

В.М. Данилова, К.І. Богуцька, А.М. Шут, Ю.І. Прилуцький

Вплив змін рН на АТФазну активність міозину скелетних м'язів

Исследована зависимость АТФазной активности миозина скелетных мышц от рН среды, а также проведено математическое моделирование АТФ-гидролазной биохимической реакции при изменении рН среды мышечных волокон.

ВСТУП

На фізіологічному рівні існують деякі механізми, які обмежують м'язову активність, наприклад психо-емоційне стомлення, блок нервово-м'язової передачі, порушення електромеханічного спряження через дисбаланс катіонів, розвиток гіпоксії [5, 8, 15]. На внутрішньомолекулярному рівні також можна виділити фактори, відповідальні за розвиток стомлення. Так, у процесі м'язової діяльності утилізація АТФ істотно прискорюється, що потребує мобілізації всіх ланцюгів енергетичного обміну для відновлення Na^+/K^+ -балансу, акумуляції Ca^{2+} саркоплазматичним ретикулумом і забезпечення функціонування актоміозинової АТФази. Дані літератури свідчать, що при цьому у внутрішньоклітинний простір продукуються іони водню, через що знижується рН цитоплазми порівняно з позаклітинним простором [5]. Відомо також, що активність багатьох ферментних систем, обміну іонів і скорочувальної здатності клітин безпосередньо залежить від значення рН.

При розгляді лімітуючих ланцюгів енергетичного обміну під час метаболічного стомлення враховують співвідношення сили та часу, протягом якого система здатна функціонувати в стаціонарному режимі

при заданому навантаженні. Тривалість роботи у цьому режимі обмежується механізмом, пов'язаним з пригніченням АТФаз міозину та саркоплазматичного ретикулула протонами, що накопичуються у клітині. У зв'язку з цим деякі дослідники вважають, що основним обмежувачем працездатності при субмаксимальних м'язових навантаженнях є ацидоз, при якому внутрішньоклітинний рівень рН знижується до 6,3–6,5 [12, 16]. Деякі факти свідчать на користь того, що зниження рН у м'язовій клітині може гальмувати енергопродукцію та утилізацію АТФ, порушувати процес електромеханічного спряження і, власне, роботу скоротливого апарату [23]. Значну роль у підтриманні м'язового скорочення та цілісності структури м'язових клітин відіграє стабілізація рівня рН, яка забезпечується різними буферними системами і, в першу чергу, буферною ємністю, що складається з хімічних буферних систем та деяких механізмів, які використовують протон при АТФ-синтезних реакціях [14, 17, 19].

Скорочення–розслаблення м'язів являє собою динамічний коливальний процес, який складається із взаємопов'язаних і взаємозумовлених фізико-хімічних реакцій [6]. Характерною особливістю цього процесу є зміна рівня рН середовища внаслідок

виділення протонів під час АТФазної реакції міозину. Збільшення концентрації протонів сприяє пригніченню активації іонами кальцію процесу актин-міозинової взаємодії, тобто закиснення середовища є причиною зниження сили м'язового скорочення. Зміна рН середовища може супроводжуватись структурними та функціональними змінами основного скорочувального білка – міозину, а також впливати на поведінку та взаємодію макромолекул у розчині [11, 21].

Метою нашої роботи було експериментальне дослідження залежності АТФазної активності міозину скелетних м'язів від рівня рН середовища та проведення математичного моделювання, яке описує хід АТФ-гідролазної біохімічної реакції при зміні рН середовища у м'язовому волокні.

МЕТОДИКА

Досліджували міозин, виділений зі скелетних м'язів кроля за загальноприйнятими методиками, описаними раніше [1]. Активність міозинової АТФази вимірювали при 37 °С в інкубаційному середовищі (загальний об'єм 1,8 мл) такого складу: імідазол – 20 ммоль/л, рН 7,5, CaCl_2 – 5 ммоль/л, ДТТ – 0,5 ммоль/л, АТФ – 1 ммоль/л, KCl – 0,5 моль/л, білок – 0,14 мг/мл. При дослідженні рН-залежності Ca^{2+} -АТФазної активності міозину в діапазоні значень рН від 5,5 до 11,0 використовували такі буферні суміші: NaOH -малеатна – слабкокіслі значення рН, тріс- HCl – нейтральні та слабколужні рН, гліцин- NaOH – у зоні лужних рН. Кількість неорганічного фосфату, що утворився при гідролізі АТФ, визначали за методом Фіске–Суббароу.

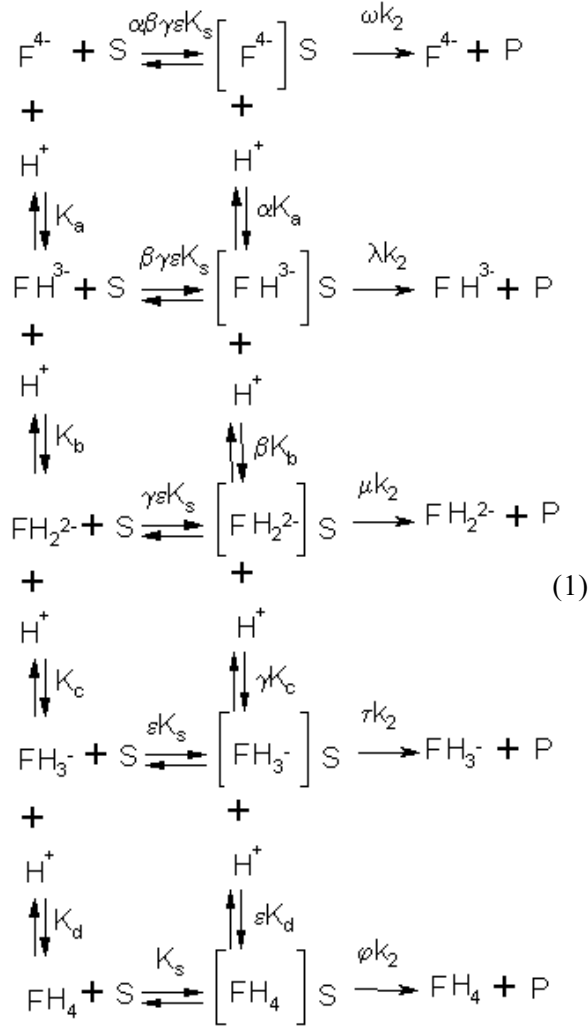
РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Одержані нами результати, наведені на рис. 1, свідчать про те, що зміна рН середовища супроводжується характерною зміною Ca^{2+} -АТФазної активності міозину скелетних м'язів. Нами виявлено два максимуми

цієї активності: при рН 6–6,5 та 9–9,5, які різняться між собою за абсолютними значеннями, і один мінімум – у зоні фізіологічних значень рН (7,0–8,5). Водночас з літературних джерел відомо, що при наявності ЕДТА, тобто за відсутності двовалентних катіонів, крива рН-залежності так званої ЕДТА-АТФазної активності міозину скелетних м'язів має лише один максимум, розташований у діапазоні або лужних рН (при наявності K^+), або кислих рН (при наявності NH_4^+) [7]. Отже, хід АТФ-гідролазної реакції міозину залежить як від рН середовища, так і від різних катіонів, а сама крива рН-залежності при цьому може відображувати механізм гідролізу субстрату в активному центрі міозину та значення катіонів для цього процесу.

Проведене нами математичне моделювання, яке описує АТФ-гідролазну біохімічну реакцію при зміні рН у м'язовому волокні, узгоджується з наведеними вище експериментальними даними.

Як відомо [7], класична схема, яка описує механізм взаємодії ферментативного білка з двома іонами водню, призводить до появи єдиного локального максимуму на кривій залежності максимальної швидкості ферментативної реакції від рівня рН. Тому можна припустити, що участь чотирьох іонів водню у такому ферментативному процесі ініціюватиме появу двох локальних максимумів. У цьому разі схема 1, яка віддзеркалює сукупність відповідних реакцій, має такий вигляд: (1), де F – ферментативний білок, S та P – субстрат та продукт ферментативної реакції відповідно; FS – подвійний „комплекс Міхаеліса” „білок – субстрат” ферментативної реакції, FH – подвійний комплекс „білок-іон водню” і FHS – потрійний „комплекс Міхаеліса” „білок-іон водню-субстрат”; K_s – субстратна константа для стадії утворення потрійного комплексу $[\text{FH}_4]\text{S}$ (ця константа є кількісною мірою спорідненості субстрату S до подвійного комплексу „білок-іон водню”), ϵK_s , $\gamma \epsilon K_s$, $\beta \gamma \epsilon K_s$ і $\alpha \beta \gamma \epsilon K_s$ –



субстратні константи для стадій утворення потрійних комплексів $[FH_3^-]S$, $[FH_2^{2-}]S$, $[FH^{3-}]S$ і $[FH_4]S$ з відповідними коефіцієнтами модифікації $\alpha, \beta, \gamma, \epsilon$; K_a, K_b, K_c і K_d – константи для стадій утворення подвійних комплексів $[FH_3^-]$, $[FH_2^{2-}]$, $[FH^{3-}]$ і $[FH_4]$ відповідно, які характеризують спорідненість іонів водню до ферментативного білка F; $\alpha K_a, \beta K_b, \gamma K_c$ і ϵK_d – константи

для стадій утворення потрійних комплексів $[FH_3^-]S$, $[FH_2^{2-}]S$, $[FH^{3-}]S$ і $[FH_4]S$ з відповідними коефіцієнтами модифікації $\alpha, \beta, \gamma, \epsilon$; $\omega k_2, \lambda k_2, \mu k_2, \tau k_2$ і ϕk_2 – константи розпаду („число обертів”) комплексів $[F^{4-}]S$, $[FH^{3-}]S$, $[FH_2^{2-}]S$, $[FH_3^-]S$ і $[FH_4]S$ з відповідними коефіцієнтами модифікації $\omega, \lambda, \mu, \tau, \phi$ у напрямку необоротного вивільнення продукту P ферментативної реакції.

Зазначимо, що наявність коефіцієнтів модифікації α, β, γ і ϵ безпосередньо впливає із застосування закону збереження вільної енергії Гіббса ΔG , записаного у формі класичного рівняння Вант–Гоффа, до циклічного фрагмента реакції (1), який віддзеркалює два паралельні шляхи переходу від стану білка F^{4-} до стану потрійного комплексу „білок-іон водню-субстрат” $[FH_4]S$ (2), де ΔG – зміни вільної енергії на окремих стадіях реакції (1).

Залучення до схеми 1 закону діючих мас разом із принципом незалежного проходження реакцій після громіздких перетворень дає змогу записати загальний вираз для максимальної швидкості ферментативної реакції $\langle V_{0, \max} \rangle$ як функції $h=10^{-pH}$ у такому вигляді: (3), де f_0 – загальна концентрація речовини в реакції (1).

Як бачимо, величина $\langle V_{0, \max} \rangle$ є складною функцією змінної h і залежить від значень великої кількості невідомих кінетичних показників. Чисельне моделювання рівняння (3) засвідчило, що максимальна швидкість ферментативної Ca^{2+} -АТФазної реакції $\langle V_{0, \max} \rangle$ як функція h може мати три дійсних додатніх локальних екстремуми, а саме єдиний мінімум та два максимуми (рис. 2). Отже, отримана теоретична крива в рамках запропонованої кінетичної моделі цієї реакції

$$\begin{aligned}
 & \Delta G_{F^{4-} \rightarrow FH^{3-}} + \Delta G_{FH^{3-} \rightarrow FH_2^{2-}} + \Delta G_{FH_2^{2-} \rightarrow FH_3^-} + \Delta G_{FH_3^- \rightarrow FH_4} + \\
 & + \Delta G_{FH_4 \rightarrow FH_4S} = \Delta G_{F^{4-} \rightarrow F^{4-}S} + \Delta G_{F^{4-}S \rightarrow FH^{3-}S} + \Delta G_{FH^{3-}S \rightarrow FH_2^{2-}S} + \\
 & + \Delta G_{FH_2^{2-}S \rightarrow FH_3^-S} + \Delta G_{FH_3^-S \rightarrow FH_4S},
 \end{aligned} \quad (2)$$

$$\frac{\langle V_{0, \max} \rangle}{f_0 k_2} = \frac{\left(\omega + \frac{h\lambda}{\alpha K_a} + \frac{h^2 \mu}{\alpha \beta K_a K_b} + \frac{h^3 \tau}{\gamma \alpha \beta K_a K_b K_c} + \frac{h^4 \varphi}{\gamma \alpha \beta \epsilon K_a K_b K_c K_d} \right)}{\left(1 + \frac{h}{\alpha K_a} + \frac{h^2}{\alpha \beta K_a K_b} + \frac{h^3}{\gamma \alpha \beta K_a K_b K_c} + \frac{h^4}{\gamma \alpha \beta \epsilon K_a K_b K_c K_d} \right)} \quad (3)$$

якісно корелює з результатами експерименту, зображеного на рис. 1: тестується фаза підвищення АТФазної активності до деякої максимальної точки, далі – фаза падіння її до мінімуму і знову підвищення ферментативної активності до максимуму з подальшим спаданням кривої.

Таким чином, ми отримали теоретичне обґрунтування експериментальних результатів, які свідчать про важливе значення рівня рН усередині клітини для функціонування скоротливих білків, зокрема міозину.

Зміна рН у м'язовій клітині супроводжується не тільки зміною АТФазної активності міозину, але також локальними конформаційними змінами в його молекулі, що було зафіксовано такими конформаційно-чутливими методами як двошхвильовий

флуоресцентний метод, флуоресценція гідрофобного зонда ANS, власна флуоресценція міозину [2, 3]. Тобто не тільки функціональні характеристики міозину, але і його структурний стан залежать від рівня рН середовища.

У дослідях з використанням методів кругового дихроїзму та диференціальної скануючої калориметрії при вивченні впливу рН на фолдінг і стабільність стрижня міозину було показано, що в діапазоні значень рН 2–11 білок зберігає свою спіральність, але стабільність при цьому порушується [10, 11, 20]. Білок за наявності денатурантів має більшу стабільність при кислих значеннях рН, що може бути зумовлено розташуванням або доступністю здатних до протонування амінокислотних залишків на поверхні двох α -спіральних ланцюгів молекули міозину.

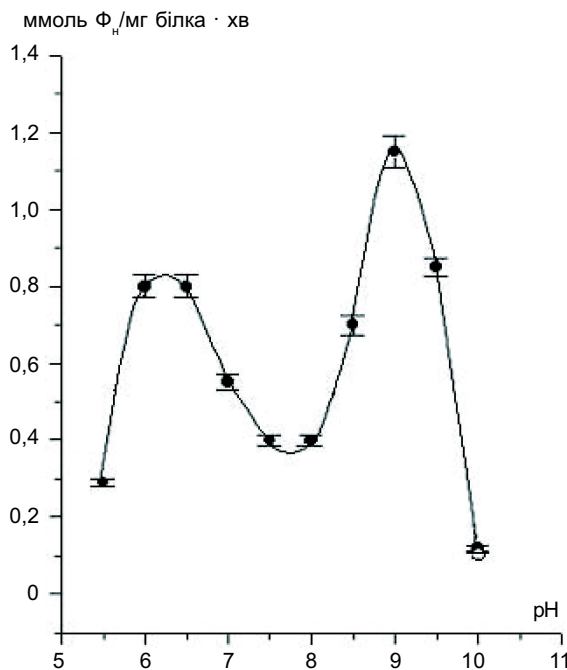


Рис. 1. Залежність Ca^{2+} -АТФазної активності міозину скелетних м'язів кроля від рН середовища

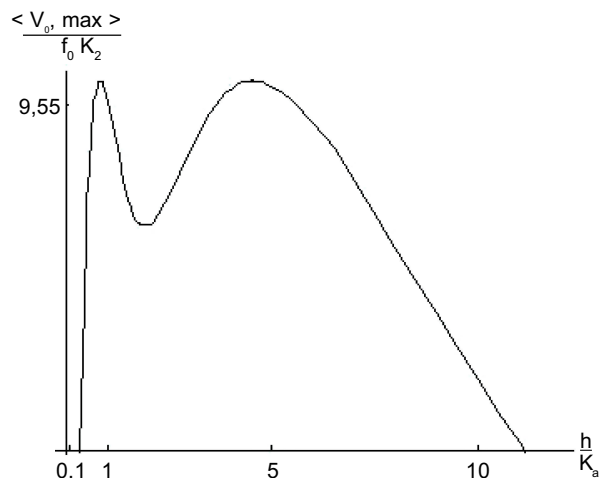


Рис. 2. Розрахована за формулою (3) залежність нормованої максимальної швидкості ферментативної реакції ($\frac{\langle V_{0, \max} \rangle}{f_0 K_2}$) від нормованого показника h/K_a у припущенні $K_b=K_c=K_a=3$, $K_d=4$ і таких значеннях кінетичних параметрів: $\alpha=0,6$, $\beta=0,4$, $\gamma=0,8$, $\epsilon=0,7$, $\omega=0,7$, $\lambda=1,29$, $\mu=0,27$, $\tau=1,17$ і $\varphi=0,7$

Як уже зазначалося, для м'язового волокна характерним є закиснення середовища, яке супроводжує процес скорочення м'яза. У зв'язку з цим обговорюється можлива функціональна роль такого ефекту та запропоновано моделі скорочення, в яких структурні зміни в молекулах міозину, що спостерігаються при закисненні, є визначальними моментами скорочення [9]. Так, наприклад модель Харінгтона, згідно з якою в процесі скорочення у фрагменті стрижня міозину S2 відбувається швидкий перехід спіраль-клубок [22]. За деякими припущеннями, в основі генерації сили відбуваються конформаційні переходи фібрилярного фрагмента S2 міозину в локальних шарнірних ділянках. На користь цього свідчать результати, одержані в роботі [4], в якій показано, що при зміні умов середовища, а саме рН і температури, відбуваються конформаційні зміни, які проявляються в експонуванні пептидних зв'язків у шарнірних ділянках фрагмента S2 стрижня міозину.

Зміна рН середовища впливає і на властивості регуляторних білків м'яза: при закисненні зменшується здатність тропоніну С зв'язувати Ca^{2+} , а незначні коливання значень рН можуть зумовлювати зміни швидкості фосфорилування тропоніну І на ділянках, що знаходяться недалеко від центрів зв'язування з актином на молекулі тропоніну І [13, 18]. Усе це може призвести до зміни взаємодії між цими білками. Отже, внаслідок зміни рН усередині м'язової клітини може змінюватися як функціональна активність її скорочувального апарату, так і чутливість скорочувальних регуляторних білків до Ca^{2+} .

ВИСНОВКИ

Одержані результати, по-перше, розширюють існуючі уявлення про вплив рН середовища на функціонування скорочувальних білків м'язів і тим самим наближують до розуміння молекулярних меха-

нізмів м'язового скорочення. По-друге, вони можуть бути корисними при розробці методів корекції можливих м'язових патологій, зокрема ішемії, гіпоксії, титанії та ін., що виникають при порушенні або зміні гомеостазу у міоцитах. І, нарешті, проведене нами математичне моделювання свідчить про те, що швидкість реакції ферментативного розщеплення АТФ міозином змінюється залежно від кількості іонів водню, яка може бути задіяна у цьому процесі. Запропонований метод дає можливість дослідникам мати чітку картину механізму взаємодії ферментативного білка з іонами водню, що можна використати при розробці методів корекції м'язових патологій, пов'язаних із проходженням АТФ-гідролазної біохімічної реакції при зміні рН у м'язовому волокні.

V.M. Danilova, K.I. Bogutska,
A.M. Shut, Yu.I. Prylutsky

EXPERIMENTAL AND THEORETICAL STUDIES OF pH INFLUENCE ON THE ATP-HYDROLASE'S REACTION OF THE SKELETAL MUSCLES MYOSIN IN THE CONTEXT OF UNDERSTANDING THE MOLECULAR MECHANISMS OF THE MUSCLE CONTRACTION

The influence of pH medium on ATP-ase activity of skeletal muscles myosin has been investigated. The mathematical simulation, which reflects the ATP-hydrolase biochemical reactions after pH medium changes in the muscular fiber was also carried out.

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

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. 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.
2. Зима В.Л. Белковые моторы: структура и генерация силы // Укр. биохим. журн. – 1998. – 70, №3. – С. 23–38.
3. Зима В.Л., Данилова В.М., Мінченко П.Г., Богач П.Г. Флуоресцентне вивчення взаємодії міозину з АТФ. Вплив температури і рН // Доп. АН УРСР. Серія "Б". – №5. – С.448–452.

4. Купагадзе Р.М., Симоишвили С.О., Куридзе К.Ш. и др. Изучение конформационных изменений миоинового стержня. – В кн.: Материалы II Съезда биофизиков России. – 1999. – С. 245–247.
5. Маевский Е.И., Розенфельд А.С. Некоторые факторы, ответственные за утомление мышечной клетки при АТФазных нагрузках. – В кн.: Сб. трудов Второй всерос. Конф. «Физика в биологии и медицине». – 2004. – С. 101–104.
6. Мирошниченко Н.С., Шуба М.Ф. Динамика физико-химических процессов при сокращении–расслаблении скелетной мышцы // Докл. АН УССР. Серия “Б”. – 1988. – №1. – С. 73–75.
7. Поглазов Б.Ф., Левицкий Д.И. Миозин и биологическая подвижность. – М.: Наука, 1982. – 160 с.
8. Физиология человека: В 3-х т.: Пер. с англ. / Под ред. Р.Шмидта, Г.Тевса. – М.: Мир, 1996. – Т. 1. – 323 с., Т. 2. – 313 с., Т. 3. – 198 с.
9. Adhikari B.B., 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.
10. Asllani I., Shankland E., Pratum T., Kushmerick M. Effects of pH and molecular charge on dipolar coupling interactions of solutes in skeletal muscle observed by DQF, ¹H NMR spectroscopy // J. Magn. Reson. – 2003. – **163**, №1. – P. 124–132.
11. Bertazzon A., Tsong T.Y. Study of effects of pH on the stability of domains in myosin rod by high-resolution differential scanning calorimetry // Biochemistry. – 1990. – **29**, №27. – P. 6453–6459.
12. Green H.J. Mechanisms of muscle fatigue in intense exercise // J. Sports Sci. – 1997. – **15**, №3. – P. 247–256.
13. Ingraham R.H., Swenson C.A. Stability of the Ca²⁺-specific and Ca²⁺-Mg²⁺ domains of troponin C. Effect of pH // Eur. J. Biochem. – 1983. – **132**, №1. – P. 85–88.
14. Jeneson J.A., Westerhoff H.V., Kushmerick M.J. A metabolic control analysis of kinetic controls in ATP free energy metabolism in contracting skeletal muscle // Amer. J. Physiol. Cell Physiol. – 2000. – **279**, №3. – P. C813–832.
15. Juel C. Lactate/proton co-transport in skeletal muscle: regulation and importance for pH homeostasis // Acta Physiol. Scand. – 1996. – **156**, №3. – P. 369–374.
16. Juel C. Muscle pH regulation: role of training // Ibid. – 1998. – **162**, №3. – P. 359–366.
17. Korzeniewski B., Zoladz J.A. Influence of rapid changes in cytosolic pH on oxidative phosphorylation in skeletal muscle: theoretical studies // Biochem. J. – 2002. – **365**, Pt.1. – P. 249–258.
18. Metzger J.M. Effects of troponin C isoforms on pH sensitivity of contraction in mammalian fast and slow skeletal muscle fibres // J. Physiol. – 1996. – **492**, Pt.1. – P. 163–172.
19. Miyake S., Ishii Y., Watari T. et al. The influences of L⁺-lactate and pH on contractile performance in rabbit glycerinated skeletal muscle // Jap. J. Physiol. – 2003. – **53**, №6. – P. 401–409.
20. Ozog A., Bechet J.J. The effect of pH on the folding and stability of the myosin rod // Eur. J. Biochem. – 1995. – **234**, №2. – P. 501–505.
21. Tsunashima Y., Akutagawa T. Structure transition in myosin association with the change of concentration: solubility equilibrium under specified KCl and pH condition // Biopolymers. – 2004. – **75**, №3. – P. 264–277.
22. Ueno H., Harrington W.F. An enzyme-probe study of motile domains in the subfragment-2 region of myosin // J. Mol. Biol. – 1984. – **180**, №3. – P. 667–701.
23. Ueno S., Yokoyama K., Nakagawa M., Araki S. Effects of pH and temperature on force and stiffness of skeletal muscle fibers during contraction and relaxation in relation to musculoskeletal disorders // Ind. Health. – 2002. – **40**, №4. – P. 362–369.

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

*Матеріал надійшов до
редакції 28.07.2005*