

Н. Б. ГУСЕВ, В. Б. РИТОВ

ИЗУЧЕНИЕ МЕМБРАННО-МИОФИБРИЛЛЯРНОЙ СВЯЗИ НА ПРОСТОЙ СОКРАТИТЕЛЬНОЙ МОДЕЛИ

(Представлено академиком С. Е. Севериным 9 VI 1972)

В систему мембранно-миофибриллярной связи объединяют ряд структур мышечного волокна, которые при участии ионов кальция обеспечивают сократительный цикл в ответ на нервный импульс. Большой интерес представляет моделирование циклов сокращения — расслабления *in vitro* с использованием изолированных компонентов мышечной клетки. Главными компонентами, необходимыми для этой цели, являются фрагменты саркоплазматического ретикулума (ф.с.р.) и препараты миофибрилл. Саркоплазматический ретикулум осуществляет выброс, реабсорбцию и удержание Ca^{2+} — активатора механохимического акта, а миофибриллы содержат систему рецепции активатора — тропонин-тропомиозиновый комплекс, регулирующий при участии Ca^{2+} взаимодействие сократительных белков. Так как циклическое перераспределение Ca^{2+} между саркоплазматическим ретикулумом и миофибриллами является сущностью мембранно-миофибриллярной связи, мы реконструировали из этих компонентов сократительную модель и изучили некоторые ее свойства.

Методы исследования. Выделение ф.с.р. проводили по методу, описанному ранее ⁽¹⁾, в опытах использовали тяжелую фракцию ф.с.р.; миофибриллы выделяли из *m. psoas* кролика методом Перри и Грей ⁽²⁾.

В ходе опыта проводили одновременную непрерывную запись изменений оптической плотности и pH. Измерение оптической плотности проводили с помощью фотоэлектрического колориметра ФЭК-56, соединенного с самопишущим потенциометром через потенциометр-усилитель ЛПУ-01. В качестве источника света использовали лампы СЦ-98 или СВД-120А (смена источника света не сказывалась на результатах опытов) со светофильтром № 4, имеющим максимум пропускания 435 мμ. В опытах применяли термостатированную кювету с длиной оптического пути 10 мм; суспензию перемешивали стеклянной мешалкой, вращавшейся со скоростью ≈1500 об/мин. Измерение pH проводили с помощью стеклянного электрода.

Объем пробы 3,8 мл, состав среды и концентрация белка даются в подписях к рисункам. Белок измеряли по биуретовой реакции.

Реактивы. Имидазол фирмы «Merck»; гистидин, АТФ, альбумин фирмы «Reanal»; ЭГТА (этиленгликоль-бис-(β-аминоэтиловый эфир)-N,N-тетраацетат) фирмы «Lamont Lab». Остальные реактивы («Союзреактив») марки х.ч. или ч.д.а.

Анзерин получен препаративно методом ионообменной хроматографии. Содержание анзерина в препарате ≈95%, примесь является карнозин.

Результаты и обсуждение. Рецепцию кальция миофибриллами проверяли с помощью оптического теста. Как видно из рис. 1, добавление АТФ к суспензии миофибрилл при низкой концентрации Ca^{2+} ($p\text{Ca} > 6$) приводит к просветлению суспензии, последующая добавка хлористого кальция приводит к увеличению оптической плотности. Величина ответа на добавку CaCl_2 зависит от его концентрации. Можно было предположить, что «просветление» соответствует расслаблению миофибрилл,

а помутнение — их сокращению. При микроскопии миофибрилл в среде с высокой (10^{-4} мол/л) и низкой ($<10^{-6}$ мол/л) концентрацией ионов кальция мы обнаружили, что и в том, и в другом случае добавка $MgATP$ приводит к сильному сокращению миофибрилл. Таким образом, при уменьшении оптической плотности суспензии миофибрилл не происходит их расслабления. Давая объяснение измерениям оптической плотности суспензии миофибрилл в аналогичных опытах, Коминц⁽³⁾ на основе обширного литературного материала по измерению оптической плотности суспензии актомиозина и миофибрилл приходит к выводу, что ее увеличение

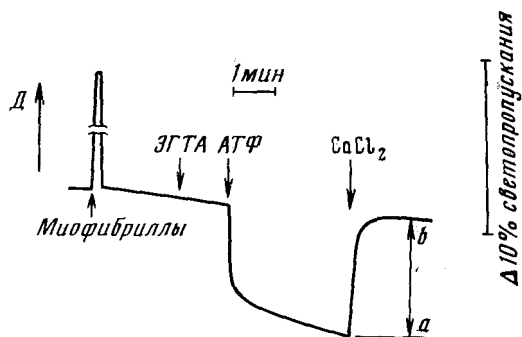


Рис. 1. Типичная запись опыта по измерению оптической плотности суспензии миофибрилл. Условия инкубации: 100 мМ KCl, 1 мМ $MgCl_2$, 5—25 мМ буфер (pH 6,8); 22°. Концентрация миофибрилл 30 μ г/мл. Стрелками обозначено введение 640 нмол. ЭГТА, 3,9 μ моля АТФ и 280—520 нмол. $CaCl_2$. Величина отрезка *ab* тем больше, чем больше добавка $CaCl_2$.

связано с образованием актомиозинового комплекса (при высокой концентрации ионов Ca^{2+}), а уменьшение обусловлено диссоциацией этого комплекса (низкие концентрации Ca^{2+}).

Результаты опытов по измерению оптической плотности смеси суспензий миофибрилл и ф.с.р., проведенных Аззоне и сотрудниками⁽⁴⁾, свидетельствуют о том, что ф.с.р. просветляют суспензию миофибрилл в присутствии $MgATP$. Нами было показано, что оптическая плотность смешанной суспензии ф.с.р. и миофибрилл может в определенных условиях претерпевать циклические изменения.

Опыты по получению циклов сокращение — расслабление начинали с добавки суспензии ф.с.р. За 2—3 мин в среде, содержащей 2 мМ $MgATP$ и 5 мМ оксалат калия, фрагменты с.р. понижали концентрацию свободных ионов Ca^{2+} до $\sim 10^{-7}$ мол/л. Добавка суспензии миофибрилл приводила к увеличению оптической плотности, величина которой в последующие 1—2 мин. убывала. Дальнейшие добавки в кювету хлористого кальция вызывали циклические изменения оптической плотности среды (рис. 2).

Эти изменения оптической плотности можно объяснить следующим образом. Каждая добавка хлористого кальция приводит к ассоциации актомиозинового комплекса и увеличению оптической плотности. В результате активного транспорта ионов Ca^{2+} фрагментами с.р. концентрация этих ионов в среде постепенно понижается, что приводит к диссоциации актомиозинового комплекса и уменьшению оптической плотности.

Увеличение оптической плотности в ответ на каждую последующую добавку хлористого кальция меньше, чем на предыдущую. Полного расслабления не удается получить даже в первом цикле (рис. 2). Эти свойства модели, видимо, обусловлены тем, что часть миофибрилл необратимо изменяется в ходе опыта и не способна отвечать на добавки $CaCl_2$, а также полностью расслабляться. Кроме того, убывание оптической плотности суспензии миофибрилл при понижении концентрации ионов Ca^{2+} в среде сопровождается увеличением оптической плотности суспензии ф.с.р. из-за выпадения внутри везикул ф.с.р. оксалата кальция. Хотя это увеличение мутности мало в сравнении с изменениями оптической плотности, связанными с ассоциацией и диссоциацией актомиозинового комплекса, оно

исключает возможность получения полного расслабления. Разобранные особенности следует отнести к недостаткам рассматриваемой модели.

В ряде опытов мы сравнивали скорость просветления смеси суспензии миофибрилл и фрагментов с.р. после первой и второй добавок хлористого кальция в присутствии трис-НСl, имидазола и анзерина. Как видно из рис. 3, скорость расслабления максимальна в присутствии имидазола и минимальна в присутствии трис-НСl-буфера.

В ответ на добавку CaCl_2 наблюдается увеличение скорости закисления среды инкубации. Закисление в значительной степени линейно во времени

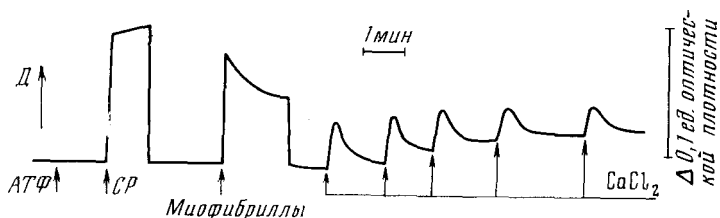


Рис. 2. Изменение оптической плотности суспензии миофибрилл в присутствии фрагментов с.р. Условия инкубации: 100 мМ KCl, 2 мМ MgCl_2 , 10 мМ имидазол, 5 мМ оксалат калия (рН 6,8); 28°. Концентрация белка ф.с.р. 100 $\mu\text{г/мл}$, концентрация миофибрилл 60 $\mu\text{г/мл}$. Стрелками обозначено введение 7,6 $\mu\text{моля}$ АТФ, добавки CaCl_2 по 50 нмол.

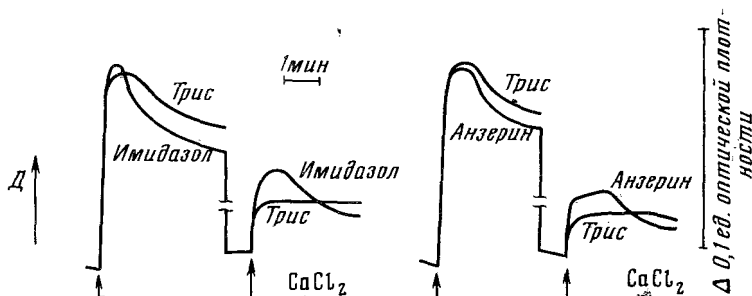


Рис. 3. Влияние имидазола, трис-буфера и анзерина на цикл просветления — помутнение суспензии миофибрилл в присутствии фрагментов с.р. Условия инкубации: 100 мМ KCl, 2 мМ MgCl_2 , по 10 мМ анзерин и имидазол или 20 мМ трис-НСl, 5 мМ оксалат, 2 ммоль АТФ (рН 7,15); 28°. Концентрация белка ф.с.р. 100 $\mu\text{г/мл}$, концентрация миофибрилл 75 $\mu\text{г/мл}$. Стрелками обозначено введение 95 нмол. хлористого кальция

и в начальный период стадии просветления заканчивается резким перегибом. Эти изменения рН отражают гидролиз АТФ Ca^{2+} -зависимой АТФазой ф.с.р. в процессе активного транспорта и позволяют рассчитать время, необходимое для аккумуляции добавленного Ca^{2+} (⁴). В наших опытах транспорт 95 нмол. кальция в трис-буфере продолжался 1,1 мин., в анзерине 0,8 мин., а в имидазоле 0,7 мин. Эти результаты согласуются с ранее опубликованными данными (⁵). Следовательно, увеличение скорости расслабления в присутствии имидазола и анзерина может быть связано с увеличением скорости активного транспорта ионов Ca^{2+} .

На основе полученных результатов мы не можем исключить влияния рассматриваемых веществ (трис-буфер, имидазол, анзерин) на переход актомиозина из ассоциированного состояния в диссоциированное. Хотя такая возможность кажется маловероятной, она нуждается в экспериментальной проверке.

Считая, что ассоциация актомиозинового комплекса, является аналогом мышечного сокращения, а диссоциация этого комплекса аналогична рас-

слаблению, можно с помощью описанной в работе модели изучать цикл сокращения — расслабления и взаимодействие мембранных структур с.р. с миофибриллами *in vitro*.

Авторы выражают благодарность академику С. Е. Северину и А. А. Болдыреву за общее руководство работой, а также Л. С. Яновской за помощь в работе по выделению препарата анзерина.

Московский государственный университет
им. М. В. Ломоносова

Поступило
9 VI 1972

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

¹ В. Б. Ритов, Биохимия, **36**, 393 (1971). ² S. V. Perry, T. C. Grey, Biochem. J., **64**, 184 (1956). ³ D. R. Kominz, Biophys. J., **11**, 47 (1971). ⁴ G. F. Azzone, G. Milic et al., Biochim. et biophys. acta, **115**, 513 (1966). ⁵ A. A. Boldyrev, V. B. Ritov, In: First Joint Symposium: Reaction Mechanisms and Control Properties of Phosphotransferases, Leipzig, 1971.