



УДК 577.152

В. И. Бобык, А. В. Веберов, Д. В. Рябенко,
Г. В. Дубровская, Н. В. Роднин, Л. Л. Сидорик

ВЫДЕЛЕНИЕ ОСНОВНЫХ ТКАНЕСПЕЦИФИЧЕСКИХ АНТИГЕНОВ ИЗ МИОКАРДА ЗДОРОВЫХ ЛИЦ И БОЛЬНЫХ ДИЛЯТАЦИОННОЙ КАРДИОМИОПАТИЕЙ

Описаны методы выделения основных тканеспецифических антигенов нормального и пораженного дилатационной кардиомиопатией (ДКМП) миокарда (актин, миозин и тропомиозин) и аорты человека, исследованы их физико-химические свойства. Показано существенное снижение содержания данных белков в пораженном ДКМП миокарде по сравнению с нормальным.

Введение. При ряде патологий сердечно-сосудистой системы человека обнаружены аутоантитела к различным белкам, а также надмолекулярным структурам миокарда [1]. Одним из заболеваний, при которых существенный вклад в развитие патологических процессов вносят аутоиммунные реакции, является дилатационная кардиомиопатия (ДКМП).

Сократительный аппарат мышечных волокон представляет собой многокомпонентную белковую систему, в состав которой входят около 20 различных протеинов. Среди них миозин, актин, тропомиозин, α -, β -, γ -актинины и др. белки, выделению и изучению которых посвящен ряд исследований [2—5]. В наибольших количествах представлены три первых белка, содержание которых составляет 55, 15 и 3 % соответственно. Кроме того, данные белки играют наиболее существенную роль в процессах сокращения миокарда, в связи с чем нарушения в их функционировании могут обуславливать несостоятельность сердечной мышцы при ДКМП, приводящей к развитию сердечной недостаточности.

С нашей точки зрения, исследование аутоантителогенеза против актина, миозина, тропомиозина миокарда, а также белков аорты (коллагены, структурные D-гликопротеиды, эластин) позволит изучить процессы возникновения и развития указанного заболевания.

Данная работа посвящена выделению и очистке препаратов тканеспецифических антигенов из миокарда и аорты человека для дальнейших иммунохимических исследований.

Материалы и методы. Ткани нормального миокарда и миокарда больных ДКМП любезно предоставлены сотрудниками УкрНИИ кардиологии им. акад. Н. Д. Стражеско. До выделения антигенов ткань освобождали от жира и тщательно отмывали от остатков крови холодной дистиллированной водой.

Гомогенат ткани миокарда экстрагировали раствором Бейли (0,5 М KCl, 0,03 М NaHCO₃), после чего разводили в 20 раз холодной бидистиллированной водой. В результате актомиозиновый комплекс выпадал в осадок. Осадок собирали центрифугированием и использовали для выделения актина и миозина.

© В. И. Бобык, А. В. Веберов, Д. В. Рябенко, Г. В. Дубровская, Н. В. Роднин,
Л. Л. Сидорик, 1993

Полученный актомиозиновый комплекс растворяли в 0,5 М КСl, после чего добавляли 1,5 объема воды и оставляли до выпадения осадка. Для оценки нативности выделенного препарата миозина определяли его АТФазную активность [6].

Ацетонированный осадок актомиозинового комплекса после удаления ацетона растворяли в воде. Далее высаливали при 25 % насыщения сульфата аммония. После диализа препарат актина растворяли в буфере, содержащем АТФ и ионы Ca^{2+} , а затем доочищали на колонке DEAE-Тоуорепарl 650М (рис. 1) [7].

Гомогенат ткани миокарда экстрагировали водой, затем центрифугировали и удаляли примеси липидов обработкой этанолом и эфи-

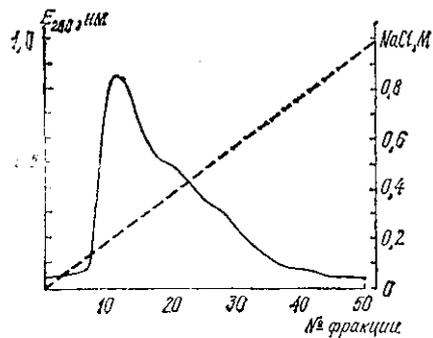


Рис. 1. Хроматография препарата актина на DEAE-Тоуорепарl 650М. Колонка 1,5×20 см. Элюция линейным градиентом 0—1 М NaCl в буфере: 50 мМ трис-НСl, рН 8,0, 0,5 мМ АТФ, 0,2 мМ CaCl_2

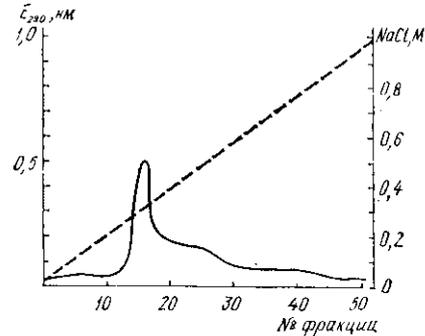


Рис. 2. Хроматография препарата тропомиозина на DEAE-Тоуорепарl 650М. Колонка 1,5×20 см. Элюция линейным градиентом 0—1 М NaCl в 50 мМ Na-фосфатном буфере, рН 8,0

ром. Осадок экстрагировали 1 М КСl, после чего рН раствора доводили соляной кислотой до 4,3. Полученный осадок собирали центрифугированием, разводили водой в 5 раз и доводили рН раствора до 7,0 с помощью NaHCO_3 . Из полученного раствора тропомиозин высаливали при насыщении сульфата аммония 41—70 %. После диализа препарат тропомиозина дополнительно очищали на колонке с DEAE-Тоуорепарl 650М (рис. 2).

Для выделения антигенов из аорты человека использовали последовательную экстракцию гомогената ткани 1 М CaCl_2 (коллаген I); 2,5 %-м NaCl (коллаген II), 2 %-й трихлоруксусной кислотой (коллаген III), 5 %-й ТХУ при 40 °С (структурные D-гликопротеиды) и 0,5 М KOH (эластин). Полученные препараты белков концентрировали диализом против воды, в результате чего структурные белки аорты выпадали в осадок [8].

Чистоту препаратов антигенов контролировали с помощью электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ) с DS-Na по методу Лэммли [9] в градиенте концентрации акриламида 7—22 %. Молекулярную массу полученных антигенов определяли с помощью калибровочной кривой для смеси стандартных белков.

Концентрацию белка находили по методу Брэдфорда [10], а также спектрофотометрически, используя определенные нами коэффициенты молярной экстинкции $A_{280}^{1\text{см}}$ 1,2; 1,24; 1,4 для миозина, актина и тропомиозина соответственно.

Результаты и обсуждение. В таблице приведены сравнительные выходы основных белков из нормального и пораженного ДКМП миокарда человека. Видно, что выход белков из нормального миокарда существенно выше. Очевидно, это объясняется разрушением части кардиомиоцитов при ДКМП и заменой соединительнотканными компонентами значительной части мышечной ткани.

По данным электрофореза в ПААГ, миозин из сердца человека представлен двумя субъединицами (рис. 3), которые соответствуют легкой (около 30 000) и тяжелой (около 200 000) цепям миозина. В отличие от миозина из сердечной мышцы быка, в котором легкая цепь представлена двумя молекулярными формами с M_r 27 000 и 19 000, в миокарде человека легкая цепь либо не образует двух молекулярных форм, либо они имеют одинаковую молекулярную массу.

Полученный нами препарат актина представлял собой при электрофорезе в ПААГ одну полосу с M_r около 40 000, что соответствует литературным данным о молекулярной массе актинов из других источников. Определенная нами изоэлектрическая точка для данного белка (около 5,5) дает возможность отнести его к α -форме актина. Следует отметить, что изоэлектрические точки не отличались для актина из нормального и пораженного ДКМП миокарда.

Из литературных данных [7] известно, что молекула тропомиозина представляет собой димер, состоящий из двух субъединиц с M_r около 33 000, при этом каждая из них содержит по

Сравнительное содержание основных сократительных белков миокарда здоровых лиц и пораженного ДКМП

Белок	Нормальный миокард, %	Пораженный ДКМП миокард, %
Актин	100	50
Миозин	100	54
Тропомиозин	100	61

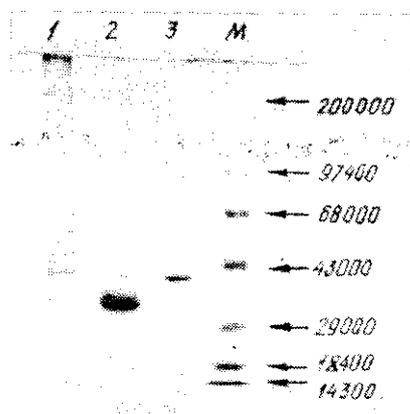


Рис. 3. Электрофорез в денатурирующих условиях тканеспецифических антигенов из миокарда человека: 1 — миозин, 2 — тропомиозин, 3 — актин, М — смесь стандартных белков (тяжелая цепь миозина, 200 000; фосфоорилаза В-97,4000; бычий сывороточный альбумин, 68 000; овальбумин 43 000; карбоангидраза, 29 000; β -лактоглобулин, 18 000; лизоцим, 14 300)

284 остатка аминокислот. При исследовании полученного нами препарата обнаружена одна основная полоса с M_r около 32 000. Во всех препаратах присутствовала также минорная полоса с M_r около 30 000. Вероятно, она представляет собой примесь тропонина, который весьма прочно ассоциирован с тропомиозином, и разделение их без существенной денатурации препарата белка затруднительно. В работе [11] показано, что субъединицы тропомиозина из скелетных мышц кур идентичны по молекулярной массе, но различаются по изоэлектрической точке. В то же время нами при изоэлектрофокусировании обнаружена лишь одна полоса с изоэлектрической точкой около 5,8. Различия в изоэлектрических точках субъединиц тропомиозина связывают с их различным фосфорилированием. Очевидно, в случае тропомиозина, полученного из миокарда человека, субъединицы данного белка фосфорилированы одинаково.

Таким образом, полученные нами данные свидетельствуют о том, что препараты тканеспецифических белков из миокарда человека достаточно гомогенны, по своим физико-химическим свойствам схожи с аналогичными белками из других источников и могут быть использованы в качестве аутоантигенов для дальнейших иммунохимических исследований.

Резюме. Описано методи виділення основних тканинспецифічних антигенів нормального та ураженого дилатативною кардіоміопатією (ДКМП) міокарда (актин, міозин, тропомиозин) і аорти людини, досліджено їх фізико-хімічні властивості. Показано суттєве зниження вмісту згаданих білків в ураженому ДКМП міокарді порівняно з нормальним.

