

АКАДЕМИЯ НАУК СССР
ИНСТИТУТ БИОЛОГИЧЕСКОЙ ФИЗИКИ

В. И. Дещеревский

МАТЕМАТИЧЕСКИЕ
МОДЕЛИ
МЫШЕЧНОГО
СОКРАЩЕНИЯ

Под редакцией
академика Г. М. ФРАНКА



ИЗДАТЕЛЬСТВО «НАУКА»

Москва 1977

Дещеревский В. И. Математические модели мышечного сокращения. М., «Наука», 1977, 160 с.

Книга известного советского биофизика В. И. Дещеревского посвящена одному из весьма плодотворных методов исследования механизма мышечного сокращения — математическому моделированию. Автором предложена кинетическая теория мышечного сокращения, позволившая количественно описать различные режимы сокращения поперечно-полосатых мышц с помощью одного набора параметров и предсказать ряд новых фактов, которые были позже обнаружены экспериментально.

Рассмотрена также кинетическая модель регуляции актомиозиновых систем, построенная на основании циклической схемы элементарного сократительного акта и простой модификации механической модели работы регуляторного комплекса. Модель хорошо описывает сложные закономерности биохимической кинетики гидролиза АТФ.

Книга адресована биофизикам, биохимикам, физиологам, математикам, научным работникам и студентам, интересующимся проблемами мышечного сокращения и математического моделирования в биологии.

Ил. 71, библиогр. 201 назв.

Составитель Н. П. ДЕЩЕРЕВСКАЯ

Владимир Иванович Дещеревский
МАТЕМАТИЧЕСКИЕ МОДЕЛИ МЫШЕЧНОГО СОКРАЩЕНИЯ

Утверждено к печати
Институтом биологической физики Академии наук СССР

Редактор В. И. Пасечник. Редактор издательства Н. И. Бузина.
Художник И. Е. Сайко. Художественный редактор Т. П. Поленова,
Технический редактор В. Д. Прилепская

Сдано в набор 14/IV-1977 г. Подписано к печати 19/VII 1977 г.
Формат 60×90^{1/8}. Бумага типографская № 1. Усл. печ. л. 10,12. Уч.-изд. л. 10,7.
Тираж 2500. Т-10736 Тип. зак. 2107. Цена 1 р. 10 к.

Издательство «Наука» 117485, Москва В-485, Профсоюзная ул., д. 94а
2-я типография издательства «Наука». 121099, Москва, Г-99, Шубинский пер., 10

Предлагаемая вниманию читателей книга является итогом работ В. И. Дещеревского в области биофизики мышечного сокращения.

Научные интересы Дещеревского концентрировались в проблемах мышечного сокращения и ферментативного катализа. В своих исследованиях он сочетал тонкое экспериментальное искусство с глубоким теоретическим анализом. К 1968 г. им было завершено создание общей математической схемы функционирования поперечно-полосатой мышцы. При этом удалось связать кинетические параметры взаимодействия актина и миозина с динамическими характеристиками мышечного сокращения. В этой теории получили объяснение все известные к тому времени данные по механике и энергетике как поперечно-полосатых мышц позвоночных, так и летательных мышц насекомых. Теория позволила предсказать ряд новых режимов работы мышцы, которые были затем экспериментально осуществлены Дещеревским и его сотрудниками.

Исследование сократительных свойств мышцы с точки зрения разработанной теории позволило определить основные молекулярные кинетические параметры элементарного сократительного процесса в мышце. Эти работы Дещеревского приобрели широкую известность как в нашей стране, так и за ее пределами, выдвинув их автора в число лидеров этого направления.

В последующие годы В. И. Дещеревским был проведен теоретический и экспериментальный анализ работы основных мышечных белков в растворе. Представление о циклическом механизме расщепления АТФ мышечными белками позволило ему предложить кинетическую биохимическую схему работы мышечных белков и определить ее главные кинетические константы. На основании исследования взаимодействия актина с тропонин-тропомиозиновой системой была построена математическая модель регуляции актомиозиновых систем ионами кальция. Существенным следствием модели явилось осознание того факта, что тепловые флуктуации макромолекул комплекса регуляторных белков принципиально важны для их функционирования.

Далеко не все из задуманного В. И. Дещеревским было осуществлено, однако и то, что сделано им, оставило большой след в нашей науке.

В. И. Дещеревский жил напряженной, насыщенной жизнью без всяких скидок на тяжелую болезнь, начавшуюся в ранние студенческие годы. Незаурядный исследователь, человек больших нравственных достоинств, верный, бескорыстный товарищ, он вызывал любовь и уважение у всех знавших его. Страстная способность самоотдаваться любимому делу, большое мужество, помогавшее с юмором относиться даже к тяжелым сторонам своей жизни, делали его жизнь счастливой. Это чувство радости жизни, радости общения и работы передавалось окружающим его людям.

Безвременная смерть помешала В. И. Дещеревскому завершить работу над книгой, обобщающей его исследования по механизму мышечного сокращения. Книга доработана и подготовлена к опубликованию Н. П. Дещеревской.

В. И. Дещеревский родился 24.X 1939 г. В 1957 г. он поступил на физический факультет МГУ, где специализировался на недавно созданной тогда кафедре биофизики. Уже в студенческие годы проявились незаурядные научные и человеческие качества В. И. Дещеревского, умение выделять существенные черты в сложном явлении, способность сочетать глубокие знания физики, биологии и математики. Тогда им было выполнено исследование изотопных эффектов D_2O в растворах мышечных белков, позволившее объяснить физико-химический механизм повышения термостабильности белков в D_2O . После окончания университета в 1963 г. В. И. Дещеревский начал работать в Институте биофизики в г. Пущино, где внес большой вклад в создание этой новой научной базы.

В настоящее время идет активное «наступление» на «фронте» исследования механизмов мышечного сокращения и, более обще, преобразования химической энергии в механическую работу в биологических системах. В этом наступлении принимают участие исследователи и научные коллективы многих стран. Всестороннее исследование мышечного сокращения — одна из главных задач Института биофизики АН СССР. В числе исследователей мышечного сокращения особое место принадлежит В. И. Дещеревскому.

Эта книга поможет молодым исследователям добиться успехов в благородном стремлении на пути к научному познанию в той его области, которая так тесно связана с благом людей.

Июль 1976 г., Пущино

Академик Г. М. Франк

ПРЕДИСЛОВИЕ

Проблема биологической подвижности — исследование общих механизмов преобразования химической энергии в механическую работу — центральная в современной биофизике. В этой проблеме соединились механика, термодинамика, статистическая физика, химическая кинетика, физическая химия с биохимией и физиологией. Здесь анализ конформаций макромолекул соединяется с измерениями теплопродукции, изменений объема, совершаемой работы при мышечном сокращении. Здесь электронно-микроскопический структурный анализ сочетается с математическим моделированием, измерения кинетических констант биохимических реакций в растворах мышечных белков — с измерениями сокращения целой мышцы. Здесь граничат и сотрудничают многие науки. Это — типичная биофизика.

В этой особой области для достижения принципиально важных результатов необходим особый склад исследователя, особый стиль работы, — стиль, который по праву, в точном семантическом смысле называется «университетским». Такая широта мысли в сочетании с глубокой профессиональностью были свойственны создателю Института биологической физики академику Глебу Михайловичу Франку. Этот, истинно университетский стиль — замечательная черта автора этой книги Владимира Ивановича Дещеревского.

Ясно, что все разнообразие методов, экспериментальных и теоретических подходов может быть плодотворным лишь в условиях общения и сотрудничества специалистов-профессионалов разных специальностей. Такое разнообразие общения, обсуждений, семинаров обеспечивалось в коллективе Института биологической физики АН СССР в Пущино, куда В. И. Дещеревский уехал сразу по окончании физического факультета МГУ по кафедре биофизики. Здесь, в Пущино, группа его однокурсников составила основу нашей лаборатории, не без юмора названную Г. М. Франком «лабораторией физической биохимии». В разнообразии тематики этой лаборатории: химические и биохимические колебательные процессы; изотопные эффекты D_2O в биологических системах; конформационные изменения макромолекул белков при их функции — поддерживался этот упомянутый университетский стиль. В. И. Дещеревский был активным участником работы в ряде направлений — его первые работы [21, 35] посвящены изо-

топным эффектам D_2O на мышце (вместе с И. А. Корниенко). Затем он занимался термодинамикой взаимодействия аминокислот с водой (вместе с А. И. Климовым) [43, 44]. Глубокие работы по общим механизмам ферментативного катализа («релаксационная» модель) [20, 61, 186] выполнены им вместе с Н. П. Сидоренко (Дещеревской). Однако основным делом его жизни было исследование биологической подвижности [10, 13, 14, 22—34, 62, 63, 96—101]. И эти исследования были успешны именно в результате редкой универсальности их автора — переходившего от собственно-ручно сделанной экспериментальной установки для исследования сокращения мышцы лягушки к построению математических моделей и их анализу на ЭВМ, к опытам на растворах белков или к дискуссиям по общим проблемам ферментативного катализа. В первый период этих исследований в памятных всем нам дискуссиях с Э. А. Лямым, А. М. Жаботинским и А. М. Молчановым формировался общий метод — сочетание математического моделирования с непосредственным экспериментальным исследованием этих моделей. Пожалуй, кульминацией такого подхода был опыт, в котором на основании математического анализа модели был предсказан периодический режим сокращения мышцы лягушки — были созданы следующие из теории условия и мышца лягушки стала работать в колебательном режиме.

Принципиальное значение имело объединение в одной теории механики мышечного сокращения с кинетикой идущих в мышцах биохимических процессов, основанное на схеме циклического функционирования АТФазного комплекса, разработанной вместе с А. Е. Букатиной.

В. И. Дещеревский не успел завершить работу над этой книгой. Последние годы он работал с особой целеустремленностью, стремясь к созданию более общей теории биологической подвижности, общему пониманию механизмов преобразования химической энергии в механическую работу. Не завершенные им работы содержат ценные подходы к решению этой проблемы. Нина Павловна Дещеревская осуществила подготовку книги к опубликованию. Это было сопряжено с очень большой и трудной работой соединения отдельных глав, неопубликованных рукописей, теоретических разработок в единое целое. При выполнении этой работы очень существенной была помощь А. Е. Букатиной, критически прочитавшей всю рукопись. В книге были учтены замечания многих коллег и друзей автора: З. А. Подлубной, В. В. Леднева, А. А. Замятнина, Э. К. Рууге, А. М. Жаботинского, Н. А. Габеловой.

Предисловие, написанное Г. М. Франком, оказалось в числе последних его трудов. То, что оно предпослано книге, посвященной проблеме биологической подвижности, имеет особый символический смысл. И можно присоединиться к Г. М. Франку в уверенности, что читатели этой книги доведут исследование биологической подвижности до принципиальных успехов.

Профессор, доктор биологических наук С. Э. Шноль

ВВЕДЕНИЕ

1. Математические модели в биологии

В последнее время среди физиков-теоретиков, работающих в биологии, стало модным рассуждать о философских проблемах этой науки. В частности, о том, достаточно ли фундаментальных физических законов, известных на сегодня, для объяснения свойств живой материи. Обычно на этот вопрос отвечают: «Да, в принципе достаточно», — и трудно сказать, чего в этом ответе больше — оптимизма или пессимизма. Ведь, встав на такую точку зрения, биофизик отказывается пусть даже от призрачной надежды сделать открытие. Конечно, низведение биологической закономерности до уровня тривиального следствия законов физики — занятие и благородное и увлекательное, но ему все-таки не хватает романтики открывания.

Однако так ли уж обоснован этот пессимизм? Вероятно, в то время, когда при содействии Гальвани входило в науку электричество (как побочный продукт исследования мышц лягушки!), мало кто из натурфилософов сомневался в том, что вся природа в принципе познаваема в рамках механического подхода. Вот разве что математический аппарат для описания движения вихрей эфира еще недостаточно развит. Но это ведь дело поправимое. Важно, что в принципе все несомненно объяснимо с позиций современной науки.

Конечно, мощь теоретической физики с тех пор неизмеримо выросла, однако содержательный анализ биологических объектов или процессов пока еще ей по плечу лишь в тех случаях, когда их биологическая сущность отступает на второй план (например, перенос электронов в процессах зрения, фотосинтеза, окисления). Причина этого кроется в радикальном отличии биологических объектов от традиционных объектов физики. Специфически биологические свойства присущи только достаточно «большим», почти макроскопическим с точки зрения физики объектам. Поэтому при анализе их поведения должны применяться статистические методы. Однако, по мнению Молчанова [47], с которым нельзя не согласиться, эти объекты обладают рядом особенностей, которые исключают возможность применения к ним обычных методов статистической физики. Во-первых, взаимодействие между компонентами, из которых они состоят (например, между аминокислотами в белках),

как правило, нельзя считать слабым. Во-вторых, эти компоненты отличаются большим разнообразием (~20 типов аминокислот в молекуле белка, несколько тысяч различных белков в клетке). Третья особенность биологических объектов заключается в принципиальной нелинейности их поведения, которая является следствием того, что они функционируют в режимах, далеких от положения равновесия. По этой причине применение к ним методов не только статистической физики, но и неравновесной термодинамики оказывается либо невозможным, либо почти бессодержательным (можно назвать работы [19, 55], которые, вероятно, являются некоторым вкладом в теоретическую физику, но имеют в лучшем случае косвенное отношение к биологии).

Значит ли это, что теоретическая физика совершенно бесполезна в большей части биологических проблем? По-видимому, такой вывод был бы преждевременным. Ее методология, конкретнее — метод математического моделирования — может занять в биологии почти такое же место, как и в физике. Основная предпосылка для этого уже имеется — глубокое проникновение в нее экспериментальных физических методов, дающих количественную информацию. Однако моделирование процессов в биологии существенно отличается от построения теории физического явления. В физике существует небольшое число элементарных моделей, таких как материальная точка, твердое тело, статистический ансамбль, электромагнитное поле, квантовая система и т. д. Их поведение регламентировано законами природы, которые сформулированы раз и навсегда и «обжалованию не подлежат». Модель или теория любого физического явления представляет комбинацию нескольких таких элементарных моделей, каждая из которых многократно апробирована. Обычно введение новой элементарной модели равносильно декларированию нового закона природы и допустимо лишь в том случае, если показано, что данное явление находится «вне компетенции», т. е. вне области применимости, всех существующих элементарных моделей. Моменты, когда это случалось, становились вехами на пути развития физики.

В моделировании биологических процессов пока что дело обстоит иначе. Использовать напрямую элементарные модели теоретической физики в этой области — занятие почти безнадежное по причинам, о которых говорилось выше. Поэтому возникает необходимость создания набора собственно «биологических элементарных моделей». В качестве примера одной из таких моделей можно привести уравнения Ходжкина — Хаксли, описывающие возникновение и распространение нервного импульса. Если бы удалось подобным образом смоделировать основные процессы жизнедеятельности, то можно было бы реально говорить о «динамической модели клетки» (термин А. М. Жаботинского), ткани и даже целого организма. В настоящее время нелегко даже представить себе этот базисный набор «элементарных процессов», на которые можно «разложить жизнь». Тем не менее я рискнул это сделать, хотя и

отдаю себе отчет в том, что приведенный ниже список, с одной стороны, неполон, а с другой стороны, по крайней мере некоторые, если не все, перечисленные процессы лишь условно могут претендовать на роль элементарных. Однако этот набор имеет, по-моему, то преимущество, что к моделированию процессов, его составляющих, можно приступить уже сегодня.

Итак, можно представить себе такой набор процессов жизнедеятельности, модели которых могли бы претендовать на роль элементарных:

- | | |
|---|-------------------------|
| 1) процессы энергообеспечения клетки; | Динамическая |
| 2) транспорт веществ через мембраны; | модель |
| 3) механизм биологического движения; | клетки |
| 4) биосинтез и распад структурных компонент клетки; | |
| 5) деление клеток; | |
| 6) контактное взаимодействие клеточных оболочек; | Динамическая |
| 7) синтез регуляторных веществ типа гормонов и механизм их взаимодействия с клетками; | модель тканей и органов |
| 8) механизм иммунитета. | |

(Спектр моделей по каждому процессу — следствие биологической эволюции.)

Естественно, что «биологические элементарные модели» обладали бы несравненно меньшей общностью, чем физические законы. Более того, вряд ли приходится сомневаться в том, что с развитием теоретической, в частности статистической, физики их удастся свести к более общим «физическим моделям». Тем не менее, создание набора «биологических элементарных моделей» является необходимым звеном в построении количественной теории биологических процессов. Попытке построения одной из таких моделей — модели биологического двигателя, каковым являются мышцы и другие органы движения живых существ, — посвящена данная монография.

2. Проблема биологической подвижности и мышечное сокращение

Прежде чем рассказывать о работе мышцы как биологического двигателя, хочется ответить на вопрос, чем интересна проблема, о которой пойдет речь, с точки зрения общей биологии и молекулярной биологии.

Одним из результатов почти тридцатилетней работы биохимиков является принцип, кратко сформулированный основоположником биохимии мышечного сокращения В. А. Энгельгардтом как принцип «единства во множестве». Речь идет о единстве механизма множества явлений, которые объединяются понятием биологической подвижности. Что такое биологическая подвижность? Это не только сокращение различных типов мышц, обеспечивающих

перемещение животных организмов, по и движение жгутиков и ресничек у одноклеточных микроорганизмов, и сокращение белкового чехла отростков фагов (Т-фаги *Escherichia coli*) в момент проникновения его нуклеиновой кислоты внутрь клетки (добавлением АТФ можно вызвать выход нуклеиновой кислоты из бактериофагов в искусственных условиях, без контакта с клеточной оболочкой [51]). Это и внутриклеточные движения — движение протоплазмы (например, в глицеринизированной ацетабулярии в присутствии АТФ *) и движение хромосом (структура кинетохор) при делении клетки. Это не только движение животных организмов, но и движение листьев мимозы (мимозин + АТФ). Все эти столь различные формы движения имеют две общие черты:

- 1) механизмы, осуществляющие их, построены из одинаковых материалов — из белков типа актина и миозина, т. е. из таких же белков, из которых построен сократительный аппарат всех мышц;
- 2) источник энергии для всех этих процессов — АТФ.

Более того, некоторые виды молекулярного движения в живых организмах, в частности активный перенос ионов и молекул через мембраны, осуществляются белками такого же типа и горючим в этих процессах также является АТФ.

После всего сказанного ясно, что не существует ни одного физиологического процесса в живых организмах, в котором бы сократительные белки не играли важной роли. Отсюда ясен общеприкладной биологический интерес к проблеме мышечного сокращения.

Существует еще один очень интересный для молекулярной биологии аспект изучения проблемы мышечного сокращения. Как известно, проблема ферментативного катализа является одной из ключевых проблем этой науки. В основе современных представлений о функционировании ферментов лежит гипотеза Кошланда о необходимости структурных, конформационных перестроек молекул фермента, т. е. их механических изменений в ходе каталитического акта. Мышечные белки — это единственные представители настоящих ферментов, в которых имеют место такие механические изменения при их взаимодействии с субстратом (АТФ), для обнаружения которых не требуется сложных приборов, настолько они явны, как на уровне целой мышцы (в чем легко убедиться, например, напрягая бицепс), так и на уровне белковых препаратов, выделенных из мышц: невооруженным глазом видно, как сжимается и уплотняется актомиозин при добавлении АТФ.

Мышечные белки являются, по-видимому, вершиной эволюции механизма биологического катализа, в них он выступает в наиболее яркой форме, и поэтому естественно ожидать, что основные принципы действия этого механизма удобно изучать именно на их примере.

В настоящее время подробно изучен белковый состав мышц; в основном выяснена роль белковых компонент; известна в общих

* Подробнее о глицеринизированных моделях сократительного аппарата, способных к сокращению, см. в [1].

чертах макромолекулярная структура сократительного аппарата, ясна примерная картина биохимических процессов, протекающих при сокращении, и с очень высоким разрешением изучена динамика сокращения и энергопродукции мышцы. Кроме этого, имеется теория, объединяющая все эти факты в стройную картину, которую можно было бы назвать: «Как могла бы сокращаться поперечно-полосатая мышца». Единственное, чего мы не знаем, — как мышца сокращается на самом деле.

Причина этого не в том, что нам неизвестны какие-то детали сокращения мышцы, а в том, что мы не знаем, насколько верно та картина, которую мы себе представляем, отражает самые существенные черты происходящих в мышце процессов. Если она отражает эти черты верно, то задача состоит в выяснении деталей (правда, очень важных) механизма, принципы работы которого ясны. Если нет — встает вопрос о самих принципах сокращения.

За последние годы была выяснена несостоятельность многих красивых физических теорий. Вообще нужно сказать, что развитие представлений о молекулярном механизме мышечного сокращения шло нетипичным путем. Обычно ситуацию в молекулярной биологии можно охарактеризовать эгегической фразой: «Как много известно — и как мало понято». В мышце «понимание» всегда опережало «знание». Красивые теории исчерпывающим образом объясняли все имеющиеся на данный момент сведения, стимулировали постановку решающих экспериментов и — погибали под давлением новых фактов, уступая место еще более красивым гипотезам.

Такие взаимоотношения эксперимента и теории обычно характерны для физики, и появление такой ситуации в исследовании мышцы объясняется участием физиков в решении кардинальных вопросов проблемы. Интерес физиков к мышечному сокращению обусловлен, на мой взгляд, следующим обстоятельством. Мышца — это преобразователь энергии, а преобразование энергии из одного вида в другой — традиционная и успешно развивавшаяся в XVIII—XIX вв. проблема физики. Употребляя современные термины, можно сказать, что мышца — механохимический преобразователь, белковый аппарат которого способен гидролизовать аденозинтрифосфорную кислоту и использовать энергию этого процесса для совершения механической работы практически без повышения температуры. Наиболее близкой технической аналогией является электродвигатель, работающий от аккумулятора или батарейки, поскольку он также использует химическую энергию для совершения работы, не являясь тепловой машиной.

Естественно, что исследования механических и энергетических свойств мышцы как механохимического преобразователя потребовали привлечения экспериментальных и теоретических методов физики. Без натяжки можно считать историю этих исследований от Гальвани до Хилла (1938) — историей возникновения и становления биологической физики как науки.

КИНЕТИЧЕСКАЯ ТЕОРИЯ СОКРАЩЕНИЯ ПОПЕРЕЧНО-ПОЛОСАТЫХ МЫШЦ

Глава 1

БИОФИЗИЧЕСКИЙ ПОДХОД К ИЗУЧЕНИЮ МЫШЕЧНОГО СОКРАЩЕНИЯ

1.1. Основные экспериментальные закономерности *

Что значит понять, как сокращается мышца? Реально, по-видимому, можно говорить о двух уровнях понимания: 1) молекулярно-кинематическом; 2) молекулярно-динамическом. Рассмотрим этот вопрос подробнее.

1. Молекулярно-кинематический уровень. Можно сказать, что в настоящее время понимание морфологии мышцы спустилось на молекулярный уровень. Нам известно, из каких белковых молекул и как построены сократительные элементы мышцы, т. е. мы знаем статическую молекулярную конструкцию мышцы. Однако за работой этой конструкции мы пока проследить не можем. Кинематический уровень понимания — это понимание того, как движутся отдельные макромолекулы при сокращении мышцы и каким образом движение отдельных молекул суммируется в наблюдаемое сокращение мышцы.

2. Молекулярно-динамический уровень. Здесь имеется в виду понимание того, каким образом «химическая» энергия молекулы АТФ превращается в движение макромолекул, как работают в этом процессе обычные физические законы природы.

Эти два уровня пока даже не очень связаны между собой. В первом направлении до сих пор работала почти исключительно морфология, во втором — физическая биохимия мышцы. Остаемся сначала на попытках понять механизм мышечного сокращения на кинематическом уровне.

* Следует отметить, что в данной книге изложены в основном результаты самого автора. Литературные данные привлекаются лишь постольку, поскольку они связаны с вопросами, интересовавшими автора. Более полное изложение экспериментальных данных о мышечном сокращении читатель легко найдет в цитированной литературе (см., например, [3, 17, 48, 50, 75], а также книгу М. М. Заалишвили. Физико-химические основы мышечной деятельности. Тбилиси, «Мецниереба», 1971).

Проблема состоит в следующем. Современная экспериментальная техника не дает возможности проследить движение отдельных белковых молекул в ходе сокращения мышцы. Однако, зная молекулярную конструкцию мышцы и предполагая определенный механизм функционирования этой конструкции, можно попытаться логически вывести свойства мышцы (сократительные и термические) при данном постулированном механизме работы, а затем сопоставить их с экспериментом. Тогда в случае удачи мы могли бы предсказать поведение мышцы и в неисследованных пока режимах сокращения. По-видимому, этот путь может привести к ответу на вопрос о том, как функционирует молекулярная белковая конструкция мышцы при сокращении. Насколько это утверждение обосновано, мы увидим в дальнейшем.

Основные достижения в экспериментальном исследовании термических и сократительных свойств мышцы, ставшие в настоящее время классикой науки о мышце, связаны с именем английского ученого А. В. Хилла. Хилл начал заниматься мышцей в начале двадцатых годов из чисто спортивного (в буквальном смысле) интереса. «Признаюсь, что именно мои состязания и поражения на треке и площадке, изнеможение и ооченелость, одолевавшие меня во время бега, побудили меня заняться изучением мышцы», — писал он. Поскольку в то время (да и сейчас) было практически невозможно применить биохимические методы для изучения химических процессов, протекающих во время сокращения непосредственно в мышце, он решил заняться изучением термодинамики мышечного сокращения, поскольку по тепловыделению можно было судить об интенсивности химических процессов в различные фазы сокращения мышцы. Для этого нужно было научиться измерять малые количества тепла за короткие интервалы времени. Чтобы стала понятной трудность задачи, назовем некоторые цифры. Тепловыделение портняжной мышцы лягушки за одиночное сокращение составляет 3 мкал/г мышцы, а весит эта мышца обычно 0,2 г. Время ее сокращения в зависимости от условий варьирует от 30—50 мс до секунд (в режиме тетануса *), а отдельные фазы сокращения в быстрых режимах занимают еще меньше времени:

Латентный период	~3 мс
Передний фронт	~10 мс
Задний фронт	15—20 мс

Заметим, что усилители и осциллографы вошли в практику физиологических исследований гораздо позже. В те времена, когда Хилл начинал свои исследования, использовались довольно

* Тетанус — режим работы мышцы, при котором частота стимулирующих мышцу импульсов подобрана так, что в промежутках между ними мышца не успевает расслабиться и одиночные сокращения сливаются. Для портняжной мышцы лягушки при 0° С такое слияние наступает на частоте примерно 15 стимулирующих импульсов в минуту.

инерционные зеркальные гальванометры. И тем не менее Хиллу удалось создать нужную методику. О кинетике тепловыделения при сокращении мышцы Хилл [129] судил по сопоставлению опытной кривой (отклонение гальванометра во времени при сокращении мышцы) с контрольной. Контролем служила убитая формалином мышца, через которую (сопротивление ее было известно) пропускали прямоугольный импульс тока.

В опытах такого типа мышцу приводят в состояние тетануса и позволяют ей изометрически сокращаться в течение небольшого отрезка времени. Затем ее внезапно освобождают, так что она сокращается до некоторой заданной величины. Такие опыты показывают, что помимо «изометрического» тепла всегда выделяется некоторое дополнительное количество теплоты ΔQ . Проводя эти опыты, Хилл [129] установил две закономерности.

Во-первых, он заметил, что при любых скоростях сокращения и любых нагрузках величина ΔQ зависит только от изменения длины ΔL (рис. 1, а), так что

$$\Delta Q = a' \Delta L.$$

Это означало, что для скорости теплопродукции dQ/dt можно записать

$$dQ/dt = a' V, \quad (1.1)$$

где V — скорость укорочения мышцы. Тогда полная мощность мышцы (сумма механической мощности и скорости теплопродукции) оказывается равной $(P + a')V$, где P — нагрузка.

Во-вторых, Хилл обнаружил, что в его опытах при одинаковом изменении длины скорость выхода на новый изометрический уровень уменьшалась с увеличением нагрузки (рис. 1, б); при этом избыточная скорость полной энергопродукции по сравнению с изометрической была пропорциональна $P_0 - P$. На основании этого Хилл смог записать

$$(P + a')V = b(P_0 - P), \quad (1.2)$$

где b — коэффициент пропорциональности. Таким образом, исходя из результатов термических экспериментов, Хилл получил кинематическое соотношение между скоростью сокращения и нагрузкой, которое должно выполняться для изотонически сокращающейся мышцы. Проверка подтвердила его справедливость. Эксперимент ставился следующим образом (рис. 2): в момент времени $t = 0$ мышцу, имеющую нагрузку P_1 , стимулируют, и она начинает сокращаться от исходной длины L_0 . Беспредельно сокращаться она не может, устанавливается какая-то конечная длина L_1 . Если теперь взять большую нагрузку P_2 , то, как можно видеть, уменьшается скорость сокращения и, кроме того, уменьшается величина укорочения мышцы. Если построить зависимость начальной стационарной скорости сокращения (т. е. наклона этих кривых) от величины нагрузки, то мы получим зависимость гипер-

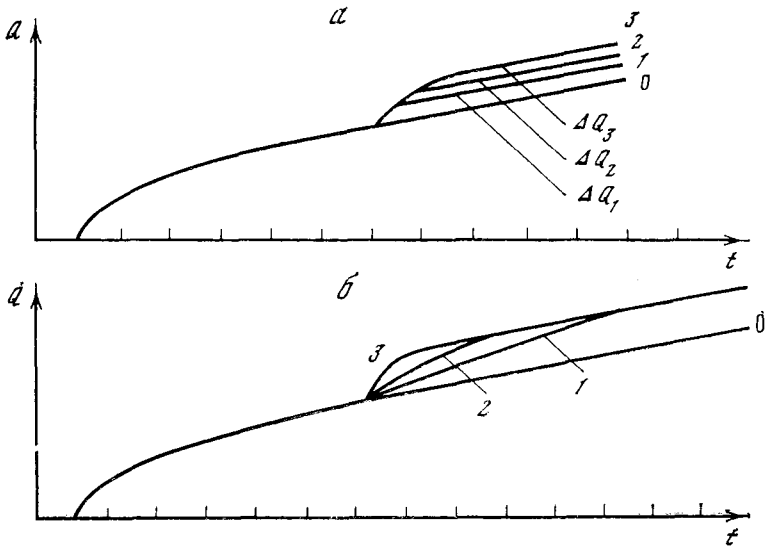


Рис. 1. Типичный ход выделения тепла при изометрическом тетаническом сокращении мышцы

a — при различных укорочениях: 0 — изометрическое сокращение при исходной длине; 1, 2, 3 — изометрическое сокращение после укорочения на ΔL , $2\Delta L$, $3\Delta L$ соответственно; *b* — при различных нагрузках: 0 — изометрическое сокращение при исходной длине; 1, 2, 3 — изометрическое сокращение после скачка нагрузки на ΔP_1 , ΔP_2 , ΔP_3 соответственно ($\Delta P_1 > \Delta P_2 > \Delta P_3$)

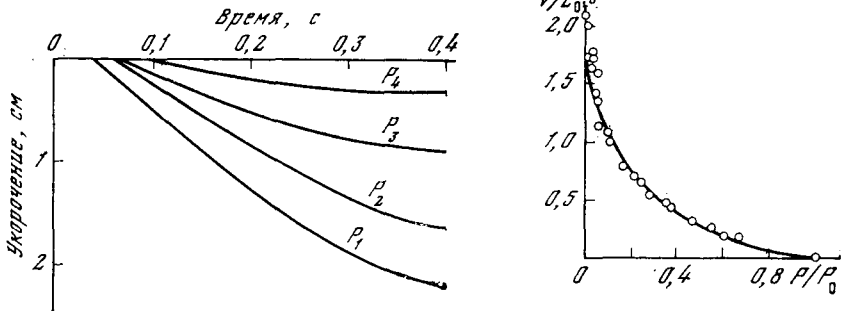


Рис. 2. Сокращение мышцы с постоянной нагрузкой [116]

Экспериментальные кривые сдвинуты так, чтобы нулевые линии и моменты начала стимуляции совпадали ($P_1 < P_2 < P_3 < P_4$)

Рис. 3. Зависимость скорости укорочения V/L_0 от нагрузки P при изотоническом сокращении [75]

Сплошная кривая рассчитана по уравнению (1.3) при $a = 0,26 P_0$ и $b = 0,42 L_0 \text{ см/с}$; L_0 — стандартная длина мышцы

большого типа со смещенными осями (рис. 3). При некоторой нагрузке P_0 мышца вообще уже не сокращается ($V = 0$); при равной нулю нагрузке скорость сокращения максимальна ($V = V_{\max}$). Полученная кривая описывается формулой, в точности совпадающей с формулой (1.2):

$$(P + a)V = b(P_0 - P), \quad (1.3)$$

где a и b — некоторые константы, причем $b = aV_{\max}/P_0$. Для портняжной мышцы лягушки a/P_0 обычно равно 0,25; аналогичная величина получена и для поперечно-полосатых мышц крысы, для мышц кошки, жабы и т. д. [75].

Позже, проводя более точные измерения, Хилл выяснил, что в соотношении (1.1), носящем теперь его имя, параметр a' не является константой, более точное выражение для него [130]:

$$a' = 0,16P_0 + 0,18P. \quad (1.4)$$

Это означает, что полная скорость выделения энергии сокращающейся мышцей зависит от нагрузки нелинейно, т. е. в выражении (1.2) правая часть равна левой лишь в определенном диапазоне изменения нагрузки (см. рис. 9, где приведены для сравнения функция $b(P_0 - P)$ и экспериментальная зависимость полной скорости выделения энергии изотонически сокращающейся мышцей от нагрузки).

Однако в большинстве моделей, построенных вплоть до недавнего времени, моделируется именно линейный процесс; обычно принимается $a' = a = 0,25P_0$. Как можно видеть из рис. 9, при достаточно больших нагрузках это обеспечивает хорошее совпадение с экспериментальными данными.

Любая теория мышечного сокращения обязана удовлетворять соотношениям (1.1) и (1.3)—двум соотношениям Хилла.

1.2. Обсуждение некоторых моделей в свете гипотезы скользящих нитей

Первой попыткой, претендующей на звание молекулярно-динамической теории мышечного сокращения, является полиэлектролитная модель, предложенная Хиллом и Мейергофом и удостоенная в 1922 г. Нобелевской премии. Согласно этой модели, в расслабленном состоянии белковые молекулы мышцы растянуты зарядами, расположенными периодически на их поверхности, а при сокращении активируется гликолиз, выделяется молочная кислота и в результате нейтрализуются заряды на поверхности белковых молекул, что приводит к их сворачиванию. Биохимическая и энергетическая несостоятельность этой модели показаны уже довольно давно, причем Хилл сам приложил к этому руку, но структурная подоплека модели рассматривалась гораздо позднее и ее опровержение было получено только после того, как стали снимать рентгенограммы сокращающейся мышцы. Рентгенострук-

турные исследования опровергают и теорию $\alpha \rightarrow \beta$ -переходов Астбюри [80] в мышце, и очень красивую идею, выдвинутую впер-вые Энгельгардтом [77], о том, что сокращение является плавлением белкового кристалла.

Рентгеноструктурные исследования показали, что при сокра-щении мышцы не происходит такого изменения структуры миофила-ментов или их упаковки, которые могли бы сами по себе обеспе-чить значительное укорочение мышцы [110,144]. Результаты этих исследований делают несостоятельными все теории, основанные на предположении о сворачиваемости или растяжении белковых цепей, о процессах плавления и кристаллизации белкового субстрата мышцы. По сути дела, рентгеновские исследования остав-ляют единственную возможность осуществления сокращения мыш-цы — именно ту возможность, которую принято в настоящее время называть гипотезой скользящих нитей

В рамках гипотезы скользящих нитей имеется целый ряд раз-личных классов моделей, в которых возникновение сократительной силы приписывается совершенно различным физическим процес-сам. Большинство исследователей придерживается мостиковой теории генерации силы, согласно которой сила возникает при конформационной перестройке актомиозиновых комплексов, периоди-чески возникающих и распадающихся между толстыми и тонкими нитями. Альтернативой этой теории является теория дальнедей-ствующих сил, основанная на следующем экспериментальном наблюдении: при сокращении мышцы объем каждого саркомера остается постоянным **. При этом к укорочению мышцы должны приводить не только силы, возникающие между нитями в продоль-ном направлении, но и силы отталкивания между ними. Была даже такая экзотическая теория, которая объясняла сокращение расширением Z-мембран мышцы при возбуждении [195]. При этом любое преобладание сил отталкивания в поперечном сечении должно приводить к расширению в поперечном направлении и, следовательно, при постоянстве объема саркомера — к его укорочению. Однако до сих пор не удалось получить сколько-нибудь удовлетворительное объяснение сократительных свойств мышцы с этих позиций.

В мостиковой гипотезе предполагается, что вдвигание систем нитей друг в друга — не пассивный процесс, а результат их ак-тивного взаимодействия, т. е. движущий механизм скрыт во

* Однако следует отметить, что для молекулярного механизма генерации си-лы в рамках гипотезы скользящих нитей изменение конформации белковых молекул и некоторые изменения в структуре толстых нитей могут играть важную роль. Такие изменения в структуре миозинсодержащих нитей были обнаружены и интенсивно изучаются школой Г. М. Франка [6, 36, 37, 42, 52, 53, 59, 65, 69, 70, 117, 171, 172, 182].

** При точных волюмометрических измерениях обнаружено изменение объе-ма порядка 10^{-5} см³/г мышцы (см., например, [113, 49]). Больше измене-ния обнаружены на суспензии миофибрилл при взаимодействии с АТФ (см. работы Н. А. Рабеловой и А. А. Замятинца [118, 38]).

взаимодействии нитей. Решающим доводом в пользу этой гипотезы являются очень важные эксперименты, связанные с именем лауреата Нобелевской премии А. Хаксли. Это известные опыты Гордона, Хаксли и Джулиана [121] 1966 г., доказавших зависимость активной изометрической силы мышечного волокна от его длины, т. е. от длины саркомера. До этого противниками гипотезы скользящих нитей было опубликовано несколько сообщений об экспериментах, в которых сильно растянутые мышечные волокна с отсутствующим, по мнению авторов, перекрыванием систем нитей, развивали довольно значительную изометрическую силу. Опыт, поставленный в лаборатории Хаксли, был выполнен безукоризненно и доказал пропорциональность изометрической силы и степени перекрытия нитей. На рис. 4 приведена экспериментальная зависимость, полученная в этих опытах, и поясняющая ее схема.

Таким образом, остается единственный класс гипотез, в котором генерация сократительной силы приписывается актомиозиновым мостикам. Моделей, в основе которых лежала бы гипотеза скольжения, не так много, но так как эта «гипотеза» на самом деле уже давно представляет собою не гипотезу, а факт [71, 135, 145], мы считаем, что имеет смысл рассматривать только такие модели.

К концу 60-х годов на основании этой гипотезы было создано несколько моделей [132, 133, 173], различающихся набором постулатов о механохимических свойствах мышечных белков. Однако все эти модели обладали рядом недостатков. Ни одна из них, по существу, не являлась количественной, поскольку в них делались попытки рассчитать лишь самый простой стационарный режим сокращения мышцы — с постоянной скоростью под постоянной нагрузкой. Согласие с кинематическим уравнением Хилла (1.3), полученное в этих теориях, ни в коей мере не могло служить подтверждением их основных постулатов. Так, например, модель Подольского [173] противоречила экспериментальной зависимости изометрической силы от длины саркомера [121]. (Можно сказать, что любая модель, основанная на предположении об укорочении протофибрилл, даже локальном, противоречит этим экспериментальным данным.) В теории Хаксли [133] и в ее модификации [132] математическое описание физической модели было проведено не совсем корректно [22]. Однако подход, развитый в этой работе, по-видимому, адекватен экспериментальным основам концепции скользящих нитей.

В следующих главах этой части книги будет изложена количественная теория [22—30, 96—100, 13, 14], связывающая термомеханические свойства поперечно-полосатых мышц с их структурной организацией. Во второй главе формулируется математическая модель сокращения. Она строится в два этапа. Сначала формулируются на математическом языке экспериментально обоснованные принципы работы сократительного аппарата. Анализ полученной системы из двух уравнений в частных производных затруднителен, поэтому вводятся три предположения, конкретизирующие

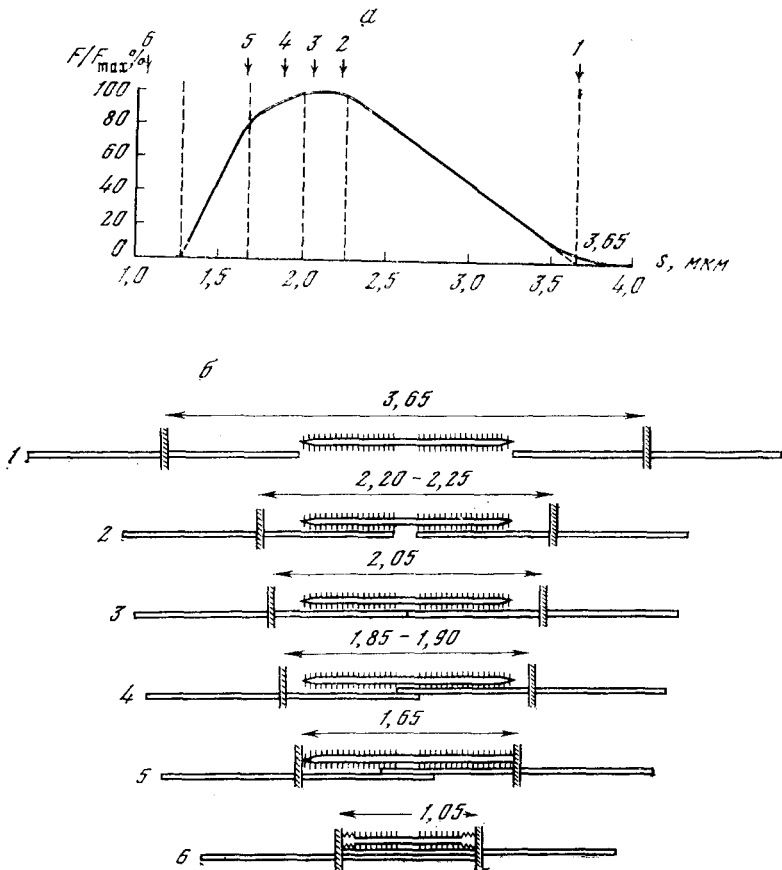


Рис. 4. Зависимость изометрического напряжения мышечного волокна от степени перекрытия нитей [121]

а — изометрическое напряжение, развиваемое поперечно-полосатой мышцей при различных длинах саркомера s по измерениям на одиночных волокнах;

б — изменение степени перекрытия толстых и тонких нитей при различных длинах саркомера; 1, 2, 3, ... на обеих схемах соответствуют одинаковым длинам саркомера; размеры указаны в μM

схему элементарного сократительного акта. Это позволяет получить из исходной математической схемы простую систему обычных дифференциальных уравнений, описывающих кинетику замыкания и размыкания миозиновых мостиков в сокращающейся мышце и позволяющих рассчитать практически любой режим сокращения мышцы. Детальное исследование этой модели в следующих главах показывает, что она количественно описывает сократительные свойства скелетных мышц позвоночных и летательных мышц насекомых.

Вывод «кинетической модели» из общей математической схемы, базирующейся на известных экспериментальных данных, позволяет уточнить смысл постулатов, лежащих в ее основе, и тех ограничений, которые они накладывают на механохимические свойства молекул сократительных белков.

Глава 2

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ОСНОВЫ И МАТЕМАТИЧЕСКАЯ ФОРМУЛИРОВКА КИНЕТИЧЕСКОЙ МОДЕЛИ МЫШЕЧНОГО СОКРАЩЕНИЯ

2.1. Сводка основных экспериментальных фактов

1. Сократительный аппарат мышечного волокна состоит, как правило, из $\sim 10^4$ последовательно соединенных одинаковых элементов — саркомеров, каждый из которых содержит $\sim 10^6$ нитей двух сортов — толстых и тонких. Изменения саркомера при сокращении схематично изображены на рис. 5. Правая и левая половины саркомера симметричны [138].

2. Комплекс двух основных мышечных белков актина и миозина — актомиозин — является механохимическим преобразователем энергии АТФ [77]. Взаимодействие двух названных белков — необходимое условие сокращения; в покоящейся мышце эти белки не взаимодействуют [60].

3. Миозин и актин локализованы соответственно в толстых и тонких нитях, которые способны контактировать друг с другом в дискретных точках только через миозиновые мостики [124].

4. В покоящейся мышце мостики на толстых нитях расположены строго упорядоченно [144]. В средней части толстой нити они отсутствуют [138].

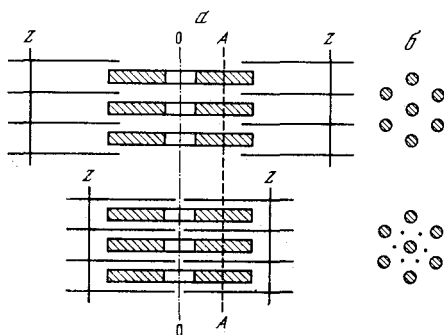


Рис. 5. Схема изменений саркомера при сокращении

а — продольный разрез; заштрихована область толстых нитей, содержащая мостики; Z — Z-мембрана;
б — поперечный разрез по АА

5. В сокращающемся саркомере решетки из толстых и тонких нитей вдвигаются одна в другую. Длина и структура тонких нитей во время сокращения не меняется. Длина толстых нитей также не меняется, но ухудшается упорядоченность в расположении мостиков (размываются соответствующие рефлексy на малоугловой рентгенограмме [144]).

6. Гексагональная упаковка нитей (см. рис. 5,б) при сокращении не нарушается [111].

7. Любой из мономеров актина, из которых построены тонкие нити, является потенциальным акцептором миозинового моста [139].

8. Сила, развиваемая саркомером при постоянной длине, пропорциональна числу мостиков в зоне перекрытия толстых и тонких нитей [121].

2.2. Принципы работы сократительного аппарата

А. Из пунктов 2, 3, 5 и 8 следует, что источником сократительной силы мышцы являются замкнутые мостики. Из дискретности расположения миозиновых мостиков и их актиновых акцепторов и из несжимаемости нитей (пункт 5) следует, что каждый мостик при сокращении должен работать циклически: замыкаться, развивать движущую силу на некотором интервале относительного перемещения нитей и затем размыкаться.

Б. Из пункта 1 и рис. 5 очевидно, что сила, регистрируемая на концах мышечного волокна, равна силе, развиваемой в любой из половинок любого саркомера (при всех режимах сокращения инерционными силами внутри мышцы можно пренебречь). Скорость укорочения волокна $V = 2Nv$, где N — число саркомеров, а v — скорость относительного движения толстых и тонких нитей.

В. Из пункта 6 следует, что сократительный аппарат можно рассматривать как принципиально одномерную систему: перпендикулярные оси волокон компоненты сил либо скомпенсированы, либо малы по сравнению с осевыми компонентами. Это позволяет ограничиться рассмотрением взаимодействия пары нитей, толстой и тонкой, и считать, что каждая половина саркомера представляет набор таких одинаковых пар.

Принципы А, Б и В представляют собой сущность «гипотезы скользящих нитей» [71,133]. Их следует дополнить четвертым принципом, который не так хорошо экспериментально обоснован, как первые три.

Г. Миозиновые мостики работают независимо*. Это вытекает из линейной зависимости натяжения от длины саркомера (пункт 8). Отсутствие синхронизации в работе мостиков [144] является косвенным подтверждением этого принципа.

Это означает, что размыкание мостика подчиняется мономоле-

* Вопрос о том, что может дать существование кооперативности в работе мостиков, мы обсудим в главе 5.

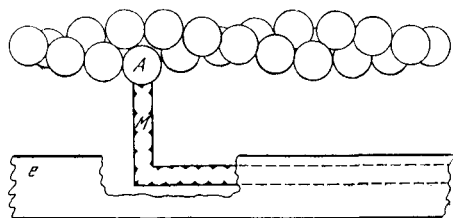


Рис. 6. Схема взаимодействия протофибрилл

A — мономер актина в тонкой нити;
M — поперечный мостик миозина в толстой нити;
e — гипотетический «жесткий стержень» толстой нити

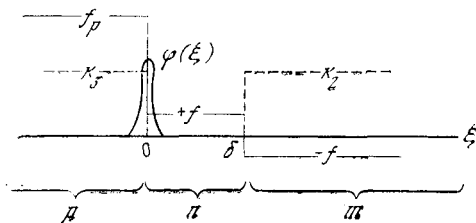


Рис. 7. Диаграмма состояний поперечного мостика

ξ — смещение мостика от равновесного положения 0; $\varphi(\xi)$ — равновесное распределение свободных мостиков; f_p и k_2 — сила, развиваемая мостиком, и константа скорости размыкания актомиозиновой связи соответственно в «супертянущем» состоянии p; $+f$ — сила в «тянущем» состоянии n; $(0, \delta)$ — интервал активной конформационной перестройки мостика; k_2 и $-f$ — константа скорости размыкания актомиозиновой связи и сила, развиваемая мостиком, в «тормозящем» состоянии m

состоянии p; $+f$ — сила в «тянущем» состоянии n; $(0, \delta)$ — интервал активной конформационной перестройки мостика; k_2 и $-f$ — константа скорости размыкания актомиозиновой связи и сила, развиваемая мостиком, в «тормозящем» состоянии m

кулярной кинетике. В силу стерических ограничений около свободного мостика может находиться только свободный актиновый центр, так что замыкание мостика также подчиняется мономолекулярной кинетике.

Физическая модель, соответствующая принципам А, Б и В, поясняется рис. 6. Из-за спирального расположения актиновых центров на тонких нитях, по-видимому, не все миозиновые мостики могут быть замкнуты одновременно. В дальнейшем мы будем рассматривать только активные мостики, входящие в состав «удобно расположенных» пар миозин-актин, т. е. замкнутые или стерически способные к замыканию. Для скелетных мышц позвоночных доля активных мостиков не зависит от положения толстой нити относительно тонкой, т. е. от длины саркомера.

2.3. Математическая формулировка кинетической теории

Из пункта 4 следует, что у каждого свободного мостика имеется собственное положение равновесия на толстой нити, вблизи которого он проводит большую часть времени. Обозначим его смещение из этого положения ξ . Тогда для всех мостиков, связанных с актиновыми центрами, скорость изменения ξ будет равна скорости сокращения полусаркомера v . Пусть $\rho(\xi, t)$ — плотность распределения замкнутых мостиков по ξ в момент t , так что $\rho(\xi, t) \Delta\xi$ — число замкнутых мостиков со смещением от ξ до $\xi + \Delta\xi$ в половине саркомера. Пусть $g(\xi, t)$ — плотность распределения свободных мостиков по ξ в момент t , а $\varphi(\xi)$ — форма равновесного распределения таких мостиков по ξ при $t \rightarrow \infty$,

введенная таким образом, чтобы

$$\int_{-\infty}^{+\infty} \varphi(\xi) d\xi = 1 \quad \text{и} \quad \lim_{t \rightarrow \infty} g(\xi, t) = \gamma \varphi(\xi),$$

если полное число свободных мостиков γ не меняется во времени. Равновесное распределение $\varphi(\xi)$ можно найти из малоугловых рентгенограмм покоящейся мышцы. Плотности распределения замкнутых и свободных мостиков $\rho(\xi, t)$ и $g(\xi, t)$ подчиняются системе уравнений, которая может быть получена при подсчете частных производных

$$\frac{\partial}{\partial t} [\rho(\xi, t) \Delta \xi] \quad \text{и} \quad \frac{\partial}{\partial t} [g(\xi, t) \Delta \xi]$$

и переходе к пределу при $\Delta \xi \rightarrow 0$:

$$\frac{\partial \rho(\xi, t)}{\partial t} = k_1(\xi) g(\xi, t) - k_2(\xi, v) \rho(\xi, t) - v \frac{\partial \rho(\xi, t)}{\partial \xi}, \quad (2.1)$$

$$\begin{aligned} \frac{\partial g(\xi, t)}{\partial t} = & -k_1(\xi) g(\xi, t) + k_2(\xi, v) \rho(\xi, t) - k_v(\xi) [g(\xi, t) - \\ & - \varphi(\xi) \int_{-\infty}^{+\infty} g(\xi, t) d\xi], \end{aligned} \quad (2.2)$$

где $k_1(\xi)$ — константа скорости замыкания свободных мостиков, имеющих смещение ξ ; $k_2(\xi, v)$ — константа скорости размыкания замкнутых мостиков, имеющих смещение ξ при скорости скольжения v ; $k_v(\xi)$ — константа скорости возвращения мостиков к равновесному распределению после их размыкания.

‡ Константа скорости замыкания свободного мостика $k_1(\xi)$ не зависит от v . Это можно объяснить следующим образом: образование связи между данным мостиком и данным актиновым центром возможно в течение интервала времени, который меняется как $1/v$, но частота, с которой актиновые центры проходят мимо данного мостика, пропорциональна v . Таким образом, среднее время взаимодействия мостика с актиновым центром не зависит от v и вероятность образования связи может зависеть только от состояния свободного мостика, которое описывается только одной существенной переменной ξ . Состояние связанного мостика описывается двумя существенными переменными: ξ и $v = d\xi/dt$, поскольку константа скорости его размыкания является функцией ξ и v .

Изменение $\rho(\xi, t)$, обусловленное потоком замкнутых мостиков со скоростью v , описывается в уравнении (2.1) членом $-v \partial \rho(\xi, t) / \partial \xi$. Это существенная особенность нашей модели. Член такого типа с необходимостью следует из скольжения нитей и не может быть исключен априори из любой математической модели, основанной на концепции скользящих нитей (например, таковой, как [132, 133]).

Для скелетных мышц позвоночных (но не для летательных мышц насекомых — см. ниже) доля активных мостиков не зависит от относительного смещения толстых и тонких нитей, т. е. от длины саркомера, поскольку осевые периоды нитей различны [144]. Поэтому зависимость числа активных мостиков α в половине саркомера от ее укорочения l , т. е. $\alpha(l)$, легко определяется из структурных данных (см. рис. 5). Очевидно, что

$$\int_{-\infty}^{+\infty} [\rho(\xi, t) + g(\xi, t)] d\xi = \alpha(l); \quad (2.3)$$

причем

$$\rho(\xi, t) \rightarrow 0 \text{ и } g(\xi, t) \rightarrow 0 \text{ при } \xi \rightarrow \pm \infty. \quad (2.4)$$

Если известна зависимость элементарной силы f , развиваемой одним замкнутым мостиком, от ξ и v , то полная сила, развиваемая половиной саркомера в момент времени t , будет

$$F(t, v) = \int_{-\infty}^{+\infty} f(\xi, v) \rho(\xi, t) d\xi. \quad (2.5)$$

Для движения нагрузки, присоединенной к мышце, под действием силы F , развиваемой мышцей, и внешней силы P запишем

$$\mathcal{J} \frac{d^2 \mathcal{L}}{dt^2} = F(t, v) - P, \quad (2.6)$$

где \mathcal{J} — масса нагрузки; $\mathcal{L} = 2Nl$ — укорочение целой мышцы; N — число саркомеров. Очевидно, что $d^2 \mathcal{L}/dt^2 = 2Ndv/dt$. Величина \mathcal{J} и вид зависимости P от t, v , \mathcal{L} определяются режимами сокращения. Система уравнений (2.1), (2.2), (2.6), дополненная условиями (2.3) — (2.5), является математической формулировкой гипотезы скольжения. В таком виде она непригодна для описания мышечного сокращения, поскольку функциональные зависимости $k_1(\xi)$, $k_2(\xi, v)$, $k_v(\xi)$, $f(\xi, v)$ не могут быть определены из существующих экспериментальных данных. Однако эту схему можно упростить, если сделать ряд предположений.

2.4. Постулаты и переход к кинетической модели

Предположение 1. После размыкания мостик возвращается в равновесное положение «мгновенно», т. е.

$$k_v(\xi) \gg k_1(\xi) \text{ и } k_v(\xi) \gg k_2(\xi, v)$$

при всех ξ . Это означает, что скорость макромолекулярных конформационных перестроек, происходящих при возвращении разомкнувшегося мостика в равновесное положение, много больше, чем скорость аналогичных перестроек при скольжении замкнутого мостика, т. е. последнее можно рассматривать как термодинамиче-

ски равновесный процесс. Следовательно, k_2 и f не зависят от v :

$$k_2 = k_2(\xi) \quad \text{и} \quad f = f(\xi).$$

Предположение 2.

$$f(\xi) = +f = \text{const} > 0 \quad \text{при} \quad 0 < \xi < \delta, \quad (2.7)$$

$$f(\xi) = -f \quad \text{при} \quad \delta < \xi < +\infty.$$

Предположение 3. Константа k_2 меняется в зависимости от ξ таким образом, что

$$\begin{aligned} k_2(\xi) &= 0, & \text{если} \quad f(\xi) > 0, \\ k_2(\xi) &= k_2 = \text{const} > 0, & \text{если} \quad f(\xi) < 0. \end{aligned} \quad (2.8)$$

Предположения 2 и 3 иллюстрируются рис. 7.

В область отрицательных значений ξ замкнутый мостик попадает при растяжении возбужденной мышцы (при $v < 0$). Состояние мостика с отрицательным смещением из положения равновесия мы рассмотрим при моделировании автоколебаний летательных мышц.

В сокращающейся мышце замкнутый мостик может находиться в двух состояниях — в «тянущем», для которого

$$f(\xi) = +f \quad \text{и} \quad k_2(\xi) = 0 \quad \text{при} \quad \xi < \delta,$$

и в «тормозящем», где

$$f(\xi) = -f \quad \text{и} \quad k_2(\xi) = k_2 \quad \text{при} \quad \xi > \delta.$$

При предположениях 1—3 гипотетический элементарный рабочий цикл миозинового мостика в возбужденной сокращающейся мышце можно описать следующим образом: замыкание мостика (образование связи актин-миозин при $\xi = 0$) делает выгодной конформационную перестройку молекулы миозина или ближайшего к мостику участка толстой нити (перестройку на уровне вторичной, третичной или четвертичной структуры), которая приводит к скольжению мостика (более точно, места присоединения миозинового мостика к актину) вдоль толстой нити к его новому равновесному положению при $\xi = \delta$. При этом замкнутый мостик развивает на расстоянии δ положительную силу, т. е. силу, ориентированную к центру саркомера (если приложить ее к тонкой нити). При $\xi = \delta$ активная конформационная перестройка заканчивается, осевая проекция силы, развиваемой мостиком, проходит через нуль и при дальнейшем скольжении становится отрицательной, а мостик получает возможность разомкнуться. Вероятно, для замыкания необходимо некоторое натяжение. Это и будет причиной отрицательной силы мостика. Разомкнувшись, мостик «мгновенно» возвращается в равновесное положение — происходит быстрая обратная конформационная перестройка, во время которой замыкание практически невероятно. Какие-то из стадий элементарного цикла сопряжены с сорбцией и десорбцией Ca^{2+} и расщеплением

АТФ. Мы здесь не конкретизируем механизм этих процессов (эти вопросы будут обсуждаться в главах 10 и 11), из ранних моделей такого типа хорошей иллюстрацией может служить схема Дэвиса [95].

Поделив правую и левую части уравнения (2.2) на k_b , перейдем к пределу при $k_b \rightarrow \infty$ и, учитывая предположение 1 ($k_b \gg \gg k_1, k_2$), получим

$$g(\xi, t) = \varphi(\xi) \int_{-\infty}^{+\infty} g(\xi, t) d\xi = \varphi(\xi) \gamma(t), \quad (2.9)$$

где $\gamma(t)$ — полное число свободных мостиков в момент времени t .

Интегрируя уравнение (2.1) по ξ от $-\infty$ до δ с учетом (2.8) и (2.9), получим

$$\frac{\partial}{\partial t} \int_{-\infty}^{\delta} \rho(\xi, t) d\xi = \gamma(t) \int_{-\infty}^{\delta} k_1(\xi) \varphi(\xi) d\xi - \nu \rho(\xi, t) \Big|_{-\infty}^{\delta}. \quad (2.10)$$

Интеграл в левой части (2.10) представляет собой полное количество «тянущих» мостиков. Обозначая его через n и учитывая, что $\rho(-\infty) = 0$, получим

$$dn/dt = k_1 \gamma(t) - \nu \rho(\delta, t), \quad (2.11)$$

где $k_1 = \int_{-\infty}^{\delta} k_1(\xi) \varphi(\xi) d\xi$ — среднее значение константы скорости замыкания свободных мостиков.

Из пункта 4 (см. раздел 2.1) следует, что $\varphi(\xi)$ отлична от нуля в очень узкой области значений ξ . Мы будем считать, что эта область много меньше интервала $(0, \delta)$. Тогда для квазистационарных режимов сокращения можно считать, что на границе «тянущей» зоны *

$$\rho(\delta, t) = n(t)/\delta = n/\delta. \quad (2.12)$$

Интегрируя (2.1) по ξ от δ до $+\infty$, аналогично получим

$$dm/dt = -k_2 m + \nu \rho(\delta, t), \quad (2.13)$$

где $m = \int_{\delta}^{+\infty} \rho(\xi, t) d\xi$ — полное число «тормозящих» мостиков. Из (2.3) следует, что $\gamma(t) = \alpha(l) - n - m$, а вместо (2.5) получаем $F(t) = f(n - m)$. Поэтому с учетом (2.12) окончательно будем

* Условие (2.12) предполагает равномерное распределение мостиков по «тянущей» зоне. Это предположение справедливо в тех случаях, когда вероятностью размыкания «тянущих» мостиков можно пренебречь. Как мы увидим ниже, при описании некоторых нестационарных режимов, например расслабления (см. раздел 6.2) или вязкоупругих свойств мышцы при вынужденных колебаниях длины (см. раздел 7.2), «медленный» процесс размыкания «тянущих» мостиков уже потребует принимать в расчет. — Прим. ред.

иметь

$$\frac{dn}{dt} = k_1 [\alpha(l) - n - m] - v \frac{n}{\delta}, \quad (2.14)$$

$$\frac{dm}{dt} = v \frac{n}{\delta} - k_2 m, \quad (2.15)$$

$$\frac{dv}{dt} = \frac{1}{2N\mathcal{F}} [f(n - m) - P], \quad (2.16)$$

$$\frac{dl}{dt} = v. \quad (2.17)$$

Уравнение (2.16) вытекает из (2.6), уравнение (2.17) очевидно. Следует отметить, что система уравнений, аналогичная (2.14) — (2.17), может быть получена и при менее жестких ограничениях на зависимость элементарной силы от ξ . В предположении 2 достаточно потребовать, чтобы $f(\xi)$ была положительна и ограничена на интервале $(0, \delta)$.

С формальной точки зрения уравнения (2.14) — (2.15) описывают цикл из трех мономолекулярных процессов (рис. 8), в котором роль молекул γ , n и m играют свободные и замкнутые в «тянущем» и «тормозящем» состояниях мостики соответственно.

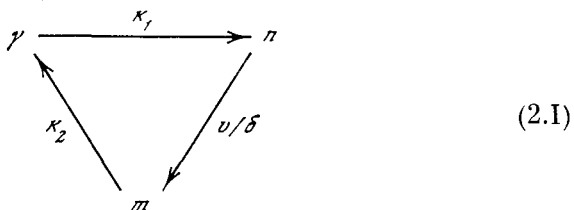


Рис. 8. Схема элементарного цикла миозинового мостика в кинетической модели мышечного сокращения

Некоторые стадии этого цикла в сущности необратимы из-за сопряжения с процессом гидролиза АТФ. Система (2.14) — (2.17) позволяет рассчитать динамику сокращения возбужденной мышцы, если известны ее характеристики — структурная функция $\alpha(l)$, число саркомеров N , характеристики нагрузки P и \mathcal{F} и величины констант k_1 , k_2 , δ и f . Из пунктов 2 и 3 (см. раздел 2.1) следует, что в покоящейся мышце все мостики разомкнуты. В предложенной схеме такое состояние мышцы возможно только в том случае, если константа скорости замыкания мостиков равна нулю. Мы будем считать, что при возбуждении мышцы эта константа скачком возрастает до величины k_1 и остается постоянной в течение всего сокращения. Такое приближение оказывается не слишком грубым для мышцы в условиях тетанической стимуляции, если нас не интересует начальный момент сокращения. Система (2.14) — (2.17) не описывает расслабления мышцы*.

* О расслаблении и начальном моменте сокращения см. раздел 6.2.

СКЕЛЕТНЫЕ МЫШЦЫ ПОЗВОНОЧНЫХ

3.1. Стационарный режим

Стационарное сокращение, т. е. сокращение с постоянной скоростью, наблюдается в условиях изотонической нагрузки, когда длина мышцы близка к ее длине в организме [138]. В терминах нашей модели эти условия означают, что P и $\alpha(l)$ не меняются в ходе сокращения:

$$P = \text{const}, \quad \alpha(l) = \alpha_0.$$

Зависимость стационарной скорости от величины нагрузки описывается эмпирическим уравнением Хилла (см. (1.3))*:

$$(P + a)v = b(P_0 - P), \quad (3.1)$$

где P — нагрузка; v — скорость скольжения нитей; P_0 — максимальная сила, развиваемая мышцей при $v = 0$; a и b — константы.

Уравнения (2.14) — (2.16) не содержат l , так что они образуют замкнутую систему с единственным стационарным решением

$$\frac{dn}{dt} = \frac{dm}{dt} = \frac{dv}{dt} = 0.$$

Условие стационарности для этой системы дает

$$n_s = \frac{k_1(f\alpha_0 + P) + k_2P}{f(2k_1 + k_2)}, \quad m_s = \frac{k_1(f\alpha_0 - P)}{f(2k_1 + k_2)},$$

$$v_s = \frac{k_1}{k_1 + k_2} \frac{k_2\delta(f\alpha_0 - P)}{P + [k_1/(k_1 + k_2)]f\alpha_0}. \quad (3.2)$$

Выражение для стационарной скорости v_s совпадает с уравнением Хилла (3.1), константы которого выражаются через параметры системы (2.14) — (2.16) следующим образом:

$$P_0 = f\alpha_0, \quad a = \frac{k_1}{k_1 + k_2} P_0, \quad b = \frac{k_1}{k_1 + k_2} k_2\delta = \frac{a}{P_0} v_{\max}, \quad (3.3)$$

где $v_{\max} = k_2\delta$ — максимальная скорость сокращения (при $P = 0$). Связи между константами a , b и P_0 , даваемые (3.3), в деталях совпадают с данными Хилла [129].

* Уравнение Хилла (1.3) было написано для целой мышцы. Однако нетрудно видеть, что аналогичная зависимость имеет место и для полусаркомера. Очевидно, что при этом параметр a останется прежним; скорость сокращения заменится скоростью скольжения нитей. Величина параметра b будет иной, но соотношение коэффициентов a , b и P_0 останется прежним. В формуле (3.1) и в дальнейшем буквой b будет обозначен этот параметр для полусаркомера.

Скорость выделения энергии в стационарном сокращении можно вычислить следующим образом:

$$\frac{dE}{dt} = \varepsilon k_2 m_s = \frac{\varepsilon k_2 k_1 (f \alpha_0 - P)}{f(2k_1 + k_2)} = \frac{\varepsilon k_2 k_1}{f(2k_1 + k_2)} (P_0 - P) = \text{const} \cdot (P_0 - P), \quad (3.4)$$

где ε — энергия химических реакций, происходящих в каждом элементарном цикле миозинового мостика, которая, вероятно, равна энергии гидролиза одной молекулы АТФ.

Скорость теплопродукции получим, вычитая из (3.4) механическую мощность и выражая $f \alpha_0 - P$ через v_s в соответствии с (3.2):

$$\frac{dQ}{dt} = \frac{dE}{dt} - P v_s = v_s \left[\frac{\eta k_1}{2k_1 + k_2} P_0 + \frac{\eta(k_1 + k_2) - (2k_1 + k_2)}{2k_1 + k_2} P \right], \quad (3.5)$$

где

$$\eta = \varepsilon / (f \delta). \quad (3.6)$$

Величина $1/\eta$ имеет смысл максимального коэффициента полезного действия сократительного цикла, так как $f \delta$ — положительная работа миозинового мостика в цикле. Если

$$\eta = \frac{2k_1 + k_2}{k_1 + k_2}, \quad \text{то} \quad \frac{dQ}{dt} = \frac{k_1}{k_1 + k_2} P_0 v_s = a v_s,$$

что согласуется с экспериментальными результатами Хилла (см. первое соотношение Хилла (1.1)). При этом в случае $a = 0,25 P_0$ получим $k_2/k_1 = 3$, а $\eta = 1,25$. Выражение (3.5) может удовлетворять и более поздним результатам этого автора [130] (см. там же, соотношение (1.4)): коэффициент при v_s в (3.5) будет равен

$$a' = 0,16 P_0 + 0,18 P,$$

если $\eta = 1,34$ и $k_2/k_1 = 6,4$.

Следует отметить, что выражения (3.4) и (3.5) дают скорость выделения энергии и тепла непосредственно в сократительной системе. В них не входит теплота «активации и поддержания сокращения», которая, по-видимому, целиком обусловлена работой системы возбуждения мышцы [74].

3.2. Оценка параметров *

В нашей схеме имеется пять «молекулярных» параметров, связанных с внутренним механизмом мышечного сокращения: α_0 , k_1 , k_2 , δ и f . Для их определения, во-первых, можно использовать

* В этом разделе мы проведем лишь предварительную оценку параметров на основании имеющихся экспериментальных данных по стационарной кинетике мышечного сокращения. Позже, в разделе 7.3, мы расскажем о результатах исследования некоторых нестационарных режимов. Там оценка констант будет проведена более точно.

три соотношения (3.3), получающихся из сопоставления выражения для стационарной скорости v_s с уравнением Хилла; α_0 можно оценить из структурных данных и, наконец, формула (3.6) даст нам последнее необходимое соотношение (при этом мы положим $\eta = 1$).

Для портняжной мышцы лягушки $P_0 = 3 \cdot 10^6$ дин на 1 см^2 поперечного сечения, $\alpha_0 = 10^{13}$ (число мостиков в слое мышцы длиной в половину саркомера и поперечным сечением 1 см^2) [71], $a/P_0 = 0,25$, $v_m = 1,5 \cdot 10^{-4} \text{ см/с}$ при 0°C [129] и энергия гидролиза

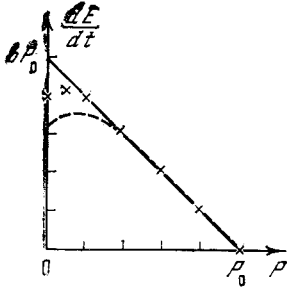


Рис. 9. Зависимость полной скорости выделения энергии сокращающейся мышцей

Сплошная линия — функция $b(P_0 - P)$; штриховая — зависимость, наблюдающаяся в экспериментах по сокращению мышцы в стационарных условиях, пересчитанная по данным [130]; крестиками обозначена функция dE/dt , рассчитанная при $\eta = 1$, $k_2/k_1 = 3$

АТФ $\varepsilon = 3 \cdot 10^{-13}$ эрг при физиологических концентрациях ионов [87], что дает

$$f = 3 \cdot 10^{-7} \text{ дин}, \quad 1/\delta = 10^6 \text{ см}^{-1}, \quad k_1 = 50 \text{ с}^{-1}, \\ k_2 = 150 \text{ с}^{-1}. \quad (3.7)$$

При оценке параметров мы здесь для простоты использовали $\eta = 1$, и соотношение полученных констант $k_2/k_1 = 3$. Из рис. 9 видно, что принятые значения позволяют с требуемой точностью описать экспериментальную зависимость.

3.3. Изотоническое сокращение нерастянутой мышцы

Динамику выхода на стационарный режим сокращения (3.2), вообще говоря, можно получить интегрированием системы (2.14) — (2.16) при $\alpha(l) = \alpha_0$ и постоянном P . Однако эта система имеет слабую нелинейность, и линейное приближение в этом случае дает совершенно удовлетворительные результаты.

После замены переменных

$$n = \alpha_0 x, \quad m = \alpha_0 y, \quad v = k_1 \delta u, \quad t = \tau/k_1 \quad (3.8)$$

и подстановки значений параметров, полученных в предыдущем разделе, эта система приобретает вид

$$dx/d\tau = 1 - x - y - ux, \quad (3.9)$$

$$dy/d\tau = ux - 3y, \quad (3.10)$$

$$du/d\tau = B(x - y - A), \quad (3.11)$$

где

$$A = \frac{P}{f\alpha_0} = \frac{P}{P_0}, \quad B = \frac{P_0}{\mathcal{F}} \frac{1}{2Nk_1^2\delta}.$$

Стационарная точка (3.2) в новых переменных имеет вид

$$x_s = \frac{4A+1}{5}, \quad y_s = \frac{1-A}{5}, \quad u_s = \frac{3(1-A)}{4A+1}. \quad (3.12)$$

Характеристическое уравнение системы (3.9) — (3.11), линеаризованной около положения равновесия (3.12), будет

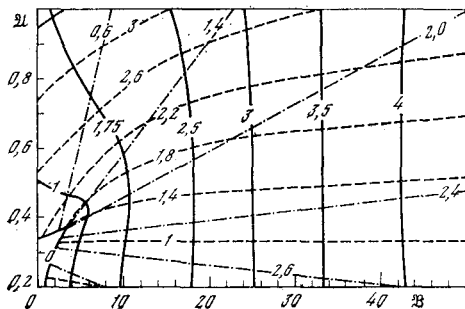
$$\lambda^3 + \lambda^2 (3,25 + 3,75\mathfrak{A}) + \lambda (15\mathfrak{A} + 0,4\mathfrak{B}) + \mathfrak{B} = 0, \quad (3.13)$$

где $\mathfrak{A} = 1/(4A + 1)$ и $\mathfrak{B} = B(4A + 1)$ могут меняться в следующих пределах: $0,2 \leq \mathfrak{A} \leq 1$ и $1 \leq \mathfrak{B} \leq 5 \cdot 10^3$, если $N = 1,5 \cdot 10^4$ и P_0/\mathcal{F} при использовании различных изотонических рычагов меняется от 10^2 до 10^4 см/с².

Зависимость корней уравнения (3.13) от параметров показана на рис. 10. Почти при всех значениях параметров \mathfrak{A} и \mathfrak{B} уравнение (3.13) имеет один действительный отрицательный корень $-\lambda$ и пару комплексных корней $-\sigma \pm i\nu$ с отрицательной действительной частью. Это означает, что приближение к стационарному состоянию (3.2) происходит следующим образом. Средние значения переменных приближаются к стационарным значениям с постоянной времени $1/(k_1\lambda)$. Около этих средних значений происходят затухающие синусоидальные колебания с периодом $2\pi/(k_1\nu)$ и постоянной затухания $1/(k_1\sigma)$. Амплитуда колебаний определяется начальным возмущением.

Рис. 10. Плоскость параметров уравнения (3.13) для автоколебаний поперечно-полосатой мышцы при изотонических условиях

Параметры \mathfrak{A} и \mathfrak{B} соответствуют величине и эффективной массе нагрузки соответственно. Линии уровня безразмерных частот ν и коэффициентов затухания σ и λ даны сплошной, штриховой и штрихпунктирной линиями соответственно



При обычных экспериментальных условиях (поднимающая груз мышца) $1/(k_1\lambda) \approx 10^{-2}$ с, $2\pi/(k_1\nu) \approx 3 \cdot 10^{-2}$ с и $1/(k_1\sigma) \approx 10^{-2}$ с. Таким образом, для наблюдения колебаний в начальный период изотонического сокращения нужны специальные условия (уменьшение эффективной массы нагрузки \mathcal{F} при $P \approx P_0$) *.

* Рассмотрим этот вопрос подробнее. Для наблюдения колебаний необходимо, чтобы затухание $2\pi\sigma/\nu$ периодической компоненты за период колебаний было как можно меньше. Это выполняется при малых σ и больших ν . Та-

В качестве иллюстрации на рис. 11, *в* приведен начальный участок кривой изотонического сокращения, полученный численным интегрированием системы (3.9) — (3.11) при $A = 0,75$, $B = 36$, т. е. $\mathfrak{A} = 0,25, \mathfrak{B} = 144$.

Следует подчеркнуть, что механизм этих колебаний не связан с эластическими свойствами мышцы, поскольку мы не учитывали их в наших расчетах. Так, система (3.9) — (3.11) не содержит резонансных элементов. Механизм возникновения колебаний можно объяснить следующим образом. Скорость перехода мостиков из «тянущего» состояния n в «тормозящее» m (см. рис. 8) прямо пропорциональна скорости сокращения мышцы. Если в первый момент скорость сокращения низка, будет превалировать переход из γ в n . Это приведет к накоплению мостов в «тянущем» состоянии и к росту силы, развиваемой мышцей. Под действием этой силы нагрузка двигается с ускорением, скорость сокращения растет, что приводит к интенсивной перекачке мостов из состояния n в «тормозящее» состояние m . Из-за инерционности нагрузки это будет вызывать понижение силы вплоть до уровня, уже недостаточного для того, чтобы поддерживать стационарную скорость. Это приводит к замедлению сокращения, и цикл повторяется.

3.4. Изотоническое сокращение растянутой мышцы

Изотоническое сокращение растянутой мышцы нестационарно, поскольку в ходе него происходит увеличение числа мостиков в зоне перекрытия нитей.

Поведение растянутой мышцы при изотонических условиях описывается системой уравнений (2.14) — (2.17) при постоянном P . Из структурных [138] и физиологических [121] данных следует, что $\alpha(l)$ при этом линейно возрастает от 0 до α_0 при укорочении саркомера от длины 3,65 мкм ($l = 0$) до 2,25 мкм ($l = 0,7$ мкм) и остается постоянным при дальнейшем укорочении до 2 мкм. Таким образом, в диапазоне длин саркомеров 2,25—3,65 мкм

$$\alpha(l) = \alpha_0 \beta l,$$

где $\beta = 1,4 \cdot 10^4 \text{ см}^{-1}$. Подставляя эту функцию в систему (2.14) — (2.17) и делая замену переменных

$$n = \alpha_0 x, \quad m = \alpha_0 y, \quad v = k_1 \delta u, \quad l = z/\beta, \quad t = \tau/k_1,$$

получим $dx/d\tau = z - x - y - ux$, (3.14)

ким величинам σ и ν соответствует область малых значений \mathfrak{A} и больших \mathfrak{B} (см. рис. 11). Так, при $\mathfrak{B} = 43$ и $\mathfrak{A} = 0,33$ отношение $2\pi\sigma/\nu \simeq 1,6$ и соответствующие колебания вполне могут быть обнаружены. Для получения больших $\mathfrak{B} \sim \frac{P_0}{\mathcal{F}} \left(1 + \frac{4P}{P_0}\right)$ нужно уменьшить массу нагрузки \mathcal{F} и работать при значениях P , близких к P_0 (см. раздел 7.4). — *Прим. ред.*

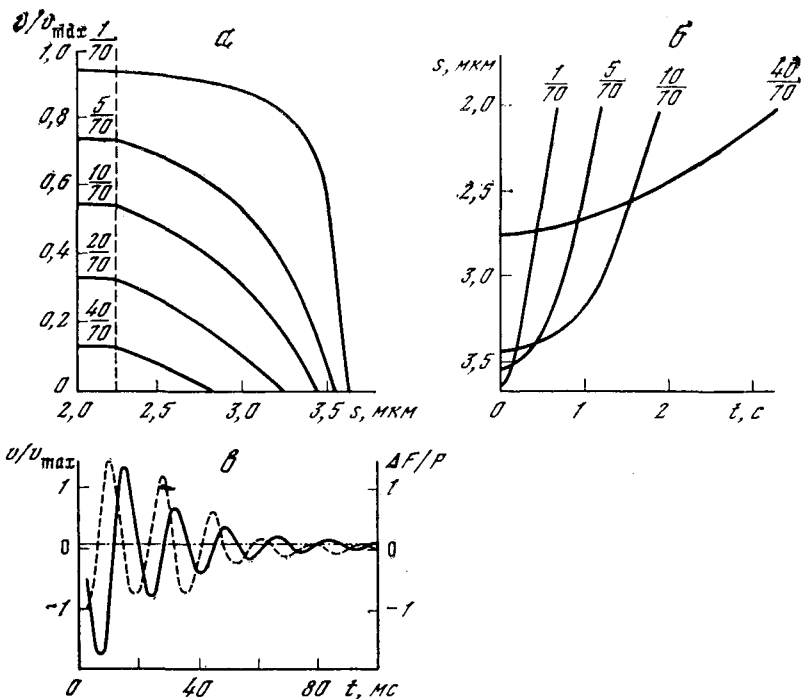


Рис. 11. Изотонический тетанус портняжной мышцы лягушки

a — зависимость относительной скорости укорочения v/v_{\max} от длины саркомера s для квазистационарного сокращения растянутой мышцы;

б — зависимость длины саркомера от времени t для того же случая. Кривые рассчитаны по уравнению (3.18) для разных нагрузок (относительные величины нагрузок указаны на кривых);

в — начальный период сокращения нерастянутой мышцы:

сплошная линия — разность между развиваемым мышцей напряжением и нагрузкой ΔF , отнесенная к нагрузке P ;

штриховая — относительная скорость сокращения; рассчитаны из системы уравнений (3.9)–(3.11) при $B = 36$, $A = 0,75$, $x(0) = y(0) = u(0) = 0$;

штрихпунктир — стационарная скорость сокращения при $A = 0,75$

$$dy/d\tau = ux - 3y, \quad (3.15)$$

$$du/d\tau = B(x - y - A), \quad (3.16)$$

$$dz/d\tau = \beta du, \quad (3.17)$$

где $A = \frac{P}{P_0}$, $B = \frac{P_0}{\mathcal{F}} \frac{1}{2Nk_1^2\delta}$.

Поскольку $\beta\delta = 1/70$, а $B > 1$, уравнение (3.17) является «медленным» по сравнению с группой «быстрых» уравнений

(3.14) — (3.16) и мы можем рассматривать z как параметр в этой группе уравнений.

Используя теорему Тихонова [66], можно найти квазистационарное решение системы. Возвращаясь к исходным переменным, мы получим

$$\left(P + \frac{k_1}{k_1 + k_2} f\alpha_0 \beta l\right) v_{\text{КВ}} = k_2 \delta \frac{k_1}{k_1 + k_2} (f\alpha_0 \beta l - P). \quad (3.18)$$

Если учесть, что $f\alpha_0 \beta l = f\alpha(l)$ — изометрическая сила, развиваемая мышцей при данном укорочении l , мы можем рассматривать уравнение (3.18) как обобщение уравнения Хилла на случай растянутой мышцы. Параллельная упругость в это уравнение не входит. Это следует помнить при экспериментальной проверке. На рис. 11, *а* показана зависимость квазистационарной скорости от длины саркомера при различных нагрузках, вычисленная по уравнению (3.18). Квазистационарную зависимость укорочения мышцы от времени можно получить, подставляя выражение для $v_{\text{КВ}}$ из (3.18) в уравнение (2.17) и интегрируя его. Результаты интегрирования при нескольких значениях A приведены на рис. 11, *б*. Исследование группы быстрых уравнений (3.14) — (3.16) в линейном приближении показывает, что при $0 \leq A \leq z \leq 1$ ее решения устойчивы (все действительные части характеристических корней отрицательны). Это означает, что условия теоремы Тихонова выполнены и решения полной системы (3.14) — (3.17) будут приближаться к квазистационарным кривым или колебаться около них.

Колебательный выход на стационарный и квазистационарный режимы сокращения при изотоническом сокращении портняжной мышцы лягушки является одним из самых неожиданных следствий теории. Ниже (см. раздел 7.1) мы остановимся на экспериментах, в которых предсказанные колебания были обнаружены и исследованы.

Следует отметить, что затухающие колебания скорости сокращения при изотонических условиях наблюдались и ранее [150], но авторы объясняли их приборными артефактами. Немонотонное укорочение саркомеров портняжной мышцы лягушки при слабо неізотонических условиях, наблюдавшееся Емельяповым [36], вероятно, является результатом рассматриваемого механизма.

3.5. Изометрическое сокращение

Если длина мышцы фиксирована, то при возбуждении относительное движение решеток нерастяжимых толстых и тонких нитей происходит за счет удлинения последовательных эластических элементов, соединяющих половинки саркомеров, т. е. за счет упругости Z -мембраны и средних участков толстых нитей [56]. Другими словами, нагрузкой для сократительного аппарата мышцы в изометрических условиях является упругость этих эластических сочленений.

Чтобы вычислить скорость развития силы при изотонических условиях, необходимо знать кривую нагрузка — растяжение $P(l)$ для упругих элементов, последовательно связанных с сократительными элементами мышцы. Необходимые нам данные были взяты из работы [150]. Характерной особенностью этой нагрузки является пренебрежимо малая эффективная масса, что позволяет заменить уравнение (2.16) в системе (2.14) — (2.17) алгебраическим соотношением

$$f(n - m) = P(\mathcal{L}), \quad (3.19)$$

где $P(\mathcal{L})$ — зависимость силы, развиваемой последовательной упругой компонентой, от ее растяжения \mathcal{L} . Очевидно, что растяжение всех упругих элементов равно укорочению всех сократительных элементов, так что $\mathcal{L} = 2Nl$. Дифференцируя соотношение (3.19) по времени, можно получить выражение для $v = dl/dt$ через n , m , l и исключить переменную v из системы (2.14) — (2.17).

Производя линейную замену переменных (3.8) в модифицированной таким образом системе (2.14) — (2.17) при $\alpha(l) = \alpha_0$, получим

$$dx/d\tau = 1 - x - y - u(x, y, z)x, \quad (3.20)$$

$$dy/d\tau = u(x, y, z)x - 3y, \quad (3.21)$$

$$dz/d\tau = u(x, y, z), \quad (3.22)$$

где

$$x = \frac{n}{\alpha_0}, \quad y = \frac{m}{\alpha_0}, \quad z = \frac{2l}{s} \cdot 100,$$

$$u(x, y, z) = \frac{s(1 - x + 2y)}{200\delta [dA/dz + (s/200\delta)x]},$$

$s = 2,2 \cdot 10^{-4}$ см — длина саркомера и $A = P(z)/P_0$. Очевидно, что z представляет собой относительное удлинение упругой компоненты в процентах и $A(z)$ — относительную силу, которую она развивает при данном удлинении. Пересчет экспериментальных данных [150] для портняжной мышцы лягушки при 2°C дает

$$A(z) = \begin{cases} 0,0897z^3 + 0,0348z^2 + 0,2z & \text{для } z \leq 1,15, \\ 0,636z - 0,319 & \text{для } z \geq 1,15. \end{cases} \quad (3.23)$$

Система (3.20) — (3.22) с начальными условиями $x(0) = y(0) = z(0) = 0$ описывает обычное изометрическое сокращение мышцы, начинающееся одновременно с началом стимуляции. Эта же система способна описать и восстановление силы после быстрого контролируемого освобождения мышцы.

Эксперименты по быстрому контролируемому освобождению мышцы [119] (так называемый quick controlled release) заключаются в том, что мышце, тетанически стимулируемой при постоянной длине, внезапно дают укоротиться на некоторую величину. При этом напряжение, развиваемое мышцей, вначале резко падает,

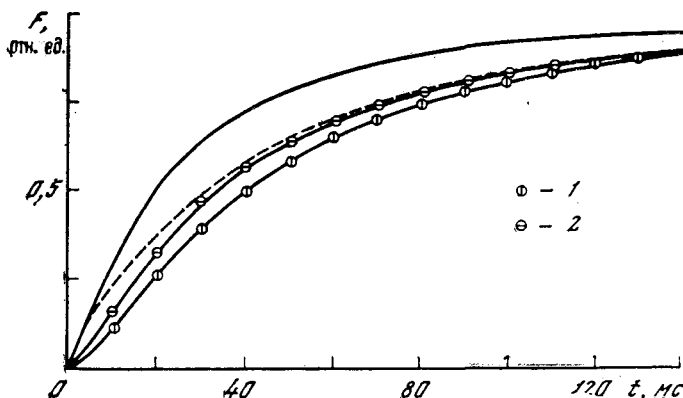


Рис. 12. Изометрический тетанус портняжной мышцы лягушки

Верхняя кривая рассчитана из уравнения Хилла (3.1) и зависимости сила — растяжение для последовательной упругой компоненты (3.23); средняя — восстановление силы после быстрого укорочения мышцы, вычисленное из системы уравнений (3.20) — (3.22) при условиях $x(0) = y(0) = 0,5; z(0) = 0$; штриховая — начальное развитие напряжения, рассчитанное из той же системы без учета времени активации при условиях $x(0) = y(0) = z(0) = 0$; нижняя — то же с учетом времени активации (см. раздел 6.2); 1, 2 — экспериментальные точки кривых начального развития напряжения и его восстановления после быстрого укорочения соответственно [150]

а затем постепенно восстанавливается до изометрического напряжения, соответствующего новой длине. Величина падения зависит от степени укорочения; при укорочениях, больших чем 2—3%, напряжение падает до нуля. Восстановление напряжения в таких экспериментах будет подчиняться системе (3.20) — (3.22).

При укорочении с падением силы до нуля начальными условиями будут следующие:

$$x(0) = y(0) = 0,5; \quad z(0) = 0.$$

Это можно объяснить таким образом. Перед моментом быстрого освобождения мышца развивала максимальную изометрическую силу; все ее мостики находились в состоянии n . Во время быстрого освобождения сила падает, так как мостики сдвигаются со скоростью v/δ в состоянии m , но не успевают перейти в состояние γ из-за ограниченности величины константы k_2 . Падение силы до нуля означает, что половина мостиков находится в состоянии n , а другая — в состоянии m .

Скорость восстановления силы можно легко рассчитать и другим способом [150]: из зависимости нагрузка — растяжение (3.23) и стационарного уравнения Хилла (3.1).

В работе Джуэла и Уилки [150] * начальное развитие напряже-

* Джуэл и Уилки работали с временным разрешением ~ 5 мс. Позже Хаксли и Симмонс [134, 136, 137] провели аналогичные опыты с лучшим временным разрешением и получили очень интересные результаты. Их работы мы обсудим ниже (см. раздел 7.4).

ния для изометрического тетануса, а также его восстановление после быстрого укорочения были получены экспериментально (рис. 12). Сравним эти данные с кривыми, рассчитанными из уравнений (3.23) и (3.1) (верхняя кривая на рис. 12) и из системы (3.20) — (3.22) (средняя сплошная кривая и штриховая). Ход восстановления напряжения после быстрого укорочения мышцы (средняя сплошная кривая) в пределах точности эксперимента совпадает с данными Джуэла и Уилки. Начальный участок расчетной кривой для обычного изометрического тетануса (штриховая кривая) идет более круто, чем соответствующие экспериментальные точки. Это проистекает из нашего предположения о почти мгновенном возрастании константы скорости k_1 в момент возбуждения мышцы. Приняв в расчет конечное время увеличения k_1 (согласно [179], это 8—10 мс), получим полное совпадение расчетных данных (нижняя кривая) с экспериментом. Далее мы обсудим это более подробно (см. раздел 6.2).

Глава 4

КОЛЕБАТЕЛЬНЫЙ РЕЖИМ СОКРАЩЕНИЯ АСИНХРОННЫХ МЫШЦ НАСЕКОМЫХ

Асинхронные мышцы, к которым относятся летательные мышцы некоторых видов насекомых, получили свое название благодаря способности давать несколько ритмических сокращений в ответ на одиночное раздражение [177]. Способностью к автоколебаниям обладают не только живые мышцы этого типа, но и их глицеринизированные волокна [149]. Это означает, что осциллирующие сокращения являются внутренним свойством сократительной белковой системы таких мышц. Биохимический состав [154], свойства сократительных белков [162] и структурная организация летательных мышц насекомых [146] и скелетных мышц позвоночных в основном одинаковы. Это позволяет надеяться на то, что и сократительные механизмы этих типов мышц сходны.

В таком случае кинетическая модель сокращения поперечно-полосатых мышц должна быть пригодна и для описания автоколебательных режимов летательных мышц насекомых.

4.1. Уточнение модели

Две специфические черты функционирования и структуры летательных мышц должны быть учтены при моделировании их работы.

1. Возбужденная летательная мышца, соединенная с резонансной нагрузкой, циклически меняет свою длину: укорачивается

($v > 0$) и удлиняется ($v < 0$). От направления относительного движения толстых и тонких протофибрилл зависит последовательность состояний, через которые проходит замкнутый миозиновый мостик.

Моделируя сокращение скелетных мышц, мы рассматривали состояния, через которые проходит мостик только при $v > 0$. Поэтому схема (2.1) элементарного цикла миозинового моста (см. рис. 8) должна быть дополнена следующим образом (рис. 13).

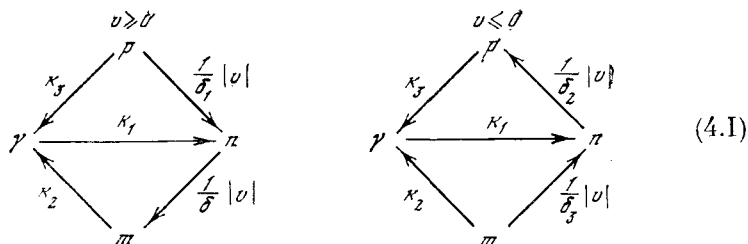


Рис. 13. Схема элементарного цикла миозинового моста для летательных мышц насекомых

Согласно такой схеме элементарного рабочего цикла при растяжении возбужденной мышцы ($v < 0$) замкнутые мостики вследствие относительного скольжения нитей переходят из тормозящего состояния m в тянущее состояние n и затем в состояние p (см. рис. 7). В состояниях m и p они имеют возможность разомкнуться, т. е. перейти в свободное состояние γ .

При сокращении мышцы ($v > 0$) мосты, не успевшие разомкнуться в состоянии p , проходят состояния p , n и m в обратном направлении. В случае скелетной мышцы силу, развиваемую мостиком в состоянии p , можно оценить из соотношения силы и скорости для отрицательных v [153]: абсолютная величина dv/dP при $P < P_0$ примерно в 6 раз превышает эту величину при $P > P_0$. Это можно интерпретировать так, что элементарная сила в состоянии p в 6 раз превышает эту силу в состоянии n и направлена в ту же сторону. Итак, состояние p можно обозначить как «супертянущее».

2. Определение структурной функции $\alpha(l)$ составляет предмет второго уточнения модели. Известно, что небольшое растяжение глицеринизированных волокон летательных мышц насекомых (2—3%) вызывает увеличение их Ca^{2+} -активированной АТФазной активности и действующей силы [92], а такое же растяжение глицеринизированных волокон скелетных мышц позвоночных никак не влияет на их ферментативные свойства [92]. В летательных мышцах, в отличие от скелетных, толстые нити не оканчиваются на границе изотропного и анизотропного дисков. Утоньшаяся, они достигают Z-мембран и, по-видимому, соединяются с ними [148]. Полагают, что активация АТФазы в глицеринизированных

волокон летательных мышц обусловлена растяжением толстых нитей и, как следствие этого, увеличением на их поверхности числа активных центров [92]. Такое объяснение предполагает, что сокращение летательных мышц происходит не по типу «скольжения» нитей и, следовательно, модель, основанная на гипотезе «скольжения», неприменима к описанию их работы.

Однако возможны объяснения этого эффекта в рамках механизма «скольжения», который, по-видимому, справедлив и в случае летательных мышц [123]. Действительная зависимость числа миозиновых центров от степени укорочения S -образна, но мы будем рассматривать только ее линейную область, в которой

$$\alpha(l) = \alpha_0 (1 - l/l_0). \quad (4.1)$$

Здесь l — укорочение половины саркомера; α_0 — максимальное число миозиновых центров, а l_0 можно оценить из данных [92] как $4 \cdot 10^{-6}$ см. Такое поведение летательных мышц может быть понято в рамках концепции скользящих нитей как изменение относительного расположения миозиновых мостиков и актиновых рецепторных центров при смещении миозиновых и актиновых нитей. Увеличение Ca^{2+} -чувствительной АТФазной активности глицеринизированных летательных волокон при растяжении может быть связано с изменением относительного расположения миозиновых мостов и актиновых центров тонких нитей. Ферментативно активной единицей является каждая «удобно расположенная» пара актиновый центр — миозиновый мостик. Среднее число «удобно расположенных» пар, т. е. активных миозиновых центров, в саркомере будет зависеть от его длины только при выполнении следующих двух условий:

- а) осевые периоды в расположении мостиков на толстых нитях и актиновых центров на тонких одинаковы;
- б) существует синхронизация в расположении мостиков на всех толстых нитях и актиновых центров на всех тонких нитях в целом саркомере, т. е. существует дальний трехмерный кристаллоподобный порядок в расположении активных центров в летательных мышцах.

Недавнее электронно-микроскопическое исследование [178] продемонстрировало, что структура летательной мышцы в ригоре действительно отвечает этим жестким требованиям. Основной осевой период на толстых и тонких нитях одинаков и равен 380 \AA , что составляет примерно 3% от половины длины саркомера.

Если такой структурой обладает и нативная мышца, то число активных мостиков в ней должно периодически меняться при растяжении. Из дальнейшего рассмотрения ясно, что амплитуда колебаний в этом случае не должна превышать 2—3% от длины мышцы. Это требование выполняется для глицеринизированных, но не для живых летательных мышц. Это может означать, что если в глицеринизированных волокнах структура толстых нитей фикси-

рована, то в нативных она зависит от длины саркомера: небольшое изменение степени закручивания толстых нитей без изменения их длины при растяжении саркомера может привести к совпадению главных осевых периодов миозиновых и актиновых нитей и к резкому увеличению числа активных мостиков. Так или иначе, в физиологическом диапазоне изменения длины летательных мышц число активных мостиков представляет монотонно возрастающую функцию от удлинения саркомера. На основании опытов Чаплена [92] можно сделать вывод, что эта функция линейна в значительном диапазоне изменения длины саркомера ($\sim 2\%$ от длины покоя) и крутизна линейного участка соответствует увеличению ферментативной активности и изометрической силы от 0 до 100% при удлинении на 2,5—3%.

Факт увеличения числа активных мостиков при растяжении саркомера оказывается решающим обстоятельством при возникновении автоколебаний. Механизм их таков. При растяжении саркомера внешней силой (например, упругой и инерционной силами резонансной механической нагрузки) число («удобно расположенных» пар актин—миозин) возрастает, возрастает и число замкнутых мостов, но с некоторым запаздыванием по времени из-за конечной величины константы k_1 . Поэтому сила, развиваемая мышцей, достигает максимальной величины, когда направление движения сменится на обратное. Таким образом, при сокращении мышца развивает в среднем большую силу, чем при растяжении, что и обеспечивает подкачку энергии в резонансный контур. Если бы такое взаимное расположение было жестким, число активных миозиновых центров периодически менялось бы при растяжении и область монотонного увеличения не могла бы превышать 1,5% от длины мышцы. Однако упругая компонента мышцы может маскировать это простое поведение сократительной компоненты. Влияние последовательной упругости на гипотетические стационарные кривые сила — растяжение показано на рис. 14. Поведение кривых определяется соотношением между наклоном действующей силы и жесткостью последовательной упругости. Возможно, что это — ключ к пониманию состояния «высокого напряжения»* при вынужденных колебаниях [149] и довольно больших амплитуд спонтанных колебаний живых летательных мышц [160].

В нашей математической модели последовательная упругость принимается в расчет только через величину наклона α (l), т. е. через значение l_0 в (4.1).

* Так называемое состояние высокого напряжения [149] наблюдается у летательных мышц в режиме вынужденных колебаний длины. При некоторых условиях (например, при повышении амплитуды колебаний) происходит резкий рост развиваемой силы, сопровождающийся увеличением вязкости мышцы. Переход в это состояние ускоряется при небольшом начальном растяжении мышцы.

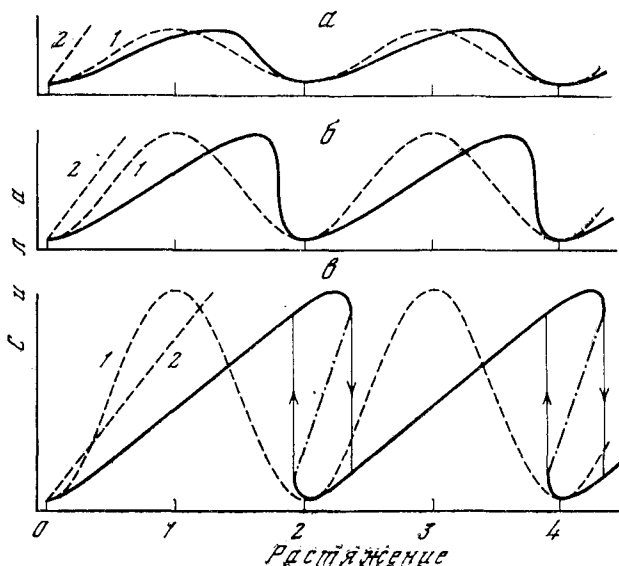


Рис. 14. Влияние последовательной упругой компоненты на идеализированную стационарную кривую сила — растяжение для летательных мышц насекомых

a — в соответствуют различным амплитудам действующей силы. Растяжение дано в половинах осевого периода нитей. Штриховые кривые: 1 — идеализированная зависимость силы от растяжения для сократительной системы; 2 — то же для последовательной упругой компоненты; сплошные кривые — суммарные характеристики «реальной» мышцы (при их построении полное растяжение для каждой данной силы определяется как сумма соответствующих этой силе растяжений сократительной системы (1) и последовательной упругой компоненты (2)). Штрихпунктирные — область неустойчивости. Амплитуда действующей силы растет от *a* к *в* (это соответствует увеличению концентрации кальция)

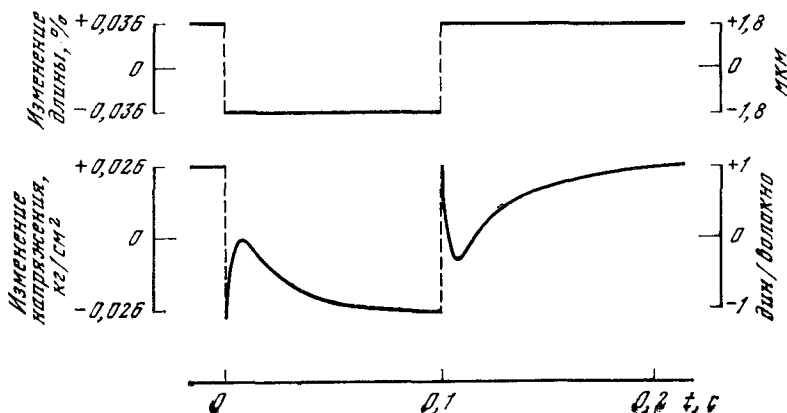


Рис. 15. Реакция активированных глицеринизированных волокон летательных мышц на быстрые изменения длины из работы Джузла и Рюэгга [149]

4.2. Оценка параметров и упрощение схемы элементарного рабочего цикла

Реакция глицеринизированных асинхронных волокон на быстрые изменения длины, исследованная в работе [149] (рис. 15), позволяет определить константы k_1 , k_2 и k_3 . Быстрые фазы роста после мгновенного укорочения и спада силы после удлинения мышцы обусловлены размыканием мостов в состояниях m и p соответственно, что дает $k_2 \simeq k_3 \simeq 100 \text{ с}^{-1}$. Медленный подъем силы после растяжения обусловлен замыканием вновь появившихся вследствие растяжения активных мостиков (см. (4.1)), что дает $k_1 \simeq 50 \text{ с}^{-1}$. Крутизна изменения равновесной силы в этом опыте совпадает с оценками из работы [92].

Замедленное падение напряжения после быстрого освобождения обусловлено размыканием мостиков в состоянии n . Но, как и в случае скелетной мышцы, мы не будем принимать в расчет размыкание мостиков в состоянии n . Это означает, что настоящая модель не будет количественно описывать низкочастотные сокращения летательных мышц, при которых число мостов в состоянии n сравнимо с их числом в состоянии γ . Это упрощение не меняет, однако, качественного поведения получаемой в результате системы уравнений (4.2) (см. следующий раздел).

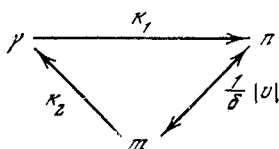
Константы k_1 и k_2 в летательных мышцах имеют те же самые величины, что и для скелетных мышц. Поэтому мы для простоты будем считать, что все аналогичные параметры в обоих типах мышц одинаковы, т. е. $1/\delta_3 \approx 1/\delta_1 \approx 1/\delta_2 \approx 1/\delta \approx 10^6 \text{ см}^{-1}$,

$$f = 3 \cdot 10^{-7} \text{ г} \cdot \text{см} \cdot \text{с}^{-2} \quad \text{и} \quad \alpha_0 = 10^{13}.$$

В этом случае «супертянущее» состояние p характеризуется следующими параметрами:

$$f_p = 6f, \quad k_3 = k_2 \quad \text{и} \quad 1/\delta_1 \simeq 1/\delta_2 \simeq 1/\delta.$$

Его можно заменить состоянием, в котором сила равна f , как в состоянии n , и константа скорости диссоциации актомиозинового мостика равна примерно $k_2/6 \approx k_1/3$. Это воображаемое состояние подобно состоянию n , если процесс диссоциации незначителен. Тогда вместо схемы (4.1) (см. рис. 13) мы будем рассматривать элементарный цикл, показанный на рис. 16.



(4.11)

Рис. 16. Схема упрощенного элементарного цикла миозинового моста для летательных мышц насекомых

Направление перехода между n и m определяется знаком скорости: при $v > 0$ (укорочение) мостики переходят из n в m , при $v < 0$ (растяжение) из m в n .

4.3. Математическая формулировка модели и результаты

Система уравнений, описывающих кинетические процессы в летательной мышце согласно схеме (4.11), выглядит следующим образом:

При $v \geq 0$

При $v \leq 0$

$$\frac{dn}{dt} = k_1 [\alpha(l) - m - n] - \frac{2}{\delta} vn, \quad \frac{dn}{dt} = k_1 [\alpha(l) - m - n] - \frac{1}{\delta} vm, \quad (4.2)$$

$$\frac{dm}{dt} = \frac{1}{\delta} vn - k_2 m,$$

$$\frac{dm}{dt} = \frac{1}{\delta} vm - k_2 m,$$

где n и m — число миозиновых центров в «тянущем» и «тормозящем» состояниях соответственно. На линейном участке зависимости числа активных мостиков от укорочения половины саркомера l (см. раздел 4.1):

$$\alpha(l) = \alpha_0 (1 - l/l_0),$$

где $\alpha_0 = 10^{13}$, как и в скелетных мышцах, а l_0 для глицеринизированных мышц составляет 2,5—3% от половины длины саркомера, т. е. $l_0 \simeq 4 \cdot 10^6$ см.

В настоящее время аэродинамика крыла насекомых и механические свойства его подвески изучены недостаточно подробно. В частности, существующие оценки присоединенной массы воздуха и силы трения о воздух при движении крыла [91] сделаны в гармоническом приближении при целом ряде грубых допущений. В то же время известно, что движение крыльев насекомых резко ангармонично (см., например, [90]) и эта ангармоничность имеет, по-видимому, принципиальный характер — благодаря ей и возникает подъемная и движущая силы при работе крыльев.

Поэтому мы не будем рассматривать автоколебательных режимов работы летательных мышц и ограничимся рассмотрением вынужденных колебаний, т. е. мы будем считать, что закон изменения длины саркомера во времени задан, и вычислим силу, работу и среднюю мощность мышцы за период. Экспериментальное изучение таких режимов работы летательных мышц и их глицеринизированных моделей дает более полную информацию об их сократительных свойствах [149].

Аналитическое исследование удобно проводить, когда изменение длины во времени задается не в явном виде, а с по-

мощью системы двух уравнений с подходящими начальными условиями:

$$\begin{aligned} \frac{dl}{dt} &= v, & l(0) &= \frac{l_0}{2} (1 \pm \theta), \\ \frac{dv}{dt} &= \omega^2 \left(\frac{l_0}{2} - l \right), & v(0) &= 0. \end{aligned} \quad (4.3)$$

Эта система уравнений дает $l = (l_0/2) (1 \pm \theta \cos \omega t)$ *, т. е. гармонические колебания длины около средней точки линейной области α (l) с амплитудой $\theta l_0/2$ ($\theta \ll 1$) и частотой $\omega/2\pi$.

Система уравнений (4.2), дополненная системой (4.3), управляет кинетикой переходов миозиновых центров в ходе вынужденных колебаний летательных мышц насекомых.

Производя линейную замену переменных

$$n = \alpha_0 x, \quad m = \alpha_0 y, \quad l = \delta z, \quad v = k_1 \delta u, \quad t = \tau/k_1 \quad (4.4)$$

и вводя безразмерные параметры $\mu = \delta/l_0$, $q = k_2/k_1$, $\nu = \omega/k_1$, получим для сокращения, т. е. $u \geq 0$, $0 \leq \tau \leq \pi/\nu$:

$$\begin{aligned} \frac{dx}{d\tau} &= 1 - x - y - \mu z - ux, & x(0) &= x_+^0, \\ \frac{dy}{d\tau} &= ux - qy, & y(0) &= y_+^0, \\ \frac{dz}{d\tau} &= u, & z(0) &= z_+^0 = \frac{1 - \theta}{2\mu}, \\ \frac{du}{d\tau} &= \nu^2 \left(\frac{1}{2\mu} - z \right), & u(0) &= u_+^0 = 0, \end{aligned} \quad (4.5)$$

и для растяжения, т. е. $u \leq 0$, $0 \leq \tau \leq \pi/\nu$:

$$\begin{aligned} \frac{dx}{d\tau} &= 1 - x - y - \mu z - uy, & x(0) &= x_-^0, \\ \frac{dy}{d\tau} &= uy - qy, & y(0) &= y_-^0, \\ \frac{dz}{d\tau} &= u, & z(0) &= z_-^0 = \frac{1 + \theta}{2\mu}, \\ \frac{du}{d\tau} &= \nu^2 \left(\frac{1}{2\mu} - z \right), & u(0) &= u_-^0 = 0. \end{aligned} \quad (4.6)$$

Аналитическое исследование проводилось следующим образом. Автономные системы уравнений четвертого порядка (4.5) и (4.6) линеаризовались около общего положения равновесия

$$x_s = 1/2, \quad y_s = 0, \quad z_s = 1/2\mu, \quad u_s = 0. \quad (4.7)$$

* Здесь и далее ω — круговая частота колебаний.

Линеаризованные системы имеют одинаковые характеристические корни:

$$\lambda_1 = -1, \quad \lambda_2 = -q, \quad \lambda_3 = iv, \quad \lambda_4 = -iv. \quad (4.8)$$

Были найдены их решения для (4.5) и (4.6) соответственно

$$\mathbf{h}_+(\tau) = \begin{Bmatrix} x_+ \\ y_+ \\ z_+ \\ u_+ \end{Bmatrix} \quad \text{и} \quad \mathbf{h}_-(\tau) = \begin{Bmatrix} x_- \\ y_- \\ z_- \\ u_- \end{Bmatrix}, \quad (4.9)$$

которые зависят от начальных условий

$$\mathbf{h}_+^0 = \begin{Bmatrix} x_+^0 \\ y_+^0 \\ z_+^0 \\ u_+^0 \end{Bmatrix} \quad \text{и} \quad \mathbf{h}_-^0 = \begin{Bmatrix} x_-^0 \\ y_-^0 \\ z_-^0 \\ u_-^0 \end{Bmatrix} \quad (4.10)$$

соответственно и от параметров μ , q , v , θ .

Предельный цикл был найден путем циклической подстановки решений систем (4.5) и (4.6) на j -м шагу в качестве начальных значений в системы уравнений (4.6) и (4.5) соответственно на $j + 1$ -м шагу и затем нахождения предела последовательностей $(\mathbf{h}_+^0)_j$ и $(\mathbf{h}_-^0)_j$ при $j \rightarrow \infty$. Работа мышцы за один период на предельном цикле вычислялась следующим образом:

$$A' = \int_0^{\pi/v} [x_+(\bar{x}_+^0, \bar{y}_+^0, \tau) - y_+(\bar{x}_+^0, \bar{y}_+^0, \tau)] u_+(\tau) d\tau + \int_0^{\pi/v} [x_-(\bar{x}_-^0, \bar{y}_-^0, \tau) - y_-(\bar{x}_-^0, \bar{y}_-^0, \tau)] u_-(\tau) d\tau, \quad (4.11)$$

где $\bar{x}_+^0 = \lim_{j \rightarrow \infty} (x_+^0)_j$ — начальное значение x для системы (4.5) на предельном цикле; \bar{y}_+^0 , \bar{x}_-^0 , \bar{y}_-^0 имеют аналогичный смысл.

В результате такого анализа получены выражения для работы и средней мощности за период в установившемся режиме:

$$A' = \frac{\pi \theta^{2\nu} [v^2(4\mu - q) + q^2(4\mu - 1) - 2q]}{16\mu^2(1 + v^2)(q^2 + v^2)}, \quad (4.12)$$

$$N' = \frac{v}{2\pi} A' = \frac{\theta^{2\nu} v^2 [v^2(4\mu - q) + q^2(4\mu - 1) - 2q]}{32\mu^2(1 + v^2)(q^2 + v^2)}. \quad (4.13)$$

Расчеты зависимости мощности летательных мышц от частоты при нескольких значениях параметров μ и q при $\theta = 1$, выполнены по формуле (4.13), приведены на рис. 17.

На рис. 18 и 19 приведены результаты численного решения системы (4.5) — (4.6) и экспериментальные фазовые портреты глициринизированных летательных волокон в режиме вынужденных колебаний при трех частотах, полученные в работе [193].

Переход от безразмерных сил, укорочения, частоты, работы и мощности к соответствующим величинам, имеющим обычную

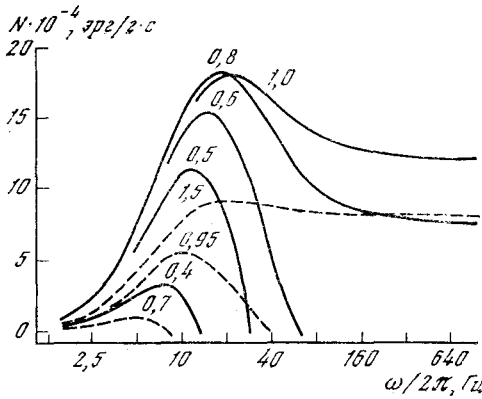


Рис. 17. Зависимость выходной мощности летательных мышц насекомых от частоты вынужденных колебаний, рассчитанная из уравнения (4.13) при $\theta = 1$

Сплошные линии соответствуют $k_2/k_1 = q = 4$; штриховые — $q = 2$; величина β указана возле кривых

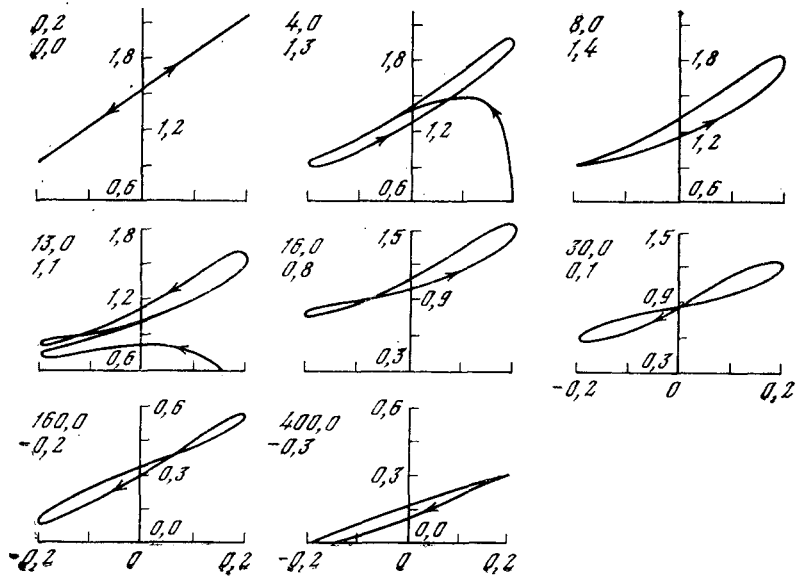
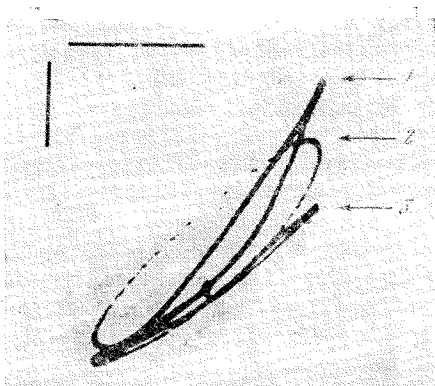


Рис. 18. Эволюция фазового портрета при изменении частоты вынужденных колебаний, рассчитанная из систем уравнений (4.5) — (4.6) при $\theta = 0,4$; $q = 3$; $\beta = 0,7$

Абсцисса — относительное удлинение в %; ордината — натяжение в кг/см²; верхние цифры — частота в Гц; нижние — работа за цикл в 10⁸ эрг/г мышцы

Рис. 19. Экспериментальные фазовые траектории глициринизированных волокон летательных мышц из работы Трэже ра [193]

По оси абсцисс — длина, по оси ординат — сила; частота вынужденных гармонических колебаний для кривых 1, 2 и 3 равна 0,2; 2 и 12 Гц соответственно; вертикальная черточка соответствует 10 мг на волокно, горизонтальная — 1% длины покоя. Амплитуда колебаний 1,7%; точка изображает статическое напряжение в отсутствие колебаний



размерность, осуществлялся по следующим формулам:

— относительное укорочение

$$\frac{2l}{s} \cdot 100 = \frac{2z\delta}{s} \cdot 100 \approx 0,8z\% ;$$

— линейная частота

$$\omega/2\pi = k_1 v/2\pi \approx 8v \text{ Гц};$$

— удельная сила

$$f(n - m) = f\alpha_0 (x - y) \approx 3 \cdot 10^6 (x - y) \text{ дин/см}^2;$$

— удельная работа за период

$$A = \frac{4f\alpha_0\delta}{s} A' \approx 5 \cdot 10^4 A' \quad \text{эрг} \cdot (\text{г мышцы})^{-1};$$

— удельная средняя мощность

$$N = \frac{4f\alpha_0 k_1 \delta}{s} N' \approx 2,5 \cdot 10^6 N' \quad \text{эрг} \cdot \text{с}^{-1} (\text{г мышцы})^{-1},$$

где $f\alpha_0$ — максимальная изометрическая сила на 1 см² поперечного сечения мышцы; s — длина саркомера.

4.4. Сопоставление с экспериментальными данными

Из сопоставления рис. 18 и 19 видно качественное сходство записности теоретических и экспериментальных фазовых портретов летательных мышц от частоты. При понижении частоты фазовый портрет имеет тенденцию к вырождению в линию, при средних частотах — это эллипс с положительной работой в цикле, при умеренно высоких частотах — восьмерка. При дальнейшем повышении частоты фазовый портрет вновь превращается в эллипс, но с отрицательным направлением обхода, т. е. с отрицательной работой в цикле. Физические причины такого поведения фазовой траектории могут быть следующими.

При малой скорости относительного движения нитей (низкая частота) количество замкнутых мостиков однозначно определяется длиной саркомера и равно $\propto (l)$ — максимальному количеству мостиков, способных замкнуться при данной длине саркомера. Таким образом, величина силы, развиваемой мышцей, не зависит от направления движения, выражением чего и является вырождение фазовой траектории в линию.

На средней частоте из-за конечной величины констант, входящих в уравнения (4.2), число мостиков в состоянии n при растяжении будет ниже равновесного уровня, соответствующего данной длине, а при укорочении окажется выше него, что дает эллиптическую фазовую траекторию.

При повышении частоты в фазе укорочения начинает играть все более заметную роль процесс перехода мостиков в тормозящее состояние m и накопление их там из-за конечной величины константы k_2 , что приводит к снижению силы, развиваемой мышцей в этой фазе. Наоборот, в фазе растяжения, особенно в ее начале, сила возрастает из-за подкачки в состоянии n мостов, не успевших разомкнуться в состоянии m . Эти эффекты приводят к появлению траектории типа восьмерки и при дальнейшем увеличении частоты — эллипса с отрицательным балансом работы за период. Крутизна структурной функции $\alpha (l)$ (параметр μ) и отношение констант k_2/k_1 (параметр q) определяют величину мощности и диапазон частот, в котором мышца совершает положительную работу в цикле сокращения—растяжение (см. рис. 17).

Предложенная модель качественно согласуется с известными экспериментальными данными [57, 149, 193], не имевшими до сих пор удовлетворительного объяснения.

1. Выходная мощность пропорциональна квадрату амплитуды вынужденных колебаний [149]. Это прямо следует из формулы (4.13), справедливой на линейном участке зависимости $\alpha (l)$.

2. Когда средняя длина мышцы отклоняется от оптимальной величины, диаграммы длина — натяжение становятся более узкими, их наклон и работа в цикле уменьшаются [193]. Это происходит из-за S -образности структурной функции: крутизна ее максимальна на среднем линейном участке и уменьшается на краях. Тогда сдвиг рабочей точки от середины линейной области структурной функции приводит к тому, что средний наклон падает. Это означает, что уменьшается параметр μ в нашем линейном приближении. Зависимость мощности от μ видна из рис. 17.

3. Широкополосность механизма генерации автоколебаний [57], т. е. способность рассматриваемого сократительного механизма совершать положительную работу в широком диапазоне частот, видна из рис. 18. Если μ превышает некоторое критическое значение, зависящее от q , то мощность остается положительной при стремлении частоты к бесконечности. Следует, однако, отметить, что кривые рис. 18 получены в линейном приближении, которое применимо в ограниченном диапазоне частот.

4. Частота, соответствующая максимальной мощности ω_m , при глицеринизировании всегда понижается, а граничная частота ω_0 , при которой мощность, меняя знак, проходит через нуль, после глицеринизирования, как правило, возрастает [149]. Известно, что у глицеринизированных волокон скелетных мышц максимальная скорость сокращения значительно меньше, чем у нативных. В рамках нашей модели это интерпретируется как уменьшение константы k_2 . Если в летательных мышцах глицеринизирование производит такое же действие, то это должно привести к уменьшению параметра q и, следовательно, к уменьшению максимальной мощности и к понижению ω_m . Уменьшение диапазона амплитуд автоколебаний у глицеринизированных волокон по сравнению с живыми согласуется с представлением о «фиксации» структуры толстых нитей (см. раздел 4.1, пункт 2), которая должна привести к увеличению крутизны $\alpha(l)$, т. е. к возрастанию μ при глицеринизировании. В таком случае возможна ситуация, когда ω_m в глицеринизированных мышцах окажется ниже, а ω_0 — выше, чем в живых (см. рис. 17).

5. На основании модели могут быть поняты некоторые свойства состояний «высокого напряжения» [149]. Это следует из анализа гипотетических кривых стационарная сила — растяжение, показанных на рис. 14. Амплитуда и, следовательно, наклон действующей силы зависят от концентрации Ca^{2+} . Если этот наклон будет круче, чем жесткость последовательной упругости (при высоких концентрациях Ca^{2+}), некоторая область зависимости сила — растяжение становится нестабильной. Это иногда может приводить к скачкообразному укорочению некоторых саркомеров ценою удлинения последовательной упругости: среднее натяжение возрастет, и рабочая точка сдвинется в нелинейную область $\alpha(l)$. Вероятность такого процесса увеличивается, когда мышца подрастянута. Большие амплитуды и высокие частоты колебаний также могут способствовать асинхронному скачкообразному перераспределению длин саркомеров, т. е. вызывать состояние «высокого напряжения». Следует отметить, что строгое исследование этого состояния, вероятно, невозможно в рамках модели с жесткими нитями.

6. Несмотря на то, что модель максимально упрощена, она дает вполне разумные величины выходной мощности и частот ω_m и ω_0 .

О ВОЗМОЖНОЙ КООПЕРАТИВНОСТИ В РАБОТЕ МОСТИКОВ

При моделировании работы сократительного аппарата скелетных мышц мы в данной книге все время предполагаем, что мостики работают независимо. Мы не учитываем надмолекулярную структуру мышцы, считая, что скорость скольжения всех замкнутых мостиков одинакова. Предположение о независимости работы мостиков, принадлежащих данной миозиновой нити, содержится и в моделях Хаксли [133] и Дэвиса [95]. Волькенштейн [196] также считает, что механизмы мышечного сокращения, основанные на гипотезе скольжения, «не включают представлений о кооперативных процессах». Однако структура мышечных протофибрилл — строгая периодичность в расположении миозиновых мостиков и активных центров на актиновых нитях — делает очень вероятным кооперативный характер работы мостиков: замыкание одного мостика, фиксируя расположение остальных относительно активных центров актиновой нити, должно влиять на вероятность их замыкания.

Известно также, что электронно-микроскопическая картина поперечных срезов толстых нитей свидетельствует о плотной упаковке вещества в них [81]. В таких условиях конформационные изменения отдельной молекулы миозина должны приводить к значительным локальным деформациям вещества нитей. С этой точки зрения также кажется вероятной ситуация, когда конформационную перестройку претерпевает одновременно группа близко расположенных миозиновых молекул.

В этой главе мы проведем качественный анализ модели, основанной, как и кинетическая теория, на гипотезе скольжения, но включающей предположение о кооперативной работе мостиков.

5.1. Формулировка кооперативной схемы

Моделируется взаимодействие избранной пары нитей через миозиновые мостики и делаются следующие предположения.

1. Толстая нить — жесткий стержень, на котором через равные интервалы h_M расположены миозиновые мостики, направленные к данной актиновой нити.

2. Тонкая нить — растяжимая двойная спираль, построенная из субъединиц, каждая из которых является центром, с которым может соединиться миозиновый мостик. Полупериод двойной спирали обозначим через h_A . Из-за спиральной конфигурации цепочек субъединиц активные центры тонкой нити неодинаково расположены по отношению к данной толстой нити. Строение тонкой

нити в виде двойной спирали из одинаковых мономеров G-актина в настоящее время является доказанным фактом [71, 144, 163, 200]. Образование структур в виде «шаконсчиков стрел» при взаимодействии тонких нитей с тяжелым меромозином [72] свидетельствует об одинаковости агрегационных свойств G-актиновых мономеров в тонкой нити.

3. Среднее время τ , необходимое для образования связи между миозиновым мостиком и актиновым центром тонкой нити, зависит от их взаимного расположения.

4. Замкнутый мостик, претерпевая конформационную перестройку, развивает постоянную силу f на интервале δ .

5. Для разрыва замкнутого мостика при обратном движении нитей, соответствующем растяжению мышцы, требуется приложить силу, значительно превышающую f . Обоснованием является тот факт, что $|dV/dP|$ для удлинения возбужденной мышцы с малой скоростью (при $P > P_0$) в 6 раз меньше, чем $|dV/dP|$ для сокращения той же мышцы (при $P < P_0$) [153]; P , P_0 и V здесь — внешняя сила, изометрическая сила и скорость сокращения мышцы.

5.2. Описание работы схемы

Периодическая организация толстых и тонких нитей и неравенство их основных периодов h_M и h_A делают конструкцию из двух парных нитей похожей на пониусное устройство. Если $h_A/(h_M - h_A)$ — целое число, то все мостики между парными нитями разобьются на группы, в каждой из которых число мостиков будет

$$N \left| \frac{h_M - h_A}{h_A} \right|, \quad (5.1)$$

где N — полное число мостиков между данной парой нитей. В силу предположения 3 мостики одной группы имеют одинаковое среднее время замыкания. При возбуждении мышцы первым замкнется мостик, оказавшийся в наиболее выгодном для замыкания положении. В силу предположения 5 замыкание первого же мостика фиксирует относительное расположение нитей. Дальнейшее замыкание мостиков будет происходить в соответствии с их характеристическими временами до тех пор, пока суммарная сила, развиваемая ими, не сравняется с внешней нагрузкой, приложенной к данной паре нитей. После этого произойдет синхронная конформационная перестройка замкнутых мостиков, что приведет к перемещению нитей на расстояние δ . Затем начинается новый цикл набора мостиков. В данной модели мы считаем, что время конформационной перестройки значительно меньше времени набора мостиков, т. е. перемещение нитей происходит скачкообразно.

5.3. Интерпретация экспериментальных данных

В настоящее время нет возможности точно охарактеризовать относительное расположение актиновых центров тонких нитей и миозиновых мостиков и времена замыкания всех мостиков. Однако можно посмотреть, как интерпретируются известные экспериментальные данные в рамках данной схемы и нет ли явных противоречий в этой интерпретации.

1. Зависимость скорости сокращения мышцы от внешней нагрузки в рамках данной схемы определяется двумя причинами: во-первых, число мостиков, которые должны замкнуться и развивать активную силу, пропорционально внешней нагрузке и, во-вторых, мостики при фиксированном положении нитей имеют различные характеристические времена замыкания. Максимальная внешняя нагрузка, при которой мышца еще способна сокращаться, определяется полным количеством мостиков, имеющих возможность одновременно замкнуться между парными нитями. Из характеристического уравнения Хилла (см. уравнение (3.1)) можно получить закон распределения мостиков по времени их замыкания с актиновыми центрами тонкой нити. Считая параметры a и b в этом уравнении равными

$$a = P_0/4 \quad \text{и} \quad b = v_{\max}/4, \quad (5.2)$$

где v_{\max} — скорость скольжения нитей при $P = 0$, перепишем его следующим образом:

$$\frac{P}{P_0} = \frac{v_{\max} - v}{v_{\max} + 4v}. \quad (5.3)$$

Обозначим буквой τ время набора такого количества мостиков, которое необходимо для того, чтобы при данной внешней нагрузке P произошло скачкообразное перемещение нитей на расстояние δ . Тогда $v = \delta/\tau$, $v_{\max} = \delta/\tau_{\min}$ и формулу (5.3) можно переписать как

$$\frac{P}{P_0} = \frac{\tau/\tau_{\min} - 1}{\tau/\tau_{\min} + 4}, \quad (5.4)$$

где P/P_0 — доля замкнутых мостиков.

В данной модели предполагается, что после фиксирования относительного расположения нитей замыкание мостиков уже не влияет на характеристические времена незамкнутых мостиков. Поэтому время набора нужного количества мостиков будет в среднем равно характеристическому времени замыкания самого «медленного» из всех замкнутых мостиков. Зависимость P/P_0 от τ/τ_{\min} , даваемая формулой (5.4), представляет, таким образом, интегральный закон распределения мостиков по времени замыкания (рис. 20). Ордината, соответствующая какому-либо значению τ ,

дает долю мостиков с характеристическими временами, не превышающими τ .

2. Экспериментально наблюдаемая зависимость скорости выделения энергии при изотоническом сокращении мышцы от внешней нагрузки, имеющая вид уравнения

$$dE/dt = b(P_0 - P),$$

явилась отправным пунктом вывода характеристического уравнения Хилла (см. раздел 1.4). Таким образом, распределение мостиков по временам замыкания (5.4), полученное из уравнения Хилла, автоматически дает правильную зависимость скорости выделения энергии от внешней нагрузки.

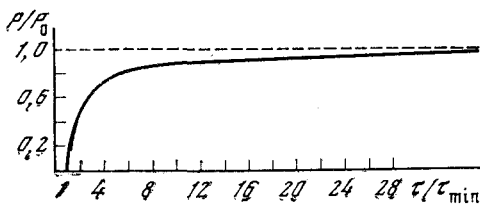


Рис. 20. Распределение мостиков по времени замыкания P/P_0 — доля замкнутых мостиков

3. Постоянство теплоты укорочения в рамках данной схемы интерпретируется следующим образом. Основным источником теплопродукции при сокращении мышцы являются границы между участками синхронно сокращающихся (замкнутых) и неподвижных (разомкнутых) мостиков. Поэтому постоянство теплоты укорочения должно означать независимость числа таких границ от внешней нагрузки. Нетрудно видеть, что постоянство числа границ раздела между группами замкнутых и разомкнутых мостиков является прямым следствием пространственной периодичности распределения мостиков по характеристическим временам.

4. Если считать, что теплота укорочения на единицу длины совпадает по величине с константой a характеристического уравнения Хилла, то окажется, что количество энергии, выделяющееся при укорочении на единицу длины ненагруженной мышцы, в 5 раз меньше количества энергии, выделяющегося при сокращении мышцы под максимальной нагрузкой (без учета теплоты активации и поддержания сокращения). Это значит, что если при сокращении мышцы под максимальной нагрузкой работают все мостики при перемещении на каждый шаг δ , то при сокращении ненагруженной мышцы срабатывает каждый пятый мостик. В связи с этим интересно отметить, что из-за несовпадения основных периодов толстых и тонких нитей (h_M и h_A соответственно) мостики по времени замыкания делятся на 5—6 групп, внутри каждой из которых характеристические времена мостиков будут различаться незначительно. Такое разделение произойдет даже в том случае,

если $h_A/(h_M - h_A)$ — не точно целое число, поскольку число мостиков между шарвыми пиями невелико (16—18 штук) [170].

Итак, проведенный геометрический анализ показывает, что константа скорости замыкания свободных мостиков в принципе может зависеть от числа замкнутых.

Однако, по-видимому, в настоящее время не существует экспериментальных данных, для объяснения которых с необходимостью потребовалось бы учесть возможную кооперативность в работе мостиков. Приближенное деление мостиков на «неактивные» и «активные», принятое при формулировке кинетической модели (см. раздел 2.2, пункт 1'), оправдывает себя при анализе экспериментальных данных с хорошей точностью: в предыдущих главах мы убедились, что основанная на предположении о независимой работе мостиков модель хорошо работает при описании работы мышцы в стационарных и квазистационарных условиях; немного ниже мы увидим, что эта модель оказывается справедливой и в случае явно нестационарных режимов.

Глава 6

НЕКОТОРЫЕ ОБЩИЕ ВОПРОСЫ КИНЕТИЧЕСКОЙ ТЕОРИИ МЫШЕЧНОГО СОКРАЩЕНИЯ

6.1. Механохимическая обратная связь

В предыдущих главах была сформулирована кинетическая теория мышечного сокращения и на основании вытекающей из нее при некоторых предположениях кинетической модели были проанализированы основные закономерности стационарных и некоторых нестационарных режимов сокращения поперечно-полосатых скелетных мышц, а также летательных мышц насекомых. Подведем первые итоги проведенного рассмотрения и обсудим возможные перспективы дальнейшего применения теории.

При формулировке модели мы рассматривали сократительный аппарат как принципиально одномерную систему (см. раздел 2.2, пункт В). Почему же простейшая двухнитевая модель оказывается достаточной для описания существенных сократительных свойств целой поперечно-полосатой мышцы?

Этот факт не выглядит слишком странным в свете экспериментальных данных, согласно которым поведение всех протофибрилл и всех саркомеров при сокращении одинаково. Однако причины такого их поведения не очевидны. Более того, при изометрическом сокращении растянутого мышечного волокна состояние, в котором

все саркомеры имеют одинаковую длину, должно быть неустойчивым [121], поскольку сила, развиваемая саркомером, растет при его укорочении. По аналогичным причинам кажется, что симметричное положение каждой толстой протофибриллы в центре саркомера также неустойчиво. Тем не менее в обычных условиях сокращения эта неустойчивость не проявляется, при укорочении мышечного волокна длина всех саркомеров меняется примерно одинаково, а в изометрических условиях укорочение одних саркомеров за счет растяжения других случается крайне редко.

Предложенная модель взаимодействия протофибрилл содержит элемент механохимической обратной связи, которая позволяет разрешить это противоречие. Допустим, что некоторый саркомер развивает большую силу, чем его соседи, и потому начинает укорачиваться с большей скоростью. Это приводит к ускорению «перекачки» замкнутых мостиков из тянущего состояния n в тормозящее состояние m , вследствие чего сила саркомера и скорость его укорочения быстро падают до среднего уровня. Активным элементом этого стабилизирующего механизма является пропорциональный скорости укорочения переход мостиков из тянущего в тормозящее состояние. В изометрическом режиме сила укорачивающегося саркомера падает, по указанной выше причине, а сила растягиваемого саркомера возрастает, поскольку его замкнутые мостики переходят в супертянущее состояние p при $\xi < 0$ (см. рис. 7).

Очевидно, что описанный механизм работает уже на уровне пары протофибрилл, выравнивая скорости скольжения толстой нити относительно тонких в правой и левой половинах саркомера и, таким образом, стабилизируя ее положение в центре саркомера.

Этот механизм можно рассматривать как механохимическую обратную связь по напряжению: если сила, развиваемая каким-либо последовательным элементом, отличается от силы, приложенной к нему со стороны соседей, то изменение скорости его движения под действием этой разницы сил вызывает исчезновение последней. Точность компенсации силы очень высока, поскольку инерционность этих элементов ничтожно мала.

Если до начала сокращения все саркомеры имели примерно одинаковую длину, то этот механизм на обычных временах сокращения эффективно стабилизирует скорость их укорочения, т. е. синхронность и одинаковость изменений их длины.

Механохимическая обратная связь по напряжению, по-видимому, свойственна не только скелетным и летательным мышцам, но и вообще всем типам мышц, что значительно облегчает задачу моделирования их работы. Характерной особенностью летательных мышц насекомых является то, что в них связь саркомеров по напряжению приводит к синхронизации изменений их длины не только через влияние на скорость укорочения, но и непосредственно.

Очевидно, что описанная обратная связь происходит из взаимодействия толстых и тонких нитей и делает возможной стабилизацию толстых нитей в середине саркомера в ходе сокращения. Именно это свойство нашей модели позволяет переносить результаты ее исследования на свойства целой мышцы.

6.2. Обобщение теории. Начальная фаза сокращения, расслабление

Система уравнений (2.14) — (2.17) описывает поведение возбужденной поперечно-полосатой мышцы, но не такие процессы, как активация и релаксация мышцы. Однако в рассматриваемую схему могут быть включены и эти переходные процессы.

Активация сократительного аппарата мышцы при возбуждении обусловлена появлением в миофибриллярном пространстве ионов Ca^{2+} [176]. Концентрация кальция достигает уровня, достаточного для максимальной активации сократительной системы ($5 \cdot 10^{-6}$ моль [73]), через 5—10 мс после начала стимуляции [179].

Отсюда очевидно обобщение модели, позволяющее включить в нее переход мышцы от покоя к активированному состоянию. Для этого достаточно отказаться от аппроксимации мгновенным скачком быстрой стадии роста константы скорости замыкания свободных мостиков. Это и было сделано при вычислении динамики развития силы в обычном изометрическом тетанусе (см. рис. 12). Константа замыкания в уравнении (2.14) задавалась в виде $k_1(1 - e^{-t/t_0})$. Наилучшее согласие с экспериментом было получено при $t_0 = 10$ мс. Близкое совпадение t_0 с временем подъема концентрации Ca^{2+} до уровня максимальной активации означает, что процессы, вызываемые появлением Ca^{2+} и приводящие мостик в состояние готовности к замыканию, являются быстрыми по сравнению с кинетикой сокращения. Именно это обстоятельство позволяет игнорировать конкретную физико-химическую природу этих и целого ряда других быстрых процессов при моделировании сократительных свойств мышцы.

После окончания стимуляции концентрация кальция и, следовательно, константа скорости замыкания уменьшаются до нуля. В рамках нашей модели это еще не означает расслабления мышцы, поскольку мостики, находящиеся в тянущем состоянии n , не могут разомкнуться. Отмена этого ограничения — введение отличной от нуля константы скорости размыкания тянущих мостиков — наиболее простое обобщение модели, позволяющее описать процесс расслабления мышцы. Уже довольно небольшая величина константы перехода из n в γ ($k_{-1} = 7 \text{ с}^{-1}$) достаточна, чтобы получить вполне приемлемое время релаксации (расслабления) мышцы при 0°C (150 мс [133]). Член $k_{-1} n$, включенный для этой цели в уравнение (2.14), играет важную роль только, когда другие константы этого уравнения (k_1 и v/δ) становятся малыми. Другими словами, процесс размыкания тянущих мостиков — медленный по сравне-

нию с остальными кинетическими процессами, и пренебрежение им при моделировании сокращения мышцы вполне допустимо и оправдано. Однако при расслаблении именно этот процесс определяет механическое состояние мышцы, поскольку константы замыкания и перехода мостиков в тормозящее состояние становятся малыми.

Следует, однако, отметить, что переход мостиков из состояния n в состояние γ в летательных мышцах может и не быть столь медленным.

6.3. Мышца как механохимическая квазикристаллическая система

Обобщение теории, проведенное выше, не только расширяет границы ее применимости практически на все возможные режимы работы поперечно-полосатых мышц, но и иллюстрирует основную идею построения математической модели. С помощью постулатов, лежащих в основе теории, из всей совокупности процессов и реакций, протекающих в возбужденной мышце, вычленяется механохимическая система. Это значит, что выделяется совокупность процессов, которые непосредственно определяют механическое состояние мышцы, и их характерные времена принимаются за единицу.

Все значительно более быстрые или медленные процессы включаются в уравнения, описывающие механохимическую систему, в виде эффективных констант, поскольку переменные, участвующие в этих процессах, на временах порядка единицы либо не меняются (медленные), либо их изменения функционально обусловлены изменением механохимических переменных.

Пусть гипотетическая система уравнений, описывающих все процессы, имеющие отношение к сокращению мышцы, выглядит следующим образом:

$$\varepsilon dr/d\tau = f(r, u, s),$$

$$du/d\tau = \varphi(r, u, s),$$

$$ds/d\tau = \varepsilon\psi(r, u, s),$$

где ε — малый параметр ($\varepsilon \ll 1$), а механохимические переменные обозначены через u . Для времен порядка единицы справедливо приближение $\varepsilon \approx 0$. В этом случае все «медленные» переменные $s = s_0$ постоянны, а «быстрые» определяются из квазистационарных уравнений $f(r_{\text{KB}}, u, s_0) = 0$, так что система механохимических уравнений

$$du/d\tau = \varphi(r, u, s)$$

может рассматриваться как замкнутая система, в которую «быстрые» и «медленные» процессы входят лишь как некоторые эффективные параметры.

Обобщение теории, позволяющее уточнить свойства мышцы на временах, существенно меньших или больших единицы, в принципе должно привлекать рассмотрение новых уравнений. Так, вместо введения эмпирической зависимости константы замыкания мостиков от времени (переход мышцы в возбужденное состояние) следовало бы записать уравнения для изменения проницаемости мембран саркоплазматического ретикулула под действием электрохимической волны возбуждения, описать диффузию Ca^{2+} внутрь миофибрилл, связывание его с миозином или актином и, возможно, еще целый ряд процессов, о которых в настоящий момент мы еще ничего не знаем. Поэтому пока приходится довольствоваться менее строгими, но более эффективными способами обобщения теории.

Элементарный рабочий цикл миозинового мостика в целом, по-видимому, необратим, поскольку он сопряжен с гидролизом молекулы АТФ. Одна из стадий этого цикла, а именно переход мостиков из тянущего состояния в тормозящее или супертянущее, невозможна без механического перемещения нитей. Математическим выражением механохимической природы предложенной модели сократительного аппарата мышцы является зависимость «химических» уравнений для замыкания и размыкания мостиков от «механических» переменных l и v . Таким свойством должна обладать любая механохимическая система.

Первая фаза движения замкнутого мостика активна: мостик, находясь в стадии конформационной перестройки, инициированным замыканием, развивает положительную силу, которая приводит к скольжению нитей. Вторая фаза движения, переход мостика в тормозящее состояние и размыкание поперечной связи, пассивна и происходит вследствие скольжения нитей, т. е. эта стадия происходит за счет положительной работы других поперечных мостиков, которые находятся в тянущем состоянии. Таким образом, механическая взаимосвязь между активными центрами, т. е. «кристаллоидная» организация сократительной системы, делает возможным использование энергии гидролиза АТФ для понижения активационного барьера этой реакции*. (Тормозящее состояние замкнутого миозинового мостика является прямым следствием существования этого барьера.) Именно этот механизм, по-видимому, ответствен за высокую АТФазную активность актомиозина. Близкие представления о природе ферментативной активности мышцы были высказаны более двадцати лет назад В. А. Энгельгардом [77].

По-видимому, подобный механизм может иметь значение и для функционирования других ферментных комплексов [155]. Белковые олигомеры способны использовать энергию, освободившуюся в экзотермической стадии реакции на одном из активных центров, для проведения эндотермических или кинетически невыгодных

* См. об этом также в конце раздела 10.2.

стадий этой реакции на соседнем активном центре. Мы предполагаем, что регуляция ферментативной активности белков основана именно на таком физическом механизме. Кинетические аспекты механизма такого типа в общем виде рассмотрены в Приложении к этой части.

6.4. Область действия и границы применимости кинетической модели

В рамках предложенной теории сократительные свойства поперечно-полосатых мышц получены как следствие их структурной организации и постулатов, конкретизирующих кинематическую схему элементарного рабочего цикла миозинового мостика.

Хорошо известные свойства поперечно-полосатых мышц даются в теории количественно: уравнение Хилла в его точном виде следует из теории автоматически; рассчитанные скорости начального развития силы и ее восстановления после быстрого укорочения совпадают с экспериментальными данными, полученными с временным разрешением ≥ 10 мс; теория объясняет автоколебания летательных мышц насекомых.

Теория способна предсказывать некоторые новые факты, так, например, автоколебания силы, возникающие в общеиспользуемой мышце sartorius лягушки при изотонических условиях; обобщение уравнения Хилла на изотоническое сокращение растянутой мышцы.

При экспериментальной проверке теории следует иметь в виду два обстоятельства. Во-первых, теория строго применима к участкам мышцы, в которых саркомеры имеют примерно одинаковую длину. Во-вторых, при расчетах изотонических режимов скелетных мышц и автоколебаний летательных мы пока пренебрегали пассивными эластическими элементами. Пренебрежение последовательной упругой компонентой должно привести к завышению расчетной частоты автоколебаний, а параллельная упругость сарколеммы может замаскировать поведение сократительной системы, нарушая изотоничность при сильном растяжении мышцы.

Постулаты, лежащие в основе теории, не конкретизируют физико-химическую природу процессов, вызывающих сокращение мышцы. Результаты этих процессов интегрально проявляются как замыкание, размыкание и механические перемещения мостиков и учитываются в нашей схеме через определенные величины констант. Исследование зависимостей констант от различных внешних воздействий (например, от температуры с вычислением энтропии и энтропии активации, от ионной силы и т. д.) даст дополнительную информацию о природе процессов, интегральным отражением которых эти константы являются. Таким образом, настоящая теория, не претендуя на объяснение конкретных молекулярных механизмов процессов в сокращающейся мышце, может служить удобным инструментом их исследования.

Наконец, сопоставление параметров предложенной модели, характерных для сокращения различных типов поперечно-полосатых мышц, дает возможность рассмотреть эволюцию сократительных систем на количественной основе. Удивительным результатом в таком плане является близкое совпадение «химических» констант скелетных мышц позвоночных и летательных мышц насекомых. Вероятно, огромное многообразие функциональных режимов работы различных мышц является следствием различий в их надмолекулярной организации, а не в механохимических свойствах молекул сократительных белков.

Этот вывод является подтверждением на механохимическом уровне положения о единстве механизмов всех сократительных систем, кратко сформулированного В. А. Энгельгардтом как «принцип единства во множестве».

Глава 7

НЕКОТОРЫЕ НЕСТАЦИОНАРНЫЕ РЕЖИМЫ СОКРАЩЕНИЯ ПОПЕРЕЧНО-ПОЛОСАТЫХ МЫШЦ *

7.1. Колебания силы в изотоническом режиме сокращения

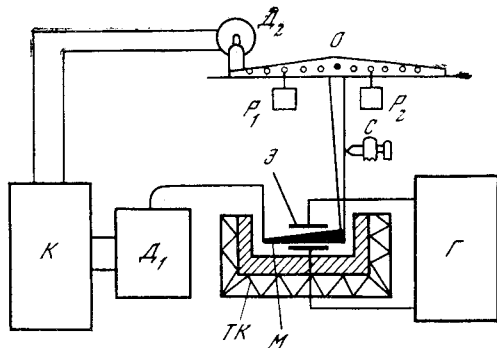
При исследовании поведения кинетической модели в случае изотонического сокращения мышцы (см. главу 3) мы видели, что теоретический анализ приводит к неожиданному, на первый взгляд, результату. Приближение к стационарному режиму происходит колебательным образом, несмотря на то, что из уравнений была исключена пассивная упругость мышцы. Нами совместно с В. Н. Буравцевым были поставлены эксперименты [13] на портяжной мышце лягушки, в которых эти предсказания были проверены и действительно были зарегистрированы колебания. (Простая оценка показывает, что сила, развиваемая мышцей, является более удобным параметром для регистрации, чем длина мышцы или скорость ее укорочения. Поэтому в экспериментах исследовались колебания силы.)

Теория предсказывает (см. рис. 10) для этих колебаний определенную зависимость круговой частоты $\omega = k_1\nu$ и постоянной

* Глава 7 составлена на основании симпозиального доклада В. И. Дещеревского на IV Международном биофизическом конгрессе 1972 г. в Москве [30]. Существенная часть представленных в этом докладе результатов была получена совместно с А. Е. Букачиной, В. Н. Буравцевым, М. Ф. Чаплием. Расчеты на ЭВМ, результаты которых приведены в разделе 7.1, выполнены Ю. М. Кокозом. Часть главы 7 (разделы, набранные петитом) написана для книги В. Н. Буравцевым.

Рис. 21. Блок-схема установки для наблюдения колебаний силы в изотоническом режиме сокращения

- M — мышца;
- D_1 — датчик силы;
- D_2 — датчик длины;
- \mathcal{E} — стимулирующие электроды;
- G — генератор прямоугольных импульсов;
- K — кардиограф;
- TK — термостатированная кювета;
- O — ось Т-образного рычага;
- P_1, P_2 — нагрузка;
- C — стопор



затухания $1/(k_1\sigma)$ от параметров нагрузки \mathcal{A} и \mathcal{B} , однозначно связанных в кинетической модели (см. раздел 3.3) с эффективной массой нагрузки \mathcal{T} и действующей на мышцу внешней силой P . В частности, наименьшего затухания колебаний следует ожидать при $P \approx P_0$ и малых \mathcal{T} .

Блок-схема экспериментальной установки для исследования колебаний силы при изотоническом режиме сокращения приведена на рис. 21. Мышца помещалась в термостатированную кювету и крепилась одним концом к передвижному датчику силы, а другим — к Т-образному рычагу. Кювета термостатировалась с помощью микротомного холодильного столика ТОС-2, температура в кювете поддерживалась в пределах $2-4^\circ\text{C}$ и контролировалась термонарой. Датчиком силы служил сегнетовый пьезоэлемент. Сигнал с пьезоэлемента подавался на осциллограф (шлейфовый осциллограф). Иногда использовалось регистрирующее устройство энцефалографа или кардиографа. Для получения необходимых частотных характеристик пьезоэлемента он был залит эпоксидной смолой. Амплитудно-частотная характеристика датчика силы позволяла без искажений регистрировать изменения силы в полосе частот от 10 до 250 Гц.

Т-образный изотонический рычаг *, к которому крепился подвижный конец мышцы, был сконструирован таким образом, что, меняя величину грузов и точки их прикрепления к рычагу (см. рис. 21), можно было независимо менять эффективную инерционную массу \mathcal{T} и вес нагрузки ** P , задавая, та-

* Насколько нам известно, в этой установке В. И. Дещеревского такая оригинальная конструкция изотонического рычага была применена впервые. — *Прим. ред.*

** Как ясно из рис. 21, при такой постановке эксперимента величина эффективной массы нагрузки \mathcal{T} зависит не только от массы грузов, но и от соотношения плеч изотонического рычага. Можно показать, что если длины плеч рычагов, к которым крепятся грузы P_1, P_2 и мышца, равны соответственно r_1, r_2 и r , то эффективная величина нагрузки

$$P = (r_1/r) P_1 - (r_2/r) P_2,$$

а ее эффективная масса

$$\mathcal{T} = [(r_2/r)^2 P_2 + (r_1/r)^2 P_1]/g.$$

ким образом, в необходимых пределах значения параметров \mathfrak{M} и \mathfrak{B} . Конструкция Т-образного рычага позволяла наблюдать смещение подвижного конца мышцы в пределах от 0 до 2 см. Датчиком изменения длины служило устройство, состоящее из жестко связанного с рычагом флажка, перекрывающего световой поток, падающий на фотозлемент. Датчик смещения позволял регистрировать изменения длины с ошибкой, не превышающей 0,3% длины мышцы. Изменения длины регистрировались одновременно с изменениями силы тем же прибором. Длина невозбужденной мышцы задавалась стопорным винтом. Стимулирующие электроды располагались в центре кюветы с разных сторон мышцы. Возбуждение осуществлялось импульсами от генератора прямоугольных импульсов Г6-5А.

Объектом исследования служила портняжная мышца (*m. sartorius*) травяной лягушки (*Rana temporaria*). После выделения мышца помещалась в кювету, заполненную раствором Рингера (6 г NaCl, 120 мг KCl, 140 мг CaCl₂, 200 мг NaHCO₃ на 1 л H₂O), и ее концы крепилась к соответствующим датчикам. Стопорным винтом устанавливалась начальная длина мышцы. В опытах осуществлялся тетанический режим стимуляции (частота следования импульсов 30 имп/с). Перед регистрацией кинетики укорочения измерялась изометрическая сила P_0 . После каждого изотонического сокращения мышце давали отдохнуть в течение 3 мин. Эксперимент на данной мышце прекращали, как только P_0 падало на 10%.

В ходе эксперимента были получены следующие результаты. В области параметров нагрузки, предсказанных теорией, действительно были обнаружены синусоидальные колебания силы, развиваемой мышцей. Частота колебаний при 2—4° С в условиях тетанической стимуляции (30 имп/с, длительность импульса 3 мс) определялась величиной и массой нагрузки и в зависимости от \mathcal{T} и P/P_0 варьировала от 10 до 70 Гц. Колебания наблюдались на стадии укорочения. Не вызывало сомнений, что они имеют активный характер. На рис. 22, 23 приведены различные типы наблюдавшихся экспериментальных кривых.

Частота обнаруженных колебаний была в 1,5—2 раза ниже расчетной, а затухание много меньше расчетного. Однако учет упругости, включенной последовательно с контрактивным элементом, позволяет легко объяснить это расхождение [12]. В ряде экспериментов (см. рис. 23) наблюдались двухчастотные колебания, а также колебания силы с нарастающей амплитудой, т. е. осцилляции, для которых $\sigma < 0$. Решая систему уравнений кинетической модели для этих условий, мы в главе 3 получили только затухающие колебания. Однако расчеты показывают, что незатухающие и двухчастотные колебания могут быть также объяснены теорией, если учесть неравномерность распределения мостиков по тянущей

где g — ускорение свободного падения; т. е. \mathcal{T} и P по-разному зависят от длины плеч r_1 и r_2 . Поэтому, выбирая большие грузы P_1 и P_2 и малые рычаги r_1 и r_2 , можно одновременно получать нагрузку P , близкую к P_0 (т. е. малые \mathfrak{M}), и большие отношения $[1 + 4P/P_0]/\mathcal{T}$ (т. е. большие \mathfrak{B}). — Прим. ред.

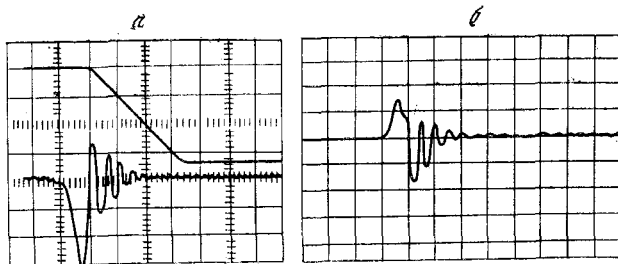


Рис. 22. Различные типы автоколебаний силы нерастянутой портняжной мышцы лягушки во время тетанического сокращения под изотонической инерционной нагрузкой

Начальная длина равна длине мышцы *in situ*; $t = 2^\circ \text{C}$; частота стимулирующих импульсов 30 имп/с. По оси ординат — переменная компонента силы, по оси абсцисс — время; *a* — деление по абсциссе 100 мс, максимальная амплитуда соответствует $0,1 P_0$, верхняя кривая — изменение длины; *b* — частота автоколебаний 20 Гц, экспериментальные параметры $A = 0,75$; $B = 26$

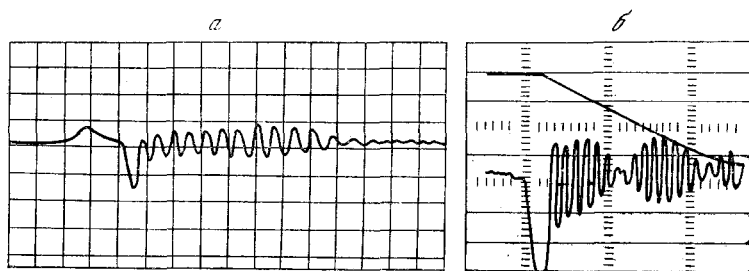
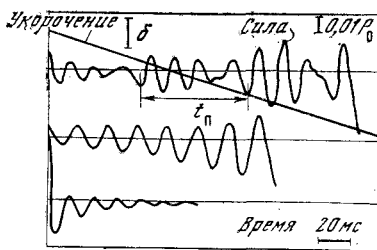


Рис. 23. То же, что на рис. 22, но для растянутой мышцы

Начальная длина равна $1,3$ ее длины *in situ*; a — $A = 0,9$; $B = 26$; частота автоколебаний 20 Гц; b — деление по абсциссе 100 мс, максимальная амплитуда соответствует $0,1 P_0$, верхняя кривая — изменение длины мышцы

Рис. 24. Расчетные кривые автоколебаний силы во время тетанического сокращения мышцы под изотонической инерционной нагрузкой, полученные с учетом запаздывания при разных условиях

$t_{\text{д}}$ — время одной пульсации



зоне. (Эта неравномерность может быть обусловлена совокупностью двух причин: во-первых, повышенной вероятностью замыкания мостиков с малым смещением и, во-вторых, переменной скоростью скольжения нитей.) Действительный поток мостиков из тянущего состояния в тормозящее определяется не средней концентрацией мостиков n/δ , а их реальной концентрацией на границе тянущей и тормозящей зон (см. схему элементарного цикла на рис. 8). Если все мостики в момент замыкания имеют смещение $\xi = 0$, то их концентрация на границе δ в момент времени t равна концентрации в точке $\xi = 0$ в момент $t - \Delta t$, где Δt — время движения мостика по тянущей зоне. Этот эффект учитывается введением в уравнения членов с запаздыванием. При этом оказывается, что полученная система не имеет стационарного решения, если все мостики замыкаются при $\xi = 0$. Реальное поведение мышцы, включая все типы кривых рис. 22, 23, было получено, когда вероятность присоединения считалась постоянной для всех мостиков с $-0,8 \delta \leq \xi \leq 0,8 \delta$ и равной нулю при других значениях ξ . Кривые автоколебаний силы, полученные при расчетах на ЭВМ, приведены на рис. 24.

Интересно отметить, что во всех рассчитанных нами кривых с осциллирующей амплитудой укорочение мышцы за время одной пульсации соответствует смещению нитей на шаг мостика δ . Однако в эксперименте соответствующее укорочение составляет 3—4% от длины мышцы, что явно превышает размеры тянущей зоны. Это расстояние скорее соответствует осевой периодичности актиновых центров на нитях.

Таким образом, механизм автоколебаний силы в ходе изотонического сокращения нуждается в дальнейшем экспериментальном и теоретическом исследовании.

Вероятно, для объяснения некоторых режимов сокращения потребуются более детальные представления о сократительном механизме, чем те, которые заложены в основу данной схемы. Однако можно сделать вывод, что многие черты динамики мышечного сокращения могут быть поняты в рамках довольно грубой модели.

7.2. Экспериментальные исследования и расчет вынужденных колебаний длины поперечно-полосатых мышц

1. Исследование фазовых характеристик. Число устойчивых состояний миозинового мостика и их энергетическая структура — важнейшие характеристики цикла актомиозинового мостика в поперечно-полосатой мышце. Некоторую информацию по этому вопросу можно получить путем сравнения констант цикла, полученных из экспериментов, в которых сократительный аппарат работает при различных физико-химических условиях. С этой целью мы попытались сравнить поведение глицеринизированных и нативных мышц кролика при вынужденных колебаниях длины.

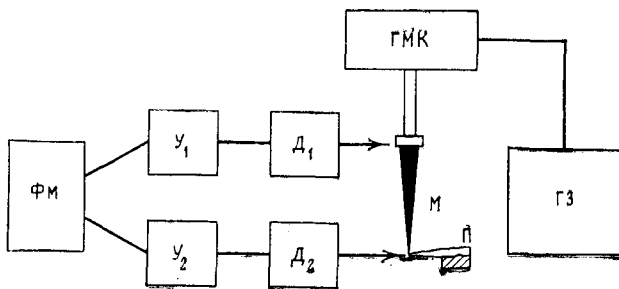
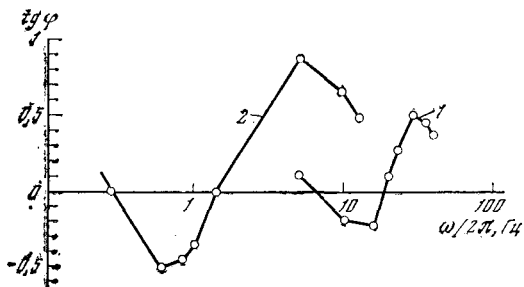


Рис. 25. Блок-схема установки для исследования фазово-частотных характеристик мышцы в режиме вынужденных периодических изменений длины M — мышца; ГМК — генератор механических колебаний; ГЗ — задающий генератор; D_1 — датчик смещения; D_2 — тензодатчик; $У_1, У_2$ — два канала усилителя УБП; ФМ — фазометр; П — пьезоэлемент

Рис. 26. Сдвиг фаз между натяжением и длиной при различных частотах вынужденных колебаний длины [9]

- 1 — портяжная мышца лягушки, амплитуда — 1% длины мышцы, 2° С, частота стимулирующих импульсов 30 имп/с;
- 2 — глицеринизированная т. psoas кролика, амплитуда 0,4% длины мышцы, 18° С, 5 ммоль АТФ, 5 ммоль $MgCl_2$, 90 ммоль KCl , рН 6,8, рСа 6,95



Эксперимент для нативной мышцы был поставлен следующим образом. На экспериментальной установке (рис. 25) измеряли сдвиг фаз между переменными составляющими изменения длины и натяжения при различных частотах вынужденных колебаний длины портяжной мышцы лягушки.

Для термостатирования мышцы, ее активации и регистрации изменения ее длины использовалась та же система, что и в эксперименте, описанном выше (см. предыдущий раздел). Мышца крепилась одним концом к неподвижному датчику силы (его описание см. там же), а другим — к генератору механических колебаний ГМК-1, позволявшему задавать выбранный режим изменений длины мышцы. Эти изменения с датчика смещения после усиления подавались на один из каналов фазометра Ф-2-1; второй канал служил для измерения силы, развиваемой мышцей. Форма и амплитуда изменений силы и длины регистрировались на энцефалографе одновременно с измерениями фазы. Фазово-частотная характеристика датчика силы была выбрана так, чтобы не вносить фазовых искажений в измеряемую величину. Нулем фазометра считали его показание в случае, когда на оба канала усилителя подавался сигнал с датчика смещения.

До начала стимуляции мышцы включался генератор механических колебаний; амплитуда его колебаний подбиралась такой, чтобы длина мышцы изме-

нялась по закону $L = L_0 (1 + 0,01 \sin \omega t)$, где L_0 — начальная длина, равная приблизительно длине покоя мышцы, ω — круговая частота.

Затем мышцу стимулировали и после развития изометрической силы регистрировали показания фазометра. На одной мышце проводили 12 измерений в диапазоне частот 5—60 Гц с интервалом 5 Гц, причем после каждого измерения, длившегося не более 5 с, мышце давали отдохнуть в течение ~ 3 мин.

Типичная кривая, наблюдавшаяся в такого рода экспериментах, приведена на рис. 26 (кривая 1).

Полученная фазово-частотная характеристика немонотонна, причем в области частот 5—25 Гц $\text{tg } \varphi$, где φ — сдвиг фазы между натяжением и длиной, становится отрицательным. Для исследуемой системы работа за цикл положительна при отрицательных значениях φ . Действительно, при достаточно малых амплитудах ΔL периодического изменения длины мышцы

$$L = L_0 \left[1 + \frac{\Delta L}{L_0} \sin(\omega t + \varphi_1) \right]$$

существуют линейные соотношения между длиной мышцы и развиваемой силой:

$$F = F_0 \left[1 + \frac{\Delta F}{F_0} \sin(\omega t + \varphi_2) \right].$$

В этом случае работа, совершаемая мышцей за период (работа положительна при укорочении мышцы):

$$\begin{aligned} A &= - \oint F dL = - \int_{t_0}^{t_0 + 2\pi/\omega} F \frac{dL}{dt} dt = \\ &= - \pi \Delta F \Delta L \sin(\varphi_2 - \varphi_1) = - \pi \Delta F \Delta L \sin \varphi. \end{aligned}$$

Следовательно, при $\varphi < 0$ работа $A > 0$. Знак $\text{tg } \varphi$ совпадает со знаком φ (при $-\pi/2 < \varphi < \pi/2$). Это означает, что фазово-частотная зависимость типа, показанного на рис. 26 (кривая 1), не может быть получена для чисто диссипативной системы.

Анализ показывает, что в режиме вынужденных колебаний длины поведение тетанически стимулируемой портняжной мышцы лягушки (рис. 26, кривая 1) аналогично поведению глицеринизированных волокон спинной мышцы кролика (рис. 26, кривая 2). На обеих зависимостях сдвиг фазы между натяжением и длиной в некотором диапазоне частот становится отрицательным, что соответствует отрицательному трению препарата. Кривые для глицеринизированных волокон и нативных мышц имеют одинаковую форму, хотя кривая для глицеринизированных волокон сдвинута в область более низких частот. Таким образом, можно надеяться, что в обоих случаях применима одна и та же математическая модель, хотя временные масштабы отличаются в 10 раз.

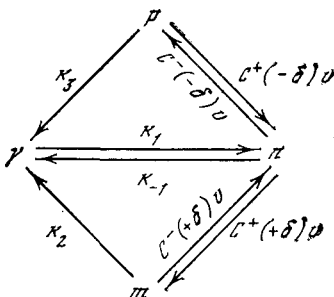
2. Расчеты вынужденных колебаний длины в кинетической модели. Итак, как интактные, так и глицеринизированные волокна

скелетных мышц в режиме вынужденных колебаний длины обла- дают в некотором диапазоне частот отрицательным трением (со- вершают положительную работу в цикле укорочение — растяже- ние) [7, 15, 181]. Такое поведение свойственно летательным мышцам насекомых [149], и приближенные расчеты в рамках кинети- ческой модели мышечного сокращения объясняют его (см. гла- ву 4). Однако при значениях параметров, характерных для ске- летных мышц, кинетическая модель не дает отрицательного тре- ния.

Здесь будет рассмотрена модификация модели, учитывающая процесс размыкания тянущих мостиков, ранее считавшийся мед- ленным, и позволяющая описать режим вынужденных колебаний длины скелетных мышц.

Рис. 27. Схема динамики мостиков в возбужденной мышце при ее укорочении и растяжении со скоростью v в терминах кинетической модели

Путь $C^+(\mp\delta)$ соответствует укорочению ($v > 0$); путь $C^-(\pm\delta)$ удлинению ($v < 0$)



Динамика мостиков в активированной мышце при ее укорочении и растяжении со скоростью v в рамках кинетической модели описывается схемой, приведенной на рис. 27. Свободные мостики γ с константой скорости k_1 замыкаются, превращаясь в тянущие мостики z , которые вследствие относительного движения актиновых и миозиновых нитей при укорочении ($v > 0$), дрейфуют в тормозящее состояние m , а при растяжении — в супертянущее состояние p , причем потоки мостиков равны соответственно $C^+(\delta)v$ и $C^-(\delta)v$, где δ — путь дрейфа, или шаг мостика, а $C^\pm(\pm\delta)$ — концентрации мостиков на границах тянущей зоны * ($-\delta, +\delta$) слева (C^+) и справа (C^-) от границ. Тянущий мостик развивает силу $+f$, тормозящий — силу $-f$, супертянущий — силу $+f_p$. Полное число мостиков линейно падает с укорочением саркомера l в диапазоне длин, в котором при вынужденных колебаниях длины наблюдается отрицательное трение: $\alpha(l) = \alpha_0(1 - l/l_0)$. Система уравнений, соответствующая схеме

* В этом разделе мы будем обозначать границы тянущей зоны $+\delta$ и $-\delta$. При растяжении мостики проходят тянущую зону в направлении к границе $-\delta$, при сокращении — в направлении к границе $+\delta$.

рис. 27, имеет следующий вид:

$$\begin{aligned} \frac{dn}{dt} &= k_1 \left[a_0 \left(1 - \frac{l}{l_0} \right) - n - m - p \right] - k_{-1}n + \\ &+ \left[C^\pm(-\delta) - C^\pm(+\delta) \right] v, \\ \frac{dm}{dt} &= C^\pm(+\delta)v - k_2m, \\ \frac{dp}{dt} &= -C^\pm(-\delta)v - k_3p, \end{aligned} \quad (7.1)$$

где m , n , p , как и раньше, — полное количество тянущих, тормозящих и супертянущих мостиков соответственно. Дополним систему (7.1) парой уравнений, задающих вынужденные колебания длины:

$$dv/dt = \omega^2 (l_0/2 - l), \quad dl/dt = v. \quad (7.2)$$

Для укорочения ($v > 0$) в системе берется $C^+(-\delta)$, для удлинения ($v < 0$) — $C^-(+\delta)$. В рамках рассматриваемой дискретной кинетической модели не существует точных выражений для $C^\pm(\pm\delta)$ — адекватно задача описывается системой уравнений в частных производных. Однако качественно, а в предельных случаях (для малых и больших частот ω и амплитуд d вынужденных колебаний длины) и количественно поведение модели можно проанализировать в рамках дискретной кинетической модели.

Граничные концентрации мостиков задаются в следующем виде:

$$\begin{aligned} C^+ (+\delta) &= C^- (-\delta) = (n/\delta) \theta(\omega d); & C^+ (-\delta) &= p/\delta; \\ C^- (+\delta) &= m/\delta, \end{aligned} \quad (7.3)$$

где $\theta(\omega d) \rightarrow 0$ при $\omega d \rightarrow 0$ и $\theta(\omega d) \rightarrow 1$ при $\omega d \rightarrow \infty$.

Появление параметра θ в выражениях для внутренних концентраций мостиков на границах тянущей зоны $(-\delta, +\delta)$ обусловлено тем, что источник тянущих мостиков сосредоточен в центре этой зоны и при медленном дрейфе они успевают разомкнуться, не достигнув границы. Для супертянущих и тормозящих мостиков источниками являются сами границы $\pm\delta$, и поэтому в выражениях для $C^+(-\delta)$ и $C^- (+\delta)$ множитель θ отсутствует.

Ранее была решена система уравнений, получающаяся из (7.1), (7.2) в предположении, что $k_{-1} = 0$, $k_3 = 0$, $\theta = 1$. Кроме того, при вычислении работы за период считалось, что $f_p = f$. Аналитическое решение в линейном приближении системы (7.1), (7.2), с условиями (7.3) дает следующее выражение для работы за период:

$$\begin{aligned} A &= \frac{\pi d^2 v}{4(\lambda^2 + v^2)} \left\{ \frac{v^2 [2\beta + (\theta/\lambda)(1 - \lambda - q)] + 2\beta q^2 - \theta(q + \lambda q + q^2)}{q^2 + v^2} + \right. \\ &+ \left. \frac{v^2 [2\beta + (\theta/\lambda)(\lambda - 1 - r\chi)] + 2\beta \chi^2 + \theta(\chi^2 + \chi - r\chi\lambda)}{\chi^2 + v^2} \right\}, \end{aligned} \quad (7.4)$$

где $v = \omega/k_1$, $\lambda = 1 + k_{-1}/k_1$, $\beta = 2\delta/l_0$, $q = k_2/k_1$, $\chi = k_3/k_1$, $r = f_p/f$.

Параметры k_2 , f , δ и k_1 оцениваются по зависимости стационарной скорости сокращения от нагрузки (см. главу 3): $k_2 = 150 \text{ с}^{-1}$, $f = 3 \cdot 10^{-7}$ дин, $\delta = 100 \text{ \AA}$ и k_1 меняется от 0 до 50 с^{-1} в зависимости от степени активации мышцы. Аналогичным образом определяются величины k_3 и r по двум особенностям зависимости стационарной скорости растяжения от нагрузки [153]: $k_3 = 5 \text{ с}^{-1}$ и $r = 2$. Оценка k_{-1} по скорости расслабления мышцы дает $k_{-1} = 7 \text{ с}^{-1}$ (см. раздел 6.2). Структурный параметр β характеризует крутизну зависимости $\alpha(l)$ на линейном участке.

Для летательных мышц насекомых $\beta \approx 1$, а для скелетных мышц позвоночных β не превышает 0,03. При столь малом β формула (7.4) дает $A > 0$ только при малых θ , т. е. в области низких частот с малой амплитудой. При $\theta = 1$, т. е. с ростом частоты и амплитуды вынужденных колебаний длины, работа за период становится отрицательной. Качественно такая зависимость $A(\theta)$ согласуется с экспериментальной. Однако в области очень низких частот в эксперименте (см. рис. 26) $\text{tg } \varphi$ вновь становится положительным, что соответствует отрицательной работе, совершаемой мышцей за период. Возможно, это связано с существованием механического трения в соединительной ткани мышцы, которое не учитывается в модели. Не исключено, однако, что на этих частотах начинают играть роль еще более медленные химические переменные.

7.3. Уточнение параметров кинетической модели

1. Необходимость уточнения констант. В предыдущем разделе мы уже обсуждали важное значение точного знания констант постулированного в кинетической модели механокинетического цикла мостика. Однако проведенная в предыдущих главах оценка параметров на основании анализа стационарных режимов дает абсолютные величины констант с малой точностью, поскольку при определении числа «активных» мостиков можно легко ошибиться в 3 раза. С хорошей точностью ($\sim 10\%$) определяются только комбинации констант, через которые выражены параметры уравнения Хилла. Правда, именно эти комбинации в основном определяют динамику поведения математической модели во всех исследованных выше режимах. Отсюда вытекают два следствия: во-первых, хорошая точность расчетов различных режимов сокращений; во-вторых, малая точность определения абсолютных величин констант при сопоставлении этих расчетов с экспериментальными данными.

Существуют резко нестационарные режимы сокращения (например, изотоническое сокращение после быстрого освобождения мышцы), динамика которых определяется комбинациями констант, не сводимыми к параметрам уравнения Хилла, что дает возможность получить абсолютные значения констант со значительно большей точностью. Однако экспериментальное исследова-

ние этих режимов осложняется маскирующим влиянием последовательной упругой компоненты мышцы.

Нами были подобраны специальные условия, позволившие исключить вклад пассивных элементов в процесс сокращения, и рассчитан наиболее информативный для определения абсолютных значений констант режим сокращения. Этому и будет посвящен следующий пункт.

2. Расчет наиболее информативного режима сокращения. Как показала оценка, наиболее информативным является режим сокращения без нагрузки после предварительного быстрого укорочения тетанически стимулируемой в изометрическом режиме мышцы.

В тех случаях, когда массой регистрирующей системы можно пренебречь, уравнение для зависимости скорости скольжения нитей от силы $f(n - m)$, развиваемой мышцей, величины нагрузки P и ее эффективной массы \mathcal{F}

$$\frac{dv}{dt} = \frac{1}{2N\mathcal{F}} [f(n - m) - P]$$

(см. уравнение (2.16) системы (2.14)–(2.17)) вырождается в алгебраическое соотношение

$$f(n - m) = P$$

и решение всей системы (2.14)–(2.17) может быть получено аналитически.

После замены переменных

$$n = \alpha_0 x; \quad m = \alpha_0 y; \quad v = k_1 \delta u; \quad t = \tau/k_1$$

система (2.14)–(2.16) запишется в виде

$$\dot{x} = 1 - x - y - ux,$$

$$\dot{y} = ux - qy,$$

$$\dot{y} = B(x - y - A),$$

$$\text{где } q = \frac{k_2}{k_1}, \quad A = \frac{P}{P_0}, \quad B = \frac{P_0}{\mathcal{F}} \frac{1}{2Nk_1^2 \delta}.$$

В случае пренебрежимо малой массы нагрузки последнее уравнение системы преобразуется в $x - y - A = 0$, тогда $\dot{x} = \dot{y}$ и безразмерную скорость u можно выразить через x :

$$u = \frac{1 + A(1 - q)}{2x} + \frac{q - 2}{2}.$$

Для x получается уравнение

$$\dot{x} = \frac{1 + A(q + 1)}{2} - \frac{q + 2}{2} x,$$

решая которое, имеем

$$x = x_0 e^{-\frac{q+2}{2} \tau} + \frac{1 + A(q+1)}{2+q} (1 - e^{-\frac{q+2}{2} \tau}),$$

где x_0 — начальное значение, задаваемое в эксперименте.

В случае быстрого укорочения находящейся в изометрическом тетанусе мышцы начальное значение x_0 равно

$$x_0 = 1/2 (1 + A).$$

Оно определяется из следующих соображений:

1) при изометрическом сокращении все мостики замкнуты и находятся в тянущем состоянии; полное число их равно единице. При быстром отпуске (достаточно быстром для того, чтобы мостики не успели разомкнуться) полное число замкнутых мостиков сохраняется, происходит лишь их перераспределение между тянущим и тормозящим состояниями, т. е. можно записать $x_0 + y_0 = 1$;

2) тянущее усилие определяется разностью между тянущими и тормозящими мостиками: $x_0 - y_0 = P/P_0 = A$.

Условия 1 и 2 совместимы лишь при

$$x_0 = 1/2 (1 + A).$$

Подставляя значение x в выражение для скорости сокращения и переходя к размерным переменным, получим

$$\frac{v}{v_{\max}} = \frac{q-2}{2q} + \frac{1-A(q-1)}{2qH}, \quad (7.5)$$

где

$$H = x_0 \exp \left\{ -\frac{2k_1 + k_2}{2} t \right\} + \frac{1 + A(q+1)}{2+q} \left(1 - \exp \left\{ -\frac{2k_1 + k_2}{2} t \right\} \right),$$

при этом для начальной скорости сокращения имеем

$$\frac{v}{v_{\max}} \Big|_{t=0} = \frac{q-2 + [1-A(q-1)]/x_0}{2q}$$

и для стационарной аналогично

$$\frac{v_{\text{стац}}}{v_{\max}} = \frac{v}{v_{\max}} \Big|_{t \rightarrow \infty} = \frac{1-A}{1+A(q+1)}, \quad (7.6)$$

т. е. при сокращении без нагрузки $v_{\text{стац}} = v_{\max} = k_2 \delta$ (см. раздел 3.1).

Ожидаемая кривая изменения длины после сброса нагрузки показана на рис. 28. Удобным экспериментальным параметром для определения показателя степени в экспоненте (требуемого для вычисления констант)

$$k = -(2k_1 + k_2)/2$$

является Δt (см. рис. 28), т. е. разность времен выхода на неко-

торое укорочение $l(t_1)$ при сокращениях со скоростью v , определенной выше формулой (7.5), и со стационарной скоростью (7.6). Для удобства представим (7.5) в виде

$$\frac{v}{v_{\max}} = Q + \frac{D}{B + (C - B)e^{kt}},$$

где значения коэффициентов B , C , D и Q очевидны. Заметим,

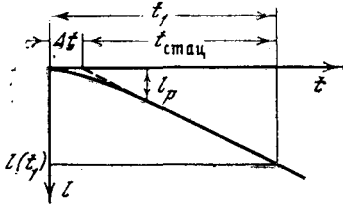


Рис. 28. Приближение к стационарной скорости изотонического сокращения после быстрого освобождения тетанически стимулируемой мышцы (теоретическая кривая)

что выражение для стационарной скорости сокращения при этом

$$v_{\text{стац}}/v_{\max} = Q + D/B. \quad (7.7)$$

Определим l для некоторого времени t_1 :

$$l(t_1) = \int_0^{t_1} v dt = v_{\max} \left[Qt_1 + D \frac{t_1}{B} - \frac{D}{kB} \ln \frac{B + (C - B)e^{kt_1}}{C} \right].$$

Так как при достаточно большом t_1 членом $(C - B)e^{kt_1}$ можно пренебречь, получим

$$l(t_1) = v_{\max} \left[Qt_1 + \frac{D}{B} t_1 - \frac{D}{kB} \ln \frac{B}{C} \right].$$

Время, требуемое для такого же укорочения со стационарной скоростью $v_{\text{стац}}$, равно

$$t_{\text{стац}} = \frac{l(t_1)}{v_{\text{стац}}} = \frac{v_{\max}}{v_{\text{стац}}} t_1 \left(Q + \frac{D}{B} \right) - \frac{v_{\max}}{v_{\text{стац}}} \frac{D}{kB} \ln \frac{B}{C},$$

следовательно, с учетом (7.7)

$$\Delta t = t_1 - t_{\text{стац}} = - \frac{v_{\max}}{v_{\text{стац}}} \frac{D}{kB} \ln \frac{C}{B}.$$

Расшифровывая значения параметров B , C и D и подставляя вместо k его значение, получим

$$\Delta t = \frac{1 - A(q - 1)}{k_2(1 - A)} \ln \left\{ 1 + \frac{q(1 - A)}{2[1 + A(q + 1)]} \right\}.$$

Если нагрузка сбрасывается от P_0 до 0, т. е. $A = P/P_0 = 0$, то начальная скорость вдвое меньше стационарной; при этом лаг-период Δt^0 и укорочение до выхода на стационарный режим l_p^0

связаны с константами k_1 и δ простыми соотношениями

$$\Delta t^0 = \frac{1}{k_2} \ln \left(1 + \frac{q}{2} \right) \quad \text{и} \quad l_p^0 = \delta \ln \left(1 + \frac{q}{2} \right),$$

где $v_{\max} = k_2 \delta$, а значение $q = k_2/k_1$ может быть определено по зависимости стационарной скорости от нагрузки ($q = 2 \div 3$) (одно-кратное изменение этого параметра слабо влияет на Δt^0 и l_p^0).

3. Экспериментальные данные и уточнение констант. Тщательное экспериментальное исследование переходных режимов после ступенчатого изменения нагрузки выполнено Подольским с коллегами [120]. Однако применявшаяся ими методика не позволяла исследовать динамику укорочения мышцы после сброса нагрузки от P_0 до величин, меньших $0,2 P_0$. В этих условиях становится существенной масса самой мышцы и начальная фаза сокращения осуществляется за счет высвобождения энергии, запасенной в последовательной упругой компоненте во время изометрического сокращения.

Нами [14, 30] был исследован такой режим сокращения, в котором, по-видимому, возможно исключить вклад пассивных элементов в процессе сокращения. Особенностью этого режима является то, что находящаяся в состоянии изометрического напряжения мышца непосредственно перед освобождением и переходом к сокращению подвергается небольшому предварительному укорочению. Эксперимент был поставлен следующим образом. Тетанически стимулируемая и развившая максимальное напряжение мышца с помощью реле укорачивалась на 2—3% за 1 мс, так что напряжение падало до 0. Спустя еще 1 мс другой конец мышцы освобождался и регистрировалось его смещение. При такой постановке эксперимента в первые две миллисекунды «гасится» потенциальная энергия, запасенная в упругих элементах мышцы и регистрирующей системы во время изометрического сокращения. Поэтому укорочение мышцы в последующие моменты времени обусловлено укорочением сократительного аппарата в чистом виде.

Была изготовлена установка (рис. 29), позволяющая задавать необходимые начальные условия сокращения и регистрировать зависимость изменения длины мышцы от времени. Описание системы термостатирования мышцы, ее активации, регистрации ее длины и развиваемой ею силы приведено выше (см. раздел 7.1). Один конец мышцы крепился к Т-образному рычагу, который был связан с датчиком изменения длины мышцы. Второй конец крепился к якорю поляризованного реле, амплитуда смещения которого регулировалась. Начальная длина мышцы фиксировалась стопором, к которому тонкой медной проволокой прикреплялся вертикальный конец Т-образного рычага. Ступенчатое укорочение мышцы производилось смещением якоря реле. Положение стопора подбиралось таким образом, чтобы длина мышцы равнялась ее длине *in situ*. После этого на стимулирующие электроды подавалось напряжение, и мышца развивала изометрическую силу. Затем на якорь реле

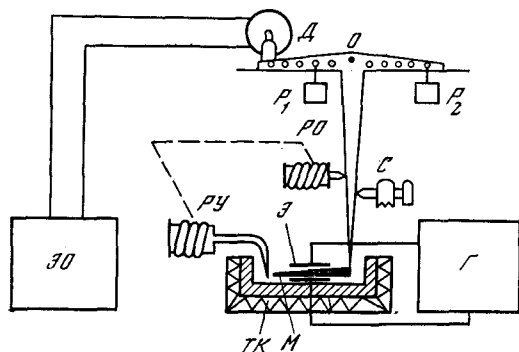


Рис. 29. Блок-схема установки для наблюдения кинетики установления постоянной скорости укорочения при сокращении без нагрузки после ступенчатого изменения длины мышцы

- М — мышца;
- ТК — термостатированная катушка;
- Э — стимулирующие электроды;
- Г — генератор прямоугольных импульсов;
- О — ось Т-образного рычага;
- Д — датчик смещения;
- ЭО — осциллограф;
- РУ — реле укорочения;
- РО — освобождающее реле;
- С — стопор

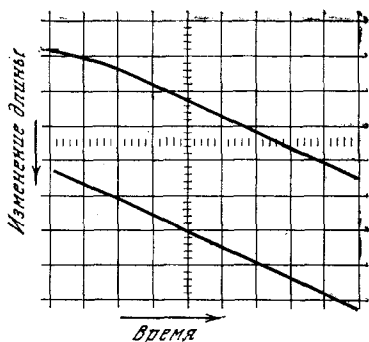


Рис. 30. Укорочение мышцы, освобожденной через 1 мс после ступенчатого укорочения (на $\sim 2\%$ за 1 мс)

Деление по ординате соответствует 0,3% длины мышцы; деление по абсциссе — 3 мс; портняжная мышца лягушки; $L_0 = 31$ мм, 2°C , 30 имп/с. Нижняя кривая является продолжением верхней

подавалось напряжение, вызывавшее смещение якоря. Амплитуда смещения регулировалась так, чтобы вынужденное изменение длины составляло $\sim 2\%$ длины мышцы. Время смещения якоря 1—2 мс. В момент окончания движения якоря на проволоку, удерживающую Т-образный рычаг, подавался импульс тока, перекигавший ее. Этим же импульсом запускался развертка осциллографа. Время между остановкой конца мышцы, связанного с якорем, и полным освобождением Т-образного рычага не превышало 1 мс. После каждого сокращения мышце давали отдохнуть в течение 3—5 мин.

Фотография полученной нами на экране осциллографа зависимости изменения длины мышцы от времени в рассмотренном режиме сокращения показана на рис. 30. Видно, что экспериментальная кривая совпадает по форме с теоретической (см. рис. 28), что дает возможность определить значения параметров.

Характерное время Δt^0 , полученное для разных мышц, колеблется в пределах 3,5—4,5 мс; $l_p^0 = 0,5\%$ от длины полусаркомера, откуда при $q = 3$ получаем $k_2 = 200 \div 250 \text{ с}^{-1}$; $k_1 = 65 \div 85 \text{ с}^{-1}$ и $\delta = 80 \text{ \AA}$. Последний параметр независимо может быть определен из соотношения $k_2\delta = v_{\text{стац}}$, откуда $\delta = 60 \div 75 \text{ \AA}$, что удовлетворительно согласуется с предыдущей оценкой.

7.4. Расчет характеристик замкнутого мостика по динамике развития силы после быстрого укорочения

К 1970 г. Хаксли и Симмонс [134, 136] смогли исследовать переходные процессы в экспериментах по быстрому контролируемому укорочению мышцы с временным разрешением лучше 10^{-3} с. Это привело к открытию связанной с замкнутыми мостиками демпфированной упругой компоненты. Представляется интересным попытаться, используя данные Хаксли и Симмонса, определить параметры замкнутого мостика — его шаг δ и силовую характеристику — и сравнить результаты с оценками, полученными в кинетической модели ранее.

Динамика изменения силы после быстрого контролируемого укорочения, по данным Хаксли и Симмонса, состоит из трех стадий, характерные времена которых различаются примерно на порядок (рис. 31).

I. Во время «скачкообразного» укорочения мышцы на величину $\sim 1\%$ за доли миллисекунды сила линейно во времени уменьшается, причем конечная амплитуда падения силы пропорциональна укорочению.

II. После окончания укорочения наблюдается фаза частичного восстановления силы, происходящего экспоненциально с постоянной времени ~ 1 мс. Это тоже быстрая стадия; она занимает несколько миллисекунд.

III. Затем в течение десятков миллисекунд идет медленный S-образный рост силы до исходного уровня.

Если оценки констант в кинетической модели верны по порядку величины, то во время первой и второй стадий замыканием и размыканием мостиков можно пренебречь. Вязкоупругие свойства саркомера на этих малых временах могут быть представлены реологической схемой. (Кинетическая модель работает на более медленных стадиях. Справедливость такого разделения на быстрые и медленные фазы мы обсудим ниже.)

Реологические модели применяются для моделирования вязкоупругих свойств мышцы очень давно. Так, в 1922 г. Хилл [128] использовал в качестве модели пружину, работающую в вязкой среде. Позже опыты Гассера и Хилла [119] с быстрым контролируемым укорочением мышцы (см. раздел 3.5) показали необходимость дополнения схемы недемпфированной упругой компонентой, что и было сделано в модели Леви и Уимена [156]. После опытов Фенна [114, 115], обнаружившего, что потребление мышцей энергии зависит от совершаемой работы, стало ясно, что мышцу нельзя рассматривать как чисто пассивную механическую систему. В реологическую модель был включен активный элемент.

Модель, которую мы будем использовать здесь (см. рис. 32, а), аналогична модели Леви и Уимена, дополненной активным элементом. В схеме имеются два упругих элемента, один из которых задемпфирован некоторой вязкостью.

Поведение мышечного волокна в ответ на быстрое контролируемое укорочение в рамках данной схемы объясняется следующим образом. В первой стадии укорочения волокна происходит очень быстро, так что длина правой компоненты практически не изменится (иными словами, актиновые и миозиновые нити не успевают сместиться друг относительно друга) из-за наличия вязкого сопротивления и происходит только укорочение предварительно растянутого левого упругого элемента. При этом на концах системы мы зарегистрируем в конце первой стадии падение силы, которое будет пропорционально укорочению, и коэффициент пропорциональности равен коэффициенту упругости левой пружины.

Если теперь снова зафиксировать конец волокна, то регистрируемая на концах сила будет изменяться (вторая стадия) следующим образом: правый элемент начнет постепенно укорачиваться,

Рис. 31. Изменения силы в экспериментах по быстрому укорочению мышечного волокна [134]

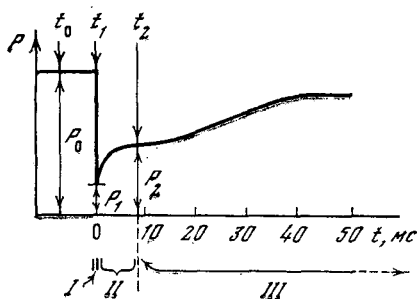


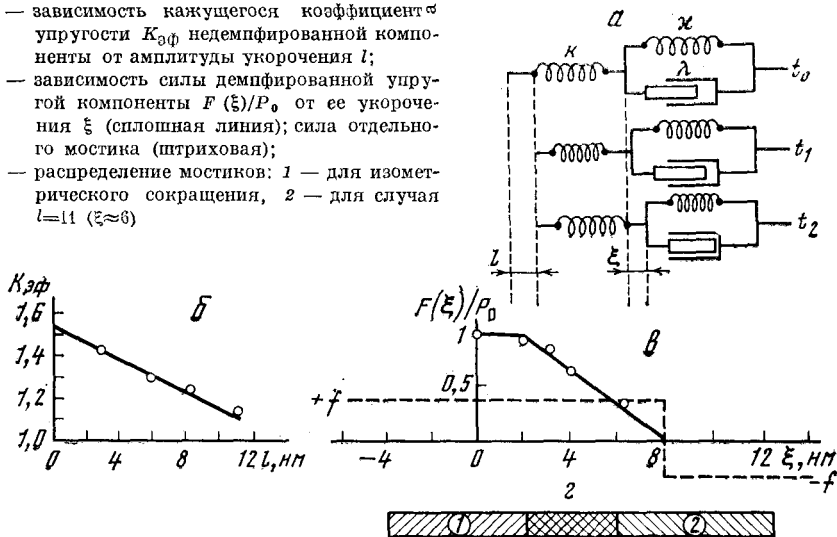
Рис. 32. Переходные процессы после быстрого контролируемого укорочения мышцы

а — эквивалентные схемы вязкоупругих свойств половины саркомера во время быстрых фаз переходного процесса; схемы t_0 , t_1 и t_2 иллюстрируют распределение укорочения l между демпфированной κ и недемпфированной k упругостями в моменты времени, соответствующие t_0 , t_1 и t_2 , указанным на рис. 31;

б — зависимость кажущегося коэффициент α упругости $K_{эф}$ недемпфированной компоненты от амплитуды укорочения l ;

в — зависимость силы демпфированной упругой компоненты $F(\xi)/P_0$ от ее укорочения ξ (сплошная линия); сила отдельного мостика (штриховая);

г — распределение мостиков: 1 — для изометрического сокращения, 2 — для случая $l=11$ ($\xi \approx 6$)



так как правая пружина как бы «помнит» силу, бывшую до укорочения. Укорочение правого элемента будет происходить до тех пор, пока силы, развиваемые обеими пружинами, не уравняются. В терминах кинетической модели эту стадию можно описать таким образом: происходит скольжение нитей без размыкания поперечных мостиков, обусловленное неравновесным распределением последних между тянущим и тормозящим состояниями. При этом растягивается последовательная (недемпфированная) упругость и развиваемая сила растет, а часть мостиков переходит из тянущего в тормозящее состояние. Скольжение нитей в этой фазе прекращается, когда упругая сила последовательной компоненты и сумма сил замкнутых мостиков выравниваются.

II, наконец, третья стадия — это уже стадия перезамыкания мостиков, вызывающего дальнейшее скольжение нитей и восстановление силы до изометрической, соответствующей новой длине.

Мы не будем сейчас конкретизировать локализацию компонент реологической схемы в саркомере и природу сил демпфирования (см. об этом в главе 8). Попытаемся по данным Хаксли [134] определить зависимость длина — натяжение в быстрых стадиях отдельно для недемпфированной и демпфированной упругих компонент. Параметры опубликованных в этой работе четырех кривых, характеризующие динамику изменения силы в экспериментах по быстрому контролируемому укорочению, приведены в табл. 1, где l — амплитуда укорочения, пересчитанная на половину саркомера; смысл P_0 , P_1 и P_2 ясен из рис. 31.

Таблица 1

l , нм	0	3,0	5,5	7,5	11,0
P_0 , кг/см ²	1,73	1,73	1,68	1,68	1,60
P_1 , кг/см ²	1,73	1,17	0,80	0,52	0,17
P_2 , кг/см ²	1,73	1,60	1,29	1,00	0,60

Так как во время первых двух стадий не происходит перезамыкания мостиков, упругие элементы будем считать чисто гукоскими пружинами.

Оценим коэффициент упругости левой пружины. Как ясно из вышеизложенного, он должен быть равен

$$k_{эф} = (P_0 - P_1)/l.$$

Нормируя $k_{эф}$ на P_0 и относя его к проценту укорочения, получим

$$K_{эф} = \frac{k_{эф} \cdot 0,5s}{P_0 \cdot 100} = \frac{(P_0 - P_1) \cdot 0,5s}{P_0 l \cdot 100},$$

где $s = 2,7 \cdot 10^3$ нм — длина саркомера. Как видно из рис. 32, б,

$K_{\text{эф}}$ линейно уменьшается с ростом амплитуды укорочения l . Можно предположить, что истинный коэффициент упругости k не зависит от l , а наблюдаемая зависимость обусловлена частичным укорочением демпфированной компоненты за время вынужденного изменения длины волокна, т. е. на стадии I (см. рис. 31). Рассчитаем истинные укорочения на этой стадии. Вязкоупругие свойства половины саркомера, представленные схемой на рис. 32, a , описываются следующим уравнением:

$$F(\xi) - \lambda \dot{\xi} = P_0 - k(l_t - \xi), \quad (7.8)$$

где l_t — укорочение половины саркомера в ходе стадии I к моменту времени t ; k — истинный коэффициент упругости недемпфированной упругой компоненты; $F(\xi)$ — сила, развиваемая демпфированной упругой компонентой; λ — коэффициент вязкости демпфирующего элемента.

Поскольку за время вынужденного укорочения длина демпфированной компоненты меняется незначительно, можно считать, что

$$F(\xi) = P_0 - \kappa \xi,$$

где κ — коэффициент упругости демпфированной упругой компоненты. Тогда (7.8) переписывается в виде

$$\lambda \dot{\xi} + \kappa \xi = k(l_t - \xi). \quad (7.9)$$

Учитывая далее, что в опытах Хаксли

$$l_t = vt, \quad (7.10)$$

где $v = 2 \cdot 10^{-3}$ см/с, можно решить уравнение (7.9) и затем получить выражение для зависящего от укорочения демпфированной упругой компоненты в ходе стадии I от укорочения половины саркомера l_t :

$$\xi = l_t \frac{\tau}{\tau_0} - \frac{v\tau^2}{\tau_0} \left(1 - e^{-l_t/v\tau}\right),$$

где $\tau_0 = \lambda/k$, $\tau = \lambda/(k + \kappa)$. В конце стадии I укорочение половины саркомера l_t равно l . В этом случае амплитуду уменьшения силы можно записать следующим образом:

$$P_0 - P_1 = k(l - \xi) = kl \left(1 - \frac{\tau}{\tau_0}\right) + kv \frac{\tau^2}{\tau_0} \left(1 - e^{-l/v\tau}\right).$$

Так как в обсуждаемых опытах $l \ll v\tau$, то, разлагая экспоненту в ряд, получим

$$P_0 - P_1 \approx kl \left(1 - \frac{l}{2v\tau_0}\right).$$

Отсюда эффективный коэффициент упругости недемпфированной

компоненты

$$k_{эф} = \frac{P_0 - P_1}{l} = k \left(1 - \frac{l}{2v\tau_0} \right), \quad (7.11)$$

или в единицах P_0 на процент укорочения волокна

$$K_{эф} = \frac{(P_0 - P_1) 0,5s}{P_0 l \cdot 100} = \frac{ks}{200P_0} \left(1 - \frac{l}{2v\tau_0} \right). \quad (7.12)$$

Сопоставляя выражение (7.12) с графиком на рис. 32, б, можно оценить истинный коэффициент упругости недемпфированной компоненты k , время релаксации τ_0 и коэффициент вязкости λ :

$$k = 1,5P_0 \frac{\text{кг/см}^2}{\text{проц}} = 0,111P_0 \frac{\text{кг/см}^2}{\text{мм}}, \quad \tau_0 = 10^{-3}\text{с}$$

$$\text{и } \lambda = 1,5 \cdot 10^{-3} P_0 \frac{\text{кг/см}^2}{\text{проц/с}} = 0,11 \cdot 10^{-3} P_0 \frac{\text{кг/см}^2}{\text{мм/с}}.$$

Оценка времени релаксации по фазе восстановления силы после прекращения вынужденного укорочения согласуется с приведенным выше значением τ_0 .

После того, как определен истинный коэффициент упругости недемпфированной компоненты, не представляет труда определить истинное укорочение демпфированного элемента в конце стадии II (см. рис. 31):

$$\xi = l - (P_0 - P_2)/k \quad (7.13)$$

и построить зависимость развиваемой этим элементом силы от его укорочения $F(\xi) = P_2(\xi)$ в относительных единицах. Эта зависимость изображена на рис. 32, в. Она может быть объяснена в рамках кинетической модели движением прямоугольного распределения мостиков из положения 1 в положение 2 по ξ (см. рис. 32, г). Из этой зависимости следует, что на значительном интервале смещения сила индивидуального мостика постоянна, как и предполагалось в кинетической модели (см. главу 2). Длина тянущей зоны, определенная таким способом, равна 80 Å.

Проведенная выше оценка справедлива, если для данного случая при полученных значениях параметров λ и k и при определенных ранее значениях констант скоростей замыкания и размыкания мостиков решение кинетических уравнений действительно будет разделяться на быстрые и медленные фазы. Проверим, так ли это.

Если пренебречь массой мышцы и регистрирующей системы и учесть «вязкое сопротивление» движению мостиков и последовательную упругую компоненту, не конкретизируя их природу и локализацию, то вместо уравнения (2.16) в систему уравнений кинетической модели для сокращающейся мышцы (2.14)–(2.17) (см. раздел 2.4) следует записать

$$v_{\xi} = \frac{1}{\lambda} [P_0 - k(l_l - \xi) - f(n - m)], \quad (7.14)$$

где

$$\xi = \int_0^t v_z dt \quad \text{и} \quad l_t = \begin{cases} vt & \text{при } t \leq l/v, \\ l & \text{при } t > l/v. \end{cases}$$

Численные решения полученной системы уравнений при начальных условиях $n(0) = \alpha$, $m(0) = \xi(0) = 0$ для различных амплитуд укорочения l приведены на рис. 33 (на рисунке построено решение системы только для времен ≤ 10 мс). При расчетах использованы значения параметров v , k и λ из предыдущей оценки. Очевидно, что в расчетных кривых так же, как в экспериментальных, легко может быть вычленена фаза быстрых изменений напряжения мышцы.

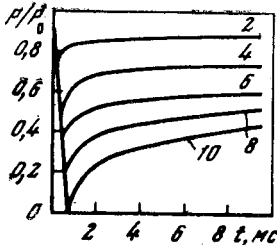


Рис. 33. Расчетные кривые изменения силы во время и после ступенчатого укорочения мышцы для различных амплитуд укорочения

Величины амплитуд укорочения в нанометрах указаны возле кривых

Обсудим физическую интерпретацию полученных результатов. Если предполагать, что мостики работают без трения, безынерционно, т. е. конформационные перестройки происходят мгновенно, то трение можно было бы приписать, например, трению саркоплазмы о нити, а последовательную упругость k можно было бы ввести как элемент, дополнительный к саркомеру (допустив, например, что Z-мембрана, находящаяся между саркомерами, может упруго деформироваться). Однако в 1971 г. Хаксли и Симмонс [137] получили результаты, которые полностью исключают такое объяснение. Они повторили свои опыты при разных исходных длинах саркомера. При этом оказалось, что величина исходной силы, величина скачка силы, как и величина промежуточной силы в конце второй стадии, уменьшаются пропорционально степени перекрытия нитей, но временные характеристики процесса остаются неизменными. Это означает, что все характеристики, получаемые из экспериментов по быстрому контролируемому укорочению, следует относить к замкнутым мостикам.

ПЕРСПЕКТИВЫ ТЕОРЕТИЧЕСКОГО ПОДХОДА К ПРОБЛЕМАМ МЫШЕЧНОГО СОКРАЩЕНИЯ

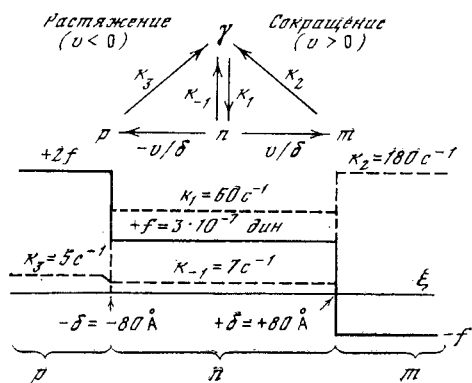
8.1. Основные достижения кинетической теории сокращения

Еще раз кратко сформулируем основные положения кинетической теории мышечного сокращения, а затем сопоставим ее с некоторыми другими теоретическими работами.

Состояния поперечных миозиновых мостиков в активированной мышце можно адекватно описать двумя типами переменных: дискретными и непрерывными. Дискретные переменные характеризуют взаимодействие миозина с актином, АТФ, АДФ и т. д., т. е. различные «химические» состояния поперечного мостика. В то же время его механическое состояние, например угловое положение и расстояние до актинового центра, описывается непрерывными переменными. Как мы могли видеть, при таком механохимическом подходе к выбору характеристических переменных общая кинетическая теория сокращения поперечно-полосатой мышцы (см. главу 2) формулируется в виде системы дифференциальных уравнений в частных производных для функций распределения мостиков каждого «химического» типа по механическим состояниям.

Для того чтобы провести анализ такой системы уравнений, необходимо ввести некоторые дополнительные предположения, конкретизирующие число существенных «химических» состояний мостика, а также зависимости констант скоростей переходов и сил, развиваемых поперечным мостиком в каждом состоянии, от механических переменных. Число параметров, возникающих в этом случае, пропорционально числу постулированных существенных состояний. Согласно теории с имеющимися экспериментальными данными будет представлять небольшую ценность, если теория имеет большое число подгоняемых параметров; следовательно, простота модели является важным критерием первоначального выбора существенных состояний.

Хорошо известную модель Хаксли [133] можно рассматривать как первую такого рода попытку подхода к описанию сократительных свойств мышцы. В 1957 г. Хаксли [133] предложил математическое описание гипотезы скользящих нитей и показал, что его модель находится в качественном согласии с известными динамическими и энергетическими свойствами поперечно-полосатых мышц, выражаемыми уравнениями Хилла. Позже появилось несколько модификаций этой модели, позволивших при соответствующем подборе параметров описать одиночное изометрическое сокращение [151], автоколебания летательных мышц насекомых



k_1 — константа скорости замыкания поперечного мостика;
 k_{-1}, k_2 и k_3 — константы скоростей размыкания тянущих, тормозящих и супертянущих мостиков соответственно;
 f — сила мостика;
 v — скорость относительного скольжения толстой и тонкой нитей (скорость укорочения половины саркомера);
 δ — «шаг» мостика — средний интервал перемещения мостика после замыкания, на котором он развивает тянущую силу $+f$

Рис. 34. Элементарный цикл поперечного мостика и зависимость силы мостика (сплошная линия) и констант скоростей переходов между существенными состояниями цикла (штриховые) от смещения мостика ξ из положения наиболее вероятного замыкания (из равновесного положения свободного мостика)

[151, 189] и переходные режимы сокращения после ступенчатого уменьшения нагрузки [174, 175]. При этом оказалось, что для описания различных режимов сокращения приходится вводить новые параметры и предполагать разные значения параметров модели, характеризующих силовые свойства замкнутого поперечного мостика и константы скоростей замыкания и размыкания мостиков. Поэтому актуальным является вопрос, возможно ли описание стационарных и нестационарных режимов сокращения в рамках одной модели с помощью единственного набора параметров.

Изложенная в предыдущих главах кинетическая модель сокращения поперечно-полосатой мышцы отличается от схемы Хаксли исходными предположениями и более простым математическим анализом. Ее основные положения были сформулированы в 1968 г. [22] как «газовая» модель мышечного сокращения. В ней постулируется, что имеются два существенных «химических» состояния миозинового поперечного мостика — свободное и замкнутое — и два существенных «механических» состояния замкнутого мостика — тянущее и тормозящее. В первом (тянущем) состоянии замкнутый мостик развивает постоянную положительную силу $+f$, во втором — постоянную отрицательную силу $-f$. Переход из первого состояния во второе происходит, когда нить после момента образования мостика продвинется на расстояние δ в положительном направлении. В тянущем состоянии вероятность размыкания мостика низка, в тормозящем — во много раз выше. После смещения замкнутого мостика в отрицательном направлении он переходит в супертянущее состояние. Схема элементарного цикла, силовая характеристика замкнутого мостика и константы скоростей замыкания и размыкания приведены на рис. 34.

Уравнения модели имели следующий вид для сокращения мышцы:

$$\frac{dn}{dt} = k_1(\alpha - n - m) - \frac{v}{\delta}n, \quad (8.1)$$

$$\frac{dm}{dt} = \frac{v}{\delta}n - k_2m, \quad (8.2)$$

$$\frac{dv}{dt} = \frac{1}{2N\mathcal{F}}[f(n - m) - P], \quad (8.3)$$

и для ее растяжения:

$$\frac{dn}{dt} = k_1(\alpha - n - p) + \frac{v}{\delta}n, \quad (8.4)$$

$$\frac{dp}{dt} = -\frac{v}{\delta}n - k_3p, \quad (8.5)$$

$$\frac{dv}{dt} = \frac{1}{2N\mathcal{F}}[f(n + 2p) - P]. \quad (8.6)$$

Кинетические уравнения (8.1), (8.2) и (8.4), (8.5) описывают переходы мостиков между различными состояниями. Сила мышцы выражается как $f(n - m)$. Уравнения (8.3) и (8.6) описывают движение нагрузки P , обладающей эффективной инерционной массой \mathcal{F} . Следует отметить, что эффективная константа скорости перехода мостиков из тянущего состояния в тормозящее имеет механическую природу и выражается как отношение скорости скольжения нитей v к среднему интервалу перемещения мостика δ , на котором он развивает положительную силу $+f$.

В случае сокращающейся мышцы приток мостиков в тянущее состояние описывается членом $k_1(\alpha - n - m)$ (см. уравнение (8.1)), что справедливо, если все свободные мостики имеют одинаковую вероятность замыкания. В уравнении (8.1) не учитывается размыкание тянущих мостиков, поскольку константа k_{-1} , которая может быть оценена по спаду напряжения во время расслабления мышцы (см. раздел 6.2), мала по сравнению с k_1 в том случае, если мышца полностью активирована.

Таким образом, кинетические уравнения (8.1)—(8.6) описывают весьма грубую модель поведения мостиков в поперечно-полосатой мышце. Однако в предыдущих главах было показано, что известные сократительные свойства могут быть количественно интерпретированы в ее рамках. Параметры модели определяются однозначно по небольшому числу экспериментальных данных и различные режимы мышечного сокращения описываются с помощью одного набора параметров.

Действительно, кинетическая модель дает описание тетанического сокращения мышцы при различных условиях. Характеристическое и энергетическое уравнения Хилла и его данные о скорости теплопродукции следуют автоматически из стационарного решения системы уравнений (8.1)—(8.6) (см. раздел 3.1).

Расчетные скорости развития силы и ее восстановления после быстрого укорочения совпадают с экспериментальными данными, полученными с временным разрешением ~ 5 мс (см. раздел 3.5). Модель дает аналитически механическую энергопродукцию летательных мышц насекомых и скелетных мышц позвоночных при вынужденных колебаниях длины, и результаты расчетов вполне согласуются с экспериментальными данными (см. главу 4). Теория предсказывает колебательный переходный режим после изменения нагрузки. Эти колебания были зарегистрированы нами в условиях, рассчитанных теоретически. Наблюдавшиеся в экспериментах колебания с возрастающей амплитудой, а также двухчастотные колебания были объяснены в рамках теории после некоторого ее уточнения. При этом различные способы определения параметров кинетической модели по динамике сокращения мышцы в разных условиях дают близкие значения. Это позволяет считать, что данная модель отражает в значительной мере реальные процессы, происходящие при сокращении поперечно-полосатых мышц.

8.2. Возможные направления дальнейшего развития теории

До недавнего времени казалось, что все режимы сокращения поперечно-полосатых мышц могут быть описаны кинетической моделью. Действительно, модель хорошо работала на временах от ~ 10 мс до нескольких секунд. Однако в 1970—1971 гг. Хаксли и Симмонс провели эксперименты (см. раздел 7.4) с временным разрешением порядка 1 мс. Оказалось, что без введения дополнительных предположений в рамках кинетической модели результаты этих экспериментов объяснить нельзя. Чем это может быть обусловлено? Рассмотрим этот вопрос подробнее.

Дело в том, что в кинетической модели, как и во всех моделях такого типа, включая модель Хаксли, содержится неявное предположение о том, что сила, которую развивает элементарный мостик в определенной стадии цикла (например, тянущие мостики в кинетической модели), не зависит от скорости скольжения питей друг относительно друга. Мы предполагаем таким образом, что процесс конформационных перестроек мостика в тянущем состоянии, благодаря которому развивается сила, является квазиравновесным процессом, т. е. при тех скоростях скольжения, которые возможны в мышце при описанных режимах, мостики еще остаются распределенными равномерно между несколькими возможными конформационными состояниями. Однако, когда мы начинаем исследовать процесс сокращения мышцы со все большим временным разрешением, мы должны вводить все большее число промежуточных состояний. Те состояния, которые мы раньше могли описывать как одно, поскольку процесс

установления равновесия между ними происходил достаточно быстро по сравнению с переходом из них в другие состояния, теперь уже так описывать нельзя, потому что распределение мостиков в нем становится неравновесным.

Для объяснения поведения мышцы на столь малых временах приходится вводить в кинетическую модель новые предположения. (В разделе 7.4 было рассмотрено одно из возможных объяснений поведения мышцы в быстрых фазах нестационарного режима на основании реологической схемы.) Совершенно ясно, что это не изменит выводов, полученных ранее для стационарных и близких к стационарным режимов — поведение модели на малых временах всегда можно анализировать отдельно от поведения на больших временах.

В случае стационарного процесса среднее растяжение последовательной упругости мостика постоянно при данной нагрузке: она растянута, и нити движутся с такой скоростью, что длина ее не меняется, мостик успевает отслеживать. Конечно, все время происходят флуктуационные колебания, но все усредняется, так что мы можем с полным основанием применять кинетическую модель. Это позволяет рассматривать предложенную кинетическую схему как первое приближение к молекулярной природе элементарного сократительного цикла. В связи с этим возникают вопросы: возможно ли дальнейшее упрощение модели в рамках рассматриваемой схемы и какова связь постулированных существенных состояний мостика с его действительными молекулярными переходами в активной мышце.

Трудно сомневаться в том, что как свободное, так и замкнутое состояния мостика действительно существуют в активной мышце и являются существенными для ее механического поведения. Следовательно, чтобы упростить модель, можно попробовать рассматривать лишь одно существенное состояние у замкнутого мостика вместо двух. Модель такого типа была предложена Чапленом и Фроммельтом [93]. В этой модели замкнутый мостик развивает только положительную силу, величина которой линейно уменьшается с ростом скорости сокращения и равна нулю при ненагруженном сокращении. Мостик размыкается после смещения на расстояние δ , так что одна из констант скоростей в этой модели имеет механическую природу и выражается точно так же, как константа скорости перехода из тянущего состояния в тормозящее в кинетической модели. Чаплен и Фроммельт показали, что их модель хорошо описывает энерго- и теплопродукцию мышцы при сокращении с постоянной скоростью. Подобная модель была независимо исследована Буравцевым в 1972 г. [98]. Он получил аналитические решения для стационарного и переходного режимов и для изменения силы при вынужденных колебаниях длины. Оказалось, что такая «редуцированная» модель описывает примерно тот же набор экспериментальных данных, что и кинетическая модель.

Может оказаться полезным рассмотреть причины такого динамического сходства кинетической и так называемой редуцированной моделей и пункты, по которым они различаются. Следует сказать, что редуцированная модель содержит столько же параметров, сколько и кинетическая, и в этом смысле не является более простой. В стационарном случае обе модели математически эквивалентны. При других условиях их математическое сходство определяется относительной величиной параметров k_1 и k_2 в уравнениях (8.1)—(8.2). В самом деле, при $q = k_2/k_1 \gg 1$ уравнение (8.2) можно считать «быстрым» в системе (8.1)—(8.3), что можно показать соответствующей заменой переменных. Это означает, что для «медленных» (по сравнению с $1/k_2 \approx 5 \div 7$ мс) процессов уравнение (8.2) эквивалентно соответствующему стационарному выражению $m = vn/k_2\delta$. Уравнение (8.1) тогда дает

$$\frac{dn}{dt} = k_1(\alpha - n) - \frac{n}{\delta'} v, \quad (8.7)$$

где $\delta' = \delta q/(q + 1)$. Для силы мышцы имеем

$$f(n - m) = nf[1 - (v/v_{\max})], \quad (8.8)$$

где $v_{\max} = k_2\delta$ — стационарная скорость сокращения без нагрузки. Зависимость силы, отнесенной к одному мостику, от скорости сокращения (выражение (8.8)) совпадает с постулированной в модели, предложенной Чапленом — Фроммельтом и Буравцевым. В уравнениях Чаплена — Фроммеля дополнительно к кинетическому уравнению (8.7) в расчет принимается размыкание поперечных связей, не зависящее от скольжения нитей * (в обозначениях этих авторов $\delta = l_k v_{cbm}/(v_{cbm} - l_k u f_{cbm})$).

В кинетической модели $q = 2 \div 4$, так что в стационарном случае и в условиях, близких к стационарным, обе модели могут вести себя одинаковым образом.

Однако в резко нестационарных условиях их поведение существенно различается. В редуцированной модели ни при каких условиях не может происходить скольжение нитей со скоростью, превышающей стационарную скорость сокращения без нагрузки. В кинетической модели скорость скольжения нитей на расстояния меньше «шага» мостика может лимитироваться только либо вязким сопротивлением саркоплазмы в области перекрытия нитей, либо собственным временем конформационной перестройки замкнутого мостика, которое в рамках кинетической модели считается пренебрежимо малым по сравнению с $1/k_2$. Следовательно, скорость сокращения в переходном процессе может значительно превышать максимальную стационарную. В переходных процес-

* Этот процесс довольно медленный и в кинетической модели берется в расчет в режимах с частичной активацией сократительной системы, когда константа k_1 становится малой и скорость сокращения очень низка.

сах, исследовавшихся экспериментально Хаксли и Симмонсом [134, 136], начальная скорость сокращения демпфированной упругой компоненты, т. е. скорость движения мостиков, в 7—10 раз превышала стационарную скорость скольжения нитей при сокращении без нагрузки. Таким образом, внутреннее трение мостиков вряд ли может быть силой, лимитирующей скорость ненагруженного сокращения. Тормозящая сила отдельного мостика скорее имеет потенциальную природу, как предполагается в кинетической модели.

Этот вопрос тесно связан с проблемой энергетической структуры реальных конформационных состояний замкнутого мостика. Мостик является молекулярным объектом и, следовательно, подвержен интенсивным тепловым флуктуациям. Поэтому такие его характеристики, как сила и смещение, имеют смысл средних по времени величин (временной интервал осреднения считается малым по сравнению с временем сокращения).

Если мостик обладает осредненной силовой характеристикой, постулированной в модели Чаплэна — Фроммельта [93], то это должно означать, что от момента замыкания до размыкания он проходит через ряд устойчивых состояний с монотонно убывающей потенциальной энергией, разделенных сравнительно высокими активационными барьерами. Силовая характеристика, постулированная в кинетической модели, означает, что на некотором интервале перемещений мостик проходит через ряд состояний с убывающей энергией, разделенных незначительными энергетическими барьерами, а на интервале перемещений, предшествующем размыканию, потенциальная энергия возрастает.

В предположении, что число реальных энергетических состояний мостика невелико, можно попытаться получить его осредненные «механические» характеристики в рамках теории абсолютных скоростей реакций.

По-видимому, первая попытка применения этой теории для описания кинетики индивидуального мостика принадлежит Волькенштейну [196].

В своей работе 1971 г. [137] Хаксли и Симмонс дали очень привлекательную интерпретацию собственных результатов по переходным процессам в мышце в терминах теории абсолютных скоростей реакций. Они предположили, что в процессе конформационной перестройки мостик проходит несколько устойчивых положений, различающихся по свободной энергии и разделенных потенциальными барьерами, причем высота барьеров, т. е. вероятность переходов между этими устойчивыми положениями, зависит от степени растяжения недемпфированной упругости мостика. При таких предположениях Хаксли и Симмонсу удалось объяснить поведение мышцы и даже изменение временных характеристик в зависимости от степени перекрытия нитей. Однако расчеты подобного рода будут иметь иллюстративный характер до тех пор, пока число устойчивых состояний миозинового мости-

ка и их энергетическая структура будут оставаться вопросом вкуса исследователя.

Особый интерес при исследовании механизма конформационной перестройки замкнутого мостика, связанной с генерацией силы и механическим перемещением нитей, представляют следующие вопросы: является ли конформационная перестройка дискретным или квазинепрерывным процессом? Каковы ее характерные собственные времена и перепады свободной энергии? Какие химические и физические изменения замкнутого мостика сопровождают конформационную перестройку, т. е. какова природа сил, ее вызывающих? Какова геометрия перестройки (амплитуды и направления смещения частей актомиозинового комплекса)? Некоторая информация по этим вопросам может быть получена путем определения параметров цикла поперечного мостика из экспериментов, в которых сократительный аппарат работает при различных физико-химических условиях. Первым шагом на этом пути должен быть поиск удобных экспериментальных моделей мышцы, в которых условия работы сократительной системы могли бы контролироваться и быть выбранными близко к физиологическим (например, мышечные волокна с разрушенной тем или иным способом мембраной). Если динамика такой экспериментальной системы описывается той же самой математической моделью, что и динамика нативной мышцы, то возможно сравнение сократительных механизмов в терминах параметров модели. Существует еще возможность получить некоторую информацию о взаимодействии миозина, актина и АТФ путем исследований физико-химических и ферментативных свойств растворов мышечных белков. Этому будет посвящена вторая часть книги.

Приложение

ПРОЯВЛЕНИЕ ОСТАТОЧНЫХ КОНФОРМАЦИОННЫХ ИЗМЕНЕНИЙ МОЛЕКУЛЫ БЕЛКА В КИНЕТИКЕ ФЕРМЕНТАТИВНЫХ РЕАКЦИЙ

Выше (см. раздел 6.3) мы обсуждали предположение о том, что за высокую АТФазную активность актомиозина ответственно наличие механической взаимосвязи между различными активными центрами, обусловленное «кристаллоидной» организацией мышцы. Предполагалось, что такая структурная организация позволяет использовать энергию, освободившуюся в экзотермической стадии реакции на одном из активных центров, для проведения эндотермической стадии на соседнем активном центре.

Для большей строгости необходимо рассмотреть биохимическую схему. Очевидно, что представления о динамике структурных изменений белка-фермента могут оказаться полезными для понимания механизма работы не только мышечных белков, но и других ферментных комплексов. Мы рассмотрим здесь простейшую модель такого рода, учитывающую возможность использования энергии экзотермической стадии реакции для осуществления ее эндотермической стадии у одноцентровых ферментов.

В последние годы были обнаружены экспериментально конформационные изменения различных белков в их фермент-субстратных и фермент-продуктных комплексах [39, 68, 161, 167]. В частности, было показано наличие таких изменений у комплекса с продуктом миозина поперечно-полосатых мышц [40, 184] в ходе гидролиза АТФ. Естественно допустить, что в течение некоторого времени после окончания реакции (образования продукта и его ухода) молекула фермента продолжает оставаться в измененном состоянии. Такие измененные молекулы фермента должны характеризоваться иной каталитической активностью, чем начальный фермент. С течением времени будет происходить возвращение молекулы фермента к исходному состоянию.

Нельзя не отметить, что сама идея об изменении молекулы фермента в результате катализируемой им реакции отнюдь не нова *. Еще в тридцатые годы Ю. В. Медведев [46] предполагал, что молекула фермента способна запасать энергию распада субстрата и использовать эту энергию в следующем каталитическом акте.

Э. С. Бауэр [2] использовал гипотезу остаточных деформаций фермента для объяснения понижения энергии активации в ферментативных реакциях. Несколько позже представления о «рекуперации» энергии обсуждались в работе Н. И. Кобозева [45]. Дальнейшее развитие рассматриваемая гипотеза получила в работе С. Э. Шноля ** [76].

В данном Приложении мы рассмотрим возможность проявления остаточных конформационных изменений в кинетических характеристиках ферментативных реакций, в частности в зависимости стационарной начальной скорости от концентрации субстрата ***.

* Подробное изложение истории этого вопроса, а также современный взгляд на теорию ферментативного катализа читатель найдет в известной книге Л. А. Блюменфельда [4].

** Широкую известность получили работы Кошлэнда об изменении конформации макромолекулы фермента при взаимодействии с субстратом. Однако интересующий нас вопрос об остаточных конформационных изменениях фермента в концепции Кошлэнда не отражен.

*** См. также более ранние работы: *Rabin B. Cooperative effects in enzyme catalysis: a possible kinetic model based on substrate-induced conformational isomerization.*—«Biochem. J.», 1967, 102, N2, 22c—23c; *Keleti T. Effect of steric changes in the protein on the kinetics of enzymic reactions.*—«Acta Biochim. et Biophys. Acad. Sci. Hung.», 1968, 3, N 3, 247—258.

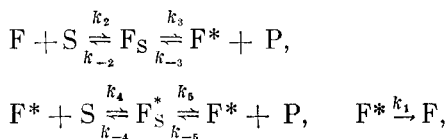
Известно, что ферментативные реакции, в которых зависимость стационарной начальной скорости от концентрации субстрата точно подчиняется уравнению Михаэлиса—Ментен, являются редким исключением [41, 67]. Это может означать, что либо истинно моносубстратных реакций не существует, либо модель Михаэлиса—Ментен не учитывает каких-то существенных свойств механизма ферментативного катализа. Ранее было принято считать, что отклонение от кинетики Михаэлиса—Ментен свидетельствует о наличии нескольких взаимодействующих активных центров на молекуле фермента [16, 127] либо о существовании аллостеризма [164].

Ниже мы увидим, что учет остаточных конформационных изменений позволяет предложить объяснение аномальной кинетики с иных позиций. Мы не конкретизируем характер изменения молекулы фермента; важно лишь то, что изменяется каталитическая способность и что с течением времени фермент возвращается к исходному состоянию.

Нами были рассмотрены два варианта математической модели.

II.1. Дискретная модель

Предположим, что свободный фермент может находиться в двух дискретных состояниях: исходном F и состоянии F^* , которое возникает в результате распада фермент-субстратного комплекса с образованием продукта. Из состояния F^* фермент возвращается в исходное с константой скорости k_1 . Тогда схема процессов, протекающих в реакционной смеси, имеет следующий вид:



где S и P — субстрат и продукт, а F_S и F_S^* — комплексы с субстратом исходного и «прореагировавшего» фермента соответственно.

Будем искать выражение для начальной скорости реакции, пренебрегая концентрацией продукта. Запишем в соответствии с законом действующих масс систему кинетических уравнений:

$$\begin{aligned} \frac{dF}{dt} &= k_1 F^* - k_2 S F + k_{-2} F_S, \\ \frac{dF^*}{dt} &= -k_1 F^* + k_3 F_S - k_4 S F^* + k_{-4} F_S^* + k_5 F_S^*, \\ \frac{dF_S}{dt} &= k_2 S F - k_{-2} F_S - k_3 F_S, \\ E &= F + F^* + F_S + F_S^*, \end{aligned} \tag{II.1}$$

где S , P , F_S , F_S^* — концентрации субстрата, продукта и соответствующих комплексов, E — полная концентрация фермента.

Решив систему уравнений (П.1) для стационарного случая, когда все производные по времени равны нулю, получим выражение для стационарной начальной скорости реакции:

$$v = \frac{k_5 S + k_1 K_M^*}{S^2 + S(1 + k_1/k_3)K_M^* + K_M K_M^* k_1/k_3} ES, \quad (\text{П.2})$$

где $K_M = (k_{-2} + k_3)/k_2$ и $K_M^* = (k_5 + k_{-4})/k_4$.

Выражение типа Михаэлиса—Ментен является частным случаем уравнения (П.2). Например, если $k_1 = \infty$, т. е. фермент мгновенно возвращается в F из F^* , так что практически все свободные молекулы фермента находятся в состоянии F , то

$$v = \frac{k_3 ES}{S + K_M}.$$

Если же $k_1 = 0$, то весь свободный фермент находится в состоянии F^* и скорость образования продукта

$$v = \frac{k_5 ES}{S + K_M^*}.$$

При определенном подборе параметров уравнение (П.2) будет описывать кривые с максимумом и перегибом. Условие существования экстремума имеет вид

$$\frac{dv}{dS} = \frac{AS^2 + BS + C}{(S^2 + DS + L)^2} = 0, \quad (\text{П.3})$$

где $A = k_5 + k_1 k_5/k_3 - k_1$, а B , C , D , L — положительные константы. Легко видеть, что уравнение (П.3) имеет действительный положительный корень лишь при условии $A < 0$, т. е. при

$$k_5 + k_1 k_5/k_3 - k_1 < 0, \quad (\text{П.4})$$

или иначе

$$k_1 > \frac{k_5}{1 - k_5/k_3} \quad \text{и} \quad k_5 < k_3.$$

Подчеркнем, что в условие существования максимума не входят константы сродства к субстрату ни исходного, ни измененного фермента. Очевидно, далее, что при $k_5 \geq k_3$ условие (П.4) не выполняется.

Итак, зависимость начальной стационарной скорости реакции от концентрации субстрата будет иметь максимум, если, во-первых, комплекс измененного фермента с субстратом менее реакционноспособен ($k_5 < k_3$) и, во-вторых, константа k_1 превышает определенное критическое значение.

Условие существования перегиба можно получить, исследуя вторую производную d^2v/dS^2 . Очевидно, однако, что выраженную

S-образную форму зависимость начальной стационарной скорости от концентрации субстрата имеет в том случае, если при малых S выражение (П.2) можно экстраполировать квадратичной функцией, т. е. если одновременно выполнены условия:

$$k_5 S \gg k_1 K_M^*, \quad S^2 \ll K_M K_M^* \frac{k_1}{k_3}, \quad S \left(1 + \frac{k_1}{k_3}\right) K_M^* \ll K_M K_M^* \frac{k_1}{k_3},$$

или иначе

$$\frac{k_1 + k_3}{k_5} \ll \frac{K_M}{K_M^*} \quad \text{и} \quad \frac{k_1}{k_5} \frac{k_3}{k_5} \ll \frac{K_M}{K_M^*}.$$

Итак, дискретная модель, учитывающая динамику изменения каталитических свойств фермента в результате ферментативного акта, позволяет описать различные типы зависимостей стационарной скорости от концентрации субстрата.

Уравнение (П.2) аналогично уравнениям, получаемым из предположения о двух взаимодействующих активных центрах на молекуле фермента [16, 127]:

$$v = \frac{aS^2 + bS}{cS^2 + dS + e}. \quad (\text{П.5})$$

Это означает, что дискретная динамическая модель и двухцентровая схема в рамках стационарной ферментативной кинетики неразличимы.

Каменский и Подрабинек [41, 54] предложили следующее уравнение для описания зависимости стационарной скорости ферментативных реакций и кривых связывания гемоглобином субстрата от концентрации последнего:

$$\frac{v}{k_3 E} = q = \frac{\lambda S e^{\alpha S}}{1 + \lambda S e^{\alpha S}}, \quad (\text{П.6})$$

где k_3 — константа скорости распада фермент-субстратного комплекса с образованием продукта; E — полная концентрация фермента; S — концентрация субстрата; α и λ — постоянные.

Каменский и Подрабинек показали, что при наличии всего двух варьируемых параметров предложенное ими уравнение описывает экспериментальные зависимости $v(S)$ различных типов лучше, чем дробно-рациональное выражение (П.5). Зависимость (П.6) можно преобразовать в прямую линию, построив график функции

$$Y = \ln \frac{q}{(1-q)S} = \ln \lambda + \alpha S. \quad (\text{П.7})$$

Спрямив описанным выше способом экспериментальные кривые $v(S)$ для большого числа ферментов, Каменский и Подрабинек действительно получили линейные зависимости почти во всем диапазоне изменения S .

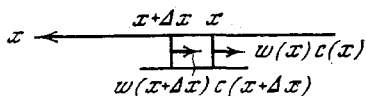
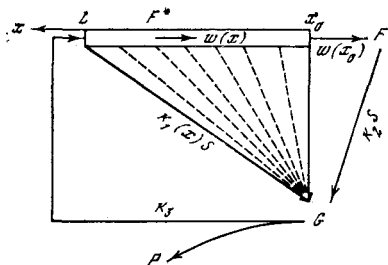


Рис. 35. Схема реакции с учетом непрерывной релаксации

F — исходный фермент; G — фермент-субстратный комплекс, F* — релаксирующий фермент

Рис. 36. Поток релаксирующего фермента

$w(x)$ — скорость релаксации; $c(x)$ — линейная плотность концентрации релаксирующего фермента.

Очевидно, что экспоненциальное выражение типа (П.6) нельзя получить из закона действующих масс в рамках общепринятой схемы с несколькими взаимодействующими центрами на молекуле фермента. Ниже будет показано, что экспоненциальное выражение для $v(S)$ типа (П.6) естественно вытекает из предлагаемой нами модели с конечным временем релаксации.

П.2. Модель с конечным временем релаксации

В дискретной модели мы считали переход $F^* \rightarrow F$ обычной мономолекулярной реакцией, т. е. считали, что собственно переход происходит мгновенно, а константа скорости k_1 определяет $1/\tau$, где τ — среднее время жизни состояния.

Теперь мы рассмотрим несколько иной случай. Предположим, что релаксация «возбужденного» фермента к равновесному состоянию происходит с конечной скоростью через непрерывный ряд состояний. В общем случае эти состояния имеют различное сродство к субстрату. Пусть отклонение фермента от равновесного состояния характеризуется переменной x : в момент распада фермент-субстратного комплекса с образованием продукта $x = L$, в равновесии $x = 0$. Скорость релаксации фермента обозначим через $w(x)$. Введем линейную плотность концентрации $c(x)$ так, чтобы концентрация фермента в диапазоне $(x, x + \Delta x)$ равнялась $c(x)\Delta x$.

Рассмотрим следующую схему ферментативной реакции (рис. 35). Фермент из исходного состояния F образует с константой скорости k_2 фермент-субстратный комплекс G. Комплекс распадается на продукт и измененный фермент $F^*(L)$. Постепенно релаксируя, молекула фермента проходит со скоростью $w(x)$ различные стадии вплоть до $x = x_0$ и возвращается в исходное

состояние. В ходе релаксации молекула может образовывать фермент-субстратный комплекс с константой скорости $k_1(x)$.

Для простоты мы рассматриваем здесь случай, когда свойства комплексов, образованных исходным и релаксирующим ферментом, одинаковы, а распадом комплекса без образования продукта можно пренебречь.

Запишем кинетические уравнения для данной системы. Очевидно, что в единицу времени в состоянии F из состояния F* переходит $w(x_0)c(x_0)$ молекул фермента, так что

$$dF/dt = w(x_0)c(x_0) - k_2SF.$$

Очевидно также, что

$$\frac{dG}{dt} = S \int_{x_0}^L k_1(x) c(x) dx + k_2SF - k_3G.$$

Из рис. 36 видно, что изменение концентрации релаксирующего фермента в интервале $(x, x + \Delta x)$ будет

$$\frac{\partial}{\partial t} [c(x, t)\Delta x] = c(x + \Delta x)w(x + \Delta x) - c(x)w(x) - k_1(x)Sc(x, t)\Delta x.$$

Поделим обе части на Δx и устремим $\Delta x \rightarrow 0$. Тогда

$$\frac{\partial c(x, t)}{\partial t} = \frac{\partial}{\partial x} [w(x)c(x, t)] - k_1(x)Sc(x, t).$$

Итак, система кинетических уравнений для нашей задачи имеет вид

$$\frac{dF}{dt} = w(x_0)c(x_0) - k_2SF, \quad (\text{II.8})$$

$$\frac{dG}{dt} = k_2SF - k_3G + S \int_{x_0}^L k_1(x)c(x) dx, \quad (\text{II.9})$$

$$\frac{\partial c}{\partial t} = \frac{\partial}{\partial x} [w(x)c(x, t)] - k_1(x)Sc(x, t). \quad (\text{II.10})$$

Условие постоянства полной концентрации фермента в наших обозначениях можно записать таким образом:

$$\int_{x_0}^L c(x) dx + F + G = E. \quad (\text{II.11})$$

Будем искать скорость стационарной реакции. В этом случае левые части уравнений (II.8)–(II.10) равны нулю, тогда (II.10) вырождается в линейное однородное дифференциальное уравнение для $c(x)$, которое дает

$$c(x) = \frac{w(x_0)c(x_0)}{w(x)} \exp \left\{ S \int_{x_0}^x \frac{k_1(x)}{w(x)} dx \right\},$$

а выражения (П.8), (П.9) и (П.11) позволяют определить произвольную постоянную решения:

$$w(x_0) c(x_0) = \frac{k_2 S E}{1 + (k_2/k_3) S e^{\alpha S} + k_2 S J},$$

где

$$\alpha = \int_{x_0}^L \frac{k_1(x)}{w(x)} dx; \quad J = \int_{x_0}^L \frac{dx}{w(x)} \exp \left\{ S \int_{x_0}^x \frac{k_1(x)}{w(x)} dx \right\}.$$

Выражаем далее G через $c(x)$ и, так как скорость образования продукта $v = k_3 G$, получим

$$v = w(x_0) c(x_0) e^{\alpha S}.$$

Следовательно, для относительной скорости реакции $q = v/(k_3 E)$ можно записать

$$q = \frac{\lambda S e^{\alpha S}}{1 + \lambda S e^{\alpha S} + k_2 S J_2(S)}, \quad (\text{П.12})$$

где $\lambda = k_2/k_3$.

Полученная формула отличается от эмпирической зависимости Каменского и Подрабиника (П.6) лишь членом $k_2 S J_2(S)$, который, как мы увидим ниже, при определенных условиях представляет малую поправку к формуле (П.6).

Рассмотрим простейший случай $k_1(x) = \text{const} = k_1$. Фермент, как и в дискретной модели, характеризуется двумя различными константами средства к субстрату. Однако в отличие от дискретной модели в рассматриваемом случае переход фермента в равновесное состояние не является мгновенным (время перехода определяется отношением $(L - x_0)/w$). Это можно интерпретировать так: релаксация фермента связана с каким-то физическим процессом, обязательным для каждой «прореагировавшей» молекулы фермента, так что переход из состояния F^* в F запрещен до окончания этого процесса.

Итак, $k_1 = \text{const}$. Тогда интеграл $J_2(S)$ переходит в

$$J_2(S) = \frac{1}{k_1 S} \left[\exp \left\{ k_1 S \int_{x_0}^L \frac{dx}{w(x)} \right\} - 1 \right] = \frac{1}{k_1 S} (e^{\alpha S} - 1)$$

и (П.12) перепишется в виде

$$q = \frac{\lambda S e^{\alpha S}}{\lambda S e^{\alpha S} + 1 + (k_2/k_1)(e^{\alpha S} - 1)}, \quad (\text{П.13})$$

где λ — отношение времени образования равновесным ферментом комплекса с субстратом к времени распада комплекса, α — отношение эффективного времени релаксации к времени образования релаксирующим ферментом фермент-субстратного комплекса.

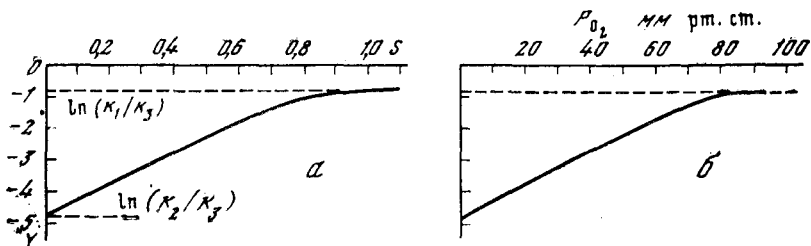


Рис. 37. Спрямление зависимости начальной стационарной скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата

a — спрямление теоретического выражения (П.13) при $\alpha = 5$; $k_2/k_3 = 0,01$; $k_1/k_3 = 0,449$; *б* — спрямление экспериментальной кривой оксигенации гемоглобина [41]

Спрямим зависимость (П.13) по правилу (П.7):

$$Y = \ln \frac{q}{(1-q)S} = \ln \lambda + \alpha S - \ln \left[1 + \frac{k_2}{k_1} (e^{\alpha S} - 1) \right]. \quad (\text{П.14})$$

Очевидно, что прямую линию $Y = \ln \lambda + \alpha S$ получим при условии, что

$$\frac{k_2}{k_1} (e^{\alpha S} - 1) \ll 1, \quad \text{т. е.} \quad \alpha S \ll \ln \left(1 + \frac{k_1}{k_2} \right).$$

При достаточно больших S имеем

$$Y = \ln \lambda - \ln (k_2/k_1) = \ln (k_1/k_3).$$

Следовательно, модель с релаксацией дает зависимость типа уравнения (П.6) лишь в ограниченном диапазоне S ; при достаточно больших S величина Y становится постоянной. Как видно из рис. 37, это вполне согласуется с экспериментальными данными: при соответствующем выборе коэффициентов α , k_2/k_1 и k_1/k_3 расчетная кривая (рис. 37, *a*) хорошо описывает экспериментальную зависимость (рис. 37, *б*).

Уравнение (П.6) Каменского и Подрабиника может описывать кривые с перегибом и максимумом. Условие существования перегиба $0 < \lambda < \alpha$, а максимума $\alpha < 0$. В нашей модели отрицательное α лишено физического смысла; однако при учете различной реакционной способности фермент-субстратных комплексов, образованных равновесной и релаксирующей молекулами фермента, модель позволит объяснить наличие максимумов у зависимости $v(S)$, не прибегая к $\alpha < 0$.

Если релаксирующий фермент обладает большим сродством к субстрату, чем равновесный, но комплекс с субстратом менее активен (константа скорости образования продукта меньше), то кривая будет иметь и перегиб, и максимум. В случае немонотонного изменения во времени сродства к субстрату или скорости образования продукта кривая $v(S)$ может иметь несколько экстремумов.

Поскольку в ходе взаимодействия с субстратом происходят конформационные или какие-либо другие изменения фермента (например, изменение его взаимодействия с низкомолекулярными компонентами окружающего раствора, с ингибиторами или активаторами), то в результате реакции с необходимостью возникает неравновесное состояние фермента (или системы фермент—«растворитель»). Если времена релаксации соизмеримы с величиной, обратной числу оборотов фермента, эти явления могут сказаться на каталитических свойствах фермента. Упрощенный анализ показывает, что для зависимости начальной скорости от концентрации субстрата рассмотренные представления приводят к выражению, аналогичному формуле Каменского и Подрабиника, которая содержит меньше варьируемых параметров и оказывается более точной, чем дробно-рациональные выражения, вытекающие из традиционных многоцентровых схем.

Этот факт, конечно, еще не доказывает существенной роли обсуждаемого механизма в ферментативном катализе. Анализ нестационарных режимов позволит оценить его вклад с большей определенностью*.

Частным случаем остаточных конформационных изменений может являться диссоциация на мономеры [78, 79] белка, состоящего из нескольких субъединиц, если каталитические свойства активного центра отдельного мономера отличны от свойств активного центра на ассоциированной молекуле. Заметим, что в случае диссоциации фермента на субъединицы релаксация уже не является мономолекулярным процессом и ее скорость зависит от концентрации фермента, вследствие чего стационарная скорость реакции будет зависеть от концентрации фермента нелинейно; концентрация субстрата, соответствующая максимуму скорости (при наличии такового), также будет зависеть от концентрации фермента.

Можно предположить, что смысл образования сложных надмолекулярных комплексов из белковых субъединиц заключается в том, что такие комплексы позволяют использовать энергию, выделяющуюся в ходе ферментативного акта на одном из активных центров, для преодоления потенциального барьера реакции, идущей одновременно на соседнем активном центре. Именно так, по-видимому, актомиозиновый сократительный аппарат мышц понижает активационный барьер гидролиза АТФ за счет энергии, выделяющейся в ходе реакции [10]. Тот же результат в случае одноцентровых молекул может достигаться иным способом — за счет энергии, запасенной в предыдущем каталитическом акте.

* Недавно существование обсуждаемых здесь конформационно-неравновесных состояний было обнаружено экспериментально для реакции связывания гемоглобином окиси углерода [5]. Авторы исследовали кинетические свойства гемоглобина, релаксирующего после сбрасывания лиганда, и обнаружили зависимость этих свойств от времени после начала релаксации.

Часть II

ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ ПОДХОД К БИОХИМИЧЕСКОЙ КИНЕТИКЕ МЫШЕЧНЫХ БЕЛКОВ

Глава 9

МЕХАНИЗМ ГИДРОЛИЗА MgATФ МИОЗИНОМ

9.1. Роль биохимических данных в теории мышечного сокращения

Для понимания того, как работает мышца, необходимо иметь информацию трех типов: 1) о структурной организации, 2) о биохимических процессах; 3) о сократительных и энергетических свойствах мышцы. Однако при попытках понять, как работает сократительная машина, использование этих трех типов информации далеко не одинаково. Обычно сначала необходимо построить модель явления, затем проанализировать поведение этой модели и, наконец, сопоставить поведение этой модели с поведением реального объекта. Таким образом, «понимание» — трехступенчатый процесс. Структурная информация учитывается в этом процессе на первом этапе — она является основой построения модели реального объекта. Динамическая информация, т. е. сведения о том, как сокращается мышца и какая энергия при этом выделяется, — это нечто вроде ответа в задачнике, под который надо «подогнать» наше решение. А вот биохимическая информация до сих пор применялась во всей этой трехступенчатой схеме крайне слабо. В самом деле, все модели мышечного сокращения, предложенные до сих пор, например такие, как модель Хаксли [133] и ее многочисленные модификации, которые были сделаны после 1957 г., или изложенная в первой части книги кинетическая модель Дещеревского, — все они всерьез использовали лишь одно положение, которое, да и то с натяжкой, можно назвать положением биохимического сорта. Предполагалось, что на каждый цикл присоединения и отсоединения миозинового мостика на тонкой нити расходуется одна молекула АТФ. Но и это предположение применялось только при расчете энергетики мышечного сокращения. В чем же причина столь слабого использования биохимических данных? Нам кажется, что она заключается в следующем.

Энзиматические свойства мышечных белков интенсивно исследуются с 1939 г., когда Энгельгардт и Любимова [112] обнаружили, что миозин В, основной структурный белок мышц (в нынешней

терминологии это актомиозин), является АТФазой. При этом биохимии всегда исходили из традиционных представлений энзимологии. Они считали, что актин является только лишь модификатором миозиновой АТФазы. Предполагалось, что актин ускоряет гидролитическую стадию или, возможно, стадию связывания. Это положение, как оказалось, совершенно неверно, но оно вплоть до последнего времени тормозило понимание того, как на самом деле работает эта биохимическая система.

Биохимическая специфика сократительных белков выяснена недавно, и этот успех связан с именами Лимна и Тейлора*. Они предложили и обосновали схему актомиозиновой АТФазы, суть которой заключается в следующем: при гидролизе АТФ актомиозином каждый ферментативный цикл, т. е. цикл гидролиза одной молекулы АТФ, сопряжен с полным циклом ассоциации и диссоциации актомиозинового комплекса.

Здесь можно отметить замечательный парадокс: схема Лимна и Тейлора предложена только в 1971 г., а люди, далекие от биохимии мышечных белков (относительно далекие, т. е. физиологи и структурщики), предполагали, что актомиозин работает именно так, уже в 1957 г. и даже раньше, как только стало ясно, что мостик в мышце должен работать циклически. Но тем не менее нельзя недооценить значение схемы Лимна и Тейлора, потому что она произвела коренную перестройку во взглядах исследователей в области мышечного сокращения на природу АТФазной активности актомиозина.

В отличие от всех остальных предложенных ранее, эта схема естественным образом стыкуется с механическим циклом актомиозинового мостика сокращающейся мышцы. Давно было ясно, что существует механический цикл мостика в сокращающейся мышце, который заключается в том, что мостик присоединяется, развивает какую-то силу и затем отсоединяется. Схема Лимна и Тейлора говорит о том, что существует и биохимический цикл при гидролизе АТФ, в котором тоже происходит образование и диссоциация актомиозинового комплекса. Впервые стало возможно поставить вопрос о соответствии между механическими промежуточными состояниями мостика в сокращающейся мышце и биохимическими его промежуточными состояниями при гидролизе АТФ. Нам кажется, что понимание молекулярного механизма работы сократительного аппарата возможно именно на пути детальной разработки соответствия этих двух циклов.

В первой части этой книги мы рассмотрели аппарат, с помощью которого, анализируя динамику сокращения мышцы, можно

* Следует отметить, что основные положения схемы Лимна и Тейлора [159] совпадают с циклической схемой актомиозиновой АТФазы, предложенной независимо от Лимна и Тейлора Букаатиной и Дещеревским [8, 10], которую мы будем подробно обсуждать ниже. Однако экспериментальные доказательства основных положений схемы были получены в работах Лимна и Тейлора, применивших методы нестационарной кинетики (см. ниже).

получить информацию о механических свойствах отдельного актомиозинового мостика, т. е. выяснить основные механические ступени миозинового мостика при сокращении мышцы. Здесь, в девятой и десятой главах, мы рассмотрим, что известно в настоящее время о биохимическом цикле актомиозиновых систем, с тем, чтобы попытаться в конце десятой главы установить, насколько это возможно, взаимное соответствие этих двух циклов.

9.2. Схема работы MgАТФазы миозина

Начнем с биохимических свойств миозина*. Известно, что миозин при физиологических условиях, т. е. при концентрации КСl порядка 0,1 моль, при нейтральном рН и концентрации Mg^{2+} порядка 1 ммоль, является очень «плохим» ферментом — в среднем, один каталитический центр (а миозиновая молекула, как известно, имеет два каталитических центра) гидролизует одну молекулу АТФ за время примерно 20—30 с. Зависимость стационарной скорости миозиновой АТФазы от концентрации субстрата подчиняется уравнению Михаэлиса — Ментен. Тем не менее кинетика гидролиза имеет одну особенность, которая была выявлена в 50-х годах Тономурой [190—192] и которая называется начальной вспышкой скорости АТФазной реакции.

Оказалось, что после смешивания миозина с АТФ в начальный момент времени скорость гидролиза значительно превышает стационарную: около одного моля АТФ на моль миозина гидролизуетея за время, которое невозможно разрешить без применения методов «быстрой» кинетики. Тономура и его коллеги предположили, что во время гидролиза АТФ миозин сначала очень быстро фосфорилируется, т. е. макроэргическая связь АТФ переносится на миозин**, и именно гидролиз этой связи и отщепление фосфата от белка являются лимитирующей стадией всего процесса. Когда мы прекращаем реакцию добавлением трихлоруксусной кислоты, то эта лабильная связь, которая согласно схеме образуется очень быстро, в кислоте гидролизуетея и мы имеем как бы выброс фос-

* Подчеркнем, что мы всегда будем рассматривать только физиологические условия т. е. речь идет о магниевой АТФазе миозина и актомиозина. Кроме того, в этой главе мы ограничимся лишь актомиозиновыми системами, не содержащими регуляторных белков. Значение присутствия регуляторных белков в системе рассмотрено в следующей главе. Нужно также сказать, что в большинстве экспериментов, которые описаны в этой главе, использовался не сам миозин, а его растворимый фрагмент, так называемый тяжелый меромиозин. Дело в том, что при физиологических ионных силах, т. е. в наиболее интересных для нас условиях, миозин нерастворим. Активный центр миозина находится на его части, отходящей при протеолизе трипсином к тяжелому меромиозину, поэтому биохимические характеристики миозина и тяжелого меромиозина в основном совпадают.

** Предположение о фосфорилировании миозина в ходе АТФазной реакции было высказано еще в 40-е годы Калькарром [152] и исследовалось с тех пор многими авторами как у нас в стране (например, Сорени [64]), так и за рубежом (см. обзор этого вопроса в книге Н. С. Пантелеевой [48]).

фата, соответствующий начальной вспышке скорости гидролиза. Были предприняты интенсивные попытки обнаружить такой миозиновый фосфорилированный интермедиат *. Наиболее четкие работы на эту тему были выполнены Сарторелли [183], который в момент фиксации реакции трихлоруксусной кислотой добавлял в смесь одновременно с фиксацией меченую по кислороду воду. Если в момент фиксации (или спустя некоторое время после этого) происходил бы гидролиз макроэргической белок-фосфатной связи, то метка должна была бы включаться либо в белок, либо в фосфат. Этого не было обнаружено при разных вариантах постановки опыта. Тем не менее если реакция с самого начала протекала в среде, содержащей меченую по кислороду воду, то происходило включение метки в неорганический фосфат, причем включался не один, а до трех атомов кислорода на каждый фосфат. Для объяснения этого явления Сарторелли предположил, что существует некоторый комплекс фосфата с белком, причем этот комплекс вовсе не обязан иметь ковалентную природу. Вероятно, фосфат в форме метафосфата связан с белком и подвергается обратимой гидратации-дегидратации. Количество метки, которое включалось в фосфат, было обратно пропорционально скорости гидролиза АТФ миозином. Отсюда можно сделать вывод, что лимитирующей стадией гидролиза является время жизни фосфо-миозинового комплекса.

В 1970 г. Лимн и Тейлор [158] применили для исследования кинетики начальной вспышки АТФазной реакции технику быстрого смешивания. Они сконструировали так называемый quencher-flow-аппарат, установку быстрого смешивания методом непрерывной струи, в котором можно было смешивать миозин и субстрат за времена порядка миллисекунды и затем, спустя варьируемое время (начиная от 1 мс и более), производить второе смешивание с фиксирующей реакцией трихлоруксусной кислотой. При этом они установили следующее.

Зависимость количества гидролизованного в начальной вспышке субстрата от времени имела экспоненциальный характер, т. е. выброс фосфата, рассчитанный на молекулу миозина, можно было описать следующим уравнением **:

$$P_{\text{н}} = P_{\text{н}\infty} (1 - e^{-kt}). \quad (9.1)$$

Здесь $P_{\text{н}\infty}$ — количество неорганического фосфата, которое вы-

* См. в книге [48].

** Читателю должно быть ясно, что временная зависимость гидролизованного в начальной вспышке субстрата (см. (9.1)) в опытах Лимна и Тейлора на самом деле представляла собою изменение с течением времени концентрации ТХУ-лабильного миозин-продуктного комплекса МР. В самом деле, на измеряемых ими промежутках времени медленной стадией распада миозин-продуктного комплекса можно пренебречь. При смешивании с ТХУ весь комплекс МР мгновенно переходил в $M + P$ (т. е. мы считаем, что в ТХУ $k_3 = \infty$) и тогда в любой момент времени концентрация полученного в ТХУ фосфата была в точности равна концентрации комплекса МР.

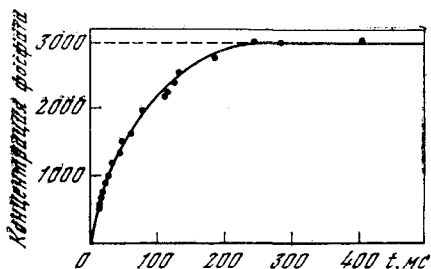


Рис. 38. Выход фосфата в случае, когда субстратом является MgATФ [158] 0,5 моль KCl; 0,1-молярный tris-HCl (pH 8,0); 0,01 моль MgCl₂; 20° С; 32 мкмоль АТФ; 2 мг/мл миозина. Штриховая линия — экстраполяция стационарной скорости к нулевому времени. Начальная вспышка составляет 1,2 моль неорганического фосфата на моль миозина

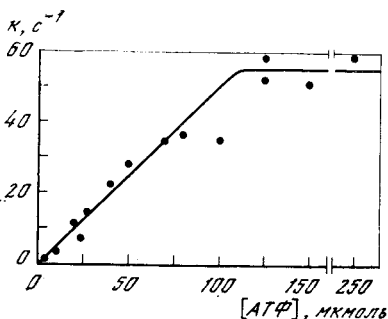


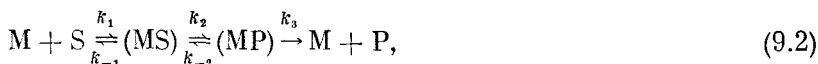
Рис. 39. Зависимость предстационарной константы скорости выброса фосфата от концентрации MgATФ [158]

Все условия, как на рис. 38; концентрация миозина 1,5—3 мг/мл

деляется за «бесконечно большой» промежуток времени. (Однако это «бесконечно большое» время должно все же быть значительно меньше, чем 20—30 с, так как иначе уже начнет сказываться стационарная скорость гидролиза.) Экспериментальная зависимость Лимна и Тейлора приведена на рис. 38.

Построив зависимость эффективной константы k от концентрации субстрата, Лимн и Тейлор получили кривую (рис. 39), аналогичную зависимости Михаэлиса—Ментен.

Для интерпретации своих результатов Лимн и Тейлор предложили следующую схему:



где M — миозин; P — продукты; S — субстрат (MgATФ); MS и MP — миозин-субстратный и миозин-продуктный комплексы соответственно.

Затем, рассчитав в схеме (9.2) зависимость от времени концентрации MP на молекулу миозина, Лимн и Тейлор получили формулу (9.1), причем эффективная константа в показателе экспоненты получилась следующей:

$$k = \frac{k_1 k_2 S}{k_{-1} + k_2 + k_1 S}. \quad (9.3)$$

Нужно сказать, что это выражение получено в предположении, что $k_{-2} \gg k_3$. Веских доказательств справедливости такого предположения у Лимна и Тейлора в то время не было, они основывались только на отсутствии в системе ресинтеза АТФ.

Формула (9.3) вполне удовлетворительно описывала экспериментальную зависимость эффективной константы k от концентрации субстрата S , и Лимн и Тейлор смогли сделать два важных вывода. Первый вывод следовал из формулы (9.3). Было ясно, что при бесконечно большой концентрации субстрата эффективная константа k просто равна k_2 , т. е. скорости гидролиза АТФ на миоине. Таким образом, Лимн и Тейлор определили константу скорости гидролиза АТФ миозином. Она оказалась $k_2 = 160 \text{ с}^{-1}$.

Второй вывод касался линейной зависимости эффективной константы $k(S)$ при малых концентрациях субстрата. В формуле (9.3) есть две возможности для описания такой зависимости: если $k_2 > k_{-1}$, то $k \approx k_1 S$; если же $k_2 < k_{-1}$, то $k = \frac{k_1}{k_{-1}} k_2 S$. Авторы не смогли сделать различия между этими двумя случаями на основании собственных результатов и интерпретировали линейную зависимость эффективной константы k от S при малых концентрациях АТФ как «кажущуюся» константу связывания субстрата с миозином. Измерения в эксперименте дали для этой константы значение $2 \cdot 10^6 \text{ моль}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$.

В 1973 г. Бакшоу и Трэнсем [83] измерили величину константы k_{-1} . Она оказалась меньше $0,02 \text{ с}^{-1}$. Это означает, что в экспериментах Лимна и Тейлора была измерена действительно константа связывания АТФ с миозином, т. е. $k = k_1 S$ и

$$k_1 = 2 \cdot 10^6 \text{ моль}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}.$$

Надо сказать, что Лимн и Тейлор не рассматривали другого возможного механизма этой вспышки начальной скорости гидролиза АТФ. Механизм этой вспышки мог бы быть таким: очень быстро происходит связывание субстрата с миозином, его гидролиз и сбрасывание продукта, но в результате сбрасывания продукта миозин переходит в какое-то измененное конформационное состояние, которое неспособно связывать субстрат. Затем с течением времени миозин возвращается к исходному состоянию, и именно этот переход и лимитирует скорость АТФазной реакции в стационарных условиях.

Этот второй механизм оказалось возможным окончательно исключить только после работ Трэнсема с сотрудниками [194], показавших отсутствие в реакционной среде быстрого выброса как фосфата, так и АДФ. В работе Трэнсема был получен еще один существенный результат, существенный именно с точки зрения приложения биохимии к динамике мышечного сокращения, т. е. сравнения биохимического и механического циклов: было доказано, что лимитирующей стадией процесса гидролиза АТФ на миоине является не сброс продукта, а конформационная перестройка миозин-продуктного интермедиатного комплекса (см. примечание на с. 104).

Авторами работы [194] были проделаны очень красивые опыты. Они использовали сопряженные ферментные системы, которые

позволяли регистрировать прямо в реакционной среде выделение фосфата и выделение АДФ. Сначала они измерили выход в среду фосфата во время реакции. Оказалось, что в системе миозин—АТФ (в своих экспериментах они использовали растворимый фрагмент миозина — тяжелый меромиозин) при физиологических условиях никакой быстрой вспышки выхода фосфата не наблюдается, фосфат сразу же выделяется со стационарной скоростью. Это означает, что диссоциация АДФ не может быть последней лимитирующей стадией. Иначе бы фосфат выбрасывался быстро и оставался долгоживущий комплекс миозин—АДФ. Регистрируя в этой же среде выброс АДФ (с помощью другой сопряженной системы), Трэнсем и его коллеги выяснили, что начальной вспышки АДФ тоже не наблюдается. Следовательно, и отщепление фосфата не может быть лимитирующей последней стадией. Соответственно они локализовали место лимитирующей стадии между гидролизом АТФ на миозине и диссоциацией продуктов. Но оставалась еще возможность того, что АДФ и фосфат диссоциируют вместе и именно это является лимитирующей стадией *. Тогда авторы измерили скорость диссоциации АДФ из комплекса, образованного просто при смешивании его с миозином. Получить такой комплекс легко, так как в этой системе равновесие довольно сильно смещено в сторону комплексообразования. Для измерения скорости распада этого комплекса они использовали аналог АТФ, так называемый тио-АТФ, который способен изменять спектр поглощения при связывании с активным центром фермента. Добавляя к созданному ими комплексу $M \cdot АДФ \cdot Ф$ тио-АТФ, они по кинетике изменения спектра видели, с какой скоростью тио-АТФ замещает АДФ в активном центре фермента. Известно, что константа скорости взаимодействия АТФ (а также тио-АТФ) с миозином очень велика, поэтому измеряемая в опыте зависимость характеризовала именно диссоциацию АДФ из комплекса. Измеренная таким образом константа скорости диссоциации АДФ оказалась равной $2,3 \text{ с}^{-1}$, т. е. примерно в 50 раз выше, чем стационарная скорость гидролиза АТФ миозином ($0,03—0,05$ оборотов в секунду). Таким образом, было показано, что кинетические свойства интермедиатного комплекса миозин—АДФ·Ф_n значительно отличаются от кинетических свойств такого же равновесного комплекса, т. е. комплекса, образованного из конечных продуктов. Это позволило сделать уже вполне обоснованное заявление о том, что лимитирующей стадией является конформационная перестройка миозин-интермедиатного комплекса. Перестройка эта длится примерно 20 с **.

* На самом деле возможен еще один случай: когда один из продуктов, например АДФ, диссоциирует медленно, так что лимитирующей стадией является именно его диссоциация, но при этом второй продукт сбрасывается сразу же вслед за первым. Однако этот случай практически неотличим от обсуждаемого.

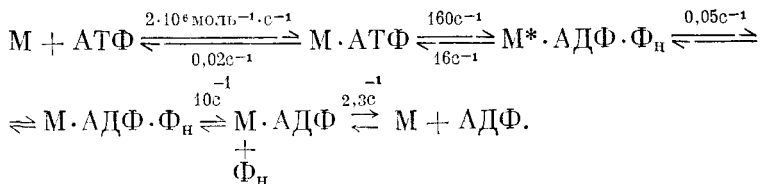
** Следует отметить, что результаты изложенных выше экспериментов доказывают, что лимитирующей стадией является именно конформационная пе-

Существование интермедиатного комплекса было показано и с помощью других методов, например метода спиновых меток. В работах Сидела и Гергели [184], а также Игнатъевой и др. [40] показано, что действительно интермедиатный миозин-продуктный комплекс, образовавшийся в ходе гидролиза АТФ, отличается по физическим свойствам, в частности по подвижности метки, прикрепленной к тиоловой группе S₁ миозина, от аналогичного комплекса, образованного при взаимодействии миозина с АДФ и фосфатом *. Существование интермедиатного комплекса можно обнаружить также методом флуоресценции [199].

Недавно появилась работа Ямады с сотр. [201], в которой калориметрически показано, что выделение энергии при гидролизе АТФ миозином происходит не во время расщепления АТФ на фосфат и АДФ, а с некоторой задержкой во времени, т. е. возможно, что этот долгоживущий миозин-интермедиатный комплекс способен запасать энергию гидролиза АТФ.

Таким образом, в настоящее время принято считать, что в результате гидролиза АТФ миозин переходит (вероятно, в момент связывания АТФ миозином или в момент расщепления АТФ на фосфат и АДФ) в некое долгоживущее состояние и лишь после того, как завершится конформационная перестройка комплекса миозина с АДФ и фосфатом, происходит диссоциация АДФ и фосфата от миозина, после которой возможно новое присоединение АТФ и повторение гидролитического цикла.

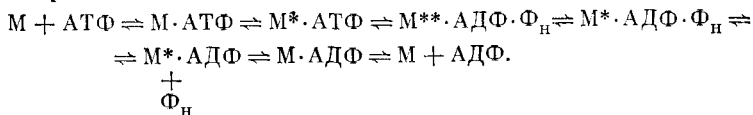
Мы не будем здесь останавливаться на довольно сложных, тонких и красивых опытах, с помощью которых были измерены остальные константы. Приведем просто схему гидролиза АТФ миозином, которая стала общепринятой после работ Трэнсема и его коллег [83, 194] **:.



рестройка долгоживущего интермедиата, а не диссоциация продуктов, лишь в предположении, что миозин-продуктный комплекс, образовавшийся в ходе реакции, обязательно проходит в своем развитии через стадию «равновесного», т. е. образованного из миозина и конечных продуктов реакции (см. об этом в [84]).

* См. также работы Сидела, Гергели [184], Э. К. Рууге и др. [58].

[** На основании дальнейших работ упомянутых авторов [82, 84, 85] сейчас можно написать более детальную схему гидролиза АТФ миозином:



В схеме проставлены значения всех известных к настоящему времени из работ Лимна и Тейлора и Трэнсема с сотрудниками констант скоростей. Как видим, константа процесса, обратного распаду миозин-продуктного комплекса, которую, как говорилось выше, Лимн и Тейлор предполагали малой, довольно велика, она равна 16 с^{-1} . Это означает, что свободная энергия комплексов $M \cdot \text{АТФ}$ и $M^* \cdot \text{АДФ} \cdot \text{Ф}_n$ примерно одинакова (концентрации их в равновесии различаются всего лишь на порядок, поэтому можно считать, что они по энергиям близки). Далее, промежуточный комплекс $M^* \cdot \text{АДФ} \cdot \text{Ф}$, образованный во время гидролиза АТФ, за очень долгое время, порядка 20 с (так как константа скорости равна $0,05 \text{ с}^{-1}$), переходит в обычный комплекс, который мог бы быть образован путем смешивания АДФ и фосфата с миозином, и затем этот комплекс уже сравнительно быстро диссоциирует после отделения неорганического фосфата на АДФ и миозин.

Мы до сих пор не касались вопроса о различии двух центров для связывания АТФ на миозиновой молекуле. Дело в том, что достаточно четких данных по этому вопросу пока нет. По результатам одних авторов получается, что эти центры работают по отдельности, т. е. в каждый данный момент может работать только один центр; другие авторы считают, что оба центра могут работать одновременно и совершенно одинаково; в то же время из некоторых опытов можно сделать вывод, что центры независимы, но разные.

В общем эта проблема пока не решена, хотя ясно, что она имеет чрезвычайно важное значение для понимания того, как функционирует мышца, т. е. как взаимодействует миозиновый мостик с актином.

Глава 10

ЦИКЛИЧЕСКИЙ МЕХАНИЗМ ГИДРОЛИЗА АТФ АКТОМИОЗИНОМ

10.1. Экспериментальные данные

Перейдем теперь к механизму гидролиза АТФ актомиозином, а точнее, к механизму активации актином АТФазы миозина, ибо известно, что если к миозину в физиологических условиях добавить актин в фибриллярной форме, то скорость гидролиза резко возрастает.

Надо сказать, что серьезное изучение этой проблемы стало возможным лишь благодаря достижениям последних лет, когда в 60-х годах Эбаши и его коллеги [102, 103, 105] обнаружили, что в актомиозиновых системах присутствует комплекс регуляторных

белков, и научились очищать актомиозин от этих белков. Биохимическое поведение свободного от регуляторных белков (так называемого искусственного) актомиозина оказалось гораздо проще, чем актомиозина исходного. Так, его поведение одинаково как в присутствии, так и в отсутствие Ca^{2+} , он подчиняется кинетике Михаэлиса — Ментен, т. е. не проявляет субстратного ингибирования и т. д. Поэтому стало возможным установить основные закономерности кинетики гидролиза АТФ.

Уже после того, как поведение нерегулируемых систем в общих чертах было выяснено, исследователи смогли снова вернуться к реконструированной, с регуляторными белками, системе. Этим исследованиям мы посвятим следующую, одиннадцатую, главу, а здесь мы рассмотрим только нерегулируемые актомиозиновые системы.

При исследовании этой системы, как и в случае миозина, существенных успехов удалось добиться лишь после того, как опыты стали проводить с растворимым при физиологических условиях акто-тяжелым меромиозином (акто-НММ, но в дальнейшем, как и раньше, употребляется термин «актомиозин»). Все началось с того, что в 1968 г. Айзенберг и Мус [108] исследовали, как зависит скорость гидролиза АТФ в системе акто-НММ от концентрации актина, и обнаружили интересную закономерность, которая в дальнейшем очень помогла при анализе этой реакции.

Они заметили, что если построить зависимость обратной величины скорости гидролиза АТФ, рассчитанной на одну молекулу миозина, от обратной концентрации актина, то эта зависимость линейна. На рис. 40 приведен один из таких графиков для нескольких концентраций АТФ, взятый из работы Айзенберга и Муса [109].

Экстраполяция указанной прямой до пересечения с осью ординат (что соответствует бесконечной концентрации актина) позволяет определить максимальную скорость w''_{\max} при бесконечной активации актином для данной концентрации АТФ. Зависимость обратной скорости гидролиза от обратной концентрации субстрата MgATP также была линейной (ряд таких зависимостей показан на рис. 40, а, взятом из той же работы Айзенберга и Муса [109]). Ясно, что при этом и зависимость $1/w''_{\max}$ от $1/[\text{MgATP}]$ будет линейной, а экстраполяция ее к бесконечной концентрации субстрата дает нам максимальную скорость АТФазной реакции (рис. 41). Обратная величина максимальной скорости $1/w''_{\max}$ в точке пересечения с осью ординат равна

$$\frac{1}{w''_{\max}} \approx 0,22 \left(\frac{\text{мкмоль } P_{\text{H}}}{\text{мгНММ} \cdot \text{мин}} \right)^{-1} \approx \frac{1}{25\text{с}^{-1}},$$

т. е. актин при бесконечно высоких концентрациях актина и АТФ должен активировать миозиновую АТФазу примерно в 200 раз.

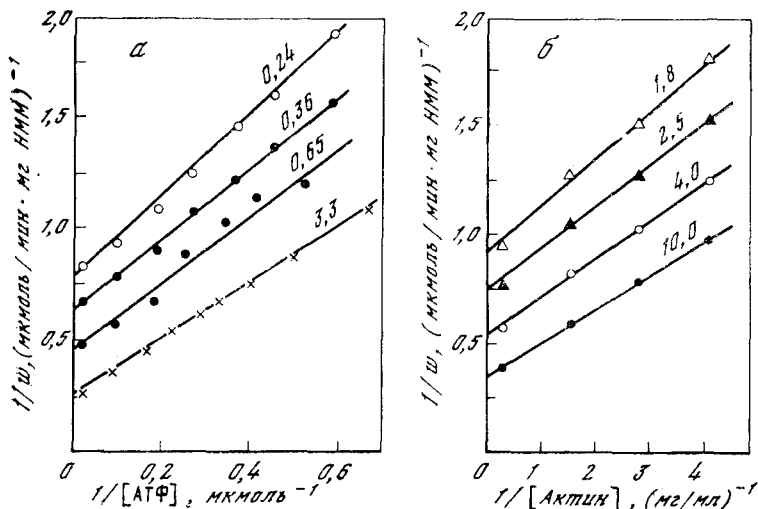


Рис. 40. Зависимости обратной скорости $1/w$ гидролиза АТФ, рассчитанной на мг НММ, в системе акто-НММ [109]

а — от обратной концентрации АТФ при фиксированных концентрациях актина (концентрации актина в мг/мл указаны у кривых);

б — от обратной концентрации актина при фиксированных концентрациях АТФ (концентрации АТФ в мкмоль указаны у кривых).

Условия: 2,5 ммоль $MgCl_2$, 2,5 ммоль креатин-фосфата; 1 мг/мл креатин-киназы; 0,036 мг/мл НММ, 25° С

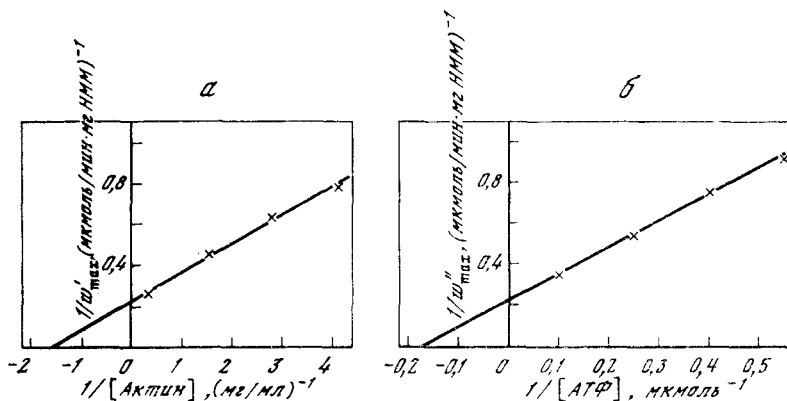


Рис. 41. Обратная скорость $1/w_{max}$ гидролиза АТФ, рассчитанная на мг НММ, в системе акто-НММ [109]

а — при бесконечной концентрации АТФ как функция обратной концентрации актина;

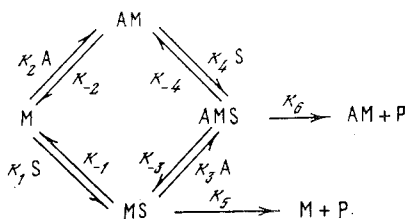
б — при бесконечной концентрации актина как функция обратной концентрации АТФ.

Значения w_{max} , w_{max}'' взяты из точек пересечения с осью ординат кривых на рис. 40, а и б соответственно

При этом пересечение с осью абсцисс на рис. 41, а даст нам равновесную константу диссоциации акто-НММ при бесконечной концентрации АТФ: $K_{\text{дис}} \approx 13$ мкмоль; из соответствующей величины на рис. 41, б мы получим константу Михаэлиса для АТФазы акто-НММ при бесконечной концентрации актина: $K_M \approx 6$ мкмоль.

Давно уже было известно некоторое парадоксальное явление: актин значительно активирует АТФазу миозина, но в присутствии АТФ актомиозиновый комплекс диссоциирован. Если в отсутствие субстрата актин полностью связан с миозином, то в присутствии субстрата и особенно при достаточно высокой его концентрации наблюдается практически полная диссоциация, — это показано самыми различными методами, включая такие физические

Рис. 42. Схема Айзенберга и Муса для гидролиза АТФ актомиозином [109]



методы, как измерение вязкости, светорассеяния и пр. Тем не менее скорость АТФазной реакции в такой системе гораздо выше, чем скорость гидролиза АТФ чистым миозином. Возникает вопрос: каким образом актин может активировать миозиновую АТФазу, если он не образует комплекса с миозином.

Чтобы объяснить свои результаты, Айзенберг и Мус предложили схему, приведенную на рис. 42. Это слегка видоизмененная традиционная схема работы фермента с модификатором: когда модификатор (здесь это актин) связан с белком (миозин), то ферментативная активность белка повышается; при этом, чтобы обойти парадокс с диссоциацией, Айзенберг и Мус дополнительно предположили, что присоединение к миозину субстрата изменяет его сродство к модификатору. Тогда даже при высоких концентрациях АТФ, когда актин и миозин в сильной степени диссоциированы, расщепление АТФ все равно может быть практически полностью обусловлено гидролизом на комплексе миозина с «модификатором» (актином), если этот комплекс гидролизует АТФ в достаточное количество раз быстрее, чем миозин (т. е. $k_6 \gg k_5$). Для того чтобы получить в этой схеме линейные зависимости обратной скорости гидролиза от обратной концентрации актина и АТФ, Айзенбергу и Мусу пришлось наложить еще несколько ограничений на сравнительные величины констант. В конце концов схема позволила объяснить их экспериментальные результаты, хотя и получилась довольно сложной.

10.2. Циклическая схема актомиозиновой АТФазы

В 1971 г. Букатина и Дещеревский [8, 10, 11] предположили, что описанная Айзенбергом и его коллегами зависимость скорости гидролиза АТФ от концентрации актлина обусловлена очень простым механизмом, а именно, что каждый ферментативный акт гидролиза АТФ представляет собой полный цикл взаимодействия актлина и миозина и, следовательно, не может быть приписан ни одной отдельной стадии цикла (и в том числе ассоциированному состоянию миозина, как это делали Айзенберг и Мус).

Это простое предположение является прямым следствием общеизвестного факта циклической работы мостиков в поперечно-полосатой мышце. Из механизма скольжения нитей ясно, что в процессе сокращения мышцы поперечные мостики должны работать циклически — замыкаться и размыкаться. Поэтому элементарным сократительным актом является цикл взаимодействия одного миозинового мостика с актином. Так как энергопродукция мышцы возрастает во время ее укорочения, т. е. при увеличении числа элементарных сократительных актов, то можно считать, что определенное число молекул АТФ гидролизуются в ходе каждого цикла взаимодействия актлина и миозина [147].

Естественно было ожидать, что основные закономерности ферментативной кинетики расщепления АТФ растворами мышечных белков также определяются циклическим характером взаимодействия актлина и миозина. Подобная мысль была высказана Сент-Дьёрдьи [188] еще в 1968 г., однако при количественном описании кинетики гидролиза АТФ эти представления не использовались.

Как мы уже видели в предыдущем разделе, прилагалось немало усилий, чтобы объяснить основные законы ферментативной кинетики акто-НММ в рамках традиционного представления об актине как аллостерическом регуляторе, который, присоединяясь к миозину, увеличивает его активность.

В этом разделе ферментативные свойства актомиозиновых систем будут рассмотрены в рамках циклической схемы Букатиной—Дещеревского (в дальнейшем будем называть ее «циклической схемой»).

Сначала сформулируем основные положения циклической схемы, выясним, что она может дать при анализе ферментативной кинетики актомиозиновых систем, а затем проанализируем с ее помощью известные экспериментальные зависимости.

Ясно, что полный механохимический цикл мышечных белков состоит из большого числа элементарных стадий взаимодействия актлина и миозина с низкомолекулярными компонентами и друг с другом. В аналитических целях выделим существенные стадии этого цикла.

Для упрощения анализа актомиозиновые системы в зависимости от состояния миозина были разделены на два типа: первый тип —

структурированные системы и второй тип — неструктурированные. К системам первого типа относятся все системы, в которых миозин, как и в мышце, организован в нити. Это — актомиозин при ионных силах, меньших 0,3, миофибриллы, глицеринизированные волокна, интактные мышцы. К системам второго типа относятся системы, в которых миозин существует в виде отдельных молекул. Это — актомиозин при ионных силах, больших 0,3, акто-НММ, актосубфрагмент-1.

Проанализируем существенные состояния по каждому типу систем в отдельности. Для описания ферментативных свойств систем первого типа может быть использована кинетическая модель, предложенная ранее для описания сокращения поперечно-полосатой мышцы, в которой введен цикл * из трех состояний (рис. 43):

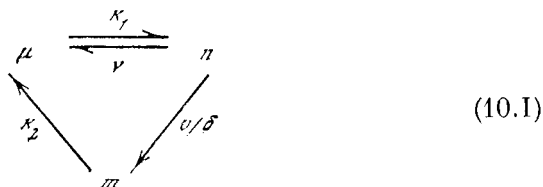


Рис. 43. Циклическая схема для гидролиза АТФ структурированными актомиозиновыми системами

В этом цикле, цикле для структурированных систем, очень существенно наличие двух состояний замкнутого мостика n и m . В первом из них мостик является источником развиваемой силы и скольжения нитей. Затем он переходит в тормозящее состояние m вследствие скольжения нитей за счет силы, развиваемой соседними мостиками; μ — свободный миозин; ν — скорость относительного скольжения нитей; δ — величина структурной перестройки; κ_1 и ν — эффективные константы скорости процессов образования и диссоциации актомиозинового комплекса.

Процесс образования связи между актином и миозином в структурированных системах подчиняется мономолекулярной кинетике, так как около свободного миозинового центра может находиться только не связанный с миозином активный центр. Поэтому в цикл (10.1) не входит концентрация актина a .

Для неструктурированных систем состояние m отсутствует, а концентрация актина существенна. Следовательно, для этих

* Этот цикл является основой рассмотренной в первой части книги кинетической модели мышечного сокращения (см. рис. 8). Пользуясь этим циклом, мы смогли рассчитать динамику сокращения поперечно-полосатой мышцы μ , сопоставляя расчеты с экспериментальными данными, определить характеристические параметры цикла. Здесь этот цикл записан в несколько иных обозначениях.

систем цикл состоит из двух существенных состояний:

$$\alpha + \mu \stackrel{k_1}{\rightleftharpoons} n. \quad (10.11)$$

В циклах (10.1) и (10.11) введены только существенные состояния, и очевидно, что переходы между этими состояниями включают целый ряд элементарных процессов; поэтому константы скоростей переходов заведомо не являются элементарными, а имеют смысл эффективных*.

Запишем выражение для скорости гидролиза АТФ в наших циклах. Будем считать, что в каждом цикле гидролизуется строго определенное число молекул АТФ Z . Тогда стационарная скорость циклической (актомиозиновой) АТФазы будет равна

$$W_{\text{ц}} = NZ, \quad (10.1)$$

где N — частота актов взаимодействия актина и миозина.

Можно рассчитать стационарную скорость для обоих циклов. Для цикла (10.11) в стационарном случае

$$d\mu/dt = 0,$$

причем $\alpha = \alpha_0 - n$, $\mu = \mu_0 - n$, где α_0 , μ_0 — полные концентрации актина и миозина соответственно. Тогда

$$-(\alpha_0 - n)(\mu_0 - n)k_1 + n\nu = 0.$$

Определив отсюда n , легко рассчитать частоту актов взаимодействия актина и миозина $N = \nu n$ и стационарную скорость циклической АТФазы

$$W_{\text{ц}}^{\text{II}} = \nu n Z = \frac{\nu Z}{2} \left[\alpha_0 + \mu_0 + \frac{\nu}{k_1} - \sqrt{\left(\alpha_0 + \mu_0 + \frac{\nu}{k_1} \right)^2 - 4\alpha_0\mu_0} \right]. \quad (10.2)$$

Аналогичным образом для цикла (10.1) можно получить

$$W_{\text{ц}}^{\text{I}} = \frac{k_1 [\nu + k_2 (v/v_{\text{max}})]}{k_1 + \nu + (k_1 + k_2)(v/v_{\text{max}})} \mu_0 Z. \quad (10.3)$$

Формула (10.3) дает скорость гидролиза АТФ в структурированных актомиозиновых системах как функцию скорости относительного движения актиновых и миозиновых нитей. Из (10.3) следует, что при $v = 0$

$$W_{\text{ц}}^{\text{I}} = \frac{k_1}{k_1 + \nu} \mu_0 \nu Z. \quad (10.4)$$

Ясно, что формула (10.4) описывает кинетику АТФазной реакции актомиозина, миофибрилл и мышечных волокон при условии отсутствия в них механических изменений в процессе гидролиза

* В разделе 11.2 мы расшифруем эти эффективные константы и выразим их через константы скоростей элементарных процессов. Однако здесь оказывается более полезным пользоваться эффективными константами.

АТФ, т. е. в изометрических условиях. В нативной мышце в условиях максимальной активации $v \ll k_2$, а k_1 и k_2 одного порядка (см. разделы 6.3 и 7.4). В этих условиях АТФазная активность сократительного аппарата мышц, описываемая формулой (10.3), должна быть тем выше, чем больше скорость сокращения, что согласуется с данными по энергопродукции мышцы [129]. Аналогичным механизмом, по-видимому, объясняется повышенная АТФазная активность миофибрилл [191, 198] и актомиозина [147] в первый период после начала реакции, сопровождающийся механическими изменениями этих систем (укорочение миофибрилл, суперпреципитация актомиозина). Кроме того, механически равновесное состояние структурированной системы должно быть аналогично суперсокращенному состоянию саркомера в следующем смысле: механическое равновесие в такой системе наступает тогда, когда активная движущая сила, пропорциональная числу контактов между данной актиновой и миозиновой нитями, оказывается скомпенсированной встречными упругими силами, возникающими при сминании неперекрывающихся концов нитей. Очевидно, что число актомиозиновых контактов в этом состоянии должно быть меньше, чем в исходной случайно перемешанной, а возможно, и в определенной мере ориентированной вандерваальсовыми электростатическими силами системе актиновых и миозиновых нитей. Это явление может быть ответственно также за снижение стационарной скорости АТФазы по сравнению с нестационарной в структурированных системах.

Рассмотрим теперь неструктурированные актомиозиновые системы. Учитывая, что скорость гидролиза АТФ в актомиозиновых системах является суммой циклической и миозиновой АТФаз, мы можем переписать (10.2) в следующем виде:

$$W = W_{II} + \mu w_{\mu} = \frac{vZ}{2} \left[\alpha_0 + \mu_0 + \frac{v}{k_1} - \sqrt{\left(\alpha_0 + \mu_0 + \frac{v}{k_1} \right)^2 - 4\alpha_0\mu_0} \right] + \mu w_{\mu}, \quad (10.5)$$

где w_{μ} — удельная АТФазная активность свободного миозина.

При сильно различающихся концентрациях актина и миозина формула (10.5) сильно упрощается.

В самом деле, при $\alpha_0 \gg \mu_0$ можно считать $\alpha_0 - n \approx \alpha_0$. Тогда уравнения стационарной кинетики дадут

$$\frac{d\mu}{dt} = 0, \quad \text{т. е.} \quad n = \frac{\alpha_0 \mu_0 k_1}{\alpha_0 k_1 + v}.$$

Далее, учитывая АТФазу миозина и то, что $N = vn$ и $\mu = \mu_0 - n$, можно записать для стационарной скорости

$$W = \frac{\alpha_0 \mu_0 k_1 v}{\alpha_0 k_1 + v} Z + \frac{v}{\alpha_0 k_1 + v} \mu_0 w_{\mu}. \quad (10.6)$$

Аналогичным образом для случая $\mu_0 \gg \alpha_0$ получается

$$W = \frac{\alpha_0 \mu_0 k_1 v}{\mu_0 k_1 + v} Z + \mu_0 w_\mu. \quad (10.7)$$

(Выражения (10.6) и (10.7) можно получить и просто разлагая в ряд подкоренное выражение в (10.5) при соответствующих предположениях.)

При избытке актина стационарная скорость гидролиза описывается формулой (10.6). При этом удельная АТФазная активность, т. е. активность, рассчитанная на одну молекулу миозина, равна

$$w = \frac{\alpha_0 k_1 v}{\alpha_0 k_1 + v} Z + \frac{v}{\alpha_0 k_1 + v} w_\mu. \quad (10.8)$$

Тогда разность удельных АТФазных активностей актомиозина и чистого миозина $w - w_\mu$ будет иметь вид

$$w - w_\mu = \frac{\alpha_0 k_1}{\alpha_0 k_1 + v} (vZ - w_\mu). \quad (10.9)$$

Такой характер зависимости (10.9) позволяет сделать два важных вывода.

Во-первых, из (10.8) ясно, что при бесконечной концентрации актина ($\alpha_0 \rightarrow \infty$) удельная АТФазная активность

$$w \rightarrow w_\infty = vZ. \quad (10.10)$$

С учетом (10.10) из формулы (10.9) следует возможность как активации миозиновой АТФазы актином (при $vZ > w_\mu$), так и ингибирования (при $vZ < w_\mu$). Известно, что при низких концентрациях Mg^{2+} актин ингибирует АТФазную активность НММ [180]. Поскольку предполагается [166], что для распада актомиозинового комплекса необходим $MgATP$, то уменьшение концентрации Mg^{2+} приведет к уменьшению эффективной константы диссоциации v . Поэтому в излагаемой схеме ингибирование АТФазной активности миозина актином получает простое объяснение.

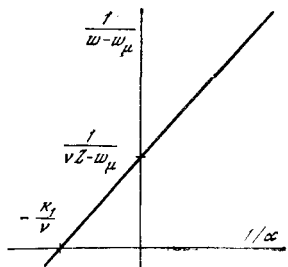
Во-вторых, наблюдавшееся Айзенбергом и его коллегами экспериментальные зависимости скорости АТФазной реакции от концентрации актина следуют из схемы автоматически. В самом деле, перепишем (10.9) в обратных величинах:

$$\frac{1}{w - w_\mu} = \frac{v/k_1}{\alpha_0 (vZ - w_\mu)} + \frac{1}{vZ - w_\mu}. \quad (10.11)$$

На рис. 44 построена зависимость типа (10.11). Точка пересечения с осью ординат, очевидно, даст нам $1/(vZ - w_\mu)$, а пересечение с осью абсцисс — значение дроби k_1/v . Таким образом, равновесная константа диссоциации (см. раздел 10.1) равна отношению эффективных констант скоростей процессов диссоциации и образования актомиозинового комплекса

$$v/k_1 = K_{дис}. \quad (10.12)$$

Рис. 44. Иллюстрация способа определения кинетических констант схемы из зависимости скорости гидролиза АТФ от концентрации актина в двойных обратных координатах



При достаточно сильной активации миозиновой АТФазы актином, т. е. при $vZ \gg w_\mu$, зависимость (10.11) переходит в (10.13):

$$\frac{1}{w - w_\mu} = \frac{K_{\text{дис}}}{vZ} \frac{1}{\alpha_0} + \frac{1}{vZ}. \quad (10.13)$$

Тогда экспериментальные данные Айзенберга и его коллег [86, 109, 180] позволяют нам определить численные значения эффективных констант предлагаемой циклической схемы для различных концентраций АТФ и выяснить, как они зависят от концентрации КС1, от суммарной ионной силы, от температуры. При вычислениях были приняты молекулярные веса для НММ 350 000, для актина 46 000 и Z считали равным единице.

По данным [109] (рис. 45) были вычислены v , k_1 и $K_{\text{дис}}$ при разных концентрациях АТФ. В исследованном диапазоне изменения концентраций АТФ k_1 постоянна и равна $3 \cdot 10^5$ моль $^{-1} \cdot$ с $^{-1}$, значения v и $K_{\text{дис}}$ приведены в табл. 2.

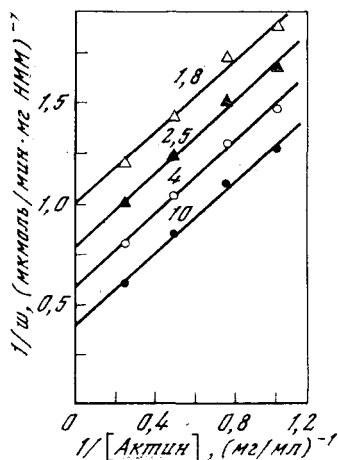
Видно, что увеличение концентрации АТФ от 1,8 до 10 мкмоль действительно увеличивает эффективную константу v и не влияет на константу k_1 . Следовательно, изменения константы диссоциа-

Таблица 2

АТФ, мкмоль	v , с $^{-1}$	$K_{\text{дис}} \cdot 10^5$, моль
1,8	5,8	1,9
2,5	7,4	2,5
4,0	10,0	3,4
10,0	14,8	5,0

Рис. 45. Зависимость обратной скорости гидролиза АТФ $1/w$ системой акто-НММ от обратной концентрации актина при различных фиксированных концентрациях АТФ [109]

Условия те же, что и на рис. 40, б, за исключением ионной силы: здесь добавлено 20 ммоль КС1. Концентрация АТФ в мкмоль указана у кривых



ции $K_{\text{дис}}$ с концентрацией АТФ определяются влиянием АТФ на процесс распада комплекса (вспомним, что Айзенбергу и Мусу пришлось, кроме того, постулировать изменение и константы ассоциации миозина с актином при добавлении АТФ). Отсюда следует простое объяснение парадокса одновременных диссоциации актомиозинового комплекса и активации при этом миозиновой АТФазы: с точки зрения предложенной циклической схемы увеличение скорости гидролиза АТФ при повышении его концентрации является прямым следствием увеличения скорости распада комплекса (см. формулу (10.2)).

Применение циклической схемы к экспериментальным данным других авторов, Бароуха и Муса [86], позволило внести ясный физический смысл и в результаты исследований температурной зависимости активации миозиновой АТФазы актином. Экспериментальные данные этих авторов (рис. 46) свидетельствуют о сильном влиянии температуры на активацию АТФазы при концентрациях актина $\alpha_0 \rightarrow \infty$. Поскольку $w_\infty = vZ$ (см. формулу (10.10)), эти данные говорят о высокой энергии активации процесса диссоциации акто-НММ под действием АТФ. На рис. 47 приведена кривая Аррениуса, на основании которой Бароух и Мус [86] рассчитали энергию активации максимальной скорости, т. е., как мы теперь понимаем, энергию активации процесса диссоциации акто-НММ под действием АТФ. Она оказалась равной ≈ 28 ккал/моль. Интересно отметить, что эта энергия активации не зависит от ионной силы.

Соответствующая константа скорости v также не зависит от ионной силы (это хорошо видно из приведенных на рис. 48 экспериментальных кривых из работы Риззино с сотр. [180]). В то же время известно, что нелинейная зависимость логарифма равновесной константы диссоциации $K_{\text{дис}}$ от температуры изменяется с изменением ионной силы. (На рис. 49 мы приводим график из работы Бароуха и Муса [86], на основании которого сделан этот вывод.) Так как из циклической схемы известно, что $K_{\text{дис}} = v/k_1$, где k_1 — константа скорости ассоциации актина и миозина (см. формулу (10.12)), то все сказанное выше позволяет сделать вывод о сложности процесса ассоциации и о его зависимости от ионной силы. Ниже приведены значения константы скорости ассоциации k_1 и ее средней энергии активации, рассчитанные для различных ионных сил по данным Бароуха и Муса [86].

Ионная сила	0,017	0,027	0,036	0,045
$k_1 \cdot 10^{-5}$, моль $^{-1} \cdot$ с $^{-1}$	11,7	4,2	1,7	1,0
E_1 , ккал/моль	19,0	22,0	26,0	27,0

Из этих данных видно уменьшение константы k_1 и увеличение средней энергии активации этой константы с ростом ионной силы. Вычисления проведены для 15°C ; при этих значениях ионной силы константа скорости процесса диссоциации v и его энергия активации E_v постоянны и равны $7,4 \text{ с}^{-1}$ и 28 ккал/моль соответственно.

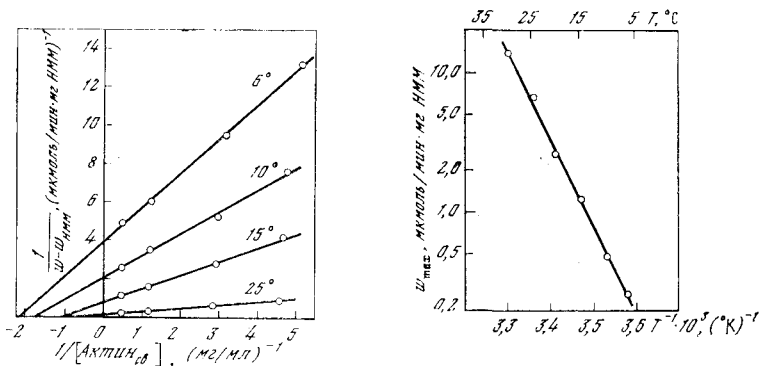


Рис. 46. Влияние температуры на построенную в двойных обратных координатах зависимость скорости гидролиза АТФ системой акто-НММ от концентрации актина [86]

Все образцы содержали: 2,0 ммоль АТФ; 2,4 ммоль $MgCl_2$; 6,9 ммоль имидазольного- HCl буфера (рН 7) и 12,7 ммоль KCl , так что полная ионная сила $I = 0,027$. Температура указана у кривых; при каждой температуре использованы разные концентрации миозина: от 0,045 до 0,56 мг/мл

Рис. 47. Зависимость Арреншуса для АТФазной активности акто-НММ [86]

Условия такие же, как на рис. 46; w_{max} определяли из точек пересечения с осью ординат кривых, аналогичных показанным на рис. 46

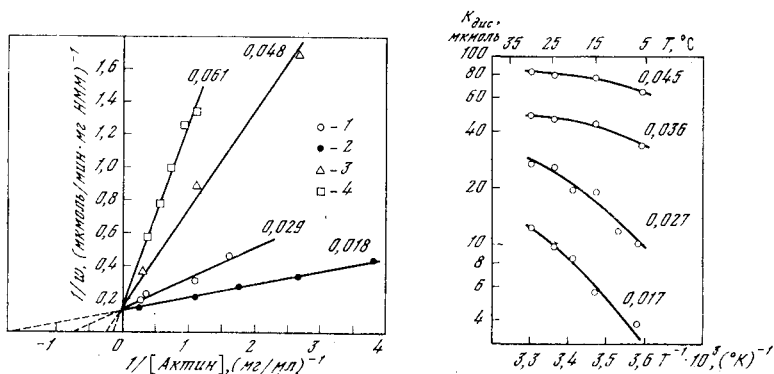


Рис. 48. Зависимость обратной скорости АТФазной реакции акто-НММ от ионной силы [180]

Полная ионная сила указана на каждой прямой. Образцы содержали: 2 ммоль АТФ; 2,4 ммоль (1—3) или 1,0 ммоль (4) $MgCl_2$; 10 ммоль имидазольного буфера (рН 7); KCl добавляли до нужных значений ионной силы. Концентрация НММ были: 0,04 мг/мл для кривых 1, 2 и 0,08 мг/мл для 3, 4. Температура 25° С

Рис. 49. Зависимость от температуры равновесной константы диссоциации для взаимодействия актина с НММ при различных ионных силах [86]

Значения ионной силы указаны на кривых; $1/K_{дис}$ вычисляли из точек пересечения с осью абсцисс кривых, аналогичных показанным на рис. 46; молекулярный вес актина при расчетах полагали равным 46 000. Экспериментальные условия: 2,0 ммоль $MgATP$; 2,4 ммоль $MgCl_2$; 3,7 ммоль имидазольного буфера (рН 7); концентрацию KCl варьировали от 2 до 32 ммоль

Устойчивость константы ν к внешним воздействиям, по-видимому, свидетельствует об относительной простоте процесса диссоциации комплекса под действием АТФ по сравнению с процессом ассоциации. Таким образом, можно предполагать, что при высоких концентрациях АТФ диссоциация акто-НММ является одноступенчатым высокobarьерным процессом.

Диссоциация актомиозинового комплекса в структурированных системах может иметь значительно меньший барьер в условиях, когда возможны относительные перемещения миозиновых и актиновых нитей, так как в этих условиях возможно использование энергии гидролиза АТФ на одном активном центре для создания «напряженной» конформации (см. схему (10.1) на другом центре ассоциации (см. раздел 6.3). Действительно, энергия активации процесса диссоциации «напряженного» состояния актомиозинового комплекса, определяемая по данным Хилла [129] о зависимости максимальной скорости сокращения мышцы от температуры (так как $v_{\max} = k_2\delta$, см. раздел 3.1), равна 13 ккал/моль, что значительно меньше выясненной в нашей работе энергии активации процесса диссоциации «устойчивого» состояния этого комплекса.

Снижение барьера для процесса диссоциации комплекса, ускорение этого процесса при деформации комплекса вследствие относительного перемещения актиновых и миозиновых нитей имеют, по-видимому, важное значение для функционирования сократительного аппарата мышц. Этот механизм увеличивает коэффициент полезного действия при трансформации энергии гидролиза АТФ в механическую работу, поскольку он делает маловероятным замыкание поперечного мостика до завершения активной конформационной перестройки актомиозинового комплекса, являющейся источником движущей силы.

Итак, предложенный механизм, согласно которому ферментативный акт гидролиза АТФ требует полного цикла взаимодействия актина и миозина, не противоречит экспериментальным данным и дает простое объяснение ряду явлений (ингибирование актином при низких концентрациях Mg^{2+} , одновременное увеличение скорости гидролиза АТФ и константы диссоциации актомиозинового комплекса при повышении концентрации АТФ [109] или температуры [86]).

Однако все эти явления могли быть интерпретированы и в рамках традиционных представлений [109, 180]. Действительно, если высокой ферментативной активностью обладает комплекс актомиозина, то стационарная скорость гидролиза АТФ выражается следующим образом:

$$w = \frac{n}{\mu_0} w_n + \frac{\mu}{\mu_0} w_{\mu} = \frac{\alpha_n k_1}{\alpha_n k_1 + \nu} w_n + \frac{\nu}{\alpha_n k_1 + \nu} w_{\mu}, \quad (10.14)$$

где w_n — скорость гидролиза АТФ стабильным комплексом актомиозина. Из сравнения (10.14) и (10.8) видно, что они эквивалентны при $\nu Z = w_n$. Поэтому в рамках стационарной кинетики эти

схемы неразличимы. Только исследование определенных нестационарных режимов могло дать возможность исключить один из этих механизмов.

Итак, применение предложенной схемы к описанию ферментативных свойств актомиозиновых систем правомерно, хотя и не доказана единственность такого подхода. Достоинством изложенного подхода является его общность: сократительные, энергетические и биохимические свойства интактных и экстрагированных мышц и мышечных белков рассматриваются с единой точки зрения.

10.3. Схема Лимна и Тейлора

Циклическая схема актомиозиновой АТФазы, изложенная в предыдущем разделе, была, пожалуй, первой попыткой связать биохимию с механикой, т. е. биохимический цикл гидролиза АТФ — с образованием и распадом актомиозинового комплекса. Независимо в это же время Лимн и Тейлор, основываясь на своих исследованиях с использованием методов нестационарной кинетики, предложили детальную схему гидролиза АТФ актомиозином.

Что же сделали Лимн и Тейлор? Во-первых, они заметили из работ Айзенберга и его коллег, что максимальная скорость гидролиза АТФ актомиозином при бесконечной концентрации актина все-таки гораздо ниже, чем константа скорости гидролиза АТФ на чистом миозине ($w''_{\max} \approx 25 \text{ с}^{-1}$, тогда как константа скорости гидролиза на чистом миозине равна 160 с^{-1}). Поэтому они предположили, что актин ускоряет не стадию гидролиза АТФ, как предполагали Айзенберг и Мус, а самую медленную стадию — стадию сброса продукта. Это предположение Лимна и Тейлора и было руководящей идеей всего опыта.

Методами нестационарной кинетики они исследовали продукцию фосфата в актомиозиновой системе и обнаружили, что на актомиозине, как и на миозине, при физиологических условиях наблюдается начальная вспышка гидролиза АТФ (рис. 50), причем величина этой вспышки примерно такая же, как и на миозине, т. е. от 1 до 2 моль АТФ на моль актомиозина, да и временные характеристики примерно такие же. Правда, константа связывания субстрата с актомиозиновым комплексом оказалась раза в 2 меньше, чем для чистого миозина, но максимальная скорость гидролиза АТФ в этой начальной стадии примерно равна константе скорости гидролиза на чистом миозине ($\sim 160 \text{ с}^{-1}$).

Второй принципиальный шаг, который сделали Лимн и Тейлор, заключался в том, что они определили скорость диссоциации актомиозинового комплекса под действием АТФ. Регистрировали они диссоциацию по уменьшению мутности раствора после быстрого смешивания актомиозинового комплекса с АТФ, при этом происходил почти мгновенный распад комплекса на актин и миозин. Скорость диссоциации зависела от концентрации АТФ линейно во

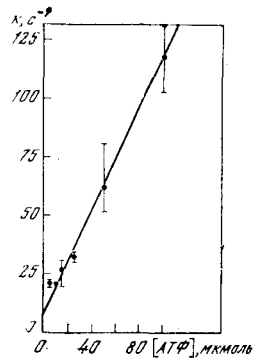
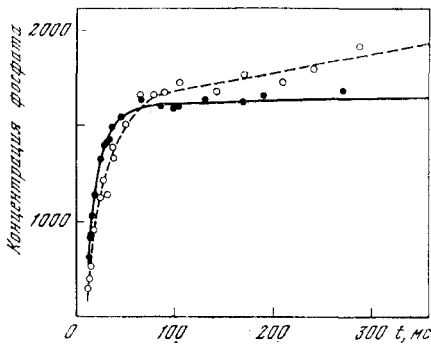


Рис. 50. Сравнение начальной вспышки АТФаз НММ (точки) и акто-НММ (кружки) [159]

Условия: 0,05 моль КСl; 0,02-молярный tris-HCl (рН 8); 20° С; $5 \cdot 10^{-3}$ моль $MgCl_2$; 25 ммоль АТФ; 4,8 моль актина на моль НММ; 1 мг/мл НММ. Точка пересечения экстраполяции линейной части с осью ординат соответствует начальной вспышке примерно 1,1 моль неорганического фосфата на моль НММ

Рис. 51. Зависимость скорости диссоциации акто-НММ от концентрации АТФ [159]

Условия: 0,05 моль КСl; $5 \cdot 10^{-3}$ моль $MgCl_2$; рН 8,0; 20° С; 35 моль актина на моль НММ; 5,7 мкмоль НММ. Каждая точка — среднее значение по крайней мере двух измерений. При концентрациях 5 мкмоль и ниже диссоциация неполная и концентрацию АТФ нельзя считать постоянной, поэтому эффективная константа скорости диссоциации не зависит линейно от концентрации АТФ

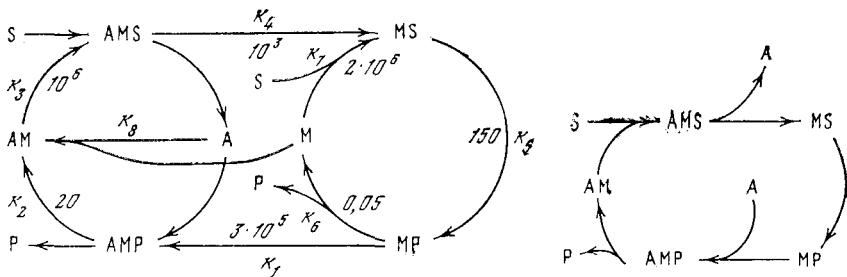


Рис. 52. Кинетическая диаграмма Лимна — Тейлора для гидролиза АТФ нерегулируемым актомиозином

М — миозин; А — актин; S — субстрат ($MgATP$); P — продукты реакции ($MgADP$ и неорганический фосфат); MS, MP, AM, AMS, AMP — различные комплексы актина и миозина друг с другом и с субстратом и различными продуктами; бимолекулярные константы k_1, k_3, k_4 имеют размерность моль $^{-1}$ ·с $^{-1}$; мономолекулярные k_2, k_4, k_5, k_8 — с $^{-1}$

Рис. 53. Рабочий цикл гидролиза АТФ актомиозином при избытке актина

всем исследованном диапазоне (рис. 51), т. е. время диссоциации было не больше, чем временное разрешение их установки (1 мс). Значит, в пределах точности опыта диссоциация комплекса определяется скоростью связывания АТФ с актомиозином. Константа скорости этого процесса равна 10^6 моль⁻¹·с⁻¹. Тогда при обычных физиологических концентрациях субстрата (порядка 1—5 ммоль) скорость диссоциации получается равной $(1 \div 5) \cdot 10^3$ с⁻¹, т. е. актомиозиновый комплекс распадается так быстро, что на нем не успевает гидролизываться АТФ, — гидролиз АТФ происходит на чистом миозине.

В соответствии с этим Лимн и Тейлор предложили схему гидролиза АТФ актомиозином. Мы приводим эту схему (рис. 52) несколько в ином виде, для того чтобы лучше подчеркнуть ее смысл.

Итак, Лимн и Тейлор смогли методами нестационарной кинетики измерить максимальную скорость гидролиза АТФ актомиозином (в обозначениях схемы рис. 52 это k_5) и оценить снизу константу скорости диссоциации актомиозинового комплекса (k_4). Эти оценки невозможно было сделать при анализе стационарной кинетики, проведенном нами в предыдущем разделе. Другие константы схемы, полученные нами, k_1 , k_2 и k_3 хорошо согласуются с соответствующими константами Лимна и Тейлора.

Проследим на рис. 52 развитие событий, начав, например, с комплекса актин—миозин. Комплекс присоединяет субстрат, очень быстро диссоциирует на миозин-субстрат и актин, и только после этого происходит гидролиз АТФ. Далее к этому миозин-продуктному комплексу либо присоединяется актин, либо может идти диссоциация продукта с миозина. Однако так как известно, что диссоциация продукта с миозина является очень медленным процессом, то при достаточной концентрации актлина у нас процесс будет идти в основном через актомиозиновый комплекс, т. е. будет «крутиться» цикл, показанный на рис. 53, и гидролизом АТФ на чистом миозине можно полностью пренебречь. Следовательно, при каждом акте образования и распада актомиозинового комплекса гидролизуется одна молекула АТФ.

Таким образом, можно считать, что схема гидролиза АТФ актомиозином в настоящее время почти ясна. Правда, это не детальная схема. Во-первых, она не учитывает последних открытий Трэнсема, Бакшоу и их коллег [82, 83, 85, 194], показавших, что существует целый набор миозин-продуктных интермедиатных комплексов. Конечно, они должны отличаться по своим кинетическим характеристикам, а именно по сродству к актину. Это не так давно было показано экспериментально в работе Иное и Тономуры [148]. Они смешивали небольшие количества АТФ с миозином, после чего через различные интервалы времени (порядка нескольких секунд) добавляли актин и обнаружили, что константа скорости образования актомиозинового комплекса зависит от интервала времени после первого смешивания. Из их результатов следовало,

что интермедиатный миозин-продуктный комплекс, который образуется после гидролиза АТФ, имеет малое сродство к актину, по с течением времени, по мере его эволюции, его сродство к актину растет. Ясно, что рассмотренные нами схемы не учитывали всего этого. Правда, на первом этапе, пожалуй, в этом и нет необходимости.

Во-вторых, Лимн и Тейлор, чтобы упростить схему, проводили свои исследования на актине, свободном от регуляторных белков. Как известно, если актин содержит регуляторные белки, поведение актомиозина при гидролизе АТФ сильно усложняется.

Итак, Лимн и Тейлор смогли экспериментально доказать справедливость гипотезы, предложенной в циклической схеме для объяснения данных по стационарной кинетике. Необходимость полного цикла взаимодействия актина и миозина для гидролиза каждой молекулы АТФ была доказана. Схема Лимна и Тейлора стала общепринятой.

Однако эта замечательная схема очень сложна и количественный анализ ее затруднителен [157]. В предыдущем разделе мы использовали для анализа стационарной кинетики гидролиза АТФ циклическую схему, которая представляет собой более простую формулировку основного принципа циклической работы мышечных белков.

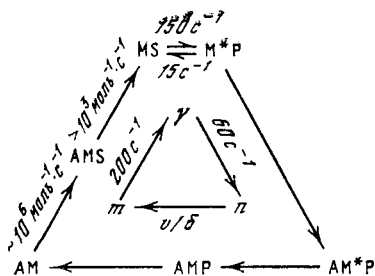
Как можно было видеть, применение даже такой простейшей формулировки оказалось достаточно плодотворным. В одиннадцатой главе на основании циклической схемы мы проведем анализ кинетики гидролиза АТФ в гораздо более сложных актомиозиновых системах, содержащих регуляторные белки. Там же эффективные константы циклической схемы будут расшифрованы через элементарные константы схемы Лимна и Тейлора.

10.4. Сопоставление механического и гидролитического циклов актомиозинового мостика в сокращающейся мышце

До сих пор мы рассматривали актомиозиновые системы, свободные от регуляторных белков. Известно, что в их присутствии поведение системы значительно усложняется. Однако далее (см. главу 11) мы увидим, что основные особенности кинетики регулируемых систем могут быть описаны без изменения качественной схемы биохимического цикла. Поэтому мы считаем возможным провести здесь попытку сопоставления пятистадийного биохимического цикла гидролиза АТФ (см. рис. 52) с трехстадийным механокинетическим циклом (см. рис. 8), постулированным в кинетической модели мышечного сокращения, установить примерное соответствие (рис. 54) между биохимическими и механическими состояниями, хотя количественное сравнение будет возможно лишь после рассмотрения регулируемых систем.

Рис. 54. Взаимное соответствие механического и гидролитического циклов актомиозинового мостика в сокращающейся мышце

Внутренний цикл: γ , n , m — мостик свободный и замкнутый в тянущем и тормозящем состояниях соответственно; внешний цикл: MS, M*P — комплексы миозина с субстратом и с продуктами реакции соответственно, AM, AMS, AM*P, AMP — актомиозиновый комплекс, этот же комплекс с субстратом и различные его комплексы с продуктами соответственно



Гидролиз АТФ, очевидно, происходит на стадии диссоциированного актомиозина, т. е. на свободном мостике, который биохимически представляет собой смесь двух состояний миозина MS и M*P, где MS — миозин-субстратный, а M*P — интермедиатный комплекс миозина с АДФ и фосфатом, образующийся в результате гидролиза MgАТФ на миозине и отличающийся конформационно и кинетически от комплекса MP аналогичного состава, но образованного в результате связывания фосфата и АДФ с миозином. Оба эти состояния заряжены свободной энергией (энергия MS примерно на 1,5 ккал/моль выше, чем энергия MP), однако в первом комплексе эта энергия в основном локализована в фосфоэфирной связи молекулы АТФ, а во втором — это уже конформационная энергия головки миозина. При взаимодействии M*P с актином (по-видимому, обычно в мышце только состояние M*P свободного мостика соединяется с актином) конформационная энергия миозина преобразуется в механическую работу, вызывая относительное смещение актиновых и миозиновых нитей (если этому смещению препятствует большая внешняя нагрузка, то конформационная энергия миозина переходит в тепло). Согласно механическому циклу, эта энергия выделяется на стадии тянущего мостика, который, таким образом, представляет собой смесь биохимических состояний AM*P и AMP. Тормозящее механическое состояние, очевидно, является смесью AMP, AM и AMS. Биохимический смысл «тормозящего» состояния — осуществить энергетически и, по-видимому, кинетически невыгодный процесс сброса продуктов (Φ_n и АДФ) с актомиозинового комплекса, в результате чего комплекс получает возможность утилизировать новую порцию энергии, присоединяя следующую молекулу АТФ. Энергия сорбции молекулы АТФ, по-видимому, тратится на диссоциацию актина и миозина, т. е. на переход мостика в свободное состояние, энергия гидролиза, как говорилось выше, — на создание энергетически заряженного конформационного состояния миозина.

КИНЕТИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ РЕГУЛЯЦИИ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ МЫШЕЧНЫХ БЕЛКОВ

11.1. Структура и особенности биохимической кинетики регулируемых актомиозиновых систем

В предыдущей главе мы говорили о кинетике гидролиза АТФ нерегулируемым актомиозином, т. е. актомиозином, не содержащим регуляторные белки. Однако хорошо известно, что сократимость мышцы и интенсивность гидролиза АТФ в ней сильно зависят от наличия кальция. С 60-х годов известно (см. работы Эбаши и его коллег [102, 103]), что кальциевая регуляция осуществляется благодаря наличию в тонкой нити комплексов регуляторных белков. Начиная с этого времени особенности функционирования регуляторных белков интенсивно исследуются. Сейчас известно, что каждый такой комплекс — один на каждые семь глобул актина — включает молекулу тропомиозина и три тропониновые компоненты TN-T, TN-I, TN-C, причем последний ответствен за взаимодействие всего комплекса с кальцием. Молекулы тропомиозина образуют два непрерывных тяжа вдоль двойной спирали актина. Тропонин локализован на тропомиозиновых тяжах с интервалами около 390 Å. К сожалению, пока еще не выяснена точная структура комплекса миозина с актином, содержащим полный комплекс регуляторных белков, в отсутствие и в присутствии кальция. Мы приведем здесь только имеющиеся в настоящее время данные по реконструкции, с одной стороны, комплекса миозина с актином, свободным от регуляторных белков, и тонкой нити, содержащей регуляторные белки, — с другой.

На рис. 55 приведена фотография модели двойной спирали актина, декорированной субфрагментом-1 миозина (субфрагменты изображены в виде изогнутых кончиков пальцев). Модель построена на основании реконструкции трехмерной структуры по электронно-микроскопическим снимкам комплекса акто-S1. На рис. 56 приведена модель структуры актина, полученная аналогичным способом, а на рис. 57 — модель актиновой спирали, содержащей тропомиозин. Видно, что тропомиозиновый тяж расположен в желобобразных канавках вдоль актиновой спирали.

На основании анализа данных по рентгеноструктурной дифракции, а также по оптической дифракции электронно-микроскопических фотографий [125, 126, 140—143, 169] сделано заключение о том, что тропомиозин на актиновой спирали может находиться в двух различных положениях. На рис. 58 представлена схема регуляторного действия тропомиозина; «активное» положение тропомиозина в актиновой нити построено на основании анализа

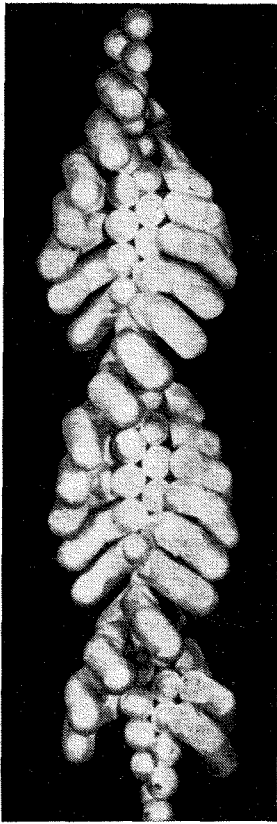


Рис. 55. Модель двойной спирали актина, декорированной субфрагментами-1 миозина [165]

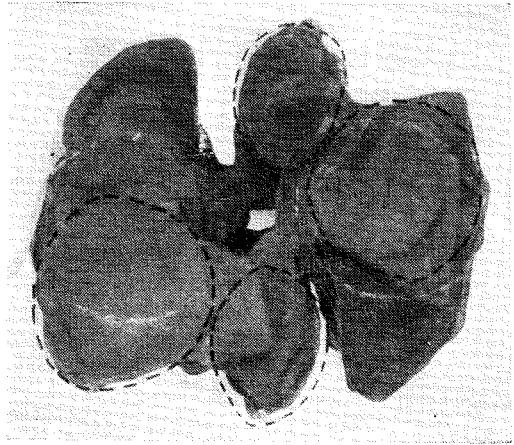
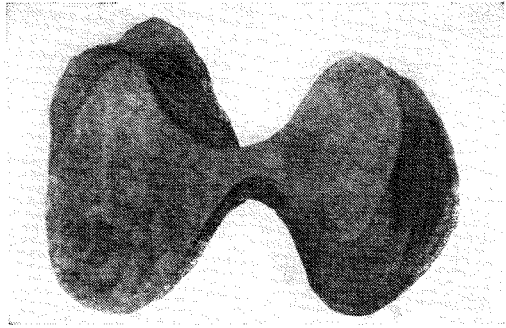


Рис. 56. Модель нити *F*-актина, построенная на основании трехмерной реконструкции по электронно-микроскопическим снимкам (вид с торца) [165]

Рис. 57. Модель актиновой нити, содержащей тропомиозин [187]

Вид с торца. Положение актиновых глобул и тропомиозина показано штриховыми линиями

структуры актина, содержащего тропомиозин, «ингибирующее» — по данным реконструкции структуры комплекса актин-тропомиозин с тропонином, не содержащим TN-C. Положение субфрагмента-1 построено на основании данных Мура с сотр. [165] по реконструкции структуры комплекса субфрагмента-1 с чистым актином. Перемещение тропомиозинового тяжа приводит либо к блокированию, либо к освобождению на актине участков связывания с миозином. На рис. 59 приведен вариант этой модели [53], показываю-

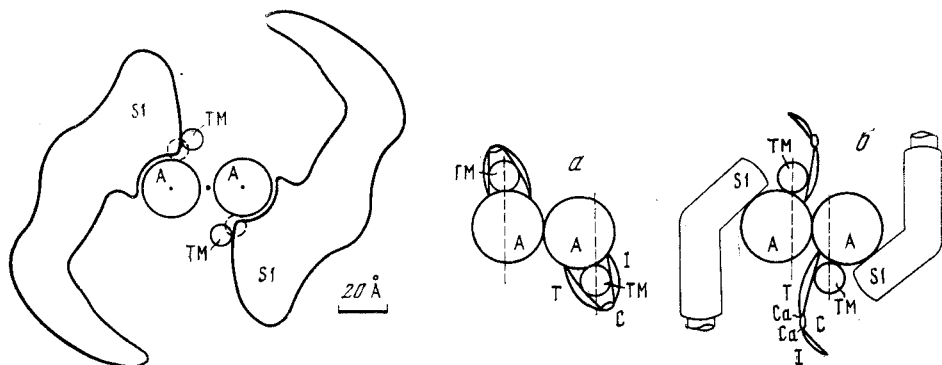


Рис. 58. Предполагаемая схема ингибирования актиновых центров тропомиозином [197]

S1 — субфрагмент-1; А — актин; ТМ — тропомиозин. Тропомиозин, расположенный в активной актиновой нити в положении, показанном сплошной линией, сдвигается у ингибированной нити в положение, показанное штриховой линией

Рис. 59. Предполагаемая схема работы регуляторного комплекса [53]

а — в отсутствие Ca^{2+} ; б — в присутствии Ca^{2+} . А — актин; S1 — субфрагмент-1; ТМ — тропомиозин; Т, С, I — соответствующие компоненты тропомиозинового комплекса

щей возможную роль тропомиозиновых компонент в перемещении тропомиозинового тяжа.

Параллельно с исследованием структуры регулируемого актомиозина проводилось интенсивное исследование биохимических особенностей регулируемых актомиозиновых систем. Рассмотрим кратко, какие же экспериментальные данные имеются в этой области.

Было давно известно, что АТФазная активность и сократимость естественных актомиозиновых систем (т. е. содержащих полный комплекс регуляторных белков) имеют место только при наличии кальция (полная активация при концентрации $\sim 5 \cdot 10^{-6}$ моль). При высоких концентрациях MgATP наблюдается субстратное ингибирование, снимающееся кальцием. Ранее считалось, что субстратное ингибирование функциональной активности сократительных систем обусловлено отрицательной кооперативностью между двумя АТФ-связывающими центрами, вероятно двумя центрами на миозиновой молекуле. Однако недавно Айзенберг и Килли [106] установили, что нативный тропомиозин в присутствии высокой концентрации АТФ и в отсутствие Ca^{2+} ингибирует АТФазную активность акто-S1 точно так же, как акто-НММ, и что ингибирование снимается добавлением кальция. Бремель и Вебер [89] непосредственно показали, что зависимость АТФазной активности акто-S1 от концентрации субстрата в отсутствие кальция имеет колоколообразную форму, типичную для других актомиозиновых систем. Эти две работы демонстрируют, что наличие на миозиновой молеку-

ле двух центров взаимодействия с субстратом и с активном несущественно для механизма субстратного ингибирования и снятия этого ингибирования кальцием.

Каким же образом можно увязать эти данные с теми представлениями, которые известны из структурных исследований тропонин-тропомиозинового комплекса? Эти представления таковы: имеется тропомиозиновый тяж, который в отсутствие кальция полностью блокирует активные центры от взаимодействия с миозином. Если мы добавляем кальций, кальций связывается с тропонином С, это приводит к смещению тропомиозинового тяжа по направлению к жолобу актиновой нити, при этом активные центры оголяются и получают возможность взаимодействовать с миозином. Однако такая простая схема неспособна объяснить поведение регуляторной системы. Дело в том, что в серии работ Бремеля, Вебер и др. [88, 89] было показано, что, во-первых, при низкой концентрации субстрата ($MgATP$) система полностью активирована даже в отсутствие кальция и, во-вторых, даже избыток кальция неспособен полностью предотвратить субстратное ингибирование, а лишь сдвигает его в область более высоких концентраций субстрата. Если эти факты интерпретировать в терминах механической модели, о которой говорилось выше, то из них следует, во-первых, что смещение тропомиозина может происходить и без участия кальция и, во-вторых, что кальций сам по себе неспособен вызвать смещение тропомиозинового тяжа, достаточное для полного освобождения активных центров.

Поскольку в области низких концентраций субстрата Ca^{2+} не влияет на функциональную активность актомиозиновых систем, Бремель и Вебер предположили, что ингибирующее влияние нативного тропомиозина на взаимодействие актина с миозином может блокироваться не только кальцием, но и «ригорными» комплексами. Известно, что образование таких комплексов, т. е. связывание актина с миозином, свободным от нуклеотида, происходит независимо от наличия кальция. Согласно Эбашу [104], одна тропонин-тропомиозиновая пара контролирует участок тонкой нити, содержащий семь актиновых мономеров. Бремель и Вебер предположили, что если в такой «функциональной единице» смогут образоваться несколько «ригорных» комплексов (например, четыре или пять), то остальные мономеры ее окажутся «включенными». Они будут связывать миозин, содержащий АТФ, и вести гидролиз; таким образом, система окажется активированной даже в отсутствие кальция. Поэтому при низкой концентрации субстрата, когда ригорных комплексов много, весь актин оказывается «включенным» и добавка кальция не приводит к дополнительному увеличению активности. Напротив, при высокой концентрации субстрата доля ригорных комплексов ничтожна, а актиновые мономеры в основном «выключены», даже в отсутствие Ca^{2+} .

Однако для объяснения наблюдавшихся в эксперименте колоколообразных зависимостей АТФазы акто-S1 от концентрации

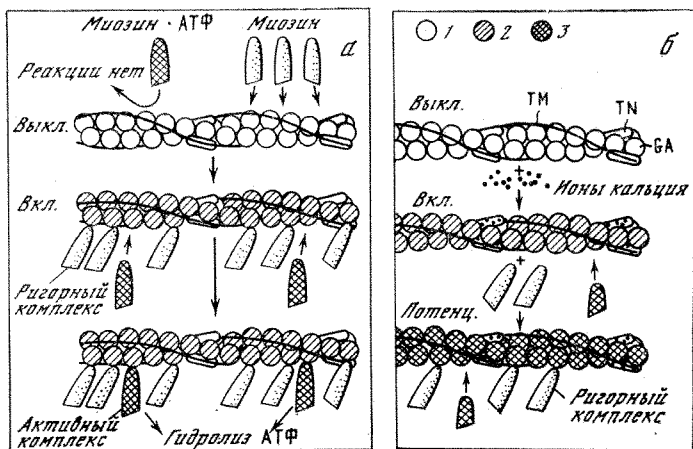


Рис. 60. Механизм, предложенный Бремелем и Вебер [168], для объяснения особенностей биохимической кинетики гидролиза АТФ регулируемым акто-S1

а — в отсутствие кальция;

б — в присутствии кальция;

GA — глобулы актина, ТМ — тропомиозин, ТН — тропониновый комплекс. Глобулы 1 соответствуют выключенному актину, 2 — включенному, 3 — третьему состоянию актина

АТФ высказанных предположений оказалось недостаточно. Пришлось ввести новое состояние актина (с повышенной АТФазной активностью), так называемое потенцированное состояние. В это состояние блок актина, активированный уже кальцием, переходит при образовании на нем достаточного количества ригорных комплексов. На рис. 60 из обзора Мюррея и Вебер [168] иллюстрируется схема, предложенная Бремелем и Вебер для объяснения их экспериментальных данных. Глобулы 1 принадлежат «выключенному» актину, глобулы 2 — «включенному» актину, глобулы 3 — актину в третьем состоянии.

11.2. Основные положения и математическая формулировка кинетической модели регуляции

Схема для объяснения результатов кинетических экспериментов Бремеля и Вебер, изложенная в предыдущем разделе, очень сложна и резко контрастирует с простой структурой регуляторной системы. Однако эти данные могут быть объяснены значительно проще. Ниже будет рассмотрена простая и естественная с физической точки зрения модель, которая, во-первых, позволяет рассчитывать ферментативную и сократительную активность мышечных белков (и эти расчеты согласуются с известными эксперименталь-

ными данными) и, во-вторых, не противоречит результатам структурных исследований.

В основе модели лежит признание того факта, что белковые молекулы и, в частности, молекулы тропомиозина являются микрообъектами и вследствие этого подвержены тепловым флуктуациям. Поэтому те два положения тропомиозинового тяжа, которые он занимает в присутствии и в отсутствие Ca^{2+} , не являются строго фиксированными. Эти положения являются лишь наиболее вероятными, и тропомиозин проводит в них большую часть времени (поэтому именно они и выявляются при рентгеновском исследовании), но в результате флуктуаций тропомиозиновый тяж может смещаться из равновесных положений.

1. Основные положения. В модели предполагается следующее.

А. Тонкие нити состоят из независимых функциональных единиц, аналогичных введенным в модели Бремеля — Вебера. Каждая функциональная единица содержит l актиновых центров, регулируемых одним тропонин-тропомиозиновым комплексом и работающих как единое целое.

Б. Тропомиозин имеет некоторый дискретный либо непрерывный набор положений на поверхности актинового тяжа, которые он проходит вследствие тепловых флуктуаций. Некоторые из положений совместимы с образованием связи между актиновыми центрами данной функциональной единицы и субфрагмента-1, другие — нет. Функциональные единицы первого типа мы будем называть «включенными» и в дальнейшем обозначать через a_i ; функциональные единицы второго типа — «выключенными» или «релаксированными» и обозначать R .

Кальций, связываясь с тропонином С, изменяет равновесное положение тропомиозинового тяжа. При этом меняется вероятность флуктуационного перехода функциональной единицы из «выключенного» состояния во «включенное» (подробно см. раздел 11.8).

В. При связывании субфрагмента-1 с любым актиновым центром функциональной единицы будут невозможны все положения тропомиозина, в которых он должен перекрываться с субфрагментом-1, т. е. «выключенное» состояние этой функциональной единицы становится запрещенным*.

Г. Каждый актиновый центр во «включенной» функциональной единице работает независимо от других.

Д. Циклическая схема, предложенная Букатиной и Дещеревским [8, 10] для АТФазы актомиозина (см. раздел 10.2), применима для анализа гидролиза АТФ субфрагментом-1 с «включенным» актином в качестве «кофактора». Согласно этому механизму, каждый оборот ферментативного расщепления АТФ сопряжен с цик-

* При этом предполагается, что наличие или отсутствие нуклеотида на субфрагменте-1 не играет существенной роли и что критическое число актомиозиновых комплексов в функциональной единице равно 1.

лом ассоциации — диссоциации актомиозина и может быть адекватно описан двумя эффективными константами образования κ и диссоциации ν актомиозинового комплекса.

Циклический механизм АТФазы актомиозина можно вывести и из схемы Лимна и Тейлора (см. рис. 52). Она в дальнейшем будет использована для получения зависимости κ и ν от концентраций субфрагмента-1 и MgАТФ. Однако при первоначальной формулировке нашей модели более удобно работать с эффективными константами κ и ν как с независимыми параметрами.

Ниже мы рассмотрим, как, используя перечисленные предположения, можно рассчитывать стационарные концентрации комплексов актомиозина a и свободных «включенных» актиновых центров α , а также стационарную частоту образования или распада комплексов актомиозина, т. е. скорость гидролиза АТФ.

2. Математическая формулировка. Согласно изложенным выше предположениям, функциональная единица имеет $l+2$ кинетически существенных состояний. В «релаксированном» состоянии R все ее актиновые центры «выключены» и неспособны связываться с S1. В «активных» состояниях a_i (где $i = 0, 1, \dots, l$) все l актиновых центров «включены» и i из них связаны с миозином. Очевидно, что таких состояний будет $l+1$: «включенное», но полностью свободное от миозина состояние a_0 и l состояний с различной занятостью миозином. Эффективная константа равновесия $1/r$ для перехода R в a_0 увеличивается с концентрацией кальция, т. е. обратная ей константа ингибирования r уменьшается, когда система активируется кальцием.

Вероятность присоединения субфрагмента-1 к функциональной единице в состоянии a_i пропорциональна числу свободных «включенных» актиновых центров этой функциональной единицы, т. е. $l-i$, а вероятность размыкания контакта субфрагмента-1 с a_i пропорциональна числу акто-S1 комплексов на ней, т. е. i . Следовательно, эффективные константы скоростей переходов a_i в a_{i-1} и в a_{i+1} будут, очевидно, равны $(l-i)\kappa$ и $i\nu$ соответственно.

Тогда кинетическую схему переходов функциональных единиц можно представить в виде линейной цепи следующим образом:

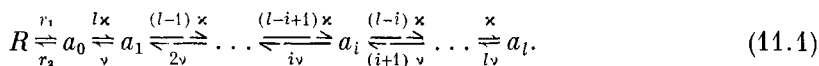


Схема (11.1) позволяет определить стационарные концентрации функциональных единиц всех типов, R и a_i , через константу ингибирования $r = r_2/r_1$ и эффективную константу равновесия $g = \kappa/\nu$.

Для них получаются следующие рекуррентные соотношения:

$$R = ra_0; \quad a_1 = lg a_0; \dots; \quad a_i = \frac{l-i+1}{i} g a_{i-1}; \dots; \quad a_l = \frac{1}{l} g a_{l-1}. \quad (11.2)$$

Приведем вывод рекуррентных соотношений (11.2) и определение стационарных концентраций для R , a_1 , a_2 , a_3 , \dots , a_i . Согласно (11.1)

$$R \stackrel{r_1}{\rightleftharpoons} a_0 \dots \stackrel{r_2}{\rightleftharpoons}$$

отсюда при $dR/dt = 0$ имеем

$$R = (r_2/r_1) a_0 = ra_0.$$

Аналогично получается выражение для a_1 :

$$R \stackrel{r_1}{\rightleftharpoons} a_0 \stackrel{l\kappa}{\rightleftharpoons} a_1 \dots \stackrel{\nu}{\rightleftharpoons}$$

$$da_0/dt = -(r_2 + l\kappa)a_0 + r_1R + \nu a_1 = 0,$$

откуда $a_1 = (l\kappa/\nu)a_0 = la_0$.

Подобным образом, используя следующие члены ряда (11.1), можно получить

$$a_2 = \frac{(l-1)\kappa}{2\nu} a_1 = \frac{l-1}{2} ga_1 = \frac{l(l-1)}{2 \cdot 1} g^2 a_0,$$

$$a_3 = \frac{(l-2)\kappa}{3\nu} a_2 = \frac{l-2}{3} ga_2 = \frac{l(l-1)(l-2)}{3 \cdot 2 \cdot 1} g^3 a_0,$$

.....

$$a_i = \frac{l-i+1}{i} ga_{i-1} = \frac{l(l-1)\dots(l-i+1)}{i!} g^i a_0.$$

Используя (11.2), мы можем выразить через a_0 полное число функциональных единиц как сумму всех блоков по состояниям:

$$\begin{aligned} R + \sum_{i=0}^l a_i &= ra_0 + a_0 + lg a_0 + \frac{l(l-1)}{2 \cdot 1} g^2 a_0 + \frac{l(l-1)(l-2)}{3 \cdot 2 \cdot 1} \times \\ &\times g^3 a_0 + \dots + \frac{l!}{l!} g^l a_0 = a_0 \left\{ r + \left[1 + lg + \frac{l(l-1)}{2!} g^2 + \right. \right. \\ &\left. \left. + \frac{l(l-1)(l-2)}{3!} g^3 + \dots + g^l \right] \right\}. \end{aligned} \quad (11.3)$$

В квадратных скобках мы получили разложение биномиального ряда $(1+g)^l$, поэтому (11.3) можно записать как

$$R + \sum_{i=0}^l a_i = a_0 [r + (1+g)^l].$$

Полная концентрация комплексов акто-S1 во всех функциональных единицах (обозначим ее через a) может быть выражена подобным образом:

$$\begin{aligned} a &= \sum_{i=0}^l ia_i = gla_0 \left[1 + (l-1)g + \frac{(l-1)(l-2)}{2!} g^2 + \dots \right. \\ &\left. \dots + \frac{(l-1)!}{(l-1)!} g^{l-1} \right] = gla_0 (1+g)^{l-1}. \end{aligned} \quad (11.4)$$

Обозначим полную концентрацию активных центров через A . Тогда полная концентрация функциональных единиц будет A/l . Согласно (11.3) она равна

$$\frac{A}{l} = a_0[r + (1 + g)^l], \quad \text{отсюда} \quad a_0 = \frac{A}{l[r + (1 + g)^l]}.$$

Подставив это выражение для a_0 в (11.4), получим

$$a = A \frac{g(1 + g)^{l-1}}{r + (1 + g)^l}. \quad (11.5)$$

Число комплексов акто-S1, диссоциирующих в 1 с, равно νa . Обозначим его через w :

$$w = \nu a.$$

В стационарном состоянии число диссоциирующих в секунду комплексов равно числу присоединений субфрагментов-1 к актину в секунду, т. е. $w = \nu a = \kappa \alpha$, где α — концентрация свободных «включенных» активных центров. Используя (11.5), мы имеем

$$w = \nu g A \frac{(1 + g)^{l-1}}{r + (1 + g)^l} = \kappa \alpha \frac{(1 + g)^{l-1}}{r + (1 + g)^l}, \quad (11.6)$$

и, следовательно,

$$\alpha = \frac{w}{\kappa} = A \frac{(1 + g)^{l-1}}{r + (1 + g)^l}. \quad (11.7)$$

Согласно положению Д пункта 1, w представляет собой стационарную скорость АТФазы регулируемого актомиозина.

Итак, относительная стационарная скорость гидролиза АТФ выражается формулой

$$\frac{w}{\kappa A} = f(g) = \frac{(1 + g)^{l-1}}{r + (1 + g)^l}. \quad (11.8)$$

По этой формуле, задав определенные r и l , для каждого g можно рассчитать соответствующую величину $w/\kappa A$. Так мы и сделаем в дальнейшем, но сначала проанализируем зависимость $f(g)$ в общем виде.

Прежде всего ясно, что при $r = 0$ функция вырождается в уравнение равносторонней гиперболы со смещенными осями $f(g) = 1/(1 + g)$ (рис. 61).

Исследуем теперь случай $r \neq 0$. Введем $x = 1 + g$. Рассмотрим соответствующую функцию (11.8):

$$f(x) = x^{l-1}/(r + x^l).$$

При малых x , когда $x \ll r$, $f(x)$ растет как x^{l-1} . При достаточно больших x , когда $x \gg r > 1$, в знаменателе можно пренебречь $r \ll x^l$. Тогда функция $f(x) = 1/x$ уменьшается с ростом x . Следовательно, при некотором значении x , т. е. при некотором значении g , функция (11.8) должна иметь максимум.

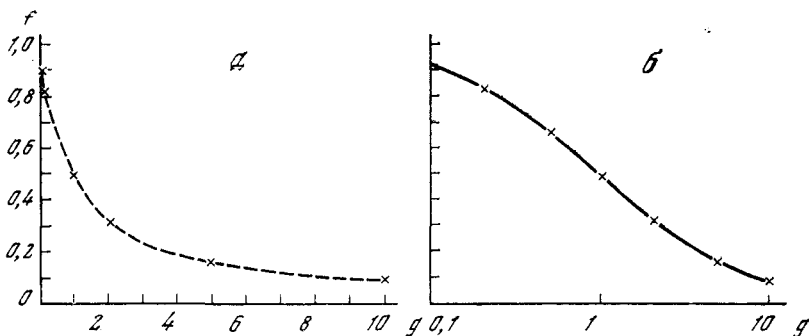


Рис. 61. Функция $f(g)$ при $r = 0$ в линейном (а) и логарифмическом (б) масштабах

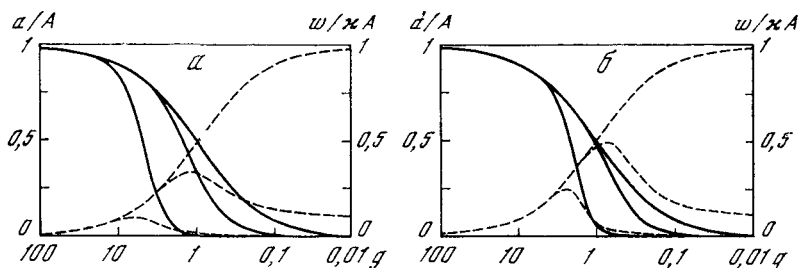


Рис. 62. Активация актомиозиновых систем в зависимости от эффективной константы равновесия образования актомиозина g для двух различных значений параметра кооперативности l

$a - l = 3$; $b - l = 7$. Сплошные линии — доля актомиозиновых комплексов a/A ; штриховые — относительная скорость АТФазной реакции $w/kA = f(g)$, рассчитаны по формулам (11.5) и (11.8). Верхние кривые семейств — $r = 0$, система без регуляторного комплекса; средние и нижние — система с регуляторным комплексом: насыщенная кальцием, $r = 10$ (средние кривые), и в отсутствие кальция, $r = 2000$ (нижние)

Из условия максимума $df/dg = 0$ найдем выражение для g^{\max} :

$$g^{\max} = \sqrt[l]{r(l-1)} - 1. \quad (11.9)$$

Значение функции $f(g)$ в максимуме будет

$$f(g^{\max}) = \frac{(1 + g^{\max})^{l-1}}{r + (1 + g^{\max})^l},$$

или с учетом (11.9)

$$f(g^{\max}) = \frac{l-1}{l \sqrt[l]{r(l-1)}}.$$

Так, например, для $l = 7$:

$$g^{\max} = \sqrt[7]{6r} - 1 \quad (11.10)$$

и

$$f(g^{\max}) = \frac{1}{7} \frac{6}{\sqrt[7]{6r}} = \frac{0,664}{\sqrt[7]{r}}. \quad (11.11)$$

На рис. 62 показаны зависимости доли актомиозиновых комплексов a/A и относительной скорости АТФазной реакции $w/\kappa A$ от константы равновесия g , рассчитанных по формулам (11.5) и (11.8) при $r = 0$, $r = 10$ и $r = 2000$ для двух различных параметров кооперативности: $l = 3$ и $l = 7$.

3. Качественный анализ. Применение модели к конкретным актомиозиновым системам предполагает, что r , g , κ и ν суть известные функции концентраций кальция, актина, миозина и субстрата *.

Однако поведение модели может быть проанализировано качественно до того, как будет сделана детальная оценка параметров. Уменьшение константы ингибирования r соответствует активации кальцием. Эффективная константа равновесия ** g ассоциации актиновых и миозиновых центров уменьшается с концентрацией субстрата, т. е. движение вправо вдоль абсциссы на рис. 62 соответствует увеличению концентрации MgАТФ. Следовательно, мы можем заключить, что кривые на рис. 62 указывают на качественное согласие теории с поведением реальных регулируемых актомиозиновых систем, а именно: теория дает колоколообразную зависимость скорости АТФазной реакции от концентрации субстрата в некотором диапазоне величин r . Максимальная скорость растет, и ее положение сдвигается вправо (к более высоким концентрациям субстрата) с уменьшением r (с увеличением концентрации кальция). При низком уровне MgАТФ скорость АТФазной реакции не зависит от r : при достаточно больших g кривые $w/\kappa A$ для всех r совпадают. При $r = 0$ кривая становится гиперболической, что соответствует нерегулируемому актомиозину. Нелинейность кривых на рис. 62 зависит от числа актиновых центров l в функциональной единице, которое играет роль параметра кооперативности.

* В разделе 11.3 мы выразим эффективные константы g , κ и ν через элементарные постоянные, а в разделах 11.4 и 11.5 проведем их численную оценку, что даст нам возможность в разделе 11.6 рассчитать зависимости скорости гидролиза АТФ от концентрации субстрата и сравнить их с экспериментальными данными.

** Подробно вопрос о зависимости g от концентрации MgАТФ будет рассмотрен в разделе 11.3, однако здесь следует упомянуть о том, что зависимость эта нелинейна. Ниже мы увидим, что именно эта нелинейность позволит нам объяснить аномальное влияние концентрации субфрагмента-1 на кооперативность АТФазной реакции регулируемого акто-S1.

11.3. Интерпретация эффективных констант модели κ и ν в терминах схемы Лимна и Тейлора

Для сопоставления расчетной скорости гидролиза АТФ с реакцией в конкретной системе акто-S1 необходимо уметь ставить в соответствие величинам g концентрации $MgATP$, т. е. уметь вычислять эффективные константы скорости диссоциации ν и образования κ актомиозинового комплекса. Для этого нужно, во-первых, выразить эти эффективные константы через элементарные константы скоростей реакций i , во-вторых, найти численные значения элементарных констант.

В этом разделе мы, используя известную схему Лимна и Тейлора, выразим эффективные константы κ и ν , а затем и их отношение g через элементарные константы скоростей реакций. В следующем разделе, используя циклическую схему, оценим по экспериментальным данным численные значения элементарных констант.

В последующем изложении в формулах и на рисунках мы, как правило, будем использовать обозначение M вместо $S1$ для головок миозина, чтобы сохранить символ S для субстрата ($MgATP$). Обозначение P использовано для обоих продуктов ($MgADP$ и неорганический фосфат). Различные комплексы актина и миозина друг с другом и с субстратом и различными продуктами обозначены как MS , MP , AM , AMS и AMP .

Кинетическая диаграмма, предложенная Лимном и Тейлором [126] для гидролиза АТФ нерегулируемым актомиозином, дана на рис. 52 (см. раздел 10.3). (Обозначения и нумерация стадий изменены по сравнению с оригинальной публикацией, и скорости всех обратных процессов считаются пренебрежимо малыми.) Будем предполагать, что этот механизм применим и к гидролизу АТФ субфрагментом-1 с «включенным» актином как кофактором, хотя величины всех констант не обязательно должны быть одинаковыми в обоих случаях.

Определим эффективную константу скорости образования актомиозинового комплекса κ . Согласно схеме рис. 52 этот процесс включает в себя два пути:



где под M понимается миозин, свободный и от актина, и от продуктов реакции (его концентрацию будем обозначать $[M_{св}]$), а MP — миозин-продуктный комплекс.

Оценим сравнительные величины стационарных концентраций $M_{св}$, MS и MP . Оценку будем проводить при условиях, в которых выполнены экспериментальные работы Бремеля и Вебер, т. е. когда концентрация миозина сравнима или много больше концентрации актина и субстраты имеются в большом избытке. На основании схемы Лимна и Тейлора (см. рис. 52) можно записать

$$\frac{d[MP]}{dt} = k_5 [MS] - k_6 [MP] - k_1 \alpha [MP] = 0, \quad (11.12)$$

где α , как и раньше в этой части книги, концентрация свободного актина, т. е.

$$\frac{[MS]}{[MP]} = \frac{k_6 + k_1\alpha}{k_5} < \frac{k_6 + k_1A}{k_5}$$

для всех случаев, когда $\alpha < A$. Далее,

$$\frac{d[M_{CB}]}{dt} = k_6[MP] - k_7S[M_{CB}] - k_8\alpha[M_{CB}] = 0, \quad (11.13)$$

следовательно,

$$\frac{[M_{CB}]}{[MP]} = \frac{k_6}{k_7S + k_8\alpha} < \frac{k_6}{k_7S}$$

для тех же случаев. Условие $\alpha < A$ может не выполняться лишь при $A \gg M$ (тогда $\alpha \approx A$). Однако такие ситуации мы пока рассматривать не будем.

Используя величины констант скоростей, данные Лимном и Тейлором (см. рис. 52), получим следующие оценки при $A < < 50$ мкмоль и $S > 0,25$ мкмоль (здесь S — полная концентрация MgATФ):

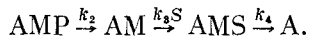
$$[MS]/[MP] < 0,1 \text{ и } [M_{CB}]/[MP] < 0,1. \quad (11.14)$$

Эти оценки означают, что при обычных экспериментальных условиях концентрации свободного миозина и миозин-субстратного комплекса малы по сравнению с концентрациями комплекса миозин—продукт. Следовательно, мы будем предполагать, что весь не связанный с актином миозин находится в форме миозин-продуктного комплекса MP и эффективная константа скорости образования актомиозинового комплекса первого порядка может быть выражена как

$$k = k_1\mu, \quad (11.15)$$

где μ — концентрация миозиновых центров, свободных от актина (в общем случае $\mu = [M_{CB}] + [MS] + [MP]$).

Оценим теперь эффективную константу скорости диссоциации актомиозина ν . Согласно схеме рис. 52 диссоциация актомиозинового комплекса включает в себя следующие стадии:



Тогда константа ν может быть выражена как обратное время жизни актомиозиновых комплексов всех типов (AMP, AM и AMS), т. е.

$$\nu^{-1} = (k_2)^{-1} + (k_3S)^{-1} + (k_4)^{-1}.$$

Так как, по данным Лимна и Тейлора [158], $k_4 > 10^3$ с⁻¹ и можно считать, что актомиозиновый комплекс после соединения с суб-

стратом распадается мгновенно, то

$$v^{-1} \approx (k_2)^{-1} + (k_3 S)^{-1},$$

следовательно,

$$v = \frac{k_2 k_3 S}{k_2 + k_3 S}. \quad (11.16)$$

Выражение (11.16) получено на основании схемы (см. рис. 52), в которой мы пренебрегали обратными реакциями. Однако при достаточных концентрациях продукта в системе может оказаться необходимым учет обратной реакции на стадии 2. Рассчитаем эффективную константу скорости диссоциации g_p для таких случаев. Влияние обратной реакции на стадии 2 можно учесть, рассчитав отношение суммы стационарных концентраций актомиозиновых комплексов [AMP] + [AM] к концентрации свободного актина α , которое, очевидно, равно отношению соответствующих времен жизни. Из схемы рис. 52, пренебрегая временем быстрой стадии 4, имеем

$$\dot{\alpha} = k_3 S [AM] - k_1 \mu \alpha = 0,$$

откуда

$$[AM]/\alpha = k_1 \mu / (k_3 S),$$

$$[A^*M] = k_2 [AM] - (k_{-2} P + k_3 S) [AM] = 0.$$

Тогда

$$\frac{[AMP]}{\alpha} = \frac{[AMP]}{[AM]} \frac{[AM]}{\alpha} = \frac{(k_{-2} P + k_3 S) k_1 \mu}{k_2 k_3 S},$$

$$g_p = \frac{\kappa}{v_p} = \frac{k_1 \mu}{v_p} = \frac{[AMP] + [AM]}{\alpha} = k_1 \mu \left(\frac{1}{k_3 S} + \frac{k_{-2} P + k_3 S}{k_2 k_3 S} \right),$$

$$v_p = \frac{k_2 k_3 S}{k_2 + k_{-2} P + k_3 S}. \quad (11.17)$$

Из сравнения (11.16) и (11.17) видно, что действие продукта на константу скорости диссоциации эквивалентно снижению концентрации субстрата: если одинаковые значения v и v_p достигаются при концентрациях MgATФ S и S_p , то $S_p/S = 1 + (k_{-2} P/k_2)$. Таким образом, если $k_{-2} \approx 10^4$ моль⁻¹·с⁻¹, $k_2 = 20$ с⁻¹, то при концентрации АДФ и Ф_H 20 ммоль требуется в 10 раз более высокая концентрация MgATФ, чтобы получить ту же самую величину константы скорости диссоциации, что и в отсутствие продуктов.

При дальнейшем анализе мы ограничимся случаем пренебрежимо малых концентраций продукта, т. е. для константы скорости диссоциации будем считать справедливым выражение (11.16). Тогда, учитывая (11.15), для эффективной константы g получим

$$g = \frac{\kappa}{v} = \frac{k_1 \mu (k_2 + k_3 S)}{k_2 k_3 S}.$$

Для более ясного представления о характере зависимости эффективной константы g от концентраций субстрата S и миозина M рассчитаем в качестве примера несколько кривых, используя значения элементарных констант для регулируемого актомиозина (см. раздел 11.6):

$$k_1 = 3 \cdot 10^6 \text{ моль}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}; \quad k_2 = 180 \text{ с}^{-1}; \quad k_3 = 1 \cdot 10^6 \text{ моль}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}.$$

Мы будем рассматривать сейчас только те случаи, когда миозин имеется в большом избытке, т. е. $\mu \approx M$ (M — полная концентрация миозина). Тогда

$$g = \frac{3 \cdot 10^6 (180 + 10^6 S) M}{180 \cdot 10^6 S} \text{ моль}^{-1}.$$

Из такой зависимости $g(S)$ (рис. 63) можно видеть, что при разных концентрациях миозиновых центров $M_1 > M_2 > M_3$ одному и тому же значению концентрации субстрата $S_x = [\text{MgATФ}]_x$ соответствуют разные значения параметра g ($g_1 < g_2 < g_3$). На графике $w/\kappa A = f(g)$ (рис. 64, а) это соответствует разным значениям функции $f(g)$. Из рис. 64, б видно, что в результате на кривой $w/\kappa A = f(S)$ при увеличении концентрации миозиновых центров должен постепенно исчезать максимум.

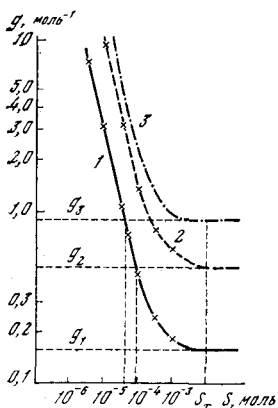


Рис. 63. Зависимость эффективной константы g от концентрации субстрата (MgATФ) при различных концентрациях миозина M

1 — $M_1 = 10^{-5}$ моль;
2 — $M_2 = 3 \cdot 10^{-5}$ моль;
3 — $M_3 = 5 \cdot 10^{-5}$ моль.

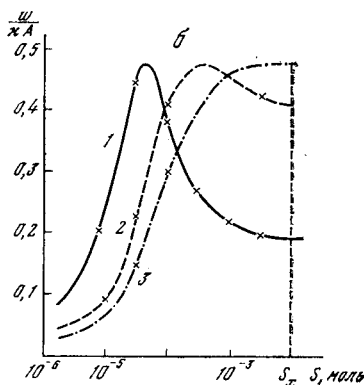
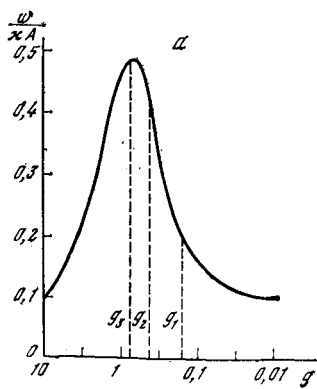
Значения элементарных констант скоростей, принятых при расчете, приведены в тексте

Рис. 64. Зависимость относительной скорости АТФазной реакции $w/\kappa A$ при увеличении концентрации миозина

а — от параметра g ;
б — от концентрации субстрата.

Кривые 1, 2, 3 соответствуют концентрациям миозина, указанным на рис. 63;

g_1, g_2, g_3 и S_{x1}, S_{x2}, S_{x3} — те же, что и на предыдущем рисунке. При расчете было принято $l = 7, r = 10$



11.4. Расчет стационарной кинетики нерегулируемых актомиозиновых систем

Итак, эффективные константы выражены через константы скоростей элементарных стадий. Перейдем к их численной оценке.

Возможно, что часть элементарных констант для актомиозиновых систем с регулируемым и нерегулируемым актином совпадают. Поэтому сначала оценим некоторые константы из работ по стационарной кинетике нерегулируемого акто-НММ Айзенберга и Муса [109], Риззино, Бароуха, Айзенберга и Муса [180], Бароуха и Муса [86]. Анализ будем проводить в предположении о двухстадийном циклическом механизме Букатиной — Дещеревского (см. раздел 10.2).

Эксперименты перечисленных авторов были выполнены в условиях, когда концентрация актина значительно превышала концентрацию НММ. В разделе 10.2 (см. формулу (10.13)) было показано, что если актин имеется в большом избытке, т. е.

$$\alpha \approx A,$$

то число молекул АТФ, гидролизующихся на одном миозиновом центре в одну секунду, и обратная ему величина будут выражаться как

$$w = \frac{vk_1A}{v + k_1A} \quad \text{и} \quad w^{-1} = v^{-1} + (k_1A)^{-1}, \quad (11.18)$$

Это хорошо согласуется с экспериментальными данными (см. раздел 10.1), что позволяет определить величины k_1 и v . Анализируя указанным способом экспериментальные кривые Айзенберга и Муса [109], мы получили зависимость v и k_1 от концентрации MgАТФ при двух концентрациях KCl (рис. 65). Константа скорости k_1 не зависит от концентрации субстрата, тогда как v обнаруживает сильную зависимость при небольших концентрациях MgАТФ. Эту зависимость можно аппроксимировать формулой (11.16) при соответствующем выборе параметров (если принять $k_2 = 25 \text{ с}^{-1}$ и $k_3 = 4,6 \cdot 10^6 \text{ моль}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$ в отсутствие KCl и $k_2 = 24 \text{ с}^{-1}$ и $k_3 = 4,0 \cdot 10^6 \text{ моль}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$ для 20 ммоль KCl. Можно видеть, что параметры уменьшаются с концентрацией KCl). Зависимость k_1 и k_2 от концентрации KCl и полной ионной силы, полученные из данных Риззино и др. [180] и Айзенберга и Муса [108], показаны на рис. 66 точками и треугольниками соответственно. Полная ионная сила в этих двух экспериментах достигалась различными сочетаниями ингредиентов. При этом оказалось, что в случае зависимости от суммарной ионной силы результаты обеих работ для константы скорости k_2 хорошо согласуются — соответствующие точки ложатся на одну плавную кривую, тогда как соответствующая кривая для константы k_1 получается немонотонной. Однако если построить зависимость не от суммарной ионной силы, а от концентрации KCl, то на одну плавную кривую укладываются

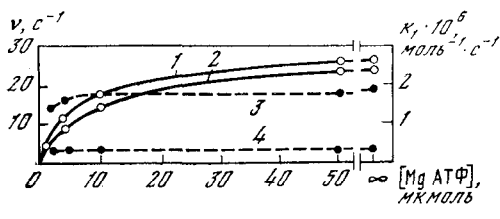


Рис. 65. Зависимость эффективной константы диссоциации v_1 актомиозина (сплошные линии) и его константы ассоциации k_1 (штриховые) от концентрации АТФ

1, 3 — в отсутствие КСI; 2, 4 — при 20 ммоль КСI. Рассчитаны из данных [109] на основании циклической схемы

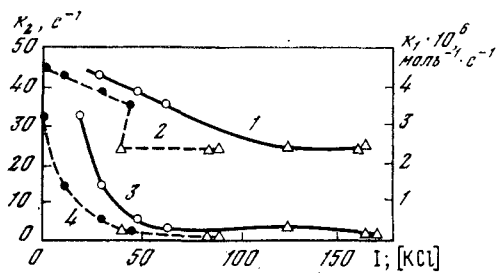


Рис. 66. Зависимость константы скорости диссоциации продукта k_2 (1, 2) и константы скорости образования актомиозинового комплекса k_1 (3, 4) от суммарной ионной силы I (сплошные линии) и от концентрации КСI (штриховые)

Кривые рассчитаны на основании циклической схемы из данных [180] (точки) и [108] (треугольники)

только точки для k_1 . Это дает возможность заключить, что для скорости ассоциации миозин-продуктного комплекса с актином (константа k_1) существенна концентрация КСI, а не суммарная ионная сила, в то время как скорость диссоциации продуктов с актомиозинового комплекса (константа k_2) зависит от суммарной ионной силы. Величины констант скоростей, полученные анализом стационарных данных в терминах «циклической схемы», немного отличаются от измеренных методами переходной кинетики. Разногласия могут быть приписаны различным условиям по рН и температуре в экспериментах Айзенберга — Муса и Лима — Тейлора. Однако они могут также означать различную способность интермедиатного и релаксировавшего миозин-продуктных комплексов (например, $E^* \cdot ADF \cdot F$ и $E \cdot ADF \cdot F$ — в обозначениях Трэнсема с сотр. [194]) реагировать с актином.

11.5. Оценка параметров модели для регулируемых систем

Предполагается, во-первых, что двухстадийный циклический механизм применим к гидролизу АТФ субфрагментом-1 с «включенными» актиновыми центрами в нитях регулируемого актина как кофактором и, во-вторых, что эффективные константы скорости κ и ν в этом случае могут быть аппроксимированы формулами (11.15) и (11.16). Если субфрагмент-1 в большом избытке, ситуация достаточно проста для того, чтобы использовать ее для оценки параметров. Величина κ линейно растет с увеличением концентрации свободных миозиновых центров, в то время как ν не может

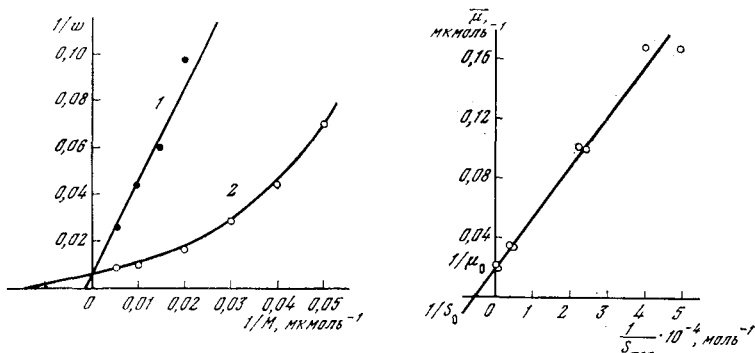


Рис. 67. Зависимость обратной скорости АТФазной реакции $1/w$ от обратной концентрации субфрагмента-1 $1/M$ для чистого (1) и регулируемого (2) актина [88]; w рассчитана на моль актина

Субфрагмент-1 в большом избытке. Концентрация актина 16 мкмоль. Концентрацию АТФ поддерживали постоянной и равной 1 ммоль; ионная сила $I = 35$ ммоль; 100 мкмоль Ca^{2+} ; 25°C ; 1 ммоль MgCl_2 ; 10-миллимолярный имидазольный буфер (рН 7,0)

Рис. 68. Связь между концентрацией субфрагмента-1 и оптимальной концентрацией субстрата

μ — концентрация миозиновых центров; S_{max} — концентрация субстрата, соответствующая максимуму АТФазной активности. Зависимость построена в двойных обратных координатах по данным рис. 3 из работы [88] (см. рис. 69, е). Точки пересечения с осью абсцисс и осью ординат соответствуют $S_0 = -180$ мкмоль и $\mu_0 = 55$ мкмоль

превысить k_2 . Таким образом, при достаточно высоких концентрациях миозиновых центров $g > 1$. Следовательно,

$$r \ll (1 + g)^7 \quad (11.19)$$

и константой ингибирования r можно пренебречь по сравнению с $(1 + g)^7$. Тогда формула (11.6) преобразуется к виду

$$w = A \frac{\mu}{1 + g} = A \frac{k_1 M}{1 + k_1 M / \nu}, \quad (11.20)$$

где M — полная концентрация миозиновых центров (так как $M \gg A$, мы вправе считать $\mu \simeq M$).

При достаточно высоком уровне MgATP $\nu = k_2$ и мы можем переписать (11.20) как

$$A/w = (k_1 M)^{-1} + (k_2)^{-1}, \quad (11.21)$$

т. е. обратные величины концентрации субфрагмента-1 и скорости АТФазной реакции, нормализованной по полной концентрации актина, связаны линейно. Сравнивая это выражение с кривыми Бремеля с сотр. [88], приведенными на рис. 67, мы получим для регулируемого акто-S1: $k_2 = 160 \div 190 \text{ с}^{-1}$ и $k_1 = (2 \div 2,8) \cdot$

$\cdot 10^6$ моль $^{-1} \cdot$ с $^{-1}$; для нерегулируемой системы $k_2 = 160 \div 190$ с $^{-1}$ и $k_1 = (0,2 \div 0,3) \cdot 10^6$ моль $^{-1} \cdot$ с $^{-1}$ *.

Теория предсказывает также линейную корреляцию между обратными величинами концентрации свободных миозиновых центров и концентрации субстрата, при которых скорость АТФазной реакции максимальна. Это дает возможность оценить константу скорости k_3 и константу ингибирования r при высоком уровне ионов кальция. Проведем эту оценку.

В разделе 11.2 было получено условие экстремума зависимости скорости АТФазной реакции от концентрации субстрата (11.10). Подставляя в (11.10) вместо $g^{\max} = \kappa/v_{\max}$ его выражение через (11.15) и (11.16), мы получим

$$\mu^{-1} = k_1 (\sqrt[7]{6r} - 1)^{-1} [(k_2)^{-1} + (k_3 S_{\max})^{-1}]. \quad (11.22)$$

Предсказанная выражением (11.22) корреляция между концентрацией миозиновых центров и положением максимума АТФазной активности действительно существует. На рис. 68 построена в двойных обратных координатах зависимость концентрации субфрагмента-1 от концентрации субстрата, соответствующей максимуму АТФазной активности, реконструированная по данным рис. 3 из работы Бремеля с сотр. [88]. Сравнивая вид зависимости (11.22) с этой кривой и используя наиболее вероятные значения k_1 и k_2 из предыдущей оценки ($2.4 \cdot 10^6$ моль $^{-1} \cdot$ с $^{-1}$ и 175 с $^{-1}$ соответственно), мы получим

$$k_3 = - \frac{k_2}{S_0} = 10^6 \text{ моль}^{-1} \cdot \text{с}^{-1} \quad \text{и} \quad r = \frac{1}{6} \left(1 + \frac{k_1 \mu_0}{k_2} \right)^7 = 8$$

для 10^{-4} моль Са $^{2+}$ и ионной силы $I = 35$ ммоль.

11.6. Расчет стационарной кинетики регулируемого акто-S1

Зависимости стационарной скорости гидролиза АТФ регулируемым акто-S1 от концентрации субстрата были рассчитаны для условий, в которых были выполнены эксперименты Бремеля и Вебер [89] и Бремеля с сотр. [88]. Для случаев, когда концентрации миозина, актина и субстрата одного порядка по величине,

* Регулируемый акто-S1 на рис. 67 не дает прямой (11.21). Возможно, это потому, что условие (11.19) не выполняется во всем диапазоне изменения концентрации субфрагмента-1. Действительно, при $k_1 = 3 \cdot 10^6$ моль $^{-1} \cdot$ с $^{-1}$, $k_2 = 200$ с $^{-1}$, $S = 10^{-3}$ моль, $k_3 = 10^6$ моль $^{-1} \cdot$ с $^{-1}$ оценка $(1 + g)^7$ в области нелинейности (например, для $M = 20$ мкмоль) дает

$$v = \frac{200 \cdot 10^6 \cdot 10^{-3}}{200 + 10^3} = 167; \quad g = \frac{3 \cdot 10^6 \cdot 2 \cdot 10^{-5}}{167} = 0,36; \quad (1 + g)^7 = (1,36)^7 = 8,5.$$

При экспериментальных условиях рис. 67, как будет видно из дальнейшего, $r \approx 10$, следовательно, условие $r \ll (1 + g)^7$ уже не выполняется. Легко убедиться, что в линейной части обсуждаемой кривой вблизи $1/M = 0$ условие $r \ll (1 + g)^7$ выполнено.

был разработан специальный метод расчетов. В этом методе эффективную константу равновесия $g = \kappa/v$ не рассчитывали как функцию данных экспериментальных условий, а выбирали ее значения произвольно и для каждого из них рассчитывали скорость гидролиза АТФ w , с одной стороны, и полную концентрацию субстрата N , с другой.

Дело в том, что в приведенные выше оценки эффективных констант скоростей κ и v входят концентрации свободного миозина μ и свободного субстрата S . В эксперименте же обычно задаются только полные концентрации миозина M и нуклеотида N , а μ и S неизвестны. Если $M \gg A$ и $N \gg M$, то можно считать, что $\mu \approx M$ и $S \approx N$ и, воспользовавшись предыдущими оценками, выразить $g = \kappa/v$ через экспериментальные параметры. В этом случае формула (11.6) позволяет непосредственно рассчитать зависимость стационарной скорости гидролиза АТФ от полной концентрации субстрата. Однако основной интерес представляют случаи соизмеримых концентраций актина, миозина и MgАТФ. Если условия $M \gg A$ и $N \gg M$ не выполнены, то можно предложить «сопряженный» метод расчета. В этом методе исходным пунктом является определение области значений g , совместимых с условиями эксперимента.

Если $M < A$, то доля актомиозиновых комплексов не может превышать отношение концентраций миозина и актина. В этом случае с помощью формулы (11.5) определяется g^{\max} , для которого $a/A = M/A$ (если $A < M$, то g сверху не ограничено). Затем выбирается ряд значений $g < g^{\max}$ и для каждого из них вычисляется скорость гидролиза АТФ и полная концентрация нуклеотида. Таким образом, в соответствии с условиями эксперимента может быть определена область допустимых значений g и в этой области построена зависимость скорости гидролиза АТФ от экспериментальной задаваемой концентрации субстрата.

Процедура расчетов для каждого данного g состоит в вычислении следующих величин:

1) концентраций актомиозиновых комплексов a и свободных «включенных» активных центров α соответственно формулам (11.5) и (11.7) для ряда значений g ;

2) концентрации свободных миозиновых центров $\mu = M - a$ и эффективной константы скорости ассоциации актина и миозина $\kappa = k_1\mu$ для заданных g ;

3) скорости гидролиза АТФ при циклическом взаимодействии актина и миозина $w = \kappa\alpha$ и эффективной константы диссоциации актомиозина $v = \kappa/g$ для каждого g ;

4) концентрации свободного субстрата в соответствии с (11.16). Как ясно, на этом этапе ряду значений g ставится в соответствие ряд значений S :

$$S = \frac{k_2 v}{k_3 (k_2 - v)} ;$$

5) концентрации связанного нуклеотида s :

$$s = \frac{k_a S}{k_d + k_a S} M. \quad (11.23)$$

Отношение в (11.23) равно доле миозиновых центров, занятых нуклеотидом, т. е.

$$\frac{[MS] + [AMS] + [AMP] + [MP]}{[M_{св}] + [AM] + [MS] + [AMS] + [MP] + [AMP]}.$$

Его выражение через элементарные константы скорости может быть получено из схемы Лимна и Тейлора (см. рис. 52). Если считать $[MS]$ и $[AMS]$ незначительными, то мы можем получить выражения для $[AMP]$, $[AM]$ и $[M_{св}]$ через $[MP]$ из условий стационарности

$$\frac{d[AM]}{dt} = \frac{d[M_{св}]}{dt} = \frac{d[AMP]}{dt} = 0,$$

а затем необходимое нам отношение может быть рассчитано прямо. Оно имеет форму выражения (11.23) с

$$k_a = k_3 \left(1 + \frac{k_1 \alpha}{k_2} \right) \quad \text{и} \quad k_d = k_1 \alpha + \frac{k_3 k_6}{k_7} \simeq k_1 \alpha + k_6; \quad (11.24)$$

6) полной концентрации нуклеотида $N = s + S$.

На основании описанной процедуры для разных экспериментальных условий были рассчитаны зависимости скорости гидролиза АТФ как свободным, так и содержащим регуляторные белки актомиозином от концентрации АТФ. Результаты расчета представлены на рис. 69,70 как функции $\lg N$. Для сравнения на тех же рисунках даны экспериментальные точки из соответствующих кривых Бремеля и др. [88, 89]. Параметры k_1 , k_2 и k_3 варьировались относительно величин, удовлетворяющих выражению (11.22), до получения согласия между вычисленными и экспериментальными кривыми. Окончательные значения этих констант даны на соответствующих графиках.

Можно видеть, что расчетные кривые удовлетворительно совпадают с экспериментальными точками, исключая область низких концентраций субстрата. Это расхождение можно устранить, предположив, что реальная эффективная константа диссоциации субстрата k_d примерно равна 1 с^{-1} , а не $0,1 \text{ с}^{-1}$, которая получается из формулы (11.24) для начальных участков всех кривых в случае, когда $\mu \gg A$. В этой формуле не принимается в расчет обратимости стадии ассоциации субстрата с миозиновым центром. Однако, согласно данным Бакшоу и Трэнсема [83], константа скорости диссоциации $MgATP$ не превышает $0,02 \text{ с}^{-1}$, следовательно, наше предположение не выполняется.

Один из авторов экспериментальных кривых, рассчитанных нами, Бремель считает, что расхождение расчета с экспериментальными данными в этом случае может быть обусловлено негово-

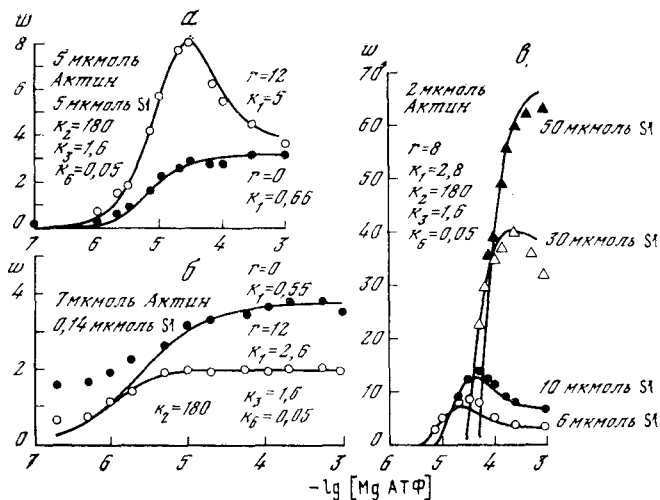


Рис. 69. Скорость гидролиза АТФ системой акто-S1 в зависимости от концентрации субстрата

Кривые рассчитаны при указанных на рисунке значениях параметров. Точки и треугольники на а, б и в соответствуют экспериментальным точкам на рис. 1, 2 и 3А из работы [88]. Скорость АТФазной реакции выражена как число оборотов в секунду на моль субфрагмента-1 (а, б) и актина (в). Константа k_1 дана в 10^6 моль $^{-1}$.с $^{-1}$, k_2 в с $^{-1}$, k_3 в 10^6 моль $^{-1}$.с $^{-1}$, k_6 в с $^{-1}$

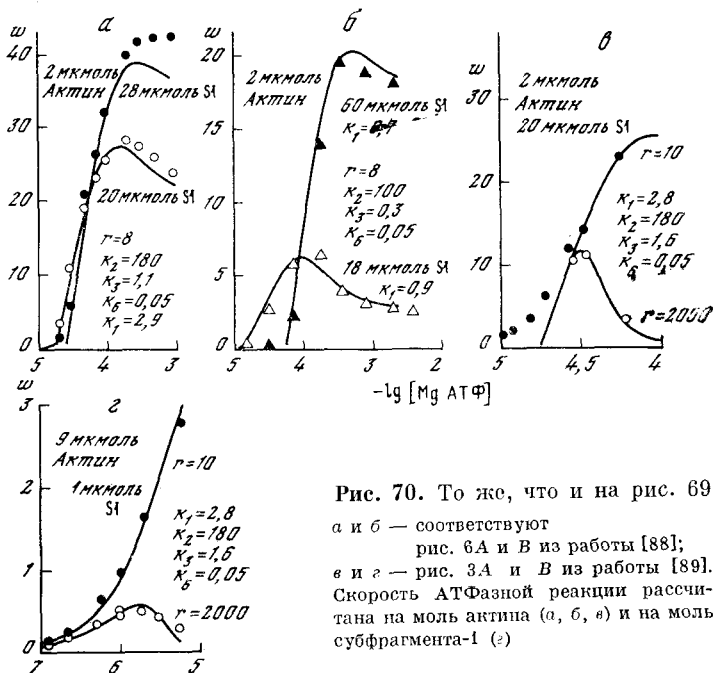


Рис. 70. То же, что и на рис. 69
 а и б — соответствуют рис. 6А и В из работы [88];
 в и г — рис. 3А и В из работы [89].
 Скорость АТФазной реакции рассчитана на моль актина (а, б, в) и на моль субфрагмента-1 (г)

генностью препаратов S1, не принимавшейся в расчет в настоящих вычислениях.

Можно предположить, что вариации параметров модели от графика к графику отражают естественную изменчивость различных препаратов фермента. Однако эта изменчивость не позволяет говорить о количественном согласии модели с реальным поведением системы, хотя любую экспериментальную кривую можно подобрать индивидуальным набором параметров. Один набор констант достаточен для описания различных экспериментальных ситуаций: в девяти случаях из 14 (кривые рис. 69, б, в и 70, в, г) для регулируемого и «включенного» F-актина и субфрагмента-1 миозина специфичными являются следующие константы скоростей:

$$k_1 = 2,6 \cdot 10^6 \text{ моль}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}, \quad k_2 = 180 \text{ с}^{-1}, \\ k_3 = 1,6 \cdot 10^6 \text{ моль}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}, \quad k_6 = 0,05 \text{ с}^{-1}.$$

Те же самые константы оказываются подходящими и для нерегулируемого актина, за исключением константы k_1 , которая в этом случае составляет либо $0,66 \cdot 10^6 \text{ моль}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$ (см. рис. 69, а), либо $0,55 \cdot 10^6 \text{ моль}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$ (см. рис. 69, б). Следует отметить, что константа скорости диссоциации продукта k_2 , которая, согласно схеме Лимна и Тейлора, должна быть лимитирующей скоростью АТФазной реакции, почти в 10 раз больше, чем указанная Айзенбергом и Муссом [109] для акто-НММ и использованная Лимном и Тейлором. Таким образом, становится возможным количественное сопоставление соответствующих стадий цикла мостика на рис. 54.

Кальций-зависимый параметр ингибирования r в отсутствие кальция и при 100 мкмоль кальция имеет значение 2000 (нижние кривые рис. 70, в и г) и 8—12 (рис. 69, в; 70, а, б, верхние кривые рис. 69, а; 70, в и нижняя кривая рис. 69, б) соответственно. В случае нерегулируемого актина r равно нулю (нижняя кривая рис. 69, а и верхняя рис. 69, б).

11.7. Обсуждение экспериментальных данных в свете кинетической модели регуляции

В поведении модели проявляются все особенности стационарной АТФазной кинетики регулируемого акто-S1 (см. раздел 11.1).

При низком уровне концентрации субстрата и достаточной концентрации субфрагмента-1 кальций не активирует систему (см. рис. 70, в).

При средних концентрациях субфрагмента-1 и актина скорость АТФазной реакции может иметь колоколообразную зависимость от MgATФ как в отсутствие, так и в присутствии кальция (нижняя кривая рис. 70, в и верхняя кривая рис. 69, а соответственно).

Колоколообразность исчезает в двух экстремальных случаях: при очень низкой и при очень высокой концентрациях субфрагмента-1 (см. рис. 69, б и в, 70, а, б соответственно).

Оптимальная концентрация субстрата увеличивается с увеличением концентрации субфрагмента-1 (см. рис. 69, в).

Теория предсказывает (см. формулу (11.22)) сдвиг оптимума в область более высоких концентраций MgATФ, если активировать систему кальцием при постоянной концентрации субфрагмента-1 (т. е. если r уменьшить от 2000 до 10).

Все эти особенности очень просто объясняются в терминах модели. Распределение функциональных единиц между «включенным» и «выключенным» состояниями управляется двумя факторами. Первый — это зависящая от кальция вероятность инициирования «включенного» состояния и второй — вероятность его стабилизации путем образования комплекса акто-S1. Существенно, что первый процесс имеет «низкую мощность» по сравнению со вторым, т. е. кальций сам по себе может активировать лишь небольшую долю функциональных единиц. Полная активация достигается лишь вследствие образования связи актина с миозином. Связывание кальция с тропонином в последнем случае неважно. При низкой концентрации субстрата большинство актиновых центров связано с миозином, так что поведение системы не зависит от концентрации кальция. В этом случае скорость АТФазной реакции ограничена частотой диссоциации актомиозина, которая увеличивается с концентрацией MgATФ. При высоком уровне субстрата скорость диссоциации может достигать своей максимальной величины k_2 . Кроме этого, если концентрация миозиновых центров низка, большинство функциональных единиц не будет иметь актиновых центров, связанных с миозином. В отсутствие кальция меньше чем 1/1000 этих функциональных единиц находится во «включенном» состоянии, так что скорость АТФазной реакции лимитирована частотой ассоциации актина и миозина. Этот механизм дает колоколообразную зависимость скорости АТФазной реакции от концентрации субстрата.

При высоком уровне кальция ситуация сходная, за исключением того, что в этом случае во «включенном» состоянии находится около 1/10 свободных функциональных единиц. Следовательно, скорость актомиозиновой АТФазы измерима даже при очень низком отношении миозин—актин. Ее зависимость от концентрации субстрата в этом случае гиперболична, поскольку образование актомиозиновых комплексов недостаточно, чтобы изменить распределение функциональных единиц между «включенным» и «выключенным» состояниями.

При более высокой концентрации миозиновых центров та же степень диссоциации актомиозина достигается при более высоких уровнях концентрации субстрата. Скорость ассоциации изменяется линейно с концентрацией миозиновых центров и может увеличиваться до бесконечности, тогда как скорость диссоциации ограничена величиной k_2 . Таким образом, при очень высокой концентрации миозиновых центров степень диссоциации может оказаться недостаточной для того, чтобы скорость АТФазной реакции достиг-

ла максимума даже при бесконечном увеличении концентрации субстрата. Это приводит к исчезновению колоколообразности.

Можно заключить, что существенные свойства регулируемого акто-S1 могут быть интерпретированы в терминах модели. Следовательно, нет необходимости предполагать взаимодействие между активными центрами в функциональной единице, которое приводит к усилению их кофакторной активности в том случае, когда часть из них связана с миозиновыми центрами. В терминах нашей модели любой «включенный» активный центр регулируемой тонкой нити имеет постоянную кофакторную активность, которая значительно больше, чем у активного центра нерегулируемого актина, или, более точно, первый имеет в несколько раз большую константу скорости ассоциации с миозином (см. рис. 69,б). Можно предположить, что электростатическое отталкивание между F-актином и головкой миозина частично экранируется тропомиозином.

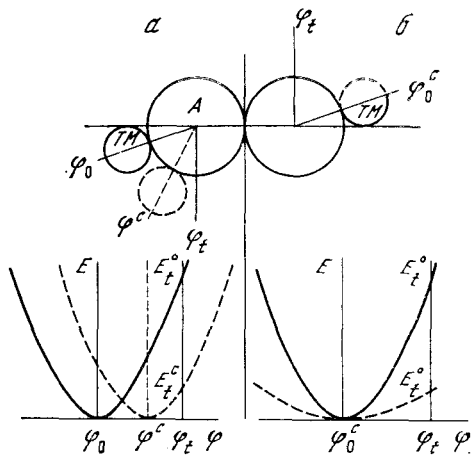
11.8. Молекулярные интерпретации модели

На рис. 71 иллюстрируются две возможные молекулярные интерпретации предложенной кинетической схемы. Угловое положение тропомиозина совместимо с образованием связи актин—миозин, если φ превышает критическую величину φ_t . В отсутствие кальция тропомиозин находится при φ_0 . Когда тропонин связывает Ca^{2+} , возможны две ситуации. В первом случае (рис. 71,а) равновесное положение тропомиозина сдвигается к φ_c , но крутизна потенциальной ямы та же, что и в отсутствие кальция. Во втором случае (рис. 71,б) равновесное положение не изменяется, но потенциальная яма становится более плавной. В обоих случаях положения с $\varphi > \varphi_t$ становятся более вероятными, т. е. связывание на тропонине кальция сдвигает распределение функциональных единиц во «включенное» состояние. В свете рентгеновских данных Хэнсон с сотр. [125] по реконструированным тонким нитям более предпочтительна первая возможность, однако и вторая не может быть полностью исключена из рассмотрения. В любом случае связывание на актине миозина должно приводить к дополнительному смещению тропомиозина. Данные Чаплэна и Захарьяна [94], согласно которым образование поперечного мостика инициирует значительное увеличение интенсивности слоевой линии 19,3 нм, могут рассматриваться как косвенное доказательство модели. Описанный здесь механизм сильно зависит от эффективного средства актينا к миозину. Так, например, увеличение g от 1 до 2 при $r = 2000$ приводит к более чем десятикратной активации системы (как можно видеть из рис. 62, б, доля актомиозиновых комплексов увеличивается от 0,03 до 0,4). Таким образом, кажется, что модель пригодна и для контролируемых миозином систем, в которых активные нити содержат тропомиозин, но не проявляют чувствительности к кальцию.

Рис. 71. Два варианта индуцированных кальцием изменений потенциальной ямы для тропомиозинового тяжа ТМ на поверхности активной спирали А в случае свободного тропонина (сплошная линия) и тропонина, связанного с кальцием (штриховая)

а — сдвиг потенциальной ямы;
б — сглаживание потенциальной ямы.

E — потенциальная энергия;
 φ — угловая переменная;
 φ_0 и φ_c — равновесные положения тропомиозина в отсутствие и в присутствии кальция соответственно. При $\varphi > \varphi_t$ активные центры становятся доступными для миозина. Соответствующие критические уровни энергии в отсутствие и в присутствии кальция будут E_t^0 и E_t^c



Эффективное средство актина к миозину и степень активации живой мышцы должны уменьшаться со скоростью сокращения. Предварительная оценка показывает, что данные Хилла о скорости энергопродукции [130] могут быть объяснены предложенной моделью.

Многие стороны модели открыты для критики. Во-первых, модель не принимает в расчет вполне вероятное различие во взаимодействии с актином релаксировавшего и интермеднатного $M \cdot ADF \cdot F_n$ комплексов, которое было постулировано Айзенбергом и Килли [107]. Результаты Инойе, Шиегавы и Тономуры [148] также могут считаться указанием на такую разницу, которая в терминах нашей модели может приводить к нелинейной зависимости эффективной константы скорости ассоциации k от концентрации свободных миозиновых центров. Во-вторых, кажется, что независимая работа функциональных единиц сама по себе едва ли возможна из-за стремления молекул тропомиозина образовывать непрерывный тяж вдоль всей тонкой нити. И наконец, может показаться странным, что даже при насыщающем уровне кальция свободные от миозина функциональные единицы проводят во «включенном» состоянии только небольшую часть времени. Однако такой тип кальциевой регуляции имеет некоторые преимущества по сравнению с механизмом «все или ничего». Он более эффективен, потому что при достаточно высокой концентрации миозиновых центров для достижения практически полной активации необходима гораздо меньшая амплитуда индуцированного кальцием сдвига тропомиозинового тяжа. Добавочный сдвиг тропомиозина в этом случае «оплачивается» из энергии взаимодействия миозина с актином. Это должно приводить к кооперативному характеру связывания тропонином кальция, а это делает систему более лабильной, так что для ее работы необходимы меньшие концентрации кальция.

1. Арронет Н. И. Мышечные и клеточные сократительные (двигательные) модели. Л., «Наука», 1971.
2. Бауэр Э. С. Теоретическая биология. М.—Л., Изд. ВИЭМ, 1935.
3. Бендолл Дж. Мышцы, молекулы и движение. М., «Мир», 1970.
4. Блюменфельд Л. А. Проблемы биологической физики. М., «Наука», 1974.
5. Блюменфельд Л. А., Ермаков Ю. А., Пасечник В. И. Кинетика реакций гемоглобина с окисью углерода. 3. О существовании конформационно неравновесных молекул Нв в процессах присоединения и диссоциации СО.—«Биофизика», 1977, 22, № 1, 8—14.
6. Будницкий А. А., Смыкова Н. А. Изменение структуры поперечной полосатости мышц при сокращении. III Всесоюз. симпоз. по биофизике мышечного сокращения. Ереван, 1971. Тезисы докл., с. 68—70.
7. Букатина А. Е. Зависимость динамических характеристик глицеринизированных мышечных волокон кролика от концентрации кальция. III Всесоюз. симпоз. по биофизике мышечного сокращения. Ереван, 1971. Тезисы докл., с. 82—83.
8. Букатина А. Е. Исследование механохимического процесса по кинетике АТФазной реакции в цикле взаимодействия актина и миозина и по динамике сокращения глицеринизированных мышечных волокон. Автореф. канд. дис. Пуцзино, 1971.
9. Букатина А. Е., Бурацев В. Н., Чаплий М. Ф. Экспериментальное исследование динамических характеристик интактных и глицеринизированных мышц позвоночных.— В кн.: Биофизические основы и регуляция процесса мышечного сокращения. Пуцзино, 1972, с. 198—203.
10. Букатина А. Е., Децеровский В. И. Циклический механизм актомпозиновой АТФазы.—«Биофизика», 1972, 17, № 5, 738—743.
11. Букатина А. Е., Децеровский В. И. Циклический механизм актомиозиновой АТФазы. IV Междунар. биофизический конгресс. Москва, 1972. Тезисы докл., т. 2, с. 358—359.
12. Бурацев В. Н. Экспериментальные исследования и моделирование нестационарных режимов мышечного сокращения. Автореф. дис., МГУ, 1977.
13. Бурацев В. Н., Децеровский В. И. Автоколебания силы при сокращении портняжной мышцы лягушки в изотоническом режиме.—«Биофизика», 1970, 15, № 3, 541—542.
14. Бурацев В. Н., Децеровский В. И., Чаплий М. Ф. Переходные режимы сокращения поперечно-полосатых мышц (расчеты и экспериментальные данные). IV Междунар. биофизический конгресс. Москва, 1972. Тезисы докл., т. 2, с. 351.
15. Бурацев В. Н., Кокос Ю. М., Сарвазян А. П., Чаплий М. Ф. Экспериментальное исследование фазовых характеристик мышцы в режиме вынужденного периодического изменения длины.— В кн.: Колебательные процессы в биологических и химических системах, т. 2. Пуцзино, 1971, с. 16—19.
16. Волькенштейн М. В. Кооперативные свойства ферментов. Стационарная кинетика кооперативных реакций.— В кн.: Молекулярная биофизика. М., «Наука», 1965, с. 5—15.

17. *Волькенштейн М. В.* Молекулы и жизнь. М., «Наука», 1965.
18. *Габелова Н. А., Замятин А. А.* Изменение объема суспензии миофибрилл при моделировании мышечного сокращения и расслабления. — «Биофизика», 1971, 16, № 2, 239—243.
19. *Гудвин Б.* Временная организация клетки. М., «Мир», 1966.
20. *Дежнеревский В. И., Дежнеревский В. И.* Проявление релаксационных процессов в стационарной кинетике ферментативных реакций. II Всесоюз. биохимический съезд. Ташкент, 1969, Тезисы докл. с. 37—38.
21. *Дежнеревский В. И.* О механизме повышения теплоустойчивости скелетных мышц в D₂O. — «Биофизика», 1965, 10, № 4, 708—710.
22. *Дежнеревский В. И.* Две модели мышечного сокращения. — «Биофизика», 1968, 13, № 5, 928—935.
23. *Дежнеревский В. И.* Кинетическая модель мышечного сокращения. Симпоз. по биофизике и биохимии мышцы. Тбилиси, 1968. Тезисы докл. «Мецниереба», 1968, с. 47—48.
24. *Дежнеревский В. И.* Кинетическая теория сокращения поперечно-полосатых мышц. М., ВИНТИ, № 818-деп. 1969.
25. *Дежнеревский В. И.* Теория сокращения асинхронных мышц. — «Биофизика», 1970, 15, № 1, с. 53—61.
26. *Дежнеревский В. И.* Кинетическая модель мышечного сокращения и ее экспериментальная проверка. Автореф. канд. дис., МГУ, 1970.
27. *Дежнеревский В. И.* Расчеты вынужденных колебаний в кинетической модели мышечного сокращения. — В кн.: Колебательные процессы в биологических и химических системах, т. 2. Пуцдино, 1971, с. 11—15.
28. *Дежнеревский В. И.* Скольжение и шарнирный тип конформационной перестройки — микромеханика биологических двигательных систем. III Всесоюз. симпоз. по биофизике мышечного сокращения. Ереван, 1971. Тезисы докл., с. 85—87.
29. *Дежнеревский В. И.* Экспериментальные основы и постулаты кинетической теории мышечного сокращения. — В кн.: Механизмы мышечного сокращения. М., «Наука», 1971, с. 210—219.
30. *Дежнеревский В. И.* Теория мышечного сокращения и параметры элементарного сократительного цикла. IV Междунар. биофизический конгресс. Москва, 1972. Докл. симпоз., т. 1. Пуцдино, 1973, с. 408—416.
31. *Дежнеревский В. И.* Регуляция функциональной активности актомиозиновых систем. Препринт. Пуцдино, 1973.
32. *Дежнеревский В. И.* Модель регуляции функциональной активности актомиозиновых систем нативным тропомиозином. Всесоюз. симпоз. по биофизике и биохимии мышц. Тбилиси, 1974. Тезисы докл. «Мецниереба», 1974, с. 133—135.
33. *Дежнеревский В. И.* Регуляция активности мышечных белков. — В кн.: Биофизика и биохимия мышечного сокращения. М., «Наука», 1975, с. 247—254.
34. *Дежнеревский В. И., Жаботинский А. М., Сельков Е. Е., Сидоренко Н. П., Шноль С. Э.* Колебательные биологические процессы на молекулярном уровне. — «Биофизика», 1970, 15, № 2, 225—233.
35. *Дежнеревский В. И., Корниенко И. А.* Влияние D₂O на витальную окрашиваемость и теплоустойчивость скелетных мышц лягушки. — «Биофизика», 1964, 9, № 3, 315—320.
36. *Емельянов В. Б., Ефимов В. Н., Франк Г. М.* Изучение структурных изменений в мышце при одиночном сокращении дифракционным методом. — В кн.: Биофизика мышечного сокращения. М., «Наука», 1966, с. 70—77.
37. *Емельянов В. Б., Федорова И. С.* Структура саркомеров фазного мышечного волокна в условиях пассивного и активного изменения длины. Всесоюз. симпоз. по биофизике и биохимии мышц. Тбилиси, 1976. Тезисы докл. «Мецниереба», с. 98—99.
38. *Замятин А. А.* Объемные эффекты в растворах белков и в сократительных системах. Автореф. канд. дис., Пуцдино, 1971.
39. *Иванов В. И.* Изучение механизма действия фермента аспаргат-трансаминазы оптическими методами. Канд. дис., МГУ, 1968.

40. *Игнатъева Л. Г., Серегина Т. М., Блюменфельд Л. А., Рууге Э. К., Артюх Р. И., Постникова Г. Б.* Исследование ферментативной активности миозина методом спиновой метки.—«Биофизика», 1972, 17, № 3, 533—536.
41. *Каменский И. И.* Математическое описание некоторых биохимических процессов (ферментативный катализ, оксигенация гемоглобина, гемолиз эритроцитов). Канд. дис., Пушкино, 1969.
42. *Климов А. А.* Исследование сокращения саркомеров мышечных волокон речного рака при спонтанной контрактуре.— В кн.: Биофизика живой клетки, т. 4, вып. 1. Пушкино, 1973, с. 175—177.
43. *Климов А. И., Дещеревский В. И.* Изучение растворимости неполярных аминокислот в легкой и тяжелой воде в связи с термостабильностью белков. II Всесоюз. симпоз. по химии пептидов. Душанбе, 1969. Тезисы докл.
44. *Климов А. И., Дещеревский В. И.* Изучение растворимости неполярных аминокислот в легкой и тяжелой воде в связи с термостабильностью белков.—«Биофизика», 1971, 16, № 3, 556—559.
45. *Кобозев Н. И.* О валентном и энергетическом механизме катализа.— В кн.: Катализ в высшей школе. Изд-во МГУ, 1962, с. 43—63.
46. *Медведев Ю. В.* Новые представления в учении о ферментах. М., Изд-во АН СССР, 1932.
47. *Молчанов А. М.* Термодинамика и эволюция.— В кн.: Колебательные процессы в биологических и химических системах. М., «Наука», 1967, с. 292—308.
48. *Пантелеева Н. С.* Миозин (O^{18} -обмен и фосфорилирование). Изд-во ЛГУ, 1975.
49. *Пасечник В. И.* Теоретические и экспериментальные исследования изменения вязкоупругих свойств и объема мышц при сокращении. Автореф. канд. дис., Пушкино, 1969.
50. *Поглазов Б. Ф.* Структура и функции сократительных белков. М., «Наука», 1965.
51. *Поглазов Б. Ф., Тихоненко А. С., Энгельгардт В. А.* Действие АТФ на выход ДНК из бактериофага.—«ДАН СССР», 1962, 145, № 2, 450—452.
52. *Подлубная Э. А.* Влияние ионной силы на структуру паракристаллов легкого меромиозина.—«Биофизика», 1973, 18, № 4, 593—599.
53. *Подлубная Э. А., Фрейдина Н. А., Шагина М. Д., Орлова А. А.* Исследование молекулярных взаимодействий в структуре толстых и тонких нитей мышцы.— В кн.: Молекулярная и клеточная биофизика. М., «Наука», 1977, с. 124.
54. *Подрабичек П. А., Каменский И. И.* О зависимости между оксигенацией гемоглобина и его молекулярными изменениями.— «Биофизика», 1967, 12, № 6, 983—988.
55. *Пригожин И.* Введение в термодинамику необратимых процессов. М., ИЛ, 1961.
56. *Прингл Дж.* Модели мышцы.— В кн.: Моделирование в биологии. М., 1963, с. 85—125.
57. *Прингл Дж.* Полет насекомых. М., ИЛ, 1963.
58. *Рууге Э. К., Медведева Н. В., Виленикина М. Н., Блюменфельд Л. А.* Исследование конформационных превращений миозина с помощью двух типов спиновых меток.—«Биофизика», 1976, 21, № 3, 409—412.
59. *Самосудова Н. В., Любковская Р. Г., Франк Г. М.* Ультраструктурные изменения медленных и промежуточных мышечных волокон лягушки при тоническом сокращении. IV Междунар. биофизический конгресс. Москва, 1972. Тезисы секц. докл., ч. 2, секц. 8, с. 395.
60. *Сент-Дьёрдьи А. Г.* О мышечной деятельности, М.—Л., Медгиз, 1947.
61. *Сидоренко Н. П., Дещеревский В. И.* Обобщенная теория кинетических уравнений ферментативного катализа как следствие учета релаксации белковой макромолекулы.—«Биофизика», 1970, 15, № 5, 785—792.
62. *Сидоренко Н. П., Дещеревский В. И.* Эффект аномального изменения реологических свойств растворов мышечных белков на последней стадии гидролиза АТФ.—«Биофизика», 1976, 21, № 3, 580—582.

63. Сидоренко Н. П., Фрейдина Н. А., Децеровский В. И., Подлубная З. А. Кинетическое исследование взаимодействия F-актина с тяжелым меромозином. Всесоюз. симпози. по биофизике и биохимии мышц. Тбилиси, 1974. Тезисы докл. «Мецниереба», 1974, с. 63—65.
64. Сорени Э. Т., Чепинога О. П. О новом специфическом свойстве мюзина.—«Укр. биохим. журн.», 1946, 18, № 2, 177—180.
65. Сребницкая Л. К., Будницкий А. А. Структурные перестройки в саркомерах поперечно-полосатых мышц беспозвоночных при сокращении. Всесоюз. симпози. по биофизике и биохимии мышц. Тбилиси, 1974. Тезисы докл. «Мецниереба», 1974, с. 120—121.
66. Тихонов А. Н. О зависимости решений дифференциальных уравнений от малого параметра.—«Матем. сб.», 1948, 22, 193—204.
67. Уэбб Л. Ингибиторы ферментов и метаболизма. М., «Мир», 1966.
68. Филлипс Д. Ц. Конформационный анализ структуры гемоглобина. VII Междунар. конгресс по кристаллографии. Тезисы докл. М., «Наука», 1966.
69. Франк Г. М. Некоторые вопросы физических и физико-химических основ мышечного сокращения.—«Изв. АН СССР. Сер. биол.», 1965, № 3, 335.
70. Франк Г. М., Емельянов В. Б., Подлубная З. А., Самосудова Н. В., Сребницкая Л. К. Молекулярные основы мышечного сокращения. III Всесоюз. биохимический съезд. Рига, 1974. Тезисы докл., с. 207—208.
71. Хаксли Х. Структура поперечно-полосатой мышцы.— В кн.: Молекулярная биология. М., ИЛ, 1963, с. 13—27.
72. Хаксли Х. Механизм мышечного сокращения.— В кн.: Молекулы и клетки. М., «Мир», 1967, с. 107—118.
73. Хассельбах В., Вебер Г. Внутриклеточная регуляция мышечного сокращения.— В кн.: Молекулярная биология. Проблемы и перспективы. М., «Наука», 1964, с. 237—249.
74. Хилл А. Теплопродукция мышцы.— В кн.: Молекулярная биология. М., ИЛ, 1963, с. 28—36.
75. Хилл А. Механика мышечного сокращения. М., «Мир», 1972.
76. Шноль С. Э. Конформационные колебания макромолекул.— В кн.: Колебательные процессы в биологических и химических системах. М., «Наука», 1967, с. 22—41.
77. Энгельгардт В. А. Мышечные белки и функция мышцы. V конф. по высокомолекулярным соединениям. Совещание по белку. Москва, 1947. М., Изд-во АН СССР, 1948, с. 122—145.
78. Antonini E., Chiancone E., Brunori M. Studies on the relations between molecular and functional properties of haemoglobin. VI. Observations on the kinetics of haemoglobin reactions in concentrated salt solutions.—«J. Biol. Chem.», 1967, 242, N 19, 4360—4366.
79. Antonini E., Brunori M., Anderson S. Studies on the relations between molecular and functional properties of haemoglobin. VII. Kinetic effects of the reversible dissociation of haemoglobin into single chain.—«J. Biol. Chem.», 1968, 243, N 8, 1816—1822.
80. Astbury W. X-ray studies of muscle.—«Proc. Roy. Soc. London», 1950, B137, 58.
81. Bacetti B. L'ultrastructure del miofilamento e il modello «9 + 2».—«Atti Accad. naz. Lincei. Mem. Cl. sci. fis., mat. e natur.», 1964, 36, N 5, 710—714.
82. Bagshaw C. R., Eccleston J. F., Eckstein F., Goody R. S., Gutfreund H., Trentham D. R. The magnesium ion-dependent adenosine triphosphatase of myosin. Two-step processes of adenosine triphosphate association and adenosine diphosphate dissociation.—«Biochem. J.», 1974, 141, N 2, 351—364.
83. Bagshaw C. R., Trentham D. R. The reversibility of adenosine triphosphate cleavage by myosin.—«Biochem. J.», 1973, 133, N2, 323—328.
84. Bagshaw C. R., Trentham D. R. The characterization of myosin-product complexes and of product-release steps during the magnesium ion-dependent adenosine triphosphatase reaction.—«Biochem. J.», 1974, 141, N2 331—349.

85. *Bagshaw C. R., Trentham D. R.* Transient kinetic and isotopic tracer studies of the myosin adenosine triphosphatase reaction.—«J. Supramolec. Structure», 1975, 3, N4, 315—322.
86. *Barouch W. W., Moos C.* Effect of temperature on actin activation of heavy meromyosin ATPase.—«BBA», 1971, 234, N2, 183—189.
87. *Benzinger T. H., Hems R.* Reversibility and equilibrium of the glutaminase reaction observed calorimetrically to find the free energy of adenosine triphosphate hydrolysis.—«Proc. Nat. Acad. Sci.», 1956, 42, N12, 896—900.
88. *Bremel R. D., Murray J. M., Weber A.* Manifestations of cooperative behaviour in the regulated actin filaments during actin-activated ATP hydrolysis in the presence of calcium.—«Cold Spring Harbor Sympos. Quant. Biol.», 1973, 37, 267—275.
89. *Bremel R. D., Weber A.* Cooperative behaviour within the functional unit of the actin filament in vertebrate skeletal muscle.—«Nature New Biol.», 1972, 238, N82, 97—101.
90. *Chadwick L. E.* Stroke amplitudes as a function of air density in the flight of drosophila.—«Biol. Bull.», 1951, 100, N1, 15—27.
91. *Chadwick L. E., Williams C. M.* The effect of atmospheric pressure and composition on the flight of drosophila.—«Biol. Bull.», 1949, 97, 115—137.
92. *Chaplain R. A.* The effect of Ca^{2+} and fibre elongation on the activation of the contractile mechanism of insect fibrillar flight muscle.—«BBA», 1967, 131, N2, 385—392.
93. *Chaplain R. A., Frommelt B.* A mechanochemical model for muscular contraction. I. The rate of energy liberation at steady state velocities of shortening and lengthening.—«J. Mechanochem. Cell Motility», 1971, 1, N1, 41—56.
94. *Chaplain R. A., Sacharjan S.* Calcium and tension-dependent changes in the actin filament structure of insect fibrillar muscle.—«FEBS Letters», 1974, 42, N1, 50—53.
95. *Davies R. E.* A molecular theory of muscle contraction.—«Nature», 1963, 199, 1068.
96. *Deshcherevsky V. I.* Mechanism of activation of myosin ATPase by actin. Sympos. Mechanism Action and Regulatory Properties Phosphotranspheras. Berlin, 1971, p. 122—124.
97. *Deshcherevsky V. I.* A kinetic theory of striated muscle contraction.—«Bioreology», 1971, 7, 147—170.
98. *Deshcherevsky V. I.* A theoretical approach to muscle contraction.—«Studia biophysica», 1972, 33, H. 3, 157—165.
99. *Deshcherevsky V. I.* The theory of muscle contraction and the parameters of elementary contractile cycle. IV Intern. Biophys. Congr. Moscow, 1972. Sympos. papers. Pushchino, p. 419—437.
100. *Deshcherevsky V. I.* Kinetic model of muscle contraction.— In: Proc. Conf. on Biological and Biochemical Oscillators, Prague, 1968. N. Y., London, Acad. Press, 1973, p. 311—328.
101. *Deshcherevsky V. I.* Kinetic model of regulation of muscle protein activity.—«J. Theoret. Biol.», 1977, 64, 517—534.
102. *Ebashi S.* Third component participating in the superprecipitation of «natural» actomyosin.—«Nature», 1963, 200, 1010.
103. *Ebashi S., Ebashi F.* A new protein factor promoting contraction of actomyosin.—«Nature», 1964, 203, N 4945, 645—646.
104. *Ebashi S., Endo M., Ohtsuki I.* Control of muscle contraction.—«Quart. Rev. Biophys.», 1969, 2, N 4, 351—384.
105. *Ebashi S., Kodama A.* A new protein factor promoting aggregation of tropomyosin.—«J. Biochem.», 1965, 58, N 1, 107—108.
106. *Eisenberg E., Kielley W. W.* Native tropomyosin: Effect on the interaction of actin with heavy meromyosin and subfragment-1.—«BBRC», 1970, 40, N 1, 50.
107. *Eisenberg E., Kielley W. W.* Evidence for a refractory state of heavy meromyosin and subfragment-1 unable to bind to actin in the presence of ATP.—«Cold Spring Harbor Sympos. Quant. Biol.», 1973, 37, 145—152.

108. *Eisenberg E., Moos C.* The adenosine triphosphatase activity of acto-heavy meromyosin. A kinetic analysis of actin activation.—«Biochemistry», 1968, 7, N 4, 1486—1489.
109. *Eisenberg E., Moos C.* Actin activation of heavy meromyosin adenosine triphosphatase.—«J. Biol. Chem.», 1970, 245, N 9, 2451—2456.
110. *Elliot G. E., Lowy J., Millman B. M.* Low angle X-ray diffraction studies of living striated muscle during contraction.—«J. Mol. Biol.», 1967, 25, N 1, 31—45.
111. *Elliot G. E., Lowy J., Worthington C. R.* An X-ray and light diffraction study of the filament lattice of striated muscle in the living state and in rigor.—«J. Mol. Biol.», 1963, 6, N 4, 295—305.
112. *Engelhardt V. A., Lubimova M. N.* Myosin and adenosine triphosphatase.—«Nature», 1939, 144, N 3650, 668—669.
113. *Ernst E.* Biophysics of the striated muscle. Publ. Hung. Acad. Sci., Budapest, 1963.
114. *Fenn W. O.* The relation between the work performed and the energy liberated in muscular contraction.—«J. Physiol.», 1924, 58, N 6, 373—395.
115. *Fenn W. O.* A quantitative comparison between the energy liberated and the work performed by the isolated sartorius muscle of the frog.—«J. Physiol.», 1924, 58, N 2—3, 175—203.
116. *Fenn W. O., Marsh B. S.* Muscular force at different speeds of shortening.—«J. Physiol.», 1935, 85, N 3, 277—297.
117. *Frank G. M.* Some problems of the physical and physico-chemical bases of muscle contraction.—«Proc. Roy. Soc. London», 1964, B160, N 981, 473—476.
118. *Garamvölgyi N.* The arrangement of the myofilaments in the insect flight muscle. I, II.—«J. Ultrastruct. Res.», 1965, 13, N 5—6, 409—435.
119. *Gasser H. S., Hill A. V.* The dynamic of muscular contraction.—«Proc. Roy. Soc. London», 1924, B96, N 678, 398—437.
120. *Givan M. M., Podolsky R. J.* Contraction kinetics of striated muscle fibres following quick changes in load.—«J. Physiol.», 1966, 184, N 3, 511—534.
121. *Gordon A. M., Huxley A. F., Julian F. J.* The variation in isometric tension with sarcomere length in vertebrate muscle fibres.—«J. Physiol.», 1966, 184, N 4, 170—192.
122. *Gray B. F.* Reversibility and biological machines.—«Nature», 1975, 253, N 5491, 436—437.
123. *Hanson J.* Studies on the cross-striation of the indirect flight myofibrils of the blowfly calliphora.—«J. Biophys. and Biochem. Cytol.», 1956, 2, N 6, 691—740.
124. *Hanson J., Huxley H. E.* The structural basis of contraction in striated muscle. Sympos. Soc. Experiment. Biol., N 9. Cambridge, Univ. Press, 1955, p. 228—264.
125. *Hanson J., Lednev V., O'Brien E. J., Bennet P. M.* Structure of the actin-containing filaments in vertebrate skeletal muscle.—«Cold Spring Harbor Sympos. Quant. Biol.», 1973, 37, 311—318.
126. *Haselgrove J. C.* X-ray evidence for a conformational change in the actin-containing filaments of vertebrate striated muscle.—«Cold Spring Harbor Sympos. Quant. Biol.», 1973, 37, 341—352.
127. *Hearon J. L., Bernhard S. A., Friess S. L., Botts D. J., Morales M. F.* Enzyme Kinetics.— In: The Enzymes. V. 1. N. Y., Acad. Press, 1959, p. 49—142.
128. *Hill A. V.* The maximum work and mechanical efficiency of human muscles and their most economical speed.—«J. Physiol.», 1922, 56, N 1, 19—41.
129. *Hill A. V.* The heat of shortening and the dynamic constants of muscle.—«Proc. Roy. Soc. London», 1938, B126, 136—195.
130. *Hill A. V.* The effect of load on the heat of shortening of muscle.—«Proc. Roy. Soc. London», 1964, B159, N975, 297—324.
131. *Hill T. L., Eisenberg E., Chen M-der, Podolsky R. J.* Some selfconsistent two-state sliding filament models of muscle contraction.—«Biophys. J.», 1975, 15, N 4, 335—373.

132. *Hill T. L., White G. M.* On the sliding-filament model of muscular contraction. IV. Calculation of the force-velocity curves.—«Proc. Nat. Acad. Sci. USA», 1968, **61**, N 3, 889—896.
133. *Huxley A. F.* Muscle structure and theories of contraction.—«Progr. Biophys. and Biophys. Chem.», 1957, **7**, 255—318.
134. *Huxley A. F.* The activation of striated muscle and its mechanical response.—«Proc. Roy. Soc. London», 1971, **B178**, N 1050, 1—27.
135. *Huxley A. F., Niedegerkerke R.* Structural changes in muscle during contraction. Interference microscopy of living muscle fibres.—«Nature», 1954, **173**, N 4412, 971—973.
136. *Huxley A. F., Simmons R. M.* Rapid «give» and the tension «shoulder» in the relaxation of frog muscle fibres.—«J. Physiol.», 1970, **210**, N 1, 32p—33p.
137. *Huxley A. F., Simmons R. M.* Proposed mechanism of force generation in striated muscle.—«Nature», 1971, **233**, N 5321, 533—538.
138. *Huxley H. E.* Electron microscope studies on the structure of natural and synthetic protein filaments from striated muscle.—«J. Mol. Biol.», 1963, **7**, N 3, 281—308.
139. *Huxley H. E.* Structural arrangements and the contraction mechanism in striated muscle.—«Proc. Roy. Soc. London», 1964, **B160**, N 981, 442—448.
140. *Huxley H. E.* Structural changes in muscle and muscle proteins during contraction. XIII Intern. Congr. Biochem. Switzerland, 1970. Abstrs, p. 23.
141. *Huxley H. E.* Cross-bridge movement and filament overlap. Amer. Biophys. Soc. Abstrs. 1971, p. 235a.
142. *Huxley H. E.* Structural changes during muscle contraction.—«Biochem. J.», 1971, **125**, N 4, 85p—86p.
143. *Huxley H. E.* Structural changes in the actin- and myosin-containing filaments during contraction.—«Cold Spring Harbor Sympos. Quant. Biol.», 1973, **37**, 361—376.
144. *Huxley H. E., Brown W.* X-ray diffraction studies of muscle.—«J. Mol. Biol.», 1967, **30**, N 2, 383—434.
145. *Huxley H. E., Hanson J.* Changes in the cross striations of muscle during contraction and stretch and their structural interpretation.—«Nature», 1954, **173**, N 4412, 973—976.
146. *Huxley H., Hanson J.* Structure of insect indirect flight muscle.—«J. Appl. Phys.», 1957, **28**, N 11, 1372, Abstr. B 17.
147. *Iasui T., Watanabe S.* A study of «superprecipitation» of myosin B by the change in turbidity.—«J. Biol. Chem.», 1965, **240**, N 1, 98—104.
148. *Inoue A., Shikeyama M., Tonomura Y.* Direct evidence for the two route mechanism of the acto-H-meromyosin-ATPase reaction.—«J Biochem.», 1973, **74**, N 5, 923—934.
149. *Jewell B. R., Rüegg J. C.* Oscillatory contraction of insect fibrillar muscle after glycerol extraction.—«Proc. Roy. Soc. London», 1966, **B164**, N 996, 428—459.
150. *Jewell B. R., Wilkie D. R.* An analysis of the mechanical components in frog striated muscle.—«J. Physiol.», 1958, **143**, N 3, 515—540.
151. *Julian F.* Activation in a skeletal muscle contraction model with a modification for insect fibrillar muscle.—«Biophys. J.», 1969, **9**, N 4, 547—569.
152. *Kalckar H. M.* The function of phosphate in cellular assimilations.—«Biol. Rev.», 1942, **17**, N 1, 28—45.
153. *Katz B.* The relation between force and speed in muscular contraction.—«J. Physiol.», 1939, **96**, N 1, 45—64.
154. *Kominz D. R., Maruyama K., Levenbook L., Lewis M.* Tropomyosin, myosin and actin from the blowfly, *phormia regina*.—«BBA», 1962, **63**, N 1, 106—116.
155. *Koshland D. E.* The molecular basis for enzyme regulation.— In: *The Enzymes*. V. 1, N. Y., Acad. Press, 1959, p. 342—395.
156. *Levin A., Wyman J.* The viscous elastic properties of muscle. — «Proc. Roy. Soc. London», 1927, **B101**, N 709, 218—243.
157. *Lynn R. W.* The steady-state actomyosin ATPase: a further note.—«J. Theor. Biol.», 1975, **49**, N 2, 425—429.

158. *Lynn R. W., Taylor E. W.* Transient state phosphate production in the hydrolysis of nucleoside triphosphates by myosin.—«Biochemistry», 1970, 9, N15, 2975—2983.
159. *Lynn R. W., Taylor E. W.* Mechanism of adenosine triphosphate hydrolysis by actomyosin.—«Biochemistry», 1971, 10, N 25, 4617—4624.
160. *Machin K. S., Pringle J. W. S.* The physiology of insect fibrillar muscle. II. Mechanical properties of a beetle flight muscle.—«Proc. Roy. Soc. London», 1959, B151, N 943, 204—225.
161. *Markus C., Barnard E. A., Castellani B. A., Saunders D.* Ligand-induced conformational changes in ribonuclease.—«J. Biol. Chem.», 1968, 243, N 15, 4070—4076.
162. *Maruyama W.* Interaction of insect actomyosin with adenosine triphosphate.—«J. Cellular and Compar. Physiol.», 1958, 51, N 2, 173—187.
163. *Millman B. M., Elliott G. F., Lowy J.* X-ray diffraction studies.—«Nature», 1967, 213, N 5074, 356—358.
164. *Monod J., Wyman J., Changeux J.-P.* On the nature of allosteric transitions: a plausible model.—«J. Mol. Biol.», 1965, 12, N4, 88—118.
165. *Moore P. B., Huxley H. E., Rosier D. J. de.* Three-dimensional reconstruction of F-actin, thin filaments and decorated thin filaments.—«J. Mol. Biol.», 1970, 50, N 2, 279—295.
166. *Mühlrad A., Kovass M., Hegyi G.* The role of Mg^{2+} in the contraction and adenosine triphosphatase activity of myofibrils.—«BBA», 1965, 107, N 3, 567—578.
167. *Muirhead H., Perutz M.* Structure of haemoglobin. A three-dimensional Fourier synthesis of reduced human of haemoglobin at 5.5 Å resolution.—«Nature», 1963, 199, N4898, 633—638.
168. *Murray J. M., Weber A.* The cooperative action of muscle proteins.—«Scient. Amer.», 1974, 230, N 2, 58—71.
169. *O'Brien E. J., Bennet P. M., Hanson J.* Optical diffraction studies of myofibrillar structure.—«Philos. Trans. Roy. Soc. London», 1971, B261, 201.
170. *Page S., Huxley H. E.* Filament length in striated muscle.—«J. Cell Biol.», 1963, 19, 369.
171. *Podlubnaya Z. A.* Electron microscope investigation of the LMM structure as function of ionic strength.—In: Proc. Sympos. Structure and Function Normal and Diseased Muscle and Peripheral Nerve. Kazimierz, 1972. Polish Medical Publishers, 1972, p. 47.
172. *Podlubnaya Z. A., Freydina N. A.* Myosin aggregation «in vitro» and thick filament structure in muscle. V Intern. Biophys. Congr., Copenhagen, 1975. Abstrs, p. 562.
173. *Podolsky R. J.*—In: Proc. Conf. Contractility. Pennsylvania, Pittsburgh, 1960, p. 247.
174. *Podolsky R. J., Nolan A. C.* Cross-bridges properties derived from physiological studies of frog muscle fibers.— In: Contractility of muscle cells and related processes. R. J. Podolsky (Ed.). Prentice-Hall, 1971, p. 247—260.
175. *Podolsky R. J., Nolan A. C., Zaveler S. A.* Cross-bridge properties derived from muscle isotonic velocity transients.—«Proc. Nat. Acad. Sci. USA», 1969, 64, N 2, 504—511.
176. *Portzehl H., Caldwell P. C., Rüegg J. C.* The dependence of contraction and relaxation of muscle fibres from the crab *mala squinado* on the internal concentration of free calcium ions.—«BBA», 1964, 79, N 3, 581—591.
177. *Pringle J. W. S.* The excitation and contraction of the flight muscles of insects.—«J. Physiol.», 1949, 108, 226—232.
178. *Reedy M. K.* Ultrastructure of insect flight muscle. I. Screw sense and structural grouping in the rigor cross-bridge lattice.—«J. Mol. Biol.», 1968, 31, N2, 155—176.
179. *Ridgway E. B., Ashley C. C.* Calcium transients in single muscle fibers.—«BBRC», 1967, 29, N 2, 229—234.
180. *Rizzino A. A., Barouch W. W., Eisenberg E., Moos C.* Actin-heavy meromyosin binding. Determination of binding stoichiometry from adenosine triphosphatase kinetic measurements.—«Biochemistry», 1970, 9, N 12, 2402—2408.

181. *Rüegg J. C., Steiger G. J., Schädler M.* Mechanical activation of the contractile system in skeletal muscle.—«Pflügers Arch. ges. Physiol., Europ. J. Phys.», 1970, 319, F. 2, 139—145.
182. *Samosudova N. V., Ludkovskaya R. G., Frank G. M.* Ultrastructure of frog muscle fibres under potassium contracture. V Intern. Biophysics Congr. Copenhagen, 1975. Abstrs, p. 540.
183. *Sartorelli L., Fromm H. J.* Direct O^{18} exchange measurements relevant to possible activated or phosphorylated states of myosin.—«Biochemistry», 1966, 5, N 9, 2877—2884.
184. *Seidel J. C., Gergely J.* The conformation of myosin during the steady state of ATP hydrolysis: studies with spin labelled at the S_1 thiol groups.—«BBRC», 1974, 44, N 4, 826—830.
185. *Seidel J. C., Gergely J.* Electron spin resonance of myosin spin labelled at the S_1 thiol groups during hydrolysis of adenosine triphosphate.—«Arch. Biochem. and Biophys.», 1973, 158, N 2, 853—856.
186. *Sidorenko N. P., Descherevsky V. I.* A generalized equation of enzymatic kinetics with account of relaxation of the enzyme macromolecule. VII Intern. Sympos. Chem. Natural Products, Riga, 1970. Abstrs, p. 138—139.
187. *Spudich J. A., Huxley H. E., Finch J. T.* Regulation of skeletal muscle contraction. II. Structural studies of the interaction of the TM — TN complex with actin.—«J. Mol. Biol.», 1972, 72, N 3, 619—632.
188. *Szent-Györgyi A. G.* The role of actin-myosin interaction.— In: Aspects of cell motility. Sympos. Soc. Experiment. Biol. N 22. Cambridge, Univ. Press, 1968, p. 17—42.
189. *Thorson J., White D. C. S.* Distribution representations for actin-myosin interaction in the oscillatory contraction of muscle.—«Biophys J.», 1969, 9, N 3, 360—390.
190. *Tomomura Y.* The pre-steady state of the myosin-adenosine triphosphate system. I. Initial rapid liberation of inorganic phosphate.—«J. Biochem.», 1965, 57, N 5, 604—615.
191. *Tomomura Y., Kitagawa Sh.* The initial phase of actomyosin ATPase.—«BBA», 1957, 26, N1, 15—21.
192. *Tomomura Y., Kitagawa Sh., Yoshimura J.* The initial phase of myosin A ATPase and the possible phosphorylation of myosin A.—«J. Biol. Chem.», 1962, 237, N 12, 3660—3666.
193. *Tregear R. T.* The oscillation of insect flight muscle. Current topics bioenergetics, v. 2. Acad. Press, 1967, p. 269—286.
194. *Trentham D. R., Bardsley R. C., Eccleston J. F., Weeds A. G.* Elementary processes of the magnesium ion-dependent adenosine triphosphatase activity of heavy meromyosin. A transient kinetic approach to the study of kinases and adenosine triphosphatases and a colorimetric inorganic phosphate assay in situ.—«Biochem. J.», 1972, 126, N 3, 635—644.
195. *Ulrich W. C.* Theory of contraction for striated muscle.—«J. Theoret. Biol.», 1967, 15, N 1, 53—69.
196. *Volkenstein M. V.* Muscular contraction.—«BBA», 1969, 180, N 3, 562—572.
197. *Wakabayashi T., Huxley H. E., Amos L. A., Klug A.* Three-dimensional image reconstruction of actin-tropomyosin complex and actin-tropomyosin-troponin T-troponin I complex.—«J. Mol. Biol.», 1975, 93, N 4, 477—497.
198. *Weber A., Hasselbach W.* Die Erhöhung der Rate der ATP-Spaltung durch Myosin- und Actomyosin-gels bei Beginn der Spaltung.—«BBA», 1954, 15, 237—245.
199. *Werber M. M., Szent-Györgyi A. G., Fasman G. D.* Fluorescence studies on heavy meromyosin-substrate interaction.—«Biochemistry», 1972, 11, N 15, 2872—2882.
200. *Worthington C. R.* Large axial spacing in striated muscle.—«J. Mol. Biol.», 1959, 1, 398.
201. *Yamada T., Shimizu H., Suga H.* A kinetic study of the energy storing enzyme-product complex in the hydrolysis of ATP by HMM.—«BBA», 1973, 305, N 3, 642—653.

ОГЛАВЛЕНИЕ

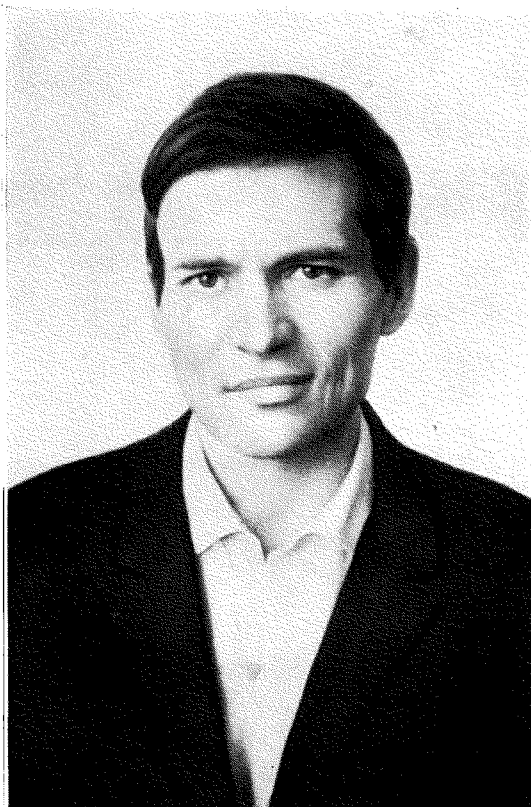
От редактора	3
Предисловие	5
Введение	7
1. Математические модели в биологии	7
2. Проблема биологической подвижности и мышечное сокращение	9
Часть I	
КИНЕТИЧЕСКАЯ ТЕОРИЯ СОКРАЩЕНИЯ ПОПЕРЕЧНО-ПОЛОСАТЫХ МЫШЦ	
Глава 1. Биофизический подход к изучению мышечного сокращения	12
1.1. Основные экспериментальные закономерности	12
1.2. Обсуждение некоторых моделей в свете гипотезы скользящих нитей	16
Глава 2. Экспериментальные основы и математическая формулировка кинетической модели мышечного сокращения	20
2.1. Сводка основных экспериментальных фактов	20
2.2. Принципы работы сократительного аппарата	21
2.3. Математическая формулировка кинетической теории	22
2.4. Постулаты и переход к кинетической модели	24
Глава 3. Скелетные мышцы позвоночных	28
3.1. Стационарный режим	28
3.2. Оценка параметров	29
3.3. Изотоническое сокращение нерастянутой мышцы	30
3.4. Изотоническое сокращение растянутой мышцы	32
3.5. Изометрическое сокращение	34
Глава 4. Колебательный режим сокращения асинхронных мышц насекомых	37
4.1. Уточнение модели	37
4.2. Оценка параметров и упрощение схемы элементарного рабочего цикла	42
4.3. Математическая формулировка модели и результаты	43
4.4. Сопоставление с экспериментальными данными	47
Глава 5. О возможной кооперативности в работе мостиков	50
5.1. Формулировка кооперативной схемы	50
5.2. Описание работы схемы	51
5.3. Интерпретация экспериментальных данных	52
Глава 6. Некоторые общие вопросы кинетической теории мышечного сокращения	54
6.1. Механохимическая обратная связь	54
6.2. Обобщение теории. Начальная фаза сокращения, расслабление	56

6.3.	Мышца как механохимическая квазикристаллическая система	57
6.4.	Область действия и границы применимости кинетической модели	59
Глава 7.	Некоторые нестационарные режимы сокращения поперечно-полосатых мышц	60
7.1.	Колебания силы в изотоническом режиме сокращения	60
7.2.	Экспериментальные исследования и расчет вынужденных колебаний длины поперечно-полосатых мышц	64
7.3.	Уточнение параметров кинетической модели	69
7.4.	Расчет характеристик замкнутого мостика по динамике развития силы после быстрого укорочения	75
Глава 8.	Перспективы теоретического подхода к проблемам мышечного сокращения	81
8.1.	Основные достижения кинетической теории сокращения	81
8.2.	Возможные направления дальнейшего развития теории	84
Приложение.	Проявление остаточных конформационных изменений молекулы белка в кинетике ферментативных реакций	88
П.1.	Дискретная модель	90
П.2.	Модель с конечным временем релаксации	93

Часть II

ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ ПОДХОД К БИОХИМИЧЕСКОЙ КИНЕТИКЕ МЫШЕЧНЫХ БЕЛКОВ

Глава 9.	Механизм гидролиза MgATФ миозином	98
9.1.	Роль биохимических данных в теории мышечного сокращения	98
9.2.	Схема работы MgATФазы миозина	100
Глава 10.	Циклический механизм гидролиза АТФ актомиозином	106
10.1.	Экспериментальные данные	106
10.2.	Циклическая схема актомиозиновой АТФазы	110
10.3.	Схема Лимна и Тейлора	119
10.4.	Сопоставление механического и гидролитического циклов актомиозинового мостика в сокращающейся мышце	122
Глава 11.	Кинетическая модель регуляции функциональной активности мышечных белков	124
11.1.	Структура и особенности биохимической кинетики регулируемых актомиозиновых систем	124
11.2.	Основные положения и математическая формулировка кинетической модели регуляции	128
11.3.	Интерпретация эффективных констант модели κ и ν в терминах схемы Лимна и Тейлора	135
11.4.	Расчет стационарной кинетики нерегулируемых актомиозиновых систем	139
11.5.	Оценка параметров модели для регулируемых систем	140
11.6.	Расчет стационарной кинетики регулируемого акто-S1	142
11.7.	Обсуждение экспериментальных данных в свете кинетической модели регуляции	146
11.8.	Молекулярные интерпретации модели	148
	Литература	150



ВЛАДИМИР ИВАНОВИЧ
ДЕЩЕРЕВСКИЙ