

УДК 577.2

## ИЗМЕНЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА И СОДЕРЖАНИЯ ТАЙТИНА (КОННЕКТИНА) В ПОПЕРЕЧНО-ПОЛОСАТЫХ МЫШЦАХ ХРОНИЧЕСКИ АЛКОГОЛИЗИРОВАННЫХ КРЫС

© 2013 г. Ю. В. Грицына<sup>1</sup>, Н. Н. Салмов<sup>1</sup>, И. М. Вихлянцев<sup>1\*</sup>, А. Д. Уланова<sup>1,2</sup>, М. Г. Шарапов<sup>3</sup>,  
В. В. Теплова<sup>1</sup>, З. А. Подлубная<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Институт теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук,  
Пушино, Московская обл., 142290

<sup>2</sup>Пушинский государственный естественно-научный институт, Пушино, Московская обл., 142290

<sup>3</sup>Институт биофизики клетки Российской академии наук, Пушино, Московская обл., 142290

Поступила в редакцию 17.04.2013 г.

Принята к печати 25.05.2013 г.

Методами обратной транскрипции – полимеразной цепной реакции в реальном времени и гель-электрофореза в денатурирующих условиях изучены изменения экспрессии гена и изоформного состава гигантского саркомерного белка тайтина (коннектина) в сердечной мышце, а также изменения изоформного состава этого белка в скелетной мышце *soleus* хронически алкоголизированных крыс. Обнаружено снижение содержания белка тайтина в этих мышцах, а также экспрессии его гена в миокарде хронически алкоголизированных животных, что указывает на развитие патологического процесса.

**Ключевые слова:** изоформы тайтина, ген *ttn*, тяжелые цепи миозина, поперечно-полосатые мышцы, хронически алкоголизированные крысы.

CHANGES IN GENE EXPRESSION AND CONTENT OF TITIN (CONNECTIN) IN STRIATED MUSCLES OF CHRONICALLY ETHANOL-FED RATS, by Yu. V. Gritsyna<sup>1</sup>, N. N. Salmov<sup>1</sup>, I. M. Vikhlyantsev<sup>1</sup>, A. D. Ulanova<sup>1,2</sup>, M. G. Sharapov<sup>3</sup>, V. V. Teplova<sup>1</sup>, Z. A. Podlubnaya<sup>1,2</sup> (<sup>1</sup>Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Moscow region, 142290 Russia, \*e-mail: vikhlyantsev@iteb.ru; <sup>2</sup>Pushchino State Institute of Natural Sciences, Pushchino, Moscow region, 142290 Russia; <sup>3</sup>Institute of Cell Biophysics, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Moscow region, 142290 Russia). Changes in gene expression and isoform composition of giant sarcomeric protein titin (connectin) in cardiac muscle, as well as changes of its isoform composition in skeletal muscle (*m. soleus*) of chronically ethanol-fed rats have been studied using real-time RT-PCR and low percentage SDS-gel electrophoresis. The decrease of titin content in examined muscles and the decrease in titin gene expression in myocardium of chronically ethanol-fed rats have been shown. These changes indicate the development of pathologic process.

**Keywords:** titin isoforms, gene of titin *ttn*, myosin heavy chains, striated muscles, chronically ethanol-fed rats.

DOI: 10.7868/S0026898413060050

Известно, что хроническая алкогольная интоксикация приводит к развитию симптомокомплекса алкоголь-индуцированного поражения как скелетных (алкогольная миопатия), так и сердечной (алкогольная кардиомиопатия) мышц [1–3]. Основные характеристики алкоголь-индуцированных нарушений в мышцах успешно моделируются на животных, в частности на крысах [4–6]. Показано, что у человека и животных развитие алкогольной миопатии/кардиомиопатии сопровожда-

ется атрофией и слабостью скелетных мышц, нарушением сократительных свойств сердечной мышцы [1–4, 7]. Свой вклад в эти изменения вносит снижение общего содержания РНК, ДНК и белка (например, тяжелых цепей миозина, актина, десмина, тропонина-I) [4, 5, 8, 9], а также нарушение функциональных свойств сократительных белков, в частности снижение активируемой актином АТФ-зависимой активности миозина [10]. Молекулярный механизм развития алкоголь-инду-

Принятые сокращения: ДСН – додецилсульфат натрия; ОТ – обратная транскрипция; ПЦР – полимеразная цепная реакция; Т2 – протеолитический фрагмент тайтина.

\* Эл. почта: vikhlyantsev@iteb.ru

цированных нарушений в мышцах не ясен, однако показано, что этанол и, главным образом, продукт его окисления ацетальдегид участвуют как в подавлении белкового синтеза путем токсического поражения ряда ключевых звеньев сигнальной системы mTOR, так и в активации протеолиза [2, 7, 11–14].

Важным компонентом саркомеров поперечно-полосатых мышц позвоночных является тайтин (титин, коннектин) – гигантский эластичный белок, формирующий третий тип нитей в миофибриллах (для ссылок см. [15–17]). Молекулы тайтина длиной около 1 мкм и диаметром 3–4 нм перекрывают половину саркомера от M-линии до Z-диска. В A-зоне саркомера тайтин связан с миозиновыми нитями. В I-зоне саркомера некоторые участки тайтина взаимодействуют с актиновыми нитями, однако большая часть его молекулы в этой зоне проходит свободно, соединяя концы миозиновых нитей с Z-диском. Молекула тайтина на ~90% состоит из повторяющихся иммуноглобулин-подобных (IgC2) и фибронектин-подобных (FnIII) доменов с  $\beta$ -складчатой структурой. Кроме этих доменов тайтин содержит киназный домен вблизи M-линии саркомера и уникальные эластичные N2A-, N2B- и PEVK-элементы в I-зоне саркомера (для ссылок см. [17]). Гигантские размеры тайтина, его расположение во всех зонах саркомера, эластичные свойства и уникальная структура молекулы создают основу для многофункциональности этого белка. Показано, что тайтин служит каркасом для сборки толстых нитей и саркомера; участвует в поддержании высокоупорядоченной саркомерной структуры и, вследствие этого, сократительной функции мышцы; вносит вклад в пассивное напряжение, возникающее при растяжении мышцы, и развивает возвратную силу при сокращении саркомера; участвует в запуске и регуляции актин-миозинового взаимодействия и регуляции процессов внутриклеточной сигнализации (для ссылок см. [17, 18]). В поперечно-полосатых мышцах млекопитающих и человека ген тайтина кодирует несколько изоформ: N2B, N2BA и N2A с молекулярной массой их изоформантов 3000–3700 кДа (см. обзор [17]). Недавно в мышцах мутантных крыс обнаружены изоформанты тайтина, молекулярные массы которых превышают 3700 кДа [19]. Нами было показано, что в поперечно-полосатых мышцах млекопитающих наряду с изоформами N2B, N2BA и N2A, присутствуют и более высокомолекулярные изоформы тайтина, названные NT-изоформами [17]. За последние годы установлена важная роль изоформных изменений тайтина в адаптации мышечной системы млекопитающих к условиям гибернации и микрогравитации [17, 20–25], а также участие этого белка в патогенезе ряда мышечных заболеваний [17, 26–33]. В частности, нами обнаруже-

но, что при развитии ряда патологических процессов в мышцах человека и животных наряду с изменением экспрессии гена тайтина происходит разрушение NT-изоформ этого белка, что вносит основной вклад в нарушение упорядоченной саркомерной структуры и снижение сократительной способности мышцы [17, 28, 31].

В представленной работе изучены изменения экспрессии гена тайтина, а также содержания его N2B-, N2BA-, N2A- и NT-изоформ в сердечной и скелетной (*m. soleus*) мышцах хронически алкоголизированных крыс.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**Хроническая алкоголизация крыс.** В работе использовали самцов белых лабораторных крыс линии Wistar. Масса каждого животного вначале эксперимента составляла 150 гр. Животных содержали в отдельных клетках в условиях вивария ИТЭБ РАН (Пушино). Проведение опытов на животных было одобрено комиссией по биомедицинской этике ИТЭБ РАН. Методика алкоголизации крыс разработана на основе модели хронической алкогольной интоксикации [34]. Животные были разделены на две группы: контрольную (“Контроль”,  $n = 5$ ), в которой крысы получали стандартный пищевой рацион и питьевую воду, и опытную, в которую вошли хронически алкоголизированные крысы (“Алкоголь”,  $n = 5$ ), получающие стандартный пищевой рацион и 20%-ный раствор этанола в качестве единственного источника жидкости в течение 6 мес. Привыкание животных к алкоголю развивали, постепенно увеличивая содержание этанола в питьевой воде. В частности, в течение первых 3 сут оно составляло 5%, в последующие 3 сут – 10 и 15%, соответственно, а далее – 20%. Через 6 мес. животных взвешивали и выводили из эксперимента. В дальнейшем использовали миокард левого желудочка и скелетную мышцу *soleus*. Образцы мышц хранили при температуре  $-70^\circ\text{C}$ .

**Выделение РНК из ткани миокарда крыс** проводили с использованием набора Aurum<sup>TM</sup>Total RNA Fatty and Fibrous Tissue Kit (“Bio-Rad”, США) согласно протоколу изготовителя. Качество РНК определяли по сохранности 18S и 28S рРНК с помощью электрофореза в 1%-ном агарозном геле. Концентрацию РНК определяли спектрофотометрически (спектрофотометр NanoDrop ND-1000, “NanoDrop Technologies”, США). Раствор РНК хранили при температуре  $-70^\circ\text{C}$ .

**Обратная транскрипция и ПЦР в реальном времени.** Реакцию обратной транскрипции проводили на суммарной РНК (концентрация 0.5 мкг/мкл) с использованием обратной транскриптазы Mint (“Евроген”, Россия) и стандартного праймера

олиго-dT<sub>15</sub>. Полученную кДНК использовали в ПЦР с праймерами, специфичными к гену тайтина (*ttn*), кодирующему разные изоформы этого белка, в частности N2B и N2BA. Нуклеотидные последовательности праймеров, синтезированных фирмой “Евроген” (Россия) на основе известной последовательности гена тайтина крысы [35], приведены в табл. 1. Температура отжига праймеров для изоформ тайтина составляла 64°C.

**ПЦР в реальном времени** проводили на амплификаторе ДТ-322 (“ДНК-Технология”, Россия) с использованием ДНК-полимеразы Tersus (“Евроген”, Россия) и SYBR Green I (“Invitrogen”) в качестве флуоресцентного красителя. Режим ПЦР был следующим: (1) “горячий старт” – 95°C, 5 мин; (2) денатурация – 95°C, 15 с; (3) отжиг праймеров – 64°C, 20 с; синтез – 72°C, 20 с. Этапы 2–4 повторяли 35 раз. В качестве референсного гена (*housekeeping gene*) использовали ген фактора элонгации EF-1 $\alpha$  [36]. Продукты амплификации анализировали с помощью электрофореза в 8%-ном полиакриламидном геле (рис. 1). Изменение экспрессии гена *ttn* рассчитывали по методу  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  согласно [37]. Значения  $\Delta C_t$  рассчитывали по формуле  $\Delta C_t = C_{t(\text{контроль})} - C_{t(\text{опыт})}$ , каждое значение  $\Delta C_t$  рассчитывали по формуле  $\Delta C_t = C_t(ttn) - C_t(\text{референсный ген})$ .  $C_t$  – пороговый цикл.

**ДСН-гель-электрофорез.** Для электрофоретического разделения высокомолекулярных изоформ тайтина в присутствии ДСН использовали крупнопористый 2.1–2.3%-ный полиакриламидный гель (соотношение акриламид : бис-акриламид = 36.5 : 1) с содержанием агарозы 0.5–0.6%, приготовленный согласно [38] с нашими модификациями [17]. Пробы для электрофореза подготавливали по методу [17], исключающему кипячение. Разделение тяжелых цепей миозина проводили согласно [39]. Концентрация полиакриламида составляла 4% (соотношение акриламид : бис-акриламид = 36.5 : 1) в концентрирующем геле и 7%

(акриламид : бис-акриламид = 99 : 1) в разделяющем геле. ДСН-гель-электрофорез проводили на аппаратах с вертикальным расположением геля (“Helicon”, Россия и “C.B.S. Scientific Co.”, США) с использованием пластинки геля 8 × 10 см. Гели, окрашенные Coomassie Brilliant Blue (G-250 и R-250, смешанные в соотношении 1 : 1), сканировали, а затем проводили денситометрическую обработку с помощью компьютерной программы Total Lab v1.11. Содержание тайтина оценивали по отношению к содержанию тяжелых цепей миозина. В А-диске саркомера эти белки связаны друг с другом в определенном соотношении (шесть молекул тайтина на каждую миозиновую нить в половине саркомера), поэтому этот способ более точен, чем оценка по отношению к содержанию общего белка в пробе, и используется в настоящее время всеми исследователями. Полученные нами данные свидетельствуют о существовании линейной зависимости между соотношением тайтин/тяжелые цепи миозина и количеством этих белков, нанесенных на гель. Ошибка измерения при этом составляет 2–3% (неопубликованные данные).

**Статистическую обработку** проводили с использованием непараметрического U-критерия Манна–Уитни. Этот критерий предназначен для оценки количественных различий данного признака между двумя малыми выборками, когда  $n_1, n_2 \geq 3$  или  $n_1 = 2, n_2 \geq 5$ , он сильнее Q-критерия Розенбаума. Таким образом, при отсутствии резких отклонений тестируемых показателей в выборках этот критерий позволяет выявить статистически значимые различия между двумя малыми выборками. В нашей работе значимыми считали различия при  $p < 0.01$ .

**Таблица 1.** Пары праймеров для полимеразной цепной реакции в реальном времени

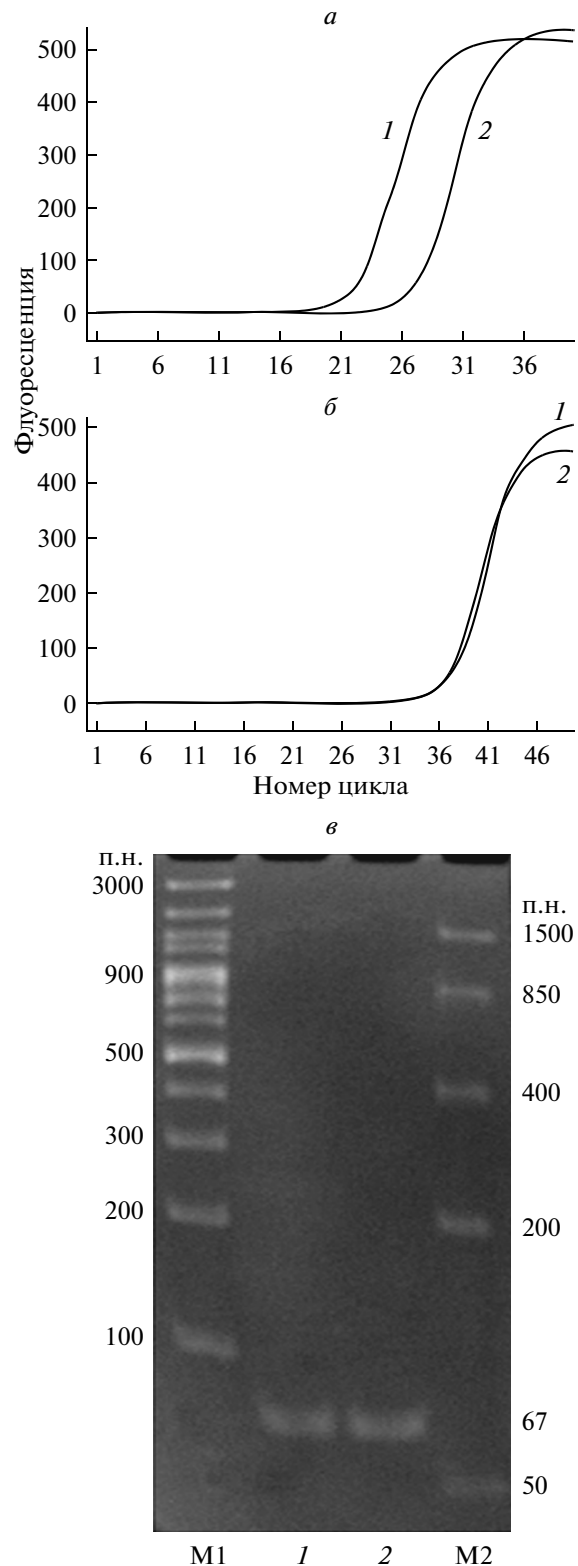
Праймер	Нуклеотидная последовательность	Размер продукта, п.н.
N2B + N2BA <i>ttn</i> (экзоны 49–50). F	CCAAGCTCACTGTGGGAGAAA	67
N2B + N2BA <i>ttn</i> (экзоны 49–50). R	GCTACTTCCAAGGGCTCAATTC	
N2B <i>ttn</i> (экзоны 50–219). F	CCAACGAGTATGGCAGTGTCA	93
N2B <i>ttn</i> (экзоны 50–219). R	TGGGTTCAGGCAGTAATTTGC	
N2BA <i>ttn</i> (экзоны 107–108). F	CGGCAGAGCTCAGAATCGA	110
N2BA <i>ttn</i> (экзоны 107–108). R	GTCAAAGGACACTTCACACTCAAAA	
EF-1 $\alpha$ . F	AGGTGATTATCCTGAACCATCC	234
EF-1 $\alpha$ . R	AGTGGAGGGTAGTCAGAGAAGC	

Примечание. F – прямой праймер, R – обратный праймер.

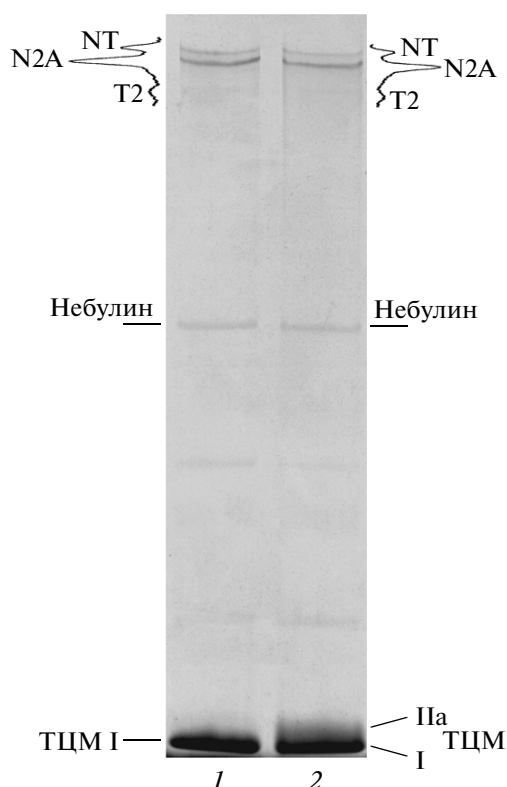
**РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ**

В табл. 2 приведены результаты определения соотношения массы сердечной мышцы и *m. soleus* и массы тела у контрольных и хронически алкоголизованных крыс. Обнаружено снижение (на ~30%) массы *m. soleus* у хронически алкоголизованных крыс, и выявлена тенденция к снижению массы сердечной мышцы относительно массы тела. Эти результаты указывают на развитие атрофических изменений в мышцах животных группы “Алкоголь”, что согласуется с опубликованными данными [5, 40].

Ранее нами было показано, что при развитии атрофических изменений в *m. soleus* человека и крыс в условиях микрогравитации, а также при развитии ряда патологических процессов (синдром “ригидного человека”, дилатационная кардиомиопатия, гипертрофия сердечной мышцы, постинсультная мышечная спастичность) в мышцах человека и животных значительно снижается (в 1.5–2 раза) содержание тайтина и, прежде всего, его NT-изоформ [17, 28, 31]. Это снижение вносило основной вклад в развитие нарушений саркомерной структуры и сократительных свойств поперечнополосатых мышц. Учитывая эти данные, мы предположили, что алкоголь-индуцированные нарушения в мышцах крыс также должны приводить к снижению содержания тайтина. Действительно, выявлено статистически значимое снижение содержания NT-изоформы (в среднем в 1.28 раза) и N2A-изоформы (в среднем в 1.13 раза) тайтина относительно содержания тяжелых цепей миозина в *m. soleus* хронически алкоголизованных крыс (табл. 3, рис. 2), что свидетельствует о развитии патологического процесса. Следует, однако, отметить, что изменения в содержании тайтина оказались менее выраженными, чем в мышцах человека и животных при развитии указанных патологий. Более того, в *m. soleus* животных группы “Алкоголь” не обнаружено значимого снижения содержания небулина – гигантского белка тонких (актин-содержащих) нитей (табл. 3, рис. 2), содержание которого снижалось в скелетных мышцах человека и крыс при развитии “гипогравитационного мышечного синдрома”, при синдроме “ригидного человека” и постинсультной мышечной спастичности [17]. Тем не менее, выявленное нами снижение содержания тайтина в *m. soleus* подопытных крыс свидетельствует о развитии в ней алкоголь-индуцированных патологических изменений. Этот вывод подтверждается и увеличением содержания “быстрой” изоформы IIa тяжелых цепей миозина в “медленной” мышце *soleus* у хронически алкоголизованных крыс (рис. 3). Аналогичные изменения изоформного состава тяжелых цепей миозина, сопровождающиеся значительными деструктивными изменениями тайтина, наблюда-

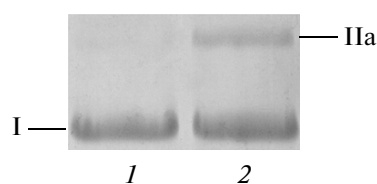


**Рис. 1.** Анализ экспрессии гена *ttn* в миокарде крыс методом ОТ-ПЦР с красителем SYBR Green I. *a* – Накопление фрагмента гена *ttn* в зависимости от цикла ПЦР; *б* – накопление фрагмента гена фактора элонгации EF-1α в зависимости от цикла ПЦР; *в* – электрофореграмма ПЦР-продуктов: 1 – N2B + N2BA, контрольные крысы; 2 – N2B + N2BA, хронически алкоголизованные крысы; M1, M2 – маркеры молекулярных масс.



**Рис. 2.** Содержание тайтина и небулина в *m. soleus* контрольных (1) и хронически алкоголизованных (2) крыс. Электрофорез проведен в 2.1%-ном полиакриламидном геле, укрепленном агарозой. ТЦМ – тяжелые цепи миозина. I – “медленная” изоформа ТЦМ. Па – “быстрая” изоформа ТЦМ. T2 – протеолитический фрагмент тайтина.

лись в *m. soleus* человека и крыс при развитии атрофических процессов в условиях гравитационной разгрузки [28], а также в *m. soleus* больных с постинсультной мышечной спастичностью (неопубликованные данные). Следует также отметить, что выявленное нами снижение содержания тайтина в *m. soleus* животных группы “Алкоголь” не согласуется с опубликованными данными [6], согласно которым содержание этого белка (определенное относительно тяжелых цепей миозина) не снижается в скелетных мышцах хронически алкоголизованных крыс. Эти расхождения, по-видимому, можно объяснить разной продолжительностью периодов



**Рис. 3.** Изоформный состав тяжелых цепей миозина в *m. soleus* контрольных (1) и хронически алкоголизованных (2) крыс. Электрофорез проведен в 7%-ном полиакриламидном геле. Содержание “быстрой” Па изоформы тяжелых цепей миозина (ТЦМ) от общего содержания ТЦМ в “медленной” мышце *soleus* составило 2–11% (контрольные крысы,  $n = 5$ ) и 8–19% (хронически алкоголизованные крысы,  $n = 5$ ). I – “медленная” изоформа ТЦМ.

хронической алкоголизации: 10 недель в [6] и 6 мес. в нашей работе.

В табл. 4 приведены результаты определения относительного содержания изоформ тайтина в левом желудочке сердца крыс. Не обнаружено статистически значимых изменений в содержании тайтина в сердечной мышце алкоголизованных и контрольных крыс (табл. 4, рис. 4, 1). Однако в ряде случаев при электрофоретическом исследовании образцов миокарда животных группы “Алкоголь” наблюдалось значительное снижение (в ~1.7 раза) содержания N2B-, N2BA- и NT-изоформ (рис. 4, 2). Эти данные указывают на развитие патологических изменений и в сердечной мышце хронически алкоголизованных крыс. Учитывая полученные нами ранее результаты [17, 28, 31], можно утверждать, что снижение содержания тайтина в миокарде и *m. soleus* вносит вклад в развитие алкоголь-индуцированных нарушений в мышцах крыс.

Что может быть причиной снижения содержания тайтина в мышцах хронически алкоголизованных крыс? Известно, что тайтин является субстратом кальций-зависимых протеаз кальпаинов [41]. Предполагается, что оборот мышечных белков в саркомере инициируется расщеплением кальпаинами тайтина и других белков миозин- и актин-содержащих нитей, деградация которых завершается по убиквитин-протеасомному пути [41]. Принимая во внимание опубликованные недавно данные о том, что этанол способствует усилению деградации мышечных белков по убиквитин-протеасомному пути [13], можно предположить, что в мышцах хро-

**Таблица 2.** Отношение массы сердечной мышцы и *m. soleus* к массе тела у контрольных и хронически алкоголизованных крыс

Группа	Масса тела животного, г	Масса миокарда, мг	Масса <i>m. soleus</i> , мг	Отношение массы миокарда к массе тела животного, мг/г	Отношение массы <i>m. soleus</i> к массе тела животного, мг/г
“Контроль”, $n = 5$	556 ± 37	1361 ± 73	209 ± 17	2.45 ± 0.10	0.38 ± 0.02
“Алкоголь”, $n = 5$	433 ± 77	1007 ± 178	122 ± 22	2.32 ± 0.09	0.29 ± 0.04

**Таблица 3.** Содержание тайтина и небулина относительно содержания тяжелых цепей миозина (ТЦМ) в *m. soleus* контрольных и хронически алкоголизованных крыс

Группа	Животное, №	NT/ТЦМ	N2A/ТЦМ	T2/ТЦМ	Небулин/ТЦМ
“Контроль”	1, <i>n</i> = 5	0.071 ± 0.012	0.174 ± 0.020	0.041 ± 0.007	0.055 ± 0.008
	2, <i>n</i> = 4	0.067 ± 0.011	0.165 ± 0.027	0.040 ± 0.013	0.053 ± 0.010
	3, <i>n</i> = 6	0.078 ± 0.030	0.176 ± 0.026	0.043 ± 0.016	0.059 ± 0.011
	4, <i>n</i> = 3	0.072 ± 0.033	0.156 ± 0.038	0.028 ± 0.014	0.058 ± 0.019
	5, <i>n</i> = 5	0.063 ± 0.011	0.170 ± 0.021	0.041 ± 0.018	0.056 ± 0.006
“Алкоголь”	1, <i>n</i> = 7	0.053 ± 0.013	0.155 ± 0.049	0.034 ± 0.011	0.051 ± 0.011
	2, <i>n</i> = 3	0.051 ± 0.008	0.144 ± 0.017	0.029 ± 0.003	0.056 ± 0.004
	3, <i>n</i> = 6	0.056 ± 0.018	0.140 ± 0.031	0.038 ± 0.017	0.059 ± 0.014
	4, <i>n</i> = 6	0.059 ± 0.015	0.150 ± 0.027	0.044 ± 0.012	0.049 ± 0.006
	5, <i>n</i> = 5	0.055 ± 0.014	0.156 ± 0.027	0.045 ± 0.022	0.050 ± 0.007
Уровень статистической значимости		$p \leq 0.01$	$p \leq 0.01$	Зона незначимости	Зона незначимости

Примечание: *n* – количество повторов. Указаны средние значения и их стандартные отклонения. Для статистической обработки использованы средние значения.

**Таблица 4.** Содержание тайтина относительно содержания тяжелых цепей миозина (ТЦМ) в левом желудочке сердца контрольных и хронически алкоголизованных крыс

Группа	Животное, №	NT/ТЦМ	N2BA/ТЦМ	N2B/ТЦМ	T2/ТЦМ
“Контроль”	1, <i>n</i> = 5	0.027 ± 0.007	0.028 ± 0.009	0.145 ± 0.013	0.052 ± 0.014
	2, <i>n</i> = 3	0.037 ± 0.007	0.028 ± 0.003	0.169 ± 0.007	0.057 ± 0.008
	3, <i>n</i> = 4	0.039 ± 0.008	0.026 ± 0.007	0.152 ± 0.030	0.055 ± 0.014
	4, <i>n</i> = 3	0.034 ± 0.002	0.038 ± 0.006	0.169 ± 0.006	0.060 ± 0.005
	5, <i>n</i> = 3	0.031 ± 0.006	0.030 ± 0.011	0.171 ± 0.024	0.059 ± 0.006
“Алкоголь”	1, <i>n</i> = 5	0.031 ± 0.009	0.022 ± 0.009	0.136 ± 0.019	0.044 ± 0.006
	2, <i>n</i> = 4	0.025 ± 0.011	0.028 ± 0.017	0.164 ± 0.034	0.054 ± 0.007
	3, <i>n</i> = 3	0.027 ± 0.004	0.031 ± 0.007	0.166 ± 0.006	0.056 ± 0.013
	4, <i>n</i> = 4	0.030 ± 0.005	0.027 ± 0.009	0.165 ± 0.023	0.061 ± 0.011
	5, <i>n</i> = 6	0.032 ± 0.011	0.024 ± 0.005	0.161 ± 0.019	0.062 ± 0.016
Уровень статистической значимости		Зона незначимости	Зона незначимости	Зона незначимости	Зона незначимости

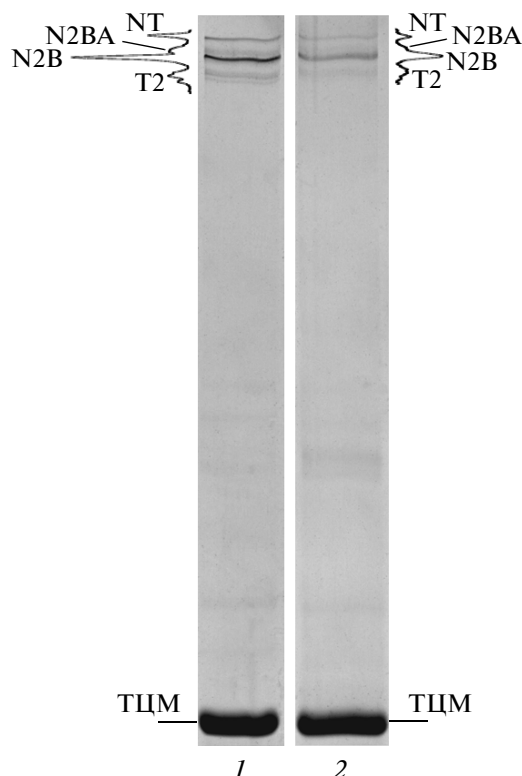
Примечание: *n* – количество повторов. Указаны средние значения и их стандартные отклонения. Для статистической обработки использованы средние значения.

нически алкоголизованных крыс возрастает активность кальпаиновых протеаз. Однако это предположение нуждается в проверке.

Учитывая данные о снижении содержания РНК и ДНК в мышцах хронически алкоголизованных крыс [5, 8], мы ожидали обнаружить уменьшение экспрессии гена тайтина в мышцах крыс группы “Алкоголь”. Действительно, в миокарде этих крыс содержание мРНК N2BA-изоформы тайтина снизилось в среднем в 69 раз (рассчитано по методу  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  [37]) (рис. 5). Однако уровень мРНК N2B-изоформы тайтина при этом не снизился (рис. 5). Тем не менее, общая экспрессия гена *tnn* в левом

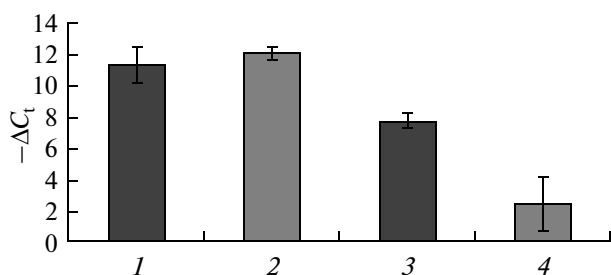
желудочке хронически алкоголизованных крыс снизилась в 7–11 раз (данные не приведены).

Обсуждая эти результаты нашей работы, необходимо отметить следующее. Ранее нами было показано, что при развитии гипертрофии сердечной мышцы у 26-недельных спонтанно-гипертензивных крыс (SHR) на фоне снижения содержания тайтина уменьшалось содержание мРНК как N2B-, так и N2BA-изоформы тайтина [31]. Однако на более ранней стадии развития гипертрофии сердечной мышцы (15-недельные крысы SHR) при сниженном содержании тайтина наблюдалось значительное повышение экспрессии



**Рис. 4.** Состав изоформ тайтина в левом желудочке сердца контрольных (1) и хронически алкоголизованных (2) крыс. Электрофорез проведен в 2.1%-ном полиакриламидном геле, укрепленном агарозой. ТЦМ – тяжелые цепи миозина. Т2 – протеолитический фрагмент тайтина.

гена *ttn*. Мы предположили, что увеличение содержания мРНК тайтина в миокарде 15-недельных крыс SHR является признаком компенсированной стадии заболевания, когда для восстановления нормального содержания белка требуется активация транскрипции его гена [31]. Учитывая эти результаты, можно предположить, что полученные нами данные, свидетельствующие о снижении содержания мРНК только N2BA-изоформы



**Рис. 5.** Изменение экспрессии N2B- и N2BA-изоформ тайтина в миокарде контрольных (1, 3) и хронически алкоголизованных (2, 4) крыс. 1, 2 – N2B-изоформа; 3, 4\* – N2BA-изоформа. \* – уровень статистической значимости,  $p \leq 0.01$ .

тайтина в миокарде хронически алкоголизованных крыс, могут указывать на переход заболевания в декомпенсированную (патологическую) стадию. Наши дальнейшие исследования будут направлены на проверку этого предположения.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (11-04-01026, 11-04-01798, 13-04-00281) и Федеральной целевой программы “Научные и научно-педагогические кадры инновационной России” (соглашение о предоставлении гранта № 8600).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Lang C.H., Frost R.A., Summer A.D., Vary T.C. 2005. Molecular mechanisms responsible for alcohol-induced myopathy in skeletal muscle and heart. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **37**, 2180–2195.
- Oba T., Maeno Y., Ishida K. 2005. Differential contribution of clinical amounts of acetaldehyde to skeletal and cardiac muscle dysfunction in alcoholic myopathy. *Curr. Pharm. Des.* **11**, 791–800.
- Шенкман Б.С., Маслова Г.А., Стогова Ю.В., Зиновьева О.Е., Яхно Н.Н. 2009. Атрофия медленных и быстрых волокон локомоторной мышцы у больных хроническим алкоголизмом. Клинико-физиологический анализ. *Технологии живых систем.* **8**, 3–10.
- Patel V.B., Sandhu G., Corbett J.M., Dunn M.J., Rodrigues L.M., Griffiths J.R., Wassif W., Sherwood R.A., Richardson P.J., Preedy V.R. 2000. A comparative investigation into the effect of chronic alcohol feeding on the myocardium of normotensive and hypertensive rats: an electrophoretic and biochemical study. *Electrophoresis.* **21**, 2454–2462.
- Reilly M.E., McKoy G., Mantle D., Peters T.J., Goldspink G., Preedy V.R. 2000. Protein and mRNA levels of the myosin heavy chain isoforms Ibeta, IIa, IIx and IIb in type I and type II fibre-predominant rat skeletal muscles in response to chronic alcohol feeding. *J. Muscle Res. Cell Motil.* **21**, 763–773.
- Hunter R.J., Neagoe C., Järveläinen H.A., Martin C.R., Lindros K.O., Linke W.A., Preedy V.R. 2003. Alcohol affects the skeletal muscle proteins, titin and nebulin in male and female rats. *J. Nutr.* **133**, 1154–1157.
- Казанцева Ю.В., Маслова Г.А., Лысенко Е.А., Зиновьева О.Е., Шенкман Б.С., Яхно Н.Н. 2010. Механизмы развития атрофии скелетных мышц при хронической алкогольной интоксикации. *Анн. клин. и эксп. неврол.* **4**, 15–19.
- Preedy V.R., Peters T.J. 1988. The effect of chronic ethanol ingestion on protein metabolism in type-I- and type-II-fibre-rich skeletal muscles of the rat. *Biochem. J.* **254**, 631–639.
- Vary T.C., Deiter G. 2005. Long-term alcohol administration inhibits synthesis of both myofibrillar and sarcolemmal proteins in heart. *Metabolism.* **54**, 212–219.
- Reddy Y.S., Beesley R.C. 1990. Effects of acute and chronic ethanol on cardiac contractile protein ATPase activity of Syrian hamsters. *Biochem. Med. Metab. Biol.* **44**, 259–265.
- Lang C.H., Frost R.A., Deshpande N., Kumar V., Vary T.C., Jefferson L.S., Kimball S.R. 2003. Alcohol impairs leucine-mediated phosphorylation of 4E-BP1,

- S6K1, eIF4G, and mTOR in skeletal muscle. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **285**, E1205–1215.
12. Hong-Brown L.Q., Kazi A.A., Lang C.H. 2012. Mechanisms mediating the effects of alcohol and HIV antiretroviral agents on mTORC1, mTORC2 and protein synthesis in myocytes. *World J. Biol. Chem.* **3**, 110–120.
  13. Vargas R., Lang C.H. 2008. Alcohol accelerates loss of muscle and impairs recovery of muscle mass resulting from disuse atrophy. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* **32**, 128–137.
  14. Preedy V.R., Crabb D.W., Farrés J., Emery P.W. 2007. Alcoholic myopathy and acetaldehyde. *Novartis Found Symp.* **285**, 158–177; discussion 177–182, 198–199.
  15. Tskhovrebova L., Trinick J. 2010. Roles of titin in the structure and elasticity of the sarcomere. *J. Biomed. Biotechnol.* 2010:612482. doi: 10.1155/2010/612482.
  16. Anderson B.R., Granzier H.L. 2012. Titin-based tension in the cardiac sarcomere: molecular origin and physiological adaptations. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **110**, 204–217.
  17. Вихлянцев И.М., Подлубная З.А. 2012. Новые изоформы тайтина (коннектина) и их функциональная роль в поперечно-полосатых мышцах млекопитающих: факты и предположения. *Успехи биол. химии.* **52**, 239–280.
  18. Voelkel T., Linke W.A. 2011. Conformation-regulated mechanosensory control via titin domains in cardiac muscle. *Pflugers Arch.* **462**, 143–154.
  19. Li S., Guo W., Schmitt B.M., Greaser M.L. 2012. Comprehensive analysis of titin protein isoform and alternative splicing in normal and mutant rats. *J. Cell Biochem.* **113** (4), 1265–1273.
  20. Вихлянцев И.М., Карадулева Е.В., Подлубная З.А. 2008. Сезонные изменения изоформного состава тайтина в мышцах зимнеящихся сусликов. *Биофизика.* **53**, 1066–1072.
  21. Nelson O.L., Robbins C.T., Wu Y., Granzier H. 2008. Titin isoform switching is a major cardiac adaptive response in hibernating grizzly bears. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **295**, H366–371.
  22. Карадулева Е.В., Вихлянцев И.М., Тутукина М.Н., Подлубная З.А. 2010. Сезонные изменения экспрессии N2B и N2BA изоформ тайтина в миокарде зимнеящихся сусликов *Spermophilus undulatus*. *Вестн. биотехнол. и физ.-хим. биологии им. Ю.А. Овчинникова.* **6**(4), 5–12.
  23. Шумилина Ю.В., Вихлянцев И.М., Подлубная З.А., член-корреспондент РАН Козловская И.Б. 2010. Изоформный состав белков миозиновых нитей в миокарде монгольских песчанок *Meriones unguiculatus* после космического полета. *ДАН.* **430**, 264–267.
  24. Вихлянцев И.М., Окунева А.Д., Шпагина М.Д., Шумилина Ю.В., Молочков Н.В., Салмов Н.Н., Подлубная З.А. 2011. Изменения изоформного состава, структуры и функциональных свойств тайтина сердечной мышцы монгольской песчанки (*Meriones unguiculatus*) после пребывания в условиях реальной невесомости. *Биохимия.* **76**, 1629–1639.
  25. Окунева А.Д., Вихлянцев И.М., Шпагина М.Д., Рогачевский В.В., Хуцян С.С., Подлубная З.А., Григорьев А.И. 2012. Изменения изоформного состава тайтина и тяжелых цепей миозина скелетных мышц монгольской песчанки (*Meriones unguiculatus*) после 12-суточного космического полета. *Биофизика.* **57**, 756–763.
  26. Makarenko I., Opitz C.A., Leake M.C., Neagoe C., Kulke M., Gwathmey J.K., del Monte F., Hajjar R.J., Linke W.A. 2004. Passive stiffness changes caused by upregulation of compliant titin isoforms in human dilated cardiomyopathy hearts. *Circ. Res.* **95**, 708–716.
  27. Nagueh S.F., Shah G., Wu Y., Torre-Amione G., King N.M., Lahmers S., Witt C.C., Becker K., Labeit S., Granzier H.L. 2004. Altered titin expression, myocardial stiffness, and left ventricular function in patients with dilated cardiomyopathy. *Circulation.* **110**, 155–162.
  28. Вихлянцев И.М., Подлубная З.А. 2008. Изоформный состав тайтина в мышцах при патологических процессах. *Биофизика.* **53**, 1058–1065.
  29. Borbély A., Falcao-Pires I., van Heerebeek L., Hamdani N., Edes I., Gavina C., Leite-Moreira A.F., Bronzwaer J.G., Papp Z., van der Velden J., Stienen G.J., Paulus W.J. 2009. Hypophosphorylation of the Stiff N2B titin isoform raises cardiomyocyte resting tension in failing human myocardium. *Circ. Res.* **104**, 780–786.
  30. Krüger M., Babicz K., von Frieling-Salewsky M., Linke W.A. 2010. Insulin signaling regulates cardiac titin properties in heart development and diabetic cardiomyopathy. *J. Mol. Cell Cardiol.* **48**, 910–916.
  31. Карадулева Е.В., Вихлянцев И.М., Подлубная З.А. 2010. Экспрессия тайтина в миокарде спонтанно гипертензивных крыс при развитии гипертрофии. *Биофизика.* **55**, 612–618.
  32. Ahmad S., Rai T.S., Khullar M., Bahl A., Saikia U.N., Thungapathra M., Kumar R.M., Mahajan R., Talwar K.K. 2010. Decreased myocardial expression of dystrophin and titin mRNA and protein in dilated cardiomyopathy: possibly an adverse effect of TNF-alpha. *J. Clin. Immunol.* **30**, 520–530.
  33. Lassche S., Stienen G.J., Irving T.C., van der Maarel S.M., Voermans N.C., Padberg G.W., Granzier H., van Engelen B.G., Ottenheijm C.A. 2013. Sarcomeric dysfunction contributes to muscle weakness in facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Neurology.* **80**, 733–737.
  34. Lang C.H., Frost R.A., Svanberg E., Vary T.C. 2004. IGF-1/IGFBP-3 ameliorates alterations in protein synthesis, eIF4E availability, and myostatin in alcohol-fed rats. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **286**, E916–926.
  35. Opitz C.A., Leake M.C., Makarenko I., Benes V., Linke W.A. 2004. Developmentally regulated switching of titin size alters myofibrillar stiffness in the perinatal heart. *Circ. Res.* **94**, 967–975.
  36. Liu D., Shi L., Han C., Yu J., Li D., Zhang Y. 2012. Validation of reference genes for gene expression studies in virus-infected *Nicotiana benthamiana* using quantitative real-time PCR. *PLoS One.* **7**, e46451. doi: 10.1371/journal.pone.0046451.
  37. Livak K.J., Schmittgen T.D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* **25**, 402–408.
  38. Tatsumi R., Hattori A. 1995. Detection of giant myofibrillar proteins connectin and nebulin by electrophoresis in 2% polyacrylamide slab gels strengthened with agarose. *Anal. Biochem.* **224**, 28–31.
  39. Tikunov B.A., Sweeney H.L., Rome L.C. 2001. Quantitative electrophoretic analysis of myosin heavy chains in single muscle fibers. *J. Appl. Physiol.* **90**, 1927–1935.
  40. Otis J.S., Guidot D.M. 2009. Procysteine stimulates expression of key anabolic factors and reduces plantaris atrophy in alcohol-fed rats. *Alcohol Clin. Exp. Res.* **33**, 1450–1459.
  41. Goll D.E., Neti G., Mares S.W., Thompson V.F. 2008. Myofibrillar protein turnover: the proteasome and the calpains. *J. Anim. Sci.* **86** (14 Suppl), E19–35.