

այն է, երբ դիպոլի առանցքն ուղղահայաց է բաժանման սահմանին: Հաշված է դիպոլային մոլեկուլի մի ֆազից մյուսին անցնելու ազատ էներգիան: Գտնրված է դիպոլային մոլեկուլի էներգետիկ պրոֆիլը երկու ֆազերի բաժանման սահմանում: Ջրի մոլեկուլի համար կատարված է տեսական բանաձևի համեմատում էքսպերիմենտալ տվյալների հետ:

## ENERGETIC PROFILE OF DIPOLE MOLECULES ON THE BORDER OF SEPARATION OF TWO PHASES

V. B. ARAKELIAN, S. B. ARAKELIAN

The dipole potential, located on the border of separation of two phases, has been calculated. The dipole position is stable when the dipole axis is perpendicular to the border of separation. The free energy of dipole molecule transfer from one phase to another, as well as the energetic profile of dipole molecules on the border of separation of two phases are measured. The comparison of theoretical formulae and experimental data is carried out for water molecules.

### Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Айтян С. Х., Духин С. С., Чизмаджев Ю. А. Электрохимия, 13, 779—783, 1977.
2. Ивков В. Г., Берестовский Г. Н. Динамическая структура липидного бислоя. М., 1981.
3. Кубо Р. Статистическая механика. М., 1967.
4. Пастушенко В. Ф., Чизмаджев Ю. А. Бисфизика, 24, 3, 458—463, 1981.
5. Fettiplace R., Haydon D. A. Physiological Reviews, 60, 2, 510—550, 1980.
6. Fettiplace R. Biochim. et biophys. acta., 513, 1, 1—10, 1978.
7. Kirkwood J. G. J. chem. Phys., 2, 51, 1934.
8. Lawaczeck R. Ann. Meet. Dtsch. Ges. Biophys., Abstr. Poster. Present. Berlin, 1979.
9. Neumcke B., Läuger P. Biophys., J., 9, 1160—1170, 1969.
10. Parsegian V. A. Annals N. Y., Acad. Sciences, 264, 161—174, 1975.
11. Tien H. T. Bilayer Lipid Membranes Dekker., N. Y., 1974.

«Биолог. ж. Армении», т. XXVI, № 7, 1983

УДК 612.014.4:612.73.74

## ОСОБЕННОСТИ КАЛЬЦИЕВОЙ РЕГУЛЯЦИИ АКТИН-МИОЗИНОВОГО ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ В БЫСТРЫХ И МЕДЛЕННЫХ СКЕЛЕТНЫХ МЫШЦАХ

Б. А. ТИКУНОВ

Изучены флуоресцентные свойства и реакция суперпреципитации нативного и десенситизированного актомиозина из разных типов скелетных мышц белых крыс. Выявлены существенные различия в кинетике суперпреципитации, а также в характере модуляции ее скорости и максимума собственной флуоресценции актомиозина быстро и медленносокращающихся мышц ионами Са. Предполагается, что в актомиозине

медленных мышц, в отличие от быстрых, помимо тропонин-тропомиозинового комплекса, в регуляцию актин-миозинового взаимодействия в присутствии ионов  $Ca$  включаются также ДНБ-чувствительные цепи миозина.

*Ключевые слова:* скелетные мышцы, актин-миозиновое взаимодействие,  $Ca^{2+}$ -регуляция.

Согласно современным представлениям, взаимодействие актина (А) с миозином (М) в мышцах опосредованно регулируется ионами  $Ca$  через регуляторные белковые компоненты. Ингибиторный эффект тропонина (ТН) или легких цепей миозина (ЛЦ) снимается в результате связывания  $Ca^{2+}$ , и становится возможным непосредственный контакт А с М [14]. В зависимости от того, как осуществляется модулирующее действие  $Ca^{2+}$ -через ТН или ЛЦ миозина, различают соответственно актиновый и миозиновый типы регуляции.

Актиновый тип регуляции предполагает индуцирование конформационных переходов в ТН ионами  $Ca$  в концентрациях выше  $10^{-7}$  М [15], индуктивно-резонансную передачу конформационной волны на тропомиозин (ТМ) и деблокировку М-связывающих центров А. Подобная схема считается классической и представляется как основной механизм контроля функциональной активности сократительного белкового аппарата скелетных мышц позвоночных [7, 10].

Миозиновая регуляция, протекающая с участием ЛЦ, обнаружена у моллюсков и в гладкой мускулатуре высших животных, однако роль  $Ca^{2+}$ -чувствительных ДНБ-ЛЦ миозина в скелетных мышцах окончательно не выяснена [2]. Так, большинство авторов придерживается мнения, согласно которому этот механизм регуляции в поперечно-полосатых мышцах либо отсутствует вообще, либо очень слабо представлен [1]. Вместе с тем имеются данные, подчеркивающие отнюдь не второстепенную роль последней, даже в присутствии тропонин-тропомиозинового (ТН-ТМ) комплекса [13].

Однако в этих работах не предполагалось сравнительного изучения удельной роли ЛЦ-регуляции в мышцах различного функционального профиля, хотя известно, что набор ЛЦ миозина обнаруживает типовые различия как в отношении свойств самих ЛЦ, так и в их стехиометрии [8, 21]. Более того, различная филогенетическая принадлежность красных и белых мышц наводит на мысль о неодинаковой значимости миозинового типа регуляции в этих мышцах.

В настоящей работе были изучены особенности взаимодействия А и М красных и белых мышц крыс, вызываемого добавлением АТФ в белковый раствор при физиологических значениях ионной силы (реакция суперпреципитации—СПП), а также изменение флуоресцентных свойств препаратов актомиозина в зависимости от концентрации  $Ca^{2+}$  в среде.

*Материал и методика.* Эксперименты проводили на белых крысах линии «Вистар». Были исследованы медленносокращающиеся красные скелетные мышцы КМ и МГТМ (камбаловидная и медиальная головка трехглавой мышцы) и быстрые белые мышцы ДРП и ПЛМ (длинный разгибатель пальцев и плечеглавая мышца).

Нативный актомиозин (НАМ) получали по методу [19] с последующим ультрацентрифугированием при 20000 g. Путем многократного щелочного промывания суспензии НАМ получали  $Ca^{2+}$ -нечувствительный десенситизированный актомиозин (ДАМ), лишенный ТН—ТМ комплекса [18].

Чистоту белковых препаратов проверяли электрофоретически на ПААГ [22] и по спектрам УФ-светопоглощения. Концентрацию белка в растворе определяли по методу Лоури и спектрофотометрически, по калибровочным кривым, построенным на сухих препаратах белков.

Кинетические кривые реакции суперпреципитации регистрировали по изменению мутности белковой суспензии после добавления АТФ. Скорость процесса определяли как тангенс угла наклона прямолинейного участка кривой СПП.

Непрерывные спектры собственной флуоресценции белковых препаратов записывали на однолучевом УФ-спектрофлуориметре «Farrand», марки МК-1 (США).

*Результаты и обсуждение.* На рис. 1 представлены кинетические кривые СПП НАМ белых и красных мышц. В момент добавления субстрата ( $Mg^{2+}$ -АТФ) происходит быстрое уменьшение мутности белкового раствора (фаза просветления), более сильно выраженное на препаратах НАМ белых мышц. Предполагается, что фаза просветле-

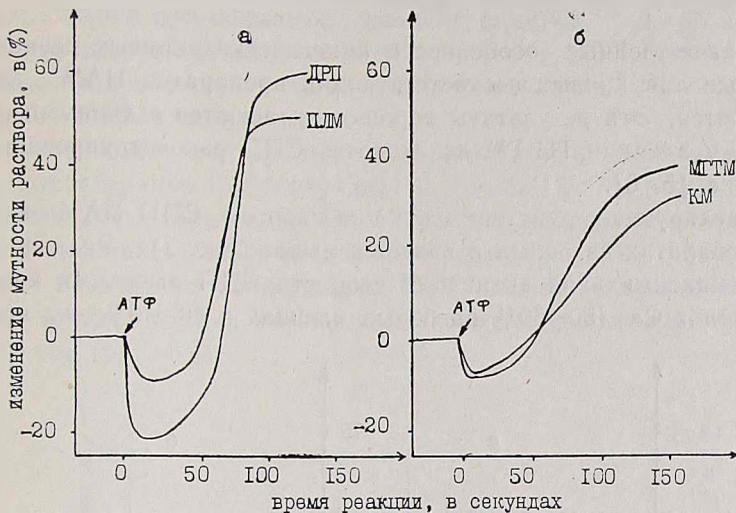


Рис. 1. Кинетические кривые реакции СПП НАМ белых (а) и красных (б) скелетных мышц крысы. Инкубационная смесь: 0,15 М КСl, 2 мМ Трис-НСl,  $\beta$ -меркаптоэтанол, 0,1 мМ  $Ca^{2+}$ -ЭГТА буфер, 0,5 мМ  $MgCl_2$ , 0,5 мМ АТФ, рН 7,4;  $C_{НАМ} = 0,5$  мг/мл. Условия эксперимента:  $\lambda_{рег.} = 660$  нм,  $t = 25^\circ C$ .

ния является результатом диссоциации АМ комплекса при связывании АТФ и необходима для дальнейшего протекания СПП, так как при этом происходит переход М в конформационно-активное состояние [11]. По мере гидролиза АТФ увеличивается количество неорганического фосфата и АДФ в среде, что стимулирует наступление следующей стадии— собственно СПП (восходящий участок кривых), при котором происходит образование комплекса актин-миозин.

Как следует из таблицы, скорость СПП НАМ быстросокращающихся мышц ПЛМ и ДРП значительно выше таковой, рассчитанной для препаратов белка, выделенных из медленных мышц КМ и МГТМ. Кинетические кривые СПП НАМ красных мышц как бы «вытянуты» в меридиональном направлении и завершение процесса обозначено менее четко (рис. 1 б).

После удаления регуляторного ТН-ТМ комплекса несколько укорачивается фаза просветления и повышается скорость СПП (см. табл.),

Таблица

Значения скорости СПП НАМ и ДАМ разных типов скелетных мышц крыс

Тип мышцы	Белок	Скорость СПП (абс. ед.)	n	p
ДРП	НАМ	24,5±1,12	5	p<0,01
	ДАМ	27,0±0,70	6	
ПЛМ	НАМ	20,1±1,31	6	p<0,001
	ДАМ	25,5±1,00	7	
МГТМ	НАМ	5,5±0,56	6	p<0,001
	ДАМ	8,0±0,45	7	
КМ	НАМ	4,5±0,32	5	p<0,001
	ДАМ	6,0±0,22	6	

Инкубационная смесь и условия экспериментов те же, что к рис. 1. n—число опытов, M±m, p—достоверность различий.

однако качественные особенности кинетических кривых реакции, характерные для кривых соответствующих препаратов НАМ, при этом сохраняются. Эти результаты хорошо согласуются с данными об ингибирующем влиянии ТН-ТМ на скорость СПП реконструированного актомиозина [5, 6].

Модулирующее действие  $Ca^{2+}$  на скорость СПП НАМ неодинаково в препаратах из белых и красных мышц (рис. 2). Различна также степень максимальной активации скорости СПП высокими концентрациями ионов Ca (50—60% на белых мышцах и 40—45% —на красных).

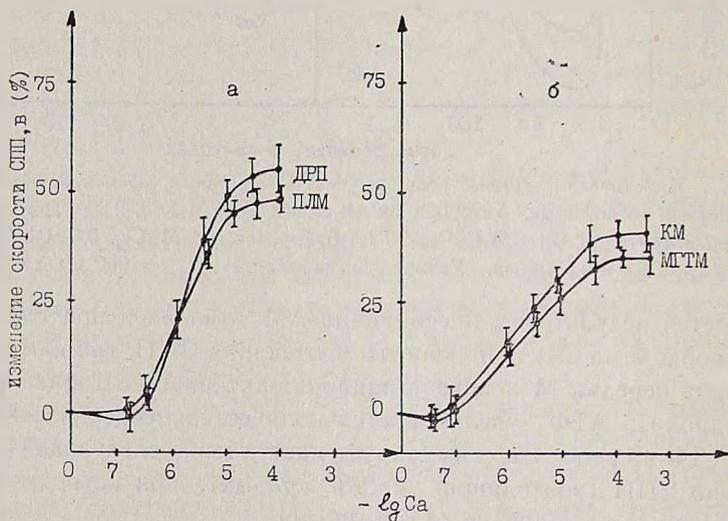


Рис. 2. Зависимость скорости СПП НАМ белых (а) и красных (б) скелетных мышц крыс от концентрации  $Ca^{2+}$  в среде. Инкубационная смесь и условия эксперимента те же, что к рис. 1.

Особого внимания заслуживает тот факт, что интервал наиболее эффективно действующих концентраций  $Ca^{2+}$  гораздо уже для препаратов НАМ из ДРП и ПЛМ ( $pCa$  7,0÷5,5), чем для КМ и МГТМ ( $pCa$  8,5÷4,0). При этом заметное увеличение скорости СПП НАМ быстрых мышц начинается при больших, а выход на плато завершается при

меньших, чем в случае медленных мышц, концентрациях  $\text{Ca}^{2+}$ . Возможно это в какой-то степени отражает реальное поведение сократительного белкового аппарата мышц в условиях «in vivo», так как качественно аналогичные кривые зависимости величины максимума изометрического сокращения от концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  в том же диапазоне были получены на скиннированных (лишенных мембран) волокнах из ДРП и КМ [17]. Не исключается также связь с более низкой скоростью ресеквестрации  $\text{Ca}^{2+}$  саркоплазматическим ретикулом красных мышц по сравнению с таковой белых [16, 24].

Как уже отмечалось выше, при связывании  $\text{Ca}^{2+}$  тропонином индуцируемые конформационные изменения приводят к увеличению интенсивности собственной флуоресценции белка [20]. Поскольку кривые, отражающие изменение максимума собственной флуоресценции НАМ белых мышц при повышении концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  в среде, схожи с соответствующими кривыми изменения скорости СПП (см. рис. 2 а и 3 а), можно предположить, что активация скорости СПП ионами  $\text{Ca}$  опосредуется ТН-ТМ комплексом.

Несколько иначе обстоит дело с препаратами из красных мышц. Уже при концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  порядка  $10^{-5} \div 5 \times 10^{-5}$  М рост максимума собственной флуоресценции НАМ красных мышц прекращается, в то время как скорость СПП продолжает расти (рис. 2 б). Более того, дальнейшее повышение концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  вызывает нисходящий ход концевых участков кривых изменения максимума собственной флуоресценции белка (рис. 3 б).

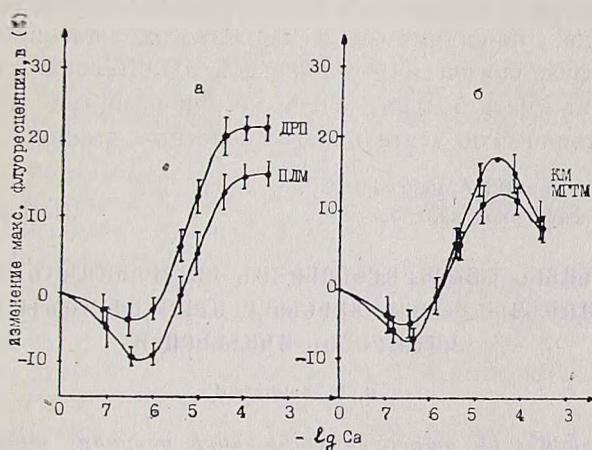


Рис. 3. Зависимость величины максимума собственной флуоресценции НАМ белых (а) и красных (б) скелетных мышц крысы от концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  в среде. Инкубационная смесь: 0,6 М КСI, 2 мМ Трис-НСI,  $\beta$ -меркаптоэтанол, 0,1 мМ  $\text{Ca}^{2+}$ -ЭГТА буфер, рН 6,8;  $C_{\text{НАМ}} = 0,5$  мг/мл. Условия эксперимента:  $\lambda_{\text{возб.}}$  = 275 нм,  $\lambda_{\text{рег.}}$  = 330 нм,  $t = 25^\circ\text{C}$ .

Таким образом, в случае НАМ красных мышц, в отличие от препаратов белых мышц, помимо восходящего участка кривых зависимости максимума флуоресценции от концентрации  $\text{Ca}^{2+}$ , обусловленного, по-видимому, конформационными изменениями в ТН-ТМ комплексе, появляется также нисходящий участок, свидетельствующий о частичном тушении собственной флуоресценции белка.

Этот феномен может быть обусловлен взаимодействием  $\text{Ca}^{2+}$  с ДТНБ-ЛЦ миозина, ион-связывающие центры которых характеризуются константами диссоциации выше  $10^{-5}$  М [3, 11]. Действительно, способность высоких концентраций ионов Са тушить триптофановую флуоресценцию ДТНБ-ЛЦ в растворе [4, 23] может привести к частичному уменьшению интегральной интенсивности собственной флуоресценции НАМ, в состав которого ЛЦ входят в молярном соотношении 2:1.

Подтверждением высказанного предположения может служить отмечаемое снижение максимума собственной флуоресценции ДАМ в области высоких концентраций  $\text{Ca}^{2+}$ , достоверно выраженное только в препаратах красных мышц. В то же время небольшая активация скорости СПП ДАМ при этих же концентрациях  $\text{Ca}^{2+}$  является прямым указанием на нетропониновую природу наблюдаемых явлений.

Таким образом, можно допустить наличие «двухступенчатого» механизма активации скорости СПП НАМ медленносокращающихся красных мышц. При концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  в среде не выше  $5 \times 10^{-5}$  М активирующий эффект ионов осуществляется так же, как и в препаратах быстрых мышц—через ТН-ТМ регуляторный комплекс. Однако дальнейшее повышение содержания  $\text{Ca}^{2+}$ , очевидно, приводит к дополнительному включению ЛЦ миозина, что, с одной стороны, проявляется в частичном тушении собственной флуоресценции НАМ, а с другой—в дальнейшей активации скорости СПП.

В заключение хочется отметить, что существование подобного механизма регуляции функциональной активности сократительных белков не исключено и на уровне целой мышцы, причем наиболее четко он представлен, по-видимому, в медленносокращающихся скелетных мышцах. В физиологических условиях дополнительная активация ЛЦ миозина может иметь большое значение при развитии длительных сокращений и тонической деятельности скелетных мышц.

Институт кардиологии МЗ Армянской ССР,  
лаборатория молекулярной кардиологии

Поступило 12.V 1983 г.

**ԱԿՏԻՆ-ՄԻՈԶԻՆԱՅԻՆ ՓՈԽՂԱՐԱԲԵՐՈՒԹՅԱՆ ԿԱՆՑԻՈՒՄԱԿԱՆ ԿԱՐԳԱՎՈՐՄԱՆ,  
ԱՌՆԱԶՆԱՂՍՏՎՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԸ ԱՐԱԳ ԵՎ ԴԱՆԿԱԿ  
ԿՄԱԽՔԱՅԻՆ ՄԿԱՆՆԵՐՈՒՄ**

Բ. Ա. ՏԻՎՈՒՆՈՎ

Ուսումնասիրվել են սպիրտակ առնետների տարբեր տիպի կմախքային մկանների ակտիվ և դեանեսիտիզացված ակտոմիոզինի լուսածորման հատկությունները և սուպերպրեցիպիտացիայի (ՍՊՊ) ռեակցիան: Պարզաբանվել են էական տարբերությունները ՍՊՊ-ի կինետիկայում, ինչպես նաև ՍՊՊ-ի մոդուլացիոն արագության և  $\text{Ca}$ -ի իոններով արագ և դանդաղ կծկվող մկանների ակտոմիոզինի լուսածորման ինտենսիվության մաքսիմումի բնույթում: Ենթադրվում է, որ ի տարբերություն արագ կծկվող մկանների, դանդաղ կծկվող մկանների ակտոմիոզինում, բացի տրոպոնին-տրոպոմիոզինային կոմպլեքսից, ակտին-միոզին փոխհարաբերության կարգավորմանը  $\text{Ca}$ -ի իոնների ներկայությամբ ներգրավում են նաև միոզինի ԴՏՆԲ-զգայուն թեթև շղթաները:

# PECULIARITIES OF CALCIUM REGULATION OF ACTIN-MYOSIN INTERACTION IN FAST AND SLOW SKELETAL MUSCLES

B. A. TIKUNOV

The fluorescent properties and superprecipitation reaction of native and desensitized skeletal muscles actomyosin of the white rats have been investigated. Differences of kinetic parameters of SPP and in SPP modulation speed and also of the maximal fluorescence of actomyosins of fast- and slow-shortening muscles by Ca ions have been observed.

The obtained results have shown, that in actomyosin of slow skeletal muscles (in distinction from that of fast muscles) in the presence of Ca<sup>2+</sup>, the regulation of actin-myosin interaction may be realized not only by troponin-tropomyosin complex, but also by means of the DTNB-sensitive light chains of myosin.

## Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Гегели Дж. В сб. Метаболизм миокарда. М., 107—118, 1979.
2. Поглазов Б. Ф., Левицкий Д. И. В кн. Миозин и биологическая подвижность. М., 66—70, 1980.
3. Тищенко В. М. 3-я Всесоюз. конф. по биохимии мышц. М., 175, 1974.
4. Caffein S. L., Werber M. M., Oplatka A. 9-th Int. Congr. Biochem. Stockholm, 116, 1973.
5. Ebashi S. E., Nonomura Y., Toyooka T. and Katayama E. In: Calcium in biological systems. № 30, 1976.
6. Ebashi S., Ebashi F. J. Biochem., 55, 443—450, 1964.
7. Gyorgyi A. G. J. Mol. Biol., 104, 747—775, 1976.
8. Hoh J. F. Y. Febs. Letters., 98, 267—270, 1979.
9. Huxley R. F. Wynn J. Arch. Biochem. and Biophys., 179, 432—443, 1977.
10. Huxley H. F. In: Molecular Basis of Motility., 26 Colloquium Mosbach, 1975, Berlin-Heidelberg Springes, Werlag.
11. Komlnz D. R. Biochemistry, 9, 1792—1797, 1970.
12. Morimoto K., Harrington W. F. J. Mol. Biol., 88, 633—709, 1974.
13. Pemrick S. J. Biol. Chem., 255, 8826—8841, 1980.
14. Perry S. V. Biochem. Soc. Trans., 7, 593—617, 1979.
15. Potter J. D., Gergely J. J. Biol. Chem., 250, 4628—4633, 1975.
16. Sreter F. A., Gergely J. J. Biochem. Biophys. Res. Commun., 16, 438—443, 1970.
17. Stephenson D. G., Forrest G. G. Biochem. et Biophys. Acta, 589, 358—362, 1980.
18. Stewart J. M., Levy H. M. J. Biol. Chem., 245, 5764—5772, 1970.
19. Straub M. C., Perry G. Biochem. J., 93, 115, 1969.
20. Van Eerd J. and Kawasaki Y. In: Calcium binding protein. Warszawa—Amsterdam, 153—178, 1974.
21. Waser P. G. Biochim. et Biophys. Acta, 410, 267—270, 1979.
22. Weber K., Osborn M. J. Biol. Chem., 244, 4406—4412, 1969.
23. Werber M. M., Caffein S. L. and Oplatka A. Mechanochem. Cell. Motility., 1, 91—96, 1972.
24. Yamamoto T., Takayi M., Nagai T. J. Physiol., 20, 424—432, 1970.