

ДВУМЕРНЫЙ ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ БЕЛКОВ МИОКАРДА ПРИ НЕКОТОРЫХ ФОРМАХ СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТОЙ ПАТОЛОГИИ ЧЕЛОВЕКА.

Л.И. КОВАЛЕВ, В.В. СЕВЕРИН, Е.С. ЕРШОВА, И.В. ЛУКАШОВА, М.А. КОВАЛЕВА,
С.С. ШИШКИН.

Медико-генетический центр РАМН, Москва

Институт трансплантологии и искусственных органов МЗ РФ, Москва.

Методом двумерного электрофореза изучен белковый состав миокарда человека при сердечно-сосудистой патологии. При дилатационной кардиомиопатии и ишемической болезни сердца выявлено накопление трансферрина в миокарде и усиление экспрессии белка с Мм 18,3 кД/рI 5. Кроме этого, при ишемической болезни сердца отмечено увеличение количества фетальной изоформы легкой цепи миозина. Также выявлено изменение частоты встречаемости одной из полиморфных белковых систем.

Ключевые слова: двумерный электрофорез, белки миокарда, сердечно-сосудистая патология.

ВВЕДЕНИЕ. Качественные и количественные изменения на уровне белков миокарда обнаруживаются при многих сердечно-сосудистых заболеваниях [1-4] отражая как первичные, так и вторичные изменения метаболизма сердечной мышцы. Эти данные представляются весьма важными для расшифровки молекулярных основ патогенеза соответствующих болезней. Сравнительно недавно для этих целей начал применяться двумерный электрофорез по О'Фаррелу (2 DE) - метод, позволяющий параллельно анализировать сотни или даже тысячи белков и обладающий целым рядом других преимуществ [5, 6]. Благодаря его использованию, несколько групп исследователей, изучая белки в эндомикардиальных биоптатах пациентов с некоторыми формами сердечно-сосудистой патологии, обнаружили ряд характерных изменений [7-9]. Однако трудности изучения многокомпонентного белкового состава в миокарде, сложности получения эндомикардиальных биоптатов и проблематичность применения аутопсийных материалов для изучения молекулярных процессов в миокарде при сердечно-сосудистых болезнях заметно сдерживают проведение подобных исследований.

В ранее выполненных работах нам удалось с помощью 2 DE анализа построить двумерную карту - схему распределения 282 белков миокарда человека, сформировать компьютерный банк данных этих белков и оценить влияние аутолитических процессов на белки миокарда в течение первых трех суток после смерти человека [10, 11]. На этой основе в данном исследовании было проведено сравнительное изучение белков миокарда, полученных от лиц, страдавших кардиомиопатиями, ишемической болезнью сердца, миокардиатами, и некоторыми другими заболеваниями.

МЕТОДИКА. В работе использовались биоптаты и аутопаты миокарда человека со сроками аутолиза не более 3 ч. До исследования образцы хранились при -70° С. Приготовление образцов для фракционирования двумерным электрофорезом, фракционирование двумерным электрофорезом по О'Фаррелу с некоторыми модификациями проводили как описано ранее [10, 12]. Для визуализации белков использовали

окрашивание гелей кумасси голубым R-250 [12] и/или азотнокислым серебром [14]. Цитозольную и миофибрилярно-ядерную фракции миокарда получали гомогенизацией ткани в 0,25 М растворе сахарозы и дифференциальным ультрацентрифугированием при 105 000 g. Анализ электрофореграмм выполняли как визуально, используя модифицированный подход Камингса [15], так и с применением лазерной денситометрии на приборе Ultrascan XL (Pharmacia, Швеция) в комплексе с компьютером IBM PC/AT. Компьютерная обработка результатов денситометрии осуществлялась с помощью пакета программ Gelscan 2 фирмы-производителя. Частоты встречаемости полиморфных вариантов оценивали на основании критерия хи-квадрат [16].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. В таблице представлены общие характеристики изучавшихся образцов сердечной мышцы, полученных как от лиц не страдавших сердечно-сосудистой патологией (контрольная группа), так и от пациентов с теми или иными болезнями сердечно-сосудистой системы.

Таблица. Распределение больных сердечно-сосудистой патологией по полу и клиническим формам.

Клиническая форма	Мужчины	Женщины	Всего больных
Дилатационная кардиомиопатия	8	4	12
Гипертрофическая кардиомиопатия	2	-	2
Ишемическая болезнь сердца	10	6	2
Миокардит	3	2	5
Патология клапанов	4	1	5
Контроль, норма	72	33	105

Детальное описание электрофореграмм образцов контрольной группы, построение на этой основе усредненной схемы - двумерной карты, опубликованные ранее [10, 15], и другие данные [17, 18, 11], позволили осуществить поиск изменений на уровне белков у лиц с различными формами сердечно-сосудистых заболеваний.

При миокардите, клапанной патологии и ГКМП среди анализируемого спектра белков различий выявлено не было.

У 8 из 12 пациентов с ДКМП наблюдалось увеличение от умеренного до выраженного количества пятна белка с молекулярной массой 79,4 кД и изоэлектрической точкой 6,60 (номер по карте 4900660). Ранее оно было нами идентифицировано по результатам определения фрагментов аминокислотной последовательности как соответствующее трансферрину [10].

Кроме этого у 6 из 12 больных с ДКМП также было отмечено увеличение количественного содержания белка с молекулярной массой 18,3 кД и изоэлектрической точкой 5,93 (N 4263593). Наша попытка идентифицировать эту фракцию при анализе белков лиц контрольной группы, используя N-концевое микросеквенирование, пока оказалась безуспешной, вероятно из-за блокирования N-концевой аминокислоты. Такое предположение подтверждено сообщением Baker et al., которые отмечали блокирование N-концевой аминокислоты данного белка [7].

Однако, в сообщении Jungblut et al. недавно приведены результаты определения аминокислотного состава данного полипептида, что позволило идентифицировать его как проэндотелин 3 [19].

Полученные нами результаты показывают, что количественное содержание белка N 4263593 варьирует в образцах одного и того же больного, в зависимости от того из какой зоны миокарда образец ткани был взят для анализа.

Такие изменения в некоторой степени коррелировали с данными об очаговости поражения сердца при ДКМП.

По результатам изучения субклеточной локализации (сравнения двумерных электрофореграмм белков цитозольной и миофибрилярно-ядерной фракций миокарда) можно предположить, что этот полипептид относится к белкам, локализованным в митохондриально-ядерной фракции.

В группе больных с ИБС было обнаружено, также как и при ДКМП, усиление экспрессии белка N 4900660 (трансферрина) у 9 из 16 пациентов и фракции N 4263593 с молекулярной массой 18.3 кД и pI 5.93 (7 из 16 пациентов), хотя степень усиления была менее выраженной, чем при ДКМП. По-видимому, отмеченные изменения являются вторичными, хотя, возможно, они и играют определенную роль в патогенезе изученных заболеваний. В последующем представляется возможность осуществить точную идентификацию белка N 4263593, что может способствовать лучшему пониманию его роли в развитии гипертрофии миокарда.

Увеличение количества белка во фракции N 4900660 (трансферрина) в миокарде у лиц с сердечно-сосудистой патологией разного генеза может быть как следствием метаболических сдвигов и накопления белка в ткани, так и следствием усиления экспрессии соответствующего гена. К настоящему времени известно, что ген трансферрина экспрессируется помимо печени, и в фетальной мышечной ткани [20]. По опубликованным нами ранее данным, в миокарде фракция трансферрина относится к мажорным компонентам среди белков на ранних сроках пренатального развития [17]. Однако на сроке 21-23 недель развития наблюдалось нарушение представленности этого белка, что позволяет думать об уменьшении уровня экспрессии гена трансферрина. Из литературных данных известно об усилении синтеза трансферрина при воздействии целого ряда физиологических факторов [21], но аналогичен ли процесс регуляции синтеза трансферрина в печени наблюдаемым изменениям содержания белка в мышечной ткани - этот вопрос остается открытым. По другим белкам-маркерам онтогенеза, в том числе и тем, гены которых репрессируются позже (например эмбриональная легкая цепь миозина), координированных изменений с усилением пятна трансферрина не было выявлено.

В группе больных ИБС у одного из пациентов было выявлено выраженное усиление количества белка во фракции фетальной ЛЦМ, при отсутствии изменений по другим маркерам эмбриогенеза, описанных ранее [18]. Возраст пациента к моменту получения биопсии достигал 40 лет. В принципе можно предполагать, что подобное изменение возникло или из-за функциональной незрелости ткани сердца, или из-за каких-то изменений в составе мышечных волокон в ткани желудочка и компенсаторным появлением фетальной изоформы. Кроме того, известно, что фетальная форма экспрессируется у взрослых лиц в ткани предсердий как специфичная ЛЦМ-1 предсердий [22, 23]. Вместе с тем, в изучавшемся образце других белковых маркеров, характерных для предсердий, также не выявлялось, и, следовательно, по всей видимости изменения фетальной ЛЦМ не могут быть объяснены появлением в ткани желудочков мышечных волокон предсердного типа.

В работе Hirzel et al. [24] отмечено увеличение количественного содержания фетальной ЛЦМ в ткани желудочков при ряде форм сердечно-сосудистой патологии, и особенно при ДКМП.

В нашей выборке, в изученных образцах количество фетальной ЛЦМ желудочков у лиц с сердечно-сосудистой патологией варьировало. Но эти колебания были сходны с наблюдавшимися в контрольной группе, за исключением вышеописанного случая.

При изучении образцов миокарда у лиц контрольной группы ($n=105$) были обнаружены три группы белков, которые можно было расценить как полиморфные системы, коррелирующие с двухаллельным состоянием (выявились три электрофоретических фенотипа 1-1, 1-2 и 2-2, по результатам компьютерной денситометрии отмечался эффект дозы гена, а рассчитанные частоты встречаемости соответствовали ожидаемым из равновесия Харди-Вайнберга) [10]. Оценка полученных результатов проводилась методом хи-квадрат. При изучении образцов миокарда от лиц с сердечно-сосудистой патологией в группе больных с ИВС наблюдалось смещение частоты встречаемости одного из выявленных полиморфных вариантов, при этом наблюдаются три фенотипа данной полиморфной системы, когда у части лиц выявляется только белок с M_r/pI 26.0 кД/6.65, у ряда других есть как этот вариант так и более низкомолекулярный, и с несколько другим значением pI 24.5 кД/6.54, а в третьей части обследованных есть только вариант более низкомолекулярного белка. Из 15 лиц с ИВС более высокомолекулярная форма найдена у 3 человек, у 4 отмечено наличие обоих форм и у 8 найдена только низкомолекулярная фракция. Если в норме частота встречаемости высоко-/низкомолекулярного вариантов составили $f_1=f_0.535/f_2=0.465$, то в группе больных ИВС частоты встречаемости составили $f_1=0.333/f_2=0.667$ ($P < 0.005$). Подобное смещение частот в группе больных может свидетельствовать о связи низкомолекулярного варианта белка с патогенезом ИВС. По результатам изучения субклеточной локализации данная полиморфная система имеет смешанную локализацию, и представлена как в цитозольной, так и в миофибрилярно-ядерной фракции. Представляет интерес проведение дальнейшей идентификации данных полиморфных белков, что возможно осуществить используя микросеквенирование, как это было сделано ранее для ряда полипептидов миокарда человека [17, 10].

Таким образом, проведенный анализ показывает перспективность дальнейшего использования двумерного электрофореза белков миокарда для изучения молекулярных основ патогенеза отдельных сердечно-сосудистых заболеваний.

ЛИТЕРАТУРА

1. Feldman A., Cates A., Veazey W., Hershberger R., Bristow M., Baughman K., Baumgartner W., Vandop. (1988) J. Clin. Invest. **82**. 189-197.
2. Ladensen P., Sherman S., Baughman K., Ray P., Feldman A. (1992). Proc. Nat. Acad. Sci. USA. **89**. 5251-5255.
3. Mercadier J., Bouveret B., Gorza L., Schiaffino S., Clark W., Zak R., Swynghedauw B., Schwartz K. (1983). Circ. Res. **53**. 52-59.
4. Schwartz K., Carrier L., Lompre A., Mercadier J., Boheler K. (1992). Basic Res. Cardiol. **87**. 285-290.
5. O'Farrell P.H. (1975). J. Biol. Chem. **250**. 4007-4021.
6. O'Farrell P.H., Goodman H.M., O'Farrell P.Z. (1977). Cell. **12**. 1133-1142.

7. Baker C.S., Corbett J.M., May A.J., Yacoub M.H., Dunn M.J. (1992). *Electrophoresis*. **13**. 723-726.
8. Jungblut P., Otto A., Regitz V., Fleck E., Wittmann-Liebold B. (1992). *Electrophoresis*. **13**. 739-741.
9. Knecht M., Regitz-Zagrosek V., Pleissner K.-P., Emig S., Jungblut P., Hildebrandt A. A and Fleck E. (1994). *Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* **32**. 615-624.
10. Kovalyov L.I., Shishkin S.S., Efimochkin A.S., Kovalyova M.A., Ershova E.S., Egorov T.A. Musalyamov A.K. (1995) *Electrophoresis*, **16**.
11. Цветкова М.Н., Ковалев Л.И., Шишкин С.С. (1993) *Вопр. мед. химии*. **39**, 31-34.
12. Tsvetkova M.N., Kovalyov L.I., Laptev A.V., Shishkin S.S. (1991). *Electrophoresis*. **12**. 576-578.
13. Fairbanks G., Steck T.L., Wallach D.F.H. (1971). *Biochemistry*. **10**. 2607-2617.
14. Blum H., Beir H., Cross H.G. (1987). *Electrophoresis*. **8**. 126-129.
15. Пуляева Е.В., Ковалев Л.И., Цветкова М.Н., Шишкин С.С., Болдырев Н.И. (1990). *Биохимия*. **55**. 489-498.
16. Животовский Л.А. (1983). *Итоги науки и техники. Общая генетика*. Т.8. Теоретическая популяционная генетика. М. ВИНТИ. 76-104.
17. Лантев А.В., Шишкин С.С., Егоров Ц.А., Ковалев Л.И., Цветкова М.Н., Галюк М.А., Мусалымов А.Х. (1994). *Мол. биология* **28**. 51-57.
18. Цветкова М.Н., Ковалев Л.И., Феценко С.П., Шишкин С.С. (1992). *Онтогенез*. **23**. 351-363.
19. Jungblut P., Otto A., Zeindl-Eberhart E., Pleibner K.P., Knecht M., Regitz-Zagrosek V., Fleck E. and Wittmann-Liebold B (1994) *Electrophoresis*, **15**, 685-707.
20. Schaeffer E., Boissier F., Py M., Cohen C., Zakin M. (1989). *J. Biol. Chem.* **264**. 7153-7160.
21. Idserda R.L., Hulberg H., Finch G.A., McKuigt S.L. (1986). *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. **83**. P. 3723-3727.
22. Barton P.J., Buckingham M.E. (1985). *Biochem. J.* **231**. 249-261.
23. Emerson C.P., Bernstein S.I. (1987). *Ann. Rev. Biochem.* **56**. 695-726.
24. Hirzel H., Tuchschild C., Schneider J., Krayenbuehe H., Schaub M. (1985). *Circul. Research*. **37**. 729-740.

2D ELECTROPHORETIC ANALYSIS OF MYOCARDIAL PROTEINS AT SOME [HUMAN] CARDIOVASCULAR PATHOLOGIES

L.I. KOVALYOV, V.V. SEVERIN, E.S. YERSHOVA, T.V. LUKASHOVA, M.A. KOVALYOVA AND
S.S. SHISHKIN

Center of medical Genetics (?), RAMS, Moscow
Institute of Transplantology and Artificial Organs. RF Ministry of Health Moscow

The protein composition of human myocardium at some cardiovascular pathologies was studied by use of 2D electrophoresis. It was found that dilatation(al) cardiomyopathy and ischemia are both characterized by transferrin accumulation in myocardium and by enhanced expression of a protein with Mm 3 kD/pI 5. Besides that, at ischemic disease there was seen an elevation of the fetal isoform in the light chain of myosin. For one of the polymorphous protein systems, the occurrence rate changes were also recorded.

Key Words: 2D electrophoresis, myocardial proteins, cardiovascular pathologi