

## Модулирующее действие хлорида алюминия и его комплекса с оксипроизводным 2-фенилхромона на регуляторные механизмы сокращения мышц

Т. Л. Давидовская, Е. И. Богуцкая, П. Г. Минченко, Н. С. Мирошниченко

Киевский университет имени Тараса Шевченко  
252033, Киев, ул. Владимирская, 64

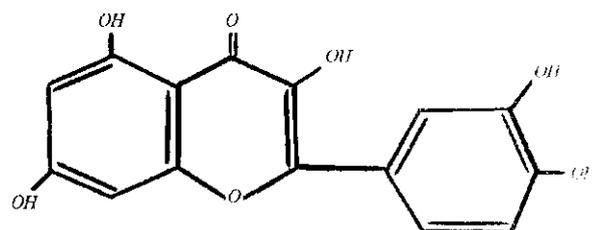
*Показано, что кверцетин уменьшает проницаемость плазматической мембраны гладких мышц толстого кишечника морских свинок для ионов кальция, не влияя на состояние внутриклеточных пулов этих катионов. Хлорид алюминия увеличивает амплитуду калий-индуцированных сокращений, амплитуда кофеиновых ответов остается без изменений. Кверцетин в комплексе с хлоридом алюминия способен проникать в миоциты за счет растворения в липидной фазе плазматической мембраны и изменять освобождение  $Ca^{2+}$  из саркоплазматического ретикулума. Также установлено, что хлорид алюминия влияет на структурные изменения актомиозинового комплекса скелетных мышц.*

**Введение.** По своему действию на организм человека алюминий, бериллий, барий, висмут, кадмий относятся к группе токсических элементов, вызывающих ряд заболеваний (легочный алюминоз, дилазная энцефалопатия, алюминиевая остеодистрофия и др.) [1—4]. Несмотря на это, алюминий получил широкое распространение как основной компонент многих современных технических и бытовых средств, а его гидроокись входит в состав фармакологических препаратов, действие большинства которых направлено на нейтрализацию желудочного сока при язвенных заболеваниях и токсикозах [5].

Представляло интерес исследовать влияние алюминия на проницаемость мембраны гладких мышц желудочно-кишечного тракта для ионов кальция, состояние внутриклеточных пулов этих катионов, что в конечном счете является определяющим в реализации механизма сокращения. Учитывая, что алюминий способен образовывать комплекс с флавоноидами, в частности с кверцетином, изучить и его действие.

Кверцетин — это вещество растительного про-

исхождения, являющееся производным 2-фенилхромона:



Он входит в состав пищевого рациона человека.

Поскольку сокращение мышц определяется не только клеточными регуляторными процессами, но и состоянием белков, входящих в сократительный комплекс, в нашей работе в модельных экспериментах мы изучали также влияние алюминия на структурные перестройки актомиозина скелетных мышц.

**Материалы и методы.** Исследования проводили на тонких (50—100 мкм) кольцевых мышечных

полосках толстого кишечника морских свинок. В опытах использовали раствор Кребса следующего состава (ммоль/л): NaCl — 120,4; KCl — 5,9; NaHCO<sub>3</sub> — 15,5; MgCl<sub>2</sub> — 1,2; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> — 1,2; CaCl<sub>2</sub> — 2,5; глюкоза — 11,5 (рН раствора поддерживали на уровне 7,4), температура раствора составляла 36 °С. В опытах с гиперкалиевым раствором концентрацию K<sup>+</sup> увеличивали, заменяя соответствующее количество ионов натрия ионами калия. Исследуемые вещества (хлорид алюминия, кверцетин и их комплекс) заданной концентрации вносили в раствор Кребса, омывающий препараты, за 30 мин до изучения их механической активности, вызванной гиперкалиевым раствором, которую регистрировали с помощью электромеханического преобразователя МХ1С. Сигналы регистрировали на диаграммной бумаге электрического потенциометра КСП-4. Сокращения гладкомышечных полосок осуществляли в изометрическом режиме. Кверцетин растворяли в диметилсульфоксиде (ДМСО), концентрация которого в растворе Кребса составляла 10 %, что, как показали результаты экспериментов, не оказывает существенного влияния на регистрируемые механические параметры гладкомышечных полосок.

Плоские фосфолипидные мембраны формировали, используя метод Мюллера [6], на отверстиях диаметром 0,6 мм в тефлоновом стаканчике из раствора, представляющего собой смесь фосфатидилхолина и холестерина (в соотношении 2:1) в *n*-гептане. Общая концентрация липидов в растворе составляла 20 мг/мл.

Омывающий билипидные мембраны (БЛМ) раствор состоял из 10 мМ трис-HCl, рН 7,4, и необходимого количества хлоридов металлов. В работе использовали хлор-серебряные электроды, которые размещали в 2 М растворе KCl с агаровыми мостиками, заполненными 0,2 М KCl на 2 М агар-агаре. Поляризационный потенциал между электродами не превышал 1—1,5 мВ.

Трансmemбранный ток измеряли с помощью операционного усилителя, позволяющего регистрировать токи до 10<sup>-12</sup> А. Разницу потенциалов подавали на мембрану от источника напряжения, разрешающего получать постоянное (до 100 мВ) или линейно-переменное напряжение, контролирующееся с помощью цифрового вольтметра (Щ 4300). Потенциал на внешней стороне стаканчика (*цис*-сторона) задавали относительно потенциала внутреннего объема (*транс*-сторона), который принимали равным нулю. Ток регистрировали с помощью двухкоординатного самописца типа ENDIM 620.02. Во всех экспериментах исследуемые вещества вводили с *цис*-стороны БЛМ.

Полученные экспериментальные данные обрабатывали статистически. Достоверность результатов оценивали по критерию Стьюдента.

Влияние алюминия на структурные перестройки актомиозина скелетных мышц кролика изучали в присутствии АТФ. Актомиозин получали по методу Барани [7]. Структурные перестройки актомиозина в ходе гидролиза АТФ регистрировали по изменению его оптической плотности с помощью спектрофотометра СФ-46, соединенного с потенциометром Н-306. О скорости протекания регистрируемых процессов судили по величине времени ( $t_{1,2}$ ), в течение которого оптическая плотность актомиозина возрастает до величины  $D/2$ , где  $D$  — оптическая плотность актомиозина после завершения реакции суперпреципитации (СПП). О степени СПП судили по величине  $D-D_0$ , где  $D_0$  — оптическая плотность актомиозина до СПП. АТФ-разную активность актомиозина определяли методом Фиске-Суббароу [8] по количеству отщепленного в ходе АТФ-разной реакции неорганического фосфата (P<sub>н</sub>). Реакцию фиксировали при помощи трихлоруксусной кислоты.

**Результаты и обсуждение.** Гиперкалиевая контрактура гладких мышц — удобный прием при изучении проницаемости плазматической мембраны клеток для ионов кальция [8]. В наших опытах исследовали сокращение гладкомышечных полосок в ответ на аппликацию избытка ионов калия (80 мМ) в нормальном растворе Кребса и при добавлении в него исследуемых веществ. Как показали результаты экспериментов, амплитуда гиперкалиевой контрактуры (80 мМ) составляла 70 ± 3,6 % ( $n = 18$ ,  $p < 0,05$ ) по отношению к сокращению, вызванному 130 мМ K<sup>+</sup>, которое принимали за 100 %.

Опыты показали, что кверцетин в концентрации 10<sup>-11</sup>—10<sup>-8</sup> М не вызывает статистически достоверных изменений амплитуды сокращений, тогда как ее повышение до 10<sup>-4</sup> М сопровождается уменьшением калиевой контрактуры на 28,2 ± 0,6 % ( $n = 12$ ,  $p < 0,05$ ) по сравнению с контролем (рис. 1, а, в). Отмывание гладкомышечных клеток раствором Кребса сопровождается восстановлением исходных значений исследуемого параметра. Описанные изменения свидетельствуют об уменьшении проницаемости плазматической мембраны для ионов кальция, однако эти изменения могут быть связаны также с влиянием кверцетина на накопление Ca<sup>2+</sup> внутриклеточными хранилищами, что указывало бы на его способность проникать в миоплазму клеток. Для выяснения этого вопроса использовали кофеин, который увеличивает внутриклеточную концентрацию кальция, освобождая

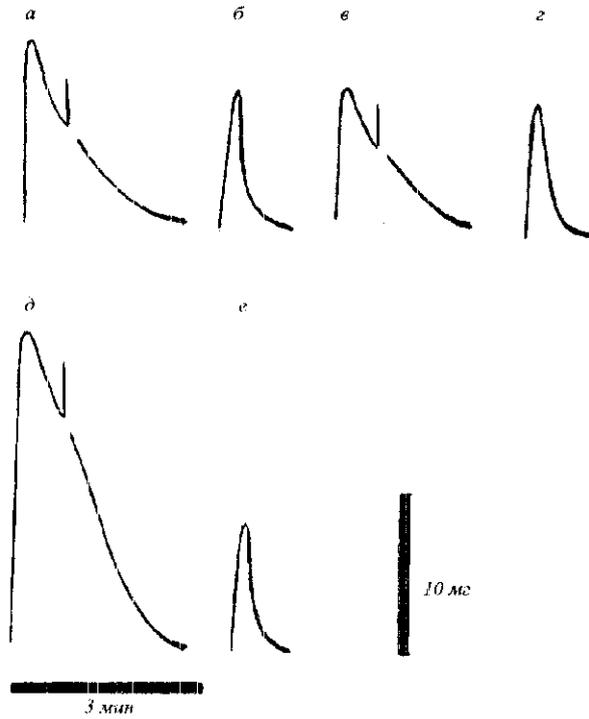


Рис. 1. Сокращения полосок циркулярных гладких мышц толстого кишечника, вызванные гиперкалиевым (80 мМ) (а) и кофеинсодержащим (25 мМ) (б) растворами в контроле и при добавлении к эти растворы кверцетина (в, г), хлорида алюминия (д, е) в концентрациях  $10^{-4}$  и  $10^{-5}$  М соответственно

большую часть катионов из саркоплазматического ретикулума и не влияя на плазматическую мембрану. В наших опытах амплитуда кофеиновой контрактуры в присутствии различных концентраций кверцетина не изменялась (рис. 1, б, г), что указывает на неспособность этого вещества проникать в гладкомышечную клетку.

В последующих опытах изучали действие хлорида алюминия в концентрации  $10^{-11}$ — $10^{-4}$  М на гиперкалиевую контрактуру и кофеиновые ответы гладкомышечных препаратов. Результаты продемонстрировали, что амплитуда калий-индуцированных сокращений в рассматриваемых условиях увеличивается и, например, при концентрации этого вещества  $10^{-5}$  М превышает норму в 1,72 раза (рис. 1, а, д), а при концентрации  $10^{-4}$  М — в 2,4 раза. Отмывание мышечных полосок раствором Кребса в течение 20 мин приводило к восстановлению исследуемого параметра. В этих опытах кофеиновые ответы достоверно, как и в случае с кверцетином, не изменялись (рис. 1, б, е).

Кверцетин в комплексе с алюминием в кон-

центрации  $10^{-11}$  М увеличивал калиевую контрактуру в 2,8 раза (рис. 2, а, в). При этом кофеиновые сокращения достоверно увеличивались в 1,24 раза (рис. 2, б, г). Увеличение концентрации комплекса до  $10^{-7}$  М вызывает значительное уменьшение амплитуды калиевой и кофеиновой контрактур, а при  $10^{-6}$  М — их практически полное угнетение (рис. 2, д, е). Отмывание мышечных полосок раствором Кребса в течение 30 мин сопровождается частичным восстановлением исходной амплитуды сокращений до  $60,7 \pm 2,6$  % ( $n = 14$ ,  $p < 0,05$ ) для калиевого сокращения и  $32 \pm 2,0$  % ( $n = 14$ ,  $p < 0,05$ ) — для кофеинового. Приведенные результаты свидетельствуют о способности кверцетина в комплексе с алюминием проникать в миоциты и угнетать освобождение  $Ca^{2+}$  из саркоплазматического ретикулума.

Нами исследована также способность хлорида алюминия, кверцетина и его комплекса с алюминием формировать каналы проводимости в мембране. В качестве модели мы использовали искусственные билипидные мембраны. Как показали результаты экспериментов, введение исследуемых веществ и их комплекса в ячейку с БЛМ не вызывало скачкообразного повышения трансмембранного тока, характерного для образования структур типа ионных каналов. Таким образом, приведенные выше экспериментальные данные позволяют допустить, что эффекты исследуемых веществ на гладкомышечные полоски связаны с их примембранным действием, а в случае их комплекса — со способностью проникать в клетку за счет растворения в липидной фазе плазматической мембраны и изменять выход ионов  $Ca^{2+}$  из внутриклеточных депо этих катионов. Учитывая полученные результаты, представляло интерес изучить в модельном эксперименте влияние алюминия на структурные перестройки актомиозина мышц.

Характер механохимической реакции актомиозина СПП предопределяется условиями среды, такими как ионная сила, концентрации  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$  и другими параметрами [11]. Ранее было показано [12], что при взаимодействии актомиозина с АТФ двухвалентные катионы оказывают влияние как на скорость реакции СПП, так и на структуру образующегося при этом преципитата. В зависимости от вида двухвалентного катиона он может приобретать форму мелких частичек («тонкий» преципитат), более крупных агрегатов («грубый» преципитат) или же находиться в виде четко сформированного сгустка. Взаимодействие актомиозина с  $Mg$ -АТФ — субстратом актомиозиновой АТФазы — сопровождается образованием «тонкого» преципитата. Кривая изменения оптической плотности в

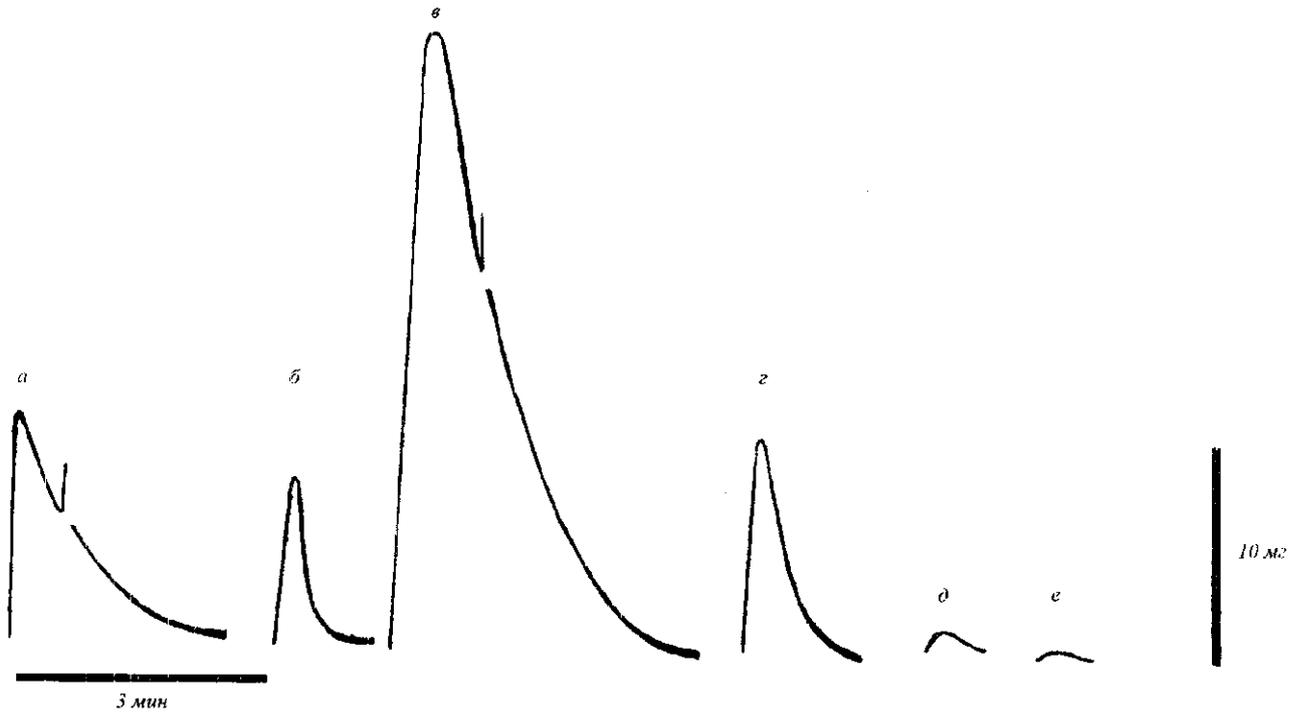


Рис. 2. Сокращения полосок циркулярных гладких мышц толстого кишечника, вызванные гиперкалиевым (80 мМ) (а) и кофеинсодержащим (25 мМ) (б) растворами в контроле и при добавлении в эти растворы комплекса хлорида алюминия с кверцетином в концентрации  $10^{-11}$  (в, г) и  $10^{-6}$  М (д, е)

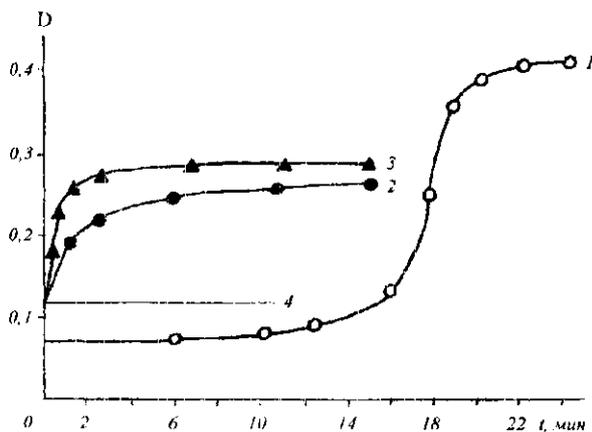


Рис. 3. Изменение оптической плотности актомиозина скелетных мышц кролика при добавлении: 1 —  $10^{-4}$  М АТФ и  $10^{-3}$  М хлорида магния; 2 —  $10^{-4}$  М АТФ и  $10^{-3}$  М хлорида алюминия; 3 —  $10^{-4}$  М АТФ; 4 —  $10^{-4}$  М АДФ. Концентрация актомиозина 0,2 мг/мл, температура 20 °С

этом случае имеет длительную рефрактерную фазу, плавно переходящую в быструю фазу СПП (рис. 3, кривая 1). В отличие от ионов магния ионы алюминия в той же концентрации индуцируют реакцию СПП, протекающую с достаточно высокой скоростью (рис. 3, кривая 2), а образующийся при этом преципитат визуально имеет несколько большие размеры. Если сравнить скорости этих двух реакций, то в случае присутствия в реакционной среде ионов магния величина  $t_{1/2}$  составляла 18 мин, в то время как в присутствии ионов алюминия — только 2 мин. Ионы алюминия изменяют не только скорость и степень реакции СПП актомиозина, регистрирующиеся при добавлении ионов магния, но оказывают также значительное влияние на механизм образования преципитата, поскольку на кривых суперпреципитации исчезают рефрактерная фаза и фаза просветления актомиозина.

Выполнение контрольных опытов (рис. 3, кривая 3), когда реакционная смесь содержала только

следы двухвалентных катионов, показало, что реакция СПП в этом случае протекает с высокой скоростью и завершается образованием «грубого» преципитата. Одной из особенностей такой реакции СПП является ее нестабильность, в результате чего кривая суперпреципитации может или выходить на плато, или идти после максимума на спад, что является результатом частичного или полного выпадения преципитата в осадок. В присутствии ионов алюминия параметры реакции СПП изменяются, причем степень этих изменений определяется количеством взятого в опыт алюминия. Было установлено, что в интервале концентраций от  $10^{-4}$  до  $5 \cdot 10^{-4}$  М (рис. 4, кривые 1, 2) ионы алюминия оказывают определенное воздействие на СПП актомиозина, регистрируемое в присутствии следов двухвалентных катионов. При этом наблюдается частичное снижение скорости реакции СПП, однако вид преципитата не изменяется. При концентрации ионов алюминия, равной  $8 \cdot 10^{-4}$  М, скорость реакции СПП значительно снижалась, а образующийся при этом преципитат носил устойчивый характер и равномерно распределялся в кювете (рис. 4, кривая 3). Дальнейшее увеличение концентрации ионов алюминия до  $10^{-3}$  М сопровождалось значительным снижением степени СПП актомиозина (рис. 4, кривая 4), а при концентрации  $2 \cdot 10^{-3}$  М реакция СПП полностью ингибировалась, о чем свидетельствовал тот факт, что оптическая плотность актомиозина в ходе опыта не изменялась и оставалась на исходном уровне (рис. 4, кривая 5).

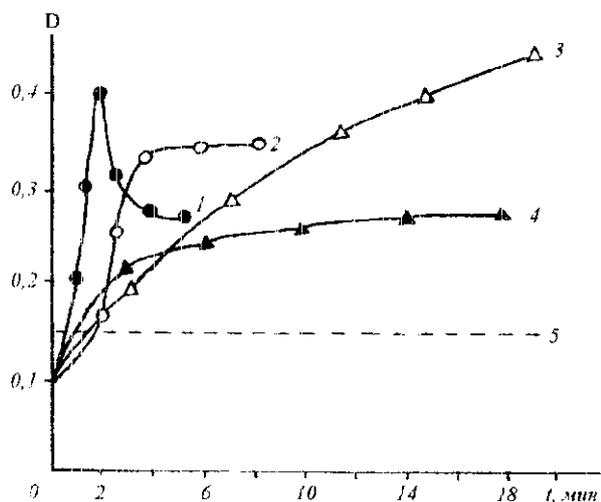


Рис. 4. Изменение оптической плотности актомиозина скелетных мышц кролика при добавлении  $10^{-4}$  М АТФ и хлорида алюминия в следующих концентрациях: 1 —  $10^{-4}$  М; 2 —  $5 \cdot 10^{-4}$  М; 3 —  $8 \cdot 10^{-4}$  М; 4 —  $10^{-3}$  М; 5 —  $2 \cdot 10^{-3}$  М. Концентрация актомиозина 0,2 мг/мл, температура 20 °C

Таким образом, как видно из представленных выше результатов, ионы алюминия оказывают значительное влияние на структурные перестройки актомиозинового комплекса, происходящие в ходе гидролиза АТФ.

В последующих опытах также было установлено его влияние и на ферментативные свойства актомиозина. Так, АТФазная активность актомиозина, измеренная в присутствии таких катионов, как магний, кальций и алюминий, соответственно равнялась 1,0; 10 и 2,3 мкг  $P_n \cdot \text{мг}^{-1} \cdot \text{мин}^{-1}$ . Ошибка измерения составляла при этом не более 2 %.

Полученные результаты показывают, что в исследуемых концентрациях алюминий влияет на актомиозиновый комплекс скелетных мышц и это влияние значительно отличается от такового «собственного» катиона мышц — магния. Следовательно, можно допустить, что попадание алюминия в организм, особенно в виде комплекса с органическими соединениями, будет вызывать нарушение функционирования его мышечной системы.

Т. Л. Давидовська, К. І. Богущька, П. Г. Мінченко,  
М. С. Мірошніченко

Модулююча дія хлориду алюмінію та його комплексу з оксидом 2-фенілхрому на регуляторні механізми скорочення м'язів

#### Резюме

Показано, що кверцетин зменшує проникність плазматичної мембрани гладеньких м'язів товстого кишечника морських свинок для іонів кальцію, не впливаючи на стан внутрішньоклітинних пулів цих катіонів. Хлорид алюмінію збільшує амплітуду калій-індукованих скорочень, амплітуду кофеїнових відповідей залишається без змін. Кверцетин в комплексі з хлоридом алюмінію здатний проникати в міоцити внаслідок розчинення в ліпідній фазі плазматичної мембрани та змінювати вивільнення  $Ca^{2+}$  з саркоплазматичного ретикулуму. Також встановлено, що хлорид алюмінію впливає на структурні зміни актомиозинового комплексу скелетних м'язів.

T. L. Davidovskaya, K. I. Bogutska, P. G. Minchenko,  
M. S. Miroshnichenko

Modulatory effect of aluminium and its complex with quercetin on muscle contractile regulatory mechanisms

#### Summary

It was shown that the quercetin decreases permeability of plasma membrane of smooth muscle of large intestine from guinea pig for calcium ions and does not influence on intracellular depots of cations. Aluminium increases the amplitude of potassium-induced contractions, while the amplitude of caffeine-induced replies stays without changes. Aluminium complex with quercetin can penetrate to myocytes due to solubility in lipid phase of plasma membrane and changes  $Ca^{2+}$  release from sarcoplasmic reticulum. It has been found that aluminium can influence on the structural changes of actomyosin complex of skeletal muscle.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Alfrey A. C., Le Gendre G. K., Kachru W. D.* The dialysis encephalopathy syndrome. Possible aluminium in toxication // *New Engl. J. Med.*—1976.—N 294.—P. 184—188.
2. *Zatta P., Favarato M., Nicolini M.* Deposition of aluminium in brain tissues of rats exposed to inhalation of aluminium acetylacetonate // *Neuroreport.*—1993.—4, N 9.—P. 1119—1122.
3. *Бабенко Г. А.* Микроэлементы в экспериментальной и клинической медицине.—Киев: Медицина, 1985.—125 с.
4. *Aggett P. I.* Physiology and metabolism of essential trace elements: An outline // *Clin. Endocrinol. Metab.*—1985.—14, N 3.—P. 513—543.
5. *Харкевич Д. А.* Фармакология.—М.: Медицина, 1993.—543 с.
6. *Muller P., Rudin D. O., Tien H. T. et al.* Reconstruction of cell membrane structure *in vitro* and its transformation into excitable system // *Nature.*—1962.—194, N 3519.—P. 979—980.
7. *Barany M., Barany K., Gaetiens E., Bailin G.* Chicken gissard myosin // *Arch. Biochem. and Biophys.*—1966.—113, N 1.—P. 205—221.
8. *Fiske C. H., Subbarou I. J.* The colometric determination of phosphorus // *Ibid.*—1925.—191, N 1.—P. 266—275.
9. *Shuba M. F.* The transport mechanisms by which contraction activating extra-cellular  $Ca^{2+}$  ions enter smooth muscle cell // 28-th Int. Cong. of Physiol. Sci.—Budapest, 1976.—P. 88—93.
10. *Алибеков М. И.* Влияние свинца на активность  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ -АТФазы и  $Na^+$ ,  $K^+$ -АТФазы плазматической мембраны гладкомышечных клеток // *Физиол. журн.*—1995.—81, № 1.—С. 126—128.
11. *Таран Т. Т., Костерин С. А.* Влияние  $Ca^{2+}$  и  $Mg^{2+}$  на реакцию суперпреципитации и АТФазную активность актомиозина миометрия // *Вопр. мед. химии.*—1994.—№ 6.—С. 26—28.
12. *Зима В. Л., Минченко П. Г.* Влияние двухвалентных катионов на суперпреципитацию актомиозина скелетных мышц // *Физиол. журн.*—1988.—34, № 1.—С. 28—33.

Поступила в редакцию 22.01.96