натрію і кальцію між різними субклітинними структурами і сполуками, що входять до їх складу.

I — надосадова рідина, II — ядра, III — мітохондрії, IV — мікросоми. Чорний сектор — іони, зв'язані з ліпідами, вертикально заштрихований — з білками.

в комплексних сполуках друг не тільки ковалентного характ му стану між ковалентною та

Природа сил у молекуляр на, отже, інтерпретація їх мо властивостей, як дипольні мом спектри поглинання, спектри підставі проведеного дослідж чому ґрунтується міцне утрим даних дозволяє висловити дея

Наявність у клітині іонів, екстрагуються абсолютованим виявлення інтенсивних смуг по 3370 см^{-1} свідчить про те, що акцептором є іони Ca^{++} , Na^+ а що вони з'єднуються з ліган менти підгруп S, O, N або P, зв'язки можливі в нуклеїнови ними лігандами, що підтвер ДНК [17]. Ряд хелатних стру кислоти і β -дикарбонові кис мання їх структури. При його тощо, білок денатурує [35]. І, лих фосфоліпідів, які є осно неполярними розчинниками [

Природа натрієвих і, особ зовсім невідома. Мається на

внутріклітинними органоїдами і відбувається на білках, ліпідах і нуклеїнових кислотах.

Такого ж роду дані були одержані на ядрах тимуса і печінки, а також на мітохондріях ряду тканин [19, 28, 29, 33, 45].

Цілком імовірно, що зв'язування K^+ , Na^+ і Ca^{++} аніонними або нейтральними лігандами клітинних поліелектролітів може здійснюватись двома шляхами: 1) утворенням міцних, координаційних сполук, в яких іон металу є складовою частиною структури і 2) оборотною (тимчасовою) взаємодією іонів металів з лігандами. Можливо, що

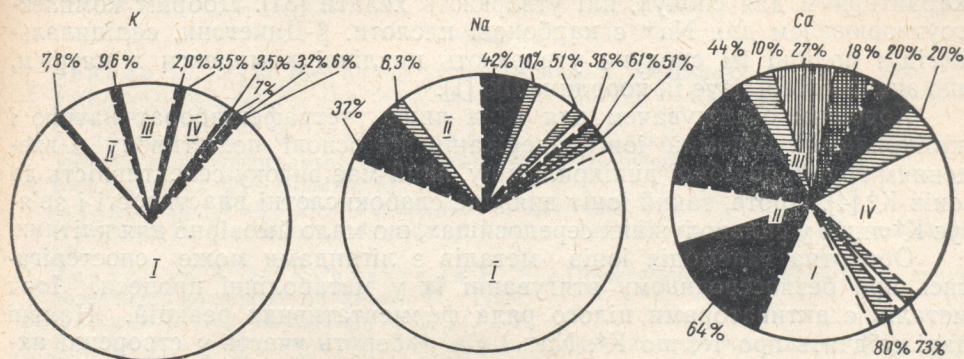


Рис. 4. Розподіл калію, натрію і кальцію між різними субклітинними структурами і сполуками, що входять до їх складу.

I — налосадова рідина, II — ядра, III — міофібрили, IV — мітохондрії I і II, V — мітохондрії III, VI — мікросоми. Чорний сектор — іони, зв'язані з білком, горизонтально заштрихований — іони, зв'язані з ліпідами, вертикально заштрихований — іони, зв'язані з ДНК, навхрест заштрихований — іони, зв'язані з РНК.

в комплексних сполуках другої групи взаємодія з металами набуває не тільки ковалентного характеру, але може відповідати й проміжному стану між ковалентною та іонною формами зв'язку.

Природа сил у молекулярних органічних комплексах дуже складна, отже, інтерпретація їх можлива лише за умов дослідження різних властивостей, як дипольні моменти, інфрачервоні й електронно-коливні спектри поглинання, спектри дифузійного відбиття й ЕПР. Тому на підставі проведеного дослідження поки ще важко судити про те, на чому ґрунтується міцне утримання іонів. Однак, сукупність наведених даних дозволяє висловити деякі міркування.

Наявність у клітині іонів, які осаджуються ТХА й ацетоном та екстрагуються абсолютними неполярними розчинниками, а також виявлення інтенсивних смуг поглинання в області 1600—1815 і 2770—3370 cm^{-1} свідчить про те, що можливі комплекси першої групи, у яких акцептором є іони Ca^{++} , Na^+ або K^+ . У відношенні іонів Ca^{++} відомо, що вони з'єднуються з лігандами, у яких донорними атомами є елементи підгруп S, O, N або P, утворюючи з ними хелати. Такого роду зв'язки можливі в нуклеїнових кислотах, які виявляються полідентатними лігандами, що підтверджується спектральними дослідженнями ДНК [17]. Ряд хелатних структур з Ca^{++} можуть утворювати α -амінокислоти і β -дикарбонові кислоти білків. Ca^{++} необхідний для підтримання їх структури. При його видаленні з допомогою ЕДТА, діалізом тощо, білок денатурує [35]. І, нарешті, Ca^{++} взаємодіє з лігандами кислот фосфоліпідів, які є основними компонентами, що екстрагуються неполярними розчинниками [12].

Природа натрієвих і, особливо, калієвих комплексів у протоплазмі зовсім невідома. Мається на увазі, що ці іони можуть зв'язуватись за

типом утворення водневих містків і хелатних зв'язків [20]. Наявність ІЧ-спектрах м'язів згаданих характерних смуг поглинання свідчить про те, що такі сполуки можливі. Відомо, що α -лактоглобулін і міозин м'язів зв'язують Na^+ . Константи асоціації таких сполук становлять 150—1600. Це доводить те, що білкові ліганди утворюють з Na^+ тетраедричні структури [22, 24, 39]. Зв'язування Na^+ спостерігається також у розчинах ряду метаболітів, як лактат, піруват, малат тощо. Найбільш сильна взаємодія спостерігається з кислотами, які містять гідроксильну або кетогрупу в α - і β -положенні по відношенню до гідроксилу, що характерним для сполук, які утворюють хелати [31]. Добрим комплексуювачем для Na^+ є карбонові кислоти. β -Дикетони, саліцилат, дегід і подібні їм сполуки утворюють циклічні комплекси з натрієм, що значно стабілізує їх координацію [1].

Хорошим осаджувачем для K^+ є лише тетрафенілборат натрію дипікриламін. Відомий іоніт, одержаний на основі полістиролу з введенням групи, подібної дипікриламіну, який має високу селективність до іонів K^+ [4]. Проте, такий іоніт виявляє слабокислотні властивості і зв'язує K^+ лише у сильнолужних середовищах, що мало ймовірно для клітин.

Оборотна взаємодія іонів металів з лігандами може спостерігатись при безпосередньому втягуванні їх у метаболічні процеси. Іони металів є активаторами цілого ряду ферментативних реакцій. Наявні дані свідчать про те, що K^+ , Na^+ і Ca^{++} беруть участь у створенні активного комплексу фермент-метал-субстрат, утвореного з вільних компонентів. Комплекси стабілізують певну конформацію ферменту, яка обумовлює його максимальну каталітичну активність.

В такого рода сполуках в клітинах повинна бути частина Na^+ , яка бере участь у процесах синтезу білка в ядрах, і Ca^{++} , що призводить до підвищення активності АТФази міозину, креатинфосфокінази, α -карбоксилази, оксалоацетатдекарбоксилази і ряду лужних фосфатаз. Можливе зв'язування і деякої кількості K^+ , оскільки активність ряду ферментів (фосфотрансацетилаза, ацетил-КоА-синтетаза, коацетокіназа, фосфофераза піровиноградної кислоти, фосфофруктокіназа й алдогодегідрогеназа) підвищується K^+ , проте пригнічується Na^+ [5, 21, 30].

Є підстави думати, що зв'язування іонів відбувається також при процесах їх активного переносу крізь мембрани клітин проти градієнта концентрації, оскільки він супроводжується ферментативним гідролізом АТФ, який послідовно активується Na^+ і K^+ . Дійсно, встановлено, що АТФ комплексується з іонами лужних металів [40, 43]. Крім того, в ряді досліджень [44, 46, 49] виявлена позитивна кореляція між інтенсивністю активного переносу Na^+ в клітинах сечового міхура щурів і в міокарді собак та кількістю Na^+ , зв'язаного з фосфоліпідами, екстрагованими з цих тканин ефіром.

Особливий інтерес становлять дані про те, що в клітинах є іони металів, розчинні в неполярних розчинниках і зв'язані з гідрофобними сполуками внутріклітинних структур. Йдеться про те, що останнім часом відкрито новий механізм утворення комплексів пептидними системами і нещодавно синтезованими циклічними поліефірами з іонами лужних металів. У макроциклічних депсипептидів і поліефірів вирішальне значення при комплексуванні мають іон-дипольні взаємодії катіона з просторово упорядкованою системою карбонілів амідних і (або) складно ефірних груп. Комплексоутворення спостерігається лише в ліпофільних середовищах та відсутнє у водних розчинах. Селективність взаємодії більшою мірою залежить від конформації сполук. Передбачається, що аналогічний тип зв'язування іонів має місце при процесах їх активного переносу через мембрани клітин, здійснюючись карбо-

нільними лігандами поліпептидного ланцюга білкових молекул [11, 34, 42].

Отже наведені експериментальні і літературні дані, як нам здається, досить переконливо показують, що в клітинах відбувається хімічне зв'язування деякої кількості K^+ , Na^+ і Ca^{++} певними поліелектролітами. Процеси зв'язування іонів відіграють значну роль у життєдіяльності клітини, беручи участь, з одного боку, у створенні стереохімічної конформації поліелектролітів, з другого — будучи інтегральною частиною ферментативних процесів і, зокрема, механізму активного переносу іонів.

Література

1. Бейлар Д., Буш Д.—Химия координационных соединений, М., ИЛ, 1960.
2. Бергельсон Л. Д., Дятловицкая Э. В., Красовский Э. В.—Биохимия, 1967, 32, 1128.
3. Большаков Г. Ф., Глебовская Е. А., Каплан З. Г.—Инфракрасные спектры и рентгенограммы гетероорганических соединений. «Химия», 1967.
4. Гельферих Ф.—Иониты, М., ИЛ, 1962.
5. Диксон М., Уэбб Э.—Ферменты, М., ИЛ, 1966.
6. Иванов В. П.—В сб.: Физиол. и биохим. беспозвоночных, Л., «Наука», 1968, 140.
7. Казинцына Л. А., Куплетская Н. Б.—Применение УФ, ИК и ЯМР спектроскопии в органической химии, М., 1968.
8. Койчев К. А.—Цитология, 1969, 11, 537.
9. Кросс А.—Введение в практич. инфракрасную спектроскопию, М., ИЛ., 1961.
10. Нестеров В. П.—Цитология, 1964, 6, 754.
11. Овчинников Ю. А.—Вестник АН СССР, 1969, 9, 49.
12. Скульский И. А.—Журн. общей биол., 1969, 30, 724.
13. Скульский И. А., Леонтьев В. Г., Буровина И. В.—Изв. АН СССР, 1968, 6, 831.
14. Сорокина З. А.—Цитология, 1970, 12, 1398.
15. Сорокина З. О., Холодова Ю. Д., Рожманова О. М., Безручко Н. П.—Физиол. журн. АН УРСР, 1968, 14, 412.
16. Сорокина З. А., Холодова Ю. Д.—Биофизика, 1970, 15, 844.
17. Терентьев А. П., Рухадзе Е. Г., Дунина В. В.—Природа, 1968, 12, 19.
18. Эндрюс Л., Кифер Р.—Молекулярные комплексы в органической химии, «Мир», 1967.
19. Amooore J.—Biochem. J., 1960, 76, 438.
20. Baker H., Saroff H.—Biochemistry, 1965, 4, 1670.
21. Bergeder H., Rinc H.—Naturwissenschaften, 1966, 5, 133.
22. Bjerrum J., Schwarzenbach G., Sillen L.—Stability constants, London, The chemical society, 1957.
23. Briggs F., Fleischman M.—J. gen. Physiol., 1965, 49, 131.
24. Carr C.—Arch. Biochem. Biophys., 1965, 62, 476.
25. Carvalcho A., Leo B.—J. gen. Physiol., 1967, 50, 1327.
26. Dancer P.—Pflügers Arch., 1970, 315, 198.
27. Dick D., McLaughlin S.—J. Physiol., 1969, 205, 61.
28. Gamble J.—J. Biol. Chem., 1957, 228, 955.
29. Gamble J.—Fed. Proc., 1963, 22, 213.
30. Glynn I.—J. Physiol., 1956, 134, 278.
31. Jahrdeitzky O., Wertz J.—The complexing of sodium ion with some common metabolites, L., 1956, 65, 569.
32. Judah J., Lean E., Ahmed K., Christie G.—BBA, 1965, 94, 441.
33. Itoh S., Schwartz J.—Amer. J. Physiol., 1957, 188, 490.
34. Izatt R., Rytting J., Nelson D., Haymore B., Christensen J.—Science, 1969, 164, 443.
35. Kasai M.—BBA, 1969, 172, 171.
36. Kaye G., Cole J.—Science, 1965, 150, 1167.
37. Koketsu K., Kitamura R., Tanaka R.—Amer. J. Physiol., 1964, 207, 509.
38. Kierschner L.—J. gen. Physiol., 1958, 42, 231.
39. Lewis M., Saroff H.—J. Amer. Chem. Soc., 1957, 79, 2112.
40. Melchior N.—J. Biol. Chem., 1954, 208, 615.
41. Nanninga L.—J. Physiol. Chem., 1957, 61, 1144.
42. Ohnishi M., Urry D.—Science, 1970, 188, 1091.
43. Smith R., Alberty R.—J. Amer. Chem. Soc., 1956, 78, 2376.
44. Solomon S., Vanatta J.—Proc. soc. exp. biol. med., 1966, 122, 1040.
45. Spector W.—Proc. Roy. Soc. B., 1953, 141, 268.

46. Susat R., Vanatta J.—Proc. Roy. Soc. Exp. Biol. Med., 1965, 119, 334.
47. Weber A., Herz R.—J. Biol. Chem., 1963, 238, 599.
48. Winegrad—J. gen. Physiol., 1968, 51, 65.
49. Vanatta J.—Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1966, 123, 954.
50. Zadunaisky J., Gennaro J., Bashirelahi J., Hilton M.—J. gen. Physiol., 1968, 51, 290.

Надійшла до редакції
2.XI 1971 р.

STATE OF POTASSIUM, SODIUM AND CALCIUM IONS IN SUBCELLULAR STRUCTURES OF SKELETAL MUSCLES

Z. A. Sorokina, Yu. D. Kholodova

The A. A. Bogomoletz Institute of Physiology, Academy of Sciences, Ukrainian SSR, Kiev

Summary

The quantity of ions isolated from subcellular organoids of skeletal muscles together with proteins, lipids and nucleic acids as well as of those extracted from lyophilized preparations by absolutized non-polar solvents with a low dielectric constant was determined. Specificity in ion distribution between compounds localized in subcellular organoids was found. The bulk of sodium is bound with lipids and proteins. Calcium is found in lipids, proteins and nucleic acids. As to potassium it might be distributed as distinct from sodium and calcium more uniformly between various intracellular compounds. In IR-spectra obtained with the purpose of identifying a probable structure of ion bonds in extracts absorption lines are found typical of true complexes of investigated ions.