

**УДК:577.151.121:616.092.9**

## **АТФ-азна АКТИВНІСТЬ АКТОМІОЗИНУ СКЕЛЕТНИХ М'ЯЗІВ ЩУРІВ ПРИ ХРОНІЧНІЙ ТРИВАЛІЙ АЛКОГОЛІЗАЦІЇ**

*Подпалова О.М., Цейслер Ю.В., Нурищенко Н.Є., Мартинюк В.С.*

*ННЦ «Інститут біології» Київський національний університет імені Тараса Шевченка,  
Київ, Україна  
E-mail: olgapodpalova@gmail.com*

Оцінювали функціональну активність актоміозину різних за чутливістю до етанолу скелетних м'язів щурів при 2-, 4-, 6-ти місячній алкоголізації. Показано, що через 2 місяці активність АТФ-ази актоміозину чутливих до алкоголю м'язів підвищується, а в подальшому спостерігається її падіння по мірі хронізації процесу алкоголізації. Встановлено, що через 4 місяці алкоголізації аналогічні, але менш виражені зміни відбуваються і у м'язах, що вважаються нечутливими до дії алкоголю.

**Ключевые слова:** АТФ-азна активність, актоміозин, *plantaris*, *soleus*, алкоголізація.

### **ВСТУП**

Хронічне зловживання алкоголем серед інших важких патологічних наслідків, таких як, цироз печінки, супроводжується метаболічними, фізіологічними і структурними змінами в скелетних м'язах, що характеризуються як алкогольна міопатія. Алкогольна міопатія вважається багатофакторною хворобою і пов'язана з зміною окислювально-відновного статусу і антиоксидантним дисбалансом в скелетних м'язах [1], зниженням швидкість білкового синтезу, в тому числі і міофібрилярних білків, порушеннями вуглеводного, білкового та енергетичного обміну, сигнальних каскадів, реалізації апоптозу і регуляції генів [2]. Відомо, що основною структурною одиницею м'язів, що забезпечує їх скорочення є скоротливі білки. Однак, вплив етанолу на функціональний стан актоміозину скелетних м'язів досліджувався або в експериментах, *in vitro* [3], або в гострих дослідах при прийомі однократно великої дози алкоголю [4]. Тому метою роботи було з'ясування впливу довготривалої алкоголізації на АТФ-азну активність актоміозину як основного показника функціонального стану.

### **МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ**

В дослідження включали білих безпородних щурів-самців вагою 150-200 г. Алкоголізацію тварин здійснювали за методикою [5] в авторській модифікації. Тварин відбирали на основі їх індивідуальної схильності до споживання розчину етилового спирту, що оцінювалась протягом двох тижнів щоденним вимірюванням кількості спожитого 5%-ого розчину алкоголю.

Експериментальну групу становили щури, що, перебуваючи в умовах вільного вибору, віддавали перевагу розчину алкоголю з першого дня тестування. Кількість

споживаного спирту коливалася від 15 мл і вище на тварину. Після тестування для експериментальних тварин наступні два тижні концентрацію етилового спирту поступово підвищували від 5 до 36% (з кроком в 10%) і у подальшому не змінювали. Хронічну алкоголізацію тварин здійснювали протягом 2, 4, 6 місяців.

Для кожної експериментальної групи (при 2-х місячній експозиції  $n=7$ , 4-х місячній -  $n=8$ , 6-и місячній -  $n=7$ ) була своя контрольна група (2-х місячна експозиція  $n=4$ , 4-х місячна -  $n=5$ , 6-и місячна -  $n=5$ ), що складалась з тварин, які демонстрували повну відмову від споживання алкоголю і яких утримували в аналогічних умовах віварію протягом строку експерименту.

Актоміозин виділяли із скелетних м'язів щура за методикою Перрі описаній в роботі Тартаковського [6].

Визначення концентрації актоміозину проводилося за біуретовою реакцією, яка є оптимальною в даному діапазоні концентрацій від 0,5 до 10 мг/мл [7].

$Mg^{2+}$ - і  $K^{+}$ -АТФ-азну активність актоміозину визначали за кількістю неорганічного фосфату ( $P_i$ ) (нмоль), який утворюється шляхом відщеплення від АТФ активними центрами міозинових молекул [8]. Інкубаційне середовище при визначенні  $Mg^{2+}$ - АТФ-азної активності містило 20 мМ імідазольного буферу (рН 7.5), 0.08 М КСl, 2.5 мМ  $MgCl_2$ , 100 мкМ  $CaCl_2$ , 1 мМ АТФ (виробництва Sigma-Aldrich); при визначенні  $K^{+}$ -АТФ-азної активності додавали хелатор двовалентних іонів – 1 мМ етиленгліколь-біс( $\beta$ -аміноетил-етер)-N,N,N',N'-тетраоцтову кислоту (ЕГТА, виробництва Sigma-Aldrich).

Відомо, що при хронічній алкогольній міопатії страждають волокна ІВ (анаеробного) типу. Тому для дослідження були обрані м'язи *plantaris* щурів, що містять переважно волокна цього типу, а також м'язи *soleus*, які нечутливі до дії етанолу і містять переважно волокну І (аеробного) типу [9].

Статистичну обробку результатів експериментів проводили в програмі Origin 8.0 (OriginLab Corporation, США) з використанням t-критерія Стьюдента ( $p < 0.05$  вважали статистично вірогідним).

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

Дослідження АТФ-азної активності актоміозину показало, що характер змін даного показнику по мірі алкоголізації тварин в двох різних м'язах неоднаковий.

Встановлено, що  $Mg^{2+}$ -АТФ-азна активність актоміозину м'язів *plantaris* через 2 місяці вживання алкоголю збільшувалась на 5,5 % ( $p < 0,05$ ). Через 4 місяці алкоголізації цей показник знаходився в межах контролю, знижуючись на 29,77 % через 6 місяців з початку експерименту відносно контрольної групи (рис.1).

Одночасно з тим,  $K^{+}$ -АТФ-азна активність актоміозину м'язів *plantaris* зростала на 31,8% відносно контрольного рівня через 2 місяці вживання алкоголю, але залишалась на рівні контролю на більш пізніх строках алкоголізації (рис. 2).

$Mg^{2+}$ -АТФ-азна активність актоміозину нечутливих до дії алкоголю скелетних м'язів *soleus* залишалась на рівні контролю через 2 місяці вживання алкоголю, зменшувалась на 11,4 % через 4 місяці і на 8,8 % через 6 місяців алкоголізації (рис.3).

$K^{+}$ -АТФ-азна активність актоміозину м'язів *soleus* не змінювалась відносно контролю протягом всього експерименту (рис.4).

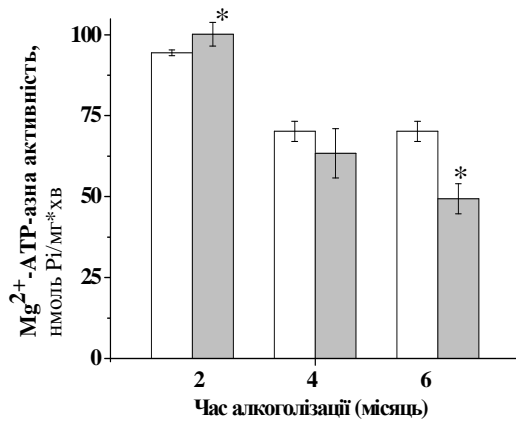


Рис. 1. Mg<sup>2+</sup>-АТФ-азна активність актоміозину в скелетних м'язах *plantaris* щурів за умов хронічної алкоголізації протягом 2 (n=7), 4 (n=8), 6 (n=7) місяців.  
\* - достовірні відмінності відносно контрольної групи тварин, p<0,05

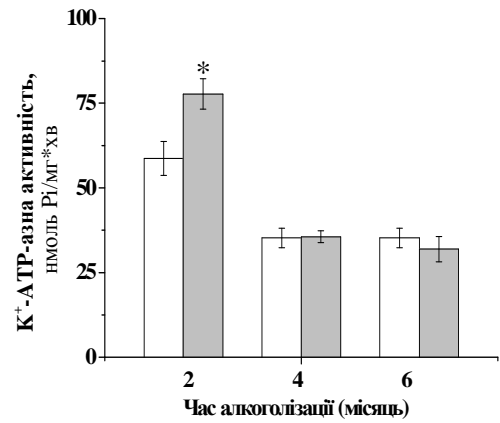


Рис. 2. K<sup>+</sup>-АТФ-азна активність актоміозину в скелетних м'язах *plantaris* щурів за умов хронічної алкоголізації протягом 2 (n=7), 4 (n=8), 6 (n=7) місяців.  
\* - достовірні відмінності відносно контрольної групи тварин, p<0,05.

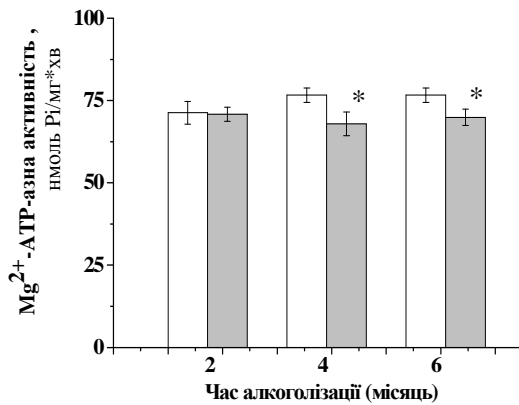


Рис. 3. Mg<sup>2+</sup>-АТФ-азна активність актоміозину в скелетних м'язах *soleus* щурів за умов хронічної алкоголізації протягом 2 (n=7), 4 (n=8), 6 (n=7) місяців.  
\* - достовірні відмінності відносно контрольної групи тварин, p<0,05

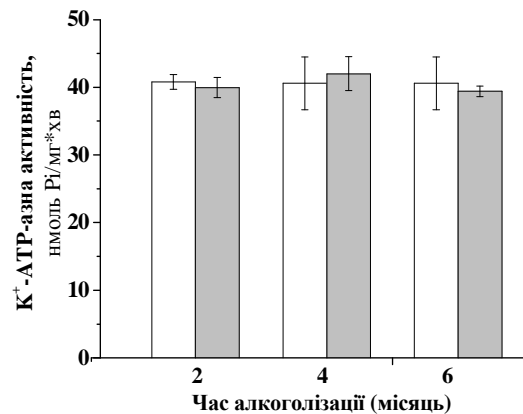


Рис. 4. K<sup>+</sup>-АТФ-азна активність актоміозину в скелетних м'язах *soleus* щурів за умов хронічної алкоголізації протягом 2 (n=7), 4 (n=8), 6 (n=7) місяців.

Отже отримані результати можуть свідчити про те, що в основі порушення функціонування м'язів при алкоголізації лежить не тільки підвищення перекисного окиснення ліпідів, зниження синтезу м'язових білків, збільшення вмісту основних медіаторів запалення, а також і більш глибокі зміни, що стосуються функціонування скоротливих білків. Розвиток порушення м'язів під впливом алкоголю характеризується відстроченістю дії. Так, через 2 місяці активність АТФ-ази актоміозину чутливих до алкоголю м'язів підвищується, а в подальшому спостерігається її падіння зі збільшенням строку алкоголізації до контрольних значень показнику. В інших дослідженнях показано, що в ці строки спостереження відбувається підвищення вмісту карбонільних груп в скоротливих білках [10]. Очевидно, що такі зміни відбуваються внаслідок підвищеного рівня продукції вільних радикалів [10], і зміни структури скоротливих білків. Встановлено, що через 4 місяці алкоголізації аналогічні, але менш виражені зміни відбуваються і у м'язах, що вважаються нечутливими до дії алкоголю.

### ВИСНОВОК

Таким чином, отримані нами результати показують, що тривала хронічна алкоголізація веде до глибоких метаболічних і функціональних змін скелетних м'язів, які вважалися стійкими до впливу зовнішніх чинників, а також можуть пояснити велику кількість алкогольних міопатій у осіб, що зловживають алкоголем. Для більш глибокого розуміння впливу етанолу на структурні компоненти скелетних м'язів в подальших дослідженнях планується подовжити термін вживання алкоголю тваринами і проаналізувати розвиток деструктивних і функціональних порушень по мірі хронізації алкоголізму.

### Список літератури

1. Fernandez-Sola J. Muscle antioxidant status in chronic alcoholism / Fernandez-Sola J., Garcia G., Elena M., Tobrars E., Sacanella E., Estruch R., Nicolas J.M. // *Alcohol Clin Exp Res.* – 2002. – Vol. 26. – P. 1858–1862.
2. Fernandez-Sola J. Evidence of apoptosis in alcoholic cardiomyopathy / Fernandez-Sola J., Fatjor F., Sacanella E., Estruch R. et al. // *Hum Pathol.* – 2006. – Vol. 37. – P. 1100–1110.
3. Tsuda Y. Direct inhibition of the actomyosin motility by local anesthetics in vitro / Tsuda Y., Mashimo T., Yoshiya I. et al. // *Biophys. J.* – 1996. – Vol. 71. – P. 2733–2741.
4. Fernandez-Sola J. Molecular and cellular events in alcohol-induced muscle disease / Fernandez-Sola J., Preedy V.R., Lang C.H. et al. // *Alcohol Clin Exp Res.* – 2007. – Vol. 31. – P. 1953–62.
5. Бардина Л.Р. Метаболическая адаптация к алкоголю у крыс, различающихся по предпочтению этанола воде / Бардина Л.Р., Сагановская В.И. // *Вопросы медицинской химии.* – 1999. – Т. 45, № 2. – С. 117–122.
6. Методы выделения и характеристика миозина и его субъединиц из поперечнополосатых мышц / А.Д. Тартаковский // *Биофизические и биохимические методы исследования мышечных белков.* – Л.: Наука, 1987. – С.55-76.
7. Досон Р. Справочник биохимика / Р.Досон, Д.Эллиот, У. Эллиот, К.Джонс. – М.: Мир, 1991. – С. 465-466.
8. Fiske C. The colorimetric determination of phosphorus / C.Fiske, Y.Subbarow / *J. Biol. Chem.* – 1925. – Vol. 66. – P. 375-400.
9. Slavin G. Chronic alcohol excess is associated with selective bur reversible injury to type 2B muscle fibers / Slavin G., Martin F., Ward P. et al. // *J. Clin. Pathol.*— 1983.— Vol. 36.— P. 772—777.

10. Цейслер Ю.В. Изменения степени окисления актомиозина скелетных мышц и показателей липидного обмена плазмы крови крыс в условиях хронической алкоголизации / Цейслер Ю.В., Подпалова О.Н., Нурищенко Н.Є., Пелюх Л.И., Мартинюк В.С. // Матеріали ІІ міжнародного семінару «Медична фізика – сучасний стан, проблеми, шляхи розвитку. Новітні технології». - Київ, Україна, 2012. – С. 123-127.

**Подпалова О.Н. АТФ-азная активность актомиозина скелетных мышц крыс при хронической длительной алкоголизации / О.Н. Подпалова, Ю.В. Цейслер, Н.Є. Нурищенко, В.С. Мартинюк // Ученые записки Таврического национального университета им. В.И. Вернадского. Серия «Биология, химия». – 2012. – Т. 25 (64), № 4. – С.166-170.**

Оценивали функциональную активность актомиозина различных по чувствительности к этанолу скелетных мышц крыс при 2-, 4-, 6-ти месячной алкоголизации. Показано, что через 2 месяца активность АТФазы актомиозина чувствительных к алкоголю мышц повышается, а в дальнейшем наблюдается ее падение по мере хронизации процесса алкоголизации. Установлено, что через 4 месяца алкоголизации аналогичные, но менее выраженные изменения происходят и в мышцах, которые считаются нечувствительными к действию алкоголя.

**Ключевые слова:** АТФ-азная активность, актомиозин, plantaris, soleus, алкоголизация.

**Podpalova O.N. ATP-ase activity the actomyosin of rat's skeletal muscles during prolonged chronic alcoholisation / O.N. Podpalova, Yu.V. Tseyslyer, N.E. Nurischenko, V.S. Martyniuk // Scientific Notes of Taurida V.Vernadsky National University. – Series: Biology, chemistry. – 2012. – Vol. 25 (64), No. 4. – P. 166-170.**

The functional activity of actomyosin in differently sensitive to ethanol skeletal muscle of rats with alcohol abuse during 2 -, 4 -, 6-month period was studied. It was shown that actomyosin ATPase activity in sensitive to alcohol muscles was increased after 2 months and then it decreased during development of alcoholism. The similar but less pronounced changes occur in 4 months of alcoholism in the muscles, which are considered insensitive to the effects of alcohol, were found in rats.

**Keywords:** ATPase activity, actomyosin, plantaris, soleus, alcoholisation.

*Поступила в редакцию 21.11.2012 г.*