

ВПЛИВ ЕТАНОЛУ НА КІНЕТИЧНІ ВЛАСТИВОСТІ АКТОМІОЗИНУ З ГЛАДЕНЬКОГО М'ЯЗА

У статті представлено результати дослідження ефекторної дії етанолу на АТР-гідролазну активність і суперпрєципітацію актоміозину міометрія. Визначено, що етанол сильніше впливає на АТР-гідролазну активність, ніж на суперпрєципітацію. Крім того, АТРаза актоміозину міометрія в присутності етанолу характеризується однією активуючою та двома інактивуючими ділянками. Для визначення кореляції між ступенем чутливості АТРази актоміозину з міометрія у присутності етанолу та ступенем спорідненості актоміозину до Mg^{2+} нами проведено розрахунок кінетичних показників реакції гідролізу АТР; найбільший активуючий ефект етанолу на АТР-гідролазну активність актоміозинового комплексу в присутності 8 %-го етанолу корелює зі збільшенням спорідненості актоміозину до Mg^{2+} .

Структурно-динамічна організація білків, яка являє собою фундаментальну проблему сучасної біохімії, охоплює баланс міжмолекулярних взаємодій як всередині білка, так і в його мікрооточенні. Для спрямованої зміни властивостей білків поряд із генною інженерією і білковим дизайном одним із перспективних підходів вважається «дизайн середовища», який ґрунтується на багатоманітні методів використання безводних розчинників та їх сумішей, водно-органічних розчинів. Моделювання фізико-хімічних властивостей середовища для ферментативного каталізу шляхом введення органічних розчинників останнім часом набуло значного поширення, оскільки, окрім практичного застосування в біотехнології та медицині, дозволяє моделювати більшість біохімічних процесів і отримувати таку інформацію про ферменти, якої не надає традиційна ензимологія.

Гладенькі м'язи виконують основну роль в забезпеченні життєдіяльності організму. Скорочення та розслаблення гладеньком'язової тканини лежить в основі функціонування кровоносних та лімфатичних судин, потоків внутрішньої та зовнішньої секреції, кишково-шлункового тракту, матки, сечового міхура, сечовода та інших органів.

Відомо, що етанол впливає на скоротливу активність гладенького м'яза матки [8, 10]. Етанол, внесений безпосередньо у середовище інкубації, впливає на системи енергозалежного транспорту Ca^{2+} , який локалізовано у субклітинних структурах міоцитів матки [1].

Отже, метою даної роботи було дослідити дію різних концентрацій етанолу на взаємодію

скоротливих білків гладенького м'яза матки, а саме на АТРазну активність та реакцію суперпрєципітації актоміозинового комплексу.

Матеріали та методи

Актomioзин одержували із міометрія свині модифікованим методом Барані та Вебер [7, 12]. М'язи матки міометрія свині старанно очищували, промивали фізрозчином (0,9 %-м NaCl), залишали у морозильній камері холодильника. Наступного дня м'язи перемелювали у м'ясорубці 2 рази та промивали водою (100 г м'язів промивали 7-8 л холодної води) декілька разів і центрифугували при 5-6 тис. об./хв. Актomioзин екстрагували буфером, який містив на 400 мл: 0,6 М KCl, 0,05 М трис HCl (pH 7,5), 1 мМ EGTA (190 г/500 мл), 0,5 мМ фенілметилсульфонілфтору, 20 мг/мл соєвого інгібітора трипсину, 0,5 мМ дитіотреїтолу.

Екстрагували 18 год, потім відділяли м'язовий залишок центрифугуванням при 5-6 тис. об./хв, надосадову частину розводили водою (до 3-3,5 л).

Осілий актоміозин (протягом 1-2 дн.) відділяли центрифугуванням при 15-20 тис. об./хв і розчиняли у 100 мл холодного 0,6 М KCl (на магнітній мішалці), центрифугували для освітлення 1 год при 105 тис. г. Потім знову виділяли осад актоміозину 10-разовим об'ємом води (1-1,5 л). Осад виділяли центрифугуванням при 20 тис. об./хв, розчиняли в 60 мл 0,6 М KCl. Розчин актоміозину освітлювали центрифугуванням 1 год при 105 тис. г.

Чистоту препарату контролювали електрофоретично на приладі Phast System Pharmacia LKB

(Швеція) в умовах, які забезпечують денатурацію (1 %-й розчин дидецилсульфату натрію, 0,5 %-й розчин дитіотреїтолу). В якості білків-маркерів використовували Д-Д-фрагменти фибріногену (200 кДа), фосфорилазу В (94 кДа), бичий сировотковий альбумін (43 кДа), вугільну ангідразу (30 кДа), трипсиновий інгібітор (20 кДа), α -лактальбумін (14 кДа). Виділений препарат актоміозину (концентрація 18-20 мг/мл) містив дві ізоформи важких ланцюгів міозину (200 та 208 кДа), два легкі ланцюги міозину (18 та 15 кДа), актин (42 кДа), тропоміозин (33 кДа) та домішки гемоглобіну (65 кДа).

Концентрацію Mg^{2+} та Ca^{2+} визначали титрометрично за методом Мора [4].

Реакцію суперпретиципації актоміозину [3] проводили протягом 15 хв, реєструючи її за зміною оптичної густини (довжина хвилі 660 нм) в кюветах товщиною 1 см при температурі 37 °С. Реакційна суміш (об'єм 3 мл) містила 5 мМ трис-НCl буфер рН 7,2, 100 мМ KCl, 5 мМ $MgCl_2$, 10 мкМ $CaCl_2$, 2-10% етанолу, 1,5 мг актоміозину. Реакцію ініціювали додаванням в середовище інкубації АТР (до кінцевої концентрації 4,5 мМ). Контролем слугували проби, які не містили АТР. Величина суперпретиципації актоміозину становила приблизно 0,05 одиниць оптичної густини на 1 мг актоміозину за 15 хв.

АТРазну активність актоміозину [11] визначали в умовах, аналогічних тим, що були при дослідженні суперпретиципації, за винятком кількості актоміозину (4 мкг/мл), яким ініціювали реакцію. Об'єм реакційної суміші становив 0,5 мл, контролем на спонтанний гідроліз слугували проби, в які білок додавали після зупинки неферментативної реакції. Кількість фосфору, який утворився в ході ферментативного гідролізу АТР, визначали за методом Ратбуна та Бетлах. У вказаних умовах середня величина АТРази актоміозину становить 20-25 мкмоль P_i /1 мг білка за 1 год.

В дослідах використовували: дитіотреїтол («Serva», Німеччина), ЕГТА («Fluka», Швейцарія), сироватковий альбумін («Sigma», США), соєвий інгібітор трипсину («Reanal», Угорщина). Останні реактиви вітчизняного виробництва кваліфікації х. ч. або перекристалізовані. Всі розчини, використані в дослідах, готували на двічі дистильованій воді, яка мала електропровідність близько 1,6 мкСм, електропровідність води реєстрували за допомогою кондуктометра ОК-102/1 (Угорщина).

Результати та обговорення

В дослідах *in vitro* ми вивчали безпосередній вплив етанолу на взаємодію скоротливих білків, виділених з гладеньких м'язів матки.

Виявилось, що на АТРазну активність актоміозинового комплексу міометрія дуже впливає етанол, і її залежність від концентрації цього органічного розчинника має складний характер (табл. 1). При низьких концентраціях етанолу (2 %) АТР-гідролазна активність актоміозину гальмується на $20,9 \pm 10,33$ % відносно контролю (прийнятого за 100 %).

Підвищення концентрації органічного розчинника до 4-8 % активізує АТР-гідролазну реакцію актоміозину, яка досягає свого максимального значення при 8 %-й концентрації органічного розчинника і становить $168,8 \pm 13,247$ % відносно контролю. При подальшому підвищенні концентрації етанолу до 10 % спостерігалось гальмування АТРазної активності актоміозинового комплексу міометрія на $59,6 \pm 3,951$ % відносно контролю.

За 100 % брали значення АТРазної активності за відсутності етанолу в середовищі інкубації.

Подібний тип залежності від концентрації іншого органічного розчинника - ацетону - описаний в літературі щодо АТРазної активності актоміозину, а також швидкості ковзання активних філаментів на міозинових голівках, виділених із скелетних м'язів. При низьких концентраціях органічного розчинника спостерігали обернено пропорційну залежність цих процесів від концентрації розчинника, збільшення концентрації розчинника призводило спочатку до активізації, а потім знову до гальмування процесів [9].

Імовірно, що гальмування АТРазної активності актоміозину при введенні в інкубаційне середовище органічного розчинника є наслідком зниження полярності інкубаційного середовища та відповідно збільшення сили притягування між позитивно зарядженими амінокислотами в активному центрі АТРази і продуктами АТР-гідролазної реакції, які є аніонами ($MgADP^-$, HPO_4^{2-}). Активуєчий вплив етанолу в діапазоні концентрацій 4-8 % на АТРазну активність актоміозинового комплексу можна пояснити (за даними літератури) «розпушуванням» структури ферменту за рахунок розриву гідрофобних контактів та водневих зв'язків у молекулах білків з відповідними групами. Відомо, що метильна група етанолу, на відміну від ОН-групи, зв'язується з неполярною ділянкою білків [6].

Гальмування АТРазної активності 10 %-м етанолом може бути наслідком його інактиву-ючого впливу на АТРацу актоміозину.

Як виявилось, на суперпрєципітацію акто-міозинового комплексу міометрія етанол впли-ває менше, ніж на АТРазну активність (табл. 2). В інтервалі концентрацій 2-10 % розчинник незначно гальмує цей процес, і найбільший гальмівний ефект ($22,00 \pm 4,28$ %) має розчин з 10 %-м етанолом.

За 100% брали величину СПП за відсутності етанолу в інкубаційному середовищі.

Цікаво, що загальна картина залежності су-перпрєципітації актоміозину міометрія дещо на-гадує аналогічну залежність АТРазної активно-сті скоротливого комплексу гладенького м'яза матки, але в значно редукованому вигляді. Тобто в присутності 2 %-го розчинника процес галь-мується на $18 \pm 5,771$ % відносно контролю, при підвищенні концентрації етанолу спочатку спо-стерігається тенденція до деякої активізації су-перпрєципітації порівняно з попередньою кон-центрацією етанолу, внаслідок чого зростає гальмівний вплив етанолу на цей процес. Мож-ливо, що менш виражений вплив етанолу на су-перпрєципітацію актоміозину міометрія є на-слідком того, що співвідношення між білком та

етанолом в інкубаційному середовищі цього процесу значно вище, ніж у випадку АТРазної активності.

Взаємодія між актином та міозином, яка ле-жить в основі м'язового скорочення, включає в себе активну активацію Mg^{2+} -АТРази міозину. Іонам магнію відводять унікальну роль у цьому процесі, оскільки саме Mg^{2+} має здатність най-сильніше серед катіонів зв'язуватись безпосе-редньо на певних іон-зв'язувальних ділянках мо-лекули міозину і змінювати структуру та власти-вості міозинової АТРази [4]. Крім того, АТР най-більш сильно зв'язується з міозином саме в при-сутності іонів магнію, які беруть участь також у каталізі гідролізу АТР.

Той факт, що 2 %-й етанол інгібує АТРазну активність актоміозину міометрія, а 8 %-п етанол має найбільший активуючий ефект на даний про-цес, спонукав нас дослідити, чи змінюється за цих умов спорідненість актоміозинового комплексу гладенького м'яза матки до Mg^{2+} .

З цією метою досліджували залежність АТР-гідролазної реакції від концентрації іонів Mg^{2+} в контролі та в присутності 2 і 8 %-го етанолу (табл. 3).

Одержані графіки у висхідній частині були лінеаризовані згідно з методом Лайнуівєра-

Таблиця 1. Залежність АТРазної активності актоміозину міометрія від концентрації етанолу, % (n = 3)

АТРаза	2	4	6	8	10
Середнє (M ± m)	79,1 ± 3,041	119,6 ± 5,408	156,5 ± 5,885	168,8 ± 13,247	40,4 ± 3,951

Таблиця 2. Вплив етанолу на суперпрєципітацію актоміозину міометрія, % (n = 6)

СПП	2	4	6	8	10
Середнє (M ± m)	82 ± 5,771	103,1 ± 3,654	96,9 ± 3,342	94,3 ± 2,987	78 ± 4,28

Таблиця 3. Залежність величини АТРазної активності від вмісту іонів Mg^{2+} в присутності етанолу, %

[Mg^{2+}] (ММ)	I/[Mg^{2+}]	Контроль		2 %-й етанол		8 %-й етанол	
		V	I/V	V	I/V	V	I/V
0,5	2	1,8	0,555	2,3	0,434	5,1	0,196
1	1	3,2	0,312	4,3	0,235	6,9	0,144
2	0,5	4,8	0,208	7,1	0,141	16	0,063
3	0,33	6,6	0,151	8,4	0,119	13,2	0,076
4	0,25	9,6	0,104	7,6	0,132	12,5	0,08
5	2	9,6	0,104	6,6	0,152	12	0,86

Примітка: V - величина АТРазної активності (мкмоль Р/мг білка за 1 год).

Берка [1], що дало можливість визначити уявну константу Міхаеліса АТРазної активності відносно Mg^{2+} .

Якщо побудувати графік залежності $1/V$ від $1/S$, де V - величина АТРазної активності в мкмольх P_i /мг білка за годину, а S - концентрація Mg^{2+} в мМ, то виявиться, що це пряма, яка описується рівнянням:

$$1/V = K_m/V_{max} \cdot 1/S + 1/V_{max}.$$

Ця пряма перетинає вісь абсцис у точці $-1/K_m$. Якщо підставити $1/V = 0$, то в результаті одержимо $1/S = -1/K_m$. Пряма перетинає вісь у точці $1/A^*$ та має нахил $K_m A^*$.

Використовуючи комп'ютерну програму, розроблену у відділі біохімії м'язів Інституту біохімії для визначення K_m методом найменших квадратів, отримали формулу розрахунку величин уявних констант Міхаеліса відносно Mg^{2+} у контролі, а також у присутності 2 та 8 %-го етанолу.

Контроль:

$$y = 0,2469 \cdot x + 6,45 \cdot 10^{-2} \quad (R = 0,99)$$

$$y = 0; x = 0,0645/0,2469 = -0,26 \text{ мМ}^{-1}$$

$$K_m = 1/0,26 = 3,8 \text{ мМ}$$

2 %-й етанол:

$$y = 0,191 \cdot x + 4,900 \cdot 10^{-2} \quad (R = 0,99)$$

$$y = 0; x = -0,256$$

$$K_m = 1/0,256 = 3,9 \text{ мМ}$$

8 %-й етанол:

$$y = 0,08343 \cdot x + 3,6999 \cdot 10^{-2} \quad (R = 0,99)$$

$$y = 0; x = -0,443 \text{ мМ}^{-1}; K_m = 2,25 \text{ мМ}$$

Отримані результати виявили, що в присутності 2 %-го етанолу в інкубаційному середовищі АТР-гідролазна реакція актоміозину міо-

метрія уявна константа Міхаеліса відносно Mg^{2+} , а отже, і спорідненість, не змінюються порівняно з контролем.

В присутності 8 %-го етанолу спостерігається зменшення K_m щодо Mg^{2+} майже в 1,7 раза.

Отже, значне підвищення АТРазної активності актоміозинового комплексу в цьому випадку може бути пояснене зростанням спорідненості актоміозину до Mg^{2+} .

Висновки

1. Етанол впливає на АТР-гідролазну активність та суперпреципітацію актоміозинового комплексу гладенького м'яза матки.

2. Етанол сильніше впливає на АТР-гідролазну реакцію актоміозину, ніж на суперпреципітацію.

3. В присутності 2 %-го етанолу АТРазна активність актоміозинового комплексу гальмується на 20 % у порівнянні з контролем, при підвищенні концентрації до 8 % процес активізується більше ніж в 1,5 раза. Подальше підвищення концентрації етанолу призводить до гальмування АТР-гідролазної активності на 59 %.

4. Суперпреципітація актоміозину міометрія незначно гальмується 2-10 %-м етанолом. Максимальний гальмівний ефект виявлений в присутності 10 %-го розчинника.

5. У присутності 8 %-го етанолу уявна константа Міхаеліса АТРазної активності актоміозину міометрія відносно Mg^{2+} зменшується в 1,7 раза в порівнянні з контролем. Значне посилення АТРазної активності актоміозинового комплексу в цьому випадку може бути зумовлене зростанням спорідненості актоміозину до Mg^{2+} . В присутності 2 %-го етанолу K_m щодо Mg^{2+} практично не змінюється.

1. Бабич Л. Г., Шлыков С. Е, Борисова Л. А., Слинченко Н. Н., Браткова Н. Ф., Костерин С. А. Влияние этанола на активность энергозависимых Ca^{2+} -транспортирующих систем клеток миомерия // Укр. биохим. журн.— 2000.- Т. 72.— № 1. - С.32-39.
2. Келети Т. Основы ферментативной кинетики.- М.: Мир, 1990.-С. 131-133.
3. Лабынцева Р. Д., Ульяненко Т. В., Костерин С. А. Влияние ионов тяжелых металлов на суперпреципитацию и АТРазную активность актомиозина гладкой мышцы матки // Укр. биохим. журн.- 1998.- Т. 70.- № 2.- С. 71-77.
4. Поглазов Б. Ф., Левицкий Д. И. Миозин и биологическая подвижность.- М.: Мир, 1982.- С. 31—42.
5. Приготовление растворов для химико-аналитических работ.- М.: Наука, 1964.- С. 197.
6. Слинченко Н. Н., Таран Т. Т., Костерин С. А. Влияние диэлектрической проницаемости на ферментативную активность функционально различных АТРаз гладкой мышцы // Укр. биохим. журн.- 1997.- Т. 69.- № 4.- С. 9-17.
7. Barany M., Barany K. Chicken gizzard myosin // Arch. Biochem. and Biophys.- 1966.- V.113.- P. 205-211.
8. Fuchs E, Fuchs A. R., Poblete V. E, Risk A. The effect of alcohol on threatened premature labor // Am. J. Obst. Gynec.- 1967.- V. 99.- P. 627-636.
9. Hatori K., Honda H., Matsuno K. ATP hydrolysis and sliding movement of actomyosin complex in the presence of ethanol // J. Biochem.- 1995.- V. 117.- P. 264-266.
10. Lunkkainen T., Vaislo L., Jarvinen P. A. The effect of oral intake of ethyl alcohol on the activity of the pregnant human uterus // Acta Obst. et. Gynec. Scandinav.- 1967.- V. 46 - P. 486-493.
11. Rathbun W., Bettlach V. Estimation of enzymically produced orthophosphate // Anal. Biochem.- 1969.- V. 28.- N 1-3.- P. 436-446.
12. Weber A. Ultracentrifugal separation of L-myosin and actin in an actomyosin under influence of ATP // Biochem. Biophys. Acta.- 1956. - V. 19.-P.345.

Y. G. Zaganych

THE EFFECT OF ETHANOL ON KINETICS PROPERTIES OF SMOOTH MUSCLE ACTOMYOSIN

In the article are introduced the results of investigations of ethanol effect on ATP-hydrolysis activity and superprecipitation of myometrium actomyosin. It has been clear from results that ATP-hydrolysis activity is more sensible than superprecipitation to the ethanol. In addition, ATP-hydrolysis activity has two inhibit and one activate distance in the presence of ethanol. We have estimated kinetics parameters of the ATP-hydrolysis activity in the presence of ethanol for the determination of correlation level between ATPase sensibility and Mg^{2+} -ATP-affinity. As a result, the ethanol, taken in amount of 8 % in incubation media has the biggest effect on the ATP-hydrolysis activity and this effect correlates with the increase of actomyosin Mg^{2+} -affinity.