

А. О. КОШКАРЯН, С. С. ОГАНЕСЯН

ТРИПТИЧЕСКОЕ ПЕРЕВАРИВАНИЕ МИОЗИНА МИОКАРДА ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ КОАРКТАЦИИ АОРТЫ

Изменения энзиматической активности и структуры миозина в условиях патологии сердца, по-видимому, обусловлены нарушением упорядоченности молекулярной структуры белка [1, 2], что может привести к изменению атакуемости его пептидных связей протеолитическими ферментами.

Согласно существующему представлению, скорость протеолиза в значительной степени зависит от состояния конформации молекулы белка [3, 4, 5]. Перевариваемость белка является тонким индикатором малейших сдвигов в его молекулярной структуре, которые могут не выявляться физическими методами исследования [6]. Сведения о протеолизе миозина в патологических условиях весьма ограничены, имеется указание на отсутствие изменений в интенсивности триптического распада миозина денервированных мышц [7]. Миозин же миокарда, обладая примерно равной миозину скелетных мышц спиральностью, отличается большей устойчивостью к трипсину [8, 9, 10]. Отсюда необходимость специального исследования этого вопроса очевидна.

Методы исследования. В опытах сравнивались интенсивность и скорость триптического распада миозина нормального и гипертрофированного миокарда собак (через 8—12 месяцев после экспериментальной коарктации аорты). Миозин выделяли из миокарда по Муеллеру [11]. Концентрацию белка определяли по Лоури и методом сжигания по азоту (16,2%).

Миозин инкубировали с трипсином («Дифко») в течение 30 мин. при $+18$ — $+26^{\circ}\text{C}$ в ультратермостате. Трипсин добавляли к раствору белка из расчета 0,5 мг на 25 мг белка, астворенного в KCl на 0,05 М фосфатном буфере, pH 6,8. Интенсивность триптического распада миозина на фрагменты (легкий и тяжелый меромиозины) оценивали по величине падения относительной вязкости ($\eta_{\text{отн.}}$), измеряемой вискозиметром типа Оствальда.

Результаты опытов. Известно, что повышение температуры инкубации фермента с субстратом ускоряет реакцию не только вследствие увеличения доли эффективных соударений. В случаях, когда идет протеолиз сложной макромолекулы, нужно полагать, что приобретают немаловажное значение и тепловые флуктуации в структуре самого субстрата. Отсюда можно допустить, что степень возрастания интенсивности триптического распада миозина в зависимости от температуры определяется способностью его к тепловым флуктуациям, т. е. стабилизированностью макромолекулы этого белка.

Из рис. 1 видно, что скорость триптического распада миозина гипертрофированного миокарда собак снижена. Если на 8-й минуте инкубации с трипсином $\eta_{\text{отн.}}$ миозина нормального миокарда падает на 8,6%, то вязкость миозина гипертрофированного миокарда — только на 6,1%. По мере повышения температуры инкубации скорость распада миозина гипертрофированного миокарда возрастает в меньшей степени, чем миозина нормального миокарда собак.

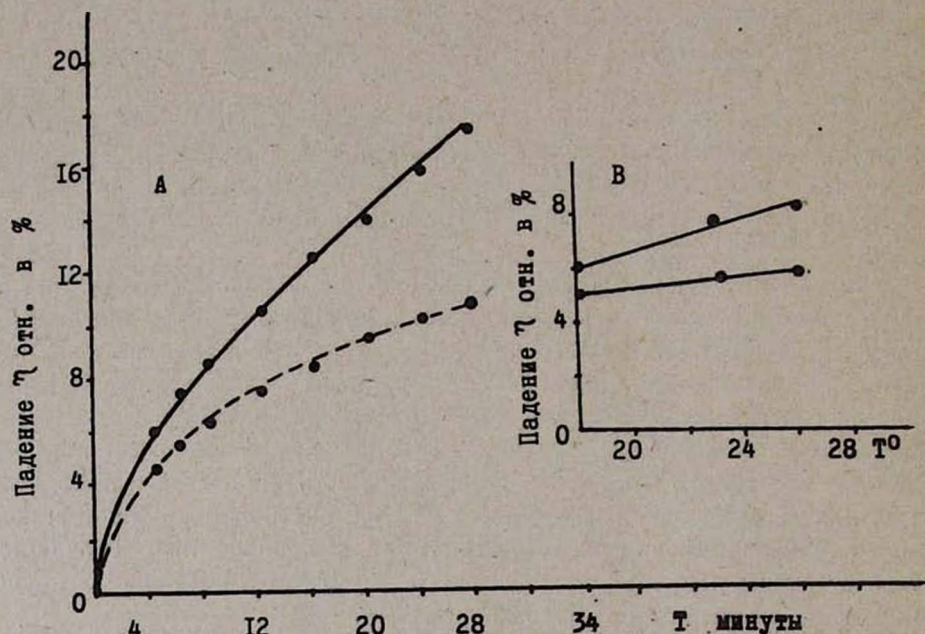


Рис. 1. А. Триптический распад миозина нормального и гипертрофированного (—) миокарда собаки в зависимости от времени инкубации, $T=23^\circ\text{C}$, $\text{pH } 6,8$. В скорость триптического распада миозина в зависимости от температуры инкубации (8-я минута переваривания). Верхняя линия — норма, нижняя — гипертрофия.

Повышение устойчивости миозина к трипсину объясняется меньшей атакуемостью пептидных связей в участке макромолекулы, связывающей L- и H-меромиозины. Причиной этого может служить изменение молекулярной структуры миозина или морфологии его частиц в растворе из-за образования агрегатов.

Результаты вискозиметрических измерений показали, что относительная вязкость миозина гипертрофированного миокарда обычно ниже таковой миозина нормального миокарда ($\eta_{\text{отн.}} = 1,88$) и составляет 1,45. Следовательно, возможно, что миозин гипертрофированного миокарда обладает высокой способностью образовывать агрегаты (вероятно, ди- или тримеры), преимущественно слипанием частиц бок о бок, что обуславливает уменьшение их аксиального соотношения и тем самым вязкости в ламинарном потоке. Это предположение подтверждается полученными нами ранее данными о снижении величины анизотропии частиц миозина гипертрофированного миокарда собак [12].

Одной из причин снижения атакуемости белка трипсином может служить нарушение состояния четвертичной структуры молекулы и затруднение взаимодействия с трипсином пептидных связей. Оценка значения этого фактора производилась в опытах, где изучали влияние возрастающих концентраций KCl (ионной силы растворителя) на скорость триптического распада миозина. Из рис. 2 видно, что повышение концентрации хлористого калия от 0,1 до 0,5 М вызывает некоторое усиление действия трипсина, а дальнейшее увеличение молярности вызывает обратное снижение интенсивности переваривания белка. Различия в действии хлористого калия на миозин нормального и гипертрофированного миокарда не обнаруживаются. Однообразно влияет хлористый калий и на величину относительной вязкости растворов миозина.

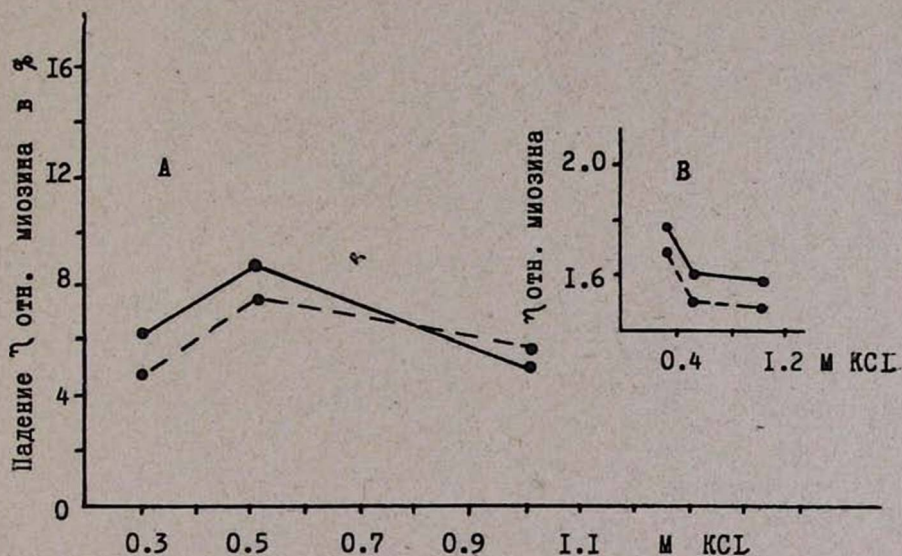


Рис. 2. А. Триптическое расщепление миозина нормального и гипертрофированного (—) миокарда в зависимости от концентрации хлористого калия (8-я минута переваривания). В. Влияние возрастающих концентраций хлористого калия на относительную вязкость миозина нормального и гипертрофированного миокарда ($T=23^{\circ}\text{C}$).

Очевидно, повышение ионной силы растворителя обуславливает ускорение протеолиза миозина вследствие небольших сдвигов в конформации частиц, выявляемых начальным снижением относительной вязкости. Однако однозначное усиление действия трипсина на миозин нормального и гипертрофированного миокарда позволяет считать, что при гипертрофии участки макромолекулы белка, ответственные за эффект хлористого калия, не изменены. Значительное снижение интенсивности протеолиза миозина при гипертрофии миокарда скорее объясняется дополнительной стабилизацией вторичной структуры белков. Так, например, денатурация белков усиливает действие протеолитических ферментов [13, 14].

В наших опытах была использована мочевины, способная в больших концентрациях вызвать изменения в структуре миозина, что сопровождается конформационным переходом белка. В малых концентрациях (0,1—0,5 М) мочевины четко повышала скорость протеолиза миозина только нормального миокарда. Увеличение ее концентрации до 3,0 М сопровождается первоначальным возвращением скорости протеолиза к исходной величине и вторичным усилением действия трипсина (рис. 3). Проявляется существенная разница в эффекте мочевины на миозин контрольного и гипертрофированного миокарда. Так, в присутствии 3,0 М мочевины в инкубационной среде интенсивность протеолиза миозина нормального миокарда возрастает более чем в 2 раза, а миозина гипертрофированного миокарда—всего на 50%.

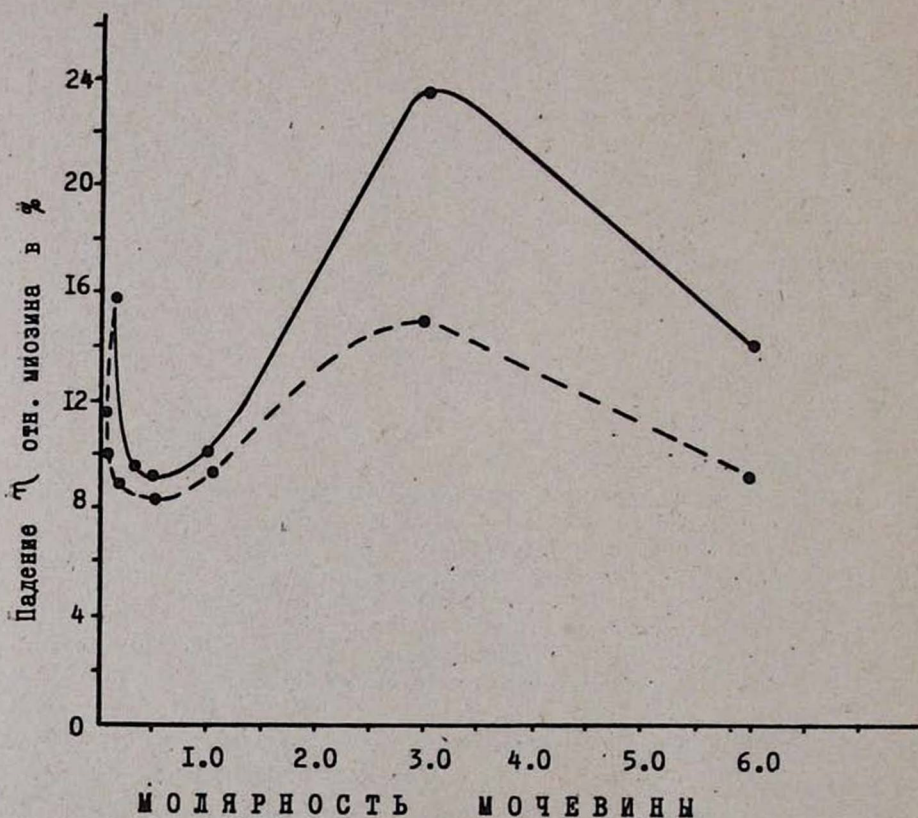


Рис. 3. Интенсивность триптического распада миозина нормального и гипертрофированного (— — —) миокарда в зависимости от концентрации мочевины (8-я минута переваривания), рН 6,8; $T=23^{\circ}\text{C}$.

Мочевина в концентрациях выше 3,0 М вызывает замедление ускоренного гидролиза пептидных связей, по-видимому, вследствие торможения активности самого трипсина [15, 16].

В настоящее время установлено, что в низких концентрациях мочевины (0,1—0,5 М) вызывает увеличение дисперсии оптического вращения

и уменьшение реактивности титруемых парахлормеркурибензоатом SH-групп миозина [17]. Это обусловлено сворачиванием молекулы миозина вследствие разрыва водородных и других связей, образованных гидрофильными группами, а также уменьшением гидрофобных взаимодействий [18, 19]. В данном случае, вероятно, происходит дополнительная стабилизация отдельных пептидных цепей и раскрытие участков, которые

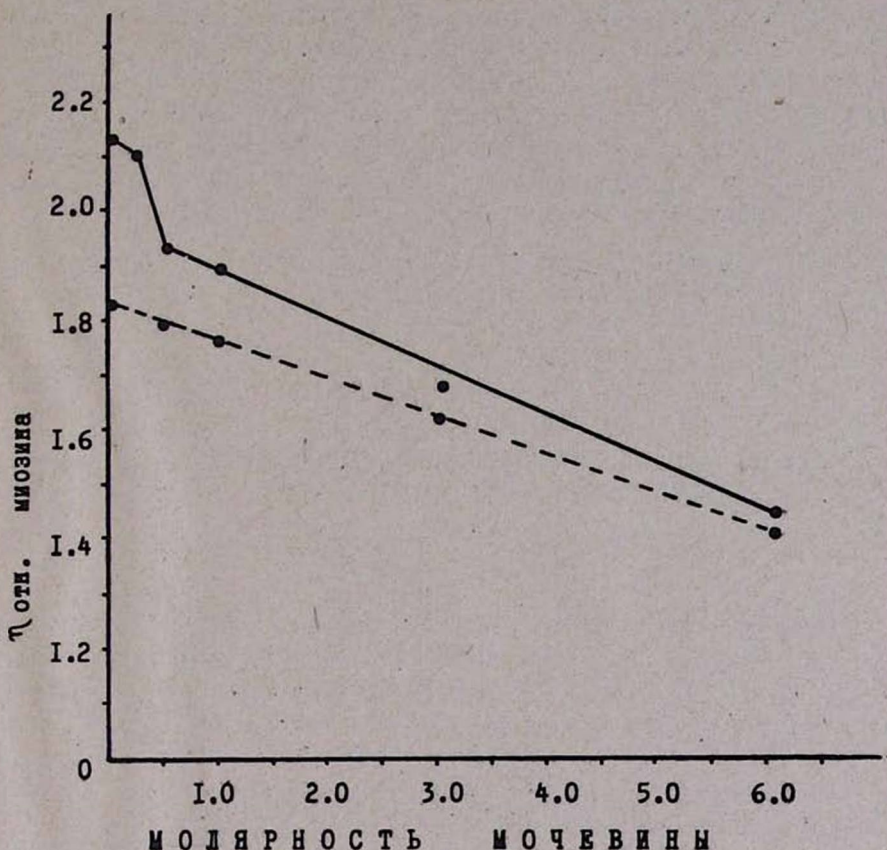


Рис. 4. Изменения относительной вязкости миозина миокарда в зависимости от концентрации мочевины в норме и при гипертрофии (— — —) Миокарда, рН 6,8; Т-23°C.

взаимодействуют с трипсином. Мочевина в более высоких концентрациях (выше 2,0 М) приводит к раскручиванию вторичной структуры белка, уменьшению процента спиральности из-за снятия гидрофобных взаимодействий внутри макромолекулы миозина [20, 21]. Деспирализация вторичной структуры и возникший выраженный конформационный переход [22] приводят к резкому возрастанию эффекта трипсина на пептидные связи, образованные на уровне вторичной структуры миозина, связывающие две субъединицы — легкий и тяжелый меромиозины.

Более слабый эффект мочевины на триптическое переваривание миозина гипертрофированного миокарда, по-видимому, обусловлен агреги-

рованностью частиц белка в растворе. Подтверждением такого предположения является небольшое изменение $\eta_{\text{отн.}}$ миозина гипертрофированного миокарда в присутствии возрастающих концентраций мочевины (рис. 4).

На основании полученных результатов можно заключить, что гипертрофия миокарда, вызванная экспериментальной коарктацией аорты, сопровождается изменениями в структуре миозина. Повышение устойчивости миозина к действию трипсина можно объяснить, во-первых, дополнительной стабилизацией вторичной структуры белка, во-вторых, усилением взаимодействия между отдельными молекулами и их агрегированием. В обоих случаях снижение атакующести пептидных связей должно обуславливаться экранировкой соответствующих групп, легко реагирующих с трипсином.

Институт кардиологии
сердечной хирургии
МЗ Арм. ССР

Поступило 1/XI 1969 г.

Ա. Շ. ԿՈՇԿԱՐՅԱՆ, Ս. Ս. ՂՈՎԱՆԵՆՍՅԱՆ

ՄԻՈԿԱՐԴԻ ՄԻՈԶԻՆԻ ՏՐԻՊՍԻՆԱՅԻՆ ՔԱՅՔԱՅՈՒՄԸ ԱՈՐՏԱՅԻ
ԷՔՍՊԵՐԻՄԵՆՏԱԼ ԵՆԴԱՑՄԱՆ ԴԵՊԵՆԴ

Ա մ փ ո փ ո լ մ

Շնորհի մոտաորոտայի էքսպերիմենտալ ենդացումը 8—12 ամիս հետո հանգեցնում է միոզինի մոլեկուլի կայունացմանը պրոտեոլիտիկ ֆերմենտներից մեկի՝ տրիպսինի նկատմամբ: Հիպերտրոֆիայի ենթարկված սրտամկանի միոզինը ալկալի դժվար է փոխում իր կառուցվածքը հանդես միզանյութի, լուծիչի իոնական ուժի և չեղմային պայմանների փոփոխման: Ենթադրվում է, որ սրտամկանի գերաճը ուղեկցվում է միոզինի երկրորդային ստրուկտուրայի կայունության լրացուցիչ բարձրացումով:

A. O. KOSHKARIAN, S. S. OGANESIAN

TRYPTIC DIGESTION OF MYOCARDIAL MYOSIN IN
EXPERIMENTAL COARCTATION OF THE AORTA

S u m m a r y

An experimental coarctation in dogs in 8—12 months results in an increased resistance of myosin to the effect of trypsin. The decrease in the rate and intensity of hydrolysis of peptide links, the weaker action of urea, the increase in ionic strength of the solvent and temperature affect the rate of tryptic decomposition of myosin in the hypertrophic heart indicate an additional increase in the stability of its secondary structure.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Оганесян С. С. Докт. диссерт., Ереван, 1967.
2. Оганесян С. С. III между-биофиз. конгресс, Нью-Йорк, 1969.
3. Putnam F. W. et al. J. Gen. Physiol., 26, 6, 513, 1943.
4. Fukushi T., Ymontshi A. et al. J. Biochem., 63, 4, 409, 1968.
5. Zito R. et al. J. Biol. Chem., 239, 6, 1804, 1964.
6. Александров В. Я. Успехи совр. биол. 67, 3, 383, 1969.
7. Schapira G., Dreyfus J. C. C. R. Soc. Biol., 62, 1705, 1958.
8. Brahm J., Kay C. M. J. Biol. Chem. 238, 1, 198, 1963.
9. Mueller H., Thelner M., Olson A. R. J. Biol. Chem., 239, 7, 2153, 1964.
10. Ellenbogen E., Yengar R. et al. J. Biol. Chem. 235, 9, 2642, 1960.
11. Mueller H. J. et al. J. Biol. Chem., 239, 5, 1447, 1964.
12. Дадиванян А. К., Кошкарян А. О. I Респуб. сессия по общ. вопр. мол. биол. и биофиз. Тезисы докл. 1967, Ереван.
13. Lineaver, Haover, J. Biol. Chem., 137, 1, 325, 1941.
14. Gorini L., Audrian L. Biochem. Biophys. Acta, 19, 2, 289, 1956.
15. Wismanatha, Liener. Arch. Biochem. Biophys., 56, 1, 222, 1955.
16. Harris J. J. Nature, 177, 471, 1956.
17. Fujisaki Jasuo. J. Sci. Hiroshima Univ. Ser. A. Div., 2, 25, 1961.
18. Jencks W. P. Fed. Proc. 24, 2, Suppl. 15:50, 1965.
19. Nemethy G. Fed. Proc. 24, 2, Suppl. 15; 38, 1965.
20. Small P. A., Harrington W. F. et al. Biochem. Biophys. Acta, 49, 462, 1961.
21. Straecher A. J. Biol. Chem., 236, 9, 2467, 1961.
22. Takashina H., Kasuya Minoru. Arch. Biochem. Biophys., 118, 2, 475, 1967.