

К. І. Богуцька, О. В. Цимбалюк, В. М. Данилова, М. С. Мірошніченко

Вплив рН середовища на АТФазну активність міозину різних типів м'язів

Исследовано влияние рН среды на активность АТФазы миозина разных типов мышц. Показано, что миозиновая АТФаза имеет два максимума активности в зависимости от рН, а именно при рН 6,0 – 6,5 и 9,0 – 9,5, которые отличаются за абсолютными значениями удельной активности для сердечной, скелетных и гладких мышц. Обсуждается зависимость физиологических свойств мышц разных типов от физико-химических и структурных особенностей миозина.

ВСТУП

Протягом багатьох років вивчається залежність функціональних властивостей м'язів від рН, але механізм впливу рН внутрішньоклітинного середовища на взаємодію міозинових та актинових філаментів залишається остаточно нез'ясованим. Відомо, що м'язова активність є результатом перетворення хімічної енергії гідролізу АТФ у механічну енергію скорочення міофібрил [14]. У ланцюзі цих процесів спостерігається певна динаміка концентрації протонів, що призводить до локальної тимчасової зміни рН усередині клітини [12]. Протони використовуються при ресинтезі АТФ у клітині, а утворюються вони під час анаеробного гліколізу та гліколізу АТФ. Збільшення концентрації H^+ призводить до інгібування таких ферментів, як фосфофруктокіназа, фосфорилаза тощо, а також до пригнічення активації кальцієм процесу утворення актин-міозинових містків, тобто закиснення середовища є причиною зниження сили м'язового скорочення. Важливою функціональною характеристикою для міозину є АТФазна активність, яка залежить від таких факторів зовнішнього середовища, як іонна сила, рН, температура, наявність катіонів тощо [5].

Мета нашої роботи – дослідження залежності АТФазної активності міозину серцевого, скелетних і гладеньких м'язів від рН середовища в порівняльному аспекті.

МЕТОДИКА

У роботі досліджували міозини, виділені з серцевого м'яза бика, гладеньких м'язів шлунка свині, скелетних м'язів кроля за загальноприйнятими методиками [2]. Чистоту та якісний склад препаратів скоротливих білків контролювали методом електрофорезу в поліакриламідному гелі при наявності додецилсульфату натрію. Активність міозинової АТФази вимірювали при 37 °С в інкубаційному середовищі (загальний об'єм 1,8 мл) такого складу: імідазол – 20 ммоль/л, $CaCl_2$ – 5 ммоль/л, ДТТ – 0,5 ммоль/л, АТФ – 1 ммоль/л, KCl – 0,5 моль/л, білок – 0,14 мг/мл; рН 7,5. При дослідженні рН-залежності Ca^{2+} -АТФазної активності міозину у діапазоні значень рН від 5,5 до 11,0 використовували буферні суміші: $NaOH$ -малеатна – слабко-кислі значення рН, $трис-HCl$ – у зоні нейтральних і слабколужних рН, $гліцин-NaOH$ – у зоні лужних рН. Кількість неорганічного фосфату, що утворився при гідролізі АТФ, визначали за методом Фіске – Суббароу.

© К. І. Богуцька, О. В. Цимбалюк, В. М. Данилова, М. С. Мірошніченко

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Особливості функціонування різних типів м'язів значною мірою визначаються фізико-хімічними властивостями та структурою білків їх скорочувального апарату, а також комплексом факторів внутрішньоклітинного середовища міоцитів. Для поглиблення уявлень про молекулярний механізм скорочення м'язів у цілому, на наш погляд, важливими є порівняльні дослідження структурно-функціональних властивостей міозину з різних типів м'язів. У проведених раніше дослідженнях показано відмінності для АТФазної активності міозину різного походження при наявності двовалентних катіонів [1, 2].

Існують і подібність, і відмінності залежності АТФазної активності міозину скелетних і гладеньких м'язів від рН середовища: АТФазна активність міозину гладеньких м'язів має максимуми активності при рН 6,0 та 9,5; для міозину скелетних

м'язів виявлено також два максимуми АТФазної активності, які дещо зміщені відносно максимумів гладеньком'язового міозину, а саме: при рН 6,0 – 6,5 та 9,0 (рис. 1). рН-залежність Ca^{2+} -АТФазної активності міозину міокарда (рис. 2) має максимуми активності при рН 6,0 – 6,5 та 9,0 – 9,5, як і міозин скелетних м'язів. Тобто, характер зміни Ca^{2+} -АТФазної активності міозину залежно від рН для всіх типів м'язів подібний, а відмінності спостерігаються тільки за абсолютними її значеннями. При рН 6,0 – 6,5 Ca^{2+} -АТФазна активність міозину зі скелетних і серцевого м'язів практично збігається, для міозину з гладеньких м'язів за цих умов вона дещо вища (див. рис. 1), але при рН 9,0 – 9,5 АТФазна активність при наявності Ca^{2+} вища для міозину зі скелетних м'язів порівняно з гладенькими та серцевим м'язами.

Характерною особливістю Ca^{2+} -АТФазної активності міозину як гладеньких, так і серцевого м'язів є наявність незначного максимуму при рН 7,5 – 8,0 і менш виражений максимум при рН 9,0 – 9,5 порівняно з міозином скелетних м'язів.

Таким чином, нами встановлено, що залежно від рН Ca^{2+} -АТФазна активність міозину різних типів м'язів має два максимуми, а саме при 6,0 – 6,5 та 9,0 – 9,5,

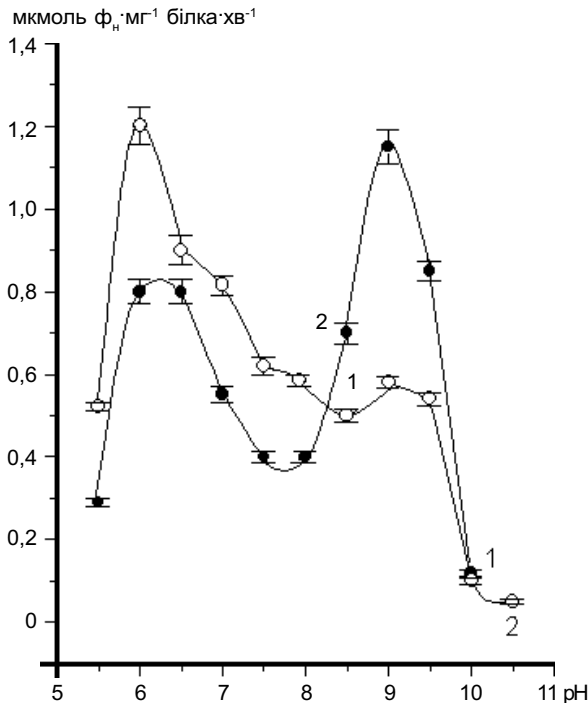


Рис. 1. Залежність від рН Ca^{2+} -АТФазної активності міозину гладеньких м'язів скелетних м'язів кроля (1) і гладеньких м'язів шлунка свині (2)

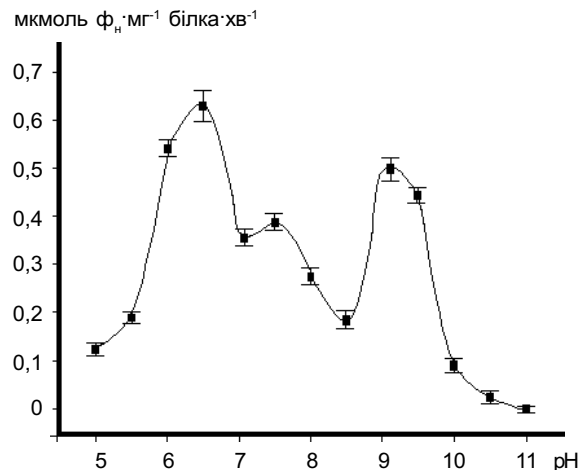


Рис. 2. Залежність від рН Ca^{2+} -АТФазної активності міозину серцевого м'яза бика

які відрізняються за абсолютним значенням питомої активності для серцевого, скелетних і гладеньких м'язів. Такі особливості функціонування молекули міозину можуть деякою мірою зумовлювати специфіку функціонування різних типів м'язів. Варіювання в значеннях питомої Ca^{2+} -АТФазної активності, найвірогідніше, спричинено амінокислотним складом міозинів з цих типів м'язів. Так, при дослідженні препаратів міозину з гладеньких м'язів показано, що амінокислотна послідовність його легких ланцюгів дещо відрізняється від послідовності легких ланцюгів міозину скелетних і серцевого м'язів [3]. Міозин серцевого м'яза має характерні ізоформи суттєвих і регуляторних легких ланцюгів, що відрізняються від таких у скелетних і гладеньких м'язах [6]. Різним є не тільки якісний, але й кількісний склад легких ланцюгів міозинів, що були виділені з різних типів м'язів (рис. 3). Оскільки властивості міозину переважно корелюють зі складом його легких ланцюгів, то це деякою мірою буде визначати особливості функціонування скорочувальних білків різних м'язових клітин. Зміни в складі легких ланцюгів супроводжуються змінами всіх функціональних властивостей міозину, що лежать в основі нормального функціонування м'яза (зміна структури ниток міозину, інгібування ферментативної активності, зміна регуляторних властивостей міозину) [10, 12].

Якщо рН-залежність Ca^{2+} -АТФазної активності міозину має переважно форму кривої з двома максимумами при рН 6,0 – 6,5 та 9,5, а в діапазоні фізіологічних значень (рН 6,5 – 7,5) спостерігається широкий мінімум, то з літературних джерел відомо, що крива рН-залежності ЕДТА-АТФазної активності має лише один максимум, розміщений в діапазоні лужних рН у K^+ , ЕДТА-АТФази та кислих рН у NH_4^+ , ЕДТА-АТФази [5]. Тобто залежність АТФазної активності міозину від рН відрізняється

при наявності різних катіонів, і певною мірою форма кривої рН-залежності відображає механізм гідролізу субстрату в активному центрі міозину та значення катіонів для цього процесу.

Нині відомо, що для функціонування скорочувальних білків, зокрема, міозину як ферменту, важливе значення має рівень рН усередині клітини. Для м'язового волокна характерним є закиснення середовища, яке супроводжує процес скорочення. На основі цього обговорюється можлива функціональна роль такого ефекту і запропоновано моделі скорочення, в яких структурні зміни в молекулах міозину, що супроводжують закиснення, є визначальними моментами скорочення [7].

Відомо також, що скорочувальний апарат м'язової клітини на різних рівнях своєї організації є чутливим до зміни рН. Більше того, кожний тип м'язових волокон має специфічний діапазон рН, в якому функціонує міофібрилярна АТФаза. За межами цього діапазону АТФаза не активується і продукти реакції не утворюються. Так, Potma і співавт. [13] досліджували вплив рН в діапазоні 6,4 – 7,9 на АТФазну активність міофібрил і силу скорочення в ізометричному режимі поодиноких волокон швидких і повільних м'язів щура. За контрольні умови приймали значення

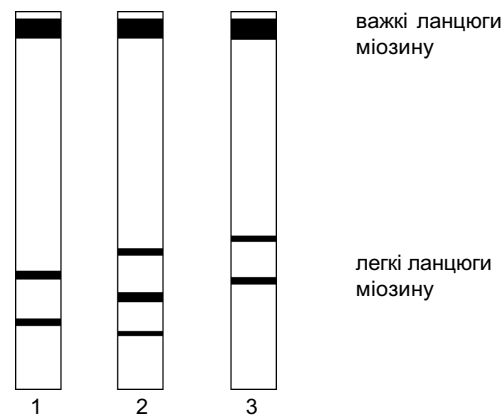


Рис. 3. Схематичне представлення електрофореграм препаратів міозину різних м'язів: 1 – гладеньких, 2 – скелетних, 3 – серцевого

pH 7,3. Вище від цих значень сила скорочення монотонно збільшувалась, АТФаза на активність міофібрил залишалася постійною для швидких м'язів, для повільних вона зменшувалася зі збільшенням pH.

При зміні умов середовища, зокрема pH, виявлено два типи конформаційних переходів у міозині [4]. Гідроліз АТФ міозином супроводжується утворенням проміжних станів, які є неоднаковими для різних типів м'язів і чутливими до зміни pH [4]. Крім того, для міозинових мономерів і полімерів методом диференційної скануючої калориметрії показано, що їх стабільність також може залежати від pH середовища [8]. Зміна pH середовища впливає і на властивості регуляторних білків м'яза: при закисненні зменшується здатність тропоніну С зв'язувати Ca^{2+} , а незначні коливання значення pH можуть зумовлювати зміни швидкості фосфорилування тропоніну І на ділянках, що знаходяться недалеко від центрів зв'язування з актином [9, 11]. Усе це може призвести до зміни взаємодії між цими білками. Отже, в результаті зміни pH всередині м'язової клітини може змінюватися функціональна активність її скорочувального апарату внаслідок змін чутливості скорочувальних і регуляторних білків м'язів до Ca^{2+} .

K.I. Bogutska, O.V. Tsimbalyuk, V.M. Danilova, M.S. Miroshnichenko

ATPASE MYOSIN ACTIVITY IN DIFFERENT MUSCLE TYPES DEPENDS ON PH

The influence of pH in the medium on ATPase myosin activity in different muscle types was investigated. It has been found that myosin ATPase had two maxima with different values of the specific activity in cardiac, skeletal and smooth muscles depending on pH, namely: 6.0-6.5 and 9.0-9.5. The dependence of physiological properties of different muscle types on the physical-chemical and structural peculiarities of myosin has being discussed.

*Shevchenko National Kyiv University, Kiev;
Palladin Institute of Biochemistry of Ukraine, Kiev*

*Київ. нац. ун-т ім. Тараса Шевченка, Київ;
Ін-т біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України, Київ*

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Богуцька К.І., Цимбалюк О.В., Данилова В.М. Особливості функціонування міозинової АТФази серцевого м'яза // Біополімери і клетка. – 2002. – **18**, № 4. – С. 297 – 300.
2. Данилова В.М., Трегубов В.С. Сравнительное изучение структурно-функциональных свойств миозина скелетных и гладких мышц млекопитающих // Мол. генетика и биофизика. – 1988. – № 13. – С. 88 – 95.
3. Левицкий Д.И. Легкие цепи миозина и их роль в регуляции мышечного сокращения // Успехи биологической химии. – 1986. – **27**. – С. 74 – 100.
4. Леднев В.В. Конформеры миозина и их возможная роль в функционировании сократительного аппарата мышц. – В кн.: Контроль мышечной деятельности. – Л.: Наука, 1986. – С. 101 – 127.
5. Поглазов Б.Ф., Левицкий Д.И. Миозин и биологическая подвижность. – М.: Наука, 1982. – 160 с.
6. Халина Я.Н., Подлубная З.А. Состав легких цепей миозина миокарда человека: перспективы для диагностики заболеваний сердца // Биофизика. – 2002. – **47**, вып. 2. – С. 367 – 368.
7. Adhikari B.V., Somerset J., Stull J.T., Fajer P.G. Dynamic modulation of the regulatory domain of myosin heads by pH, ionic strength and RLC phosphorylation in synthetic myosin filaments // Biochemistry. – 1999. – **38**, № 10. – P. 3127 – 3132.
8. Bertazzon A., Tsong T.Y. Effects of ions and pH on the thermal stability of thin and thick filaments of skeletal muscle: high-sensitivity differential scanning calorimetric study // Ibid. – 1990. – **29**, № 27. – P. 6447 – 6452.
9. Dargis R., Pearlstone J.R., Barrette-Ng I. et al. Single mutation (A162H) in human cardiac troponin I corrects acid pH sensitivity of Ca^{2+} -regulated actomyosin S1 ATPase // J. Biol. Chem. – 2002. – **277**, № 38. – P. 34662 – 34665.
10. Davis J.S., Satorius C.L., Epstein N.D. Kinetic effects of myosin regulatory light chain phosphorylation on skeletal muscle contraction // Biophys. J. – 2002. – **83**, № 1. – P. 359 – 370.
11. Li G., Martin A.F., Solaro J.R. Localization of regions of troponin I important in deactivation of cardiac myofilaments by acidic pH // J. Mol. Cell Cardiol. – 2001. – **33**, № 7. – P. 1309 – 1320.
12. Orchard C.H., Kentish J.C. Effects of changes of pH on the contractile function of cardiac muscle // Amer. J. Physiol. – 1990. – **258**, № 6 (Pt 1). – P. C967 – C981.
13. Potma E.J., van Graas I.A., Stienen G.J. Effects of pH on myofibrillar ATPase activity in fast and slow skeletal muscle fibers of the rabbit // Biophys. J. – 1994. – **67**, № 6. – P. 2404 – 2410.
14. Sieck G.C., Regnier M. Invited review: plasticity and energetic demands of contraction in skeletal and cardiac muscle // J. Appl. Physiol. – 2001. – **90**, № 3. – P. 1158 – 1164.

Матеріал надійшов до редакції 02.06.2003