

ФІЗІОЛОГІЯ

© К. І. Богуцька

УДК 57. 013: 577. 322: 611. 018. 63: 611. 127

К. І. Богуцька

**ВПЛИВ ІОНІВ ЦИНКУ НА ФУНКЦІОНАЛЬНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ
АКТОМІОЗИНОВОГО КОМПЛЕКСУ СЕРЦЕВОГО М'ЯЗА****Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Навчально-науковий центр
«Інститут біології» (м. Київ)**

Дана робота є фрагментом НДР «Механізми реалізації адаптаційно-компенсаторних реакцій організму за умов розвитку різних патологій», № держ. реєстрації 11БФ036-01.

Вступ. Проблема регуляції функціональної активності м'язів і каталітичних механізмів забезпечення цього процесу завжди була і залишається актуальною для біохімії, фізіології та фармакології м'язів. Незважаючи на значну кількість даних з біологічної дії іонів металів (Me^{2+}) на організм, мало вивченими є молекулярні механізми такої дії на субклітинному рівні. Отримання нових експериментальних даних у цьому напрямку сприятиме розробці методів підвищення стійкості організму до дії шкідливих факторів та терапії інтоксикацій, викликаних сполуками металів (наприклад, фосфідом цинку). Взагалі, останніми роками вивчають такі ефекти впливу іонів цинку на організм – його розподіл у тканинах, дію на окремі структури (мембрани, білки тощо), роль цинк-вмісних металопротеїнів як перспективної фармакологічної мішені та ін. [3, 6, 9, 11, 12, 14]. Проте мало вивченим залишається механізм контролю внутрішньоклітинного розподілу Zn^{2+} та його зміни протягом циклу функціонування серця [10]. Такі дослідження зміни гомеостазу Zn^{2+} проводять з використанням специфічного флуоресцентного барвника FluoZin-3 [7], а також мас-спектрометричної техніки, яка дозволяє «закартувати» метал у біологічній тканині. Так, у серці мишей цинк розподіляється негомогенно з усередненою концентрацією 26 мкг на г тканини [7]. Результати свідчать, що цинк акумулюється головним чином у м'язових волокнах середньої оболонки міокарда. Дефіцит цинку може бути фактором впливу на морфологію серця та серцевих білків на моделі щурів [11]. При дослідженні вмісту мікроелементів у різних ділянках лівого шлуночка хворих на ішемічну хворобу серця методом рентгенофлуоресцентного аналізу з використанням синхротронного випромінювання був виявлений дисбаланс мікроелементів, зокрема різко підвищений вміст Zn [4]. В рамках дослідження кардіопротекторних властивостей цинк-вмісних сполук зроблено припущення про те, що іони цинку здатні бути потенційними знижувачами ішемічних та постішемічних пошкоджень тканин внаслідок механізму, пов'язаного з

антагонізмом по реактивності міді [13]. Також знайдені клініко-експериментальні відповідності порушень мікроелементного складу крові у хворих при інфаркті міокарду [1]. На сьогодні одним з напрямків застосування нанотехнологій, враховуючи нанорозмірність функціональних компонентів живих клітин, у біомедичних є використання наночастинок, зокрема цинку, для молекулярної діагностики, адресної доставки лікарських засобів, розробки нових фармпрепаратів [8].

Метою представленої роботи було дослідити вплив іонів цинку на процес, що моделює молекулярний механізм скорочення м'язів, – реакцію суперпреципітації (СПП) актоміозинового комплексу.

Об'єкт і методи дослідження. Актomioзин екстрагували впродовж години розчином, що містив 0,2 М KCl, 0,15 М трис-HCl, pH 8. 0, 1 мМ EDTA, 5 мМ $MgCl_2$, 0,2 мМ PMSF, 1 мМ NaN_3 , 3,5 мМ АТФ, потім осаджували із супернатанту додаванням 10 об'ємів холодної дистильованої води, попередньо довівши його pH до 6. 2 0,1 н оцтовою кислотою. Білок збирали центрифугуванням при 3000g протягом 15 хв. Кінетику СПП актоміозинового комплексу реєстрували за зміною оптичної густини актоміозину при довжині хвилі 450 нм при температурі 25 °C протягом 20 хв на спектрофотометрі «Spekord M – 40» (Німеччина). Реакційна суміш для реакції СПП актоміозину містила 20 мМ трис-HCl (pH 7. 5), 0,15 KCl мМ, 1 мМ $MgCl_2$, 0,1 мМ $CaCl_2$, концентрація актоміозину в сумарному об'ємі проби 2 мл становила 0,1 мг/мл. СПП ініціювали додаванням до середовища АТФ. Про швидкість реакції суперпреципітації в судили за величиною часу $t_{1/2}$, протягом якого оптична густина актоміозину зростала до величини $D/2$, де D – оптична густина актоміозину після завершення реакції СПП.

При вивченні впливу іонів цинку на СПП актоміозину ці катіони (у вигляді розчину хлориду цинку) додавали у відповідних концентраціях до середовища інкубації. У роботі використовували реактиви вітчизняних та іноземних виробників класу чистоти не нижче ч. д. а. Для приготування водних розчинів реактивів та середовища інкубації використовували бідистильовану та деіонізовану воду.

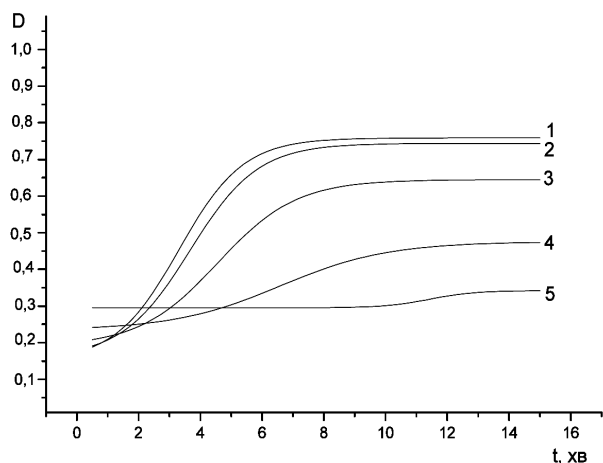


Рис. Типові кінетичні криві реакції суперпреципітації актоміозину серцевого м'язу при додаванні різних концентрацій $ZnCl_2$ (мМ): 1 – без Zn^{2+} (контроль); 2 – 0,1; 3 – 0,5; 4 – 1; 5 – 5.

Результати досліджень та їх обговорення. Під час виконання експериментальної частини роботи вирішували таке завдання – дослідити реакцію СПП актоміозину серцевого м'язу за присутності іонів Zn. Саме на такій моделі можна вивчати молекулярні механізми скорочувальної активності м'язів. На **рис.** представлено кінетичні криві реакції СПП актоміозину за різних концентрацій іонів цинку (0, 1-5 мМ).

При додаванні до розчину актоміозину 0,05 мМ АТФ відбувається швидка СПП актоміозину (крива 1 – контроль). При додаванні до середовища 0,1 мМ $ZnCl_2$ на фоні Mg^{2+} перебіг кривої СПП майже не змінюється (крива 2). При поступовому збільшенні концентрації катіонів Zn^{2+} (криві 2-5) процес СПП

Таблиця

Значення $t_{1/2}$ та v_0 для СПП актоміозину в присутності іонів цинку

Катіон	№ кривої	Концентрація іонів металів, мМ	Параметри СПП актоміозину		
			мах од. поглинання	v_0 , %	$t_{1/2}$, хв.
Zn^{2+}	1	–	0,76	100	3
	2	(контроль)	0,74	95	3,5
	3	0,1	0,64	84	4,6
	4	0,5	0,47	62	6,2
	5	1	0,34	45	11,3

пригнічується: зменшується не лише її величина, але й швидкість (збільшується $t_{1/2}$). Це свідчить про те, що катіони Zn^{2+} уповільнюють перебіг реакції СПП актоміозину, а за певної концентрації (1 мМ і більше) зовсім її пригнічують.

Таким чином, у присутності іонів цинку (**рис.**, криві 2-5, **табл.**) для кривих СПП актоміозинового комплексу $t_{1/2}$ зростає зі збільшенням концентрації іонів цинку.

Подібна залежність виявлена і для іонів кадмію: показано, що за своєю дією вони виявляють інгібуючий вплив на реакцію СПП актоміозину серцевого м'язу [2].

Обговорення. Більшість літературних даних свідчить на користь того, що регуляція двовалентними іонами відбувається завдяки безпосередньому зв'язуванню катіонів з білком. З іншого боку, роль іонів металів може полягати і у створенні або стабілізації певної конформації білкової молекули [5], яка необхідна для забезпечення каталітичної дії міозину як ферменту. Тобто, специфічну дію катіонів можна пояснити як безпосереднім впливом на активний центр білка іонів, що зв'язуються, так і опосередкованим впливом катіонів через зміну конформації макромолекули в цілому. Але це питання щодо взаємодіювання цих шляхів (як прояв конкуренції між прямою (через активні центри) та опосередкованою ($Me^{2+} - АТФ$) дією катіонів) реалізації регуляторних ефектів двовалентних іонів залишається дискусійним.

Висновок. Проведені дослідження ефектів впливу іонів цинку на СПП актоміозину серцевого м'язу засвідчили, що іони цинку, ймовірно заміщуючи іони кальцію або магнію за реакції СПП, хоча таке заміщення менш ефективне для реалізації реакції СПП, здатні модулювати актин-міозинову взаємодію, змінюючи функціональні характеристики актоміозинових макромолекул м'язу. Отримані результати розширюють уявлення щодо механізмів впливу фізико-хімічних чинників середовища, зокрема іонів цинку, на ферментативну активність АТФ-гідролази, а саме міозинової АТФази міокарда,

Перспективи подальших досліджень. Проведення експериментальних досліджень у цьому напрямку загалом має практичне значення у зв'язку з можливою регуляцією функціональної активності м'язів за участі іонів цинку за умов норми та патології.

Література

1. Антонов А. Р. Обмен биометаллов при инфаркте миокарда (клинико-экспериментальное исследование) / А. Р. Антонов, Е. А. Васькина, Ю. Д. Чернякин // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. – 2009. – № 4. – С. 8-10.
2. Богущька К. Вплив іонів кадмію на суперпреципітацію актоміозину серцевого та скелетних м'язів / К. Богущька, П. Мінченко // Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Біологія. – 2010. – Вип. 56. – С. 21-23.
3. Скальный А. В. Биэлементы в медицине / А. В. Скальный, И. А. Рудаков. – М.: Издательский дом «Оникс 21 век»: Мир, 2004. – 272 с.
4. Содержание микроэлементов в миокарде левого желудочка больных ишемической болезнью сердца по данным рентгенофлуоресцентного анализа с использованием синхротронного излучения / Г. Н. Окунева, А. М. Чернявский, Е. Н. Левичева, И. Ю. Логинова и др. // Кардиология. – 2006. – Т. 46, № 10. – С. 13-17.
5. Тикунов Б. А. Характер актин-миозинового взаимодействия на двух стадиях реакции суперпреципитации / Б. А. Тикунов // Биофизика. – 1991. – Т. 36, № 2. – С. 261-265.

- Anzellotti A. Zinc metalloproteins as medicinal targets / A. Anzellotti, N. Farrell // *Chem. Soc. Rev.* – 2008. – Vol. 37, № 8. – P. 1629-1651.
- Bioimaging of metals and biomolecules in mouse heart by laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry and secondary ion mass spectrometry / J. Becker, U. Breuer, H. Hsieh, T. Osterholt et al. // *Anal. Chem.* – 2010. – Vol. 82, № 22. – P. 9528-9533.
- Bogutska K. I. Zinc and zinc nanoparticles: biological role and application in biomedicine / K. I. Bogutska, Yu. P. Sklyarov, Yu. I. Prylutskyy // *Ukrainica Bioorganica Acta.* – 2013. – N 1. – P. 9-16.
- Intracellular distributions of essential elements in cardiomyocytes / B. Palmer, S. Vogt, Z. Chen, R. Lachapelle et al. // *J. Struct. Biol.* – 2006. – Vol. 155, № 1. – P. 12-21.
- Intracellular free zinc during cardiac excitation-contraction cycle: calcium and redox dependencies / E. Tuncay, A. Bilginoglu, N. Sozmen, E. Zeydanli et al. // *Cardiovasc. Res.* – 2011. – Vol. 89, № 3. – P. 634-642.
- Lopez V. Prenatal zinc deficiency: influence on heart morphology and distribution of key heart proteins in a rat model / V. Lopez, C. Keen, L. Lanoue // *Biol. Trace Elem. Res.* – 2008. – Vol. 122, № 3. – P. 238-255.
- Maret W. Metals on the move: zinc ions in cellular regulation and in the coordination dynamics of zinc proteins / W. Maret // *Biometals.* – 2011. – Vol. 24, № 3. – P. 411-418.
- Protective effect of zinc aspartate on long-term ischemia-reperfusion injury in rat skeletal muscle / E. Atahan, Y. Ergun, E. Kurutaş, T. Alici // *Biol. Trace Elem. Res.* – 2010. – Vol. 137, № 2. – P. 206-215.
- Roles of zinc and zinc signaling in immunity: zinc as an intracellular signaling molecule / T. Hirano, M. Murakami, T. Fukada, K. Nishida et al. // *Adv. Immunol.* – 2008. – Vol. 97. – P. 149-176.

УДК 57. 013: 577. 322: 611. 018. 63: 611. 127

ВПЛИВ ІОНІВ ЦИНКУ НА ФУНКЦІОНАЛЬНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ АКТОМІОЗИНОВОГО КОМПЛЕКСУ СЕРЦЕВОГО М'ЯЗА

Богуцька К. І.

Резюме. Показано, що у діапазоні концентрацій 0,1-5 мМ іони цинку пригнічують Mg^{2+} -залежну реакцію суперпреципітації актомиозину серцевого м'яза. Іони цинку, ймовірно заміщуючи іони кальцію або магнію за реакції суперпреципітації, здатні модулювати актин-міозинову взаємодію, змінюючи функціональні характеристики актомиозинових макромолекул м'яза.

Ключові слова: актомиозин, іони цинку, серцевий м'яз.

УДК 57. 013: 577. 322: 611. 018. 63: 611. 127

ВЛИЯНИЕ ИОНОВ ЦИНКА НА ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ АКТОМИОЗИНОВОГО КОМПЛЕКСА СЕРДЕЧНОЙ МЫШЦЫ

Богуцкая Е. И.

Резюме. Показано, что в диапазоне концентраций 0,1-5 мМ ионы цинка ингибируют Mg^{2+} -зависимую реакцию СПП актомиозина сердечной мышцы. Ионы цинка, вероятно замещая ионы кальция и магния в реакции СПП, могут модулировать актин-миозиновое взаимодействие, изменяя функциональные характеристики актомиозиновых макромолекул мышцы.

Ключевые слова: актомиозин, ионы цинка, сердечная мышца.

UDC 57. 013: 577. 322: 611. 018. 63: 611. 127

Influence of Zinc Ions on Functional Characteristics of Cardiac Muscle Actomyosin Complex

Bogutska K. I.

Abstract. The problem of regulating the functional activity of the muscles and catalytic mechanisms of this process has been and remains relevant to biochemistry, physiology and pharmacology of muscle. Although a large amount of data on biological action of metal ions on the organism is poorly understood molecular mechanisms of such action at the subcellular level. Receive new experimental data in this area will contribute to the development of methods to increase resistance to the action of harmful factors and treatment of poisoning caused by metal compounds.

Zinc is known to be one of the most essential microelements indispensable for vital functions. Zinc that comes into the organism from food and water is mainly absorbed in small intestine, and then it is transported to blood plasma, where it is bound by albumins and globulins, or to the tissues in which it is deposited in zinc and cadmium accumulating protein. Zinc is included in the structure of metalloenzymes and hormonal complexes. The property of zinc to take part in the processes of forming ligands with organic molecules explains why it is widely available in different biological systems. However, zinc distribution in tissues may change, since zinc can be displaced by other cations accumulated in proteins. The transport and metabolism of zinc in the organism is characterized by its fast assimilation. At the same time its deficiency is often caused by pathological conditions, and decreased concentration of zinc cations may, in turn, influence vital processes in cells.

Human body contains about 1,3-2,3 g of zinc, almost 90 % of total amount of which is in the muscles and bones. High level of zinc content is known to be not only in endocrine glands but also cells of muscles (1,4-7,1 mg per 100 g of tissue). In other reports the content of zinc in the muscles comprises 240 mg/kg. In the myocardium the mechanism of controlling intercellular distribution of Zn^{2+} and its change during the cycle of functioning has not been

revealed so far. The research in changes of Zn^{2+} homeostasis have been performed by using specific fluorescent dye FluoZin-3 and mass-spectroscopy, which allows «mapping» the metal in the biological tissue. For example, zinc has been found to be distributed inhomogeneously with the average concentration of 26 mg per gram of tissue. The results show that zinc is accumulated mainly in the muscle fibres of endocardium. Zinc is distributed evenly in sarcoplasmic reticulum, while in myocardium fibres it is concentrated mainly in anisotropic disks of myofibrils, that is, in the regions, which consist of myosin. The investigations of microelement content in different regions of the left ventricle in patients with ischemic coronary disease, by X-ray fluorescence analysis with synchronous emission, have revealed disbalance in microelement contents, in particular an increase the content of zinc. In the result of research in cardioprotecting properties of zinc-containing compounds and assumption has been made about the ability of zinc ions to decreased ischemic and postischemic damages of tissues due to antagonism with copper reactivity.

As known zinc exists in biological systems in two forms: bound zinc and chemically reactive Zn^{2+} . Over the recent years the researchers have studied zinc, zinc ions and compounds and their effect on organism as biomarkers and antioxidants, as well as intravital and lethal distribution in tissues, activity in certain structures (cell membranes, proteins, etc.), toxicity and as a promising pharmaceutical target. Zinc plays important role in controlling apoptosis. The excess of zinc may cause cell death due to apoptosis or necrosis. But still poorly understood mechanism controlling the intracellular distribution of zinc ions and its changes during a cycle of operation of the myocardium. Zinc deficiency may be a factor influencing the morphology of the cardiac proteins in rat model. Also found clinical and experimental compliance essential trace element composition of the blood in patients with myocardial infarction.

The aim of the work presented was to investigate the effect of zinc ions on the process of modeling the molecular mechanism of muscle contraction – superprecipitation reaction of actomyosin complex. Most published data testifies to the fact that the regulation of bivalent ions occurs through direct binding of cations to the protein. The researchers report that Zn^{2+} influences on superprecipitation of cardiac muscle actomyosin, probably, being able to replace calcium and magnesium ions (this displacement is less efficient for superprecipitation reaction) and modulate actin-myosin interaction by changing functional characteristics of actomyosin macromolecules of cardiac muscles. These results extend the understanding of the mechanisms of the influence of physical and chemical factors, including zinc ions, on the enzyme activity of ATP-hydrolases, namely myosin ATPase.

The researches in this field have practical importance due to possibility to regulate functional activity of muscles using zinc ions both in normal and pathological states.

Key words: actomyosin, zinc ions, cardiac muscle.

Рецензент – проф. Соболев В. І.

Стаття надійшла 7. 12. 2013 р.