

МИОЗИН И ТОНКИЙ ФИЛАМЕНТ МИОКАРДА – МИШЕНИ ДВУХВАЛЕНТНЫХ КАТИОНОВ СВИНЦА И КАДМИЯ

© 2024 О.П. Герцен*, Ю.К. Потоскуева, А.Е. Цыбина,
Т.А. Мячина, Л.В. Никитина

Институт иммунологии и физиологии УрО РАН,
620078 Екатеринбург, Россия; электронная почта: o.p.gerzen@gmail.com

Поступила в редакцию 18.05.2024

После доработки 10.06.2024

Принята к публикации 11.06.2024

Свинец и кадмий – это тяжёлые металлы, которые широко распространены в окружающей среде и вносят значительный вклад в сердечно-сосудистую заболеваемость и смертность. С помощью окрашивания Leadmium Green мы показали, что двухвалентные катионы свинца и кадмия способны проникать внутрь кардиомиоцита, распределяясь по всей клетке. Методом искусственной подвижной системы мы показали, что скорость скольжения актина и нативного тонкого филамента по миозину снижается при повышении концентрации Pb^{2+} и Cd^{2+} . Для остановки движения тонкого филамента по миозину требовались значительно меньшие концентрации Pb^{2+} и Cd^{2+} (0,6 мМ), чем для остановки движения актина по миозину (1,1–1,6 мМ). Для остановки движения актина по миозину требовалась более низкая концентрация Cd^{2+} (1,1 мМ) по сравнению с Pb^{2+} (1,6 мМ) и комбинацией $Pb^{2+} + Cd^{2+}$ (1,3 мМ). При этом не было найдено отличий в воздействии ионов свинца и кадмия на относительную силу, развиваемую головками миозина, и количество осевших на миозин актиновых филаментов. Скорость скольжения актина по миозину левого предсердия, правого и левого желудочков одинаково изменялась при воздействии одной и той же дозы одного и того же металла. Таким образом, мы впервые показали, что Pb^{2+} и Cd^{2+} могут оказывать прямое воздействие на функцию миозина и тонкого филамента, при этом Cd^{2+} оказывает более токсичное влияние, нежели Pb^{2+} .

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: миозин, тонкий филамент, свинец, кадмий, сердечная мышца.

DOI: 10.31857/S0320972524070068 EDN: WNFGAG

ВВЕДЕНИЕ

Мышечное сокращение происходит благодаря скольжению тонких и толстых филаментов друг относительно друга [1]. Толстые филаменты состоят главным образом из миозина, тогда как тонкие филаменты в основном состоят из актина, тропомиозина и субъединиц тропонина: Т, I, С [2]. Миозин сердца млекопитающих содержит шесть полипептидных цепей, а именно – две тяжёлые цепи миозина (ТЦМ), две существенные (ЛЦМ 1) и две регуляторные (ЛЦМ 2) лёгкие цепи. ТЦМ миокарда представлены двумя изоформами: α -ТЦМ и β -ТЦМ, которые отличаются АТРазной активностью [3]. ЛЦМ 1 и ЛЦМ 2 также представлены

двумя изоформами, названными в зависимости от камеры сердца: предсердные или желудочковые, каждая из которых вносит различный вклад в кинетику миозина [4].

Двухвалентные катионы, такие как кальций и магний, играют ключевую роль в сокращении сердца. ЛЦМ 2 связывает ионы Ca^{2+} [5] и Mg^{2+} [6]. Mg^{2+} также необходим для АТРазной активности миозина, поскольку АТР-связывающий карман миозина связывает комплекс АТР- Mg^{2+} , обеспечивая необходимую энергию для генерации силы [7]. Тропонин С обладает способностью связывать Ca^{2+} , запуская процесс скольжения тонких и толстых филаментов друг относительно друга [8].

Свинец и кадмий, будучи широко распространёнными в окружающей среде ксенобиотиками, вносят значительный вклад в сердечно-сосудистую заболеваемость и смертность. В 2019 году из-за воздействия свинца были потеряны более 1 миллиона жизней и 21,7 миллиона лет жизни с поправкой на инвалидность (DALY) [9].

Принятые сокращения: ЛЦМ 1 – существенная лёгкая цепь миозина; ЛЦМ 2 – регуляторная лёгкая цепь миозина; НТФ – нативный тонкий филамент; ТЦМ – тяжёлые цепи миозина.

* Адресат для корреспонденции.

На свинец приходится 4,6% глобального бремени сердечно-сосудистых заболеваний [9], при этом по кадмию глобальных статистических данных нет.

Свинец и кадмий могут иметь разные степени окисления (Pb^0 , Pb^{2+} , Pb^{4+} , Cd^0 , Cd^{1+} , Cd^{2+}) и попадают в организм в форме различных соединений [10], при этом в организме их наиболее распространённая форма – со степенью окисления +2. Период полувыведения Pb^{2+} и Cd^{2+} из организма составляет около 10–30 лет [11, 12]. Pb^{2+} и Cd^{2+} способны накапливаться в миокарде [13–15], и помимо потенциальных опосредованных эффектов, связанных с гипертонией [16, 17], атеросклерозом [18] или почечной дисфункцией [19], они могут оказывать прямое влияние на миокард [20–22]. Ионы свинца и кадмия вызывают окислительный стресс, приводящий к повреждению эндотелия сосудов и кардиомиоцитов [23–25], вмешиваются в нормальный клеточный цикл, стимулируя апоптоз [26, 27], и, действуя на кальциевые каналы L-типа, изменяют кальциевую активацию, замедляют деполяризацию [28] и способствуют развитию аритмии [20]. Было показано, что длительное воздействие ионов свинца и кадмия на организм снижает скорость скольжения актина по миозину миокарда, вызывает сдвиг соотношения изоформ ТЦМ, а воздействие ионов свинца значительно снижает фосфорилирование ЛЦМ 2 в предсердиях [29–33].

Размер и ионная форма многих тяжёлых металлов позволяют им связываться с -SH-группами белков [34], тем самым потенциально вытесняя незаменимые ионы, такие как Ca^{2+} , Zn^{2+} и Mg^{2+} [35–37]. В частности, Pb^{2+} и Cd^{2+} могут влиять на АТФазную активность миозина [38], а также на функцию белков семейства EF-hand, таких как скелетный тропонин С [39] и кальмодулин [40, 41]. В то время как сердечный тропонин С и сердечная ЛЦМ 2, будучи членами семейства EF-hand, способны связывать Ca^{2+} и Mg^{2+} [6], остаётся неясным, обладают ли похожие двухвалентные катионы, такие как Pb^{2+} и Cd^{2+} , сродством к ним. Поэтому всестороннее изучение влияния Pb^{2+} и Cd^{2+} на функциональные характеристики сократительных и регуляторных белков миокарда представляется необходимым.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Животные. Все эксперименты проводились в соответствии с Директивой 2010/63/EU и были одобрены Этическим комитетом Института иммунологии и физиологии УрО РАН. Взрослых крыс линии Wistar в возрасте 24–26 недель перед использованием в экспериментах содержали в стандартных условиях. Перед изоляцией сердца животные были анестезированы внутримышеч-

ной инъекцией 0,3 мл/кг Zoletil® 100 («Virbac», Карро, Франция) и 1 мл/кг ксилазина 2%-ного («Alfasan», Вурден, Нидерланды), гепаринизированы 5000 МЕ/кг гепарином натрия («Эллара», Россия).

Выделение кардиомиоцитов желудочка. Единичные кардиомиоциты были выделены из левого желудочка крыс с использованием комбинированного метода перфузии по Лангендорфу и внутрикамерных инъекций, как было описано ранее [42]. Суспензии кардиомиоцитов хранили в модифицированном HEPES-буферном растворе Tyrode (140,0 mM NaCl, 5,4 mM KCl, 1,0 mM $MgSO_4$, 10,0 mM HEPES, 11,1 mM D-глюкозы и 1,8 mM $CaCl_2$, pH 7,35) при комнатной температуре (22 ± 2 °C) и использовали в течение 4–6 ч. Выделенные кардиомиоциты перед использованием в экспериментах выдерживали в покое не менее 30 мин.

Измерения внутриклеточных $[Pb^{2+}]$ и $[Cd^{2+}]$. Для регистрации внутриклеточного $[Pb^{2+}]$ (или $[Cd^{2+}]$) суспензии кардиомиоцитов крысы инкубировали с 2,5 мкМ Leadmium Green AM («Molecular Devices», Сан-Хосе, Калифорния, США) и 0,1%-ным Pluronic® F-127 («AAT Bioquest», США) при комнатной температуре в темноте в течение 30 мин, а затем промывали HEPES-буферным раствором Tyrode. Интенсивность испускаемой флуоресценции, возбуждаемой оптически при 488 нм, регистрировали при 463–614 нм с использованием системы конфокальной лазерной сканирующей микроскопии (LSM 710, «Carl Zeiss», Йена, Германия). Для измерения изменений внутриклеточного $[Pb^{2+}]$ (или $[Cd^{2+}]$) стимулированные кардиомиоциты инкубировали при 36 ± 1 °C в растворе, содержащем Pb^{2+} (или Cd^{2+}), в течение 10 мин. Клетки стимулировали полем с частотой 1 Гц. Изменение сигнала флуоресценции рассчитывали и использовали как показатель изменения внутриклеточных $[Pb^{2+}]$ и $[Cd^{2+}]$. Анализ конфокальных 2D-изображений окрашенных кардиомиоцитов проводили с использованием программного обеспечения FIJI ImageJ (National Institutes of Health, Бетесда, Мэриленд, США).

Экстракция белка. Для основной части экспериментов миозин выделяли из левого желудочка сердца быка [43]. Для сравнения влияния Pb^{2+} и Cd^{2+} на актин-миозиновое взаимодействие в различных камерах сердца миозин экстрагировали из левого предсердия, правого и левого желудочков свиньи [43]. Актин был выделен из быстрых скелетных мышц кролика [44]. Нативный тонкий филамент (НТФ) выделяли из левого желудочка свиньи [45].

SDS-PAGE. Состав ТЦМ определяли методом полиакриламидного гель-электрофореза с додецилсульфатом натрия (SDS-PAGE) [46]. Состав ЛЦМ и НТФ определяли по Laemmli [47].

Искусственная подвижная система. Характеристики актин-миозинового взаимодействия исследовали с помощью искусственной подвижной системы [48] с модификациями, а именно – из состава всех используемых растворов были исключены вещества с активными -SH-группами (например, дитиотреитол), т.к. они активно связывают свинец и, в меньшей степени, кадмий. В проточной камере объемом 50 мкл по миозину двигались актиновые филаменты в присутствии АТФ или НТФ в присутствии АТФ и кальция. Чтобы изучить прямое влияние Pb^{2+} и Cd^{2+} , мы добавляли растворы $PbCl_2$ и $CdCl_2$ в проточную камеру в различных концентрациях. С помощью программы GMimPro (Mashanov and Molloy, 2007) регистрировали скольжение филаментов по миозину – анализировали не менее 10 записей, в каждой из которых регистрировали не менее 8–10 филаментов.

Для изучения влияния Pb^{2+} и Cd^{2+} на характеристики актин-миозинового взаимодействия мы анализировали скорость скольжения актина по миозину левого желудочка быка и фракцию подвижных филаментов (количество двигающихся филаментов по отношению к их общему числу) при различных концентрациях этих ионов, а также скорость скольжения НТФ левого желудочка свиньи по миозину левого желудочка свиньи. Для сравнения влияния Pb^{2+} и Cd^{2+} на актин-миозиновое взаимодействие в разных камерах сердца мы изучали скорость скольжения актина по миозину левого предсердия, правого и левого желудочков сердца свиньи.

Для исследования количества осевших на миозин левого желудочка быка актиновых филаментов мы использовали высокие концентрации $PbCl_2$ и $CdCl_2$ (1,5–3,5 мМ), при которых движения не наблюдалось.

Относительную силу, развиваемую головками миозина, определяли с использованием смеси миозина левого желудочка быка и нециклирующего NEM-модифицированного миозина [49] в различных соотношениях. NEM-модифицированный миозин прикреплялся к актину и служил грузом, препятствующим скольжению. Мера относительной силы определялась как доля нециклирующего NEM-модифицированного миозина, необходимая для остановки скольжения актина по миозину.

Статистический анализ. Зависимость скорости скольжения актина по миозину левого желудочка быка анализировали по двухфазной кривой «концентрация-эффект» (OriginPro). Статистический анализ и построение графиков проводили с использованием критерия Краскела–Уоллиса и программы PrizmaGraph или OriginPro, различия считали статистически значимыми при уровне достоверности $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Измерение внутриклеточного $[Pb^{2+}]$ и $[Cd^{2+}]$. В течение 10 мин наблюдалось увеличение интенсивности флуоресценции на 43% после обработки $PbCl_2$ и на 15% после обработки $CdCl_2$, что подтверждает проникновение двухвалентных катионов свинца и кадмия внутрь кардиомиоцитов (рис. 1).

Состав тяжёлых и лёгких цепей миозина. Тяжёлые цепи миозина (ТЦМ) левого желудочка быка были представлены β -изоформой, а существенные (ЛЦМ 1) и регуляторные (ЛЦМ 2) лёгкие цепи миозина были представлены желудочковыми изоформами. В миокарде свиньи ТЦМ в левом предсердии были представлены 26% α -ТЦМ и 74% β -ТЦМ, в правом желудочке – 100% β -ТЦМ и в левом желудочке – 100% β -ТЦМ. В левом предсердии присутствовали предсердные изоформы ЛЦМ 1 и ЛЦМ 2, а в правом и левом желудочках – желудочковые изоформы ЛЦМ 1 и ЛЦМ 2. НТФ левого желудочка свиньи включал актин, тропомиозин и тропонин.

Характеристики актин-миозинового взаимодействия в присутствии ионов свинца и кадмия. Скорость скольжения актина по миозину снижалась с увеличением концентрации Pb^{2+} и Cd^{2+} (рис. 2), следуя двухфазной кривой «концентрация-эффект». Для остановки движения требовались различные концентрации каждого металла: 1,6 мМ Pb^{2+} , 1,1 мМ Cd^{2+} и 1,3 мМ для их комбинации. Полумаксимальные ингибирующие концентрации (IC_{50}) показали два значения для каждого металла из-за двухфазного характера кривых. Для кривой зависимости скорости от концентрации Pb^{2+} значения IC_{50} для фаз I и II составили 0,255 мМ и 1,251 мМ соответственно. Для кривой зависимости скорости от концентрации Cd^{2+} значения IC_{50} для фаз I и II составили 0,359 мМ и 0,956 мМ, для комбинации ионов – 0,176 мМ и 0,989 мМ соответственно (рис. 2, табл. 1).

Зависимость фракции подвижных филаментов от концентрации ионов свинца и кадмия также имела вид двухфазной кривой. Концентрации металлов для достижения нулевой фракции были те же, что и для остановки движения. Однако IC_{50} для фаз I и II различались и составляли соответственно 0,12 мМ и 1,012 мМ для Pb^{2+} , 0,269 мМ и 1,052 мМ для Cd^{2+} , 0,954 мМ и 1,272 мМ для их комбинации (рис. 2, табл. 1).

Мера относительной силы, развиваемой головками миозина, определялась как доля нециклирующего NEM-модифицированного миозина, необходимая для полной остановки движения. Для контрольного миозина эта доля составила 62%, а в присутствии Pb^{2+} , Cd^{2+} и их комбинации – 62%, 63% и 66% соответственно (рис. 3, а, б, в).

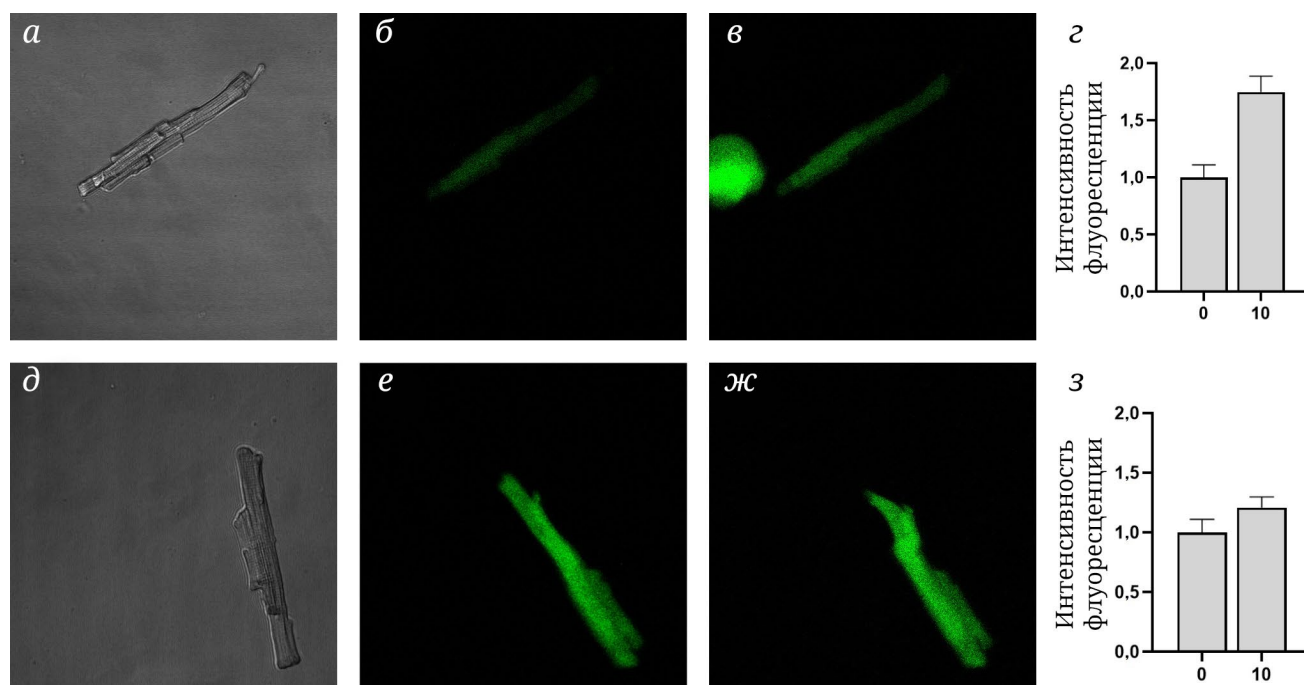


Рис. 1. Кардиомиоцит левого желудочка крысы, окрашенный Leadmium Green, в светлопольном режиме (а), на 0-й (б) и 10-й минуте (в) обработки $PbCl_2$ во флуоресцентном режиме; нормированная интенсивность флуоресценции на 0-й и 10-й минуте обработки $PbCl_2$ (з), данные представлены как среднее $\pm$ стандартное отклонение. Кардиомиоцит левого желудочка крысы, окрашенный Leadmium Green, в светлопольном режиме (д), на 0-й (е) и 10-й минуте (ж) обработки $CdCl_2$ во флуоресцентном режиме; нормированная интенсивность флуоресценции на 0-й и 10-й минуте обработки $CdCl_2$ (з), данные представлены как среднее $\pm$ стандартное отклонение

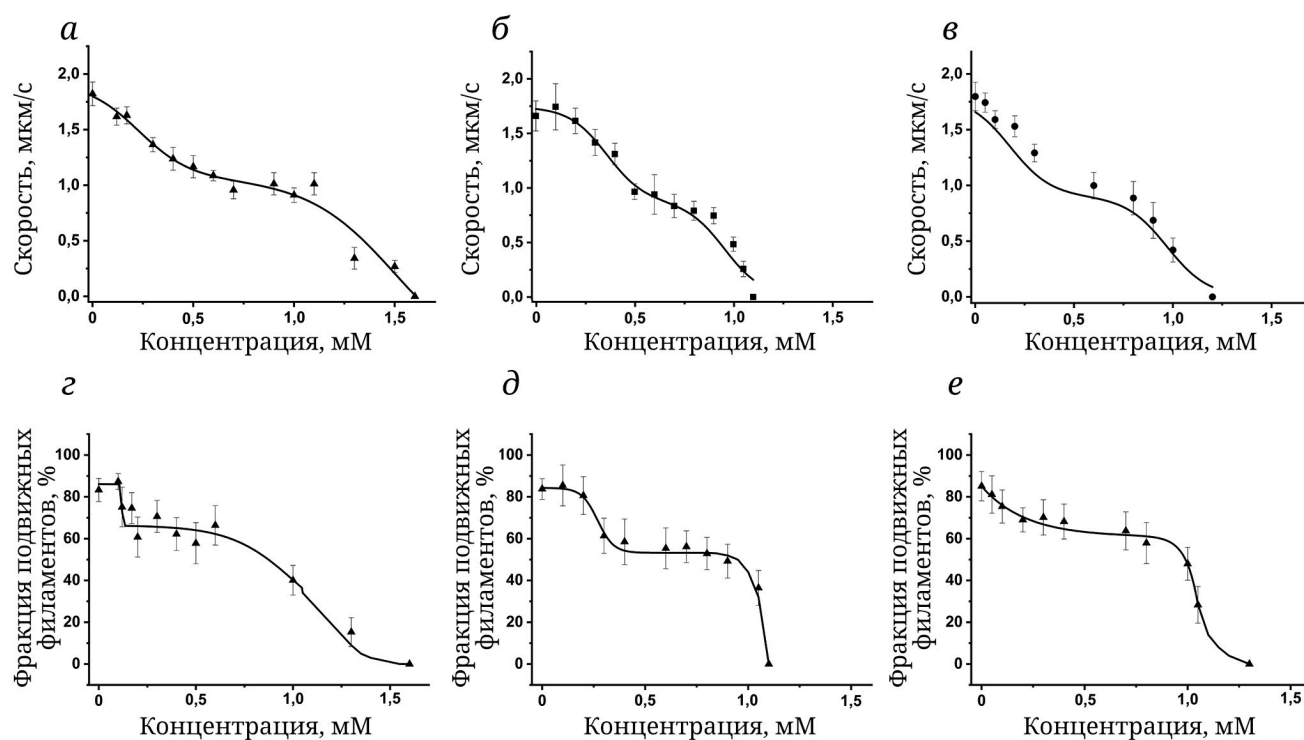
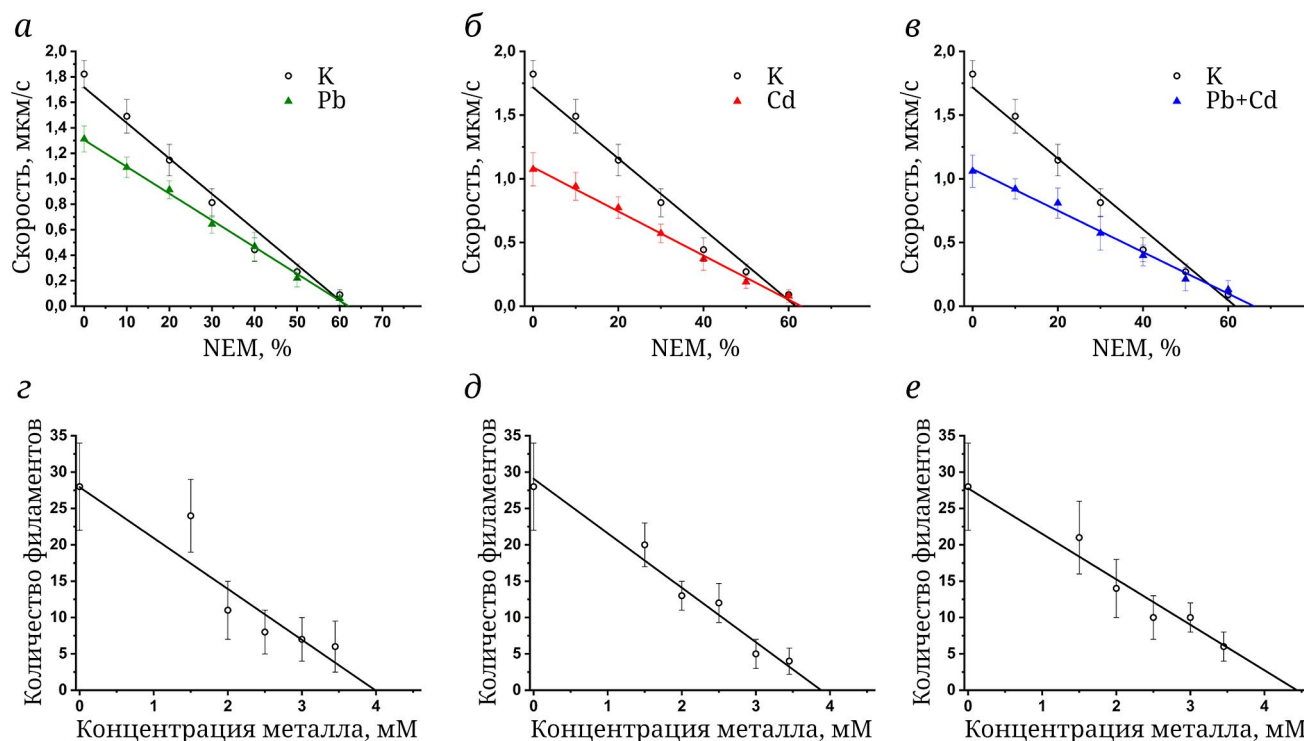


Рис. 2. Зависимость скорости скольжения актина по миозину от концентрации $PbCl_2$ (а), $CdCl_2$ (б) и комбинации $PbCl_2$ и $CdCl_2$ (1 : 1) (в); зависимость фракции подвижных филаментов от концентрации $PbCl_2$ (г), $CdCl_2$ (д) и комбинации $PbCl_2$ и $CdCl_2$ (1 : 1) (е)

Таблица 1. Характеристики кривых «концентрация-эффект» в присутствии ионов свинца и кадмия

	Скорость			Фракция подвижных филаментов		
	Pb ²⁺	Cd ²⁺	Pb ²⁺ + Cd ²⁺	Pb ²⁺	Cd ²⁺	Pb ²⁺ + Cd ²⁺
Концентрация, необходимая для остановки движения, мМ	1,6	1,1	1,3	1,6	1,1	1,3
IC ₅₀ фазы I, мМ	0,255	0,359	0,176	0,120	0,269	0,754
IC ₅₀ фазы II, мМ	1,251	0,956	0,989	1,012	1,052	1,272

**Рис. 3.** Зависимость скорости скольжения актина по миозину от доли NEM-модифицированного миозина в контрольной группе (К), при добавлении 0,5 мМ PbCl₂ (а), 0,5 мМ CdCl₂ (б) и 0,5 мМ комбинации PbCl₂ и CdCl₂ (1 : 1) (в). Количество филаментов в поле зрения экспериментальной записи при добавлении PbCl₂ (г), CdCl₂ (д) и комбинации PbCl₂ и CdCl₂ (1 : 1) (е)

При добавлении высоких концентраций исследуемых металлов (1,5–3,5 мМ) количество осевших на миозин актиновых филаментов снижалось пропорционально увеличению концентрации ионов (рис. 3, г, д, е). Значимых отличий между группами найдено не было.

Скорость скольжения актина по миозину разных камер сердца в присутствии ионов свинца и кадмия. Добавление 0,1 мМ PbCl₂ не оказывало значимого влияния на скорость скольжения актина по миозину всех исследуемых отделов сердца. При добавлении 0,5 мМ PbCl₂ скорость скольжения актина по миозину левого предсердия, правого и левого желудочка снижалась на 5%, 12% и 2% соответственно. При этом добавление 0,1 мМ CdCl₂ снижало скорость на 27%, 25%

и 25%, а 0,5 мМ CdCl₂ – на 47%, 43% и 55% для левого предсердия, правого и левого желудочка соответственно (рис. 4).

Скорость скольжения актина и НТФ по миозину в присутствии ионов свинца, кадмия и их комбинации. Добавление 0,1 мМ CdCl₂ снижало скорость скольжения актина по миозину на 26%, а добавление 0,1 мМ PbCl₂ и комбинации металлов не оказывало значимого влияния на эту скорость. Добавление 0,5 мМ PbCl₂ не оказывало значимого влияния, а добавление 0,5 мМ CdCl₂ и комбинации металлов снижало скорость скольжения актина по миозину на 56% и 45% соответственно (рис. 5, а).

При этом добавление 0,1 мМ PbCl₂, CdCl₂ и их комбинации снижало скорость скольжения НТФ

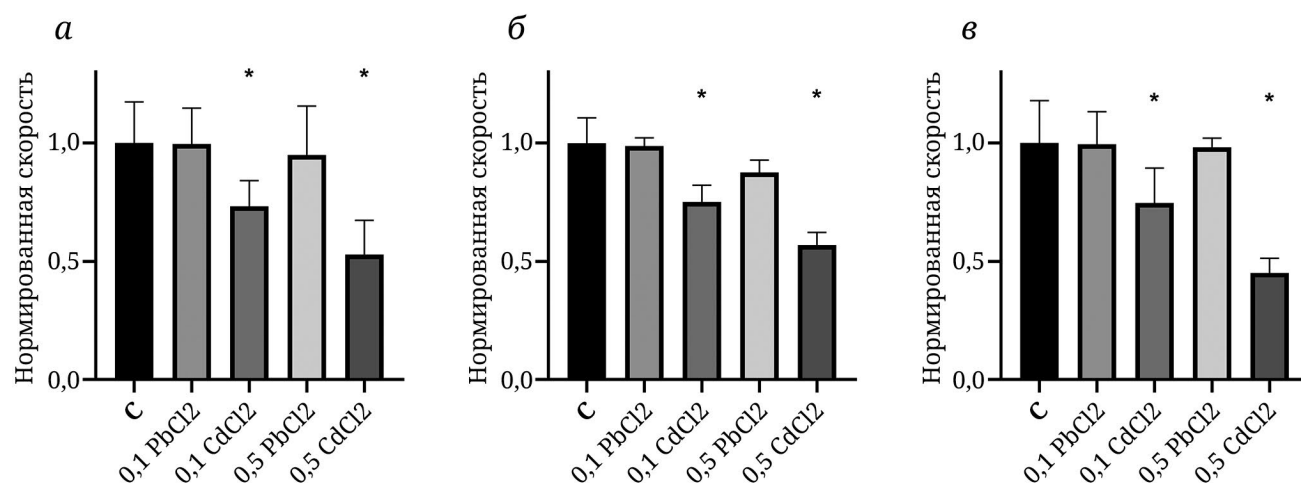


Рис. 4. Нормированная скорость скольжения актина по миозину предсердий (а), правого (б) и левого (в) желудочка свиньи в присутствии 0,1 мМ и 0,5 мМ $PbCl_2$ или $CdCl_2$. * Статистически значимые отличия от контрольной группы ($p < 0,05$)

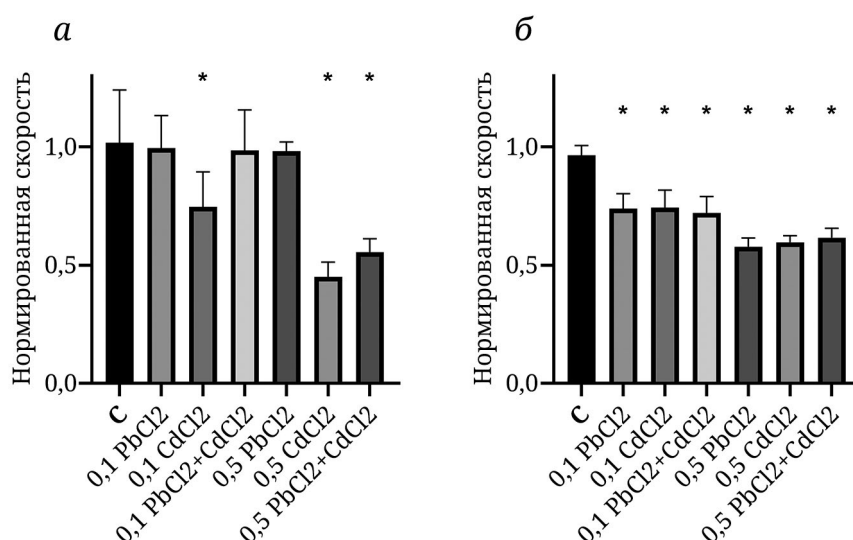


Рис. 5. Нормированная скорость скольжения актина (а) и НТФ левого желудочка свиньи (б) по миозину левого желудочка свиньи в присутствии 0,1 мМ и 0,5 мМ $PbCl_2$, $CdCl_2$ или их комбинации. * Статистически значимые отличия от контрольной группы ($p < 0,05$)

по миозину на 19%, 23% и 25% соответственно. А при добавлении 0,5 мМ $PbCl_2$, $CdCl_2$ и их комбинации скорость скольжения НТФ по миозину снижалась на 40%, 38% и 36% соответственно (рис. 5, б). При этом при добавлении 0,6 мМ $PbCl_2$, $CdCl_2$ или их комбинации движение полностью останавливалось.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Влияние ионов свинца и кадмия на функцию миозина и тонкого филамента. Pb^{2+} и Cd^{2+} могут накапливаться в миокарде [13, 14] и изменять профиль потенциала действия кардиомио-

цитов [21, 28]. Двухвалентные катионы свинца и кадмия способны проникать в кардиомиоциты через различные транспортные каналы [50], однако дальнейшая миграция и распределение по клетке были показаны только для ионов свинца [21]. Наши результаты впервые предоставляют экспериментальные доказательства того, что не только Pb^{2+} , но и Cd^{2+} способен проникать в кардиомиоциты и распределяться по всей клетке. Следовательно, оба металла, в том числе благодаря их способности связываться с -SH-группами белков [34], имеют потенциальную возможность взаимодействовать с металл-связывающими сайтами сократительных и регуляторных белков миокарда [50].

Миозин сердца содержит два сайта связывания металлов – АТР-связывающий карман, который связывает Mg^{2+} в комплексе Mg –АТР [7], и ЛЦМ 2, которая, будучи членом семейства EF-hand, способна связывать Ca^{2+} и Mg^{2+} [6]. Важно понимать, что АТР-связывающий карман, помимо комплекса Mg –АТР, может также связывать комплекс Ca –АТР [7, 51, 52], следовательно, на эти сайты связывания гипотетически могут воздействовать и другие двухвалентные катионы. Кроме того, было показано, что АТР-разная активность миозина изменяется в присутствии Pb^{2+} и Cd^{2+} [22, 38, 39].

Скелетный тропонин С и кальмодулин, принадлежащие к семейству EF-hand, могут связывать ряд двухвалентных катионов, включая Pb^{2+} , Cd^{2+} , Sr^{2+} , Mn^{2+} и Zn^{2+} [39, 41]. Оптимальное связывание катионов с белками семейства EF-hand происходит при ионном радиусе в диапазоне между ионными радиусами Mg^{2+} (0,81 Å) и Ca^{2+} (1,06 Å) [53].

Учитывая эффективный ионный радиус Cd^{2+} (0,97 Å) и Pb^{2+} (1,19 Å), мы предполагаем, что первоочередной мишенью для этих ионов среди белков саркомера миокарда может служить входящий в состав тонкого филамента тропонин С – член семейства EF-hand, который в норме связывает только Ca^{2+} . Ранее было показано, что скелетный тропонин С может взаимодействовать с Pb^{2+} и Cd^{2+} [39, 54]. Второй мишенью может служить ЛЦМ 2, которая связывает как Mg^{2+} , так и Ca^{2+} . К третьей мишени – АТР-связывающему карману миозина, который в норме связывает только Mg^{2+} – двухвалентные катионы свинца и кадмия должны иметь меньшее сродство в силу большей разности эффективных ионных радиусов.

Мы исследовали характеристики взаимодействия миозина с актином и НТФ, состоящим из актина, тропонина и тропомиозина, при различных концентрациях хлорида свинца и кадмия. Снижение скорости скольжения актина по миозину происходило при увеличении концентрации ионов вплоть до полной остановки движения при концентрациях в диапазоне 1,1–1,6 мМ. При этом кривая зависимости скорости от концентрации Pb^{2+} и Cd^{2+} имеет вид двухфазной кривой, что гипотетически может быть обусловлено наличием у миозина двух потенциальных мишеней для связывания исследуемых ионов: АТР-связывающего кармана и ЛЦМ 2.

Эксперимент с НТФ проходил при наличии Ca^{2+} в растворе, что в теории должно было ослабить действие Pb^{2+} и Cd^{2+} за счёт конкуренции. При низких концентрациях металлов снижение скорости скольжения НТФ по миозину действительно происходило немного медленнее, чем при скольжении актина, но при увеличении дозы до 0,6 мМ происходила остановка движения, что подтверждает более высокую чувствительность

тонкого филамента к Pb^{2+} и Cd^{2+} по сравнению с миозином.

Отдельного обсуждения заслуживает сравнение скорости скольжения актина по миозину разных камер сердца. Известно, что в миокарде предсердий и правого желудочка Pb^{2+} и Cd^{2+} могут накапливаться в более высокой концентрации, чем в левом желудочке [55], а в наших предыдущих работах было показано, что скорость скольжения тонкого филамента по миозину предсердий и правого желудочка более подвержена изменениям при хронической интоксикации свинцом [33]. Таким образом, несмотря на то что миозин предсердий и желудочков имеет различные изоформы ЛЦМ 2, при данных концентрациях Pb^{2+} и Cd^{2+} различий в характеристиках актин-миозинового взаимодействия найдено не было.

Сравнение токсического влияния ионов свинца и кадмия. По данным ВОЗ свинец, среди прочих химических веществ, оказывает наиболее серьёзное влияние на функцию сердца и вызывает сердечно-сосудистые заболевания [9]. При этом кадмию уделяется значительно меньше внимания, и глобальных статистических данных по влиянию кадмия на функцию сердца нет [9]. Наши исследования показывают, что прямое воздействие ионов кадмия на функцию миозина миокарда значительно более токсично, чем такое у ионов свинца: при скольжении актина по миозину Cd^{2+} останавливает движение при концентрации 1,1 мМ, тогда как для Pb^{2+} требуется концентрация 1,6 мМ. Cd^{2+} имеет меньший ионный радиус по сравнению с Pb^{2+} , поэтому его токсичность в данном случае предсказуема. Стоит отметить, что для полной остановки скольжения актина по миозину требуется концентрация комбинации металлов 1,3 мМ, что выше, чем для Cd^{2+} , но ниже, чем для Pb^{2+} . Это указывает не на суммарный эффект воздействия Pb^{2+} и Cd^{2+} , а на конкурентные отношения между этими ионами.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Свинец и кадмий в форме двухвалентных катионов способны проникать и распределяться по всему кардиомиоциту, что создаёт для них возможность связываться с белками и ухудшать их функцию.

Мы показали, что для остановки движения тонкого филамента по миозину требуются значительно меньшие концентрации Pb^{2+} и Cd^{2+} , чем для остановки движения актина по миозину. Прямое воздействие Pb^{2+} и Cd^{2+} может быть обусловлено потенциальным взаимодействием с белками семейства EF-hand тропонином С и ЛЦМ 2, а также с АТР-связывающим карманом,

при этом тропонин С является их первоочередной мишенью. Наши исследования показывают, что прямое воздействие Cd²⁺ на функцию миозина может быть значительно более токсичным, чем воздействие свинца.

Таким образом, мы впервые показали, что Pb²⁺ и Cd²⁺ могут оказывать прямое воздействие на функцию миозина и тонкого филамента, изменяя механические свойства миокарда на молекулярном уровне и увеличивая риск сердечно-сосудистых заболеваний. Учитывая способность Pb²⁺ и Cd²⁺ к накоплению в миокарде, это является серьёзной проблемой для населения, проживающего в экологически неблагоприятных условиях. Поэтому исследование механизмов влияния двухвалентных катионов свинца и кадмия на функцию миозина и НТФ не только вносит вклад в копилку фундаментальных знаний, но и может быть использовано для дальнейшей разработки эффективных стратегий профилактики и лечения сердечно-сосудистых заболеваний.

Вклад авторов. Герцен О.П., Никитина Л.В. – концептуализация и руководство работой; Потоскуева Ю.К., Цыбина А.Е., Мячина Т.А., Герцен О.П. – проведение экспериментов и обсуждение результатов исследования; Потоскуева Ю.К., Мячина Т.А., Герцен О.П. – написание текста; Герцен О.П., Никитина Л.В. – редактирование текста статьи.

Финансирование. Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 22-74-00128).

Благодарности. Работа выполнена на оборудовании Центра коллективного пользования ИИФ УрО РАН.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием животных, соответствовали этическим стандартам учреждения, в котором проводились исследования, и утверждённым правовым актам РФ и международных организаций.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Haselgrove, J. C., and Huxley, H. E. (1973) X-ray evidence for radial cross-bridge movement and for the sliding filament model in actively contracting skeletal muscle, *J. Mol. Biol.*, **77**, 549-568, [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(73\)90222-2](https://doi.org/10.1016/0022-2836(73)90222-2).
2. Gordon, A. M., Homsher, E., and Regnier, M. (2000) Regulation of contraction in striated muscle, *Physiol. Rev.*, **80**, 853-924, <https://doi.org/10.1152/physrev.2000.80.2.853>.
3. Walklate, J., Ferrantini, C., Johnson, C. A., Tesi, C., Poggesi, C., and Geeves, M. A. (2021) Alpha and beta myosin isoforms and human atrial and ventricular contraction, *Cell. Mol. Life Sci.*, **78**, 7309-7337, <https://doi.org/10.1007/s00018-021-03971-y>.
4. Yamashita, H. (2003) Myosin light chain isoforms modify force-generating ability of cardiac myosin by changing the kinetics of actin-myosin interaction, *Cardiovasc. Res.*, **60**, 580-588, <https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2003.09.011>.
5. Da Silva, A. C. R., Kendrick-Jones, J., and Reinach, F. C. (1995) Determinants of ion specificity on EF-hands sites, *J. Biol. Chem.*, **270**, 6773-6778, <https://doi.org/10.1074/jbc.270.12.6773>.
6. Sitbon, Y. H., Yadav, S., Kazmierczak, K., and Szczesna-Cordary, D. (2020) Insights into myosin regulatory and essential light chains: a focus on their roles in cardiac and skeletal muscle function, development and disease, *J. Muscle Res. Cell Motil.*, **41**, 313-327, <https://doi.org/10.1007/s10974-019-09517-x>.
7. Walker, B. C., Walczak, C. E., and Cochran, J. C. (2021) Switch-1 instability at the active site decouples ATP hydrolysis from force generation in myosin II, *Cytoskeleton*, **78**, 3-13, <https://doi.org/10.1002/cm.21650>.
8. Gordon, A. M., Regnier, M., and Homsher, E. (2001) Skeletal and cardiac muscle contractile activation: tropomyosin “rocks and rolls,” *Physiology*, **16**, 49-55, <https://doi.org/10.1152/physiologyonline.2001.16.2.49>.
9. World Health Organization (2019) *The Public Health Impact of Chemicals: Knowns and Unknowns*. Data Addendum for 2019.
10. Wu, X., Cobbina, S. J., Mao, G., Xu, H., Zhang, Z., and Yang, L. (2016) A review of toxicity and mechanisms of individual and mixtures of heavy metals in the environment, *Environ. Sci. Pollut. Res.*, **23**, 8244-8259, <https://doi.org/10.1007/s11356-016-6333-x>.
11. Rosin, A. (2009) The long-term consequences of exposure to lead, *Isr. Med. Assoc. J.*, **11**, 689-694.
12. Suwazono, Y., Kido, T., Nakagawa, H., Nishijo, M., Honda, R., Kobayashi, E., Dochi, M., and Nogawa, K. (2009) Biological half-life of cadmium in the urine of inhabitants after cessation of cadmium exposure, *Biomarkers*, **14**, 77-81, <https://doi.org/10.1080/13547500902730698>.
13. Ali, S., Awan, Z., Mumtaz, S., Shakir, H. A., Ahmad, F., Ulhaq, M., Tahir, H. M., Awan, M. S., Sharif, S., Irfan, M., and Khan, M. A. (2020) Cardiac toxicity of heavy metals (cadmium and mercury) and pharmacological intervention by vitamin C in rabbits, *Environ. Sci. Pollut. Res.*, **27**, 29266-29279, <https://doi.org/10.1007/s11356-020-09011-9>.

14. Davuljigari, C. B., and Gottipolu, R. R. (2020) Late-life cardiac injury in rats following early life exposure to lead: reversal effect of nutrient metal mixture, *Cardiovasc. Toxicol.*, **20**, 249-260, <https://doi.org/10.1007/s12012-019-09549-2>.
15. Tai, Y.-T., Chou, S.-H., Cheng, C.-Y., Ho, C.-T., Lin, H.-C., Jung, S.-M., Chu, P.-H., and Ko, F.-H. (2022) The preferential accumulation of cadmium ions among various tissues in mice, *Toxicol. Rep.*, **9**, 111-119, <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2022.01.002>.
16. Borné, Y., Barregard, L., Persson, M., Hedblad, B., Fagerberg, B., and Engström, G. (2015) Cadmium exposure and incidence of heart failure and atrial fibrillation: a population-based prospective cohort study, *BMJ Open*, **5**, e007366, <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2014-007366>.
17. Ruiz-Hernandez, A., Navas-Acien, A., Pastor-Barriuso, R., Crainiceanu, C. M., Redon, J., Guallar, E., and Tellez-Plaza, M. (2017) Declining exposures to lead and cadmium contribute to explaining the reduction of cardiovascular mortality in the US population, 1988-2004, *Int. J. Epidemiol.*, **46**, 1903-1912, <https://doi.org/10.1093/ije/dyx176>.
18. Messner, B., Knoflach, M., Seubert, A., Ritsch, A., Pfaller, K., Henderson, B., Shen, Y. H., Zeller, I., Willeit, J., Laufer, G., Wick, G., Kiechl, S., and Bernhard, D. (2009) Cadmium is a novel and independent risk factor for early atherosclerosis mechanisms and *in vivo* relevance, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **29**, 1392-1398, <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.109.190082>.
19. Fatima, G., Raza, A. M., Hadi, N., Nigam, N., and Mahdi, A. A. (2019) Cadmium in human diseases: it's more than just a mere metal, *Indian J. Clin. Biochem.*, **34**, 371-378, <https://doi.org/10.1007/s12291-019-00839-8>.
20. Ferreira De Mattos, G., Costa, C., Savio, F., Alonso, M., and Nicolson, G. L. (2017) Lead poisoning: acute exposure of the heart to lead ions promotes changes in cardiac function and Cav1.2 ion channels, *Biophys. Rev.*, **9**, 807-825, <https://doi.org/10.1007/s12551-017-0303-5>.
21. Ferreira, G., Santander, A., Chavarría, L., Cardozo, R., Savio, F., Sobrevia, L., and Nicolson, G. L. (2022) Functional consequences of lead and mercury exposomes in the heart, *Mol. Aspects Med.*, **87**, 101048, <https://doi.org/10.1016/j.mam.2021.101048>.
22. Fioresi, M., Furieri, L. B., Simões, M. R., Ribeiro, R. F., Jr, Meira, E. F., Fernandes, A. A., Stefanon, I., and Vassallo, D. V. (2013) Acute exposure to lead increases myocardial contractility independent of hypertension development, *Braz. J. Med. Biol. Res.*, **46**, 178-185, <https://doi.org/10.1590/1414-431X20122190>.
23. Javorac, D., Tatović, S., Anđelković, M., Repić, A., Baralić, K., Djordjevic, A. B., Mihajlović, M., Stevuljević, J. K., Đukić-Čosić, D., Čurčić, M., Antonijević, B., and Bulat, Z. (2022) Low-lead doses induce oxidative damage in cardiac tissue: Subacute toxicity study in Wistar rats and Benchmark dose modelling, *Food Chem. Toxicol.*, **161**, 112825, <https://doi.org/10.1016/j.fct.2022.112825>.
24. Patra, R. C., Rautray, A. K., and Swarup, D. (2011) Oxidative stress in lead and cadmium toxicity and its amelioration, *Vet. Med. Int.*, **2011**, 1-9, <https://doi.org/10.4061/2011/457327>.
25. Wang, Y., Fang, J., Leonard, S. S., and Krishna Rao, K. M. (2004) Cadmium inhibits the electron transfer chain and induces reactive oxygen species, *Free Radic. Biol. Med.*, **36**, 1434-1443, <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2004.03.010>.
26. Chou, S.-H., Lin, H.-C., Chen, S.-W., Tai, Y.-T., Jung, S.-M., Ko, F.-H., Pang, J.-H. S., and Chu, P.-H. (2023) Cadmium exposure induces histological damage and cytotoxicity in the cardiovascular system of mice, *Food Chem. Toxicol.*, **175**, 113740, <https://doi.org/10.1016/j.fct.2023.113740>.
27. Li, C., Shi, L., Peng, C., Yu, G., Zhang, Y., and Du, Z. (2021) Lead-induced cardiomyocytes apoptosis by inhibiting gap junction intercellular communication via autophagy activation, *Chem. Biol. Interact.*, **337**, 109331, <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2020.109331>.
28. Shen, J., Wang, X., Zhou, D., Li, T., Tang, L., Gong, T., Su, J., and Liang, P. (2018) Modelling cadmium-induced cardiotoxicity using human pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes, *J. Cell. Mol. Med.*, **22**, 4221-4235, <https://doi.org/10.1111/jcmm.13702>.
29. Katsnelson, B. A., Klinova, S. V., Gerzen, O. P., Balakin, A. A., Lookin, O. N., Lisin, R. V., Nabiev, S. R., Privalova, L. I., Minigalieva, I. A., Panov, V. G., Katsnelson, L. B., Nikitina, L. V., Kuznetsov, D. A., and Protsenko, Y. L. (2020) Force-velocity characteristics of isolated myocardium preparations from rats exposed to subchronic intoxication with lead and cadmium acting separately or in combination, *Food Chem. Toxicol.*, **144**, 111641, <https://doi.org/10.1016/j.fct.2020.111641>.
30. Klinova, S. V., Minigalieva, I. A., Protsenko, Y. L., Sutunkova, M. P., Ryabova, I. V., Gerzen, O. P., Nabiev, S. R., Balakin, A. A., Lookin, O. N., Lisin, R. V., Kuznetsov, D. A., Privalova, L. I., Panov, V. G., Chernyshov, I. N., Katsnelson, L. B., Nikitina, L. V., and Katsnelson, B. A. (2021) Analysis of changes in the rat cardiovascular system under the action of lead intoxication and muscular exercise, *Hyg. Sanit.*, **100**, 1467-1474, <https://doi.org/10.47470/0016-9900-2021-100-12-1467-1474>.
31. Protsenko, Y. L., Klinova, S. V., Gerzen, O. P., Privalova, L. I., Minigalieva, I. A., Balakin, A. A., Lookin, O. N., Lisin, R. V., Butova, K. A., Nabiev, S. R., Katsnelson, L. B., Nikitina, L. V., and Katsnelson, B. A. (2020) Changes

- in rat myocardium contractility under subchronic intoxication with lead and cadmium salts administered alone or in combination, *Toxicol. Rep.*, **7**, 433-442, <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2020.03.001>.
32. Protsenko, Y. L., Katsnelson, B. A., Klinova, S. V., Lookin, O. N., Balakin, A. A., Nikitina, L. V., Gerzen, O. P., Minigalieva, I. A., Privalova, L. I., Gurvich, V. B., Sutunkova, M. P., and Katsnelson, L. B. (2018) Effects of subchronic lead intoxication of rats on the myocardium contractility, *Food Chem. Toxicol.*, **120**, 378-389, <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.07.034>.
33. Gerzen, O. P., Nabiev, S. R., Klinova, S. V., Minigalieva, I. A., Sutunkova, M. P., Katsnelson, B. A., and Nikitina, L. V. (2022) Molecular mechanisms of mechanical function changes of the rat myocardium under subchronic lead exposure, *Food Chem. Toxicol.*, **169**, 113444, <https://doi.org/10.1016/j.fct.2022.113444>.
34. Tang, N., Liu, X., Jia, M.-R., Shi, X.-Y., Fu, J.-W., Guan, D.-X., and Ma, L. Q. (2022) Amine- and thiol-bifunctionalized mesoporous silica material for immobilization of Pb and Cd: Characterization, efficiency, and mechanism, *Chemosphere*, **291**, 132771, <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.132771>.
35. De Souza, I. D., De Andrade, A. S., and Dalmolin, R. J. S. (2018) Lead-interacting proteins and their implication in lead poisoning, *Crit. Rev. Toxicol.*, **48**, 375-386, <https://doi.org/10.1080/10408444.2018.1429387>.
36. Kirberger, M., and Yang, J. J. (2008) Structural differences between Pb²⁺- and Ca²⁺-binding sites in proteins: Implications with respect to toxicity, *J. Inorg. Biochem.*, **102**, 1901-1909, <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2008.06.014>.
37. Yu, H., Zhen, J., Xu, J., Cai, L., Leng, J., Ji, H., and Keller, B. B. (2020) Zinc protects against cadmium-induced toxicity in neonatal murine engineered cardiac tissues via metallothionein-dependent and independent mechanisms, *Acta Pharmacol. Sin.*, **41**, 638-649, <https://doi.org/10.1038/s41401-019-0320-y>.
38. Vassallo, D. V., Lebach, E. C., Moreira, C. M., Wiggers, G. A., and Stefanon, I. (2008) Lead reduces tension development and the myosin ATPase activity of the rat right ventricular myocardium, *Braz. J. Med. Biol. Res.*, **41**, 789-795, <https://doi.org/10.1590/S0100-879X2008000900008>.
39. Chao, S., Bu, C.-H., and Cheung, W. Y. (1990) Activation of troponin C by Cd²⁺ and Pb²⁺, *Arch. Toxicol.*, **64**, 490-496, <https://doi.org/10.1007/BF01977632>.
40. Chao, S. H., Suzuki, Y., Zysk, J. R., and Cheung, W. Y. (1984) Activation of calmodulin by various metal cations as a function of ionic radius, *Mol. Pharmacol.*, **26**, 75-82.
41. Shirran, S. L., and Barran, P. E. (2009) The use of ESI-MS to probe the binding of divalent cations to calmodulin, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **20**, 1159-1171, <https://doi.org/10.1016/j.jasms.2009.02.008>.
42. Butova, X. A., Myachina, T. A., and Khokhlova, A. D. (2021) A combined Langendorff-injection technique for simultaneous isolation of single cardiomyocytes from atria and ventricles of the rat heart, *MethodsX*, **8**, 101189, <https://doi.org/10.1016/j.mex.2020.101189>.
43. Margossian, S. S., and Lowey, S. (1982) Preparation of myosin and its subfragments from rabbit skeletal muscle, *Methods Enzymol.*, **85**, 55-71, [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(82\)85009-x](https://doi.org/10.1016/0076-6879(82)85009-x).
44. Pardee, J. D., and Spudich, J. A. (1982) Purification of muscle actin, *Methods Enzymol.*, **85**, 164-181, [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(82\)85020-9](https://doi.org/10.1016/0076-6879(82)85020-9).
45. Li, A., Nelson, S. R., Rahmanseresht, S., Braet, F., Cornachione, A. S., Previs, S. B., O'Leary, T. S., McNamara, J. W., Rassier, D. E., Sadayappan, S., Previs, M. J., and Warshaw, D. M. (2019) Skeletal MyBP-C isoforms tune the molecular contractility of divergent skeletal muscle systems, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **116**, 21882-21892, <https://doi.org/10.1073/pnas.1910549116>.
46. Gerzen, O. P., Potoskueva, Iu. K., Permyakova, Yu. V., Grebenshchikova, A. V., Selezneva, I. S., and Nikitina, L. V. (2022) SDS-PAGE for myosin heavy chains: fast and furious, *J. Evol. Biochem. Physiol.*, **58**, S92-S97, <https://doi.org/10.1134/S0022093022070109>.
47. Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, **227**, 680-685, <https://doi.org/10.1038/227680a0>.
48. Nikitina, L. V., Kopylova, G. V., Shchepkin, D. V., Nabiev, S. R., and Bershitsky, S. Y. (2015) Investigations of molecular mechanisms of actin-myosin interactions in cardiac muscle, *Biochemistry (Moscow)*, **80**, 1748-1763, <https://doi.org/10.1134/S0006297915130106>.
49. Haeberle, J. R., and Hemric, M. E. (1995) Are actin filaments moving under unloaded conditions in the in vitro motility assay? *Biophys. J.*, **68**, 306S-310S; discussion 310S-311S.
50. Gerzen, O. P., Votnova, V. O., Potoskueva, I. K., Tzybina, A. E., and Nikitina, L. V. (2023) Direct effects of toxic divalent cations on contractile proteins with implications for the heart: unraveling mechanisms of dysfunction, *Int. J. Mol. Sci.*, **24**, 10579, <https://doi.org/10.3390/ijms241310579>.
51. Ge, J., Gargey, A., Nesmelova, I. V., and Nesmelov, Y. E. (2019) CaATP prolongs strong actomyosin binding and promotes futile myosin stroke, *J. Muscle Res. Cell Motil.*, **40**, 389-398, <https://doi.org/10.1007/s10974-019-09556-4>.
52. Polosukhina, K., Eden, D., Chinn, M., and Highsmith, S. (2000) CaATP as a substrate to investigate the myosin lever arm hypothesis of force generation, *Biophys. J.*, **78**, 1474-1481, [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(00\)76700-2](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(00)76700-2).

53. Snyder, E. E., Buoscio, B. W., and Falke, J. J. (1990) Calcium(II) site specificity: effect of size and charge on metal ion binding to an EF-hand-like site, *Biochemistry*, **29**, 3937-3943, <https://doi.org/10.1021/bi00468a021>.
54. Kopp, S. J., Bárány, M., Erlanger, M., Perry, E. F., and Perry, H. M. (1980) The influence of chronic low-level cadmium and/or lead feeding on myocardial contractility related to phosphorylation of cardiac myofibrillar proteins, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **54**, 48-56, [https://doi.org/10.1016/0041-008X\(80\)90007-1](https://doi.org/10.1016/0041-008X(80)90007-1).
55. Ćirović, A., and Tasić, N. (2023) Accumulation of metal(loid)s in myocardial tissue and the mechanisms underlying their cardiotoxic effects, *Med. Podml.*, **74**, 21-25, <https://doi.org/10.5937/mp74-46164>.

CARDIAC MYOSIN AND THIN FILAMENT AS A TARGET FOR LEAD AND CADMIUM DIVALENT CATIONS

O. P. Gerzen*, I. K. Potoskueva, A. E. Tzybina, T. A. Myachina, and L. V. Nikitina

*Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences,
620078 Ekaterinburg, Russia; e-mail: o.p.gerzen@gmail.com*

Lead and cadmium, which are heavy metals widely distributed in the environment, significantly contribute to cardiovascular morbidity and mortality. Using Leadmium Green dye, we have shown that lead and cadmium enter the cardiomyocytes, distributing throughout the cell. Using an *in vitro* motility assay, we have shown that the sliding velocity of actin and native thin filaments over myosin decreases with increasing concentrations of Pb^{2+} and Cd^{2+} . Significantly lower concentrations of Pb^{2+} and Cd^{2+} (0.6 mM) were required to stop the movement of thin filaments over myosin compared to stopping actin movement over the same myosin (1.1-1.6 mM). A lower concentration of Cd^{2+} (1.1 mM) needed to stop actin movement over myosin compared to the $Pb^{2+}+Cd^{2+}$ combination (1.3 mM) and lead alone (1.6 mM). There were no differences found in the lead and cadmium cations' effects on the relative force developed by myosin heads or the number of actin filaments bound to myosin. The sliding velocity of actin over myosin in the left atrium, right and left ventricles changed equally when exposed to the same dose of the same metal. Thus, we have demonstrated for the first time that Pb^{2+} and Cd^{2+} can directly affect myosin and thin filament function, with Cd^{2+} exerting a more toxic influence on myosin function compared to Pb^{2+} .

Keywords: myosin, thin filament, lead, cadmium, cardiac muscle