

НОВАЯ РОЛЬ МИОГЛОБИНА В ФУНКЦИОНИРОВАНИИ СЕРДЕЧНОЙ И СКЕЛЕТНЫХ МЫШЦ

© 2016 г. Н.В. Кулева, И.Е. Красовская

Санкт-Петербургский государственный университет, 199034, Санкт-Петербург, Университетская наб., 7/9

E-mail: nadezhda.kuleva@gmail.com

Поступила в редакцию 15.06.16 г.

В течение длительного времени миоглобин рассматривали как внутриклеточный гемосодержащий глобин, участвующий в транспорте и хранении кислорода внутри клеток сердечной и скелетных мышц. В связи с открытием его способности превращать нитрит в оксид азота при гипоксии была показана его новая роль в гипоксическом сигналинге, регулирующем функции электрон-транспортной цепи митохондрий. В статье приведены данные, подтверждающие эту точку зрения и значение вновь открытого свойства для функционирования сердечной и скелетных мышц.

Ключевые слова: миоглобин, нитрит-редуктазная активность, оксид азота.

Миоглобин (Mb) является одним из наиболее исследованных цитозольных белков мышечной ткани [1]. Он экспрессируется у наземных животных в количестве 3–10 мг на 1 г массы влажной ткани и еще значительно больше у морских ныряющих млекопитающих (до 95 мг на 1 г ткани). Этот специфичный для мышечной ткани белок является представителем семейства глобинов, имеет типичную для глобинов третичную структуру («глобиновый изгиб») и состоит из одной полипептидной цепи, содержащей 146–153 аминокислотных остатков (в зависимости от вида животного).

Наиболее известными функциями Mb являются хранение кислорода и транспортирование его к митохондриям внутри миоцитов сердечной и скелетных мышц позвоночных животных. Миоглобин кашалота был первым белком, охарактеризованным с помощью рентгеноструктурного анализа, и с 1959 г. считался наилучшей моделью для изучения структурно-функциональных отношений в белках [1].

В течение последних 15 лет наши знания о функциональной роли миоглобина в значительной степени расширились. Оказалось, что миоглобин может выполнять функции, отличные от хранения и облегченной диффузии кислорода. Он может связывать и освобождать *in vivo* оксид азота (NO), одну из главных сигнальных молекул, играющую критическую роль в контроле поглощения кислорода, вазодилатации (расширения) сосудов и защиты клеток от активных форм кислорода. Было показано, что

миоглобин может экспрессироваться и в немышечных клетках – эндотелии кровеносных сосудов, ткани печени и мозга – и иметь разные изоформы. Более того, оказалось, что функциональные свойства миоглобина (средство к кислороду и нитрит-редуктазная ферментативная активность) коррелируют с физиологией и метаболическими потребностями организма, в том числе с толерантностью к гипоксии у рыб и ныряющих млекопитающих [2].

Открытие ферментативных свойств миоглобина и его экспрессии в немышечных клетках в чем-то подобно открытию в немышечных клетках нетрадиционных миозинов и указывает на то, что миоглобин, подобно миозину, прошел долгий эволюционный путь, прежде чем стал типичным переносчиком кислорода в скелетных и сердечной мышцах. Действительно, эволюционное древо глобинов начинается с белков, аналогичных флавоглобинам, и на примере эволюции глобинов мы можем видеть, что «вновь открытые» у миоглобина позвоночных свойства существовали много миллионов лет назад у глобинов прокариот [3,4]. Поэтому настоящая статья посвящена «вновь открытым» свойствам миоглобина и механизмам их участия в адаптации к гипоксии у позвоночных животных.

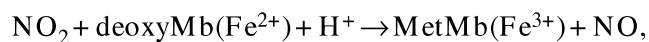
Как уже отмечено, оксид азота (NO) является одной из наиболее важных сигнальных молекул в живых организмах. Энзиматически он может образовываться двумя путями: из аргинина с помощью NO-синтаз и из нитрита с помощью нитрит-редуктаз. Первый вариант действует при нормальной концентрации кислорода, второй осуществляется, главным об-

Сокращения: NO – оксид азота, Mb – миоглобин.

разом, при недостатке кислорода, когда кислородзависимая система NO-синтаз оказывается блокированной и ее функции не могут осуществляться [5]. В этих условиях в качестве источника NO может использоваться нитрит, образующийся в плазме крови позвоночных животных с помощью Cu-содержащего белка церулоплазмينا из NO или из нитрата, поступившего в организм с пищей и подвергшегося действию нитрат-редуктаз.

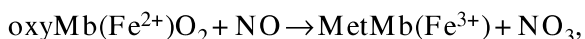
Преобразование нитрита в NO, т. е. катализ нитрит-редуктазной активности, может осуществляться в различных компартментах клетки и связано с гемовыми структурами, железоз- и серосодержащими кластерами или молибденсодержащими ферментами [6]. Изучение метаболизма нитрита в различных тканях в широком диапазоне парциального давления кислорода [7] показало, что нитрит-редуктазная активность пропорциональна относительной экспрессии обладающего нитрит-редуктазной активностью ферментативного белка в ткани и может быть различной для разных белков и у различных видов животных.

В начале нашего столетия нитрит-редуктазная активность в условиях гипоксии была продемонстрирована у гемосодержащих глобинов позвоночных: гемоглобина, миоглобина, цитоглобина, нейроглобина и других [3,8]. Нитрит-редуктазная активность проявляется только при гипоксии, когда глобины находятся в деоксигенированной форме:



где $\text{deoxyMb}(\text{Fe}^{2+})$ – дезоксимиоглобин, $\text{MetMb}(\text{Fe}^{3+})$ – метмиоглобин.

В условиях нормоксии глобины могут действовать как диоксигеназы и превращать NO в NO_3^- :



где $\text{oxyMb}(\text{Fe}^{2+})\text{O}_2$ – оксимиоглобин.

Было показано [6], что при нормоксии диоксигеназная активность миоглобина играет важную роль в поддержании функций электрон-транспортной цепи митохондрий, так как эта реакция удаляет из скелетных мышц избыток оксида азота, который при связывании с оксидазой цитохрома *c* может ингибировать ее активность, а следовательно, и дыхание клетки. В результате уменьшается образование АТФ и сократимость сердечной или скелетной мышцы.

Таким образом, миоглобин, экспрессирующийся главным образом в миокарде и оксидативных волокнах мышц и обладающий нитрит-редуктазной и диоксигеназной активностями в зависимости от степени насыщения его кислородом, может либо связывать и активировать

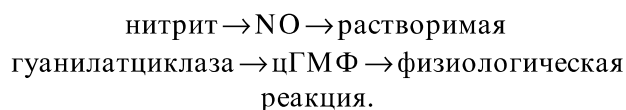
нитрит (при гипоксии), превращая его в NO, реагирующий с компонентами электрон-транспортной цепи митохондрий, либо связывать NO (при нормоксии), уменьшая его доступность для электрон-транспортной цепи.

Таким образом, основной физиологической мишенью активированного миоглобином нитрита во время гипоксии или ишемии являются митохондрии [9]. Возможно, в сердечной и скелетной мышце существуют дополнительные механизмы взаимодействия между миоглобином и этими органеллами клетки.

При использовании мышцей, нокаутированной по гену миоглобина, было впервые показано, что именно миоглобин играет главную роль как нитрит-редуктаза, которая регулирует генерацию NO при гипоксии, контролирует клеточное дыхание и осуществляет цитопротекторное действие на сердечную мышцу при ишемии-реперфузии [9–11]. В опытах на изолированном сердце мышцей только при наличии миоглобина как нитрит-редуктазы обработка нитритом приводила к улучшению сократимости левого желудочка сердца.

Внутри митохондрий предполагают наличие различных белков, подвергающихся модификации оксидом азота, образующимся при активировании миоглобином нитрита при гипоксии: АТФ-синтазы, аконитазы, дегидрогеназы α -кетоглутаровой кислоты, креатинкиназы, малат-дегидрогеназы, белка теплового шока Hsp60, комплексов IV и I электрон-транспортной цепи, митохондриальных мембранных $\text{K}_{\text{АТФ}}^+$ -каналов и каналов, регулирующих проницаемость мембраны для цитохрома *c*, связанную с апоптозом [11]. Модификация этих мишеней до и во время ишемии-реперфузии сердца может вызывать торможение дыхания митохондрий и наблюдаемый цитопротекторный эффект NO и/или нитрита. Возможно, что с цитопротекторным эффектом связано и отсутствие повреждающего влияния нитритной гипоксии при малых дозах экзогенного нитрита [12].

В последние годы было показано, что миоглобин широко представлен не только в поперечнополосатых мышцах, но и в гладких мышцах сосудов, где он также проявляет функционально значимую нитрит-редуктазную активность [13]. Опосредованная миоглобином передача сигнала при гипоксии приводит к релаксации гладких мышц сосудов согласно следующей последовательности:



У мышцы с нокаутом по миоглобину снижена способность к вазодилатации до 54% от кон-

трольного значения, что указывает на специфическую роль миоглобина в этом процессе [14].

Сравнительные биохимические исследования нитрит-редуктазной активности миоглобина были проведены на рыбах. Очищенные дезоксигенированные препараты сердечного миоглобина были выделены из форели и серебряного карпа. Они обладали нитрит-редуктазной активностью $5,5 \text{ молей}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$ для форели и $17,4 \text{ молей}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$ для карпа, что коррелировало с величинами их сродства к кислороду [15]. Было показано, что миоглобин сердца радужной форели аллостерически регулируется посредством S-нитрозилирования. Такая регуляция может быть подходящим механизмом для доставки оксигенированного миоглобина (связавшего NO или SNO), когда возрастает потребление кислорода, например, при усилении физической нагрузки, что улучшает эффективность работы сердца у форели [16].

У обыкновенного карпа были обнаружены две тканеспецифичные изоформы миоглобина. Сердечная изоформа (Mb 1) обладает свойствами, сопоставимыми с ее функциональной ролью в диффузии/хранении кислорода, и способностью восстанавливать нитрит в условиях гипоксии, что может давать цитопротективный эффект в сердечной мышце карпа [17]. Напротив, изоформа, обнаруженная в мозге карпа (Mb 2), больше подходит для поглощения активных форм кислорода, которые образуются с большой скоростью при реоксигенации, так как Mb 2 обладает пероксидазной активностью. Этот тип функциональной специализации не был ранее описан у позвоночных и указывает на антиоксидантную специализацию эволюционно более молодой мозговой изоформы Mb 2.

Вновь открытые ферментативные свойства миоглобина (нитрит-редуктазная и пероксидазная активности) могут способствовать исключительной толерантности к внутренней гипоксии ныряющих морских млекопитающих (китов и дельфинов) во время долговременного («исследовательского») ныряния, которое может продолжаться более 2 ч [18]. Ключевыми адаптациями, которые делают этих животных способными к столь длительному нырянию, являются:

1) увеличенная способность сохранять кислород в крови и мышцах, которая позволяет им использовать под водой только аэробный метаболизм;

2) большая защита от оксидативного стресса, позволяющая им преодолеть увеличенную генерацию митохондриями активных форм кислорода при реоксигенации на поверхности воды.

Как было отмечено во введении, ныряющие млекопитающие содержат миоглобин в своих скелетных мышцах в концентрации $10\text{--}95 \text{ мг} \cdot \text{г}^{-1}$, что позволяет им сохранять длительный аэробный метаболизм при нырянии (пункт 1).

Адаптации, связанные с пунктом 2, рассмотрены в работе датских ученых, касающейся функциональных свойств миоглобина у пяти видов китов с различными способностями к нырянию [19]. Хотя в более ранних работах в качестве маркеров способности к нырянию у китов были рассмотрены концентрация миоглобина и его способность переносить кислород, пока не ясно, различаются ли миоглобины разных видов китов по сродству к кислороду и ферментативным активностям (редуктазной и пероксидазной).

В цитируемой работе из пяти видов «зубастых» китов и трех видов «усатых» китов были выделены очищенные миоглобины и исследована корреляция их функциональных свойств со средней продолжительностью ныряния. Оказалось, что в функциональных свойствах миоглобинов существует разница между «зубастыми» и «усатыми» китами: у первых более высокое сродство к кислороду и более высокая нитрит-редуктазная активность. Однако эти различия не коррелируют со средней продолжительностью ныряния.

Напротив, оказалось, что у разных видов китов существует значительная корреляция между содержанием Mb в мышцах и средней продолжительностью и глубиной ныряния. Продемонстрирована также корреляция между сродством к кислороду и нитрит-редуктазной активностью. Несмотря на то, что функциональные свойства миоглобина обнаружили мало видоспецифических различий *in vitro*, они вносят свой вклад в увеличение способности к нырянию на уровне целого организма за счет увеличения концентрации миоглобина в мышечной ткани экстремальных дайверов. Таким образом, фактором, определяющим способность к нырянию у китов, является не удельная функциональная активность (ферментативная: нитрит-редуктазная и пероксидазная или сродство к кислороду), а содержание миоглобина в мышцах.

Таким образом, и у наземных, и у водных млекопитающих «новые» функции миоглобина сердечных и скелетных мышц состоят в регуляции дыхания митохондрий за счет:

1) связывания нитрита при гипоксии для превращения его в оксид азота по нитрит-редуктазной реакции, что уменьшает дыхательную активность митохондрий при ишемии миокарда и уменьшает расходование кислорода при длительном нырянии, а также уменьшает окислительный стресс при реперфузии миокарда и

Участие миоглобина в процессах, регулируемых нитритным сигналингом при гипоксии

Название процесса	Действие на систему	Ссылки
1. Ишемия-реперфузия миокарда	Антиоксидантное, антиапоптозное, противовоспалительное	[4–6,8,10]
2. Вазодилатация кровеносных сосудов	Передача сигнала от растворимой гуанилатциклазы к Ca ²⁺ -каналам	[9,10,13,14]
3. Прекондиционирование миокарда	Антиоксидантное, антиапоптозное, противовоспалительное	[11,12]
4. Ныряние и реоксигенация	Торможение дыхания, сохранение резервов O ₂ под водой и антиоксидантное действие при всплытии	[2,16,17,19]

реоксигенации после возвращения на поверхность воды;

2) связывания избытка оксида азота при нормоксии, что позволяет обеспечить полное функционирование электрон-транспортной цепи митохондрий, а также уменьшает возможность нитрозивного стресса.

Хотя в организме имеются и другие белковые системы, участвующие в активации нитрита (см. обзор [20]), миоглобин является ведущим в процессах, связанных с ишемией-реперфузией миокарда, вазодилатацией сосудов, прекондиционированием миокарда и восстановлением реоксигенацией после ныряния (таблица).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- С. С. Шишкин, Л. И. Ковалев, И. Н. Крахмалева и М. А. Ковалева, *Полиморфизм мышечных белков человека* (Российский университет дружбы народов, М., 2011).
- S. Helbo, R. E. Weber, and A. Fago, *Biochim. Biophys. Acta* **1834**, 1832. (2013).
- T. Burmester and T. Hankeln, *Acta Physiol. (Oxf.)* **211**, 501 (2014).
- Н. В. Кулева и И. Е. Красовская, *Цитология*, **37**, 563 (2015).
- S. Shiva, *Nitric Oxide* **22**, 64 (2010).
- M. Feelish, B. O. Fernandes, N. S. Bryan, et al., *J. Biol. Chem.* **283**, 33927 (2008).
- E. Curtis, L. His, A. Hoguchi, et al., *Antioxidants Redox Signaling* **17**, 551 (2012).
- S. Shiva, J. Huang, R. Grubina, et al., *Circ. Res.* **100**, 654 (2007).
- U. B. Hendgen-Cotta, M. Merx, S. Shiva, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105**, 10256 (2008).
- A. Cossins and M. Berenbrink, *Nature* **454**, 416 (2008).
- D. Murillo, C. Kam, L. Mo, and S. Shiva. *Nitric Oxide* **25**, 170 (2011).
- N. V. Kuleva, I. E. Krasovskaya, and T. E. Shumilova, *Biophysics* **59**, 689 (2014).
- M. Totzeck, U. B. Hendgen-Cotta, and C. Rammos, *Circ. Res.* **126**, 325 (2012).
- U. B. Hendgen-Cotta, M. Kelm, and T. Rassaf, *Trends Cardiovasc. Med.* **24**, 69 (2014).
- C. L. Pedersen, S. Faggiano, S. Helbo, et al., *J. Exp. Biol.* **213**, 2755 (2010).
- S. Helbo and A. Fago, *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **300**, R101 (2011).
- S. Helbo, S. Dewilde, D. R. Williams, et al., *Am. J. Physiol.* **302**, R693 (2012).
- P. J. Pongonis, *Compr. Physiol.* **1**, 517 (2011).
- S. Helbo and A. Fago. *J. Exp. Biol.* **215**, 3403 (2012).
- D. B. Kim-Shapiro and M. Gladwin, *Nitric Oxide* **38**, 58 (2014).

A New Role of Myoglobin in Cardiac and Skeletal Muscle Function

N.V. Kuleva and I.E. Krasovskaya

St. Petersburg State University, Universitetskaya nab. 7/9, St. Petersburg, 199034 Russia

For a long time myoglobin has been considered as an intracellular globin that involved in oxygen transporting and storage in cardiac and skeletal muscles. Because the emerging ability of myoglobin to convert nitrite into nitric oxide during hypoxia is reported, a new role of myoglobin in the hypoxic signaling pathway that upregulates mitochondrial electron transport chain functions, is shown. Here we review corresponding experimental data that support this point of view and a significance of newly reported ability for cardiac and skeletal muscle function.

Key words: myoglobin, nitrite reductase activity, nitric oxide