

КЛИНИЧЕСКАЯ ФАРМАКОЛОГИЯ

СУБКЛЕТОЧНЫЕ, МОЛЕКУЛЯРНЫЕ И СУБМОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ НАРУШЕНИЯ СОКРАТИТЕЛЬНОЙ СПОСОБНОСТИ И ЭКОНОМИЧНОСТИ ПРЕОБРАЗОВАНИЯ ЭНЕРГИИ МИОФИБРИЛЛАМИ МИОКАРДА ПРИ ХРОНИЧЕСКОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ СЕРДЦА У ЧЕЛОВЕКА И МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ СЕРДЕЧНЫХ ГЛИКОЗИДОВ

Карсанов Н.В., Сукоян Г.В., Самсонидзе Т.Г., Татулашвили Д.Р., Гуледани Н.Е., Кучава Л.Т., Карсанов В.Н.
Республиканский НИ центр медицинской биофизики Министерства здравоохранения и
соцобеспечения РГ, Тбилиси

Резюме

При хронической недостаточности сердца (ХНС), обусловленной дилатационной и ишемической кардиомиопатиями, а также инфекционно-аллергическим миокардитом, по данным, полученным на биопсийном, секционном и экспериментальном (токсико-аллергический миокардит) материалах установлено выраженное снижение способности системы контрактильных белков миокарда (СКБМ) генерировать сокращение и гидролизовать АТФ. Это снижение сопровождается падением экономичности сократительного процесса, на что затем наслаивается энергетический дефицит и нарушение транспорта кальция через мембраны кардиомиоцита. Такие явления вместе лежат в основе развития и прогрессирования тяжелой рефрактерной ХНС. В отличие от ранней и острой ХС, в СКБМ при ХНС на актинобусловленное снижение величины и скорости генерации силы и экономичности преобразования энергии СКБМ наслаивается миозинобусловленное снижение интенсивности гидролиза АТФ и генерации силы, детерминированные поражением гидролитического центра миозиновой головки. В основе выраженных структурно-конформационных изменений в мономере и протомере актина тонкой нити лежит поражение центров, ответственных за полимеризационную активность (образование нити) и генерацию силы, снижение конформационной подвижности областей расположения Цис374, Лиз61 и Тир69. Расстояния между Цис374, Цис10 и Лиз61 увеличиваются (и только между Цис374 и Тир69, в отличие от острой ХС, уменьшаются), что ведет к разрыхлению структуры внешнего домена. На основании полученных в работе методом резонансного переноса энергии флуоресценции данных, а также атомной структуры актина скелетной мышцы и трехмерной реконструкции тонкой нити миокарда построены гипотетические модели тонкой нити и протомера актина миокарда практически здорового сердца и больного ХНС. Указанные сдвиги являются посттрансляционными и в оптимальных условиях *in vitro* под воздействием сердечных гликозидов (строфангина К, бета-ацетил- и бета-метилдигоксина) - обратимыми, хотя и стойкими.

Ключевые слова: хроническая сердечная недостаточность, дилатационная кардиомиопатия, инфекционно-аллергический миокардит, ишемическая кардиомиопатия, актин, миозин, структурный анализ, медикаментозное воздействие.

Молекулярный механизм развития и прогрессирования недостаточности сердца (НС), не говоря о субмолекулярном, все еще остается неразгаданной тайной природы [39,46,47]. И это, несмотря на то, что ХНС является наиболее грозным осложнением болезней сердца, ведущим к продолжительной инвалидности и неминуемой смерти больного, и что рациональная терапия НС не может быть разработана без познания механизма ее развития.

Ранее на субклеточном уровне было установлено, что развитие ХНС начинается с нарушения функциональной активности миофибрилл, системы контрактильных белков миокарда (СКБМ) [6,8,19], затем к этому явлению присоединяются нарушения в системе энергетического обеспечения кардиомиоцита, развивается энергетический дефицит, обусловленный поражением митохондрий и истощением резервных возможностей системы, и, наконец, на более поздних этапах прогрессирования НС включаются и нарушения в системе транспорта ионов Са, падает способность системы высвобождать и поглощать Са из цитозола [6,8,19,39,42,43].

На секционном и экспериментальном материалах показано, что нарушение генерации силы и экономичности преобразования энергии гидролиза АТФ в актомиозиновом ансамбле при ХНС являются узловыми процессами в развитии недостаточности сократительной способности миофибрилл [5,10,11,15-17,27,35,38]. При этом нарушение преобразования энергии при ХНС страдает как количественно (падает величина генерируемого напряжения [9,16,17], снижается Са-Mg-АТФазная активность миофибрилл [10,32,43], Са-,К-ЭДТА-АТФазные активности миозина [16,17,20]), так и качественно (в актомиозиновом ансамбле происходит разобщение функционирования центров гидролиза АТФ и генерации силы [5,6,16,17,35]). Показано, что при тяжелой ХС, обусловленной различными хроническими заболеваниями сердца человека, падение способности СКБМ генерировать силу сопровождается нарушением процесса полимеризации основного белка тонкой нити - актина [3,6,10,37], и что при реполимеризации актина при ХНС, *in vitro*, наиболее часто встречаемая длина актиновой нити в 4-6 раз короче Ф(фибрилярно-

го)-актина нормального миокарда человека и экспериментального животного [6,37]. Это свидетельствует о нарушении сродства, ослаблении связи между протомерами актиновой нити [21,22], о поражении домена 2 (внутреннего), в котором расположены основные центры актин-актинового взаимодействия [30,41], что и ведет к ослаблению (уменьшению) прочности и гибкости тонкой нити, ее фрагментации [21,22,25,37].

Настоящая работа посвящена выяснению молекулярного и субмолекулярного механизма нарушения генерации силы и полного разобщения процессов генерации силы и гидролиза АТФ, развития резистентных к физиологическим воздействиям нарушений в актомиозиновом ансамбле при ХНС, обусловленной дилатационной кардиомиопатией (ДКМП), инфекционно-аллергическим миокардитом (ИАМ), постинфарктным кардиосклерозом, а также экспериментальным токсико-аллергическим миокардитом 10-ти дневной продолжительности (ТАМ_{10дн}). С этой целью объектом настоящего исследования стал внешний домен протомера актиновой нити, в котором расположены центры, ответственные за генерацию силы [32,41,49] и экономичное преобразование энергии в СКБМ [49] - установлено, что сила, развиваемая миофибриллами, генерируется в процессе взаимодействия N-(1-4,11,21-40) и C-концевых (345-346 и 374-375) аминокислотных остатков, расположенных во внешнем домене протомера актиновой нити с миозиновой головкой [32,41,49].

Материал и методы

Биопсийный материал составили образцы миокарда, взятые во время эндомикардиальной биопсии (6 случаев¹) у больных (средний возраст 30,3±2,1 г) ИАМ (3 случая) и ДКМП (3 случая), осложненных ХНС (средний функциональный класс (ФК) по NYHA 3,3±0,2), а аутопсийный - сердца 7 практически здоровых людей (5 мужчин и 2 женщины, в возрасте 35-65 лет, средний возраст 54,2±2,6 г), умерших сразу на месте происшествия от острой физической травмы, несовместимой с жизнью, и 10 человек (6 мужчин и 4 женщины, средний возраст 62 г) с ХНС (средний ФК 3,2±0,3), обусловленной ДКМП - 5 человек и постинфарктным кардиосклерозом, сочетающимся с гипертонической болезнью - 5 человек (возраст 26-35 лет). Во всех случаях образцы миокарда были взяты не позднее 20 часов после смерти.

Методы получения скинированных (СВМ), гибридных (ГВМ) и теневых (ТВМ) волокон миокарда, актина и миозина [14,18], измерения скорости и величины генерируемой СВМ и ГВМ силы в изометрическом режиме в стандартных условиях (ионная сила (m) 0,13, температура (t) 25°C), pH 7,4, pCa 6,0 (сокращение) и pCa >8 (расслабление) и в интервалах t от 5 до 37°C и pH от 5,0 до 8,9, определения

Ca, Mg-АТФазной активности миофибрилл, расчета изменения свободной энергии (ΔG) гидролиза АТФ, проведения полиакриламидного микрогельэлектрофореза с додецилсульфатом натрия (ДСН ПААГ), содержания белка и методы статической обработки результатов даны в работах [16,27], а действия сердечных гликозидов (СГ, строфантин К (СК, СССР; конечная концентрация - 10^{-6} М, β -метилдигоксин (β МД - 10^{-8} М), β -ацетилдигоксин (β АД - 10^{-6} М) (Boehringer Mannheim, Австрия) на показатели сокращения СВМ, ГВМ и структурно-конформационное состояние актина указаны в других работах [13,15].

Методы регистрации ориентации (анизотропии и поляризации флуоресценции), а также расстояний между различными аминокислотными остатками, мечеными флуоресцентными зондами, по резонансному переносу энергии флуоресценции (РПЭФ) в актине с использованием 1,5-IAEDANS (N-iodoacetyl-N'-(5-sulfo-1-naphthyl) ethylenediamine), 5-IAF (5-(iodoacetamido)-fluorescein), присоединяющихся к Цис374, DnSCl (5-[Dimethylamino] naphthalene-1-sulfonyl chloride) - к Тир69 и DDPM (N-(4-Dimethylamino-3,5-dinitrophenyl)-maleimide - к Цис374 и Цис10, а также определения радиального расстояния Цис 374 осуществляли, как описано ранее [15,26]. РПЭФ между Цис 374 в актине и Цис707 и Лиз83 в миозиновой головке проводили согласно [51]. Моделирование протомера актина и Ф-актиновой нити осуществляли, как описано ранее.

Результаты и обсуждение

Сократительная способность СВМ при ХНС, обусловленной ИАМ, ДКМП и хронической ишемической болезнью сердца

Величина изометрического напряжения, развиваемая СВМ (из биоптатов) при ХНС, обусловленной ДКМП и ИАМ, а также постинфарктным кардиосклерозом в сочетании с гипертонической болезнью (секционный материал²) при pH 7,4, pCa 6.0 и t 25°C (стандартные условия определения сократительных свойств СКБМ в эксперименте) оказалась в 3,5, а при t 37°C (физиологической) в 5,0 раз меньше напряжения, генерируемого СВМ сердца практически здорового человека (рис. 1); величина генерируемого напряжения СВМ сердца практически здорового человека при повышении t возрастает, а СВМ больного ХНС, наоборот, уменьшается.

Аналогичные результаты ранее были получены при ХНС, развившейся в связи с митральными и митрально-аортальными пороками, а также легочным сердцем [4,6]. В этом исследовании было также показано, что в случае осложнения болезни мерцательной аритмией сократительная способность СКБМ падает в еще большей степени. Интенсивность гидролиза АТФ, актин-активируемой Са

¹ Авторы благодарят академика РАМН, профессора Н.Р.Палеева, руков. кардиопульмонологического отделения МОНИКИ за предоставление образцов биоптатов. В группу секционного материала вошли и больные ДКМП (3 случая), умершие в продолжение 3 месяцев после взятия эндомикардиальной биопсии, что увеличило число случаев в этой группе с 7 до 10.

² Показатели сократительной способности СВМ в условиях изометрического сокращения в этих двух подгруппах существенно между собой не отличались, поэтому в настоящей работе они объединены в одну группу.

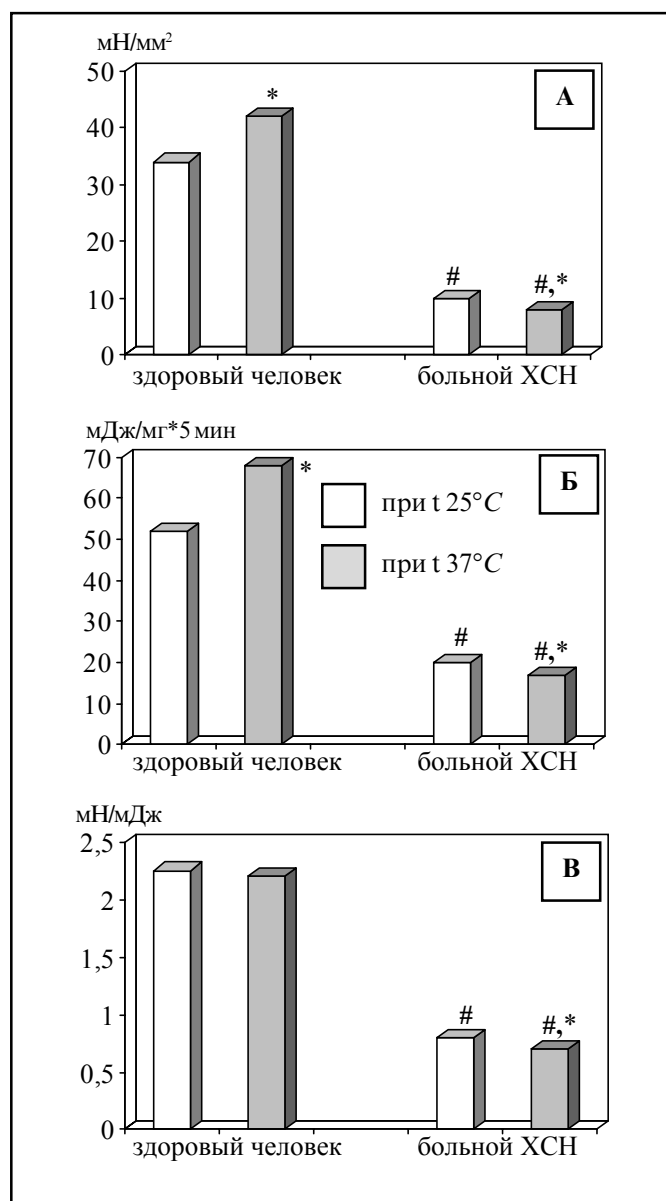


Рис 1. Напряжение (А), интенсивность гидролиза АТФ (Б) и экономичность сократительного процесса (В) в конце периода генерации силы СВМ сердца практически здорового человека и больного ХНС при температуре 25° С и при t 37° С

Примечание: * - сравнение показателей при двух температурах (p<0,05); # - СВМ сердца практически здорового человека и при ХНС (p<0,001)

MgАТФазной активности миофибрилл при t 25°С и 37°С оказалась в 2,1 и 4,0 раз, соответственно, меньше контрольной. В результате экономичность сократительного процесса при физиологической t относительно регистрируемой при t 25°С уменьшается в 1,3 раз, а относительно эффективности сокращения СВМ практически здорового человека при t 37°С в 2,25 раз (рис. 1). При этом скорость генерации силы СВМ падает в 3,5 раза, а максимальная скорость расслабления, несмотря на внесение в среду даже повышенного (не 8, а 12 мМ) количества ЭГТК (этиленгликольтетрауксусная кислота, хелатор Са-ионов; in vitro вы-

полняет роль саркоплазматического ретикулума), почти в 6 раз. Это свидетельствует, что не только сократительные свойства миофибрилл, но и процесс расслабления СВМ при ХНС страдает в результате повреждения самой СКБМ, утери способности актомиозинового ансамбля переходить из сильной (силогенерирующей) связи в слабую - силогенерирующую (утери способности к конформационным превращениям), а не только удаления Са²⁺ из цитозола.

При ХНС нарушаются Са-чувствительность, процесс модуляции Тм+Тн комплекса тонкой нити актином - рСа₃₀ СВМ сдвигается влево в сторону более низких концентраций Са²⁺ (Са-чувствительность повышается) и резко падает кооперативность Са-ответа СВМ (до 1,5; в норме - 2,8).

В случае ХНС человека, так же, как и при тяжелой НС, обусловленной ТАМ_{10дн} в эксперименте, в белковом спектре миофибрилл происходят некоторые изменения - относительное (к актину) содержание ТнI (ингибирует Са-Mg-АТФ-азную активность актомиозина) в тонкой нити уменьшается на 13% (хотя это уменьшение и недостоверно), а относительное содержание ЛЦ1 - на 23% (табл. 1). Однако, этими изменениями едва ли можно объяснить сдвиги в Са-чувствительности и кооперативности Са-ответа, а также снижение величины генерируемой силы и экономичности преобразования энергии СВМ при ХНС. Речь, по-видимому, должна идти не о количественных, а о качественных сдвигах в СКБМ.

Во всех трех случаях ХНС, обусловленной ДКМП, показатели сократительных и ферментативных свойств СВМ из образцов сердца, взятых во время эндомикардиальной биопсии, сопоставлены с данными, полученными на СВМ этих же больных, приготовленных из материала, взятого во время секции (смерть больных наступила во время пребывания в клинике в продолжение 3 месяцев после эндомикардиальной биопсии). Ни в одном случае не выявлены существенные отклонения от параметров (величины генерируемой силы, ΔG гидролиза АТФ и экономичности преобразования энергии), полученных на биоптатах. Следует отметить, что и по данным ЭхоКГ у этих больных заметной динамики в показателях сократимости миокарда (скорости циркулярного укорочения волокна и фракции выброса левого желудочка) в периоде между взятием эндомикардиальной биопсии и смертью не зарегистрировано.

Эти данные полностью согласуются с результатами ра-

Таблица 1

Относительное содержание миозина, легких цепей и белков тропомиозин-тропонинового комплекса СВМ в норме и при ХНС

Группа	ТЦМ/А	ТнТ/А	ТМ/А	ТнI/А	ЛЦ1/ТЦМ	ЛЦ2/ТЦМ	ТнС/А
норма	2,40±0,23	0,39±0,07	0,36±0,04	0,32±0,05	0,13±0,01	0,15±0,01	0,11±0,02
ХНС	2,28±0,21	0,37±0,03	0,38±0,05	0,27±0,03	0,10±0,02*	0,14±0,01	0,10±0,01
ТАМ _{10дн}	2,25±0,21	0,38±0,04	0,34±0,05	0,26±0,04	0,10±0,02*	0,13±0,02	0,11±0,01

Примечание: ТЦМ - тяжелая цепь миозина, А - актин, ЛЦ1 и ЛЦ2 - легкие цепи миозина 1 и 2, Тм- тропомиозин, Тн-Т, I и С - тропонины Т, I, С; * - достоверность различий средних по сравнению с нормой

нее проведенных исследований [2-4,6,34,36] и позволяют считать, что результаты, полученные на аутопсийном материале совпадают с данными, полученными на биоптатах и, следовательно, и одни, и другие отражают состояние (свойства) СКБМ *in vivo*, и что при тяжелой ХНС, обусловленной пороками сердца, ДКМП, ИАМ, ишемической кардиомиопатией и перегрузкой сердца давлением (гипертоническая болезнь, легочное сердце [4]), а также атиреоидной и Л-тироксिनотрофической миокардиодистрофиями [6,38], однотипны и совпадают с характером нарушений, наблюдаемых при тяжелой ХНС, воспроизведенной в экспериментальных моделях [6,8,11,42,43].

К вопросу о субмолекулярном механизме актин-обусловленного снижения сократительной активности СКБМ при ХНС

Наши исследования показали, что при ХНС в субдомене 1 (рис. 2) актина миокарда человека, как и при тяжелой ХНС, обусловленной ТАМ, в области Цис374 как в мономере, так и в протомере актиновой нити при ХНС происходят значительные структурно-конформационные изменения. Об этом свидетельствует увеличение корреляционного времени жизни флуоресценции 1,5-IAEDANS, присоединенного к Цис374 мономерного актина на 47% и, в еще

большой степени, в случае протомера актиновой нити - на 60%. Интенсивности флуоресценции 1,5-IAEDANS в обоих случаях, наоборот, уменьшаются в 2,25 и 2,1 раза, соответственно. При этом в случае мономерного актина резко изменяется анизотропия и поляризация метки, а в протомере актиновой нити не происходит обращения полярности флуоресценции (табл 2). Описанные сдвиги свидетельствуют о более жестком присоединении 1,5-IAEDANS, более стабильном "застывшем" состоянии микроокружения Цис374 и о снижении конформационной подвижности С-концевой области актина.

Радиальное расстояние Цис374 при ХНС и рСа 5 (условия сокращения) существенно увеличивается - на 0,6 нм (в норме это расстояние равно 1,96 нм), субдомен 1 отходит от оси нити. И, так как Цис374 локализован вблизи центра взаимодействия актина с миозином [32,41], такое увеличение расстояния может вести к более слабому тангенциальному присоединению миозиновой головки к актиновой нити, ослаблению сильной силогенерирующей связи. Ослабление сильной связи проявляется в снижении ригорной силы, развиваемой СВМ сердца человека с ХНС, которая относительно изометрической ригорной силы СВМ сердца практически здорового человека при $t\ 37^\circ\text{C}$ уменьшается на 80%.

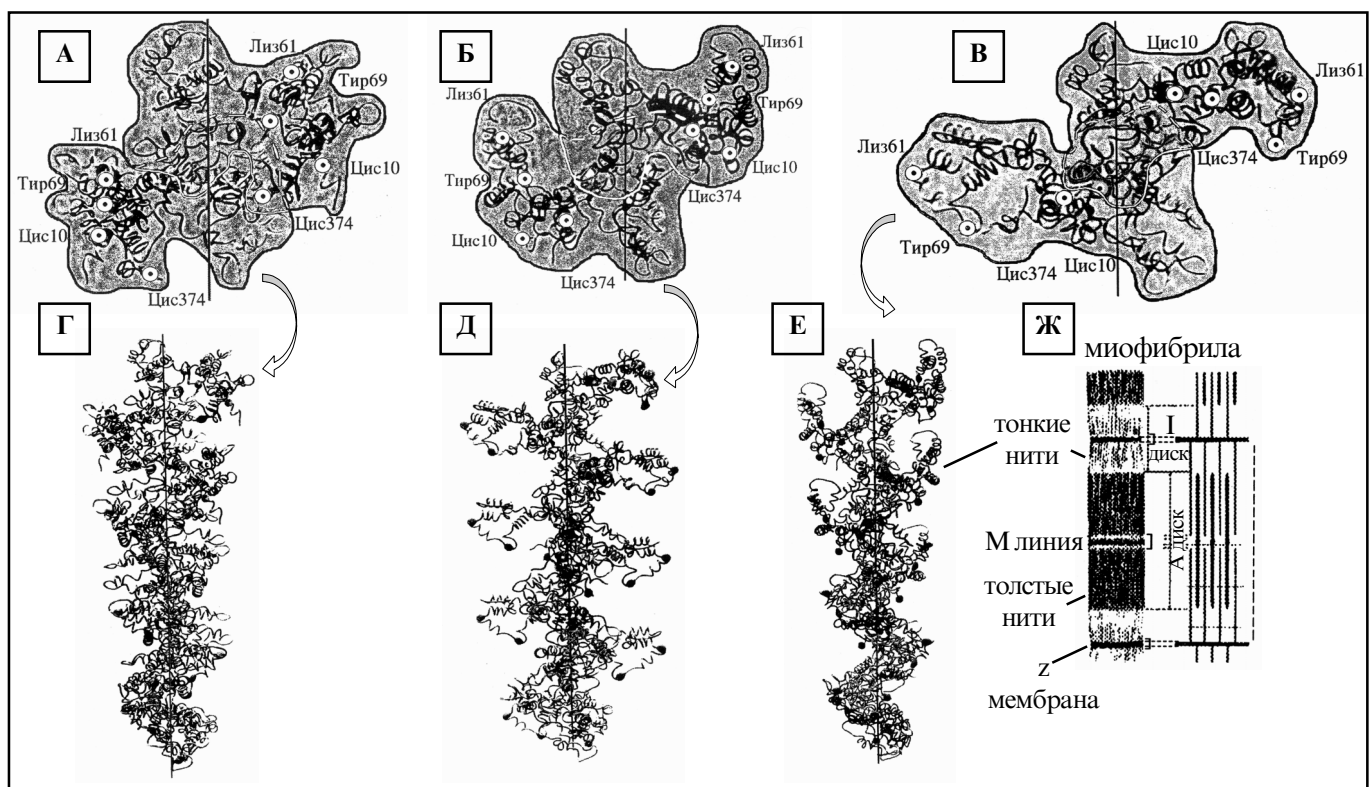


Рис. 2. Гипотетические модели протомеров актина (а,в,д) и тонких нитей (б,г,е) миокарда практически здорового человека (а,б), миокарда больного ХНС (в,г), и актина миокарда больного ХНС под воздействием сердечного гликозида (д,е), построенные на основе атомной модели актина [37,50]. При построении тонких нитей принято, что элементарный угол поворота протомера в тонкой нити практически здорового человека равен 167° , а параметры спирали равными 28/13 (28 протомеров на 13 витков спирали) с диаметром нити 10,0 нм, как и в случае тонкой нити нормального миокарда кролика и собаки [30]. В случае тонкой нити миокарда больного ХНС диаметр нити увеличивается до 14,0 нм, параметры спирали становятся равными 25/12 и элементарный угол поворота протомера актина в нити увеличивается до 172° , а под воздействием сердечного гликозида нормализуются.

Таблица 2

Анизотропия и поляриность флуоресцентных зондов в мономере актина и протомере актиновой нити миокарда практически здорового человека и при ХНС

Флуоресцентные метки и пары	Длина волны, нм	Поляризация		Анизотропия	
		норма	ХНС	норма	ХНС
мономер актина					
1,5-IAEDANS	480	-0,22±0,04	0,13±0,03^	-0,19±0,04	-0,11±0,03^
DnS	520	-0,15±0,03	-0,04±0,006	-0,10±0,01	-0,026±0,008*
FITC	520	-0,11±0,02	-0,17±0,025*	-0,07±0,01	-0,11±0,01*
1,5-IAEDANS-FITC	480	-0,12±0,03	0,06±0,008^	-0,08±0,006	0,04±0,004^
	520	-0,145±0,03	-0,135±0,009	-0,13±0,02	-0,085±0,008^
1,5-IAEDANS-DnS	480	-0,05±0,01	-0,029±0,007	-0,03±0,005	-0,021±0,005
протомер актиновой нити					
1,5-IAEDANS	480	0,16±0,02●	0,15±0,01*	0,12±0,01	0,11±0,01
DnS	520	-0,13±0,02●	-0,27±0,04**●	-0,08±0,01	-0,16±0,02**
FITC	520	-0,17±0,01	-0,19±0,01	-0,115±0,01	-0,11±0,01
1,5-IAEDANS-FITC	480	0,14±0,03	0,10±0,01	0,10±0,01	0,07±0,01
	520	-0,17±0,02	-0,14±0,02●	-0,14±0,01	-0,09±0,01●
1,5-IAEDANS-DnS	480	-0,11±0,02	-0,16±0,03	-0,08±0,01	-0,10±0,02

Примечание: достоверность различий средних - *, [^] - сравнение с нормой, •, • - мономера с протомером, *, - p<0,05; **, - p<0,01; [^], • - p<0,001

Поведение FITC, присоединенного к Лиз61, расположенному в субдомене 2 у входа в расщелину между доменами актина свидетельствует, что область Лиз61, в отличие от Цис374, наоборот, становится химически менее экранированной, открытой, как и в случае тяжелой НС, обусловленной ТАМ_{10дп} [26]. Более того, интенсивность флуоресценции FITC при ХНС увеличивается не только в результате усиления собственной флуоресценции, но и индуцированной, возникающей при возбуждении 1,5-IAEDANS, причем даже тогда, когда интенсивность свечения 1,5-IAEDANS в два раза меньше, чем в норме. Это свидетельствует о резком увеличении энтропии и свободной энергии стабилизации структуры, уменьшении внутренней энергии, очевидно, всего домена 1 актина, как и при атиреоидной миокардиодистрофии [21,22].

При этом расстояние между Цис374 и Лиз61 относительно наблюдаемого в актине миокарда практически здорового человека увеличивается на 17,1% (на 0,8 нм), а между Цис374 и Тир69, расположенном в самой расщелине, вблизи нуклеотидсвязывающего центра, наоборот, уменьшается на 19% (табл. 3) и это - основное отличие в изменении конформационного состояния при острой и ХНС.

В случае актина миокарда при ХНС Тир69 в субдомене 2 отделяется от Цис10, расположенного в субдомене 1, на 25,9%. Это дает основание считать, что в молекуле актина при ХНС, так же, как и при НС, обусловленной ТАМ_{10дп}, в эксперименте [26], а также при остром инфаркте миокарда расщелина между доменами в мономере актина раздвигается и мономер актина, по-видимому, застывает в раскрытом положении. Полимеризация (образование нити) такого актина, как в норме, не сопровождается существенными перестройками в молекуле актина, не изменяется поляризация и анизотропия флуоресцентных меток, при-

соединенных к Цис374 и Лиз61 (как и оптическая активность ароматических аминокислотных остатков [39]) (табл. 2). Мономер актина при ХНС включается в актиновую нить без соответствующего изменения конформации (рис. 2). Ранее такой же вывод сделан на основании исследований мономерного актина и актиновой нити методом кругового дихроизма [34]. Об этом свидетельствует и то, что расстояния между Цис374 и Лиз61, а также Цис374 и Тир69 в протомере актина миокарда больного ХНС, остаются равными расстояниям в мономерном актине, а не уменьшаются, как в норме, на 17 и 25 %, соответственно (табл. 3). Хотя расстояние между Тир69 и Цис10 и уменьшается на 12%, однако также не доходит до величины, характерной для протомера актиновой нити миокарда практически здорового человека. В результате при ХНС происходит увеличение размеров протомера актиновой нити, обусловленное раскрытием, сглаживанием расщелины и это сопровождается отходом Цис374 (С-конца полипептидной цепи) от оси актиновой нити на 0,5-0,6 нм (на 20%).

Эти результаты полностью согласуются с увеличением диаметра натуральной актиновой нити при тяжелой НС, обусловленной ТАМ_{10дп}, константированного методом оптической дифракции и трехмерной реконструкции, а также непосредственным измерением диаметра Ф-актиновых нитей на электронных микрофотографиях [6,25]. Изменение ориентации и взаимного расположения аминокислотных остатков актина при ХНС у человека (табл. 3) и НС, обусловленной ТАМ в эксперименте [26], а также данные кругового дихроизма об однотипности изменения ароматических аминокислотных остатков в актине при НС [6,34], отражают структурно-конформационное состояние физиологически важных центров и указывают на однотипность структурно-конформационных изменений в актиновой нити при ХНС у человека и ТАМ в эксперименте. Это дает основание считать, что у человека при ХНС угол поворота протомера актиновой нити относительно оси также должен увеличиваться, как и в эксперименте [25], со 167° в

Таблица 3

Изменение структурно-конформационного состояния мономера и протомера актина при ХНС у человека и под воздействием СГ (расстояние, нм)

Аминокислотные остатки	Состояние	Норма	Норма + СК	ХНС	ХНС + СК
Цис 374-	мономер	4,68±0,18	4,25±0,09##	5,48±0,15**	5,05±0,13***
Лиз 61-	протомер	3,90±0,09•	4,10±0,06#	5,15±0,13**#	4,85±0,12**#
Цис 374-	мономер	2,65±0,13	2,50±0,07	1,85±0,11**	2,85±0,09 [^]
Тир 69-	протомер	1,96±0,12•	1,85±0,12•	1,78±0,13*	2,29±0,11*•### [^]
Тир 69-	мономер	2,90±0,10	3,05±0,08	3,65±0,08	3,40±0,08*### [^]
Цис 10-	протомер	2,85±0,13	2,60±0,09#	3,29±0,09•	2,99±0,10§*** [^]
Цис 374-	мономер	2,50±0,13	2,50±0,07	3,15±0,11**	2,85±0,09#
Цис 10-	протомер	2,40±0,10•	1,80±0,12•	3,05±0,12**	2,29±0,11*•#### [^]

Примечание: достоверность различий средних - * - сравнение с нормой (* - p<0,01, ** - p<0,001), # - с и без СГ (# - p<0,05, ## - p<0,01, ### - p<0,001), • - мономера с протомером (• - p<0,05), [^] - с нормой+СК ([^] - p<0,05).

норме до 172° (а, возможно, и более) (рис. 2Б).

Полученные данные дают новые доказательства, ведущей роли утери конформационной подвижности, способности актинового протомера переходить из низкоэнергетической, линейно вытянутой конформации в компактное высокоэнергетизированное состояние, способности создавать и проводить волну силогенерирующих конформационных изменений вдоль тонкой нити (например, типа солитона, предложенного для объяснения механизма генерации силы миозиновыми головками [1]), но распространяющегося не по миозиновой, а вдоль актиновой нити.

При ХНС протомеры актиновой нити, в связи с утерей, в значительной степени, конформационной подвижности, как бы застывают в развернутом состоянии, и волна кооперативных силогенерирующих конформационных перестроек (перехода из одного конформационного (вытянутого) состояния в другое (частично свернутое), очевидно, должна выглядеть как рудиментарный солитон, распространение которого вдоль актиновой нити ведет при взаимодействии с сетью опорных точек, миозиновыми головками, к генерации существенно меньшей силы.

Вышеописанные изменения расстояний при ХНС нарушают взаимодействие актинового протомера с миозиновой головкой. В результате, в актомиозиновом комплексе расстояние между Цис374 в Ф-актиновой нити больного ХНС и Цис707(SH1) миозина увеличивается (с $5,83 \pm 0,19$ в норме до $6,8 \pm 0,2$ нм в ригоре (на 18%) и с $5,93 \pm 0,16$ нм до $6,74 \pm 0,17$ нм (на 13%) при сокращении), а между Цис374 и Лиз83 в условиях сокращения - на 40% (табл. 4). В случае замены миозина больного ХНС на неизмененный (нормальный) изученные расстояния в актомиозине остаются равными наблюдаемым в актомиозине миокарда больного ХНС. Это позволяет сделать вывод, что изменение взаимного расположения Цис374 актина и Цис707 (SH-группы) в миозиновой головке и между Цис374 актина и Лиз83 миозина в актомиозине обусловлено рекомбинационными перестройками, происходящими в микроокружении Цис374 актина и свидетельствует в пользу предположения, что падение величины генерируемой силы и ΔG гидролиза АТФ при ХНС обусловлено не только снижением конформационных кооперативных превращений в актине (в результате образовавшихся деформаций в структуре), но и нарушением (ослаблением) актин-миозинового контакта, особенно при образовании сильной, силогенерирующей связи из-за изменения геометрии актиновой нити. Таким образом, не только резкое падение конформационной подвижности, но и нарушение стерического взаимодействия актина и миозина лежит в основе снижения сократительной способности актомиозинового ансамбля при ХНС.

Действие сердечных гликозидов на СКБМ и состояние актина при ХНС

При ХНС СК, β АД, β МД уменьшают радиальное расстояние Цис374, однако до уровня, наблюдаемого в норме (но не уровня нормы под воздействием СГ). Под воздействием β АД как в мономере, так и в протомере актиновой нити расстояние между Цис374 и Лиз61, отражающее, по-видимому, конформационное состояние домена

Таблица 4

Расстояния (нм) между Цис374 в субдомене 1 протомера актиновой нити и Цис707(SH1 группой) 20 кД домена миозиновой головки и между Цис374 и Лиз83 в ЛЦ1 миозина в норме и при ХНС в условиях сокращения и под воздействием СГ

Аминокислотные остатки	Норма			ХНС		
	контроль	β АД	СК	контроль	β АД	СК
Цис374(актина) - Цис707 (SH1 в головке миозина)	$5,93 \pm 0,16$	$5,56 \pm 0,26^*$	$4,73 \pm 0,21^{***\#\#}$	$6,74 \pm 0,17^{***}$	$6,14 \pm 0,09\#$	$6,04 \pm 0,15\#\#$
Цис374 (актина) - Лиз83 (ЛЦ1) (миозина)	$4,23 \pm 0,18$	$3,95 \pm 0,16^*$	$4,03 \pm 0,11$	$5,55 \pm 0,12^{***}$	$4,95 \pm 0,16\#$	$4,83 \pm 0,13\#$

Примечание: сравнение различий средних - * - с нормой, # - с β АД, • - со СК в норме, остальные обозначения те же, что и в табл. 1.

1 актина в целом практически нормализуется (рис. 3).

Показано, что взаимодействие СК и β АД с актином миокарда больного ХНС нормализует не только положение Цис374 относительно оси тонкой нити, но и расстояние между Цис374 в актине и Цис707 (SH1) в 20 кД домене миозиновой головки (уменьшает на 10%), с которым формируется сильная, силогенерирующая актомиозиновая связь. Расстояние между Цис374 и Лиз83 также уменьшается (на 15%) и также возвращается к нормальному (табл. 4) - СГ, по-видимому, в определенной степени возвращают актину нормальный уровень внутренней энергии. Эти изменения коррелируют с увеличением активной (энергозависимой) и ригорной сил, которые возрастают на 45 и 57%, соответственно, а экономичность сократительного процесса увеличивается на 24%. При этом изменения Са-Mg-, К-ЭДТА-АТФазных активностей миозина под воздействием ни одного из изученных СГ не происходит.

Таким образом, при ХНС СГ обращают или сдвигают структурно-конформационное состояние и конформационную подвижность актина, а также архитектуру актомиозинового ансамбля в сторону нормализации.

Изменение конформационного состояния всей актиновой нити под воздействием СГ происходит, по-видимому, при присоединении СГ далеко не к каждому протомеру актиновой нити. Это обеспечивается высокой кооперативностью актиновой нити в норме [33,44,45] и путем восстановления кооперативности тонкой нити при ХНС под воздействием СГ. Таким образом, увеличение генерируемого напряжения и экономичности сократительного процесса должно происходить в результате восстановления (нормализации) конформационной подвижности актиновых протомеров, кооперативности передачи сигнала вдоль тонкой нити и геометрии области контакта актина с миозином. Механизм усиления кооперативных перестроек в тонкой нити в случае СГ, по-видимому, аналогичен, например, действию гельсолина, присоединение которого к Цис374 одного протомера актиновой нити изменяет конформацию более чем 200 протомеров и ведет к уменьшению жесткости всей актиновой нити в 5 раз [45] или, возможно, действию гликолитических ферментов [23,24] и других белков, веществ небелковой природы и двухвалентных катио-

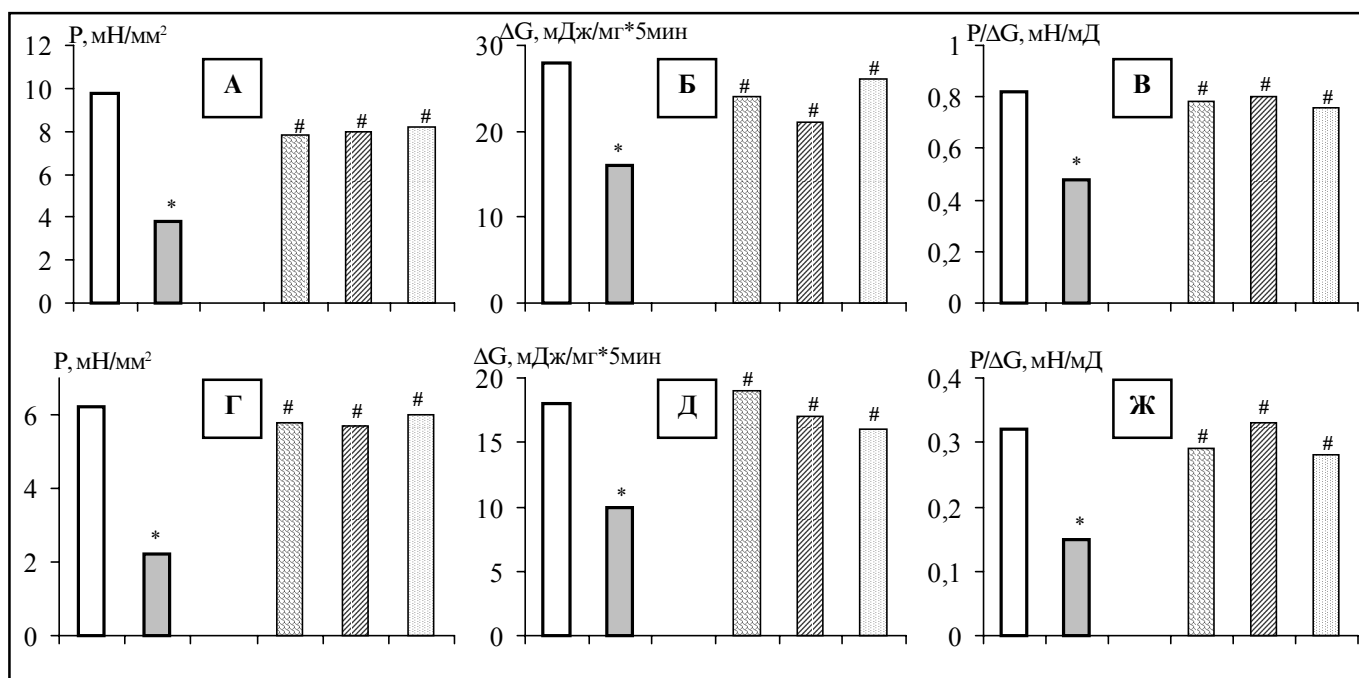


Рис. 3. Действие СГ (строфантина К (штрих), бета-ацетилдигоксина (зигзаг), бета-метилдигоксина (точечный)) на напряжение (А,Г), ΔG гидролиза АТФ (Б,Д) и экономичность сократительного процесса (В,Е) ГВМ, реконструированное из ТВМ больного ХНС и миозина сердца практически здорового человека - (штрих), ГВМ, образованное из ТВМ и миозина сердца практически здорового человека (контроль) - (белый)

Примечание: * - сравнение с контролем, # - ГВМ, реконструированное из ТВМ больного ХНС и миозина сердца практически здорового человека $p < 0,001$.

нов [44] кооперативно изменяющих конформацию актиновой нити. Во всех случаях можно допустить, что происходят супрамолекулярные перестройки, индуцированные лигандом-триггером (СГ) [50].

В механизме функционирования СКБМ открытым остается вопрос о роли обратимо связываемых с тонкой нитью гликолитических ферментов [23,24,30], наличия в тонкой нити собственной компартментализованной системы энергетического обеспечения, вырабатывающей АТФ наиболее защищенным, гликолитическим путем. Этот вопрос представляет большой интерес и требует углубленного изучения, особенно в условиях выраженного энергетического дефицита при ХНС.

В крови и миокарде человека и экспериментальных животных, никогда не получавших СГ, методами иммунохимического анализа установлено присутствие эндогенных дигиталисоподобных веществ [31,40]. При ХНС содержание этих соединений в плазме крови увеличивается почти на порядок и отмечается прямая обратная корреляционная взаимосвязь между их содержанием и сердечным индексом ($r=0,62$, $p<0,05$) [31]. Это дает основание предположить, что эндогенные дигиталисоподобные вещества являются природными модуляторами актина, и что потеря миокардом, кардиомиоцитом эндогенных дигиталисоподобных соединений может вести к посттрансляционным нарушениям конформации и конформационной подвижности актина, и, в результате - к снижению сократительной способности миофибрилл. В этом аспекте экзогенные СГ воспринимаются как средства заместительной терапии,

которые, присоединяясь к актину, модифицируют актин и, тем самым, восстанавливают сократительную и релаксационную функции миофибрилл. Однако, пока это только рабочая гипотеза.

Заключение

Полученные данные создают основу для понимания субклеточных, молекулярных и субмолекулярных механизмов развития ХНС и открывают путь к раскрытию механизмов падения сократительной активности миофибрилл миокарда при ХНС и механизма генерации силы *sui generis* [5,6]. В основе развития манифестированной острой и ХНС лежат одни и те же явления - нарушение способности актомиозинового ансамбля генерировать силу и гидролизовать АТФ. При этом ведущее значение в обоих случаях имеет изменение физико-химических свойств актина, падение его конформационной подвижности и кооперативности тонкой нити. Генерализация поражения актинового протомера при ХНС ведет к усугублению отмеченных явлений и обростанию новыми - падением экономичности преобразования энергии (в результате разобщения процессов генерации силы и гидролиза АТФ, особенно выраженное в зоне инфаркта миокарда и при ХНС) и признаками поражения миозина - происходит перерастание актиновой гипотезы в актомиозиновую концепцию падения сократительной активности СКБМ [8,13,20].

Таким образом, механизм развития ХНС представляет из себя сложный многоступенчатый процесс лимитирования сократительной и релаксационной деятельности сократительного аппарата кардиомиоцита,

постепенного развития высокоэнтропийного (высокого беспорядка), низкоэнергетического состояния СКБМ и, по-видимому, кардиомиоцита и миокарда в целом. Эти субклеточные и молекулярные нарушения разыгрываются на фоне глубоких ультраструктурных изменений во всех трех системах, ответственных за акт сокращения-расслабления кардиомиоцита. Они играют важную роль в прогрессировании ХНС.

Литература

1. Давыдов А.С. Солитоны в биоэнергетике. // Киев. Наукова думка, 1986. С.158.
2. Карсанов Н.В. Сократительные и саркоплазматические белки миокарда при недостаточности сердца и у практически здоровых людей. / Тбилиси. АН ГССР, 1963. С.157.
3. Карсанов Н.В. Некоторые итоги изучения молекулярной сущности интра- и экстракардиальной дистрофии миокарда. / В сб.: Артериальная гипертензия и недостаточность сердца. Тбилиси, 1971. С.109-110.
4. Карсанов Н.В. О роли системы контрактильных белков сердца и гладкомышечных органов в развитии недостаточности сократительной функции при различных патологических состояниях. / В кн. Вопросы биохимии нервной и мышечной систем. Тбилиси. Мецниереба, 1979. С.76-84.
5. Карсанов Н.В. Биологический двигатель кардиомиоцита - к решению дилеммы: актин или миозин генерирует силу? Актин или миозин повинен в снижении сократительной способности системы контрактильных белков миокарда при недостаточности сердца? // Вопр. биол. мед. фармац. химии. - 1999. - №2. - С.13-16.
6. Карсанов Н.В. Энергия, структура, конформация и недостаточность сердца // Бюлл. экспер. биол. мед. - 1999. - № 8. - С.124-142.
7. Карсанов Н.В., Джинчелашвили Б.Г. Конформационное состояние белков миофибрилл миокарда при недостаточности сердца. // Известия АН ГССР, сер. биол. - 1988. - №2. - С.134-142.
8. Карсанов Н.В., Капанадзе Р.В., Хайндрава Н.В. Механическая активность системы контрактильных белков и энергетическая обеспеченность миокарда при стенозе аорты. // Известия АН ГССР, сер. биол. - 1987. - №13. - С.270-279.
9. Карсанов Н.В., Магалдадзе В.А., Мачарашвили Т.Н. и др. Количественные и качественные нарушения преобразования энергии в системе контрактильных белков кардиомиоцита - узловый процесс в развитии недостаточности сердца. // Вестник АМН СССР. - 1988. - №12. - С.60-68.
10. Карсанов Н.В., Пирцхалаишвили М.П. Полимеризационная способность актина Штрауба при инфаркте миокарда у человека и окклюзии коронарной артерии в эксперименте. // Вопр. мед. химии. - 1985. - №3. - С.53-57.
11. Карсанов Н.В., Сукоян Г.В., Джибгашвили И.К. и др. Субклеточная патофизиология недостаточности сердца, обусловленной токсико-аллергическим миокардитом и действие рефрактерина на внутрисердечную гемодинамику и функциональное состояние трех субклеточных систем, ответственных за акт сокращения-расслабления // Пат. физиол. - 1999. - № 3. - С.3-8.
12. Карсанов Н.В., Сукоян Г.В., Джибгашвили И.К. и др. Положительное действие рефрактерина на резервные возможности и метаболизм миокарда при его перегрузке на фоне токсико-аллергического миокардита. // Пат. физиол. - 1999. - №4. - С.10-16.
13. Карсанов Н.В., Сукоян Г.В., Карсанов В.Н. и др. Действие ряда сердечных гликозидов на изолированную систему контрактильных белков миокарда при недостаточности сердца, обусловленной токсико-аллергическим миокардитом. Молекулярный механизм // Экспер. клин. фармакол. - 1999. - № 4. - С.18-25.
14. Карсанов Н.В., Сукоян Г.В., Татулашвили Д.Р., Гуледани Н.Е. Активная роль актина в генерации системой контрактильных белков миокарда силы и ее снижении при окклюзии коронарной артерии. // Вопр. мед. биол. фарм. химии. - 1999. - № 2. - С.36-40.
15. Карсанов Н.В., Сукоян Г.В., Татулашвили Д.Р. и др. Субмолекулярные механизмы нарушения сократительной функции миокарда при острой экспериментальной коронарной недостаточности. Действие сердечных гликозидов. // Экспер. клин. фармакол. - 1999. - №12. - С.
16. Карсанов Н.В., Сукоян Г.В., Татулашвили Д.Р., Кучава Л.Т. Разобщение хемомеханического сопряжения в сократительном аппарате кардиомиоцита при токсико-аллергическом миокардите. // Пат. физиол. - 1993. - № 3. - С.5-9.
17. Карсанов Н.В., Татулашвили Д.Р., Сукоян Г.В., Кучава Л.Т. Нарушение хемомеханического сопряжения в миофибриллах кардиомиоцита при Л-тироксеном токсикозе и атиреозе // Вопр. мед. химии. 1993. - № 6. - С.42-47.
18. Карсанов Н.В., Татулашвили Д.Р., Сукоян Г.В. и др. Активная роль актина в преобразовании энергии системой контрактильных белков миокарда и его нарушении при окклюзии коронарной артерии. // Вопр. биол. мед. фарм. химии. - 1999. - № 2. - С.40-45.
19. Карсанов Н.В., Хугашвили З.Н., Мамулашвили Л.Д. и др. Механическая активность системы контрактильных белков, энергетическая обеспеченность миокарда и нарушение транспорта кальция при воспалительных поражениях миокарда. // Кардиология. - 1984. - № 1. - С.80-89.
20. Карсанов Н.В., Эристави Д.Д., Джинчелашвили Б.Г. Роль актина и миозина в снижении сократительных свойств миофибрилл миокарда при токсико-аллергическом миокардите. // Известия АН ГССР, сер. биол. - 1981. - № 6. - С.561-568.
21. Китаева А.П., Тедеева З.Д., Карсанов Н.В. Термодинамические параметры плавления и стабилизации структуры G-актина миокарда в норме и при миокардиострофиях. // Бюлл. экспер. биол. мед. - 1999. - № 7. - С.35-38.
22. Китаева А.П., Тедеева З.Д., Карсанов Н.В. Влияние полимеризации на термодинамические параметры плавления и стабилизации структуры F-актина миокарда собаки в норме и при миокардиострофиях. // Бюлл. экспер. биол. мед. - 1999. - №8. - С.182-185.
23. Леднев В.В. Некоторые аспекты регуляции мышечного сокращения. / В кн.: Структурные основы и регуляция биологической подвижности. М., Наука. - 1980. - С.221-270.
24. Подлубная З.А., Цховребова Л., Шпагина Л. и др. Взаимодействие альдолазы с тонкими нитями в составе I-дисков, изолированных из скелетных мышц. // Цитология. - 1985. - № 4. - С.460-464.
25. Самсонидзе Т.Г., Эристави Д.Д., Карсанов Н.В. Структура тонкой нити миокарда при сердечной недостаточности, обусловленной токсико-аллергическим миокардитом. // Бюлл. экспер. биол. мед. - 1999. - №1. - С.101-105.
26. Сукоян Г.В., Татулашвили Д.Р., Карсанов Н.В. Конформационные изменения в актине миокарда при сердечной недостаточ-

- ности, обусловленной токсико-аллергическим миокардитом. // Бюлл. экпер. биол. мед.- 1999.- №4.- С.395-399.
27. Хананашвили М.М., Карсанов Н.В., Сукоян Г.В. и др. Разобщение функционирования центров генерации силы и гидролиза АТФ в миофибриллах миокарда при экспериментальной информационной болезни. // Физиол. ж. им. Сеченова.- 1992.- №12.- С.39-49.
 28. Alpert N.R., Gordon M.S. Myofibrillar adenosine triphosphatase activity in congestive heart failure. // Am. J. Physiol., 1962; 202: 940-946.
 29. Barden J.A., Phillips L. FNMR study of the myosin and tropomyosin binding sites on actin. // Biochem. 1990; 29: 1348-1354.
 30. Clarke F.M., Stephan P., Morton D. Regulation of carbohydrate metabolism. / NY: CRC Press. 1985; 2: 1.
 31. Gottlieb S.S., Rogowski A.C., Weinberg M. et al. Elevated concentrations of endogenous ouabain in patients with congestive heart failure. // Circulation. 1992; 86: 420-425.
 32. Holmes K.C., Popp D., Gebhard W., Kabsch W. Atomic model of the actin filament. // Nature. 1990; 347: 44-49.
 33. Janmey P.A., Hvidt S., Oster G. et al. Effect of ATP on actin filament stiffness. // Nature. 1990; 347: 95-99.
 34. Karsanov N.V., Jinchvelashvili B.G. Conformational state of thin myofilament proteins in normal and chronically heart failure. // Gen. Physiol. Biophys. 1990; 9: 129-146.
 35. Karsanov N.V., Magaldadze V.A., Sukoyan G.V. et al. Energy transformation disturbances in the myocardial contractile protein system: A key process in the development of acute and chronic heart failure // J. Appl. Cardiol. 1990; 5: 467-474.
 36. Karsanov N.V., Nizharadze G.T., Pirtskhalaishvili M.P. et al. Superprecipitation of hybrid actomyosin containing pathological actin from failing hearts of adults and infants // Gen. Physiol. Biophys. 1985; 7: 417-423.
 37. Karsanov N.V., Pirtskhalaishvili M.P., Semerikova V.I., Losaberidze Nsh. Thin myofilaments proteins in normal and heart failure. // Basic Res. Cardiol. 1986; 81: 199-212.
 38. Karsanov N.V., Sukoyan G.V., Tatulashvili D.R. Energy transduction in the myocardial contractile protein system under normal conditions and in toxic-allergic myocarditis. // Biomed. Science. 1991; 4: 344-356.
 39. Katz A.M. Cellular Mechanisms in congestive heart failure. // Am. J. Cardiol. 1988; 62: 3A-8A.
 40. Kelly R.A., Smith T.W. Is ouabain the endogenous digitalis? // Circulation. 1992; 86: 694-696.
 41. Mannherz H.G. Crystallization of actin in complex with actin-binding proteins. // J. Biol. Chem. 1992; 267: 11661-11664.
 42. Mercadier J.J., Hatem S., Schwartz K. Dilated cardiomyopathies: Molecular changes responsible for altered contraction and relaxation. // Heart failure. 1993; 3: 112-120.
 43. Mercadier J.J., Lompre A.M., Due P. Altered sarcoplasmic reticulum Ca-ATPase gene expression in human ventricle during end-stage heart failure. // J. Clin. Invest. 1990; 85: 305-309.
 44. Orlova A.A., Prochniewicz E., Egelman E.E. Structural dynamics of F-actin: II. Cooperativity in structural transitions. // J. Mol. Biol. 1996; 245: 598-607.
 45. Prochniewicz E., Zhang O., Janmey P., Thomas D. Cooperative molecular dynamics in phosphorescent F-actin binding of gelsolin at the barbed end affects the structure of the whole filament. // EMBO MDA Alpbach workshop symposium. 1995.
 46. Saffitz JE, Yamada K.A. Do alterations in intracellular coupling play a role in cardiac contractile dysfunction. // Circulation. 1998; 97: 630-632.
 47. Schaper J., Hein S. The structural correlate of reduced cardiac function in human dilated cardiomyopathy. // Heart Failure. 1993; 9: 95-111.
 48. Schutt C.E., Lindberg U. Actin as the generator of tension during muscle contraction. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1992; 89: 319-323.
 49. Schwyter D.H., Kron S.J., Toyoshima Y.Y., et al. Subtilisin cleavage of actin inhibits in vitro sliding movement of actin filaments over myosin. // J. Cell Biol. 1990; 111: 465-470.
 50. Stopa B., Gorny M., Konilezny L., et al. Supramolecular ligands: monomer structure and protein ligation capability. // Biochemie. 1998; 80: 963-968.
 51. Takashi R., Muhlrad A., Botts J. Spatial relationship between a fast-reacting thiol and a reactive lysine residue of myosin subfragment 1. // Biochemistry. 1982; 21: 5661-5668.

Abstract

The work has been carried out on myocardial bioplates, autopsy and experimental material. In chronic heart failure (CHF) it has been established the sharp decrease of ability of force generation, ATP hydrolysis and economy of energy transduction in myocardial contractile protein (MCPS) at the time of development of energy deficit state and disturbances in Ca-transport system are the key mechanism of CHF development and progression. In contradiction to early and acute HF in CHF myosin-based (as a result of damage of hydrolytic center of myosin head) decrease of intensity of ATP hydrolysis is deposited on the actin-based decrease of value and velocity of generated force and economy of energy transduction in MCPS. The described phenomena in CHF are conditioned on the molecular level by the changes of the structural-conformational state of monomer and protomer of actin and its interaction with myosin heads of thick filament in force generation process. This conclusion has been confirmed in experiments in which are studied the properties of hybrid fibers, reconstructed from failing heart thin filament and normal myosin and vice versa. The actomyosin hypothesis of the mechanism of force generation and energy transduction disturbances in CHF has been suggested. It has been shown that at the submolecular level in actin the distances between Lys61, Tyr69 in subdomain 2 and Cys374 and Cys10 are increased, the conformation mobility of these aminoacidic acids is decreased and microenvironment is changed. These leads to the loosening of outside domain of actin. According to these data together with the data of atomic structure of skeletal muscle actin and 3D reconstruction pattern of cardiac actin from normal and failing heart a hypothetical models for such actins have been reconstructed. The appointed faults have posttranslational character and under the creation of optimal conditions in vitro under the influence of cardiac glycosides (β -acetyldigoxine, β -methyl digoxine and strophanthine K) are able to revert, though they are firm.

Key words: chronic heart failure, cardiomyopathy, infection-allergic myocarditis, ischemic cardiomyopathy, actin, myosin.

Поступила 05/06-2000

* * *