

Изучение молекулярных механизмов функционирования кардиомиоцитов при дилатационной кардиомиопатии на модели реконструированной миофибриллы миокарда млекопитающих

О. М. Федоркова, Т. В. Ковеня, В. И. Бобык, Д. В. Рябенко¹, В. С. Трегубов², В. М. Данилова², Л. Л. Сидорик, Г. Х. Мацука

Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины
Ул. Академика Заболотного, 150, Киев, 03143, Украина

¹ Институт кардиологии им. акад. Н. Д. Стражеско АМН Украины
Ул. Народного ополчения, 5, Киев, 03151, Украина

² НИИ физиологии Киевского национального университета имени Тараса Шевченко
Пр. Глушкова, 2, корп. 12, Киев, 03022, Украина

В работе использован метод реконструкции миофибриллы миокарда из составляющих ее структурных (актомиозин) и регуляторных (тропомиозин и тропониновый комплекс) белков. С помощью этого метода изучали влияние регуляторных белков, выделенных из миокарда практически здорового донора и миокарда лица, страдавшего дилатационной кардиомиопатией (ДКМП), на Mg^{2+} -АТРа́зную активность актомиозинов из этих же тканей. При перекрестной реконструкции миофибриллы чувствительность десенситизированного актомиозина к Ca^{2+} восстанавливалась и практически не зависела от происхождения ни актомиозина, ни тропомиозин-тропонинового комплекса. Актомиозин быка использовали как стандартный белок для сравнения с актомиозинами человека при добавлении регуляторных компонентов. Обнаруженное уменьшение Mg^{2+} -АТРа́зной активности актомиозина миокарда в 1,5 раза у больных ДКМП по сравнению со здоровыми людьми предположительно можно объяснить модификационными изменениями сократительных белков при ДКМП.

Введение. При дилатационной кардиомиопатии (ДКМП) наблюдается дилатация и нарушение сократимости левого и/или обоих желудочков сердца [1]. Тяжелое течение болезни и комплексность вызывающих ее причин делают изучение этиологии ДКМП предметом повышенного интереса биологов и медиков. Принято считать, что биохимическим эквивалентом сокращения миоцита является Mg^{2+} -АТРа́зная активность актомиозина (АМ), измеренная при физиологической ионной силе и мик-

ромолярной концентрации Ca^{2+} . Регуляторные белки миофибриллы — тропомиозин (ТМ) и тропониновый комплекс (Тн) — играют ключевую роль в регуляции Ca^{2+} -чувствительного взаимодействия актина и миозина [2]. Одним из важных биохимических механизмов угнетения сократимости миокарда является снижение активности АТРа́зы его миозина, расщепляющего АТР и выполняющего роль механо-химического преобразователя энергии [3]. Снижение активности АТРа́зы миозина сопровождается нарушением актин-миозинового взаимодействия, что приводит к уменьшению скорости сокращения миофибрилл и снижению утилизации АТР миокардом.

© О. М. ФЕДОРКОВА, Т. В. КОВЕНЯ, В. И. БОБЫК,
Д. В. РЯБЕНКО, В. С. ТРЕГУБОВ, В. М. ДАНИЛОВА,
Л. Л. СИДОРИК, Г. Х. МАЦУКА, 2000

Цель данной работы состояла в изучении молекулярных механизмов функционирования кардиомиоцитов при ДКМП на модели реконструированной миофибриллы миокарда млекопитающих. Для этого были подобраны условия реконструкции сократительного аппарата миофибриллы кардиомиоцита. На первом этапе исследований использовали миофибриллярные белки сердца быка, эти же условия были применены для перекрестной реконструкции миофибриллы из миокардиальных белков человека.

Материалы и методы. Патологоанатомический материал был любезно предоставлен Институтом кардиологии им. Н. Д. Стражеско АМН Украины.

Препараты АМ выделяли из миокарда быка (АМб) и человека (АМч — из миокарда практически здорового лица, АМд — из миокарда человека, страдавшего ДКМП) по методу [6]. ТМ и Тн получали по описанным ранее методикам [7, 8] из нормального и дилатационного миокардов человека.

Концентрации получаемых белков определяли по методу [4]. Электрофорез белков проводили в ПААГ в денатурирующих условиях по [5].

АТРазную реакцию осуществляли при температуре 37 °С в течение 5 мин в среде, содержащей 60 мМ КСl, 5 мМ MgCl₂, 10 мМ имидазол (рН 7,0), 0,25 мМ АТФ и а) 100 мкМ СаCl₂ (Са²⁺-среда) или б) 1 мМ этиленгликоль-бис-(2-аминоэтиловый эфир)-N,N-тетрауксусной кислоты (ЭГТА-среда). Реакцию останавливали добавлением НСlO₄ до конечной концентрации 0,3 М. АТРазную активность актомиозина оценивали по количеству отщепленного неорганического фосфата, который определяли в инкубационной среде при длине волны 650 нм, используя окрашивание малахитовым зеленым [9]. Чувствительность АМ к Са²⁺ рассчитывали по формуле

$$\text{Ч-Са}^{2+} = \frac{(\text{АТФ-Са}^{2+} - \text{АТФ-ЭГТА})}{\text{АТФ-Са}^{2+}} \cdot 100 \%,$$

где Ч-Са²⁺ — чувствительность АМ к кальцию; АТФ-Са²⁺ — АТРазная активность АМ в Са²⁺-среде; АТФ-ЭГТА — АТРазная активность АМ в ЭГТА-среде.

При статистической обработке результатов исследования использовали пакет статистических программ «STATISTICA for Windows 5.1». Для оценки достоверности различий показателей использовали *t*-критерий Стьюдента и Mann-Whitney U тест. Значение *p* < 0,05 рассматривали как критерий достоверности различий.

Результаты и обсуждение. Применяемые нами методы выделения АМ, ТМ и Тн позволяют полу-

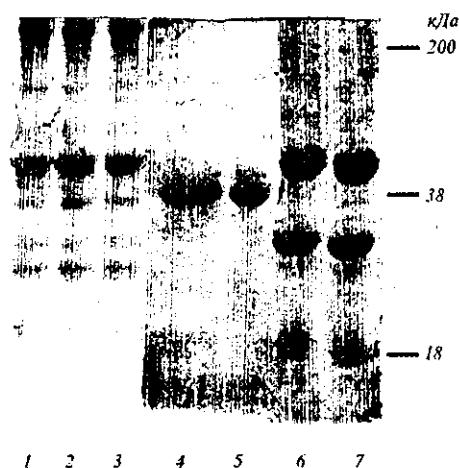


Рис. 1. Электрофореграмма препаратов актомиозина, выделенных из миокарда быка (1), из миокарда здорового человека (2) и из миокарда больного ДКМП (3), препаратов тропомиозина из нормального миокарда человека (4) и ДКМП миокарда (5), препаратов тропонинового комплекса из нормального (6) и ДКМП (7) миокардов

чить достаточные для выполнения дальнейших исследований количества очищенных препаратов белков. Электрофореграммы этих белковых препаратов представлены на рис. 1. АМ многократно пересаждали водой для получения препаратов актомиозина, нечувствительных к ионам Са²⁺. Именно эти десенситизированные препараты АМ брали в дальнейшем для реконструкции миофибриллы. Бычий АМ использовали как стандартный белок для сравнения с актомиозинами человека при добавлении к ним регуляторных компонентов сократительного аппарата.

Неорганический фосфат в инкубационной АТРазной среде определяли, используя окрашивание малахитовым зеленым. Данный метод выбран как один из наиболее чувствительных (в 35 раз более чувствителен, чем метод определения P_i по [9]), что очень важно в экспериментах с малым количеством исходного материала, в частности, с миокардом человека.

Оказалось, что Mg²⁺-АТРазная активность АМч как в Са²⁺-, так и в ЭГТА-средах составляла 86,04 ± 6,49 и 82,04 ± 4,65 нмоль P_i · мг белка⁻¹ · мин⁻¹ соответственно и в 1,5 раза превышала (*p* < 0,05) аналогичные показатели АМд (49,33 ± 3,46 и

50,89±7,09 нмоль P_i·мг белка⁻¹·мин⁻¹ соответственно).

Результаты определения АТРазной активности препаратов АМ при добавлении регуляторных компонентов (ТМ и Тн) приведены в таблице. Расчеты показали, что добавление ТМ—Тнд ко всем исследуемым актомиозином сопровождается более выраженным угнетением их АТРазной активности в бескальциевой среде (рис. 2). Так, добавление ТМ—Тнд приводило к снижению АТРазной активности АМб, АМн и АМд на 81,9; 32,4 и 41,0 % соответственно. При добавлении ТМ—Тнн в этих же условиях было выявлено снижение АТРазной активности на 30,1 % для АМд и лишь на 14,6 % для АМн и 35,1 % для АМб. В Са²⁺-среде (рис. 3) добавление ТМ—Тнн к АМ сопровождается повышением АТРазной активности АМб на 32,2 %, АМн — на 38,6 % и АМд — на 27,6 %. В случае же добавления ТМ—Тнд АТРазная активность АМб в Са²⁺-среде увеличивалась на 37,8 %, АМн — на 50,2 %, а АМд — всего на 19,1 %.

На сегодня практически не изученными остаются молекулярные механизмы, приводящие к развитию ДКМП. Рядом исследователей, в том числе в нашей лаборатории, показано наличие аутоантител к белкам саркомера кардиомиоцита в сыворотке крови больных — к миозину, актину, тропомиозину, тропониновому комплексу [8, 10—12]. Нами было показано увеличение иммунореактивности миозина из миокарда больных ДКМП по сравнению с миозином из миокарда практически здоровых лиц [11] при их одинаковой электрофоретической подвижности и изоэлектрической точке. В связи с этим было выдвинуто предположение о том, что при развитии дилатации в молекуле миозина

происходят структурные перестройки, сопровождающиеся изменением его антигенных свойств и, возможно, ферментативной активности. Известно, что расщепление АТР миозином в клетке модулируется несколькими факторами. АТРазная активность миозина в значительной мере активируется актином и регулируется тропомиозин-тропонино-

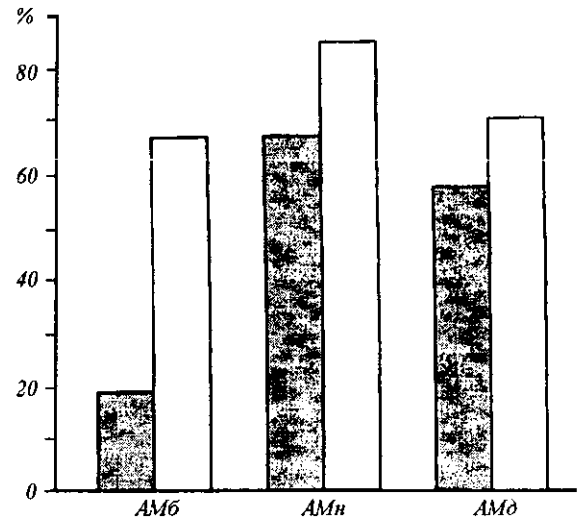


Рис. 2. Степень изменения (%) АТРазной активности актомиозина бычьего (АМб), актомиозина из миокарда здорового донора (АМн) и из ДКМП миокарда (АМд) в ЭГТА-среде при добавлении тропомиозин-тропомиозиновых регуляторных комплексов, выделенных из миокарда больного ДКМП (1) и из нормального миокарда (2). За 100 % принято исходное значение активности актомиозина

АТРазная активность актомиозина из миокарда быка (АМб), из нормального миокарда человека (АМн) и из миокарда больного ДКМП (АМд) в Са²⁺- и ЭГТА-средах при добавлении тропомиозин-тропомиозинового комплекса, выделенного из нормального (ТМ-Тнн) и дилатационного (ТМ-Тнд) миокардов человека (M±m)

Актомиозин + регуляторный комплекс	АТРазная активность, нмоль P _i ·мг белка ⁻¹ ·мин ⁻¹		Чувствительность к Са ²⁺ , %
	Са ²⁺ -среда	ЭГТА-среда	
АМб + ТМ-Тнд	100,47±6,49	40,80±2,71	58,78±5,11
АМб + ТМ-Тнн	99,27±4,34	52,66±1,09	46,72±2,83
АМн + ТМ-Тнд	103,37±5,51	46,50±6,89	54,57±8,25
АМн + ТМ-Тнн	94,60±8,51	58,10±4,62	37,96±5,24
АМд + ТМ-Тнд	60,97±1,32	29,10±2,19	52,18±4,08
АМд + ТМ-Тнн	62,93±0,99	35,57±4,18	43,53±6,42

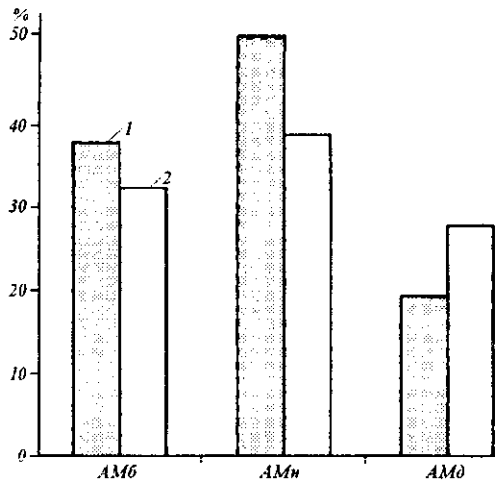


Рис. 3. Степень изменения (%) АТРазной активности актомиозина бычьего (АМб), актомиозина из миокарда здорового донора (АМн) и из ДКМП миокарда (АМд) в Ca^{2+} -среде при добавлении тропонин-тропомиозиновых регуляторных комплексов, выделенных из миокарда больного ДКМП (1) и из нормального миокарда (2). Исходное значение активности актомиозина принято за нуль

вым комплексом в зависимости от концентрации кальция в миоплазме [2]. В литературе описана, с одной стороны, корреляция между изменениями АТРазной активности сократительных белков миоцита при развитии различных патологий миокарда [13], с другой, — было продемонстрировано, что снижение сократимости, замедление расслабления и нарушение ответа на изменение частоты сокращений при ДКМП могут происходить на уровне отдельных кардиомиоцитов [16]. Обнаруженное нами значительное падение активности актомиозиновой АТРазы при ДКМП согласуется с этими данными и подтверждает предположение о том, что в основе нарушений функционирования миокарда могут быть изменения, происходящие на клеточно-молекулярном уровне. На наш взгляд, снижение активности АТРазы АМ — это, возможно, один из важных механизмов уменьшения сократительной функции миокарда при ДКМП.

Мы изучали АТРазную активность препаратов актомиозина исходя из того, что эта система дает более адекватное представление о данной физиологически важной реакции по сравнению с препаратами миофибрилл, которые часто бывают загрязнены клеточными органеллами (митохондрии, сар-

коплазматический ретикулум), имеющими свои собственные АТРазы, что может осложнить интерпретацию результатов [13]. Используемая нами методика выделения препаратов АМ достаточной степени чистоты и активности позволила получить результаты, сравнимые для белков из разных миокардов.

Для того чтобы приблизиться к условиям функционирования АТРазы в живой клетке и изучить влияние ТМ и Тн на АМ при развитии дилатации, нами был использован метод реконструкции сократительного аппарата миофибриллы из предварительно десенситизированного АМ и регуляторных белков. При перекрестной реконструкции миофибриллы, т. е. при добавлении к десенситизированному актомиозину регуляторного комплекса из нормального (ТМ—Тнн) и ДКМП (ТМ—Тнд) миокардов, чувствительность его к Ca^{2+} восстанавливалась. Как видно из таблицы, последняя составляла $43,52 \pm 6,42$ и $52,18 \pm 4,08$ % при добавлении к АМд ТМ—Тнн и ТМ—Тнд соответственно и $37,96 \pm 5,24$ и $54,37 \pm 8,25$ % при добавлении к АМн. В экспериментах с бычьим АМ получены следующие значения чувствительности к Ca^{2+} для ТМ—Тнн и ТМ—Тнд: $46,72 \pm 2,83$ и $58,78 \pm 5,11$ % соответственно. Из приведенных данных следует, что чувствительность к Ca^{2+} реконструированных препаратов практически не зависела от происхождения ни АМ, ни регуляторных белков.

Принято считать, что при сердечной недостаточности происходит снижение чувствительности сократительных белков к Ca^{2+} [14]. При ДКМП также отмечено нарушение аккумуляции Ca^{2+} белками саркоплазматического ретикулума, что ведет к нарушению нормального сокращения саркомеров [15]. Однако в нашем исследовании мы не наблюдали достоверных различий в чувствительности к Ca^{2+} всех трех реконструированных препаратов актомиозинового комплекса ($p < 0,05$).

Полученные данные позволяют приблизиться к пониманию молекулярных механизмов функционирования кардиомиоцитов и сердечной мышцы в целом при различных сердечно-сосудистых патологиях, в частности, при ДКМП.

О. М. Федоркова, Т. В. Ковеня, В. И. Бобик, Д. В. Рябенко, В. С. Трегубов, В. М. Данилова, Л. Л. Сидорик, Г. Х. Мацука

Вивчення молекулярних механізмів функціонування кардіоцитів при дилатативній кардіоміопатії на моделі реконструйованої міофібрили міокарда свавців

Резюме

У роботі використано метод реконструкції міофібрили міокарда із складових її структурних (актомиозин) та регуляторних (тропомиозин та тропоніновий комплекс) білків. За

допомогою цього методу вивчали вплив регуляторних білків, виділених з міокарда практично здорового донора та міокарда особи, що страждала на дилатаційну кардіоміопатію (ДКМП), на Mg^{2+} -АТФазну активність актоміозинів із цих же тканин. При перехресній реконструкції міофібрили чутливість десенситизованого актоміозину до Ca^{2+} відновлювалася та практично не залежала від походження ні актоміозину, ні тропоміозин-тропонінового комплексу. Актomioзон бика використовували як стандартний білок для порівняння з актоміозином людини при додаванні регуляторних компонентів. Встановлене зменшення Mg^{2+} -АТФазної активності актоміозину міокарда у 1,5 разу у хворих на ДКМП при порівнянні зі здоровими людьми можна пояснити модифікаційними змінами скоротливих білків при ДКМП.

O. M. Fedorkova, T. V. Kovenja, V. I. Bobyk, D. V. Ryabenko, V. S. Tregubov, V. M. Danilova, L. L. Sidorik, G. Kh. Matsuka

Investigation of molecular mechanism of cardiomyocytes function at dilated cardiomyopathy using the model of mammals myocardium myofibril reconstruction

Summary

The method of myocardial myofibril reconstruction from structural (actomyosin) and regulatory (tropomyosin and troponin) proteins has been used. The influence of the regulatory proteins purified from healthy donor's myocardium and from myocardium affected by dilated cardiomyopathy (DCM) on the Mg^{2+} -ATPase activity of actomyosin from the tissues has been studied by this method. During cross-myofibril reconstruction the sensitivity of desensitive actomyosin to Ca^{2+} was restored and it did not depend either on actomyosin or tropomyosin-troponin complex origin. Bovine actomyosin has been used as a standard protein in comparison with human actomyosin during addition of the regulatory proteins. The Mg^{2+} -ATPase actomyosin activity was 1.5 times lower for DCM patients than for healthy donors. It probably depends on modification changes of contractile proteins during DCM development.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Report of 1995 WHO, Task Force on the definition and classification of cardiomyopathies // *Circulation*.—1996.—93.—P. 841—842.
2. Филатов В. Л., Катруха А. Г., Буларгина Т. В., Гусев Н. Б. Тропонин: строение, свойства и механизм функционирования // *Биохимия*.—1999.—64.—С. 1155—1174.
3. Любимова М. Н., Энгельгардт В. А. Аденозинтрифосфатаза и миозин мышц // *Биохимия*.—1939.—4, № 6.—С. 716—736.
4. Bradford M. M. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of dye binding // *Anal. Biochem.*—1976.—72.—P. 248—254.
5. Sobieszek A. Gradient polyacrylamide gel electrophoresis in

presence of sodium [dodecyl sulfate]: A practical approach to muscle contractile and regulatory proteins // *Electrophoresis*.—1994.—15.—P. 1014—1020.

6. Margossian S. S. Reversible dissociation of dog cardiac myosin regulatory light chain 2 and its influence on ATP hydrolysis // *J. Biol. Chem.*—1985.—260.—P. 13747—13754.
7. Сидорик Л. Л., Федоркова О. М., Ковеня Т. В., Бобык В. И., Роднин Н. В., Мацука Г. Х. Структурно-функциональное изучение тропоміозина миокарда как аутоантигена при дилатационной кардиомиопатии // *Биополимеры и клетка*.—1998.—14, № 3.—С. 203—209.
8. Сидорик Л. Л., Федоркова О. М., Рябенко Д. В., Бобык В. И., Данилова В. М., Трегулов В. С., Мацука Г. Х. Сравнительное исследование иммунореактивности тропоміозинового комплекса при дилатационной кардиомиопатии // *Биополимеры и клетка*.—2000.—16, № 1.—С. 40—45.
9. Kodama T., Fukui K., Kometani K. The initial phosphate burst in ATP hydrolysis by myosin and subfragment-1 as studied by a modified malachite green method for determination of inorganic phosphate // *J. Biochem.*—1986.—99.—P. 1465—1472.
10. Caforio A. L. P. Role of autoimmunity in dilated cardiomyopathy // *Br. Heart J.*—1994.—72 (Suppl.).—P. 30—34.
11. Sidorik L. L., Rodnin N. V., Bobyk V. I., Ryabenko D. V., Veberov A. V., Tkachenko T. Yu., Matsuka G. Kh. Investigation of autoantibodies directed against tissue-specific myocardial antigens in dilated cardiomyopathy // *Биополимеры и клетка*.—1995.—11, № 1.—С. 81—86.
12. Konstadoulakis M., Kroumbouzou H., Tsiamis E., Trikas A., Toutouzas P. Clinical significance of antibodies against tropomyosin, actin and myosin in patients with dilated cardiomyopathy // *J. Clin. Lab. Immunol.*—1993.—N 40 (2).—P. 61—67.
13. Scheuer J., Bhan A. K. Adenosine triphosphatase activity and physiological function // *Circ. Res.*—1979.—45.—P. 1—12.
14. Малая Л. Т., Горб Ю. Г., Радчинский И. Д. Хроническая недостаточность кровообращения.—К.: Здоров'я, 1994.—624 с.
15. Meyer M., Schillinger W., Pieske B., Holubarsch Ch., Heilmann C., Posival H., Kuwajima G., Mikoshiba K., Just H., Hasenfuss G. Alteration of sarcoplasmic reticulum proteins in failing human dilated cardiomyopathy // *Circulation*.—1995.—92.—P. 778—784.
16. Anderson A. W., Malouf N. N., Oakeley A. E., Pagani E. D., Alien P. D. Troponin T isoforms expression in humans. A comparison among normal and failing adult heart, fetal heart and adult and fetal skeletal muscle // *Circ. Res.*—1991.—69.—P. 1226—1233.

УДК 577.152

Поступила в редакцию 01.06.2000