

calcium sensi-
intrinsic defect
P. 749—761.
methasoline and
portal veins of

enteric resistan-
// Acta physiol.

ells hypertrophy
A.—1981.—78.—

tractile response
essels.—1980.—

tagonism of reom
hypertensive
cular adrenergic
Hypertension.—

ступила 25.08.86

МЫШЦ

с актомиози-
нная модель
Ф осуществ-
перестройки,
с участием
СПП акто-
ительно ос-
СПП акто-
мышечного

авт. [6]. Реак-
моль/л) АТФ и
П актомиозина
ую запись опти-
СП-4. Результа-
сти $\Delta D/D_0$, где
СПП, D — опти-
кривых опреде-
е D_∞ — оптиче-
достижения по-
нной температу-

вызывает за-
При введении
актомиозина

1988, т. 34, № 1

с $t_{1/2}$ около 1 мин (рис. 1, 2). Следует иметь в виду, что в растворе KCl (0,1 моль/л), в котором растворен актомиозин, следовые концентрации Mg^{2+} и Ca^{2+} составляют меньше $5 \cdot 10^{-7}$ моль/л [4]. При добавлении АТФ и Ca^{2+} (10^{-3} моль/л) происходит СПП такая же (рис. 1, 3), как в предыдущем случае. Поэтому можно предположить, что в растворе достаточно следовых концентраций Ca^{2+} для инициации ферментативной реакции и структурных изменений в актомиозиновом комплексе, чтобы происходила СПП актомиозина. В результате образуются ассоциаты значительных размеров («грубый преципитат»), которые через определенное время оседают на дно кюветы. Если при

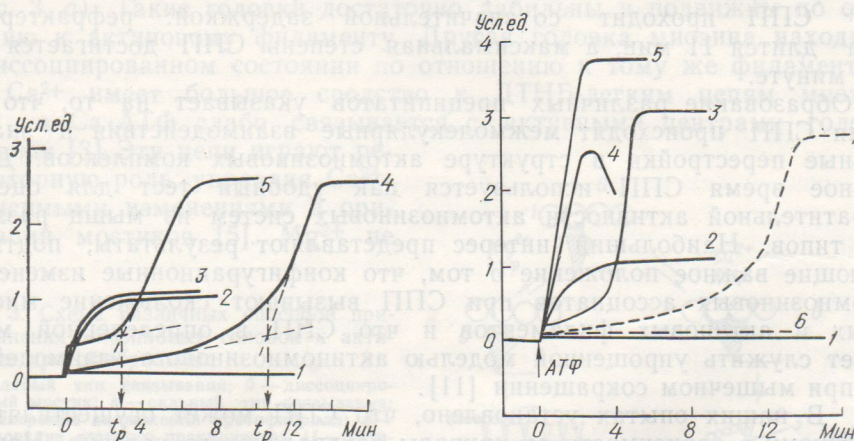


Рис. 1. Изменение во времени (мин) приведенной оптической плотности (усл. ед.) раствора актомиозина скелетных мышц кролика при добавлении АДФ (1), АТФ (2), АТФ и Ca^{2+} (3), Mg^{2+} (4), Ca^{2+} и Mg^{2+} (5).

Рис. 2. Изменение во времени (мин) приведенной оптической плотности (усл. ед.) раствора актомиозина скелетных мышц кролика при добавлении двухвалентных катионов (10^{-3} моль/л) при наличии ЭДТА (10^{-4} моль/л) и АТФ (10^{-4} моль/л): 1 — Mg, 2 — Ca, 3 — Mn, 4 — Sr, 5 — Ba, 6 — Mg и Ba, 7 — Mg и Sr.

наличии в растворе Ca^{2+} СПП происходит сравнительно быстро, то наличие актомиозина Mg^{2+} ($3 \cdot 10^{-4}$ моль/л) значительно замедляет этот процесс (рис. 1, 4). Продолжительное, но незначительное изменение оптической плотности без заметных преципитирующих структур мы назвали «рефрактерной фазой» в отличие от фазы быстрого увеличения СПП. Для более четкого разделения этих фаз мы производили графическую экстраполяцию линейных участков на кинетических кривых СПП (на рис. 1 показано пунктирными линиями). Видно, что длительность рефрактерной фазы t_r достигает 10,5 мин; фаза быстрого увеличения СПП актомиозина одинакова на кривых 2—4. При сравнении СПП с участием Ca^{2+} и Mg^{2+} можно отметить, что с Mg^{2+} степень СПП в 2,5 раза выше, чем с Ca^{2+} , причем при наличии Mg^{2+} образуется мелкодисперсный преципитат («тонкий преципитат»). При совместном действии Mg^{2+} и Ca^{2+} степень СПП не изменялось, но значительно укорачивалась рефрактерная фаза ($t_r = 3$ мин) (рис. 1, 5). В этом случае также образуется «тонкий преципитат».

Из представленных результатов отчетливо видно, что Ca^{2+} и Mg^{2+} оказывают противоположное действие на СПП актомиозина: Ca^{2+} ускоряет, а Mg^{2+} значительно замедляет этот процесс. При фиксированной концентрации Ca^{2+} (10^{-3} моль/л) наибольшее тормозящее влияние на СПП актомиозина оказывал Mg^{2+} в концентрации больше 10^{-3} моль/л. Полученные результаты хорошо согласуются с данными, представленными в других работах [8, 15, 16].

При наличии в растворе ЭДТА или ЭДТА двухвалентные катионы по-разному влияют на СПП актомиозина (рис. 2). Mg^{2+} не вызывал СПП актомиозина, Sr^{2+} и Ba^{2+} вызывали достаточно быструю СПП ($t_{1/2} = 1,5$ мин), степень СПП при этом в несколько раз выше таковой

при добавлении Ca^{2+} . Ионы марганца, подобно Mg^{2+} , вызывают СПП актомиозина с начальной рефрактерной фазой, которая сменяется фазой быстрого увеличения СПП ($t_{1/2}=1$ мин). Влияние Sr^{2+} и Ba^{2+} на фоне постоянной концентрации Mg^{2+} (10^{-3} моль/л) проявляется также по-разному (см. рис. 2). Ba^{2+} не вызывает СПП актомиозина, что является свидетельством значительного влияния Mg^{2+} на образование долгоживущих интермедиатов миозина $\text{M}_{\text{Фн}}^{**\text{АДФ}}$ [1], которые ингибируют СПП. В отличие от Ba^{2+} , Sr^{2+} вызывает СПП актомиозина. Сравнивая кривые 4 и 7 на рис. 2, можно видеть, что при одинаковой концентрации Sr^{2+} (10^{-3} моль/л) и наличии Mg^{2+} СПП проходит со значительной задержкой: рефрактерная фаза длится 11 мин, а максимальная степень СПП достигается на 14-й минуте.

Образование различных преципитатов указывает на то, что во время СПП происходят межмолекулярные взаимодействия и значительные перестройки в структуре актомиозиновых комплексов. Длительное время СПП используется как удобный тест для оценки сократительной активности актомиозиновых систем из мышц различных типов. Наибольший интерес представляют результаты, подтверждающие важное положение о том, что конфигурационные изменения актомиозиновых ассоциатов при СПП вызывают скольжение миозиновых и актиновых филаментов и что СПП в определенной мере может служить упрощенной моделью актомиозинового взаимодействия при мышечном сокращении [11].

В наших опытах установлено, что СПП может осуществляться по-разному в зависимости от природы двухвалентного катиона. Наиболее важные в мышечном сокращении Ca^{2+} и Mg^{2+} оказывают противоположное влияние на СПП актомиозина. Если в растворе нет Mg^{2+} и СПП проходит с участием одного Ca^{2+} (см. рис. 2), наблюдается только фаза быстрого увеличения СПП с образованием «грубого преципитата». Достаточно следовых концентраций Ca^{2+} (меньше $5 \cdot 10^{-7}$ моль/л), чтобы получить быстрое увеличение СПП. Когда в растворе находится Mg^{2+} , наблюдаются характерные кривые СПП с рефрактерной фазой: в одном случае (небольшая концентрация Ca^{2+} , двухфазные кривые; см. рис. 1, 4) — вначале рефрактерная фаза и затем фаза быстрого увеличения СПП, в другом (концентрация Ca^{2+} больше 10^{-4} моль/л, трехфазные кривые; см. рис. 1, 5) — вначале резкое увеличение оптической плотности, рефрактерная фаза и фаза быстрого увеличения СПП. Во всех случаях с участием Mg^{2+} образуется мелкодисперсный «тонкий преципитат».

Для объяснения различных способов осуществления СПП и для понимания механизмов, по-видимому, вызывающих структурные перестройки в актомиозине, которые в конечном счете определяют образование того или иного вида суперпреципитата, мы предположили наличие неодинакового типа подсоединения миозиновых головок к актиновому филаменту. В настоящее время обсуждается несколько функциональных состояний мостика, которые зависят от конформации головки миозина [3, 10, 13]. Выделяют мостики трех типов: диссоциированный, слабосвязанный с актином и сильносвязанный с актином. Корреляция между структурой мостика и силой связывания представляет интерес, так как при СПП актомиозина мостик может переходить от слабого к сильному типам связывания. Согласно Shriver [13], взаимодействие АТФ с миозином переводит мостик в диссоциированное состояние, так как комплекс миозин — АТФ имеет низкое сродство к актину. Гидролиз АТФ осуществляется на этом мостике, в результате чего образуется интермедиат миозина $\text{M}_{\text{Фн}}^{**\text{АДФ}}$, в котором запасается энергия гидролиза АТФ. В таком состоянии головка миозина имеет большое сродство к актину и образует слабосвязанный мостик, присоединяющийся под углом 90° к актиновому филаменту. Предполагают, что запасенная энергия трансформируется в механическую работу за счет перехода от слабого типа связывания к сильному

с изменением приводит к скольжению

Исходя из соображений присоединения (рис. 3). Сопричастность при небольшом актомиозине миозиновым актомиозине (рис. 3, а). шению к ак в диссоцииру

Ca^{2+} и [14], а Ca^{2+} миозина [3]. гуляторную зависимыми ентации мо

Рис. 3. Схема соединения миозиновых протофиламентов. а — слабый тип мостика; б — генерация скелетина; в — образование «грубого» преципитата; г — миозиновая головка; д — миозиновая п

влияет на конформацию миозина при сокращении головок. В зависимости от концентрации Ca^{2+} на $\text{M}_{\text{Фн}}^{**\text{АДФ}}$ головок к актиновому филаменту. Вый гель по данным мостиков. В соседние актиновые связи, в (рис. 3, д).

В реакциях Mg^{2+} принадлежит к другим факторам, влияющим на образование суперпреципитата. В присутствии Mg^{2+} диссоциирует молекулы (р. $\text{Mg} \cdot \text{АТФ}$ (6) филаменты, и в интактных АТФ идет на. После образования точно фиксируемого сродства. Наличие данных головок из «присоединения» происходит миозиновым (при взаимодействии с большой

изывают СПП
ая сменяется
е Sr^{2+} и Ba^{2+}
проявляется
актомиозина,
 $^{2+}$ на образо-
[1], кото-
изывает СПП
можно видеть,
и наличии
рефрактерная
стигается на
а то, что во
вия и значи-
лексов. Дли-
для оценки
ыщц различ-
ты, подтвер-
е изменения
чение миози-
ленной мере
взаимодейст-

уществляться
иона. Наибо-
вают проти-
ре нет Mg^{2+}
наблюдается
грубого пре-
 $^{2+}$ (меньше
СПП. Когда
ривые СПП
трация Ca^{2+} ,
ная фаза и
трация Ca^{2+}
значале рез-
аза и фаза
 Mg^{2+} обра-

СПП и для
урные пере-
ают образо-
едположили
ловок к ак-
несколько
онформации
диссоцииро-
тином. Кор-
редставляет
реходить от
[13], взаи-
цированное
е сродство
, в резуль-
в котором
ловка мио-
связанный
филаменту.
механичес-
к сильному

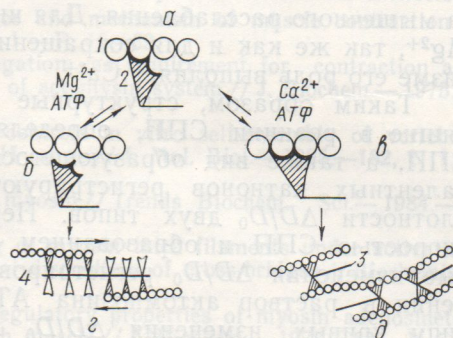
с изменением угла ориентации мостика от 90° до 45° . Такой переход приводит к генерации силы (при изометрическом сокращении) или скольжению протофибрилл (при изотоническом сокращении).

Исходя из этих положений, мы предложили схему различных способов присоединения миозиновой головки к актиновой протофибрилле (рис. 3). Согласно электронно-микроскопическим исследованиям [12], при небольших концентрациях $Mg \cdot ATP$ (меньше $2 \cdot 10^{-5}$ моль/л) актомиозин представляет собой актиновые филаменты, декорированные миозиновыми молекулами. Можно предположить, что в исходном актомиозине одна из головок миозина слабо связана с актином (рис. 3, а). Такие головки достаточно лабильны и подвижны по отношению к актиновому филаменту. Другая головка миозина находится в диссоциированном состоянии по отношению к тому же филаменту.

Ca^{2+} имеет большое сродство к ДТНБ-легким цепям миозина [14], а $Ca \cdot ATP$ слабо связывается с активными центрами головок миозина [3]. Эти цепи играют регуляторную роль, управляя Ca^{2+} -зависимыми изменениями в ориентации мостиков [5]. Mg^{2+} не

Рис. 3. Схема различных способов присоединения миозиновых головок к актиновым протофибриллам:

а — слабый тип связывания; б — диссоциированный мостик; в — сильный тип связывания; г — генерация скольжения протофибрилл; д — образование «грубого преципитата» (1 — актиновая протофибрилла; 2 — головка миозина; 3 — миозиновая молекула с двумя головками; 4 — миозиновая протофибрилла).



влияет на конформацию ДТНБ-легких цепей. Таким образом, СПП актомиозина при участии Ca^{2+} и АТФ начинается с активации свободных головок. В связи с гидролизом АТФ образуются интермедиаты миозина $M_{Фн}^{**ADP}$ [1], которые способствуют быстрому присоединению головок к соседним актиновым филаментам, прошивая актомиозиновый гель поперечными мостиками. Ca^{2+} быстро переводит слабосвязанные мостики в сильносвязанные (рис. 3, в). За короткое время соседние актиновые филаменты прошиваются жесткими поперечными связями, в результате чего образуется «грубый преципитат» (рис. 3, д).

В реакциях взаимодействия миозина или актомиозина с АТФ Mg^{2+} принадлежит особая роль. Эти катионы значительно отличаются от других двухвалентных катионов не только своим влиянием на образование и распад интермедиатов миозина, но и на СПП. При участии Mg^{2+} наблюдается рефрактерная фаза, в течение которой диссоциируется актомиозин на актиновые филаменты и миозиновые молекулы (рис. 3, б). Известно, что при повышенных концентрациях $Mg \cdot ATP$ (больше 10^{-4} моль/л) интенсивно образуются миозиновые филаменты, в которых головки располагаются в том же порядке, что и в интактных толстых протофибриллах [12]. В этом случае гидролиз АТФ идет на головках миозина, которые расположены в филаментах. После образования интермедиатов миозина $M_{Фн}^{**ADP}$ головки очень точно фиксируются на актиновом филаменте в результате значительного ограничения их подвижности в филаментных структурах. Наличие даже следов Ca^{2+} будет способствовать быстрому переходу головки из « 90° »-в « 45° »-конформацию, в результате чего будет генерироваться механическая сила, и в небольшом микрообъеме будет происходить скольжение актиновых филаментов по отношению к миозиновым (рис. 3, г). Поскольку при участии Mg^{2+} СПП обусловлена взаимодействием актиновых и миозиновых филаментов, регистрируется большая степень СПП, чем при наличии в растворе только Ca^{2+} .

Начальное резкое увеличение оптической плотности наблюдалось при наличии в растворе актомиозина Ca^{2+} и добавке $\text{Mg} \cdot \text{АТФ}$ в небольшой концентрации. Это связано с тем, что актиновые филаменты взаимодействуют с миозиновыми, образовавшимися до начала СПП [7].

Тот факт, что Mg^{2+} в присутствии АТФ значительно замедляет СПП актомиозина, может иметь важное значение. Этим подчеркиваются уникальные свойства Mg^{2+} как катиона, принимающего непосредственное участие в механизме мышечного сокращения. Если при взаимодействии с миозином Mg^{2+} значительно замедляет распад интермедиатного комплекса $\text{M}_{\text{ФН}}^{**\text{АДФ}}$ [1], то при взаимодействии с актомиозином он тормозит СПП. Это свойство отличает Mg^{2+} от других двухвалентных катионов. В организме человека и животных $\text{Mg} \cdot \text{АТФ}$ — субстрат актомиозиновой АТФазы, и, по-видимому, только в связи с уникальными свойствами Mg^{2+} , ингибирующего конформационные изменения актомиозина при взаимодействии с АТФ, может наступать фаза мышечного расслабления. Для инициации реакции СПП при наличии Mg^{2+} , так же как и для сокращения, требуется другой катион. В организме его роль выполняет Ca^{2+} .

Таким образом, структурные перестройки актомиозина, происходящие в реакции СПП, определяют различные степень и скорость СПП, а также вид образующегося преципитата. При наличии двухвалентных катионов регистрируются кривые изменения оптической плотности $\Delta D/D_0$ двух типов. Первый тип характеризуется высокой скоростью СПП и образованием «грубого преципитата». Такие кривые изменения $\Delta D/D_0$ регистрировались в наших опытах при добавлении в раствор актомиозина АТФ и Ca^{2+} , Sr^{2+} и Ba^{2+} . Другому типу кривых изменения $\Delta D/D_0$ характерно наличие рефрактерной фазы с образованием мелкодисперсного, «тонкого преципитата». Такие кривые регистрируются при участии Mg^{2+} и Mn^{2+} .

На основании полученных результатов мы можем разделить двухвалентные катионы на две группы. Первая — небольшие по размеру двухвалентные катионы, хорошо связывающиеся с АТФ и образующие субстратный комплекс в активном центре головки миозина. В данном случае ведущим является Mg^{2+} ($r=0,065-0,076$ нм). В определенной мере его может заменить Mn^{2+} ($r=0,08$ нм). Катионы этой группы в концентрации больше 10^{-4} моль/л вызывают диссоциацию актомиозина. Вторая группа — большие по размеру катионы, слабо связывающиеся в активном центре миозина. Но эти ионы могут служить управляющими сигналами, инициирующими СПП и сокращение мышц. Ведущим в этой группе является Ca^{2+} ($r=0,099-0,106$ нм). Его может заменить Sr^{2+} ($r=0,113$ нм). Менее вероятна замена Ba^{2+} ($r=0,133$ нм), хотя в некоторых случаях эти катионы инициировали СПП. Cd^{2+} , в отличие от Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Sr^{2+} и Ba^{2+} , не индуцирует образование интермедиатов миозина при гидролизе АТФ и не вызывает СПП актомиозина скелетных мышц.

THE EFFECT OF BIVALENT CATIONS ON SUPERPRECIPITATION OF ACTOMYOSIN FROM SKELETAL MUSCLES

V. L. Zima, P. G. Minchenko

Superprecipitation (SPP) of actomyosin from skeletal muscles is shown to be realized by several methods depending on the bivalent cation. Ca^{2+} and Mg^{2+} , most important in the muscular contraction, exert an opposed action. The bivalent ions may be divided into two groups by their effect on SPP. Mg^{2+} which inhibits SPP is attributed to the first group while Ca^{2+} , which initiates SPP, — to the second one. Mn^{2+} may be, to a certain extent, replaced by Mg^{2+} and Ca^{2+} by Sr^{2+} .

T. G. Shevchenko University, Ministry of Higher and Secondary Special Education, Ukrainian SSR, Kiev

1. Богач П. I взаимодействия физика. — 1
2. Кофман Е. методы исс
3. Леднев В. кратительн
4. Поглазов Л. : Наука, 1982. — 160
5. Alexis M. ions // Bio
6. Barany M. chem. and
7. Cheung P. filaments a
8. De Villafra rabbit myo
9. Ebashi S. 50, N 3. —
10. Goody R. Biochim. et
11. Hayashi T. proposal to 78, N 5. —
12. Pinset-Har te skeletal P. 159—17
13. Shriver J. N 7. — P. 3
14. Sutoh K., and rigor c ry. — 1977-
15. Takeuchi K phosphatas P. 813—83
16. Watanabe and on AT nosine diph

Киев. ун-т им. М-ва высш. и

УДК 616.28—008.

Особенное быстрой с

С. П. Чайка, С

До настояш рии генеза ряд гипотет обсуждается и централь явления БС задач требу звена слухи мозга в ада

Цель н метода реги (СПД) и (КСВП) пр дражителей.