



УДК 577.112:576.385

© 2012

К. І. Богущка, Ю. І. Прилуцький, Ю. П. Складаров

АТФазна активність міозину як характеристика функціонального стану серцевого м'яза в умовах норми та патології

(Представлено членом-кореспондентом НАН України Д. М. Говоруном)

Із застосуванням методів препаративної білкової хімії, іонообмінної хроматографії та оптичної спектроскопії досліджено протікання АТФ-гідролізної реакції, що каталізується міозином серцевого м'яза. Виявлена відмінність в АТФазній активності міозину та актоміозину, отриманих з міокарда людини в нормі та при наявності дилатативної кардіоміопатії, уможливорює використання величини АТФазної активності для регуляції функціональної активності серцевого м'яза в умовах норми та патології.

Значною мірою успіхи кардіології тісно пов'язані із з'ясуванням механізмів, які контролюють скорочувальну активність міокарда і, відповідно, можливість їх корекції при певній патології. Відомо, що міозини, які виділені з функціонально різних типів м'язів, відрізняються за величиною АТФазної активності [1]. Можна припустити, що і функціональні характеристики скорочувальних білків одного типу м'яза, як то серцевий, в умовах норми або патології, зокрема дилатативної кардіоміопатії (ДКМП), будуть різними. За визначенням ВООЗ, ДКМП — це дифузне гостре або хронічне ураження серцевого м'яза нез'ясованої етіології, що супроводжується розширенням порожнини серця, здебільшого лівого шлуночка, порушенням його систолічної функції і проявом серцевої недостатності з подальшим розвитком колагенезу серцевого м'яза [2, 3]. Існує припущення [4], що в основі механізму ДКМП може лежати зміна в ізоморфному складі легких ланцюгів міозину.

Тому з'ясування особливостей функціонування скорочувальних білків, а саме їх ролі щодо виникнення і розвитку ДКМП, є наразі актуальною медико-соціальною проблемою.

Матеріали та методи досліджень. Препарати міозину і актоміозину для дослідження їх функціональних властивостей виділяли з тканини лівого шлуночка серця людини за методом Маргосян [5]. Матеріал забирався при температурі 0–4 °С і зберігався при –15 °С. Патологоанатомічний матеріал для виділення і дослідження препаратів міозину з серця

людини отримували в Інституті кардіології ім. М. Д. Стражеска НАМН України. Чистоту і якісний склад одержаних препаратів скорочувальних білків, які використовували для подальших досліджень, визначали методом електрофорезу в поліакриламідному гелі при присутності додецилсульфату натрію. В роботі застосовувалися реактиви вітчизняних та іноземних виробників класу чистоти не нижче ч. д. а. Для приготування водних розчинів реактивів і середовищ інкубації використовували бідистильовану та деіонізовану воду.

АТФазна активність білків вимірювалася при 37 °С у середовищі (загальний об'єм — 1,8 мл) з такими концентраціями: для актоміозинової АТФази — 5 мМ MgCl₂, 100 мкМ CaCl₂, 1 мМ АТФ, 0,05 М KCl, 0,5 мМ ДТТ, 20 мМ імідазол, рН 7,5, 0,28 мг/мл білка; для міозинової АТФази — 2,5 мМ MgCl₂, 5 мМ CaCl₂, 1 мМ АТФ, 0,5 або 0,05 М KCl, 1 мМ ЕДТА, 0,5 мМ ДТТ, 20 мМ імідазолу, рН 7,5, 0,14 мг/мл білка. Кількість утвореного під час гідролізу АТФ неорганічного фосфату визначали за методом Фіске-Суббароу. Активність АТФази виражали в мкмоль Ф_н · мг⁻¹ білка · год⁻¹.

Результати статистичного аналізу подано як середнє арифметичне ± стандартна похибка середнього арифметичного для певної кількості (*n*) вимірювань. Статистичне порівняння середніх величин контрольних і тестових вимірювань проводили за законом *t*-розподілу. Рівень вірогідності параметрів ≤ 0,05 розглядався як статистично значущий.

Результати та їх обговорення. Табл. 1 і 2 демонструють АТФазну активність міозину та актоміозину, які були отримані із серцевого м'яза людини в нормі та при наявності ДКМП.

Для АТФазної активності міозину спостережені відмінності є вираженими в умовах високої іонної сили та у присутності іонів Ca²⁺ або ЕДТА. У присутності 5 або 10 мМ MgCl₂

Таблиця 1. АТФазна активність міозину серцевого м'яза людини в нормі та при патології (дилатаційна кардіоміопатія) (мкмоль Ф_н · мг⁻¹ білка · год⁻¹, *M* ± *m*, *n* = 7)

Умови проведення експерименту	Міозин	
	Норма	Патологія
5 мМ CaCl ₂ , 50 мМ KCl	17,22 ± 0,74	13,44 ± 0,51*
2,5 мМ MgCl ₂ , 50 мМ KCl	0,52 ± 0,02	0,49 ± 0,02
1 мМ ЕДТА, 50 мМ KCl	1,26 ± 0,03	1,74 ± 0,05*
5 мМ CaCl ₂ , 0,5 М KCl	11,58 ± 0,42	7,92 ± 0,26*
2,5 мМ MgCl ₂ , 0,5 М KCl	5,07 ± 0,15	5,16 ± 0,13
1 мМ ЕДТА, 0,5 М KCl	8,58 ± 0,27	5,16 ± 0,14*

*Відмінність від норми достовірна при значенні *p* < 0,05.

Таблиця 2. АТФазна активність актоміозину серцевого м'яза людини в нормі та при патології (дилатаційна кардіоміопатія) (мкмоль Ф_н · мг⁻¹ білка · год⁻¹, *M* ± *m*, *n* = 7)

Умови проведення експерименту	Актоміозин	
	Норма	Патологія
5 мМ CaCl ₂	13,24 ± 0,48	5,88 ± 0,14*
5 мМ MgCl ₂	4,68 ± 0,14	2,76 ± 0,07*
5 мМ MgCl ₂ , 100 мкМ CaCl ₂	5,04 ± 0,19	3,36 ± 0,09*
5 мМ MgCl ₂ , 1 мМ ЕГТА	4,22 ± 0,21	3,01 ± 0,11*
10 мМ MgCl ₂	5,28 ± 0,23	1,32 ± 0,06*
10 мМ MgCl ₂ , 100 мкМ CaCl ₂	5,52 ± 0,21	1,81 ± 0,06*
10 мМ MgCl ₂ , 1 мМ ЕГТА	5,16 ± 0,25	1,44 ± 0,04*

*Відмінність від норми достовірна при значенні *p* < 0,05.

АТФазна активність актоміозину визначалася за умови низької іонної сили середовища (50 мМ KCl).

препарати актоміозину мали однакову за порядком АТФазну активність. Активація препаратів іонами кальцію або хелатування ЕДТА незначно впливали на її зміну. Однак при патології значення АТФазної активності актоміозину були вірогідно менші порівняно з нормою.

Отримані результати чітко вказують на використання величини АТФазної активності міозину та актоміозину як можливого маркера щодо подальшої регуляції функціональної активності серцевого м'яза в умовах норми і патології.

Подібні результати одержані авторами роботи [6], де вивчалася АТФазна активність трьох мутантних форм міозину, які, за припущенням, є причиною однієї з форм кардіоміопатій. Показано, що міозини мають дефект в АТФазній активності та зв'язуванні з актином. Ступінь зменшення ферментативної активності мутантних форм міозину корелював з типом хвороби, причиною якої була відповідна мутація (одна мутація відбувається поблизу АТФ-зв'язуючої ділянки, дві — в актин-зв'язуючому центрі). Встановлено, що зменшення кількості легких ланцюгів-2 (ЛЛ-2) призводить до пригнічення актин-активованої АТФази міозину, що виділявся з міокарда хворого на ДКМП. На сьогодні виявлена значна кількість мутацій генів важких і легких ланцюгів серцевого міозину, завдяки яким виникають захворювання типу кардіоміопатій [6–8]. Але наразі мало відомо про дефекти мутантних форм міозину та яка з них є головною причиною розвитку захворювання.

Зниження кількості ЛЛ у міозині серцевого м'яза людини характеризує не лише ДКМП, але й інфаркт міокарда, ішемічну кардіоміопатію, ішемічну хворобу серця і ревматичне ураження серця [9–11]. При ДКМП кількість ЛЛ-2 у міозині передсердь та шлуночків становила відповідно 84 і 76% від норми, а кількість ЛЛ-1, що з'являлись у міозині лівого шлуночка, досягала 23%. Специфічні зміни відбуваються і в складі міозину при серцевій недостатності [9]. При інфаркті міокарда у собак у крові виявляли ізольовані ЛЛ-2 серцевого міозину. Їх кількість чітко корелює з розміром інфаркту. В цьому випадку важкі ланцюги у кров не надходять. Можливо, у пошкодженій ділянці серцевого м'яза ЛЛ-2 дисоціюють з міозину і потрапляють у кров. Не виключено, що цей ефект може бути використаний для діагностики розміру інфаркту.

Отже, якщо врахувати локалізацію ЛЛ в міозині, то втрата їх частини може змінювати структуру міозинової голівки і впливати на ферментативні властивості міозину. Зміни у складі ЛЛ супроводжуються зниженням всіх функціональних властивостей міозину, що лежать в основі нормального функціонування міокарда (порушення структури ниток міозину, зменшення їх розмірів, інгібування його ферментативної активності та регуляторної здатності) [12–14].

Крім того, відомо, що розвиток, протікання і наслідки ішемічної хвороби серця та деяких видів кардіоміопатій супроводжуються не лише змінами АТФазної активності міозину, але й залежать від наявності іонів металів. Збільшення вмісту в тканині токсичних металів призводить до порушення протікання низки біохімічних процесів, блокування дії іонів кальцію і магнію. З урахуванням цього актуальною проблемою залишається розробка нових фармакологічних препаратів, які б збільшували спорідненість міозину до іонів кальцію і, таким чином, підсилювали скорочувальну активність міокарда.

Одержані результати щодо вивчення АТФазної активності міозину та актоміозину серцевого м'яза вказують на можливий шлях використання значення АТФазної активності міозину для регуляції функціональної активності серцевого м'яза в умовах норми і патології.

1. Богуцька К. І., Цимбалюк О. В., Данилова В. М. Особливості функціонування міозинової АТФази // Біополімери і клітина. – 2002. – 18, № 4. – С. 297–300.

2. Лушникова Е. Л., Непомнящих Л. М., Розенберг В. Д. Морфологические и молекулярно-генетические основы дилатационной кардиомиопатии. – Москва: Изд-во РАМН, 2004. – 192 с.
3. Рябенко Д. В. Дилатационная кардиомиопатия: актуальные аспекты иммунопатогенеза, достижения и перспективы новых подходов к лечению // Серцева недостатність. – 2011. – № 1. – С. 12–24.
4. Халина Я. Н. Изменение состава легких цепей миозина миокарда как возможный компенсаторный механизм при дилатационной кардиомиопатии: Автореф. дис. . . . канд. биол. наук; 03.00.02. – Пушчино, 2004. – 21 с.
5. Margossian S. S., Krueger J. W., Sellers J. R. et al. Influence of the cardiac myosin hinge region on contractile activity // Proc. Natl Acad. Sci USA. – 1991. – **88**, No 11. – P. 4941–4945.
6. Roopnarine O., Leslie A., Leinwand L. A. Functional analysis of myosin mutations that cause familial hypertrophic cardiomyopathy // Biophys. J. – 1998. – No 6. – P. 3023–3030.
7. Schmitt J. P., Debold E. P., Ahmad F. et al. Cardiac myosin missense mutations cause dilated cardiomyopathy in mouse models and depress molecular motor function // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2006. – **103**, No 39. – P. 14525–14530.
8. Armel T. Z., Leinwand L. A. Mutations at the same amino acid in myosin that cause either skeletal or cardiac myopathy have distinct molecular phenotypes // J. Mol. Cell Cardiol. – 2010. – **48**, No 5. – P. 1007–1013.
9. Халина Я. Н., Подлубная З. А. Состав легких цепей миозина миокарда человека: перспективы для диагностики заболеваний сердца // Биофизика. – 2002. – **47**, № 2. – С. 367–368.
10. Mascaro-Blanco A., Alvarez K., Yu X., Lindenfeld J. et al. Consequences of unlocking the cardiac myosin molecule in human myocarditis and cardiomyopathies // Autoimmunity. – 2008. – **41**, No 6. – P. 442–453.
11. Fang W., Zhang J., He Z. X. Myocardial ischemia in patients with dilated cardiomyopathy // Nucl. Med. Commun. – 2010. – **31**, No 11. – P. 981–984.
12. Рябенко Д. В., Сидорик Л. Л., Федоркова О. М. и др. АТФазная активность актомиозинового комплекса миокарда у больных с дилатационной кардиомиопатией // Врачебное дело. – 2001. – № 2. – P. 36–39.
13. Lee S., Lu R., Müller-Ehmsen J., Schwinger R. H., Braxius K. Increased Ca²⁺ sensitivity of myofibrillar tension in ischaemic vs dilated cardiomyopathy // Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. – 2010. – **37**, No 12. – P. 1134–1138.
14. Халина Я. Н., Удалыцов С. Н., Подлубная З. А. Изменение состава легких цепей сердечного миозина при дилатационной кардиомиопатии: влияние на функциональные свойства // Биофизика. – 2002. – **47**, № 2. – С. 361–366.

ННЦ “Институт біології”
Київський національний університет
ім. Тараса Шевченка

Надійшло до редакції 15.11.2011

Е. И. Богуцкая, Ю. И. Прилуцкий, Ю. П. Скларов

АТФазная активность миозина как характеристика функционального состояния сердечной мышцы в условиях нормы и патологии

С применением методов препаративной белковой химии, ионообменной хроматографии и оптической спектроскопии исследовано протекание АТФ-гидролазной реакции, которая катализируется миозином сердечной мышцы. Выявленное отличие в АТФазной активности миозина и актомиозина, полученных из миокарда человека в норме и при наличии дилатационной кардиомиопатии, дает возможность использовать величину АТФазной активности в регуляции функциональной активности сердечной мышцы в условиях нормы и патологии.

K. I. Bogutska, Yu. I. Prylutsky, Yu. P. Sklyarov

ATPase activity of myosin as a characteristic of the cardiac muscle functional state under normal and pathological conditions

With the use of methods of preparative protein chemistry, ion chromatography, and optical spectroscopy, the ATP-hydrolase reaction catalyzed by myosin of cardiac muscle, is studied. The revealed difference in the ATPase activities of myosin and actomyosin derived from human normal myocardium and in the presence of dilated cardiomyopathy allows one to use the value of ATPase activity in the regulation of the cardiac muscle functional activity under normal and pathological states.