

Г. В. Барсегян

Влияние этаноламина на некоторые свойства миозина и актомиозина

(Представлено академиком АН Армянской ССР Г. Х. Буниятяном 29/V 1964)

Многочисленными исследованиями установлено, что этаноламин вызывает определенные функционально-биохимические сдвиги в животном организме. Одним из эффектов многогранного действия этого биогенного стимулятора является повышение уровня анаболических процессов и, в частности, усиление белкового синтеза (1-3). Нами установлено, что в печени и мышцах белых крыс и цыплят, получавших этаноламин, процентное содержание белка увеличивается. Перед нами стояла задача выяснить претерпевают ли белковые тела какие-либо качественные изменения под влиянием этаноламина. Для решения этого вопроса мы задались целью изучить некоторые свойства миозина и актомиозина.

Подопытными животными служили крысы обоего пола весом 150—200 г.

Крысы разделялись на две группы: одна группа служила контролем, а другая получала этаноламин вместе с кормом в количестве 10 мг/кг. Через месяц животных обезглавливали парами, отпрепаровывали бедренные мышцы, очищали от жира и сухожилий, промывали физраствором, после чего экстрагировали миозин принятым способом (0,5 М КСI + 0,03 М NaHCO₃, pH=7,8) в течение 8—10 минут. Миозин осаждали 20-кратным разбавлением дистиллированной водой.

Полученный белок очищали двукратным переосаждением. Аналогичным методом выделяли актомиозин, экстракция которого длилась 24 часа. Выделенные белки растворяли в 0,5 М КСI и определяли количество азота методом микрокельдаля в параллельных пробах. Содержание белка одновременно определяли методом Лоури.

Приведенные в табл. 1 данные показывают, что у крыс, получавших этаноламин, концентрация миозина и актомиозина в бедренных мышцах повышается соответственно на 15,1 и 14,0%. Другими опытами, поставленными на печеночной ткани, нами установлено, что под действием этаноламина наибольшие изменения по сравнению с целой тканью отмечаются в структурных белках. Следовательно, действие этаноламина адресуется в первую очередь к структурным белкам как в печени, так и в мышцах.

Таблица 1

Количество миозина и актомиозина у крыс, получавших этаноламин (в $\mu\text{г}$ на 1 г свежей ткани).
Средние данные 24 опытов

Условия опыта	Миозин	Актомиозин
Контроль $M \pm \sigma$	$27,8 \pm 5,15$	$35,1 \pm 6,92$
Этаноламин $M \pm \sigma$	$32,0 \pm 6,23$	$40,0 \pm 6,15$
Прирост в %	15,1	14,0
Достоверность	$t=2,65 \quad p < 0,01$	$t=2,66 \quad p < 0,01$

Изучение свойств сократительных белков мышц мы начали с определения сульфгидрильных групп, как общих, так и свободно реагирующих. Общие SH-группы определяли амперометрической титрацией двухлористой ртутью, а свободно реагирующих — нитропруссидной реакцией. Для стабилизации полученного окрашивания использовали сульфосалициловую кислоту.

Данные, приведенные в табл. 2, показывают, что в норме на 1 $\mu\text{г}$ белка миозина приходится $1,10 \cdot 10^{-7}$ моля общих и $4,22 \cdot 10^{-8}$ моля свободных SH-групп. Последние составляют около 35—40% от общего количества SH-групп. Примерно такое же соотношение наблюдается в актомиозине. У крыс, получавших этаноламин, содержание как общих, так и свободно реагирующих SH-групп повышается.

Таблица 2

Сульфгидрильные группы сократительных белков мышц под действием этаноламина (в молях на 1 $\mu\text{г}$ белка).
Средние данные 24 опытов

Условия опыта	Миозин		Актомиозин	
	Общие	Свободно реагирующ.	Общие	Свободно реагирующ.
Контроль	$1,10 \cdot 10^{-7}$ $\pm 0,25 \cdot 10^{-7}$	$4,22 \cdot 10^{-8}$ $\pm 0,21 \cdot 10^{-8}$	$0,75 \cdot 10^{-7}$ $\pm 0,15 \cdot 10^{-7}$	$2,93 \cdot 10^{-8}$ $\pm 0,27 \cdot 10^{-8}$
Этаноламин	$1,25 \cdot 10^{-7}$ $\pm 0,20 \cdot 10^{-7}$	$4,90 \cdot 10^{-8}$ $\pm 0,40 \cdot 10^{-8}$	$0,84 \cdot 10^{-7}$ $\pm 0,13 \cdot 10^{-7}$	$3,34 \cdot 10^{-8}$ $\pm 0,31 \cdot 10^{-8}$
Прирост в %	13,6	16,2	12,0	14,0
Достоверность	$t=2,34$ $0,01 < p < 0,02$	$t=7,6$ $p < 0,01$	$t=2,25$ $0,02 < p < 0,05$	$t=5,06$ $p < 0,01$

Несмотря на некоторое превалирование повышения свободно реагирующих SH-групп в процентном отношении, в абсолютных количествах больше увеличивается общее количество SH-групп. Если

учесть, что разность в количествах общих и свободно реагирующих SH-групп составляет количество вяло реагирующих SH-групп, то можно заключить, что под действием этаноламина увеличивается также содержание вяло реагирующих SH-групп.

Для подтверждения наших данных относительно увеличения SH-групп сократительных белков мышц под действием этаноламина мы определяли сульфгидрильные группы также полярографическим методом. Известно, что белковые вещества при полярографии вызывают появление двухступенчатой волны. По мнению ряда авторов (5,6), в возникновении второй ступени полярографической волны принимают участие SH-группы; они способствуют адсорбции белковой молекулы на поверхности ртутной капли и образованию комплексов белковых веществ с ионом кобальта, чем обуславливаются восстановительные процессы на катоде. Наши опыты проводились на саморегистрирующем полярографе типа Гейровского LP-55, при постоянной температуре $+14^\circ$ и чувствительности гальванометра $1/100$ от максимальной $2 \cdot 10^{-9}$ а/мм. В сконструированный нами электролизер наливали 5 мл аммиачного буфера ($0,2 N NH_4Cl + NH_4OH$), 2,5 мл белкового раствора (2 мг/мл) и 2,5 мл $2 \cdot 10^{-3}$ М $CoCl_2$. При полярографии миозина и актомиозина в указанной среде нами получались наглядные, двухступенчатые волны. Потенциал полу волны первой ступени находился в области $-1,1$ вольта а второй ступени $-1,3$ вольта. Полученные полярограммы (фиг. 1) показали, что высота первой ступени волны у крыс контрольной и опытной групп почти одинакова, а высота второй ступени волны заметно увеличивается в сократительных белках крыс, получавших этаноламин. Эти данные свидетельствуют о качественных изменениях белковых тел (в первую очередь об изменениях в содержании реактивных сульфгидрильных групп) у животных, получавших этаноламин.

Установив действие этаноламина на сульфгидрильные группы миозина и актомиозина, мы заинтересовались их АТФ-фосфогидролазной активностью. Для миозина инкубационная смесь была следующего состава: 1,0 мл миозина (1 мг белка), 0,5 мл $0,03 M CaCl_2$, 1,0 мл боратного буфера ($pH = 8,6$), 0,5 мл $2,4 \cdot 10^{-2} M$ АТФ. Инкубация длилась 5 мин. при 37° , после чего действие фермента приостанавливалось добавлением 0,5 мл 20% трихлоруксусной кислоты. Аналогичным образом определяли АТФ-фосфогидролазную активность актомиозина с той разницей, что вместо $CaCl_2$



Фиг. 1. Двухступенчатая полярографическая волна миозина бедренных мышц.

I—у контрольной крысы; II—у крысы, получавшей этаноламин.

брали 0,5 мл $5 \cdot 10^{-2}$ М $MgCl_2$. Определяли прирост неорганического фосфора, который выражали в единицах Qp. Вычисляли также валовую активность этих ферментов: V-АТФ-фосфогидролаза = $Qp \times p$, где p — содержание белка в мг на 1 г свежей ткани.

Таблица 3

АТФ-фосфогидролазная активность миозина

Условия опыта	Прирост в микроатом Р/мг белка	Qp	V-АТФ-фосфогидролаза.
Контроль	$22,0 \pm 2,98$	941 ± 129	26159 ± 7197
Этаноламин	$25,6 \pm 3,43$	1095 ± 151	35040 ± 8093
Прирост в %	16,4	16,4	33,9
Достоверность	$t=4,0 \cdot p < 0,01$	$t=3,89 \cdot p < 0,01$	$t=4,14 \cdot p < 0,01$

Данные, приведенные в табл. 3, показывают, что у крыс, получавших этаноламин, АТФ-фосфогидролазная активность миозина повышается на 16,4%. Имея в виду, что одновременно увеличивается содержание миозина в единице веса ткани, валовая активность этого фермента повышается еще сильнее.

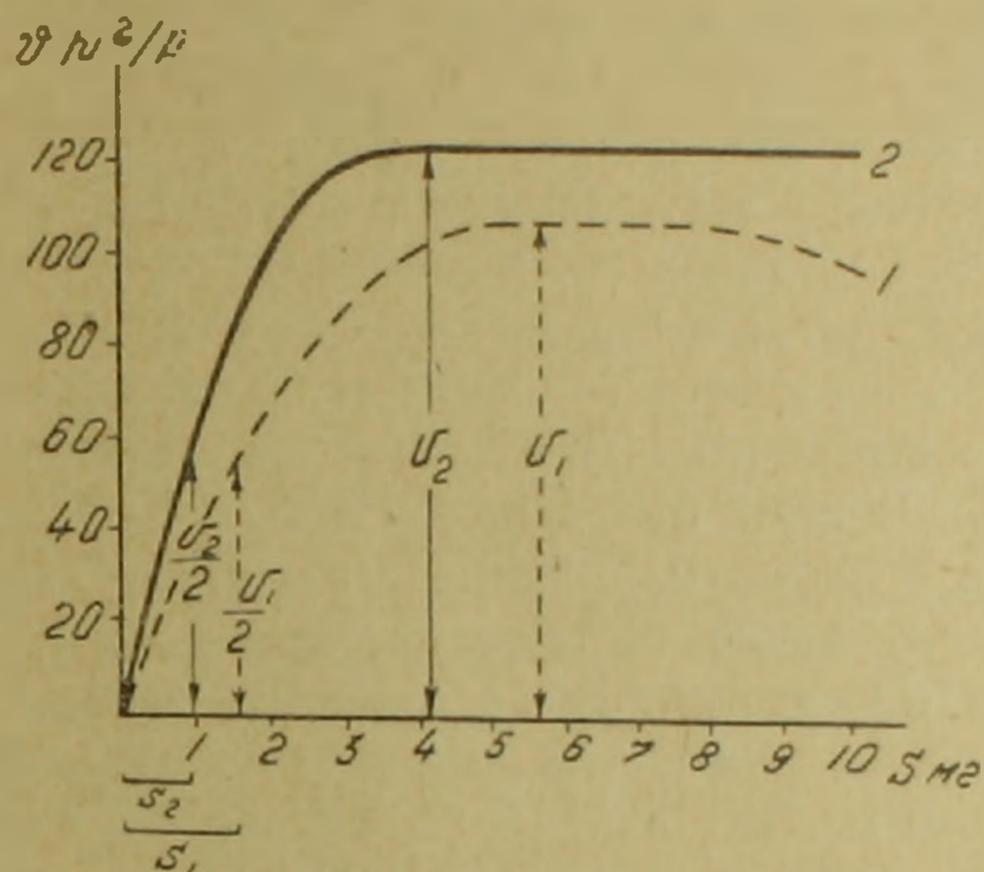
Аналогичные данные были получены также в отношении актомиозина.

Для разностороннего изучения АТФ-фосфогидролазной активности сократительных белков мышц при действии этаноламина мы определяли константу Михаэлиса—Ментена. С этой целью мы инкубировали разные количества АТФ с миозином (1 мг белка) без этаноламина и с этаноламином ($1,5 \cdot 10^{-2}$ мк М/мл). Результаты этих опытов (фиг. 2) показали, что константа Михаэлиса—Ментена уменьшается под действием этаноламина, т. е. скорость реакции, равная половине максимальной, достигается при меньших количествах субстрата.

Нами изучалась также термолабильность вязкости и АТФ-фосфогидролазы миозина и актомиозина. Установлено, что при тепловой денатурации миозин и актомиозин крыс, получающих этаноламин, некоторой степени лучше сохраняют свои нативные свойства.

Полученные данные свидетельствуют о качественных изменениях структурных белков мышц под действием этаноламина. Представляет особый интерес, в частности, увеличение количества SH-групп и повышение АТФ-фосфогидролазной активности. Известно, что АТФ-фосфогидролаза является тиоловым ферментом (⁷⁻¹⁰). Следовательно, повышение ее активности является естественным результатом увеличения количества SH-групп. Известно также, что не все SH-группы ответственны за повышение активности АТФ-фосфогидролазы (¹¹⁻¹⁴), но полученные результаты говорят о том, что под действием этаноламина освобождаются именно такие SH-группы, которые способны

взаимодействовать с АТФ. Каким образом этаноламин, будучи по своей структуре несложным веществом, может вызывать подобные изменения? Реагирует ли он с белковыми телами непосредственно или через другие системы? Для разрешения этих задач мы поставили опыты в условиях *In vitro* с разными концентрациями этаноламина. Было установлено, что этаноламин в концентрациях $1,5 \cdot 10^{-2} - 1,5 \cdot 10^{-1}$ мкМ/мл увеличивает SH-группы и повышает АТФ-фосфогидролитическую активность, но значительно слабее, чем в условиях *in vivo*.



Фиг. 2. Кривые АТФ-фосфогидролитической активности миозина при различных концентрациях субстрата. 1—у контрольной крысы; 2—у крысы, получавшей этаноламин; S —субстрат (АТФ) в мг на пробу; V —скорость реакции (прирост неорганического фосфора после инкубации в мкг); V_1 , V_2 —максимальная скорость реакции в контрольной и опытной пробах; $\frac{V_1}{2}$.

$\frac{V_2}{2}$ — скорость реакции, равная половине максимальной в контрольной и опытной пробах; S_1 , S_2 —концентрация субстрата в контрольной и опытной пробах, при которой скорость реакции равна половине максимальной (константа Михаэлиса—Ментена).

Следовательно, при целостности организма какой-то фактор усиливает действие этаноламина. По данным Гольдштейна и др., гормон щитовидной железы увеличивает количество SH-групп в миозине (15,16). Для изучения возможной роли щитовидной железы в действии этаноламина мы поставили специальные опыты с угнетением ее функции 6-метилтиоурацилом. Было установлено, что на этом фоне значительно понижается эффект от этаноламина. Следовательно, введенный в организм этаноламин оказывает определенное действие через щито-

видную железу. Какой же механизм увеличения количества SH-групп? Как указывает Гольдштейн, здесь имеются три возможности:

- 1) увеличение количества цистеина в молекуле белка;
- 2) разрыв тиоэфирной связи в метионине;
- 3) восстановление дисульфидных связей в сульфгидрильные.

Нам представляется маловероятным первый путь увеличения SH-групп под действием этаноламина. Придавая определенное значение деметилированию метионина мы считаем, что увеличение SH-групп в основном обуславливается восстановлением дисульфидных групп и возможно разрывом водородных связей между SH- и некоторыми другими боковыми группами белка. В превращении S-S-групп в SH- может играть роль увеличение количества восстановленного глутатиона, которое наблюдается под действием этаноламина (17). Интересно отметить, что Г. В. Камалюном наблюдалось восстановление этаноламином работы изолированного сердца лягушки, отравленного хлористым кадмием (18). Для изучения возможной роли цистеина в увеличении SH-групп мы поставили модельные опыты с цистеином. Известно, что в водных растворах часть SH-групп цистеина находится в связанном состоянии через внутримолекулярные и межмолекулярные водородные связи. При инкубации раствора цистеина с этаноламином отмечается освобождение дополнительного количества SH-групп. Добавление АТФ на раствор цистеина вызывает заметное уменьшение количества SH-групп (13). При инкубации цистеина с АТФ и этаноламином наблюдается увеличение SH-групп в меньшей степени, чем при инкубации только с этаноламином, что можно объяснить связыванием некоторого количества SH-групп с присутствующим в среде АТФ. Аналогичные данные были получены и с миозином. Следовательно, часть освобождающихся этаноламином SH-групп обладает способностью реагировать с АТФ.

Из вышеизложенного следует, что этаноламин усиливает реакционную способность миозина и актомиозина.

Основываясь на результатах наших опытов, можно прийти к следующим основным выводам.

1. Этанолламин увеличивает содержание миозина и актомиозина в скелетных мышцах белых крыс.

2. Количество общих и свободно реагирующих сульфгидрильных групп увеличивается под действием этаноламина.

3. АТФ-фосфогидроллазная активность миозина и актомиозина повышается у крыс, получавших этаноламин.

Ереванский зоотехническо-
ветеринарный институт

Գ. Վ. ՐԱՐՍԵՂՅԱՆ

**Էթանոլամինի ազդեցությունը միոզինի եւ ակտինինի մի-
թանի հասկանալուն համար**

Նախորդ ուսումնասիրութիւններով հաստատուել է, որ էթանոլամինը կենդանական օրգանիզմում առաջացնում է որոշակի ֆունկցիոնալ-բիոքիմիական փոփոխութիւններ

նրա բազմակողմանի ազդեցութեան արտահայտութիւններից մեկն է հանդիսանում սպիտակուցների սինթեզի արագացումը: Սպիտակուցների քանակական փոփոխութիւններն ուսումնասիրելուց հետո մեր առաջ խնդիր դրեցինք հետազոտել նրանց որակական փոփոխութիւնները: Այդ նպատակով սպիտակ առնետների կմախքային մկաններից անջատելի և մաքրել ենք միոզին և ակտոմիոզին սպիտակուցները և ուսումնասիրել ենք նրանց հատկութիւնները, հատկապէս ընդհանուր և ազատ սուլֆիդրիլային խմբերը և ԱՏՖ-ֆոսֆոհիդրոլազային ակտիվութիւնը:

Հիմնվելով մեր փորձերի արդյունքների վրա կարելի է հանդել հետևյալ եզրակացութիւններին.

1. էթանոլամինն ավելացնում է միոզինի և ակտոմիոզինի քանակութիւնը սպիտակ առնետների կմախքային մկաններում:

2. Ընդհանուր և ազատ սուլֆիդրիլային խմբերը շատանում են էթանոլամինի ազդեցութեան տակ:

3. Միոզինի և ակտոմիոզինի ԱՏՖ-ֆոսֆոհիդրոլազային ակտիվութիւնը բարձրանում է էթանոլամին ստացող առնետների մոտ:

Л И Т Е Р А Т У Р А — Գ Ր Ա Կ Ա Ն Ո Ւ Թ Յ Ո Ւ Ն

- ¹ Г. В. Барсегян, Материалы Межвуз. конф. по проблеме влияния биостимуляторов на организм и их применения в с/х практике, Ереван, 1963. ² Г. В. Барсегян, Материалы Второй всеос. конф. по физиол. и биохим. основам повышения продукт. с/х животных, Боровск, 1963. ³ Г. В. Барсегян, Первый всеос. биох. съезд. Тезисы докл. вып. 3, 1964. ⁴ Г. В. Барсегян, Труды Ереванского зооветинститута, 26, 29, 1964. ⁵ И. Д. Иванов, Полярнография белков, энзимов и аминокислот. Изд. АН СССР, 1961. ⁶ В. М. Корниенко, Уч. зап. Харьковск. ун-та им. А. М. Горького, 68, 267, 1956. ⁷ М. Зифф, J. Bi I. Chem., 153, 25, 1944. ⁸ Т. П. Сингер, Е. С. Г. Баррон, Proc. Soc. Expt. Biol. Med., 56, 129, 1944. ⁹ К. Бэйли, С. Перри, Biochim. Biophys. Acta, 1, 506, 1947. ¹⁰ В. А. Энгельгардт, Г. А. Яровая, Укр. биох. журн. 27, 312, 1955. ¹¹ Ф. Турба, Г. Кучинский, Biochim. Biophys. Acta, 7, 76, 1952. ¹² М. Барани, К. Барани Biochim. Biophys. Acta, 35, 293, 1959. ¹³ Б. Ф. Поглазов, В. Билуши, А. А. Баев, Биохимия, 23, 269, 1956. ¹⁴ С. С. Оганесян и Т. С. Замян, Пятый междунар. биох. конгресс, рефераты секц. сообщ., том I, стр. 436. ¹⁵ Б. И. Гольдштейн, М. Б. Гинцбург, Е. А. Колли, Е. Ю. Мильграм, О. С. Скловская, Биохимия, 11, 447, 1946. ¹⁶ Б. И. Гольдштейн, Укр. биох. журн., 24, 160, 1952. ¹⁷ М. Г. Гаспарян, А. А. Акопян, Труды Ер. зооветинститута, 22, 33, 1957. ¹⁸ Г. В. Камалян и Р. В. Давтян, ДАН Арм ССР, 21, 3, 113 (1955).