УДК 577.152.3

# ВПЛИВ КАТІОНІВ ВАЖКИХ МЕТАЛІВ НА АТР-азну АКТИВНІСТЬ АКТОМІОЗИНОВОГО КОМПЛЕКСУ ТА СУБФРАГМЕНТА-1 МІОЗИНУ ГЛАДЕНЬКОГО М'ЯЗА МАТКИ

*Р. Д. ЛАБИНЦЕВА, О. М. БОБРОВСЬКА, О. Ю. ЧУНІХІН, С. О. КОСТЕРІН*

*Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ;*
*email: labyntseva@biochem.kiev.ua*

*Досліджували вплив двовалентних катіонів – $Co^{2+}$, $Cu^{2+}$, $Mn^{2+}$ та $Ni^{2+}$ (5 мМ) на активність АТР-ази актоміозинового комплексу та субфрагмента-1 (S1, голівки) міозину міометрія. Показано, що $Co^{2+}$, $Mn^{2+}$ та $Ni^{2+}$ інгібують, а $Cu^{2+}$ – активує ензиматичну активність як актоміозину, так і S1 міозину.*

*Іони Mg та Mn суттєво не впливали на інтенсивність емісії асоційованого з актоміозином еозину Y, водночас, за наявності катіонів Cu спостерігали найбільш виражене гасіння емісії зв'язаного флуоресцентного зонду (еозину Y), менш виражене гасіння – у присутності $Co^{2+}$.*

*У присутності катіонів Mn, Co та Ni середній гідродинамічний діаметр (ГД) актоміозинового комплексу та субфрагмента-1 міозину гладенького м'яза матки суттєво не відрізняється від ГД у присутності $Mg^{2+}$. За наявності катіонів Cu спостерігається значне (у десятки разів) збільшення розміру протеїнових частинок, що може бути наслідком їхньої агрегації.*

*Одержані результати свідчать про суттєві зміни у структурі та функції актоміозинового комплексу міометрія у присутності катіонів важких металів та дозволяють припустити, що мішенню впливу цих металів на скоротливі протеїни є субфрагмент-1 міозину, в якому локалізовано активний центр АТР-ази та актинзв'язувальні ділянки.*

*Ключові слова: актоміозиновий комплекс, субфрагмент-1 міозину, АТР-аза, середній гідродинамічний діаметр, еозин Y, гладенькі м'язи.*

Останній час у науковій літературі з'являється величезна кількість робіт, присвячених дії важких металів на живі об'єкти, простежується взаємозв'язок між вмістом цих металів у навколишньому середовищі та виникненням низки захворювань, які інколи пов'язані із хромосомними мутаціями. Інтерес науковців до проблеми негативного впливу важких металів на біохімічні процеси в організмі, очевидно, обумовлений прогресуючим погіршенням екологічного стану довкілля.

Особливе місце серед цих робіт займають дослідження несприятливого впливу важких металів (Pb, Cd, Co, Cu, Mn та ін.) на досить чутливу до них генеративну систему людини, що виявляється у безплідді, викиднях, ускладненнях перебігу вагітності та пологів тощо [1, 2]. Відомо, що у жінок, які довгий час працюють на металопереробних підприємствах, часто порушена скоротлива функція матки. Спостерігається певна кореляція між вмістом катіонів важких металів у крові жінок і розвитком злоякісних/незлоякісних пухлин матки та не виношуванням плода. Встановлено, що у разі передчасних пологів вміст катіонів важких металів у гладеньких м'язах матки жінок значно вищий, ніж у разі своєчасних пологів [1, 2].

Молекулярну основу м'язового скорочення, зокрема і гладеньких м'язів матки, складає взаємодія міозину з актином, яка пов'язана з гідролізом АТР в активному центрі, локалізованому в каталітичному домені субфрагмента-1 (S1, голівки) міозину [3, 4].

Катіони двовалентних металів відіграють істотну роль у каталізі гідролізу АТР міозином, в утворенні та стабілізації комплексу субфрагмента-1 міозину із нуклеозидфосфатами (АТР та ADP). У фізіологічних умовах міозин є $Mg^{2+}$-залежною АТР-азою, субстратом якої є $Mg^{2+}$-АТР. В активному центрі ензиму катіон Mg координується з боковими ланцюгами амінокислотних залишків Thr-186 та Ser-237 міозину, β- та γ-фосфатними групами молекули АТР із утворенням β,γ-бідентатного комплексу та з активними молекулами води, одна з яких здійснює нуклеофільну атаку на γ-фосфат АТР [5–7]. $Mg^{2+}$ вступає у взаємодію з негативно зарядженими фосфатними групами АТР, поляризує їх і, таким чином, полегшує нуклеофільну атаку на термінальний γ-фосфат [8].

У дослідах *in vivo* показано, що катіони двовалентних (у тому числі важких) металів, здатні заміняти $Mg^{2+}$ у АТР-гідролазній реакції, що каталізується міозином [5, 9, 10]. АТР-азна активність міозину залежить від природи катіонів металів та добре корелює з їхнім іонним радіусом. Вони, подібно до $Mg^{2+}$, можуть зв'язуватися з міозином та нуклеозидфосфатами. Катіони двовалентних металів також стабілізують комплекс «міозин-Me-ADP-$P_i$» (перехідний стан) та беруть участь у подальшій дисоціації цього комплексу [6, 11].

Встановлено інгібуючий вплив $Pb^{2+}$, $Cd^{2+}$ і $Zn^{2+}$ на АТР-азну активність та суперпреципітацію актоміозину гладеньких м'язів матки, який пов'язаний з дією цих металів на початкову швидкість гідролізу АТР, що каталізується скоротливим комплексом [12, 13].

Co, Cu, Mn, Ni – біометали [14–17], які у надлишковій кількості стають токсичними для живих організмів, що зумовлює низку патологій. Відомо, що у населення, яке проживає в місцях зі збільшеною концентрацією цих металів у ґрунті, спостерігається зростання серцево-судинних захворювань та злоякісних новоутворень у шлунково-кишковому тракті, нирках та шкірі [18–21]. З літератури відома кореляція між вмістом Mn у повітрі і виникненням брадикінезії та хвороби Паркінсона [19]. Накопичення Cu в організмі призводить до складних токсикологічних ефектів, включаючи окисний стрес, пошкодження ДНК, пероксидне окислення ліпідів. Накопичення Cu у печінці корелює з мутаціями в генах ATP7A та ATP7B протеїнів, задіяних у транспортуванні міді, і появу таких мутацій пов'язують із захворюванням людей на хворобу Вільсона [22, 23].

Для подальшого розвитку уявлень щодо механізму впливу катіонів важких металів на скоротливі протеїни гладеньких м'язів ми поставили за мету дослідити вплив $Co^{2+}$, $Cu^{2+}$, $Mn^{2+}$, $Ni^{2+}$ на активність АТР-ази та середній гідродинамічний діаметр актоміозину та субфрагмента-1 міозину міометрія. Інформація стосовно зміни гідродинамічного діаметра зазначених біомакромолекул у присутності іонів важких металів може бути корисною для розуміння фізико-хімічних основ комплексоутворення між цими протеїновими структурами та зазначеними металами.

## Матеріали і методи

Препарат актоміозину одержували із гладеньком'язових клітин матки свині модифікованим методом Barany [24] та Weber [25]. М'язи матки свині старанно очищали від слизової оболонки та крові, промивали водою, гомогенізували із трьома об'ємами буфера, що містив 60 мМ KCl; 1 мМ $NaN_3$; 0,3 мМ дитіотреїтол; 0,5 мМ фенілметилсульфонілфтор; 10 мМ трис-HCl, pH 6,8; 0,5% тритон Х-100. М'язовий залишок відділяли центрифугуванням при 6000 об./хв на центрифузі РС-6 (СРСР) та промивали 3–4 рази вищенаведеним розчином без тритону Х-100. Екстрагували актоміозин трьома об'ємами буфера, який містив 0,6 М KCl; 1 мМ $NaN_3$; 0,5 мМ фенілметилсульфонілфтор; 0,3 мМ дитіотреїтол; 20 мкг/мл соєвого інгібітора трипсину; 10 мМ трис-HCl, pH 7,5. Після екстракції актоміозину м'язовий залишок відділяли центрифугуванням при 6000 об./хв, а надосадову рідину розводили водою (до 3–3,5 л) для осадження актоміозину (з метою його очищення від водорозчинних протеїнів). Осад актоміозину відділяли від надосадової рідини центрифугуванням (6000 об./хв) та розчиняли у мінімальній кількості 50 мМ трис-HCl (pH 7,5), що містив 0,6 М KCl, після чого знову центрифугували для освітлення 1 год при 105 000 g.

Субфрагмент-1 міозину гладеньких м'язів матки одержували шляхом розщеплення актоміозину α-хімотрипсином згідно з методом Weeds and Taylor [26] із деякими модифікаціями. Реакцію проводили в 50 мМ трис-HCl (pH 7,5), що містив 0,6 М KCl, 1 мМ дитіотреїтол, 1 мМ ЕДТА, протягом 20 хв при 22 °С; вагове співвідношення актоміозин/α-хімотрипсин – 400 : 1. Зупиняли реакцію 0,1%-им фенілметилсульфонілфтором. Розділення субфрагмента-1 проводили методом іонообмінної хроматографії на колонці з DEAE-Sepharose CL-6B на хроматографічній системі BioRad (США). Елюцію здійснювали із використанням градієнта KCl від 0 до 0,2 М. Фракція, що містила голівку міозину, виходила з колонки гострим піком при концентрації KCl 0,12 М. Субфрагмент-1 був ідентифікований за наявності досить високої АТР-азної активності у фракції – 60 ± 19 мкмоль $P_i$/хв на 1 мг протеїну ($M \pm m$, $n = 8$).

Вміст протеїну у препаратах визначали за методом Bradford [27], а також використовували криву концентраційної залежності поглинання світла при 280 нм, стандартизовану за сироватковим альбуміном. Чистоту препарату контролювали методом електрофорезу в поліакриламідному гелі за денатуруючих умов [28]. Згідно з результатами електрофорезу, одержаний нами препарат актоміозину містив: важкий ланцюг міозину (приблизно 200 кДа), легкі ланцюги міозину (17 та 21 кДа), актин (42 кДа) та домішки регуляторних протеїнів. Препарат субфрагмента-1 міозину на електрофореграмі відповідав молекулярній масі приблизно 100 кДа, що узгоджується з даними літератури [29].

АТР-азну активність актоміозину та субфрагмента-1 міозину досліджували при температурі 37 °С у середовищі інкубації (загальний об'єм 1 мл) такого складу (в мМ): імідазольний або трис-буфер (рН 7,2) – 20, KCl – 100, $CaCl_2$ – 0,01, $MgCl_2$ – 5, АТР – 4. Концентрація актоміозину та субфрагмента-1 міозину у середовищі інкубації становила 20 мкг/мл, тривалість інкубації – 2–6 хв. Контролем на неензиматичний гідроліз АТР слугували проби, які містили всі складові середовища інкубації за виключенням протеїну. Кількість відщепленого від нуклеозидтрифосфату неорганічного фосфату $P_i$ під час АТР-гідролазної реакції визначали методом Chen [30].

Під час дослідження впливу катіонів двовалентних металів на активність АТР-ази актоміозину та субфрагмента-1 міозину гладенького м'яза розчини хлоридів цих металів вносили безпосередньо у стандартне середовище інкубації до кінцевої концентрації 3–5 мМ. У контрольні проби, що не містили катіонів металів, замість розчинів хлоридів цих металів вносили аліквоту води.

Функцію розподілу актоміозинового комплексу та субфрагмента-1 міозину міометрія за розміром визначали методом фотонної кореляційної спектроскопії за допомогою лазерного кореляційного спектрометра (ЛКС) Malvern Instruments «ZetaSizer-3» (Велика Британія), обладнаного He-Ne лазером типу ЛГН-111 (Р = 25 мВт, λ = 633 нм) [32]. Досліджували розчини протеїнів у 20 мМ трис-HCl або імідазольному буферах, рН 7,2, що містили 0,6 М KCl. Реєстрацію лазерного випромінюваня, розсіяного (RI = 1,33) розчинами, проводили протягом 300 сек при 22 °С під кутом розсіювання 90°. Одержані результати вимірювань обробляли за допомогою комп'ютерної програми PCS-Size mode v1.61 [31].

Взаємодію скоротливих протеїнів із катіонами важких металів досліджували спектрофлуорометричним методом із використанням еозину Y як флуоресцентного зонду. Спектри флуоресценції вимірювали на флуоресцентному спектрофотометрі Signe-4 (Латвія). Флуоресценцію збуджували при 515 нм та реєстрували при 515–595 нм.

Статистичну обробку одержаних експериментальних даних проводили з використанням *t*-критерію Стьюдента. Вірогідними вважали результати, якщо $P < 0{,}05$.

Дослідження проводили, використовуючи наступні реактиви: сироватковий альбумін, ЕГТА, імідазол, маркерні протеїни для електрофорезу в NaДС-ПААГ (6000 – 205 000 Da) (Sigma, США), дитіотреїтол (Serva, Німеччина), АТР, акриламід, аскорбінова кислота (Fluka, Швейцарія), трис, гліцин (Merck, Німеччина), N,N-метиленбісакриламід (Acros organics, Бельгія), N,N,N,N-тетраметилендіамін (Reanal, Угорщина). Всі розчини готували на двічі дистильованій воді з електропровідністю меншою за 2 µS. Електропровідність води реєстрували за допомогою кондуктометра ОК-102/1 (Угорщина). Концентрацію катіонів двовалентних металів визначали титруванням за методом Мора [32].

### Результати та обговорення

Субстратом АТР-ази м'язового міозину є комплекс $MgATP^{2-}$, але за певних умов у процесі гідролізу АТР, що каталізується міозином скелетних м'язів, $Mg^{2+}$ може заміщатися катіонами інших двовалентних металів, зокрема важких [4–7].

Під час дослідження впливу катіонів важких металів ($Co^{2+}$, $Cu^{2+}$, $Mn^{2+}$ та $Ni^{2+}$) на активність АТР-ази актоміозину гладенького м'яза матки (рис. 1, *А*) нами було виявлено, що катіони $Co^{2+}$, $Mn^{2+}$, $Ni^{2+}$, внесені в інкубаційне середовище (що містило 4 мМ АТР, 5 мМ $Mg^{2+}$ та 10 мкМ $Ca^{2+}$) у концентрації 5 мМ, інгібують АТР-гідролазну реакцію скоротливого комплексу порівняно з контролем (прийнятого за 100%). Найбільший інгібуючий ефект виявляє $Co^{2+}$, який гальмує активність АТР-ази на 59 ± 9% відносно контролю, дещо нижчу інгібуючу дію виявляють $Ni^{2+}$ та $Mn^{2+}$ – 49 ± 8% і 26 ± 9% відповідно. Проте, катіони Cu у такій же концентрації активують АТР-азу актоміозину більш ніж у 2,5 раза (267 ± 28%) порівняно з контролем. Контрольні значення АТР-гідролазної активності вимірювали в середовищі інкубації, яке не містило катіонів важких металів, але містило $Mg^{2+}$. Величина активності АТР-ази скоротливого комплексу за цих умов становила 20 ± 5 мкмоль $P_i$/хв на мг протеїну ($M \pm m$, $n = 9$).

Відомо, що субфрагмент-1 міозину є достатньою функціональною одиницею міозину, тому що повністю зберігає АТР-азну активність цілого міозину та здатність взаємодіяти із актином. Крім того, він є зручною моделлю для досліджень впливу катіонів важких металів завдяки високій розчинності субфрагмента у водних розчинах із низькою іонною силою (на відміну від міозину) [29]. Вивчення впливу катіонів важких металів на АТР-азну активність субфрагмента-1 міозину показало (рис. 1, *Б*), що катіони Mn, Co та Ni за 5 мМ концентрації (у стандартному інкубаційному середовищі) інгібують активність АТР-ази субфрагмента-1 міозину міометрія на 31 ± 9, 52 ± 6 та 42 ± 13% відповідно порівняно з контролем. Водночас, $Cu^{2+}$ у тій самій концентрації активує гідроліз АТР, що каталізується субфрагментом-1 міозину, більш ніж втричі. Показана концентраційна залежність впливу $Cu^{2+}$ (у діапазоні концентрацій від 0,5 до 5 мМ) на активність АТР-ази голівки міозину (рис. 2): $Cu^{2+}$ дозозалежно активує процес гідролізу АТР, що каталізується субфрагментом-1 міозину. Крива концентраційної залежності дії $Cu^{2+}$ має тенденцію щодо виходу на плато, починаючи із 3 мМ концентрації. Константа активації $K_a$ АТР-ази голівки міозину катіонами Cu становить 1,8 ± 0,6 мМ ($M \pm m$, $n = 4$).

Отже, одержані величини інгібування АТР-ази субфрагмента-1 міозину катіонами Mn, Co та Ni (рис. 1, *Б*) близькі до тих, які були встановлені під час аналогічних досліджень на актоміозині міометрія (рис. 1, *А*). Водночас, активуюча дія $Cu^{2+}$ на процес гідролізу АТР, що каталізується голівкою міозину, виявилась також близькою до дії цього катіону на АТР-азу скоротливого комплексу (рис. 1, *Б* та 1, *А*). Результати дозволяють припустити, що мішенню впливу важких металів на скоротливі протеїни є саме голівка міозину, в якій локалізований активний центр АТР-ази.

Катіони важких металів, у тому числі і катіони Cu, в залежності від органа, походження тканини та фізіологічного стану організму, здатні або інгібувати, або, навпаки, підвищувати ензиматичну активність [33–39].

У літературі є дані про суттєве збільшення швидкості ензиматичного гідролізу АТР у присутності $Cu^{2+}$; реакція у присутності цього катіону проходить через димерний хелат $[(ATPCuOH)_2]^{6-}$, в якому катіони Cu, імовірно, з’єднані двома гідроксильними іонами [15].

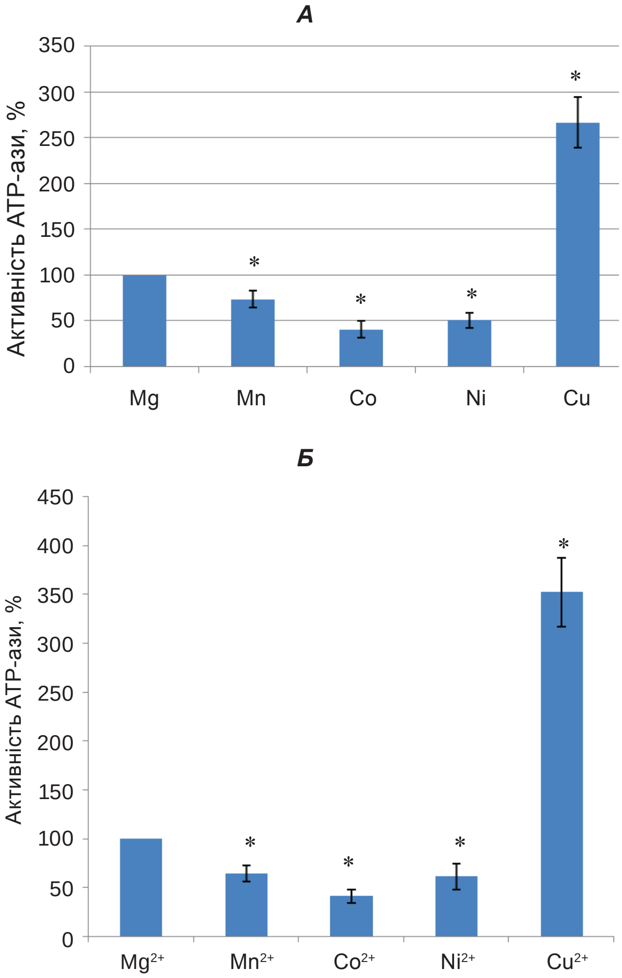


*Рис. 1. Вплив катіонів важких металів (5 мМ) на активність АТР-ази актоміозинового комплексу (А) та субфрагмента-1 міозину (Б) міометрія ($M \pm m$; $n = 6$). За 100% прийнято значення АТР-азної активності в середовищі інкубації, яке не містило катіонів важких металів, але містило $Mg^{2+}$; відмінності вірогідні порівняно з даними контролю, * $P < 0,05$*

Sigel H. показав, що катіони металів сприяють дефосфорилюванню АТР у водному розчині, і їхня ефективність знижується в порядку $Cu^{2+} > Ni^{2+} > Mn^{+2} > Mg^{2+}$. Найбільша ефективність $Cu^{2+}$ у цьому процесі може бути пов’язана з утворенням у присутності цього катіона активного комплексу $[Cu(ATP)_2(OH)]_2^{5-}$ [40].

З метою вивчення механізму впливу катіонів важких металів на АТР-азну активність скоротливого комплексу подальша робота була спрямована на дослідження взаємодії катіонів деяких важких металів із актоміозиновим комплексом флуорометрич-

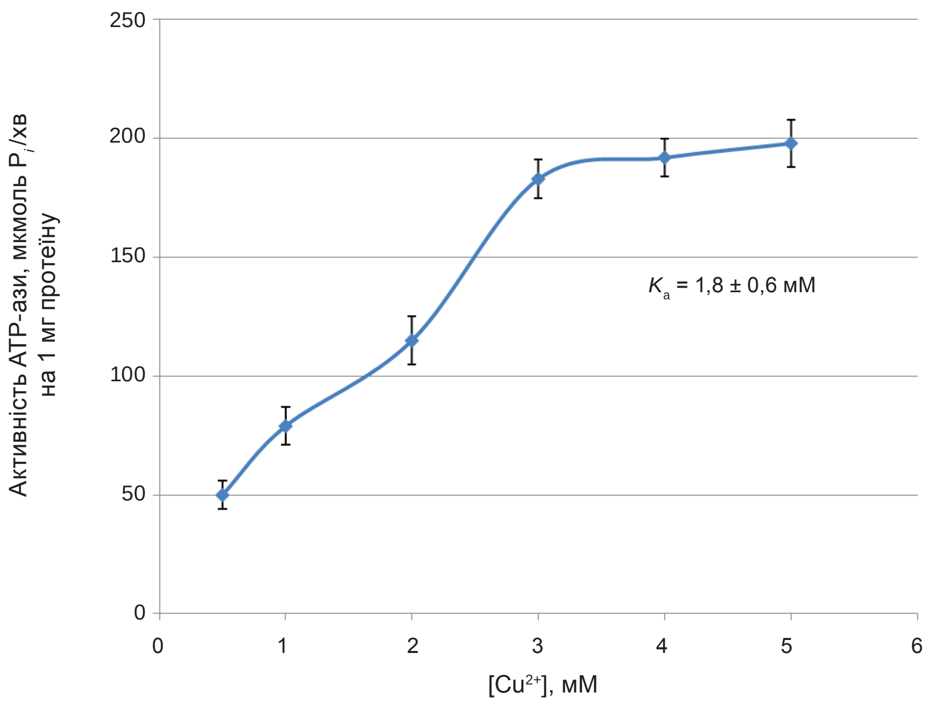


*Рис. 2. Концентраційна залежність впливу $Cu^{2+}$ на активність АТР-ази субфрагмента-1 міозину ($M \pm m$; $n = 4$)*

ним методом із використанням еозину Y (2, 4, 5, 7-тетрабромфлуоресцеїну) як флуорофора.

Методом електрофорезу в поліакриламідному гелі в умовах денатурації нами було виявлено, що еозин Y ($10^{-4}$ М) має здатність зв'язуватися з міозином міометрія: після інкубації актоміозинового комплексу з еозином Y та наступним осадженням протеїну (для звільнення його від незв'язаного еозину Y) протеїнова смуга, що відповідала міозину, мала флуоресцентний аналог в умовах збудження ультрафіолетовим випромінюванням (дані не наведено). Похідні еозину широко застосовуються як флуоресцентні зонди у разі досліджень молекулярного механізму м'язового скорочення [41, 42]. У зв'язуванні еозину Y з актоміозиновим комплексом міометрія важлива роль належить іонізаційним процесам та електростатичним взаємодіям [43, 44]. Еозин Y має максимум поглинання при 510 нм, максимум флуоресценції при 535 нм [45]. Виявилося, що актоміозиновий комплекс не впливає на спектральні характеристики еозину Y: положення максимумів поглинання та емісії еозину Y, асоційованого з актоміозиновим комплексом гладенького м'яза матки, у присутності всіх досліджуваних металів ($Mg^{2+}$, $Mn^{2+}$, $Co^{2+}$, $Cu^{2+}$) не змінюється.

Проте, була встановлена різна здатність катіонів важких металів гасити флуоресценцію флуорофору, зв'язаного з актоміозиновим комплексом, а саме, $Mg^{2+}$ та $Mn^{2+}$ практично не впливали на інтенсивність емісії зв'язаного з актоміозином флуоресцентного зонду; водночас, за наявності $Cu^{2+}$ спостерігали найбільш виражене гасіння емісії зв'язаного еозину Y, менш виражене гасіння – у присутності $Co^{2+}$ (рис. 3).

Ми припускаємо, що кількість молекул еозину Y, які здатні зв'язатися з актоміозином міометрія, залежить від структурного стану скоротливого комплексу. Не виключено, що в умовах присутності катіонів різних металів по-різному змінюється конформація протеїну, а отже, і кількість зв'язаних молекул еозину Y на одну молекулу актоміозину. Це може виявлятися у різному рівні флуоресценції флуорофору.

Міозин у процесі гідролізу АТР потребує присутності $Mg^{2+}$, оскільки нуклеозидтрифосфат зв'язується в активному центрі ензиму саме через катіон Mg. Водночас, цей катіон бере участь у каталізі гідролізу АТР [8]. Крім АТР-азного центру, існує велика кількість $Mg^{2+}$-адсорбуючих ділянок у молекулі міозину та актину, що відрізняються за силою зв'язування іонів Mg та спорідненістю до них. У молекулі міозину принаймні дві з них є високоафінними, і адсорбція на них $Mg^{2+}$ важлива у процесах перетворення хімічної енергії

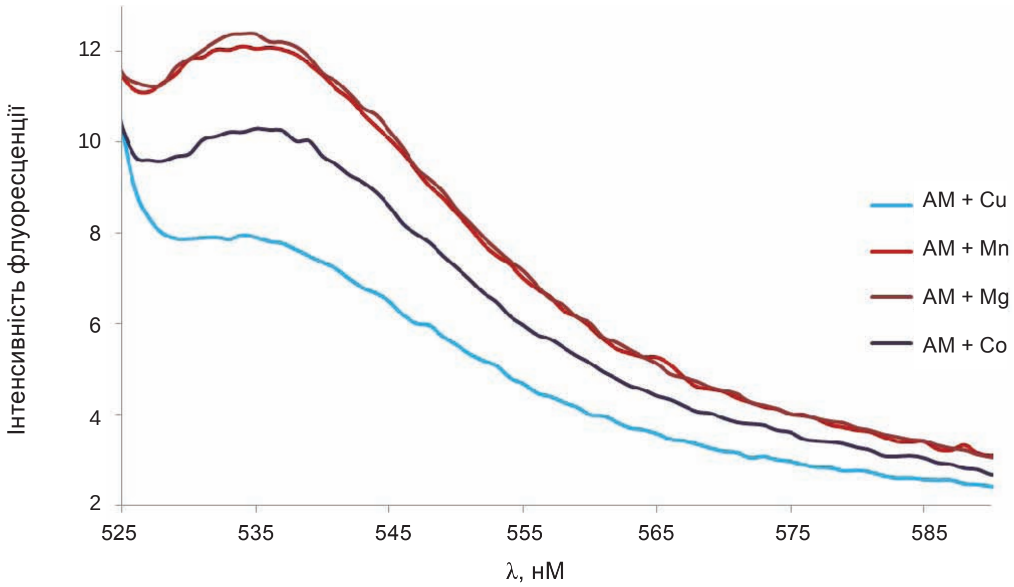


*Рис. 3. Вплив катіонів важких металів (5 мМ) на інтенсивність флуоресценції еозину Y, асоційованого з актоміозиновим комплексом міометрія, $\lambda_{зб}$ = 488 нм. Наведено типові спектри*

в механічну, завдяки чому здійснюється м'язове скорочення [9]. У присутності іонів Mg мономери G-актину підлягають нековалентній модифікації та утворюють нерозчинні двоспіральні філаменти F-актину. Адсорбція $Mg^{2+}$ на молекулі F-актину важлива також для підтримання його активної конформації.

Не виключено, що адсорбція катіонів нефізіологічних двовалентних металів на деяких $Mg^{2+}$-зв'язувальних (а можливо і на інших) ділянках міозину та актину призводить до певних конформаційних перебудов обох протеїнів, що може мати вплив на актин-міозинову взаємодію, а отже і на ензиматичну активність актоміозину.

Катіони Cu, які, на відміну від катіонів інших двовалентних металів, активують ATP-азу актоміозинового комплексу міометрія (рис. 1), виявляють найбільшу здатність серед інших катіонів гасити флуоресценцію еозину Y, асоційованого з актоміозином (рис. 3). Це може бути результатом того, що під час взаємодії зі скоротливим комплексом $Cu^{2+}$ спричинює конформаційні зміни у структурі протеїну, які можуть призводити до зменшення його спорідненості до флуорофора. Внаслідок цих структурних змін зменшується кількість місць зв'язування еозину Y із протеїном, що виявляється в гасінні флуоресценції флуорофора, зв'язаного з актоміозином. Можливо, що адсорбція саме $Cu^{2+}$ на деяких катіонзв'язувальних ділянках молекули актоміозину призводить до створення більш сприятливої для гідролізу ATP конформації активного центру порівняно з іншими катіонами.

Подальші дослідження було спрямовано на виявлення впливу катіонів важких металів на середній гідродинамічний діаметр актоміозинового комплексу та субфрагмента-1 міозину міометрія з використанням методу фотонної кореляційної спектроскопії. Контролем слугували зразки актоміозинового комплексу (в 20 мМ трис-HCl або імідазольному буферах, pH 7,2, що містили 0,6 М KCl), у присутності 5 мМ $Mg^{2+}$.

Метод фотонної кореляційної спектроскопії дозволяє виявити розподіл різних молекул та надмолекулярних утворень у розчині за їхніми розмірами. Необхідно відмітити, що використана в ЛКС програма, розроблена для визначення гідродинамічного діаметра (ГД) частинок сферичної форми. Тому одержані цим методом розміри молекул близькі до справжніх тільки для глобулярних протеїнів. У разі, коли форма протеїну далека від сферичної, одержані значення ГД вважаються досить умовною величиною. Це стосується повною мірою молекули міозину, яка має видовжену форму та складається із глобулярної голівки (S1) (~ 16,5–19,0 нм у довжину та 5,0 нм у ширину) та стрижнеподібної хвостової частини (~ 150,0 нм × ~ 2,0 нм).

Було показано (рис. 4, *А*), що у присутності катіонів Mn, Co та Ni середній гідродинамічний діаметр актоміозинового комплексу гладень-

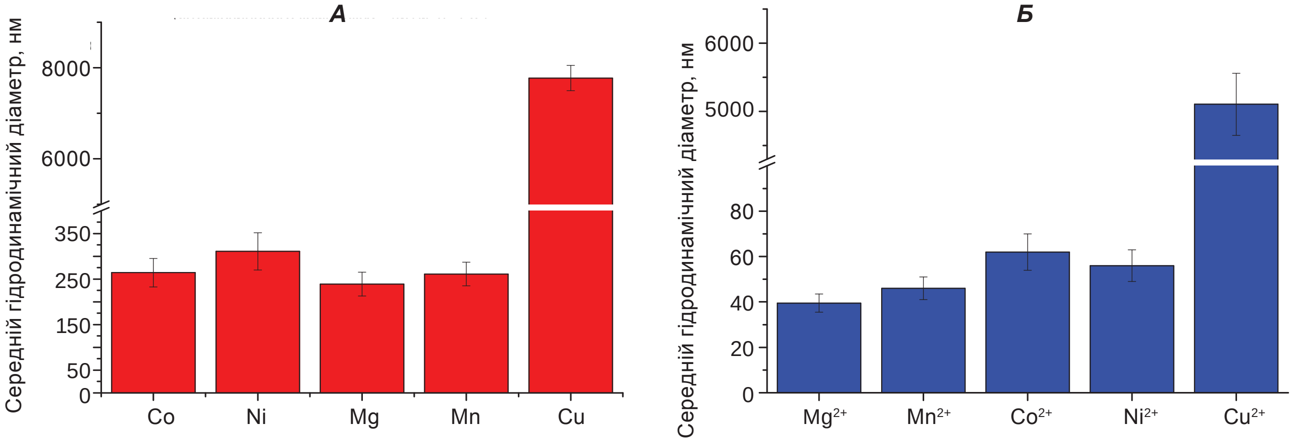


*Рис. 4. А — вплив катіонів важких металів (5 мМ) на середній гідродинамічний діаметр актоміозинового комплексу (M ± m; n = 4–6). Б — вплив катіонів важких металів на середній гідродинамічний діаметр S1 міозину міометрія (M ± m; n = 4)*

кого м'яза матки суттєво не відрізняється від ГД у присутності $Mg^{2+}$. У присутності $Cu^{2+}$ спостерігається значне (у 30 разів) збільшення розміру частинок протеїнового комплексу, що може бути наслідком їхньої агрегації. Агрегація протеїнів у присутності $Cu^{2+}$ є досить відомим явищем, і деякі автори пов'язують її з утворенням міжмолекулярних містків за участю CuOH [26].

Методом фотонної кореляційної спектроскопії виявлено (рис. 4, *Б*) збільшення середнього ГД субфрагмента-1 міозину у присутності $Co^{2+}$ та $Ni^{2+}$ у 1,5 раза у порівнянні з розміром голівки міозину у присутності $Mg^{2+}$ та 125-разове збільшення ГД субфрагмента-1 міозину у присутності $Cu^{2+}$. На рис. 5 показана різниця у розподілі частинок субфрагмента-1 міозину у присутності $Mg^{2+}$ та $Cu^{2+}$, яке може

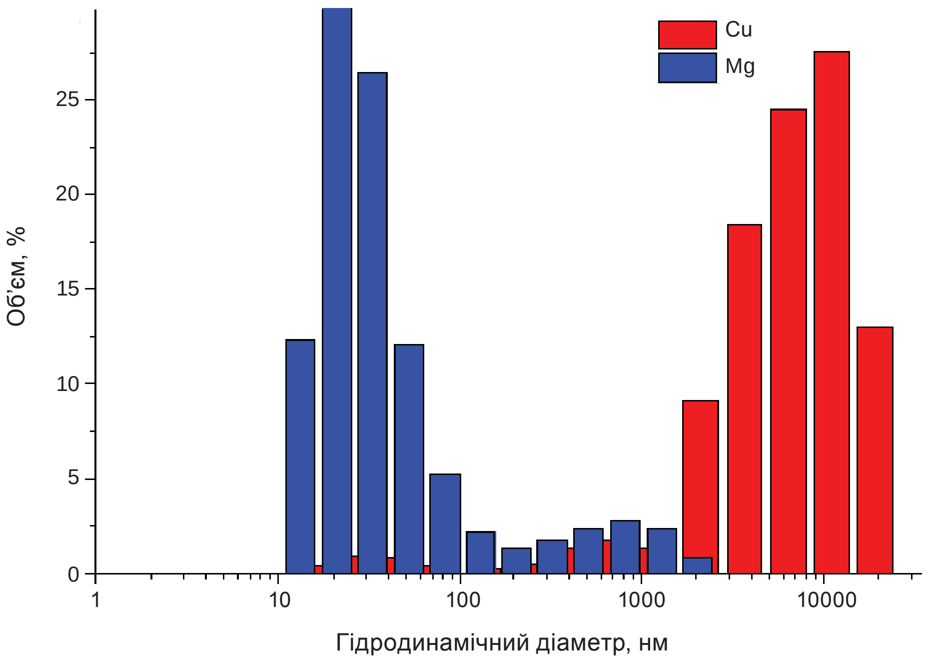


*Рис. 5. Вплив катіонів Cu на розподіл середнього гідродинамічного діаметра (ГД) (за об'ємом) субфрагмента-1 міозину міометрія. За 100% приймається кількість частинок, еквівалентний гідродинамічний діаметр яких знаходиться в діапазоні від $ГД_{min}$ до $ГД_{max}$ з точністю ±0,1% (визначається характеристиками ЛКС Malvern Instruments «ZetaSizer-3»).*

бути наслідком агрегації протеїнових частинок за участю $Cu^{2+}$.

Таким чином, показано, що катіони важких металів впливають на процес гідролізу АТР, який каталізується актоміозиновим комплексом та субфрагментом-1 міозину гладенького м'яза матки, на флуоресценцію флуорофора (еозину Y), асоційованого зі скоротливим комплексом, а також на середні ГД актоміозину та субфрагмента-1 міозину.

Одержані результати свідчать про суттєві зміни у структурі та функції актоміозинового комплексу міометрія у присутності катіонів важких металів та дозволяють припустити, що мішенню впливу цих металів на скоротливі протеїни є субфрагмент-1 міозину, в якому локалізований активний центр АТР-ази та актинзв'язувальні ділянки. Такі структурні та функціональні зміни, що відбуваються в молекулі актоміозину, зокрема у субфрагменті-1 міозину, під дією катіонів важких металів, у разі їхнього значного накопичення в організмі можуть бути причиною порушень скоротливої функції матки. Одержана інформація може бути корисною для розуміння фізико-хімічних основ взаємодії скоротливих протеїнів гладеньких м'язів з іонами важких металів.

*Автори вдячні доктору хімічних наук, професору, завідуючому кафедри фізичної хімії Київського національного університету імені Тараса Шевченка Фрицькому Ігорю Олеговичу за консультативну допомогу при написанні роботи.*

*Роботу було виконано за фінансової підтримки цільової комплексної міждисциплінарної програми наукових досліджень НАН України «Фундаментальні основи молекулярних та клітинних біотехнологій», проект №13/1(4)-31/10.*

## ВЛИЯНИЕ КАТИОНОВ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ НА АТР-азную АКТИВНОСТЬ АКТОМИОЗИНОВОГО КОМПЛЕКСА И СУБФРАГМЕНТА-1 МИОЗИНА ГЛАДКОЙ МЫШЦЫ МАТКИ

*Р. Д. Лабынцева, О. Н. Бобровская, А. Ю. Чунихин, С. А. Костерин*

Институт биохимии им. А. В. Палладина НАН Украины, Киев;
email: labyntseva@biochem.kiev.ua

Исследовалось влияние двухвалентных катионов – $Co^{2+}$, $Cu^{2+}$, $Mn^{2+}$ и $Ni^{2+}$ (5 мМ) на активность АТР-азы актомиозинового комплекса и субфрагмента-1 (S1, головки) миозина миометрия. Показано, что Co+, $Mn^{2+}$ и $Ni^{2+}$ проявляют ингибирующее, а $Cu^{2+}$ – активирующее действие на энзиматичную активность как актомиозина, так и S1 миозина.

Ионы Mg и Mn практически не влияют на интенсивность эмиссии ассоциированного с актомиозином эозина Y, в то время как в присутствии катионов Cu наблюдается сильно выраженное гашение эмиссии связанного флуоресцентного зонда, менее выраженное гашение – в присутствии $Co^{2+}$.

В присутствии катионов Mn, Co и Ni средний гидродинамический диаметр (ГД) актомиозинового комплекса и субфрагмента-1 гладкой мышцы матки существенно не отличается от ГД в присутствии $Mg^{2+}$. При наличии катионов Cu наблюдается значительное (в десятки раз) увеличение размера протеиновых частичек, что может быть следствием их агрегации.

Полученные результаты свидетельствуют о существенных изменениях в структуре и функции актомиозинового комплекса миометрия в присутствии тяжелых металлов и позволяют предположить, что мишенью влияния этих металлов на сократительные протеины является субфрагмент-1 миозина, где локализован активный центр АТР-азы и актинсвязывающие участки.

Ключевые слова: актомиозиновый комплекс, субфрагмент-1 миозина, катионы тяжелых металлов, АТР-аза, средний гидродинамический диаметр, эозин Y, гладкие мышцы.

## INFLUENCE OF HEAVY METAL IONS ON THE ATPase ACTIVITY OF ACTOMYOSIN COMPLEX AND MYOSIN SUBFRAGMENT-1 FROM SMOOTH MUSCLE OF THE UTERUS

*R. D. Labyntseva, O. M. Bobrovska, O. Ju. Chunikhin, S. O. Kosterin*

Palladin Institute of Biochemistry, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;
email: labyntseva@biochem.kiev.ua

Summary

The effect of divalent cations – $Co^{2+}$, $Cu^{2+}$, $Mn^{2+}$ and $Ni^{2+}$ (5 mM) on the activity of actomyosin complex ATPase and ATPase of subfragment-1 (S1,head) of myosin from smooth muscle of the uterus was studied. It has been shown that $Co^{2+}$, $Mn^{2+}$ and $Ni^{2+}$ inhibited, while $Cu^{2+}$ activates the enzyme activity of both actomyosin and myosin S1.

Mg and Mn ions had practically no effect on the emission intensity of eosin Y associated with actomyosin, while one could observe the most marked suppression of emission of related fluorescent probe in the presence of Cu cations and less pronounced suppression in the presence of $Co^{2+}$.

In the presence of Mn, Co and Ni cations the average hydrodynamic diameter (HD) of actomyosin complex and of subfragment-1 of the smooth muscle of the uterus is virtually identical to the HD in the presence of $Mg^{2+}$. In the presence of Cu cations there is a considerable (ten-fold) increase in the size of the protein particles that may be a result of their aggregation.

The results obtained evidence for the significant changes in the structure and function of the actomyosin complex of the myometrium in the presence of heavy metals and allow us to assume that the target of the effect of these metals on the contractile proteins is a subfragment-1 of myosin, where the active site of ATPase and actin-binding sites are localized.

Key words: actomyosin complex, subfragment-1 of myosin, ATP-asa, heavy metal cations, average hydrodynamic diameter, eosin Y, smooth muscle, uterus.

1. *Паранько М., Белицкая Э. Н., Землякова Т. Д. и др.* // Гигиена и санитария. — 2002. — № 1. — С. 28—30.
2. *Сердюк А. М., Белицкая Э. Н., Паранько Н. М., Шматков Г. Г.* Тяжелые металлы внешней среды и их влияние на репродуктивную функцию женщин. — Днепропетровск: АРТ-ПРЕСС, 2004. — 148 с.
3. *Highmith S.* // Biochemistry. — 1999. — **38**, N 31. — P. 2010—2016.
4. *Risal D., Gourinath S., Himmel D. M.* // PNAS. — 2004. — **101**, N 24. — P. 8930—8935.
5. *Connolly B. A., Eckstein F.* // J. Biol. Chem. — 1981. — **256**, N 28. — P. 9450—9456.
6. *Peyser Y. M., Ajtai K., Weber M. M. et al.* // Biochemistry. — 1997. — **36**, N 17. — P. 5170—5178.
7. *Немухин А. В., Григоренко Б. Л., Шадрина М. С.* // Рос. хим. журн. ( Журнал рос. хим. об-ва им. Д. И. Менделеева). — 2007. — **L1**, № 5. — С. 27—33.
8. *Введение* в мембранологию / Под ред. Болдырева А. А. — М.: Изд-во МГУ, 1990. — 208 с.
9. *Beinfild M. C., Bryce D. A., Kochavy D., Martonosi A.* // J. Biol. Chem. — 1975. — **250**, N 4. — P. 6282—6287.
10. *Amitani I., Sakamoto T., and Ando T.* // Biophys. J. — 2001. — **80**, N 1. — P. 379—397.
11. *Peyser Y. M., Ben-Hur M., Weber M. M. et al.* // Biochemistry. — 1996. — **35**, N 14, — P. 4409—4416.
12. *Лабынцева Р. Д., Ульяненко Т. В., Борисевич А. Н. и др.* // Укр. біохім. журн. — 1995. — **67**, № 6. — С. 46—53.
13. *Лабынцева Р. Д., Ульяненко Т. В., Костерин С. А.* // Там же. — 1998. — **70**, № 1. — С. 71—77.
14. *Ершов Ю. А., Попков В. А., Берлянд А. С. и др.* Общая химия. Биофизическая химия. Химия биогенных элементов. — М.: Высшая шк., 2003. — 506 с.
15. *Эйхгорн Г.* Неорганическая химия. 2 том. — М.: Мир, 1978. — 413 с.
16. *Карнаухов О. І., Мельничук Д. О., Чеботько К. О. та ін.* Загальна та біонеорганічна хімія. — Вінниця: Нова книга, 2003. — 544 с.
17. *Benini S., Rypniewski W. R., Wilson K. S. et al.* // J. Am. Chem. Soc. — 2004. — **126**. — P. 3714—3715.
18. *Вредные* вещества в промышленности. Справочник для химиков, инженеров и врачей. Том III. Неорганические и элементорганические соединения (под ред. Н. В. Лазарева и И. Д. Гадаскиной.). — Л.: Химия, 1977. — 608 с.
19. *Fukushima T., Tan X., Luo Yu., Kanda H.* // Neuroepidemiology. — 2010. — **34**, N 1. — P. 18—24.
20. *Протасова Н. А., Щербаков А. П., Копаева М. Т.* Редкие и рассеянные элементы в почвах Центрального Черноземья. — Воронеж: Изд-во ВГУ, 1992. — 168 с.
21. *Покатилов Ю. Г.* Биогеохимия биосферы и медико-биологические проблемы. — Новосибирск: Наука, 1993. — 168 с.
22. *Gerbasi V., Lutsenko S., Lewis E. J.* // Neurochem. Res. — 2003. — N 6. — P. 867—873.
23. *Santos E., Ball J. William T. et al.* // Environ. Sci. Technol.— 2010. — **44**, N 2. — P. 820—826.
24. *Barany M., Barany K.* // Arch. Biochem. Biophys. — 1966. — **113**, N 1. — P. 205—211.
25. *Weber A.* // Biochem. Biophys. Acta. — 1956. — **19**, N 2. — P. 345.
26. *Weeds A. G., Taylor R. S.* // Nature. — 1975. — **257**, N 1. — P. 54—56.
27. *Bradford M. M.* // Anal. Biochem. — 1976. — **72**. — P. 248—282.
28. *Laemmly U. K.* // Nature (London). — 1970. — **227**, N 7. — P. 680—685.
29. *Iwane A. H., Kitamura K., Tokunaga M. et al.* // Biochem. Biophys. Res. Commun. — 1997. — **230**, N 1. — P. 46—80.
30. *Chen P. S., Toribara Jr., T. Y., Warner H.* // Analyt. Chemistry. — 1956. — **28**, N 11. — P. 1756—1758.

31. *Merkus H. G.* Particle Size Measurements. Fundamentals, Practice, Quality. – Springer, 2009. – 533 p.
32. *Коростылев П. П.* Приготовление растворов для химико-аналитических работ. – Изд-во АН СССР. – 1964. – 310 с.
33. *Lovitt B., Vanderporten E. C., Sheng Z. et al.* // Biochemistry. – 2010. – **49**, N 14. – P. 3092–3100.
34. *Latha G. M., Muralikrishna G.* // J. Agric. Food Chem. – 2007. – **55**, N 3. – P. 895–902.
35. *Senger M. R., Rosemberg D. B., Seibt K. J. et al.* // Neurotoxicology. – 2010 – **31**, N 3. – P. 291–296.
36. *Ige S. F., Salawu E. O., Olaleye S. B. et al.* // Indian J. Nephrol. – 2009. – **19**, N 4. – 140–144.
37. *Kubiak K., Klimczak A., Dziki Ł. et al.* // Pol. Merkur. Lekarski. – 2010. – **163**. – P. 22–25.
38. *Cid A., Fidalgo P., Herrero C. et al.* // Cytometry, part A. – 1998. – **25**, N 1. – P. 32–36.
39. *Бездудная Е. Ф., Калиман П. А.* // Укр. біохім.журн. – 2008. – **80**, № 1. – С. 83–88.
40. *Sigel H.* // Coord. Chem. Rev. – 1990. – **100**. – P. 453–539
41. *Stein R. A., Ludescher R. D., Dahlberg P. S. et al.* // Biochemistry. – 1990. – **29**, N 43. – P. 10023–10031.
42. *Ludescher R. D. and Thomas D. D.* // Ibid. – 1988. – **27**, N 9. – P. 3343–3351.
43. *Лабинцева Р. Д., Костерін С. О.* // Укр. біохім. журн. – 2007. – **49**, № 6. – С. 48–52.
44. *Лабинцева Р. Д., Бобровська О. М., Бевза А. А., Костерін С. О.* // Там само. – 2009. – **81**, № 1. – С. 23–30.
45. *Du H., Fuh R. A., Li J et al.* // Photochem. Photobiol. – 1998. – **68**. – P. 141–142.

Отримано 14.02.2011