

Никитина Лариса Валерьевна

**ВКЛАД НЕОДНОРОДНОСТИ БЕЛКОВ САРКОМЕРА В  
СОКРАТИТЕЛЬНУЮ ФУНКЦИЮ МИОКАРДА И ЕЕ РЕГУЛЯЦИЮ**

03.03.01 – физиология

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени  
доктора биологических наук

Екатеринбург - 2014

Работа выполнена в лаборатории биологической подвижности Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института иммунологии и физиологии Уральского отделения Российской академии наук

**Научный консультант:**

Доктор биологических наук

Бершицкий  
Сергей Юрьевич

**Официальные оппоненты:**

доктор биологических наук, профессор  
зав. лабораторией структурной биохимии  
белка Института биохимии им. А.Н. Баха РАН

Левицкий  
Дмитрий Иванович

доктор биологических наук,  
зав. лабораторией миологии  
Института медико-биологических проблем РАН

Шенкман  
Борис Стивович

доктор биологических наук,  
в.н.с. Института теоретической и  
экспериментальной биофизики РАН

Вихлянцев  
Иван Милентьевич

**Ведущая организация:** ФГБУ Российский кардиологический научно-производственный комплекс Министерства здравоохранения Российской Федерации (Москва).

Защита состоится « 27 » ноября 2014 года в \_\_\_\_\_ часов на заседании Совета по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук Д 004.027.01 при ФГБУН Института иммунологии и физиологии УрО РАН (620049, г. Екатеринбург, ул. Первомайская, д. 106).

С диссертацией и авторефератом можно ознакомиться в Центральной научной библиотеке УрО РАН (по адресу 620041, г. Екатеринбург, ул. Софьи Ковалевской-Академическая, д. 22/20 на сайте ИИФ УрО РАН: [cranium.uran.ru](http://cranium.uran.ru), на сайте ВАК: [referat\\_vak@obrnadzor.gov.ru](mailto:referat_vak@obrnadzor.gov.ru)).

Автореферат разослан « \_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2014 г.

Ученый секретарь Совета  
Д 004.027.01 при ИИФ УрО РАН,  
д.м.н., проф.

И.А. Тузанкина

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность проблемы.** Известно, что сердце структурно и функционально неоднородный орган, а эффективность его основной, насосной, функции достигается скоординированным взаимодействием сокращающихся клеток – кардиомиоцитов. Это даёт основание считать, что целесообразно организованная неоднородность в сердце является необходимым условием для его нормального функционирования [Мархасин и др. 1999; Solovyova et al., 2006]. Специфические картины неоднородности возникают при патологии сердца [Мархасин и др. 1999; 2009].

В ряде исследований установлено, что неоднородность механических свойств кардиомиоцитов при их взаимодействии влияет на электрофизиологические характеристики, механическую функцию и кальциевую регуляцию сокращений миокарда [Markhasin et al., 2003; Solovyova et al., 2006].

Неоднородность соотношения изоформ сердечного миозина в кардиомиоцитах в трансмуральном направлении в стенке желудочка [Eisenberg et al., 1985; Litten et al., 1985; Carnes et al., 2004; Reiser et al., 2001] является одной из физиологических причин механической неоднородности взаимодействующих кардиомиоцитов. Таким образом, молекулярная неоднородность порождает механическую неоднородность макроуровня. Поэтому для понимания механизмов механической неоднородности сердечной мышцы необходимо изучать неоднородность сократительной структуры кардиомиоцитов на молекулярном уровне.

Моторный белок кардиомиоцита – миозин – представлен в сердце двумя изоформами V1 и V3, различающимися тяжелыми цепями. Изомиозины V1 и V3 являются гомодимерами  $\alpha\alpha$ - и  $\beta\beta$ -тяжелых цепей соответственно [Noh et al., 1977]. Неидентичные аминокислотные остатки изоформ V1 и V3, составляющие 7%, расположены в актин связывающем домене, АТФазном кармане головки миозина и определяют различия в их

гидролитических, кинетических и механических характеристиках [Alpert et al., 2002; Krenz et al., 2007, Sata et al., 1993; Harris et al., 1994; VanBuren et al., 1995; Noguchi et al., 2003; Malmqvist et al., 2004].

Поскольку экспрессия изомиозинов зависит от вида животного, его гормонального статуса [Lompre et al., 1979] и изменения в соотношении изоформ происходят в оттогенезе и при патологиях сердца [van der Velden et al., 1999; Miyata et al., 2000], то вариации в экспрессии изомиозинов могут участвовать в тонкой адаптации сердечной деятельности.

Разные соотношения изомиозинов V1/V3 априори могут вносить вклад в механическую функцию кардиомиоцитов двумя путями:

- напрямую, определяя разную скорость развития напряжения/укорочения [Maughan et al., 1979; Schwartz et al., 1981; Pagani & Julian, 1984];

- опосредованно, через модуляцию регуляторных механизмов активации тонкой нити.

Второй путь реализуется через кооперативное влияние поперечных мостиков (Xb) на кинетику образования/распада кальций-тропониновых комплексов (CaTnC): чем больше поперечных мостиков образовалось вдоль актиновой нити, тем выше сродство тропонина С к кальцию [Gordon et al., 2000]. В литературе этот эффект называется кооперативностью Xb-CaTnC. Кооперативность Xb-CaTnC реализует обратные связи между кинетикой кальций-тропониновых комплексов и кинетикой поперечных мостиков.

Могут ли разные изоформы сердечного миозина существенно модулировать эти обратные связи? Это ключевой вопрос данного исследования и его экспериментальная проверка – одна из центральных задач работы.

Поскольку кооперативность Xb-CaTnC – механизм, лежащий в основе ряда важнейших феноменов биомеханики миокарда, связанных с влиянием механических условий сокращений на его активацию [Izakov et al., 1991; Мархасин и др. 1999], то возможные изменения этой кооперативности в

различных механически взаимодействующих кардиомиоцитах стенки желудочка должны влиять на ход развития напряжения в каждом из них и в стенке в целом. Таким образом, кооперативность Xb-CaTnC может связывать между собой механическую неоднородность миокарда на молекулярном, межклеточном и органном уровнях.

Актин-миозиновое взаимодействие – основа мышечного сокращения. В то же время, в кардиомиоците имеется сложная система структурных и регуляторных белков, которые могут влиять на сократительный акт и его регуляцию. Интенсивное изучение этих белков в последние годы, в частности, тропомиозина и миозин-связывающего белка С, связано с тем, что мутации в генах, кодирующих  $\alpha$ -изоформу тропомиозина и сердечную изоформу миозин-связывающего белка С (сМуВР-С, С-белок) приводят к семейной гипертрофической и к дилатационной кардиомиопатиям [Richard et al., 2003; Rajan et al., 2007; Sheehan et al., 2011]. Возникает вопрос, могут ли изоформы тропомиозина и миозин-связывающий белок С модулировать вклад сердечных изомиозинов в кальциевую регуляцию сокращений через кооперативность Xb-CaTnC? Этот вопрос исследуется в данной работе.

Основной метод наших исследований – метод искусственной подвижной системы. Он позволяет непосредственно изучать взаимодействие регуляторных и сократительных белков на уровне тонкой нити саркомера, что дает возможность избежать сложностей интерпретации результатов, связанных со свойствами целой мышцы, либо кардиомиоцита. В рамках метода искусственной подвижной системы можно задавать различные концентрации свободного кальция, использовать любые регуляторные и структурные белки кардиомиоцита и регистрировать механические характеристики актин-миозинового комплекса.

**Цель работы:** исследовать механизмы влияния изоформ миозина, тропомиозина и сердечного миозин-связывающего белка С на сократительную функцию миокарда и ее кальциевую регуляцию.

### **Задачи исследования**

1. Оценить вклад изоформ сердечного миозина в кальциевую регуляцию актин-миозинового взаимодействия исследуя соотношения « $pCa$ -скорость», « $pCa$ -сила» и «сила-скорость» этих изоформ в искусственной подвижной системе с регулируемым тонким филаментом.
2. Исследовать влияние изоформ тропомиозина на взаимодействие изоформ сердечного миозина с актином.
3. Исследовать влияние комбинаций изоформ тропомиозина и изоформ сердечного миозина на кальциевую регуляцию актин-миозинового взаимодействия.
4. Исследовать модулирующее влияние сердечного миозин-связывающего белка С на взаимодействие сердечного миозина как с актином, так и с регулируемым тонким филаментом.
5. Исследовать специфическое влияние сердечного миозин-связывающего белка С на кальциевую регуляцию актин-миозинового взаимодействия в зависимости от изоформ сердечного миозина.
6. Оценить роль кооперативного влияния поперечных мостиков на сродство кальций-тропомиозиновых комплексов в качестве ключевого молекулярного механизма, реализующего вклад неоднородности сердечного миозина в кальциевую регуляцию сокращений миокарда.

### **Научная новизна**

Впервые на уровне взаимодействующих белков систематически исследовано модулирующее влияние изоформ сердечного миозина на регуляторные механизмы активации тонкой нити. С помощью метода искусственной подвижной системы показано, что тот вклад в сократительную функцию миокарда, который осуществляется изоформами сердечного миозина через кооперативное влияние сильносвязанных поперечных мостиков на кинетику кальций-тропомиозиновых комплексов, различен.

Впервые исследовано модулирующее влияние изоформ тропомиозина

как на актин-миозиновое взаимодействие, так и на его регуляцию в сердечной мышце. Показано наличие обоюдного влияния изоформ миозина и тропомиозина на актин-миозиновое взаимодействие, а также различное модулирующее воздействие изоформ тропомиозина на выраженность Хв-СаТnС кооперативности с разными изоформами сердечного миозина.

Впервые методом искусственной подвижной системы с регулируемым тонким филаментом исследовано влияние сердечного миозин-связывающего белка С на зависимость « $p$ Са-скорость» для сердечного миозина кролика и его изоформ. Показано, что С-белок, выступая как регулятор взаимодействия миозина с актином, по-разному воздействует как на кинетические характеристики изоформ сердечного миозина V1 и V3, так и на влияние поперечных мостиков, образованных этими изоформами, на сродство тропонина С к кальцию через механизм Хв-СаТnС кооперативности.

### **Научная и практическая значимость**

Полученные данные свидетельствуют в пользу предложенной автором концепции о вкладе изоформ сердечного миозина в процессы кальциевой активации тонкой нити при сокращении сердечной мышцы. С помощью метода искусственной подвижной системы показано, что влияние изоформ сердечного миозина с разным содержанием тяжелых цепей на сократительную функцию миокарда через механизм Хв-СаТnС кооперативности различно. Это может являться одной из ключевых причин вклада механической неоднородности в сократительную функцию миокарда и ее регуляцию.

Модулирующее влияние изоформ тропомиозина и сердечного миозин-связывающего белка С на процессы кальциевой регуляции актин-миозинового взаимодействия в миокарде определяется составом тяжелых цепей изоформ сердечного миозина.

Эти новые данные необходимы для понимания работы сердечной мышцы в норме и ее нарушениях при патологиях сердца, приводящих к изменению состава тяжелых цепей миозина (сахарный диабет, гипер- и

гипотиреоз и др.), а также при патологиях, связанных с мутациями в тропомиозине и сердечном миозин-связывающем белке С.

### **Положения, выносимые на защиту**

1. Анализ зависимостей « $pCa$ -скорость», « $pCa$ -сила» и «сила-скорость» изоформ сердечного миозина в искусственной подвижной системе показал, что кооперативная зависимость кинетики кальций-тропомиозиновых комплексов различается для изоформ сердечного миозина V1 и V3.

2. Выявлено обоюдное влияние изоформ сердечного миозина и изоформ тропомиозина на актин-миозиновое взаимодействие. Показано, что различие модулирующего воздействия изоформ тропомиозина на выраженность  $Xb-CaTnC$  кооперативности с разными изоформами сердечного миозина может являться способом тонкой адаптации сердечной деятельности в онтогенезе и при патологии.

3. Полученные на подвижных системах *in vitro* результаты подтверждают регуляторную роль сердечного миозин-связывающего белка С, которая может проявляться в замедлении С-белком кинетики поперечных мостиков сердечного миозина при связи С-белка с актином, и показывают, что С-белок специфически влияет на кальциевую чувствительность и коэффициент Хилла связи « $pCa$ -скорость» в зависимости от изоформ сердечного миозина V1 и V3, т.е. вносит свой вклад в реализацию кооперативности  $Xb-CaTnC$  в сердечной мышце.

**Внедрение результатов исследования.** Материалы диссертации вошли в учебные программы для студентов ГБОУ ВПО Уральского государственного медицинского университета, ФГАОУ ВПО Уральского федерального университета имени первого Президента России Б.Н. Ельцина, используются в научных исследованиях при построении математических моделей регуляции сократительной функции миокарда в лаборатории математической физиологии ФГБУН Института иммунологии и физиологии УрО РАН.

### **Апробация результатов диссертационной работы:**

Результаты работы были представлены на международных конференциях «Biological motility: Basic research and practice» (г. Пущино, 2006 г.); «Biological motility: Achievements and Perspectives» (г. Пущино, 2008 г.); «Biological motility: from Fundamental Achievements to Nanotechnologies» (г. Пущино, 2010 г.); «Biological motility: Fundamental and Applied Science» (г. Пущино, 2012 г.), «Biological motility: New facts and hypotheses» (г. Пущино, 2014 г.), Joint British-Russian Young Scientists Workshop (Екатеринбург, 2007 г.), на Международном форуме по нанотехнологиям (г. Москва, 2008 г.); на XXXIV, XXXVI и XXXXII «European Muscle Conference» (г. Дебрецен, Венгрия, 2005 г.; г. Стокгольм, Швеция, 2007 г.; г. Амстердам, Нидерланды 2013).

### **Публикации**

Материалы диссертации опубликованы в 40 работах, в том числе 22 – в журналах, рекомендованных ВАК для опубликования результатов диссертации на соискание ученой степени доктора наук, в соавторстве издана монография.

### **Личный вклад автора в работу**

Автор была организатором и ключевым исполнителем всех этапов исследования. Автором проведен анализ материала, представленного в диссертации и сформулированы выводы.

### **Объем и структура работы**

Диссертация состоит из введения, пяти глав, заключения, выводов и списка цитируемой литературы (301 источник, из них 13 отечественных и 288 зарубежных). Диссертация изложена на 209 страницах, содержит 37 рисунков и 3 таблицы.

Работа была выполнена в лаборатории биологической подвижности Института иммунологии и физиологии УрО РАН при поддержке грантов РФФИ, РФФИ-Урал, Программ фундаментальных исследований Президиума УрО РАН, гранта Президента РФ для государственной поддержки ведущей

школы РФ, грантов ННМИ и ИНТАС. Исследования на оптической ловушке выполнялись в рамках сотрудничества в отделе физической биохимии Национального института медицинских исследований (NIMR MRC, London).

## Содержание работы

### Материал и методы исследования

**Получение белков.** Актин выделяли из *m. latissimus dorsi* кролика калифорнийской породы по стандартной методике [Pardee и Spudich, 1982]. Сердечные тропомиозин и тропонин выделяли из миокарда левого желудочка сердца быка и кролика методами Smille (1982) и Potter (1982) с небольшими модификациями.

Изоформа V1 миозина была получена из миокарда левого желудочка гипертиреоидных, изоформа V3 – гипотиреоидных кроликов. Гипертиреоидизм достигался внутримышечной инъекцией L-тироксина (0,2 мг/кг; Sigma) 2-х месячным кроликам весом 1,5 кг в течение двух недель, гипотиреоидизм – добавлением пропилтиоурацила (0,8 мг/мл; Sigma) в питьевую воду кроликам в течение трех недель [Litten et al., 1985, VanBuren et al., 1995]. Миозин выделяли из левого желудочка сердца кролика по стандартной методике [Margossian & Lowey, 1982] с небольшими модификациями. Состав тяжелых цепей сердечного миозина проверялся методом ПААГ-электрофореза [van der Velden et al., 1999]. В день эксперимента неработающие молекулы миозина удаляли ультрацентрифугированием с F-актином и АТФ [Gordon et al., 1997].

Сердечный миозин-связывающий белок С был получен из куриных сердец по методу Hartzell и Glass, (1984) с небольшими модификациями.

**Растворы.** Состав буфера АВ: 25 мМ КСl, 25 мМ имидазола, 4 мМ MgCl<sub>2</sub>, 1 мМ ЭГТА и 10 мМ дитиотриэтола, рН 7,5.

**Реконструкция регулируемого тонкого филамента.** Регулируемую тонкую нить, состоящую из актина, тропонина и тропомиозина, реконструировали путем смешивания этих белков в следующих концентрациях: 400 нМ ТМРФ-F-актина, 80 нМ тропонина и 100 нМ тропомиозина при 4 °С в буфере АВ. Соотношение белков

в тонких нитях проверяли с помощью ПААГ-электрофореза [Laemmli, 1970].

**Измерение АТФазной активности.** Актин-активируемая  $Mg^{2+}$ -АТФазная активность миозина измерялась колориметрическим методом по свободному неорганическому фосфату [Kodama et al., 1986] при 28 °С в буфере АВ, содержащем 0,05 мкМ миозина, от 10 до 30 мкМ F-актина и 1 мМ АТФ. Основные параметры кинетики Михаэлиса-Ментен определялись с помощью графика Лайнуивера-Бэрка.

**Метод оптической ловушки** использовался для определения механических и кинетических характеристик взаимодействия *одиночных* молекул изоформ сердечного миозина с актином. Суть метода оптической ловушки в следующем. Луч лазера, сфокусированный высокоапертурным объективом, способен захватывать и удерживать в фокусе микроскопические объекты, образуя «оптическую ловушку» (английские термины: *optical trap* или *optical tweezers*) [Ashkin et al., 1987; Finer et al., 1994]. На основе этого явления была создана установка для исследования механических характеристик одиночных молекул миозина [Molloy et al., 1995]. В наших экспериментах лазерная оптическая ловушка использовалась для удержания в растворе двух полистироловых шариков диаметром 1 мкм, покрытых NEM-миозином, который служит «клеем», необратимо связывая филаментарный актин. Флуоресцентно окрашенная актиновая нить крепилась к этим шарикам и растягивалась между ними смещением одного из лучей с помощью двухкоординатного акусто-оптического дефлектора. К поверхности проточной камеры прикреплялись стеклянные шарики большего диаметра (1,7 мкм), которые использовались как пьедестал для миозина, свойства которого мы изучаем. Актиновая нить с помощью микроманипулятора подводилась к пьедесталу с моторным белком, где в присутствии АТФ происходило актин-миозиновое взаимодействие. По смещению положения шариков, регистрируемого квадрантными фотодиодами, записывали одиночные взаимодействия молекулы миозина с актиновой нитью, или «события», сопровождающиеся отклонением шариков

из фокуса луча. Из статистического распределения величин событий в зависимости от используемого режима работы ловушки, то есть с обратной связью или без неё, определяли, соответственно, либо среднюю силу, либо размер шага одиночных молекул миозина, а также продолжительность их взаимодействия.

Для установки оптической ловушки использовался инвертированный микроскоп (Axiovert 135; Zeiss, Germany). Луч инфракрасного лазера с диодной накачкой Nd:YAG (Adlas Model 321, Germany; длина волны 1064 nm) объединяется с прошедшим через узкополосный фильтр (EF 5 546FS10.25; Andover Corp., Salem, NH) излучением ртутной лампы, возбуждающим флуоресценцию родамина, с помощью «горячего зеркала» (DM 5 820DCSP; Omega Optical, Brattleboro, VT). Двойное дихроическое зеркало (DDM 5 570DCLP, Omega) позволяет одновременно использовать оптическую ловушку и наблюдать родаминовую флуоресценцию. Положение ловушки контролируется двумя ортогонально расположенными акусто-оптическими дефлекторами (AODs) (TeO<sub>2</sub> кристаллы N45035-3-6.5 DEG-1,06; драйвер N64010–1002ASDFS-2; NEOS Technologies). Высокоскоростные измерения положения ловушек осуществлялись четырехквadrантными фотодиодными детекторами (2 x 4QD 5 S1557, Hamamatsu Photonics, Japan). Флуоресценция актина регистрировалась интенсифицированной CCD камерой (Photon-P46036A; EEV, Chelmsford, UK). Светлопольное освещение (100 W галогеновая лампа) использовалось для получения увеличенного изображения шариков ловушки и шариков на покровном стекле (CCD camera, P46310; EEV) [Molloy et al., 1995].

***Метод искусственной подвижной системы (in vitro motility assay).*** Если метод оптической ловушки позволяет оценить механические и кинетические характеристики *одиночных* молекул моторных белков, то в методе искусственной подвижной системы можно исследовать функциональные характеристики ансамбля молекул [Gordon et al., 2000; Janson et al., 1992; Bing et al., 2002; Noguchi et al., 2003]. Суть метода искусственной подвижной

системы заключается в следующем. Исследуемый моторный белок (в нашем случае - миозин) фиксируется на внутренней поверхности проточной камеры, покрытой нитроцеллюлозой, после чего в камеру заливается раствор без АТФ, содержащий F-актин, окрашенный родамин-фаллоидином. Актин взаимодействует с молекулами миозина, образуя ригорный комплекс. С помощью установки, состоящей из инвертированного флуоресцентного микроскопа с интенсифицированной видеокамерой, контролируемой компьютерной программой, можно видеть филаментарный актин в виде светящихся нитей на поверхности ячейки. При добавлении в камеру раствора с АТФ, актин начинает двигаться по поверхности, покрытой исследуемым миозином. Метод позволяет оценить скорость скольжения F-актина и относительную силу, развиваемую поперечными мостиками исследуемого миозина. Силу можно измерять либо с помощью стеклянной микроиглы, прикрепленной с помощью NEM-миозина к флуоресцентно-окрашенному актиновому филаменту [Kishino, Yanagida, 1988], либо с использованием актин-связывающих белков альфа-актинина или филамина [Janson et al., 1992; Bing et al., 2002; Noguchi et al., 2003].

Для установки был использован инвертированный флуоресцентный микроскоп (Axiovert 200 M, Carl Zeiss MicroImaging GmbH), укомплектованный ртутной лампой HBO 100, набором фильтров для тетраметилродамина (ТРМФ) и масляно-имерсионным объективом Alpha Plan-Fluar 100×1,45 (Carl Zeiss MicroImaging GmbH). Изображение меченого актина регистрировалось с помощью EMCCD видеокамеры (Andor Technology) и записывалось на жесткий диск компьютера с помощью программы GMimPro [Mashanov et al., 2007].

Проточная камера состояла из предметного и покровного стекол с ~50 мкм зазором между ними, внутренняя поверхность покровного стекла была покрыта нитроцеллюлозой. В проточную камеру на 2 мин загружали 50 мкл сердечного миозина в высокоионном буфере АВ содержащем 500 мМ КСl, затем промывали последовательно высоко- и низкоионным буфером АВ и

добавляли 50 мкл БСА в концентрации 0,5 мг/мл на 1 мин. Далее загружали 500 мкг/мл F-актина в буфере АВ с 2 мМ АТФ на 5 мин для блокировки неработающих миозиновых головок; после чего камеру трижды промывали буфером АВ. Далее добавляли 50 мкл раствора флуоресцентно меченых F-актина или тонких регулируемых филаментов в концентрации 10 нМ в буфере АВ, содержащем 100 нМ тропонин и 100 нМ тропомиозин, и инкубировали 10 мин. Затем промывали камеру буфером АВ с 0,5 мг/мл БСА, 3,5 мг/мл глюкозы, 0,02 мг/мл каталазы, 0,15 мг/мл глюкозо-оксидазы, 20 мМ ДТТ, 2 мМ АТФ и 0,5 % метиллцеллюлозы. В случае экспериментов с регулируемым тонким филаментом раствор с АТФ содержал дополнительно 100 нМ тропонина и 100 нМ тропомиозина для предотвращения диссоциации регуляторных белков от актина. Необходимая концентрация свободного кальция в растворе достигалась добавлением  $\text{Ca}^{2+}$ -ЭГТА. Все эксперименты выполнялись при температуре 28 °С.

***Построение зависимости «pCa-скорость».*** Для построения зависимости «pCa-скорость» были определены скорости скольжения регулируемого тонкого филамента по изоформам сердечного миозина при концентрациях кальция в растворе проточной камеры от pCa 4 до pCa 8. Скорость скольжения филаментов определяли с помощью компьютерной программы GMimPro [Mashanov et al., 2007]. Кривая зависимости «pCa-скорость» была построена согласно уравнению Хилла методом наименьших квадратов:

$$V = V_{\max}(1 + 10^{h(p\text{Ca} - p\text{Ca}_{50})})^{-1}$$
, где pCa – отрицательный десятичный логарифм концентрации кальция в растворе; V и  $V_{\max}$  – скорость при данном значении pCa и максимальная скорость при насыщающей концентрации кальция, соответственно;  $p\text{Ca}_{50}$  – величина, при которой достигается половина максимальной скорости скольжения филаментов (кальциевая чувствительность), h – коэффициент кооперативности Хилла.

***Построение зависимости «pCa-сила».*** Для построения связи «pCa-сила» в качестве характеристики силы использовалась минимальная концентрация  $\alpha$ -актина, останавливающая движение филаментов при данной концентрации кальция, отнесенная к концентрации  $\alpha$ -актина,

требуемой для остановки движения при насыщающей концентрации кальция. Кривая зависимости « $pCa$ -сила» была построена согласно уравнению Хилла методом наименьших квадратов:

$F = 1/[1+10^{(h(pCa_{50}-pCa))}]$ , где:  $F$  – безразмерная сила, выраженная в долях к  $F_{max}$ ,  $h$  – коэффициент кооперативности Хилла,  $pCa_{50}$  – величина, при которой достигается сила, равная половине максимальной силы. Эксперименты были сделаны при двух концентрациях миозина, загружаемого в проточную камеру: 200 и 300 мкг/мл. Концентрация миозина 300 мкг/мл – насыщающая.

**Построение связи «сила-скорость».** Для построения зависимости «сила–скорость» определяли скорость скольжения регулируемых филаментов при различных концентрациях  $\alpha$ -актина в проточной камере. Эксперименты были проведены при насыщающей ( $pCa$  6,5) и ненасыщающей ( $pCa$  7,0) концентрациях кальция в буфере, содержащем АТФ.

Механическая нагрузка выражалась как отношение концентрации  $\alpha$ -актина, загружаемого в камеру, к максимальному значению концентрации  $\alpha$ -актина (соответствующему изометрическому состоянию). Теоретическая кривая зависимости «сила–скорость» аппроксимировалось с помощью гиперболического уравнения Хилла:  $(F/F_0+a) \cdot V=b \cdot (1-F/F_0)$ , где  $V$  – скорость скольжения регулируемого филамента при данной нагрузке,  $F$  и  $F_0$  – значение нагрузки и максимальное значение нагрузки соответственно,  $a$  – константа силы,  $b$  – константа скорости. Значения констант  $a$  и  $b$  были определены методом линеаризации гиперболического уравнения Хилла [Altringham & Johnston, 1982; Lännergren, 1978].

**Статистическая обработка.** Эксперименты по определению АТФазной активности миозина проводились трижды. Значения  $K_m$  и  $V_{max}$  представлены как среднее значение  $\pm$  стандартное отклонение.

Для построения зависимости « $pCa$ -скорость» бралась скорость, усредненная не менее, чем по 100 филаментам для каждого значения  $pCa$ . При определении зависимости «сила–скорость» были усреднены скорости скольжения не менее, чем 100 филаментов при каждой концентрации  $\alpha$ -

актинина. Значения скоростей, силы и мощности представлены как среднее значение  $\pm$  стандартное отклонение.

Эксперименты по определению зависимостей « $pCa$ -скорость» и « $pCa$ -сила» были проведены трижды. Значения коэффициента Хилла и  $pCa_{50}$  этих зависимостей были найдены в каждом эксперименте и затем усреднены. Значения скоростей, сил, коэффициентов Хилла и  $pCa_{50}$  представлены как среднее значение  $\pm$  стандартное отклонение.

Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью компьютерной программы «Microsoft Excel» и «Статистика 6.0», для оценки значимости различий использовался непараметрический критерий Манна-Уитни.

### **Результаты и обсуждение**

Среди внутриклеточных механизмов, позволяющих сердечной мышце приспосабливаться к изменяющимся механическим условиям, в которых происходит ее сокращение, особое внимание в современных исследованиях уделяется механизмам, реализующим вклад механических факторов в кальциевую регуляцию тонких нитей саркомеров.

Эти механизмы являются предметом исследований данной работы. Наиболее важные среди них – механизмы кооперативности, модулирующие взаимодействие регуляторных и сократительных белков в кардиомиоцитах.

Ключевая роль, по мнению ряда исследователей, принадлежит двум механизмам кооперативности [Grabarek *ea*, 1983; Gordon *ea*, 2001; Wang & Kerrick, 2002; Turtle *ea*, 2011]:

- сродство тропонина С к кальцию вдоль актиновых нитей саркомеров тем выше, чем больше миозиновых поперечных мостиков образовалось на этих нитях (кооперативность Xb-CaTnC);

- сродство тропонина С к кальцию вдоль актиновых нитей саркомеров тем выше, чем больше образовалось самих кальций-тропониновых комплексов вдоль этих нитей (кооперативность CaTnC- CaTnC).

Как подчеркивают Gordon с соавторами [Gordon *ea*, 2001], эти два

механизма вносят значительный вклад в регуляцию сократительной активности сердечной мышцы. В частности, предполагается, что эти механизмы лежат в основе влияния механических условий сокращений миокарда на активацию/инактивацию его сократительной функции [Godt & Maughan, 1981; McDonald & Moss, 1995; Fuchs & Wang, 1996; Smith & Fuchs, 2002; Moss ea, 2004; Fuchs & Martyn, 2005]. А именно, увеличение расстояния между актиновыми и миозиновыми нитями в ходе укорочения мышцы (саркомеров) уменьшает вероятность образования поперечных мостиков, что через кооперативность Xb-CaTnC уменьшает концентрацию кальций-тропониновых комплексов, в то время как кооперативность CaTnC-CaTnC усиливает этот эффект. Т.е. происходит инактивация сердечной мышцы. Наоборот, увеличение длины мышцы способствует ее активации.

В рамках математической модели сократительной активности миокарда было установлено, что именно эта цепочка внутриклеточных событий определяет широкий спектр экспериментально установленных механо-механических, механокальциевых и механоэлектрических *обратных* связей в ходе циклов «сокращение-расслабление» миокарда [Izakov et al., 1991; Solovyova et al., 2006]. Как показал анализ модели, именно данная цепочка событий является причиной таких фундаментальных эффектов, характерных для сердечной мышцы, как ее грузозависимое расслабление и инактивация в ответ на ее кратковременные деформации в ходе изометрического цикла «сокращение-расслабление». В модели показано, что эта же цепочка событий ответственна за тесно связанные с данными эффектами механозависимые различия во временном ходе изменения концентрации кальция в цитозоле («кальциевых переходах») и длительностях потенциалов действия, обнаруженные в классических экспериментальных исследованиях на папиллярных мышцах и трабекулах около тридцати лет назад [Allen & Kurihara, 1982; Lab, 1982; Lab ea, 1984] и впоследствии многократно подтвержденные в других работах [Vahl ea, 1998; Ishikava ea, 1999; Wakayama ea, 2001; Lamberts ea, 2002; Luers ea, 2005; Monasky ea, 2008; ter

Keurs H.E.D.G, 2011], в том числе и на изолированных клеточных препаратах [Ruwhof ea, 2001; Yasuda ea, 2003].

Таким образом, сформировалось и подкреплено большим количеством экспериментальных и теоретических работ представление о значительном вкладе указанных механизмов кооперативности в регуляцию сократительного цикла сердечной мышцы и в ритмоинотропные явления в нормальных и патологических условиях. Причем, кооперативность выступает во всех этих случаях как ключевой механизм, обеспечивающий механозависимость кальциевой регуляции циклов «сокращение-расслабление» миокарда.

Поскольку кооперативность Xb-CaTnC, с одной стороны, связывает обратными связями сократительные и регуляторные белки миокарда в процессе активации тонкой нити, а с другой, существующие в сердце млекопитающих две изоформы миозина обладают разными гидролитическими, кинетическими и механическими характеристиками, то встает закономерный вопрос о возможной модуляции разными изоформами миозина регуляторных механизмов активации тонкой нити через данный тип кооперативности.

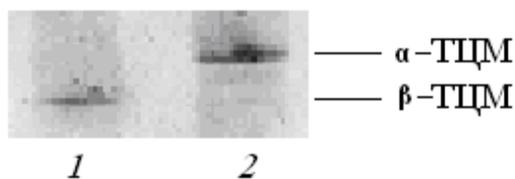
Поскольку кооперативность Xb-CaTnC – это механизм, лежащий в основе ряда важнейших феноменов биомеханики сердечной мышцы, связанных с влиянием механических условий сокращений на ее активацию [Izakov et al., 1991; Мархасин и др. 1999], то возможные изменения этой кооперативности в различных механически взаимодействующих между собой кардиомиоцитах стенки желудочка должны модулировать ход развития напряжения в каждом из них и в стенке в целом. Это могло бы пролить свет на определенные аспекты неоднородности миокарда на тканевом уровне, а именно, на механическое взаимодействие кардиомиоцитов из различных сегментов желудочка, расположенных в направлении распространения волны возбуждения в сердце. Т.к. соотношение V1 и V3 изоформ сердечных изомиозинов различается в таких

кардиомиоцитах, то это через количественные различия Xb-CaTnC кооперативности может привести к различиям в механокальциевых обратных связях этих миоцитов и сложным механическим динамическим взаимодействиям между ними. Поэтому при взаимодействии кардиомиоциты будут перетягивать друг друга, сложным образом меняя длины друг друга. Изменения длины через изменение межфиламентарных расстояний (механизм «lattice spacing» [Irving et al., 2000]) могут влиять на концентрацию присоединившихся мостиков, что, в свою очередь, модулирует кальциевую регуляцию сокращений сердечной мышцы. Таким образом, кооперативность Xb-CaTnC может связывать между собой механическую неоднородность миокарда на молекулярном, межклеточном и органном уровнях.

Одна из центральных задач данной работы - проверка гипотезы о модуляции разными изоформами сердечного миозина обратных связей между кинетикой кальций-тропониновых комплексов и кинетикой поперечных мостиков через механизм кооперативности Xb-CaTnC.

Для решения этой задачи оценивались функциональные характеристики изоформ сердечного миозина V1 и V3, которые, согласно общепринятой методике были получены при медикаментозной обработке животных [Litten et al., 1985, VanBuren et al., 1995].

Состав тяжелых цепей изоформ сердечного миозина, выделенного из левых желудочков кроликов, определяли методом полиакриламидного гель-электрофореза с додецил сульфатом натрия [van der Velden et al., 1999] (рисунок 1). Миокард левого желудочка гипертиреоидных кроликов содержал преимущественно изоформу миозина V1 (~90%), гипотиреоидных – V3 (~90%).



**Рисунок 1** – Денатурирующий полиакриламидный гель-электрофорез изоформ тяжелых цепей миозина из желудочков кроликов, обработанных пропилтиоурацилом (дорожка 1) и L-тироксидом (дорожка 2).

Сравнение функциональных характеристик изоформ сердечного миозина V1 и V3 кролика мы проводили методами оптической ловушки и искусственной подвижной системы.

С помощью метода оптической ловушки нами было обнаружено, что средняя величина одиночного перемещения нитей актина при концентрациях АТФ 1.5 и 5 мкМ была незначительно меньше для изоформы V1, при концентрации АТФ 10 мкМ не различалась. Длительность одиночного перемещения нитей актина при всех концентрация АТФ была больше для изомиозина V3, что может указывать на более медленное циклирование поперечных мостиков изомиозина V3 [Nikitina et al., 2005].

Нами было выявлено, что скорость скольжения и F-актина, и регулируемой тонкой нити по изоформе V1 в 1,7 раза больше, чем по V3 [Никитина и др., 2008а]. Сила, развиваемая поперечными мостиками изоформы сердечного миозина V3 кролика в 2 раза больше, чем V1 [Никитина и др., 2008б].

Таким образом, по нашим данным, изомиозин V1 кролика более быстрый, но обладающий меньшей силогенерирующей способностью молекулярный мотор, чем V3.

Появление методов оптической ловушки и искусственной подвижной системы позволяет исследовать непосредственно взаимодействие регуляторных и сократительных белков на уровне тонкого филамента кардиомиоцита. Метод искусственной подвижной системы с реконструированным тонким филаментом, в котором вместо филаментарного актина используется тонкий филамент, состоящий из актина, тропомиозина и тропонинового комплекса, позволяет изучать актин-миозиновое взаимодействие в условиях кальциевой активации. В рамках этого метода можно задавать различные концентрации свободного кальция и регистрировать связи « $pCa$ -скорость», « $pCa$ -сила», «сила-скорость» на уровне взаимодействующих белков. Метод позволяет оценивать такие характеристики кальциевой активации тонкого филамента, как коэффициент

кооперативности Хилла и кальциевую чувствительность для связей «*pCa*-скорость», «*pCa*-сила».

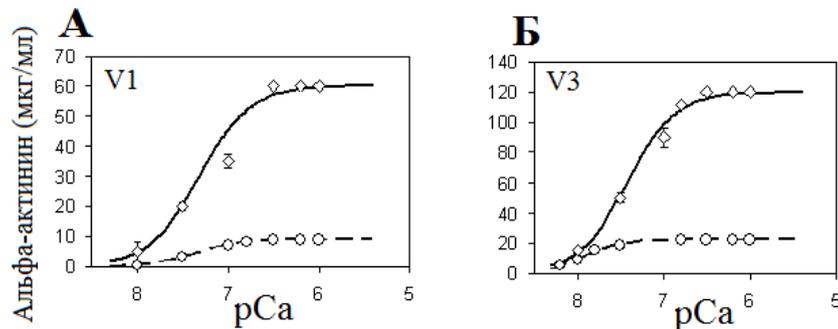
Мы сознаем ограничения метода искусственных подвижных систем. Создавая *in vitro* систему, состоящую только из ключевых взаимодействующих звеньев сократительного и кальций-регуляторного аппаратов мышцы, мы можем потерять существенные модуляторы связи между этими элементами, имеющиеся в сердечной клетке *in vivo*. Однако метод искусственных подвижных систем открыт для подключения к нему других белков саркомера и изучения их вклада в актин-миозиновое взаимодействие и его регуляцию. Причем, в такой системе этот вклад может изучаться сфокусировано, исключая иные факторы, существующие в кардиомиоците. В частности, именно такое исследование было проведено нами с включением в искусственную подвижную систему миозин-связывающего белка С и анализом его модулирующей роли в регуляции сокращений. Аналогичные исследования могут быть проведены и с другими белками.

С помощью метода искусственной подвижной системы с регулируемым тонким филаментом мы исследовали вклад изоформ сердечного миозина в активацию тонкого филамента.

Регистрация кривой «*pCa*-сила» – один из основных экспериментальных методов исследования механизмов кооперативности в мышцах. Связь «*pCa*-сила» традиционно регистрируется на скинированных мышечных волокнах [Edman et al., 1972; Bottinelli et al., 1991] или кардиомиоцитах [Metzger et al., 1999; Herron et al., 2001].

В экспериментах на искусственной подвижной системе с регулируемым тонким филаментом с использованием актин-связывающего белка  $\alpha$ -актинина нами были получены зависимости «*pCa*-[ $\alpha$ -актинин]» для двух концентраций загружаемых в проточную камеру изомиозинов V1 и V3 [Никитина и др., 2008а]. В качестве характеристики силы использовалась минимальная концентрация  $\alpha$ -актинина, останавливающая движение

филаментов при данной концентрации кальция. Кривые « $pCa$ – $[\alpha$ -актинин]» для V1 и V3 при концентрациях миозина, равных 200 и 300 мкг/мл, представлены на рисунке 2.



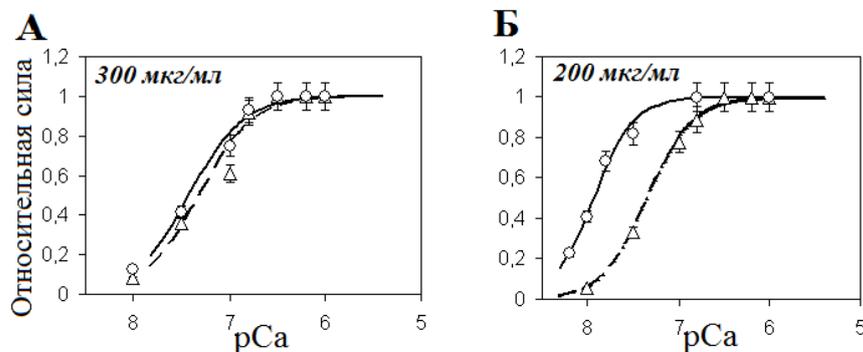
**Рисунок 2** – Кривые зависимости концентрации  $\alpha$ -актинина, останавливающей движение филаментов, от концентрации свободного кальция, полученные в экспериментах на искусственной подвижной системе для изоформ сердечного миозина V1 и V3.

*Примечание: (А) – кривые для V1 при концентрациях миозина на поверхности проточной камеры 300 (сплошная линия) и 200 мкг/мл (пунктирная линия). (Б) – такие же кривые для изомиозина V3. Кругами обозначена концентрация  $\alpha$ -актинина, требуемая для остановки движения филаментов, при концентрации изомиозинов 200 мкг/мл, ромбами – при концентрации изомиозинов 300 мкг/мл. Концентрация  $\alpha$ -актинина представлена как среднее значение  $\pm$  стандартное отклонение по трем экспериментам. Линия регрессии соответствует уравнению Хилла.*

Из рисунка видно, что кривые « $pCa$ – $\alpha$ -актинин» имеют форму сигмоиды. При насыщающей концентрации кальция в растворе количество  $\alpha$ -актинина, полностью останавливающее движение всех тонких нитей, в 6 раз выше для концентрации 300 мкг/мл, чем для концентрации 200 мкг/мл для обоих типов изомиозинов. Примечательно и то, что количество  $\alpha$ -актинина, полностью останавливающее движение филаментов, для обеих концентраций в 2 раза выше для изомиозина V3 по отношению к изомиозину V1.

Нормированные кривые « $pCa$ -сила» представлены на рисунке 3. В качестве характеристики силы использовалась минимальная концентрация  $\alpha$ -актинина, останавливающая движение филаментов при данной концентрации кальция, отнесенная к концентрации  $\alpha$ -актинина, требуемой для остановки движения при насыщающей концентрации кальция. Коэффициенты кооперативности Хилла кривых « $pCa$ -сила» изомиозина V1 при концентрациях 200 и 300 мкг/мл, составили  $1,76 \pm 0,01$  и  $1,56 \pm 0,01$

соответственно. Для изомиозина V3 при концентрациях 200 и 300 мкг/мл коэффициенты Хилла равны  $2,00 \pm 0,01$  и  $1,54 \pm 0,01$ , соответственно. Можно видеть, что с понижением концентрации белка коэффициент кооперативности возрастает.



**Рисунок 3** – Кривые зависимости относительной силы от концентрации свободного кальция для V1 (пунктирная линия) и V3 (сплошная линия) при одинаковых концентрациях миозина на поверхности проточной камеры.

*Примечание: (А) - при концентрации миозина 300 мкг/мл, (Б) - 200 мкг/мл. Треугольниками обозначены значения относительной силы для изомиозина V1, кружками – для изомиозина V3. Линия регрессии соответствует уравнению Хилла.*

При сравнении характеристик связей «pCa-сила» изоформ сердечного миозина V1 и V3 при разных концентрациях миозина оказалось, что расхождения в коэффициентах Хилла и кальциевой чувствительности для разных изомиозинов были при меньшей концентрации белка. Также выяснилось, что для каждого изофермента с понижением концентрации миозина коэффициент кооперативности возрастает. Эти данные являются новыми. В единственной опубликованной ранее работе, в которой оценивалось отношение «pCa-сила» для изомиозинов V1 и V3 [Noguchi et al., 2003], авторы приводят данные только для одной концентрации миозинов. В опубликованном протоколе эксперимента они даже не указывают, какова именно эта концентрация, что свидетельствует о том, что они вообще не рассматривают концентрацию миозина в качестве фактора, способного влиять на наклон кривой зависимости «pCa-сила» и на кальциевую чувствительность.

Обнаруженное влияние концентраций изомиозинов на характеристики связи « $pCa$ -сила» возможно объясняется двумя следующими противоположно направленными тенденциями, обусловленными понижением концентрации миозина.

1. С одной стороны, уменьшение концентрации миозина само по себе (без учета кооперативности) требовало бы меньшей концентрации кальция для прикрепления всех имеющихся миозиновых головок, т.е. уменьшало бы насыщающую концентрацию кальция, необходимую для обеспечения силы, максимально возможной при данном количестве миозина. Это способствовало бы повороту сигмoиды « $pCa$ -сила» против часовой стрелки;

2. С другой стороны, уменьшение концентрации миозина снижает кооперативное влияние поперечных мостиков на сродство  $Ca$  к  $TnC$ , а значит, в конечном итоге, и на сродство актина к миозину. Этот фактор способствует повороту сигмoиды по часовой стрелке.

Если наблюдаемый суммарный эффект уменьшения концентрации миозина выражается в повороте кривой против часовой стрелки, значит преобладает первая тенденция. Если суммарный эффект состоит в повороте по часовой стрелке, значит преобладает вторая тенденция. Сохранение прежнего наклона кривой « $pCa$ -сила» при уменьшении концентрации миозина свидетельствует о том, что эти тенденции уравнивают друг друга.

Сравнивая с этой точки зрения кривые « $pCa$ -сила» для  $V1$  и  $V3$ , полученные при концентрациях миозина 300 мкг/мл и 200 мкг/мл, мы видим, что с понижением концентрации миозина для обеих изоформ увеличился угол наклона данной кривой. Это означает, что первая тенденция преобладает для обеих изоформ, но в большей степени для  $V3$ . Это дает основание для предположения о том, что кооперативная зависимость кинетики кальций-тропониновых комплексов для  $V1$  сильнее, чем для  $V3$  [Никитина и др., 2008а].

Данные, полученные нами по кривым « $pCa$ -сила» [Никитина и др.,

2008a)], показывают, что кальциевая чувствительность изоформ сердечного миозина V1 и V3 отличается. Кальциевая чувствительность, оцененная по величине  $pCa_{50}$ , незначительно различалась у обеих изоформ миозина при концентрации 300 мкг/мл и равнялась 7,32 и 7,42 для V1 и V3, соответственно; при концентрации 200 мкг/мл наблюдалось более сильное различие в кальциевой чувствительности:  $pCa_{50}$  7,34 для V1 и  $pCa_{50}$  7,93 для V3. Таким образом, есть основание предполагать, что кальциевая чувствительность изоформы V3 выше, чем V1.

Таким образом, проанализировав изменения коэффициента Хилла при разных концентрациях миозина, мы предполагаем что кооперативная зависимость кинетики кальций-тропониновых комплексов для V1 сильнее, чем для V3 [Никитина и др., 2008a]. Что касается кальциевой чувствительности, то данные, полученные нами из кривых « $pCa$ -сила» [Никитина и др., 2008a] и « $pCa$ -скорость» [Никитина и др., 2008б] показывают, что изоформа миозина V3 обладает большей чувствительностью к кальцию.

Для более глубокого анализа кооперативного влияния изоформ сердечного миозина V1 и V3 на кальциевую регуляцию сократительной активности предпочтительно одновременно регистрировать нагрузку на нить и скорость движения нити под этой нагрузкой при данной кальциевой активации. Такую информацию мы можем получить из комплекса кривых «сила–скорость», регистрируемых в искусственных подвижных системах с регулируемой тонкой нитью при разных концентрациях кальция в растворе.

В наших предыдущих работах была изучена связь «сила–скорость» в экспериментах на препаратах миокарда и математических моделях в однородном и неоднородном миокарде [Мархасин и др. 1999; Katsnelson et al., 2004; Solovyova et al., 2002].

Известно, что концентрации кальция в клетке влияет на связь «сила–скорость» [De Clerck et al., 1977, Katsnelson et al., 1997]. Уровень кальция и механические условия через механизмы кооперативности могут существенно

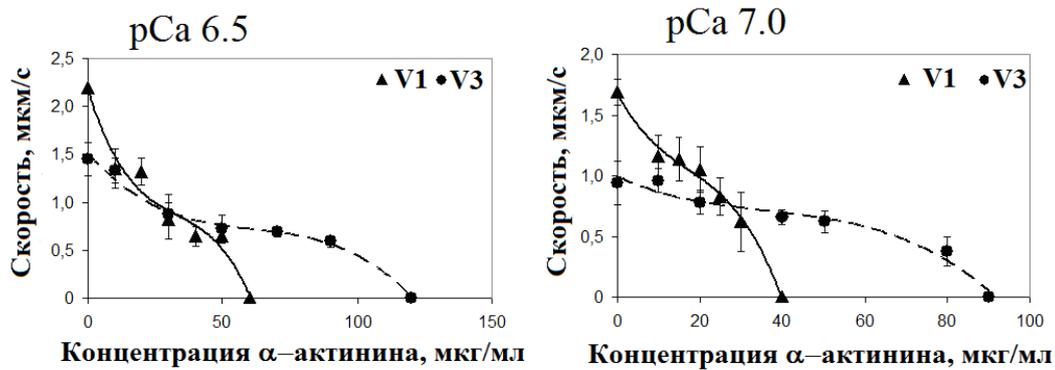
модулировать зависимость «сила-скорость». Следует ожидать, что соотношение «сила-скорость» для изоформ сердечного миозина, зарегистрированное при разных концентрациях кальция будет различаться в случае, если вклад этих изоформ в кооперативность Xb-CaTnC различен.

В экспериментах на искусственной подвижной системе с использованием реконструированной тонкой нити и актин-связывающего белка  $\alpha$ -актинина в качестве нагрузки были получены зависимости «сила-скорость» для изомиозинов V1 и V3 при двух концентрациях кальция. Для экспериментов были выбраны две концентрации кальция в растворе:  $pCa$  6,5 является насыщающей концентрацией, но находится близко к перегибу на плато зависимости « $pCa$ -сила»;  $pCa$  7,0 – ненасыщающая концентрация, при которой скорости скольжения регулируемых филаментов еще достаточно высоки, чтобы при увеличении нагрузки вплоть до максимальной можно было измерить скорости сильно замедливших свое движение филаментов.

На рисунке 4 представлены ненормированные кривые зависимости скорости скольжения регулируемого тонкого филамента от концентрации  $\alpha$ -актинина для изоформ сердечного миозина V1 и V3 при  $pCa$  6,5 и  $pCa$  7,0. Как видно из этих рисунков, кривые зависимостей «сила-скорость» имеют форму, отличающуюся от классической гиперболы, полученной А. Хиллом на скелетной мышце [Hill, 1938]: на кривой имеются гиперболическая (в области малых нагрузок) и негиперболическая (при больших нагрузках) части [Hennekes et al., 1978; Sugiura et al., 1995].

Максимальная относительная сила изоформы миозина V1 (рисунок 4), оцененная по концентрации  $\alpha$ -актинина, останавливающего движение филаментов, меньше, чем у изоформы V3 как при насыщающей, так и при ненасыщающей концентрациях кальция. Следует заметить, что при обеих концентрациях кальция изометрическая сила изоформы V3 в 2 раза больше, чем изоформы V1. Максимальная скорость скольжения регулируемого филамента (без нагрузки) при  $pCa$  6,5 составила  $2,2 \pm 0,12$  мкм/с по изоформе V1 и  $1,45 \pm 0,17$  мкм/с по V3. При ненасыщающей концентрации кальция

максимальная скорость скольжения равнялась  $1,69 \pm 0,11$  мкм/с и  $0,94 \pm 0,18$  мкм/с для V1 и V3, соответственно. Таким образом, максимальная скорость движения филаментов по изоформе V1 была выше, чем по V3 при  $pCa$  6,5 в 1,5 раза и в 1,7 раза при  $pCa$  7,0.

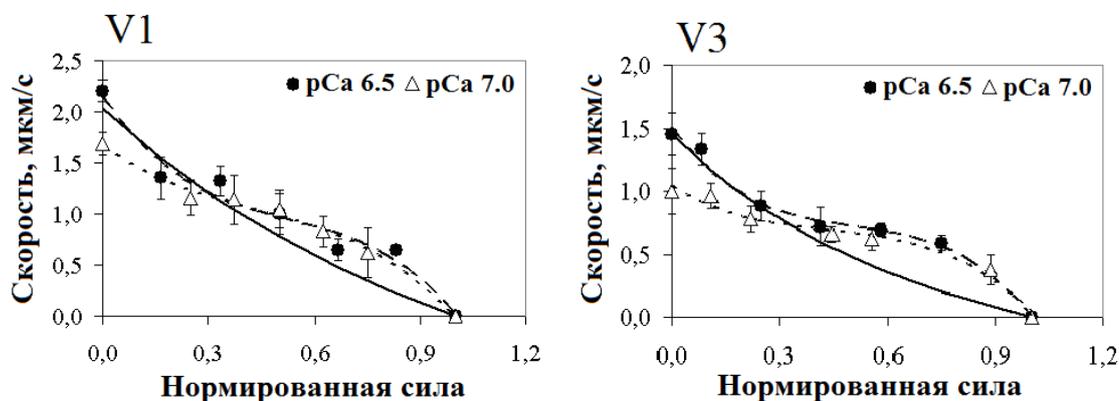


**Рисунок 4** – Зависимость «концентрация α-актинина-скорость», полученная методом искусственной подвижной системы для изоформ V1 (треугольники) и V3 (кружки) при насыщающем ( $pCa$  6,5, левая панель) и ненасыщающем ( $pCa$  7,0, правая панель) значениях концентрации свободного кальция.

*Примечание: треугольниками и кружками обозначены экспериментальные точки, аппроксимирующая кривая построена с помощью полинома третьей степени методом наименьших квадратов. Значения скоростей представлены как среднее значение  $\pm$  стандартное отклонение.*

Нормированные зависимости «сила-скорость» для изоформ V1 и V3 сердечного миозина при  $pCa$  6,5 и  $pCa$  7,0 представлены на рисунке 5. Для обеих изоформ сердечного миозина в области малых нагрузок (в диапазоне от 0 до 0,3 - 0,4 максимума силы) наблюдались отличия в скорости скольжения тонкого филамента в зависимости от концентрации свободного кальция в растворе. При дальнейшем увеличении нагрузки изменений в скорости при обоих значениях концентрации кальция для данной изоформы миозина не происходило. Причем, при увеличении нагрузки от 0,3 - 0,4 до максимальной экспериментальные кривые для V1 и V3 отклоняются от соответствующих теоретических кривых. То есть, для обеих изоформ миозина негиперболические части кривых «сила-скорость» совпадают при разных концентрациях кальция. Таким образом, для каждой изоформы миозина скорость скольжения тонкого филамента при больших нагрузках не зависит от концентрации кальция.

Падение скорости скольжения при уменьшении концентрации кальция от  $pCa$  6,5 до  $pCa$  7,0 при нулевой концентрации  $\alpha$ -актинина, т.е. в отсутствие приложенной нагрузки более выражено для медленной изоформы V3 (на 36 %), чем для быстрой V1 (на 23 %).



**Рисунок 5** – Зависимости «сила-скорость» изоформ сердечного миозина V1 (левая панель) и V3 (правая панель) при  $pCa$  6,5 и  $pCa$  7,0.

*Примечание:* нормированная сила представлена как концентрация  $\alpha$ -актинина, нормированная на «изометрическую» концентрацию  $\alpha$ -актинина для каждой изоформы при данном значении  $pCa$ . Кружками и треугольниками обозначены экспериментальные данные, полученные при  $pCa$  6,5 и  $pCa$  7,0, соответственно, аппроксимирующая кривая – полином третьей степени, проведённый методом наименьших квадратов. Значения скоростей представлены как среднее значение  $\pm$  стандартное отклонение. Сплошная линия представляет собой кривую, соответствующую теоретической кривой, полученной с помощью гиперболического уравнения Хилла методом наименьших квадратов.

Теоретические кривые зависимости «сила-скорость», полученные с помощью гиперболического уравнения Хилла, для изоформ V1 и V3 при насыщающей концентрации кальция, представлены на рисунке 5. Экспериментальные кривые для изоформ V1 и V3 совпадают с теоретической кривой, соответствующей каждой изоформе, только в диапазоне малых нагрузок (от 0 до 0,3 от максимальной). Кривизна зависимости для изоформы V3 больше, чем для V1: коэффициент  $a/F_{0V3} = 0,96$ ,  $a/F_{0V1} = 1,62$ .

Наличие негиперболической части кривых «сила-скорость», зарегистрированной в разных исследованиях [Hennekes et al., 1978; Pagani & Julian, 1984], связывали с особенностями методов получения данной кривой, а не с поведением поперечных мостиков. Присутствие негиперболического участка у кривых «сила-скорость», полученных японскими учеными на центрифужном микроскопе для изоформ сердечного миозина крысы [Sugiura

et al., 1995], а также у кривых, полученных в нашем исследовании на изоформах сердечного миозина кролика [Никитина и др., 2008б] может свидетельствовать о том, что особенность формы кривой «сила-скорость» проявляется уже на уровне актин-миозинового взаимодействия и зависит от состава сократительных белков.

Результаты наших экспериментов на искусственной подвижной системе показали, что максимальная скорость скольжения тонкого филамента по изоформе V1 больше максимальной скорости скольжения по изоформе V3, а сила, развиваемая изомиозином V1 меньше силы V3 и при насыщающей, и при ненасыщающей концентрациях кальция. Таким образом, связь «сила-скорость», зарегистрированная при разных уровнях кальция для изоформ миозина отличается, и это отличие может быть связано с тем, что вклад этих изоформ в кооперативность Xb-CaTnC различен. Следует отметить, что при изменении концентрации кальция степень кривизны связи «сила-скорость» для изоформы V3 меняется в большей степени, что, возможно, говорит о её большей чувствительности к изменению концентрации кальция.

В нашей работе мы также исследовали возможный модулирующий вклад изоформ тропомиозина и сердечного миозин-связывающего белка С в регуляцию сократительной активности миокарда. Поскольку эти два белка принимают участие в регуляции актин-миозинового взаимодействия мы попытались ответить на вопрос: могут ли они модулировать вклад различных сердечных изомиозинов в кальциевую регуляцию сокращений через кооперативность Xb-CaTnC.

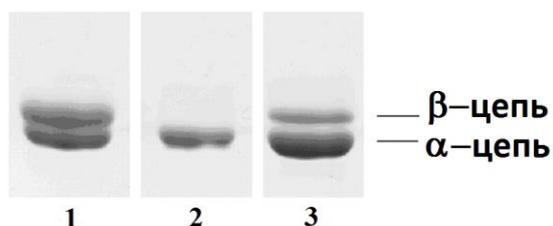
В частности, в исследованиях с использованием искусственных подвижных систем мы оценили влияние разных изоформ тропомиозина как на актин-миозиновое взаимодействие, так и на его регуляцию в зависимости от изоформ сердечного миозина V1 и V3.

У млекопитающих гены TPM1, TPM2 и TPM3 кодируют соответствующие изоформы  $\alpha$ -  $\beta$ - и  $\gamma$ -цепей тропомиозина в

поперечнополосатой мышечной ткани.  $\alpha$ -Тропомиозин и  $\beta$ -тропомиозин содержатся в сердечной и в скелетной мышечной ткани и содержат по 284 аминокислотных остатка [Boussouf et al., 2007].  $\gamma$ -Тропомиозин входит в состав только медленных скелетных мышечных волокон [Perry, 2001].

Экспрессия изоформ тропомиозина, как и изоформ миозина, зависит от вида и возраста животного и меняется в онтогенезе [Perry, 2001; Muthuchamy et al., 1998]. Наибольшее содержание  $\alpha$ -тропомиозина в сердцах взрослых особей крыс, мышей, кроликов и человека. В сердцах крыс и мышей  $\beta$ -тропомиозин экспрессируется главным образом во время гестационного периода. Изменения в экспрессии изоформ также происходят при патологических состояниях сердца. Было показано [Izumo et al., 1988], что увеличение экспрессии  $\beta$ -тропомиозина происходит в сердцах взрослых особей крыс и мышей при гипертрофии, обусловленной перегрузкой давлением. В экспериментах с искусственной сверхэкспрессией  $\beta$ -тропомиозина до 50-60% в сердцах взрослых крыс и мышей найдено, что в них увеличивалась кальциевая чувствительность связи «pCa-сила», падала максимальная скорость расслабления и появлялась диастолическая дисфункция [Muthuchamy et al, 1995]. Дальнейшее увеличение экспрессии  $\beta$ -тропомиозина до 75-80% приводило к смерти животного вскоре после рождения [Muthuchamy et al, 1998].

В экспериментах нами использовались изоформы тропомиозина, содержащие различное соотношение  $\alpha$ - и  $\beta$ - цепей, взятые из разных мышц и разных видов животных. Так тропомиозин, выделенный из миокарда кролика, является гомодимером  $\alpha$ -цепей. Сердечный бычий тропомиозин содержит наряду с  $\alpha$ -цепью от 6 до 10%  $\beta$ -цепи тропомиозина.

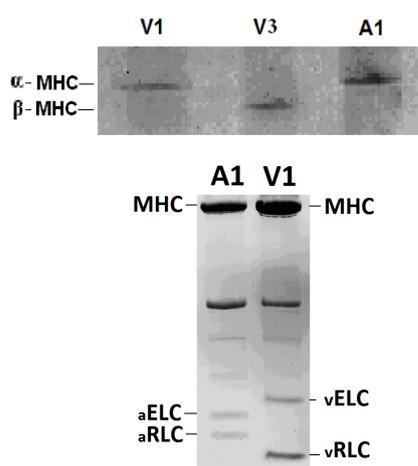


**Рисунок 6** – Денатурирующий полиакриламидный гель–электрофорез препаратов тропомиозина.

*Примечание: 1 – тропомиозин из т. psoas кролика ( $\alpha\beta$  (60 : 40%) Tm); 2 – тропомиозин, экстрагированный из миокарда кролика ( $\alpha\alpha$ Tm); 3 – тропомиозин, полученный из сердца быка ( $\alpha\beta$  (90 : 10%) Tm).*

Для моделирования ситуаций, характерных для ряда сердечных патологий, при которых начинает экспрессироваться в больших количествах  $\beta$ -цепь тропомиозина, использовался тропомиозин, выделенный из спинной мышцы кролика (*m. psoas.*), в котором содержание  $\beta$ -цепи и составляет около 40%. Содержание изоформ тропомиозина было проверено с помощью денатурирующего полиакриламидного гель-электрофореза (рисунок 6).

В качестве моторных белков были использованы изоформы сердечного миозина V1 и V3, которые содержат различные тяжелые цепи  $\alpha$ - и  $\beta$ -, и предсердный миозин A1, который содержит  $\alpha$ -цепь, аналогичную изомиозину V1 (поскольку кодируется одним геном), но различаются легкими цепями, как существенными, так и регуляторными (рисунок 7).



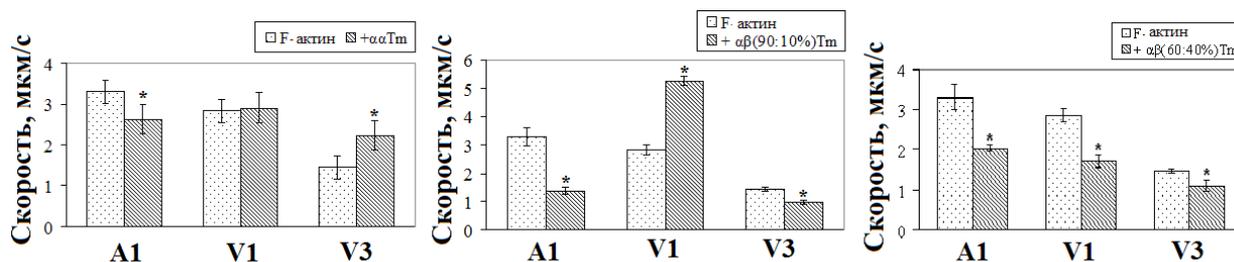
**Рисунок 7** – Денатурирующий полиакриламидный гель-электрофорез изоформ тяжелых цепей миозина из левых желудочков кроликов, обработанных L-тироксинном (V1), пропилтиоурацилом (V3) и предсердного миозина A1 здоровых кроликов (верхняя панель); предсердного (A1) и желудочкового (V1) миозинов (нижняя панель).

*Примечание: MHC, тяжелые цепи миозина;  $\alpha$ ELC, предсердная существенная легкая цепь;  $\alpha$ RLC, предсердная регуляторная легкая цепь; vELC, желудочковая существенная легкая цепь; vRLC, желудочковая регуляторная легкая цепь.*

На рисунке 8 показаны скорости движения актиновых (F-актин) и актин-тропомиозиновых филаментов, содержащих разное соотношение  $\alpha$ - и  $\beta$ - цепей тропомиозина в подвижной системе *in vitro* по изоформам сердечного миозина кролика.

Добавление изоформ тропомиозина, содержащих разное соотношение  $\alpha$ - и  $\beta$ - цепей, приводит к разнонаправленному изменению скоростей скольжения актин-тропомиозиновых филаментов. При добавлении изоформы тропомиозина, состоящей из 60%  $\alpha$ -цепи и 40%  $\beta$ -цепи, которая имитирует патологическое состояние миокарда (в частности гипертрофию левого

желудочка), скорость актин-тропомиозиновых филаментов падает на всех изоформах сердечного миозина.



**Рисунок 8** - Скорость движения актиновых (F-актин) и актин-тропомиозиновых филаментов, содержащих:  $\alpha\alpha$ -тропомиозин из левого желудочка сердца кролика (левая панель), тропомиозин из левого желудочка сердца быка -  $\alpha\beta$  (90 : 10%) Tm (средняя панель), тропомиозин из *m. psoas* кролика – ( $\alpha\beta$  (60 : 40%) Tm) (правая панель) в *in vitro* подвижной системе по изоформам сердечного миозина кролика.

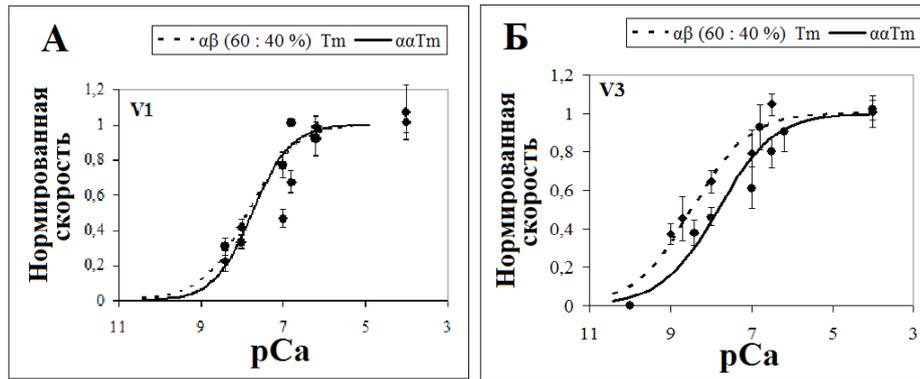
*Примечание:* значения скоростей представлены как среднее значение  $\pm$  стандартное отклонение. Звездочками обозначены статистически достоверные отличия значений скоростей,  $p < 0,05$

Таким образом, из полученных экспериментальных данных следует, что на взаимодействие миозина с F-актином влияют как изоформы сердечного миозина, так и изоформы тропомиозина с разным соотношением  $\alpha$ - и  $\beta$ -цепей. Точный механизм такого эффекта неизвестен, но можно предложить ряд гипотез на основании данных литературы. В работах с дрожжевым [Chen et al., 2006] и скелетным [Sliwinska et al., 2011] актином было обнаружено, что разные изоформы тропомиозина связываются с различными участками F-актина и что для связывания с актином имеет значения не длина молекулы тропомиозина, а её аминокислотная последовательность. Кроме аминокислотной последовательности тропомиозина на регуляцию актин-тропомиозинового филамента влияет аминокислотная последовательность актин-связывающего домена миозина. Согласно работе Ajtai с коллегами [Ajtai et al., 2009], важную роль во взаимодействии миозина с актином играет C-петля миозина. Так, меняя нативную последовательность C-петли в гладкомышечном миозине на последовательность сердечного и скелетного миозина, авторы показали, что такие химерные миозины по-разному взаимодействуют с актин-тропомиозином филаментом.

Известно, что присоединение головок миозина к тонкой нити приводит к конформационным изменениям в молекуле актина [Oztug Durer et al., 2011; Borovikov et al., 2004], и можно предположить, что характер этих изменений зависит от изоформ миозина. Таким образом, на основании наших экспериментальных данных можно заключить, что на взаимодействие сердечного миозина с актин-тропомиозиновым филаментом влияет изоформный состав как миозина (тяжёлых и лёгких цепей миозина), так и тропомиозина. Иными словами, в сердечной мышце существует взаимное влияние миозина и тропомиозина на актин-миозиновое взаимодействие. Наличие такого обоюдного влияния изоформ миозина и тропомиозина в сердечной мышце может играть значительную роль в поддержании ее эффективной работы в процессе онтогенеза и при патологических состояниях.

Для исследования влияния изоформ тропомиозина на кальциевую активацию тонкого филамента в экспериментах на искусственных подвижных системах были определены зависимости скорости скольжения реконструированных тонких филаментов, содержащих разные изоформы тропомиозина, от концентрации кальция в растворе ( $pCa$  4-10) (рисунок 9).

Коэффициенты кооперативности Хилла нормированной кривой « $pCa$ -скорость» (рисунок 9) достоверно не отличаются для изоформы сердечного миозина V1 со скелетным тропомиозином кролика ( $\alpha\beta$  (60 : 40%) Tm) и с сердечным тропомиозином ( $\alpha\alpha$  Tm):  $0,76 \pm 0,12$  и  $0,93 \pm 0,2$ , соответственно. Для изомиозина V3 коэффициенты Хилла нормированной кривой « $pCa$ -скорость» также достоверно не отличаются с обеими изоформами тропомиозина:  $0,62 \pm 0,12$  со скелетным тропомиозином кролика ( $\alpha\beta$  (60 : 40%) Tm) и  $0,63 \pm 0,11$  с сердечным тропомиозином ( $\alpha\alpha$  Tm), соответственно [Nikitina et al., 2014].



**Рисунок 9** – Нормированные зависимости скорости движения регулируемой тонкой нити, содержащей скелетный тропомиозин -  $\alpha\beta$  (60 : 40 %) Tm (пунктирная линия) и сердечный тропомиозин -  $\alpha\alpha$  Tm (сплошная линия) от концентрации свободного кальция для изомиозинов V1(A) и V3 (Б).

*Примечание:* кружками и ромбами обозначены значения скоростей, полученных в экспериментах на искусственной подвижной системе для сердечного и скелетного тропомиозина соответственно. Линия регрессии соответствует уравнению Хилла. Скорости представлены как среднее значение  $\pm$  стандартное отклонение по трем экспериментам.

Кальциевая чувствительность, определяемая величиной  $pCa_{50}$ , слабо различается для изоформы V1: 7,75 в случае сердечного тропомиозина и 7,84 – в случае скелетного. Для изоформы миозина V3 величина  $pCa_{50}$  связи « $pCa$ -скорость» различается со скелетным тропомиозином кролика ( $\alpha\beta$  (60 : 40%) Tm) и с сердечным тропомиозином ( $\alpha\alpha$  Tm) и равна 8,4 и 7,8, соответственно [Nikitina et al., 2014].

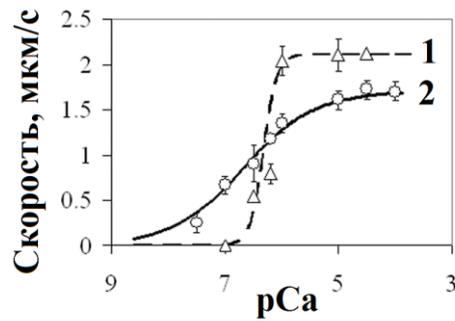
Результаты наших экспериментов, проведенных для изучения влияния изоформ тропомиозина на кальциевую активацию тонкого филамента (связь « $pCa$ -скорость»), показывают, что тропомиозин является передаточным звеном, по-разному модулирующим влияние каждой из изоформ сердечного миозина на кинетику кальций-тропомиозиновых комплексов.

Часть экспериментов на искусственной подвижной системе была посвящена проверке гипотезы о специфическом влиянии сердечного миозин-связывающего белка С на регуляцию актин-миозинового взаимодействия в миокарде вообще, и в зависимости от изоформ сердечного миозина, в частности.

Группа профессора Lecarpentier [Lecarpentier et al., 2008] изучала влияние сердечного С-белка на взаимодействие сердечного миозина с

актиновым филаментом в искусственных подвижных системах. Они нашли, что как скорость скольжения актина, так и относительная изометрическая сила, оцененная по концентрации  $\alpha$ -актинина, останавливающего движение филаментов, были ниже в отсутствие С-белка, чем при его наличии. Эти результаты, полученные с нерегулируемым филаментом на сердечном миозине, существенно отличаются от аналогичных результатов, полученных другими авторами [Razumova et al., 2006; Saber et al., 2008] на скелетном миозине. Это наводит на мысль о том, что и в экспериментах с регулируемым филаментом данные, полученные на сердечном миозине, также могут отличаться от таковых на скелетном миозине. Учитывая то, что функциональные характеристики сердечного миозина отличаются от характеристик скелетного миозина, а также принимая во внимание тот факт, что миозин через механизмы кооперативности вносит вклад в регуляцию сокращений сердечной мышцы, можно полагать, что изучение влияния сердечного С-белка на регуляцию сократительной функции сердечной мышцы, важно проводить с использованием именно сердечного миозина. Это послужило мотивацией для проведения данного исследования.

На рисунке 10 показаны кривые зависимости « $pCa$ -скорость» с добавлением миозин-связывающего белка С в проточную камеру и без него, полученные в искусственной подвижной системе для сердечного миозина кролика. В экспериментах с сердечным миозином в качестве моторного белка мы нашли, что добавление С-белка в физиологической пропорции к миозину (молярное отношение С-белка/миозин 1:5) оказывает разнонаправленное влияние на скорость движения регулируемого филамента в зависимости от концентрации кальция в проточной камере.



**Рисунок 10** - Кривые зависимости скорости скольжения регулируемого тонкого филамента по сердечному миозину от концентрации свободного кальция без С-белка (1) и в его присутствии (2).

*Примечание:*  $pCa$  - отрицательный десятичный логарифм концентрации кальция. Треугольниками обозначены значения скоростей без С-белка, полученные в экспериментах на искусственной подвижной системе, кружками — в присутствии С-белка. Концентрации миозина и С-белка, загружаемых в проточную камеру, составляли 300 мкг/мл (0,65 мкМ) и 20 мкг/мл (0,13 мкМ), соответственно, что выражается в молярном отношении С-белок/миозин как 1:5. Скорость представлена как среднее значение  $\pm$  стандартное отклонение по трем экспериментам. Линия регрессии соответствует уравнению Хилла.

В частности, добавление С-белка понижает скорость движения тонкого филамента на насыщающей концентрации кальция на 20% ( $pCa$  5), но увеличивает скорость движения филаментов на ненасыщающей концентрации кальция ( $pCa$  7). Коэффициент Хилла связи « $pCa$ -скорость» значительно понижается ( $3,7 \pm 0,5$  без С-белка против  $0,7 \pm 0,08$  с С-белком), а кальциевая чувствительность при добавлении С-белка увеличивается. Результаты, полученные в эксперименте на искусственных подвижных системах, подтверждаются нашими данными по измерению регулируемой АТФазной активности [Shcherkin et al, 2010].

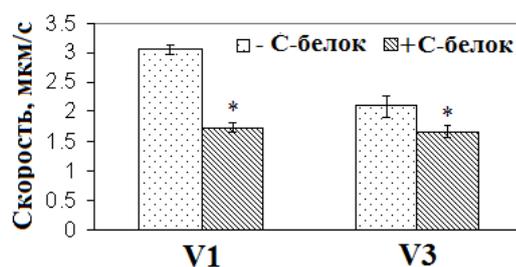
Существует ряд гипотез о влиянии С-белка на сократительный акт. Нам, с точки зрения интерпретации наших результатов, наиболее близкими кажутся гипотезы, в которых предполагается, что С-белок замедляет кинетику поперечных мостиков, когда связывается с актином.

Мы обнаружили, что при ненасыщающей концентрации кальция С-белок стимулирует АТФазную активность миозина, а также активирует движение регулируемого тонкого филамента. Это можно объяснить, если предположить, что поскольку благодаря С-белку поперечные мостики большее время находятся в присоединенном к актину состоянии, они

способны увеличивать кооперативное присоединение других поперечных мостиков вдоль тонкой нити. В такой ситуации будут играть роль следующие кооперативные механизмы взаимодействия сократительных и регуляторных белков в миокарде: 1) присоединение головки миозина в одной регуляторной группе (семь мономеров актина, тропомиозин и тропониновый комплекс) способно вызвать смещение молекулы тропомиозина в этой и близлежащей регуляторной группе, что облегчает присоединение головок миозина в этих регуляторных группах, 2) механизм мостико-тропониновой кооперативности  $Xb-CaTnC$  [Gordon et al., 2001]. С нашей точки зрения последний механизм хорошо объясняет активирующий эффект С-белка на ненасыщающем кальции, обнаруженный нами в экспериментах на искусственных подвижных системах [Shcherkin et al., 2010]. Вслед за нами исследования влияния сердечной изоформы С-белка на комплексе белков сердечной мышцы, включающем в себя сердечный миозин и сердечные регуляторные белки, были проведены группой ведущих американских исследователей [Mun et al., 2014]. В этой работе с использованием метода искусственной подвижной системы, были получены результаты, повторяющие наши данные. Сопоставляя результаты электронной микроскопии с данными на искусственной подвижной системе, авторы делают вывод, что С-белок может связываться на тонком филаменте не только с актином, но и с тропомиозином. При низкой концентрации кальция С-белок сдвигает тропомиозин с «блокирующей» позиции и тем самым облегчает активацию тонкого филамента. Падение скорости скольжения тонкого филамента при насыщающей концентрации кальция авторы приписывают «независимому молекулярному механизму» [Mun et al., 2014].

Поскольку модулирующее влияние С-белка на регуляцию взаимодействия сердечного миозина с тонким филаментом оказывается существенным, то было естественно исследовать этот феномен для каждой из изоформ сердечного миозина отдельно. Более того, данные о влиянии С-белка на регуляцию сократительной активности, с одной стороны, и на

кинетику популяций сильносвязанных поперечных мостиков [Stelzer et al., 2006], с другой, наводят на мысль о том, что влияние С-белка на регуляцию связано с механизмом мостиково-тропониновой кооперативности (Хв-СаТnС) и это влияние может быть различно при доминировании той или иной изоформы сердечного миозина (V1 и V3) в кардиомиоците. В таком случае может быть выдвинута гипотеза о специфическом влиянии С-белка на регуляцию сократительной активности в зависимости от изоформ сердечного миозина.



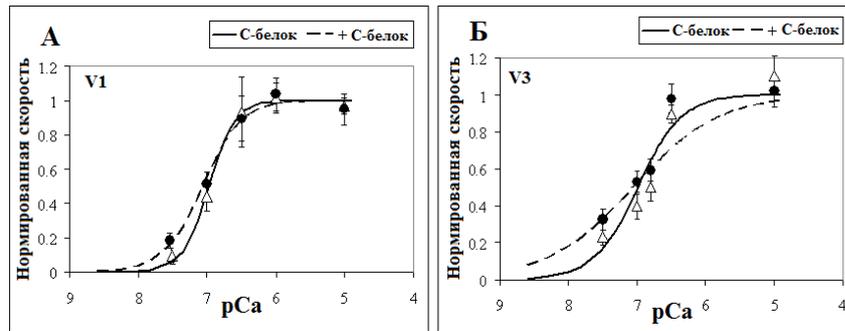
**Рисунок 11** - Зависимость скорости скольжения регулируемого тонкого филамента на насыщающей концентрации кальция от изоформ сердечного миозина V1 и V3 в присутствии и в отсутствие С-белка.

*Примечание:* концентрации миозина и С-белка, загружаемых в проточную камеру, составляли 300 мкг/мл (0,65 мкМ) и 20 мкг/мл (0,13 мкМ), соответственно, в молярном отношении С-белок/миозин, 1:5. Скорость скольжения представлена как среднее значение  $\pm$  стандартное отклонение по трем экспериментам. Звездочками обозначены статистически достоверные отличия значения скоростей от контроля (без С-белка),  $p < 0,05$ .

Для проверки этой гипотезы в серии экспериментов на искусственной подвижной системе мы оценивали зависимость скорости движения реконструированного тонкого филамента по сердечным изомиозинам V1 и V3 от концентрации кальция в диапазоне от  $pCa$  5 до  $pCa$  8 (рисунки 11 и 12).

Было установлено, что добавление С-белка в физиологической пропорции (молярное отношение С-белка к миозину 1:5) тормозит скорость скольжения регулируемого тонкого филамента на насыщающей концентрации кальция по обоим изомиозинам (рисунок 11).

Результаты исследования влияния С-белка на регуляцию сократительной активности миокарда в зависимости от изоформ сердечного



**Рисунок 12** - Нормированные кривые зависимости скорости скольжения регулируемого тонкого филамента по изоформам V1 (панель А) и V3 (панель Б) сердечного миозина от концентрации свободного кальция.

*Примечание: треугольниками обозначены полученные в экспериментах на искусственной подвижной системе значения скоростей без С-белка (сплошная линия), кружками – в присутствии С-белка (пунктирная линия). Концентрации миозина и С-белка, загружаемых в проточную камеру, составляли 300 мкг/мл (0,65 мкМ) и 20 мкг/мл (0,13 мкМ), соответственно, или, в молярном отношении С-белок/миозин, 1:5. Скорость представлена как среднее значение  $\pm$  стандартное отклонение по трем экспериментам. Линия регрессии соответствует уравнению Хилла.*

миозина показали, что добавление С-белка в физиологичном соотношении (молярное отношение С-белка к миозину 1:5) к изомиозину V1 не влияет на коэффициент Хилла и кальциевую чувствительность кривой « $pCa$ -скорость» (рисунок 12). В то же время добавление С-белка к изомиозину V3 приводит к уменьшению коэффициента Хилла, при неизменной кальциевой чувствительности ( $pCa_{50}$ ) кривой « $pCa$ -скорость». Таким образом, влияние С-белка на характеристики связи « $pCa$ -скорость» для изомиозина V3 выражено значительно сильнее, чем для V1 [Shcherkin et al., 2014]. Можно предположить, что влияние С-белка на связь « $pCa$ -скорость» для смеси изоформ, имеющей место в сердце, определяется именно изоформой V3.

Итак, согласно нашим результатам, С-белок, выступая как регулятор взаимодействия миозина с актином, по-разному модулирует кинетические характеристики изоформ сердечного миозина V1 и V3, так и влияние поперечных мостиков, образованных этими изоформами на сродство тропонина С к кальцию через механизм Xb-CaTnC кооперативности.

Таким образом, в результате проведенных исследований с использованием метода искусственных подвижных систем мы доказали существование обратных связей между кинетикой кальций-тропониновых

комплексов и кинетикой поперечных мостиков. В экспериментах *in vitro* мы показали разный вклад изоформ сердечного миозина в процесс активации тонкой нити. Также было показано модулирующее влияние как изоформ тропомиозина, так и сердечного миозин-связывающего белка С на эти процессы и определено, что это влияние специфично в зависимости от изоформ сердечного миозина.

Результаты нашего исследования дают основание обсудить возможный вклад изменения изоферментного состава белков сократительного аппарата сердечной мышцы в регуляцию ее сокращений при патологии.

Известно, что экспрессия изоформ сердечного миозина зависит от вида животного, его возраста и гормонального статуса [Lompre et al., 1979]. Так, при гипертиреозе происходит сдвиг экспрессии к изоформе V1. При гипотиреозе, а также при патологиях сердца, вызванных перегрузкой давлением, возникающим при искусственном или естественном стенозе аорты или митрального клапана, происходит сдвиг в сторону изоформы V3 [Katz, 2001]. Преимущественная экспрессия гена, кодирующего медленную  $\beta$ -цепь миозина, ведёт к уменьшению максимальной скорости сокращения сердечной мышцы и оказывает отрицательный инотропный эффект. Этот сдвиг также влияет на экономию энергии, т.к. мышца, содержащая медленные  $\beta$ -тяжелые цепи миозина, генерирует напряжение более эффективно, чем мышца с более быстрыми изоформами. Из этих соображений сдвиги в содержании изоформ, происходящие в описанных выше случаях, вероятно, играют важную роль в адаптации сердечной деятельности к меняющимся условиям функционирования миокарда. Хотя замещение быстрых изоформ медленными снижает сократительную способность миокарда, замедляя среднее время цикла поперечных мостиков, оно повышает эффективность за счёт увеличения доли работы в цикле гидролиза АТФ. Таким образом, преимущественная экспрессия низко-АТФазного миозина V3 при хронической перегрузке сердца является

механизмом экономии энергии, способствующим адаптации сердечной мышцы к изменению условий её функционирования [Alpert et al., 1991; Katz, 2001]. Наши исследования связей « $pCa$ -сила» и «сила-скорость» показали, что изомиозин V3 обладает более высокой кальциевой чувствительностью по сравнению с изомиозином V1. Т.е. активация тонкого филамента в случае изоформы миозина V3 происходит при более низкой концентрации кальция. В условиях сердечной недостаточности это может являться еще одним способом тонкой адаптации сердечной деятельности.

Известно, что при гипертрофии сердца происходит сдвиг в экспрессии не только изоформ миозина преимущественно в сторону V3, но и изоформ тропомиозина преимущественно к  $\beta$ -цепи [Izumo et al., 1988]. Результаты наших исследований показали, что кальциевая чувствительность связи « $pCa$ -скорость» значительно увеличивается в сочетании изоформы миозина V3 с изоформой тропомиозина состава  $\alpha\beta$  (60 : 40%). Поскольку в такой мышце увеличена доля медленного изомиозина V3, то укорачивается она медленнее. Но на этом фоне максимальная скорость укорочения достигается при меньших концентрациях кальция. В этом проявляется компенсаторная роль увеличения доли  $\beta$ -цепи тропомиозина. Несмотря на то, что наши результаты были получены в системе *in vitro* при постоянном уровне кальция, можно допустить, что и в сократительных циклах интактного кардиомиоцита увеличение доли  $\beta$ -цепи тропомиозина может играть компенсаторную роль. Т.е. может запускаться механизм, компенсирующий замедление укорочения кардиомиоцитов с преобладающей в них изоформой V3.

Наличие изоформ сердечного миозина – существенный фактор, определяющий механическую неоднородность сердца. Трансмуральные различия в экспрессии изоформ миозина определяют региональную неоднородность механической функции левого желудочка, регулируют генерацию силы в толще стенки желудочка и работу во время систолы [Stelzer et al., 2008]. Было показано, что различия в трансмуральной

экспрессии изоформ миозина в желудочке свиньи способствуют синхронизации развития напряжения в стенке желудочка, оптимизируя насосную функцию сердца. Сердечный миозин-связывающий белок С, выступая как регулятор взаимодействия миозина с актином, по-разному модулирует кинетические характеристики изоформ сердечного миозина V1 и V3, так кооперативное влияние поперечных мостиков, образованных этими изоформами на активацию тонкой нити. Таким образом, сердечный миозин-связывающий белок С специфически влияет на механическую и регуляторную функции изоформ сердечного миозина и может модулировать как их адаптивный вклад в сократительную функцию сердца, так и их роль в механической неоднородности миокарда.

**Выводы:**

1. При исследовании связей « $pCa$ -скорость», « $pCa$ -сила», «сила-скорость» изоформ сердечного миозина методом искусственной подвижной системы обнаружено, что кооперативная зависимость кинетики кальций-тропониновых комплексов различна для изоформ сердечного миозина V1 и V3.
2. В экспериментах на искусственной подвижной системе выявлено, что взаимодействие сердечного миозина с актин-тропомиозиновым филаментом зависит от состава как тяжёлых, так и лёгких цепей миозина; показано наличие обоюдного влияния изоформ миозина и тропомиозина на актин-миозиновое взаимодействие, что может играть роль в поддержании эффективной работы сердечной мышцы в процессе онтогенеза и при патологических состояниях.
3. В экспериментах на искусственной подвижной системе обнаружено существенное влияние изоформ тропомиозина на кальциевую регуляцию актин-миозинового взаимодействия и рост кальциевой чувствительности связи « $pCa$ -скорость» при увеличении  $\beta$  изоформы тропомиозина, что может являться способом тонкой адаптивной настройки сердечной деятельности в онтогенезе и при патологии.

4. Полученные на подвижных системах *in vitro* результаты подтверждают регуляторную роль сердечного миозин-связывающего белка С, которая может проявляться в замедлении С-белком кинетики поперечных мостиков сердечного миозина при связи С-белка с актином.
5. В экспериментах на искусственной подвижной системе выявлено, что С-белок специфически влияет на коэффициент кооперативности Хилла и кальциевую чувствительность связи «рСа-скорость» в зависимости от изоформ сердечного миозина V1 и V3, т.е. модулирует кооперативное влияние сильносвязанных поперечных мостиков на кальциевую активацию тонких нитей кардиомиоцитов.
6. Обоснована ключевая роль кооперативного влияния миозиновых поперечных мостиков на сродство кальций-тропониновых комплексов в качестве механизма, реализующего различный вклад изоформ сердечного миозина V1 и V3 в кальциевую регуляцию сокращений миокарда.

### **Практические рекомендации**

1. Результаты диссертации следует использовать при разработке учебных курсов физиологии, биофизики, биомеханики в университетах.

2. Выводы диссертации могут быть использованы в кардиологии для оценки и прогноза состояний сократительной функции сердечной мышцы при гипер- и гипотиреозе, гипертрофической кардиомиопатии, вызванной перегрузкой давлением или объемом, и других патологиях сердца, сопровождающихся изменением изоформного состава сократительных и регуляторных белков.

Автор приносит благодарности чл-корр. РАН В.С. Мархасину, д-ру J.E. Molloy (NIMR MRC, London), д.ф.-м.н. Л.Б. Кацнельсону, к.б.н. Г.В. Копыловой, к.б.н. Д.В. Щепкину и Б.Ю. Бершицкому за неоценимую помощь на разных этапах подготовки данной работы.

### **Список опубликованных работ по теме диссертации**

#### ***Публикации в изданиях, рекомендованных ВАК***

1. Исследование взаимодействия сократительных и регуляторных белков

- миокарда кролика методом искусственных подвижных систем / Л.В. Никитина, Г.В. Копылова, Д.В. Щепкин, Л.Б. Кацнельсон // Биохимия. – 2008. – Т. 73(2). – С. 219-227. Импакт-фактор JCR = 1,476.
2. Копылова Г.В. Исследование регуляторного влияния тропомиозина на актомиозиновое взаимодействие в скелетной мышце методом *in vitro* подвижных систем / Г.В. Копылова, Д.В. Щепкин, Л.В. Никитина // Биохимия. – 2013. – Т. 78(3). – С. 348-356. Импакт-фактор JCR = 1,149.
  3. Метод оценки механических характеристик контрактильного элемента в изолированных препаратах миокарда / В.С. Мархасин, С.М. Руткевич, Л.В. Никитина, Ю.Л. Проценко // Российский Физиологический журнал им. И.М. Сеченова. – 1997. – Т.83(7). – С. 136-139.
  4. Оценка механической активности сердечных изомиозинов V1 и V3 методом искусственных подвижных систем с регулируемой тонкой нитью / Л.В. Никитина, Г.В. Копылова, Д.В. Щепкин, Л.Б. Кацнельсон // Биофизика. – 2008. – Т. 53(6). – С. 956-962. Импакт-фактор JCR = 0,43.
  5. Применение метода *in vitro* подвижных систем для исследования кальций-механической связи в скелетной и сердечной мышцах / Г.В. Копылова, Л.Б. Кацнельсон, Д.А. Овсянников, С.Ю. Бершицкий, Л.В. Никитина // Биофизика. – 2006. – Т. 51(5). – С. 781-785. Импакт-фактор JCR = 0,362.
  6. Современные подходы к исследованию механизма сокращения мышц / С.Р. Набиев, П.В. Кочубей, Д.В. Щепкин, Г.В. Копылова, Л.В. Никитина, С.Ю. Бершицкий // Вестник уральской медицинской академической науки. – 2013. – Т. 44(2). – С. 68-72. Импакт-фактор РИНЦ = 0,054.
  7. Экспериментальная модель механически неоднородного миокарда (метод дуплетов) / С.М. Руткевич, В.С. Мархасин, Л.В. Никитина, Ю.Л. Проценко // Российский Физиологический журнал им. И.М. Сеченова. – 1997. – Т.83(4). – С. 131-134.
  8. Analysis of force-velocity relationship in cardiac muscle by means of mathematical modeling / L.V. Katsnelson, V.S. Markhasin, L.V. Nikitina, M.V. Ryvkin // Journal of Muscle Research and Cell Motility. – 1997. – Vol. 18. – P. 228. Импакт-фактор JCR = 2,798.
  9. Assessment of the effect of cardiac myosin binding protein-C on «pCa-velocity» relationship obtained in an *in vitro* motility assay / D.V. Shchepkin, G.V. Kopylova, B.Y. Bershitsky, L.V. Nikitina // Journal of General Physiology – 2009. – Vol. 134. – P.1a-2a. Импакт-фактор JCR = 4,711.
  10. Effects of cardiac myosin binding protein-C on the mechanical interaction of cardiac isomyosins V1 and V3 with actin filament in an *in vitro* motility assay and optical tweezers / D.V. Shchepkin, G.V. Kopylova, S.R. Nabiev, L.V. Nikitina // Journal of Muscle Research and Cell Motility. – 2014. – 35(1). – P. 143. Импакт-фактор JCR = 1,358.
  11. Effects of cardiac myosin binding protein-C on the regulation of interaction of cardiac myosin with thin filament in an *in vitro* motility assay / D.V. Shchepkin, G.V. Kopylova, L.V. Nikitina, L.B. Katsnelson, S.Y. Bershitsky // Biochemical and Biophysical Research Communications. – 2010. – Vol. 401. – P. 159-163. Импакт-фактор JCR = 2,548.
  12. Effects of mechanical interaction between two rabbit cardiac muscles connected in parallel / V.S. Markhasin, L.V. Nikitina, S.M. Routkevich, L.B. Katsnelson,

B.A. Schroder, B.B. Keller // *General Physiology & Biophysics* – 2002. – Vol. 21. – P. 277-301. Импакт-фактор JCR = 0,932.

13. Experimental and theoretical study of the role of mechanical inhomogeneity in myocardium contraction / V.S. Markhasin, L.B. Katsnelson, L.V. Nikitina, M.A. Marvin // *Journal of Muscle Research and Cell Motility*. – 1997. – Vol. 18. – P. 232. Импакт-фактор JCR = 2,798.

14. Influence of viscosity on myocardium mechanical activity: A mathematical model / L.B. Katsnelson, L.V. Nikitina, D. Chemla, O.E. Solovyova, C. Coirault, Y. Lecarpentier, V.S. Markhasin // *Journal of Theoretical Biology*. – 2004 – Vol. 230(3). – P. 385-405. Импакт-фактор JCR = 1,550.

15. Mathematical modelling of contribution of myocardium mechanical inhomogeneity in its contractile function / V.S. Markhasin, L.B. Katsnelson, L.V. Nikitina, Yu.L. Protsenko // *General Physiology & Biophysics*. – 1997. – Vol. 16(2) – P. 101-137. Импакт-фактор JCR = 0,349.

16. Mechanical characteristics of different rabbit cardiac isomyosins obtained in an *in vitro* motility assay with regulated thin filaments / G.V. Kopylova, L.V. Nikitina, D.V. Shchepkin, L.B. Katsnelson // *Journal of Muscle Research and Cell Motility*. – 2007. – Vol. 28. – P. 447. Импакт-фактор JCR = 0,944.

17. Mechanical inhomogeneity of myocardium studied in parallel and serial cardiac muscle duplexes: experiments and models / O. Solovyova, L. Katsnelson, S. Guryev, L. Nikitina, Yu. Protsenko, S. Routkevitch, V. Markhasin. // *Chaos, Solitons & Fractals*. – 2002. – Vol. 13(8). – P. 1685-1711. Импакт-фактор JCR = 0,839.

18. Nikitina L.V. Length-dependence of Ca<sup>2+</sup> sensitivity in cardiac muscle / L.V. Nikitina, K. Putilov, L.B. Katsnelson // *Journal of Muscle Research and Cell Motility*. – 2007. – Vol. 28. – P. 447. Импакт-фактор JCR = 0,944.

19. Nikitina L. Mechanical and kinetic properties of rabbit cardiac isomyosins V1 and V3 compared in an *in vitro* motility assay and optical tweezers / L. Nikitina, G. Kopylova and J.E. Molloy // *Journal of Muscle Research and Cell Motility*. – 2005. – Vol. 26(1). – P. 74. Импакт-фактор JCR = 1,721.

20. Nikitina L.V. Study of effects of tropomyosin isoforms on the regulation of actin-myosin interaction in myocardium with *in vitro* motility assay / L.V. Nikitina, D.V. Shchepkin, G.V. Kopylova // *Journal of Muscle Research and Cell Motility*. – 2014. – 35(1). – P. 147. Импакт-фактор JCR = 1,358.

21. Shchepkin D.V. Study of reciprocal effects of cardiac myosin and tropomyosin isoforms on actin-myosin interaction with *in vitro* motility assay / D.V. Shchepkin, G.V. Kopylova, L.V. Nikitina // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 2011. – V. 415. – P. 104-108. Импакт-фактор JCR = 2,595.

22. Study of influence of hyperthyroidism on calcium regulation of muscle contraction in slow and fast skeletal muscle of rabbit with an *in vitro* motility assay / G.V. Kopylova, D.V. Shchepkin, D.L. Zhalobin, P.V. Kochubey, L.V. Nikitina, S.Y. Bershitsky, V.S. Markhasin // *Journal of Muscle Research and Cell Motility*. – 2014. – 35(1). – P. 71. Импакт-фактор JCR = 1,358.

### **Монография**

23. Биомеханика неоднородного миокарда / В.С. Мархасин, Л.Б. Кацнельсон, Л.В. Никитина, Ю.Л. Проценко, С.М. Руткевич, О.Э. Соловьева, Г.П. Ясников. - Екатеринбург: УрО РАН, 1999. 253 с.

**Публикации в сборниках статей, материалах конференций:**

24. Биомеханические эффекты при взаимодействии неоднородных сократительных элементов миокарда / О.Э. Соловьева, В.В. Гурьев, Л.В. Никитина, П.В. Коновалов, С.М. Руткевич, В.С. Мархасин // Тезисы докладов XVII съезда физиологического общества им. Павлова. – Казань, 2001. – С. 428.
25. Зависимость « $pCa$ -скорость» для быстрого и медленного скелетного миозина кролика при гипертиреозе в искусственной подвижной системе / Д.Л. Жалобин, Д.В. Щепкин, Г.В. Копылова, Л.В. Никитина, В.С. Мархасин // Биология - наука XXI века: 17-я Междунар. Пушчинская школа-конф. молодых ученых, (Пушино, апр. 21-26). – Пушино, 2013. – С. 416.
26. Кацнельсон Л.Б. Математическое моделирование и анализ вклада пассивной вязкости миокардиальной ткани в активное механическое поведение сердечной мышцы / Л.Б. Кацнельсон, Л.В. Никитина, В.В. Берсенев // Тезисы докладов XVII съезда физиологического общества им. Павлова. – Казань, 2001. – С. 350.
27. Копылова Г.В. Определение соотношения  $\alpha$  - и  $\beta$ - тяжелых цепей сердечного миозина в миокарде различных животных методом одномерного SDS гель-электрофореза / Г.В. Копылова, Д.В. Щепкин, Л.В. Никитина // Тезисы докладов XX съезда физиологического общества им. Павлова. – М., 2007. – С. 277.
28. Никитина Л.В. Влияние асинхронизма на инотропные, луситропные и эрготропные свойства неоднородного миокарда / Л.В. Никитина, В.С. Мархасин // Фундаментальные науки и прогресс клинической медицины: материалы конф. молодых ученых России. – М., 1998. – С. 350.
29. Никитина Л.В. Механическая неоднородность - важный модулятор связи «частота-сила» в миокарде теплокровных / Л.В. Никитина, Ф.А. Бляхман // Центральные и периферические механизмы регуляций физиологических функций: тез. докл. Всесоюз. конф. – М., 1990. – С.5.
30. Связь « $pCa$ -сила» миокарда кролика, полученная техникой *in vitro* подвижной системы / Л.В. Никитина, Г.В. Копылова, Д.В. Щепкин, Л.Б. Кацнельсон // Сборник тезисов докладов участников Международного конкурса научных работ молодых ученых в области нанотехнологий. – М., 2008. – С. 512-513.
31. Экспериментальное и теоретическое исследование роли асинхронизма в сократительной функции неоднородного миокарда / В.С. Мархасин Л.В. Никитина С.М. Руткевич Л.Б. Кацнельсон // Прикладные аспекты исследования скелетных, сердечных и гладких мышц: сб. тез. докл. Всерос. конф. – Пушино, 1996. – С. 101.
32. Comparison of kinetic characteristics of musculoskeletal and cardiac myosins using the method of regulated contractile systems / G.V. Kopylova, L.V. Nikitina, L.B. Katsnelson, S.Yu. Bershitsky // Biological motility: basic research and practice: international symposium (Pushchino, 11-15 May, 2006). – Pushchino, 2006. – P. 25-27.
33. Does viscosity affect myocardium mechanical activity? / L.B. Katsnelson, L.V. Nikitina, D. Chemla, O. Solovyova, C. Coirault, Y. Lecarpentier, V.S. Markhasin // Proceedings of the Oxford Biomathematical Modelling Workshop (1-3 Oct. 2004). J Physiol. – 2004. – 561P. – PC12.
34. Effects of MyBP-C on the calcium regulation of interaction of cardiac isomyosins with thin filament. The *in vitro* motility assay and optical tweezers / D.V. Shchepkin, G.V. Kopylova, S.R. Nabiev, L.V. Nikitina // Biological Motility: new facts and hypotheses: international symposium (Pushchino, 11-15 May, 2014). – Pushchino, 2014. – P. 256-258.

35. Kopylova G.V. Cardiac myosin isoforms and different content of tropomyosin chains modulate the actin-myosin interaction / G.V. Kopylova, D.V. Shchepkin, L.V. Nikitina // *Biological Motility: Fundamental and Applied Science: international symposium (Pushchino, 11-15 May, 2012)*. – Pushchino, 2012. – P. 81-84.
36. «pCa-Force» relationship assessed in an *in vitro* motility assay for rabbit cardiac muscle / L.V. Nikitina, G.V. Kopylova, D.V. Shchepkin, L.B. Katsnelson // *Biological Motility: Achievements and Perspectives: international symposium (Pushchino, May 11-15, 2008)*. – Pushchino, 2008. – P. 44-48.
37. Role of isoforms of cardiac contractile and regulatory proteins in calcium regulation of actin-myosin interaction / G.V. Kopylova, D.V. Shchepkin, L.V. Nikitina // *Biological Motility: new facts and hypotheses: international symposium (Pushchino, 11-15 May, 2014)*. – Pushchino, 2014. – P. 120-123.
38. Shchepkin D.V. Contribution of actin isoforms and cardiac myosin isoforms to calcium regulation / D.V. Shchepkin, G.V. Kopylova, L.V. Nikitina // *Biological Motility: Fundamental and Applied Science: international symposium (Pushchino, 11-15 May, 2012)*. – Pushchino, 2012. – P. 183-186.
39. Shchepkin D.V. Effects of cardiac myosin binding protein-C on myocardium contractile activity assessed in an *in vitro* motility assay / D.V. Shchepkin, G.V. Kopylova, L.V. Nikitina // *Biological Motility: from Fundamental Achievements to Nanotechnologies: international symposium (Pushchino, May 11-15, 2010)*. – Pushchino, 2010. – P. 237-239.
40. Tuning-effect in inhomogeneous myocardium caused by interaction between contractile elements: experiments and models / V. Guriev, P. Konovalov, V. Markhasin, L. Nikitina, S. Routkevitch, O. Solovyova // *XXXIV International Congress of Physiological Sciences*. – Christchurch., New Zealand, 2001. – Abstr. 102.

### Список сокращений

- АТФ – аденозинтрифосфат  
 БСА – бычий сывороточный альбумин  
 ПААГ – полиакриламидный гель  
 ТМРФ – тетраметилродамин-фаллоидин  
 ТЦМ – тяжелые цепи миозина  
 ЭГТА – этиленгликоль тетрауксусная кислота  
 F-актин – филаментарный актин  
 ТnC – тропонин С  
 NEM - N-этилмалеимид  
 сMyBPC (С-белок)- сердечный миозин-связывающий белок С  
 pCa - отрицательный десятичный логарифм концентрации кальция  
 pCa<sub>50</sub> – величина, при которой достигается половина максимальной скорости/силы (кальциевая чувствительность).

Никитина Лариса Валерьевна

**ВКЛАД НЕОДНОРОДНОСТИ БЕЛКОВ САРКОМЕРА В  
СОКРАТИТЕЛЬНУЮ ФУНКЦИЮ МИОКАРДА И ЕЕ РЕГУЛЯЦИЮ**

Специальность 03.03.01 - Физиология

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени

доктора биологических наук