

Вплив іонів алюмінію на суперпрєципітацію актоміозину серцевого та скелетних м'язів

К. І. Богуцька, В. М. Данилова¹, П. Г. Мінченко, Л. П. Шеремет,
М. С. Мірошніченко

Київський національний університет імені Тараса Шевченка
Вул. Володимирська, 64, Київ, 01033, Україна

¹ Інститут біохімії імені О. В. Палладіна НАН України
Вул. Леонтовича, 9, Київ, 01030, Україна

Досліджено вплив іонів алюмінію на реакцію суперпрєципітації актоміозину серцевого та скелетних м'язів у порівняльному аспекті. Виявлено концентраційно залежне пригнічення іонами алюмінію згаданої реакції. Вивчено залежність ефектів іонів металів від їхніх фізико-хімічних властивостей.

Вступ. Найпоширенішим у групі токсичних мікроелементів є алюміній. На сьогодні є дані про специфічні фізіологічні та біохімічні зміни в живих організмах при дії токсичних концентрацій деяких сполук алюмінію, зокрема, це проявляється у порушеннях діяльності центральної нервової системи, функціонального стану і розвитку кісткової тканини, цілісності біомембран та провідності каналів, у прояві специфічного механізму мутагенної дії [1—4]. Джерелом надходження алюмінію до організму можуть бути його комплекси з поліфенолами рослинного походження, питна вода, різні побутові предмети та лікарські препарати, крім того, існує ще ціла низка антропогенних джерел забруднення довкілля алюмінієм. Для деяких регіонів України комбінована дія на організм малих доз опромінення та інтоксикації його алюмінієм є актуальною проблемою [5]. Накопичені дані з вивчення негативної дії алюмінію неповні, цілий ряд питань залишився поза увагою дослідників, зокрема, питання щодо впливу алюмінію на м'язову систему.

Метою нашої роботи було дослідити реакцію суперпрєципітації (СПП) актоміозину в присутності іонів алюмінію та порівняти отримані дані для актоміозину, виділеного з різних м'язів, а саме — серцевого та скелетних. Проаналізовано

також залежності ефектів іонів металів від їхніх фізико-хімічних властивостей.

Матеріали і методи. Актomioзини виділяли з серцевого м'яза бика та скелетних м'язів кроля за загальноприйнятими методиками. Екстракцію проводили розчином, що містив 0,2 М КСІ, 0,15 М трис-НСІ, рН 8,0, 1 мМ ЕДТА, 5 мМ MgCl₂, 0,2 мМ PMSF, 1 мМ NaN₃, 3,5 мМ АТР. Білковий препарат очищували пересадженням 10 об'ємами води та розчиняли в 0,6 М КСІ. Склад препаратів контролювали методом електрофорезу. Кінетику суперпрєципітації актоміозину реєстрували за зміною оптичної густини при довжині хвилі 450 нм і температурі 25 °С упродовж 20 хв. Реакційна суміш для СПП містила 20 мМ трис-НСІ, рН 7,5, 0,15 М КСІ, 1 мМ MgCl₂, 0,1 мМ CaCl₂ (контроль) або 0,1—2 мМ хлорид алюмінію. Концентрація актоміозину в сумарному об'ємі проби 2 мл становила 0,1 мг/мл. Реакцію СПП ініціювали додаванням до середовища АТР. Про швидкість СПП судили за величиною часу $t_{1/2}$, упродовж якого оптична густина актоміозину зростала до величини $D/2$, де D — оптична густина актоміозину після завершення реакції СПП. Ступінь СПП визначали за величиною $D - D_0$, де D_0 — оптична густина актоміозину до початку реакції СПП.

Результати і обговорення. Реакція суперпрєципітації актоміозину дозволяє досліджувати деякі властивості скорочувального білкового комплексу

м'язів та вплив на нього різних факторів, зокрема, іонів металів [6, 7]. Якщо розглядати процес утворення та дисоціації преципітату впродовж СПП актоміозину, то це в значній мірі відтворює процес м'язового скорочення — у присутності іонів магнію та АТР іони кальцію спричиняють скорочення м'яза, а видалення іонів кальцію за допомогою ЕГТА у присутності АТР веде до розслаблення м'яза. Показано, що Ca^{2+} та Mg^{2+} протилежно діють на СПП: іони кальцію прискорюють, а іони магнію сповільнюють цей процес. Інформативними є модельні дослідження стабільності структурної організації актоміозину при дії різних факторів, які змінюють той чи інший тип внутрішньомолекулярних взаємодій та впливають на СПП. Такі дослідження направлені на виявлення сил, відповідальних за стабілізацію унікальної структури молекули міозину та її можливих змін, які виникають під час м'язового скорочення.

На рис. 1 представлено кінетичні криві реакції СПП актоміозину серцевого м'яза у присутності різних концентрацій іонів алюмінію. Так, при додаванні до реакційної суміші АТР (крива 1) реєструється реакція суперпреципітації, яка характеризується поступовим зростанням оптичної густини актоміозину з подальшим виходом на плато. Величина $t_{1/2}$ становить у даному випадку близько 5 хв. Додавання 0,01 мМ AlCl_3 (крива 2) не призводить до помітної зміни швидкості та ступеня СПП, яка спостерігається при додаванні до актоміозину лише АТР (рис. 1, крива 1). При підвищенні концентрації іонів алюмінію від 0,05 до 0,5 мМ (криві 3—5) хід реакції СПП змінюється. На кривих СПП актоміозину з'являється рефрактерна фаза (це досить сповільнена фаза незначного зростання оптичної густини актоміозину без помітних преципітуючих структур), яка переходить у швидку фазу зростання оптичної густини. Остання, в свою чергу, завершується виходом кінетичних кривих реакції СПП на плато. При концентрації іонів алюмінію 1 мМ спостерігається пригнічення реакції суперпреципітації (крива 6).

При взаємодії іонів алюмінію з актоміозином скелетних м'язів також відслідковується певна залежність параметрів суперпреципітації від концентрації даних катіонів. Із рис. 2 видно, що при додаванні до актоміозину АТР (в реакційній суміші присутні лише слідові концентрації двовалентних іонів) реакція СПП протікає з високою швидкістю — $t_{1/2}$ складає близько 30 с (крива 6). У тому ж випадку, коли реакційна суміш містила 0,1 мМ іони алюмінію, спостерігалася значне зростання ступеня СПП та зменшення швидкості реакції СПП (рис. 2, крива 1). Преципітат, що утво-

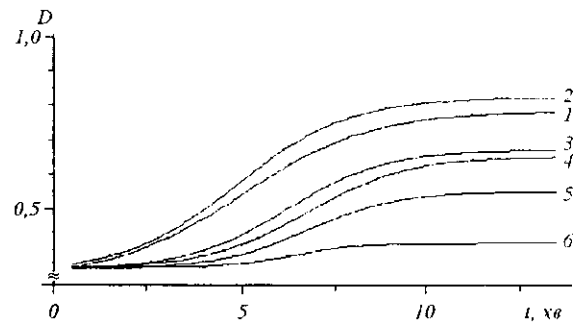


Рис. 1. Кінетичні криві реакції суперпреципітації актоміозину серцевого м'яза при додаванні різних концентрацій AlCl_3 : 1 — без Al^{3+} (контроль); 2 — 0,01; 3 — 0,05; 4 — 0,1; 5 — 0,5; 6 — 1 мМ

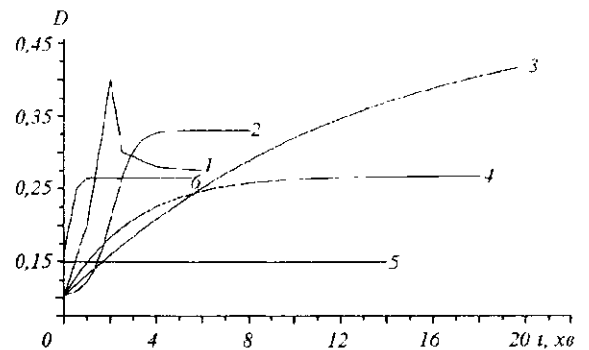


Рис. 2. Кінетичні криві реакції суперпреципітації актоміозину скелетних м'язів при додаванні 0,1 мМ АТР (6) та різних концентрацій AlCl_3 : 1 — 0,1; 2 — 0,5; 3 — 0,8; 4 — 1; 5 — 2 мМ

рюється в ході реакції, носить у даному випадку нестійкий характер і здатний до зсідання, що й відображує крива 1 на рис. 2. Подальше підвищення концентрації іонів алюмінію до 0,8 мМ супроводжується значним зниженням швидкості реакції СПП актоміозину та утворенням стійкого до зсідання преципітату (рис. 2, криві 2, 3). При вищих концентраціях іонів алюмінію (крива 4 на рис. 2) швидкість реакції СПП знову зростає, але ступінь реакції СПП значно знижується. Взаємодія актоміозину з Al^{3+} у концентрації 2 мМ і більше супроводжувалася повним пригніченням реакції СПП, на користь чого свідчив той факт, що оптична густина актоміозину впродовж дослідження не змінювалася і залишалася на вихідному рівні (рис. 2, крива 5).

Як видно з наведених результатів, СПП актоміозину серцевого м'яза носить повільніший характер порівняно з актоміозином скелетних м'язів. Разом з тим характер впливу іонів алюмінію на СПП актоміозину серцевого м'яза подібний до того, який проявляється у випадку актоміозину

скелетних м'язів [8], а саме: при певних концентраціях іони алюмінію сповільнюють реакцію СПП актоміозину і знижують ступінь СПП, а при вищих концентраціях пригнічують реакцію СПП. Таким чином, іони алюмінію можуть суттєво впливати на скоротливий комплекс білків скелетних та серцевого м'язів.

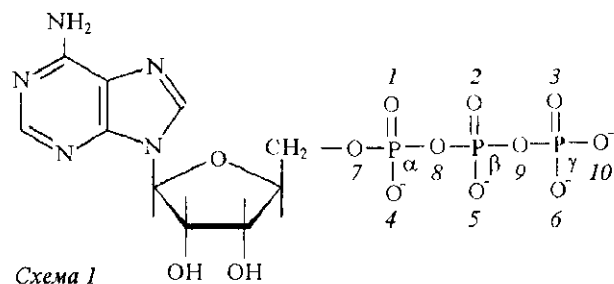
СПП пов'язана з функціонуванням актоміозинової АТРази. Враховуючи, що гідроліз АТР здійснюється міозином, можна чекати, що структурні перебудови, які спостерігаються в ході утворення інтермедіатів міозину, будуть проявлятися і при СПП актоміозину.

Якщо порівняти вплив іонів алюмінію з іншими тривалентними іонами, то для La^{3+} , наприклад, показано, що він більше здатний до взаємодії з деякими від'ємними Ca^{2+} -зв'язуючими ділянками, ніж самі іони кальцію. Якщо у білку є ділянки зв'язування з високою та низькою спорідненістю, то перші швидше насичуються La^{3+} [9]. Тривалентні катіони лантанодів мають іонні радіуси від 0,09 до 0,115 нм, тобто близькі до іонного радіуса Ca^{2+} , та можуть електростатично взаємодіяти з тими групами білка, що й іони кальцію. Eu^{3+} при взаємодії з поверхнею білка, можливо, займає і ділянку зв'язування двовалентних катіонів, але з таких ділянок Eu^{3+} може бути витіснений Ca^{2+} або Mg^{2+} . Таким чином, за допомогою флуоресцентного зонда Eu^{3+} показано, що в активації міозинової АТРази двовалентними іонами суттєву роль відіграє взаємодія катіонів з білком [9].

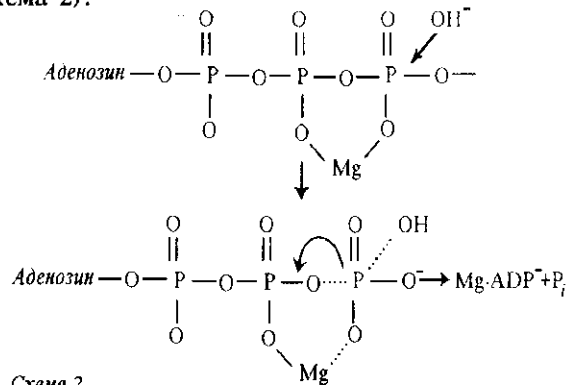
Для дослідження структури субфрагмента 1 (С1) міозину використовують стабільні аналоги проміжних станів міозину в ході АТРази реакції, одним з них є комплекс С1 з ADP та AlF_4^- [10]. Такий комплекс може існувати в розчині протягом доби і не розкладатися, що робить його зручним об'єктом для детальних досліджень. Розпад цього комплексу є аналогічним дисоціації ключового інтермедіату в процесі АТРази реакції. Комплекси С1 міозину з $Mg \cdot ADP \cdot AlCl_4$ також імітують різні структурні стани голівки міозину — дослідження в цьому напрямку проводяться для виявлення конкретних ділянок в С1, де відбуваються конформаційні зміни, що забезпечують переміщення актинових і міозинових філаментів [11, 12]. Крім того, іони алюмінію можуть впливати на деякі характеристики актинових філаментів [13]. Існують також дані про взаємодію іонів алюмінію з регуляторними білками, зокрема, про вплив цих іонів на спектральні властивості Ca^{2+} -зв'язуючої субодиниці тропоніну, тропоніну С [14]. Якщо порівняти з берилієм, який не викликає змін у спектральних характеристиках тропоніну С, то зв'язування з

алюмінієм індукує підвищення флуоресценції тропоніну С та робить доступною гідрофобну ділянку цього білка для зв'язування з флуоресцентними зондами. Іони алюмінію також впливають на Ca^{2+} -та/або Mg^{2+} -індуковані зміни в тропоніні С. Ці результати вказують на пряму взаємодію Al^{3+} із згаданим білком.

Іони металів можуть утворювати комплекси не лише з білком, а й із субстратом. Дослідження комплексу $Mg \cdot ATP$ за допомогою ^{31}P -ЯМР спектроскопії та квантово-механічних розрахунків вказують на міцнішу координацію Mg^{2+} з O_5 . У роботі [15] показано, що Mg^{2+} зв'язується асиметрично з O_5 і O_6 АТР, що послаблює зв'язок між P_γ і O_6 . Цей ефект безпосередньо визначає місце гідролізу АТР, як це наведено на схемі 1.



Грунтуючись на вищевикладених результатах, механізм гідролізу АТР можна представити так (схема 2):



Наведений механізм, імовірно, має місце при гідролізі АТР ферментами АТРазами. Не виключено, що роль АТРази полягає в забезпеченні більш міцного (коротшого) координаційного зв'язку Mg^{2+} з O_5 порівняно з O_6 в АТР.

Методом ЯМР спектроскопії показано, що хімічний зсув сигналу ядра фосфору в присутності еквімолярних концентрацій Mg^{2+} , Ca^{2+} і Zn^{2+} вказує на те, що ці іони утворюють комплекси з β - і

Фізичні характеристики металів

Радіус, нм	Al	Mg	Ca
Атомний	0,143	0,160	0,197
Іонний	0,053 (4)	0,071 (4)	—
	0,062 (5)	0,08 (5)	—
	0,067 (6)	0,086 (6)	0,114 (6)
	—	0,103 (8)	0,126 (8)
	—	—	0,137 (10)
—	—	0,148 (12)	

Примітка. В дужках вказано координаційне число.

γ -фосфатними групами ADP. Відомо, що Eu^{3+} , подібно до Ca^{2+} та Mg^{2+} , не взаємодіє у розчині з пуриновою частиною АТР, а зв'язується лише з трифосфатним угрупованням (з β - та γ -фосфатами АТР), при цьому Eu^{3+} зв'язується з АТР значно міцніше, ніж Mg^{2+} (константи зв'язування відрізняються більш ніж на порядок) [9]. На жаль, дані стосовно зв'язування іонів алюмінію з АТР нам невідомі. Але з порівняння розмірів іонних радіусів Al, Mg і Ca, наведених у таблиці, видно, що згадані величини близькі у Al та Mg, але значно різняться у Ca.

Отже, є підстави вважати, що і Al буде утворювати комплекс з β - і γ -фосфатними групами АТР. Виходячи з вищенаведених міркувань, можна запропонувати структуру цього комплексу, представлену на схемі 3.

Наведена структура, на наш погляд, імовірна.

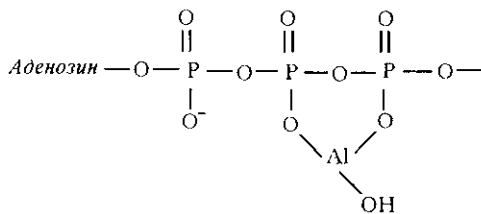


Схема 3

Теоретично можна зобразити ще дві структури Al з АТР, які наведено на схемі 4.

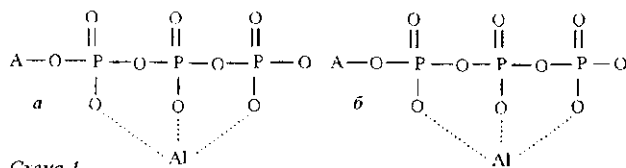


Схема 4

Структура б видається менш вигідною порівняно з а через наявність чотирьохчленного напруженого кільця (атоми P_γ , O_{10} , O_6Al). Отже, комплекс $\text{Al}\cdot\text{АТР}$ може бути прийнятним субстратом для АТРази.

Специфічну дію катіонів можна пояснити як безпосереднім впливом іонів, що зв'язуються, на активний центр білка, так і опосередкованою дією катіонів через зміну конформації всієї молекули в цілому. Деякі автори розглядають факт впливу іонів як прояв конкуренції між прямою (через активні центри) та опосередкованою ($\text{Me}^{2+}\cdot\text{АТР}$) дією катіонів [16]. Для Mg^{2+} показано, що його модуляторний ефект на кінетику СПП актоміозину здійснюється головним чином через комплекс $\text{Mg}\cdot\text{АТР}^{2-}$, який залежно від концентрації здатний переводити білкові макромолекули в два різні стани. За їхньої участю реалізуються різні механізми реакції СПП та забезпечуються кінетичні режими функціонування актоміозинової АТРази. Оскільки комплексоутворюючі та ферментативні характеристики актоміозину в цих станах відрізняються, то переходи між ними можна розглядати як можливу регуляторну ланку функціонування міофібрилярного апарату.

Отже, катіони, які зв'язуються з білком, регулюють, імовірно, взаємодію АТР (переважно її пуринової частини) з активним центром міозину; катіони, що зв'язані з трифосфатною групою АТР у розчині, вірогідно, беруть участь в подальшому гідролізі АТР — функції катіонів, які зв'язані з білком або АТР, проявляються на різних стадіях механізму АТРазиної реакції міозину.

Таким чином, враховуючи отримані дані та результати раніше проведених досліджень [8, 17], можна припустити, що іони алюмінію в певних концентраціях значною мірою впливають на реакцію СПП актоміозину і відповідно на м'язову скоротливу активність. Це може стати причиною розвитку патологічного стану серцевого та скелетних м'язів.

K. I. Bogutska, V. M. Danilova, P. G. Minchenko, L. P. Sheremet, M. S. Miroshnichenko

Influence of aluminium ions on superprecipitation of the cardiac and skeletal muscle actomyosin

Summary

Influence of aluminium ions on superprecipitation of both cardiac and skeletal muscles actomyosin has been investigated. The inhibition of superprecipitation of actomyosin under an increase in the aluminium ions concentration is shown. Effects of metal ions depending on their physical and chemical properties have been analysed in detail.

Е. И. Богуцкая, В. М. Данилова, П. Г. Минченко,
Л. П. Шеремет, Н. С. Мирошниченко

Влияние ионов алюминия на суперпреципитацию актомиозина
сердечной и скелетных мышц

Резюме

Исследовано влияние ионов алюминия на реакцию суперпреципитации актомиозина сердечной и скелетных мышц в сравнительном аспекте. Выявлено концентрационно зависимое ингибирование ионами алюминия реакции суперпреципитации актомиозина. Проведен анализ зависимости эффектов ионов металлов от их физико-химических свойств.

PERELIK LITERATURY

1. Winship K. Toxicity of aluminium // *Adverse Drug React. Toxicol. Rev.*—1992.—11, N 2.—P. 123—147.
2. Nayak P. Aluminium: impacts and disease // *Environ. Res.*—2002.—89, N 2.—P. 101—115.
3. Perez-Granados A. M., Vaquero M. P. Silicon, aluminium, arsenic and lithium: essentiality and human health implications // *J. Nutr. Health Aging.*—2002.—6, N 2.—P. 154—162.
4. Verstraeten S. V., Oteiza P. I. Al³⁺-mediated changes in membrane physical properties participate in the inhibition of polyphosphoinositide hydrolysis // *Arch. Biochem. Biophys.*—2002.—408, N 2.—P. 263—271.
5. Руденко С. С., Озерова І. О., Рибіцька М. М., Волощук К. О. Вплив алюмінієвої інтоксикації та γ -опромінення на стан антиоксидантної системи організму та вивчення можливостей його корекції // *Укр. біохім. журн.*—1998.—70, № 2.—С. 84—88.
6. Зима В. Л., Минченко П. Г. Влияние двухвалентных катионов на суперпреципитацию актомиозина скелетных мышц // *Физиол. журн.*—1988.—34, № 1.—С. 28—33.
7. Тикунов Б. А. Характер актин-миозинового взаимодействия на двух стадиях реакции суперпреципитации // *Биофизика.*—1991.—36, № 2.—С. 261—265.
8. Мірошниченко М. С., Мінченко П. Г., Шуба М. Ф. Вплив алюмінію на суперпреципітацію актоміозину // *Доп. АН України.*—1993.—№ 6.—С. 78—81.
9. Левицкий Д. И., Литвинов И. С., Поглазов Б. Ф. Изучение связывания катионов с субфрагментом 1 миозина при помощи флуоресцентного зонда Eu³⁺ // *Биохимия.*—1982.—47, № 9.—С. 1504—1511.
10. Ponomarev M. A., Timofeev V. P., Levitsky D. I. The difference between ADP-beryllium fluoride and ADP-aluminium fluoride complexes of the spin-labelled myosin subfragment 1 // *FEBS Lett.*—1995.—371, N 3.—P. 261—263.
11. Lorinczy D., Hartvig N., Belagyi J. Analysis of nucleotide myosin complexes in skeletal muscle fibres by DSC and EPR // *J. Biochem. Biophys. Meth.*—2002.—53, N 1—3.—P. 75—87.
12. Maruta S., Saitoh J., Asakura T. J. Analysis of conformational changes at the unique loop adjacent to the ATP binding site of smooth muscle myosin using a fluorescent probe // *J. Biochem. (Tokyo).*—2000.—127, N 2.—P. 199—204.
13. Arnays E. J., Schindler M. Aluminium modifies the viscosity of filamentous actin solutions as measured by optical displacement microviscometry // *Anal. Biochem.*—2000.—277, N 1.—P. 1—10.
14. Phan B. C., Reisler E. Aluminum fluoride interactions with troponin C // *Biophys. J.*—1993.—65, N 6.—P. 2511—2516.
15. Yoshikawa K., Shinohara Y., Terada H., Kato S. Why is Mg²⁺ necessary for specific cleavage of the terminal phosphoryl group of ATP // *Biophys. Chem.*—1987.—27, N 3.—P. 251—254.
16. Тикунов Б. А. Действие ионов магния на двустадийную кинетику суперпреципитации и АТФазы натурального актомиозина // *Биохимия.*—1990.—55, № 5.—С. 822—828.
17. Давидовская Т. Л., Богуцкая Е. И., Минченко П. Г., Мирошниченко Н. С. Модулирующее действие хлорида алюминия и его комплекса с оксипроизводным 2-фенилхромона на регуляторные механизмы сокращения мышц // *Биополимеры и клетка.*—1998.—14, № 6.—С. 534—539.

УДК 577.3

Надійшла до редакції 25.12.02