

На правах рукописи

СЕКУНОВ

Алексей Васильевич

**РОЛЬ СФИНГОЛИПИДОВ В НАРУШЕНИИ
МЕМБРАНО-ЦИТОСКЕЛЕТНЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ
И МЫШЕЧНОЙ ПЛАСТИЧНОСТИ
ПРИ ГРАВИТАЦИОННОЙ РАЗГРУЗКЕ ПОСТУРАЛЬНЫХ МЫШЦ**

3.3.3. Патологическая физиология

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Саратов-2023

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Ижевская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель:

доктор медицинских наук, профессор **Брындина Ирина Георгиевна**

Официальные оппоненты:

Герасимова-Мейгал Людмила Ивановна,

доктор медицинских наук, доцент;

ФГБОУ ВО «Петрозаводский государственный университет» Минобрнауки России; медицинский институт; кафедра «Физиология человека и животных, патофизиология, гистология», профессор кафедры

Капилевич Леонид Владимирович,

доктор медицинских наук, профессор;

ФГБОУ ВО «Томский государственный университет» Минобрнауки России; кафедра спортивно-оздоровительного туризма, спортивной физиологии и медицины; заведующий кафедрой

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Ярославский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита диссертации состоится «29» июня 2023 года в 13.00 часов на заседании диссертационного совета Д 21.2.066.01

при ФГБОУ ВО Саратовский ГМУ им. В.И. Разумовского

Минздрава России по адресу: 410012, г. Саратов, ул. Большая Казачья, 112

С диссертацией можно ознакомиться в читальном зале научной библиотеки ФГБОУ ВО Саратовский ГМУ им. В.И. Разумовского Минздрава России

по адресу: г. Саратов, ул. 53-й Стрелковой Дивизии, 6/9, к. 5

и на сайте: <http://science.sgmru.ru/council/21206601/pretender/373>

Автореферат разослан «_____» _____ 2023 года

Ученый секретарь диссертационного совета

доктор медицинских наук,

профессор

А.И. Осколкова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. В настоящее время одной из самых актуальных проблем гравитационной физиологии является проблема атрофии и дисфункции скелетных мышц, связанных с их неиспользованием (*disuse*). При мышечной разгрузке изменения затрагивают различные структурно-функциональные компоненты мышцы, включая белки саркомера и сарколеммального цитоскелета [Гасникова Н.М. и др., 2006; Shenkman B.S., 2020]. Для *disuse* характерна перестройка миозинового фенотипа мышц (снижение экспрессии «медленных» и повышение экспрессии «быстрых» изоформ в постуральных мышцах). Компонент сарколеммального цитоскелета – мембранный дистрофин-ассоциированный гликопротеидный комплекс является передатчиком механического сигнала и выполняет защитную роль, повышая устойчивость липопротеидного слоя к механическим альтерациям [Winder S.J., 1997]. Кавеолин-3, специфичная для мышц форма кавеолина, входит в состав дистрофин-гликопротеинового комплекса [Gazzerro E. et al., 2010], но не является его непосредственным компонентом [Crosbie R.H. et al., 1998]. Белки семейства кавеолинов обладают аминокислотным участком распознавания и связывания холестерина, которым значительно обогащены липидные рафты, а также имеют олигомеризационные мотивы для построения латеральных кавеолярных каркасов [Erland R.M. et al., 2005]. Бета-дистрогликан – связанная с сарколеммой посредством трансмембранного домена субъединица дистрофин-ассоциированного гликопротеидного комплекса [Wayne R.R., 2012]. С-концевым участком бета-дистрогликан регулирует передачу механического сигнала на дистрофиновый слой [Ibragimov-Beskrovnaia O. et al., 1992]. В свою очередь, дистрофин является интегратором цитоскелета, критически важным для стабильности сарколеммы [Gao Q.Q. et al., 2015]. При этом отсутствие дистрофина приводит к потере связи между сарколеммальным, в частности гамма-актиновым, костамерным цитоскелетом и экстрацеллюлярным матриксом и является молекулярной основой для запуска некротических процессов в мышечном волокне [Ervasti J.M. et al., 1993].

Применительно к гипогравитационным эффектам было отмечено достоверное увеличение доли волокон с повреждениями дистрофинового слоя после 14 суток вывешивания [Gasnikova N.M. et al., 2005], а также увеличение экспрессии сарколеммального кавеолина-3 на 7-й день вывешивания [Kuczmarski J.M. et al., 2018]. Установлено, что кратковременная функциональная разгрузка мышц приводит к потере мембранного холестерина и деструктуризации липидных рафтов в сарколемме мышечных волокон [Petrov A.M. et al., 2017], а моделируемое изъятие холестерина сопровождается мембранной делокализацией компонентов дистрофин-ассоциированного гликопротеидного комплекса [Vega-Moreno J. et al., 2012]. Ранее показано, что процесс развития индуцированных функциональной разгрузкой мышечных изменений ассоциирован с ростом уровней церамида, образующегося в результате сфингомиелиназного гидролиза [Брындина И.Г. и др., 2014]. При этом кломипрамин (функциональный ингибитор кислой сфингомиелиназы) частично устраняет этот эффект [Шалагина М.Н. и др., 2017]. Однако неясно, влияет ли мембранный церамид на целостность дистрофин-ассоциированного гликопротеидного комплекса и костамерного цитоскелета, и можно ли с помощью воздействия на активность кислой сфингомиелиназы стимулировать изменения миозинового фенотипа постуральной мышцы, наблюдающиеся в условиях функциональной разгрузки.

Цель – оценка роли кислой сфингомиелиназы и церамида в развитии реструктуризации кавеолярных рафтов и ассоциированных с ними компонентов субсарколеммального цитоскелета, а также в перестройке фенотипа постуральной скелетной мышцы при ее атрофии, вызванной функциональной разгрузкой.

Задачи исследования:

1. Дать характеристику нарушений компонентов дистрофин-ассоциированного гликопротеидного комплекса и гамма-актинового цитоскелета при атрофическом процессе, вызванном неиспользованием

постуральной скелетной мышцы крыс (*m. soleus*), и выявить взаимосвязь нарушений с активацией сфинголипид-зависимых механизмов.

2. Оценить влияние функциональной блокады кислой сфингомиелиназы на уровень церамида в *m. soleus* при кратковременной и длительной мышечной разгрузке и определить взаимосвязь изменений церамида и кавеолина-3.

3. Исследовать возможность коррекции нарушений дистрофин-ассоциированного гликопротеидного комплекса и гамма-актинового цитоскелета, вызванных неиспользованием мышц, с помощью применения функционального ингибитора кислой сфингомиелиназы.

4. Оценить характер перестройки мышечного фенотипа (экспрессию быстрых и медленных изоформ тяжелых цепей миозина) и показатели атрофии постуральной мышцы при разгрузке разной длительности.

5. Определить возможность восстановления характерного для постуральной мышцы фенотипа и уменьшения степени мышечной атрофии в условиях разгрузки путем ингибирования кислой сфингомиелиназы.

Научная новизна работы. В ходе исследования было впервые показано, что активация сфингомиелиназного гидролиза, сопровождающаяся генерацией церамида, при функциональной разгрузке взаимосвязана с ростом уровней кавеолина-3 в сарколеммальном регионе, а также ассоциирована со снижением уровней экспрессии компонентов дистрофин-дистрогликанового комплекса и ростом уровня костамерного гамма-актина, а также может влиять на изменение экспрессии изоформ тяжелых цепей миозина. Впервые была исследована эффективность применения препаратов из группы функциональных ингибиторов кислой сфингомиелиназы в аспекте предотвращения *disuse*-индуцированной реорганизации компонентов субсарколеммального цитоскелета и изменений экспрессии «быстрых» и «медленных» изоформ тяжелых цепей миозина при функциональной разгрузке разной длительности.

Теоретическая и практическая значимость работы. Данные исследования расширяют представления о фундаментальной роли липидного микроокружения и дистрофин-ассоциированного гликопротеидного комплекса в мембранной динамике и структурной целостности сарколеммального мышечного компонента в условиях функциональной разгрузки.

Результаты данного исследования целесообразно учитывать при разработке фармакологической коррекции атрофического процесса, вызванного функциональной разгрузкой мышц и, как показано нами, частично ассоциированного со сфингомиелиназным гидролизом.

В данном аспекте, как установлено в нашем исследовании, могут быть полезны препараты группы FIASMA (Functional inhibitor of acid sphingomyelinase), которые могут быть в дальнейшем апробированы как дополнительные средства в комплексной терапии ряда мышечных патологий, в том числе таких как DMD (Dushenn muscular dystrophy), LGMD (Limb-girdle muscular dystrophy) 1b и 1c, структурной основой которых является молекулярная нестабильность исследованных в данной работе сарколеммальных структур.

Методология и методы исследования.

Научная гипотеза: предполагается, что применение ингибитора кислой сфингомиелиназы, подавляющего усиление сфингомиелиназного гидролиза, уменьшит делокализацию и деградацию рафт-ассоциированных компонентов сарколеммального цитоскелета в разгруженной постуральной мышце (*m. soleus*) в результате угнетения генерации мембранного церамида, способного вызывать дезорганизацию липидных рафтов; также предполагается, что ингибитор может повлиять на трансформацию миозинового фенотипа разгруженной мышцы (вызванное разгрузкой изменение экспрессии генов различных изоформ тяжелых цепей миозина).

Для подтверждения гипотезы проведено три этапа исследования. Первый этап был посвящен постановке эксперимента на половозрелых крысах-самцах Вистар. Функциональная разгрузка была выполнена согласно модели Ильина – Новикова в модификации Morey-Holton. В качестве метода

воздействия применялись препараты группы FIASMA. По результатам данного этапа был получен биоматериал для дальнейшего исследования.

Второй этап представлял практическую часть работы и включал в себя иммунофлуоресцентное исследование церамида и белков сарколеммального цитоскелета. Кроме того, проводилось исследование экспрессии белков дистрофин-ассоциированного гликопротеидного комплекса методом иммуноблоттинга. Осуществлялась оценка фенотипа мышечных волокон посредством анализа флуоресценции, полученной от комплексов антител, связавшихся с «быстрыми» изоформами тяжелых цепей миозина (ТЦМ), и полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ), использованной для количественной оценки экспрессии генов, кодирующих различные изоформы ТЦМ.

Третий этап был посвящен анализу полученного массива данных, его статистической обработке и интерпретации полученных результатов.

Положения, выносимые на защиту:

1. Сфинголипидные механизмы вовлечены в перестройку субсарколеммального цитоскелета и дисрегуляцию фенотипа мышечных волокон постуральной мышцы (*m. soleus*) в условиях ее атрофии от бездействия.

2. Разгрузка *m. soleus*, вызванная бездействием и сопровождающаяся усилением сфингомиелиназного гидролиза с аккумуляцией церамида в области плазматической мембраны мышечных волокон, приводит к перестройке компонентов сарколеммального дистрофин-ассоциированного гликопротеидного комплекса, а применение ингибитора кислой сфингомиелиназы частично предотвращает данный эффект.

3. Перестройка фенотипа волокон *m. soleus*, наблюдающаяся при мышечной разгрузке и характеризующаяся снижением экспрессии «медленной» изоформы ТЦМ и усилением экспрессии «быстрых» изоформ, частично предотвращается применением ингибитора кислой сфингомиелиназы. Введение ингибитора ослабляет повышение экспрессии

«быстрых» изоформ ТЦМ и не влияет на экспрессию «медленной» изоформы. Эффект ингибитора наблюдается только при 14-дневной разгрузке и не характерен для кратковременного воздействия.

Степень достоверности результатов исследования обусловлена большим объемом изученного биоматериала, полученного от достаточной и однородной выборки экспериментальных животных; наличием контрольной группы, на сравнении с которой базировалась оценка изменений в экспериментальных группах; стандартизированными условиями выполнения лабораторных исследований, использованием сертифицированного оборудования для регистрации аналитических данных.

Комиссия, сформированная в соответствии с приказом ректора ФГБОУ ВО ИГМА Минздрава России №233/07-02 от 20.05.2022 г., подтверждает подлинность первичных материалов, а также личный вклад автора в проведение экспериментальной части исследования, ее анализ и написание текста настоящей диссертации.

Апробация результатов работы. Основное содержание диссертационного исследования обсуждено и представлено на XLV итоговой студенческой научной конференции УдГУ (Ижевск, 2017); конференции «Неделя космической науки: от экспериментов на МКС к прорывным технологиям» (Ижевск, 2017); XII Всероссийском симпозиуме с международным участием «Биологическая подвижность» (Пушино, 2019); IX Всероссийской с международным участием конференции с элементами научной школы по физиологии мышц и мышечной деятельности, посвященной памяти Е.Е. Никольского (Казань, 2019); XLIV академических чтениях по космонавтике, посвященных памяти академика С.П. Королёва и других выдающихся отечественных ученых – пионеров освоения космического пространства (Москва, 2020), Всероссийской конференции молодых учёных с международным участием (Санкт-Петербург, 2020), конференции молодых ученых и студентов ФГБОУ ВО ИГМА (Ижевск, 2022).

Апробация работы проведена в 2022 г. на заседании кафедр патологической физиологии, нормальной физиологии и биохимии ФГБОУ ВО «Ижевская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Данная научная работа была поддержана грантом РФФИ №19-315-90099.

Личный вклад автора. Вклад автора заключается в непосредственном участии во всех этапах диссертационного исследования. Им совместно с научным руководителем была выполнена постановка и формулировка цели, задач работы, их теоретическое обоснование и практическая реализация. Автором был проведен анализ полученных данных, интерпретация и обсуждение полученных результатов, представление результатов исследования на научных конференциях. Автором лично были проведены все серии экспериментов на лабораторных животных с использованием общепринятой модели разгрузки задних конечностей – антиортостатического вывешивания – с последующим забором биологического материала и пробоподготовкой, применены лабораторные методы анализа. Автором выполнена статистическая обработка полученных данных, представлены научное обоснование и выводы, разработаны рекомендации и научные положения, внедренные в учебную работу ФГБОУ ВО ИГМА Минздрава России.

Публикации. По теме и материалам диссертации опубликовано 14 печатных работ, в том числе две статьи – в журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки России, из них одна – в журнале, индексируемом в международной базе данных Web of Science; три статьи – в журналах, индексируемых в международных базах данных Scopus и Web of Science.

Объем и структура работы. Диссертация изложена на 110 страницах и включает следующие части: введение, обзор литературы, материалы и методы исследований, результаты исследований, обсуждение результатов, заключение, выводы, рекомендации и перспективы дальнейшей разработки темы, библиографический список. Содержит 4 таблицы, 37 рисунков. Список литературы представлен 168 источниками, из которых 9 отечественных и 159 зарубежных.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы.

Объект исследования и экспериментальный протокол. Исследования были проведены на половозрелых крысах-самцах Вистар массой 170–200 г в количестве 85 особей, содержащихся в стандартных условиях вивария. Для создания функциональной разгрузки было использовано антиортостатическое вывешивание животных (АОВ) под углом 30° к поверхности согласно модели Ильина – Новикова в модификации Morey-Holton. В качестве метода воздействия на анализируемые в экспериментах показатели применялись препараты группы FIASMA. Кломипрамин (Анафранил, ООО «Новартис Фарма», Россия) вводили внутримышечно в дозе 0,5 мг/кг массы тела в течение 5 дней до начала эксперимента (ежедневно) и в серии с 14-дневным АОВ дополнительно через день. Амитриптилин (ООО «Озон», Россия) подавался в растворе 250 мг/л, включенном в питьевой режим, в течение 7 дней перед АОВ и на протяжении всего эксперимента в серии с 14-дневным АОВ.

Флуоресцентная микроскопия. Иммунофлуоресцентный анализ проводили на приготовленных с помощью криосекции поперечных срезах *m. soleus*. Смонтированные на предметных стеклах срезы фиксировали посредством 4% параформальдегида, приготовленного на забуференном физиологическом растворе (ЗФР в мМ: 3,2 NaH₂PO₄, 0,5 K₂HPO₄, 1,3 KCl, 135 NaCl, pH 7,4), блокировали раствором, в состав которого входил 1% Тритон-X100 и 5% раствор бычьего сывороточного альбумина (БСА). После этапа пермеабилзации срезы обрабатывались растворами первичных антител, с которыми инкубировались при комнатной температуре в течение 24 часов. После этого срезы мышц обрабатывались растворами вторичных антител, ассоциированных с флуоресцентной меткой, и инкубировались в течение ночи при 4°C. Иммунофлуоресценцию от использованных меток регистрировали при помощи микроскопа Nikon Eclipse E200, оснащенного EF-2E эпифлуоресцентной насадкой. Экспрессию церамида, кавеолина-3,

бета-дистрогликана, дистрофина и гамма-актина оценивали на основании плотности флуоресцентного сигнала, полученного от связавшихся с ними комплексов антител. Плотность рассчитывали в условных единицах программным обеспечением Image-Pro Plus 6.0 (Media Cybernetics, США). Для определения совместной локализации кавеолина-3 и церамида в сарколемме мышечных волокон с помощью плагина Coloc-2 программы ImageJ был проведен количественный анализ пространственного перекрытия пятен флуоресценции, полученных от кавеолина-3 (зеленый канал) и церамида (красный канал) соответственно, посредством коэффициента пространственной корреляции Пирсона.

Исследование экспрессии белков дистрофин-ассоциированного гликопротеидного комплекса методом иммуноблоттинга. Для выделения сарколеммальной фракции мышечный материал был гомогенизирован. Для выделения сарколеммальной фракции полученный гомогенат был подвергнут ультрацентрифугированию [Vega-Moreno J. et al., 2012]. Осажденные мембраны из каждой фракции собирали отдельно и суспендировали в 500 мкл первоначальной буферной системы. После дифференциального центрифугирования в образцах был выровнен уровень белка на основании его концентрации, рассчитанной по методу Бредфорда. После этого к 20 мкл образца был добавлен равный объем буфера Лэммли: 0,125М Трис-HCl pH 6,8, 10% β -меркаптоэтанол, 20% глицерин, 4% додецилсульфат натрия (SDS), 0,004% бромфеноловый синий. Затем образцы были подвергнуты кипячению при 95°C в течение 5 минут. Белки разделяли электрофорезом в градиентном (4–11%) SDS-полиакриламидном геле с использованием камеры Mini Protean Tetra (Bio-Rad, США), после чего их переносили на нитроцеллюлозную мембрану в системе Mini Trans-Blot Cell (Bio-Rad, США). Перенос контролировали окраской Ponceau S. Полученные нитроцеллюлозные мембраны инкубировали с первичными антителами в разведении 1 : 1000 в течение 12 часов при 4 °C. Вторичные антивидовые антитела с пероксидазной меткой (козьи иммуноглобулины G, Abcam, Великобритания)

применяли в разведении 1 : 500, нитроцеллюлозные мембраны инкубировали с ними в течение 1 часа при 37 °С. Проявляли полосы с помощью диаминобензидиновой реакции. Цифровые изображения полос получали с помощью светового сканирования и затем анализировали в программе ImageLab Software (Bio-Rad, США). Минимальную интенсивность окрашивания полосы белка принимали за 1, а интенсивность других полос на этой мембране выражали отношением к минимальной интенсивности.

Оценка фенотипа мышечных волокон. С целью оценки экспрессии генов, кодирующих различные изоформы ТЦМ, применяли ПЦР-РВ. Для конструирования праймеров использовали сервис Primer BLAST (URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>), находящийся в свободном доступе. В качестве референсных генов были выбраны гены GAPDH (глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы) и бета-актина. ПЦР-анализ выполняли в амплификаторе CFX96 (Bio-Rad, США). Кроме того, для выявления изменений фенотипа на поперечных срезах мышц проводили анализ флуоресценции, полученной от комплексов антител, связавшихся с «быстрыми» изоформами ТЦМ. Экспрессия «быстрого» миозина измерялась по количеству (доле) иммунопозитивных к этой изоформе волокон и по их отношению ко всем волокнам в поле зрения.

Оценка мышечной атрофии при функциональной разгрузке. Измерение мышечной массы проводилось сразу после выделения *m. soleus* до их сортировки и заморозки. Для оценки изменений относительной массы мышц массу сырой мышцы (мг) делили на массу тела животного (г), полученный показатель выражали в мг/г.

Для исследования мышечной атрофии использовались снимки флуоресценции, полученной от антител, связавшихся с кавеолином-3. На основании геометрии детектируемого свечения для оценки изменения диаметра мышечных волокон был применен расчет диаметра Ферета как характерного показателя формы неправильной окружности. Расчет диаметров Ферета осуществляли с помощью морфометрических инструментов

программного обеспечения Image-Pro Plus 6.0 и Image Pro Insight (Media Cybernetics, США).

Методы статистического анализа. Статистическая обработка полученных результатов была проведена на персональном компьютере с использованием пакета прикладных программ Microsoft Excel 2010 for Windows (7.0), SPSS 22. Применялись методы описательной статистики. Оценка достоверности результатов проводилась непараметрическими методами (критерии Краскелла – Уоллиса, Манна – Уитни), корреляцию оценивали по Пирсону, различия считались достоверными при $p < 0,05$.

Результаты экспериментов и их обсуждение.

Исследование иммунофлуоресценции церамида, иммунофлуоресценции и иммуноэкспрессии кавеолина-3 и компонентов дистрофин-ассоциированного гликопротеидного комплекса при функциональной разгрузке. В данном исследовании была проанализирована иммунофлуоресценция комплексов антител, связанных с церамидом, при 12-часовой и 14-дневной функциональной разгрузке. Прирост яркости флуоресценции церамида в сарколеммальной области мышечных волокон камбаловидной мышцы крыс был выявлен как на раннем этапе разгрузки, так и при двухнедельном воздействии. Наблюдаемые нами изменения сарколеммального церамида на фоне премедикации amitriptилином имели ожидаемое сходство с результатами ранее проведенных в нашей лаборатории исследований [Брындина И.Г. и др., 2014]. Ингибитор достоверно уменьшал иммунофлуоресценцию церамида, что, вероятнее всего, было связано с функционалом, свойственным группе FIASMA, за счет которого препараты данной группы препятствуют реализации сфингомиелиназного гидролиза и генерации церамида в сарколемме (рис. 1).

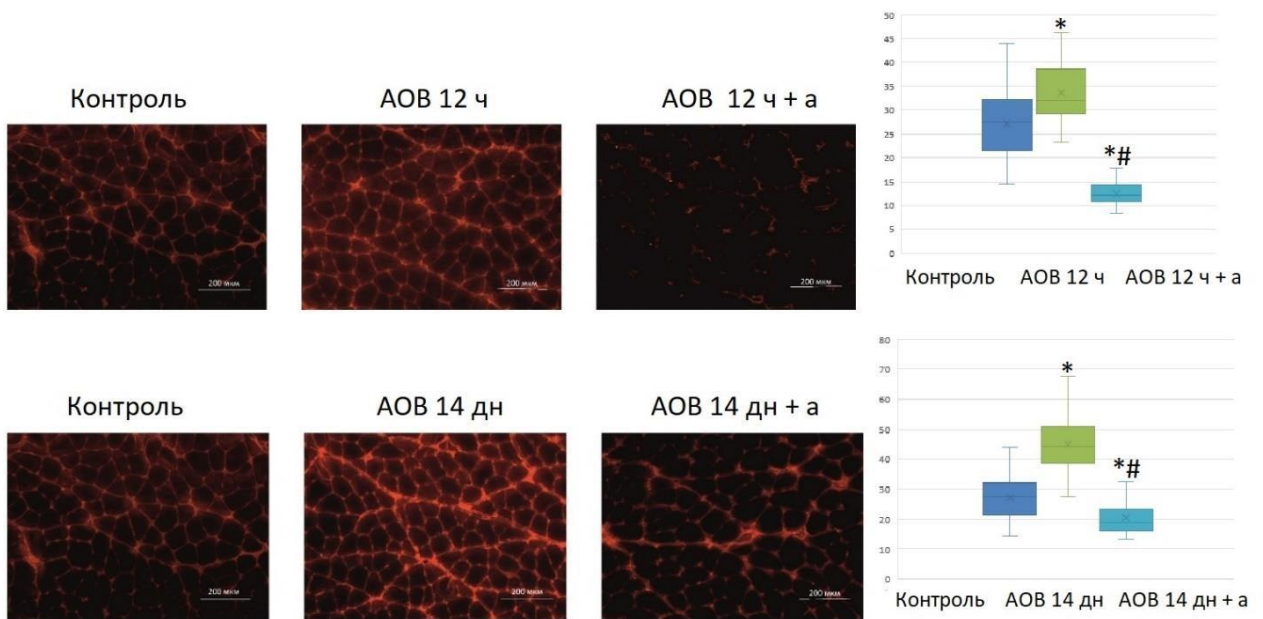


Рис. 1. Значения иммунофлуоресценции церамида при АОВ 12 ч и 14 дней, при АОВ 12 ч + амитриптилин и АОВ 14 дн + амитриптилин (в усл. ед.), * – $p < 0,05$ в сравнении с контролем; # – $p < 0,05$ в сравнении с АОВ

Наблюдаемые в данной работе сарколеммальные изменения кавеолина-3, не показавшие достоверных изменений при 12-часовом АОВ, в эксперименте с более длительным воздействием характеризовались достоверным приростом его иммунофлуоресценции. Вероятный механизм наблюдаемых изменений связан с тем, что кавеолин-3, имеющий в своей структуре аминокислотный участок распознавания и связывания холестерина, может быть чувствителен к липидному микроокружению. Наблюдаемый нами прирост экспрессии сарколеммального кавеолина-3 подтверждается схожими изменениями в ранее проведенных исследованиях [Kuczmariski J.M. et al., 2018]. На фоне премедикации иммунофлуоресценция кавеолина-3 оставалась на достоверно более низком уровне в сравнении с изолированной разгрузкой. Ингибирование активности кислой сфингомиелиназы, достоверно снижающее общую иммунофлуоресцентную плотность сарколеммального церамида, вероятно, снижало и количество отдельных церамидных генераций в липид-упорядоченной фракции и, как следствие, влияло на сохранность холестеринового компонента липидных рафтов и рафтовой интеграции кавеолина-3 (рис. 2, 3).

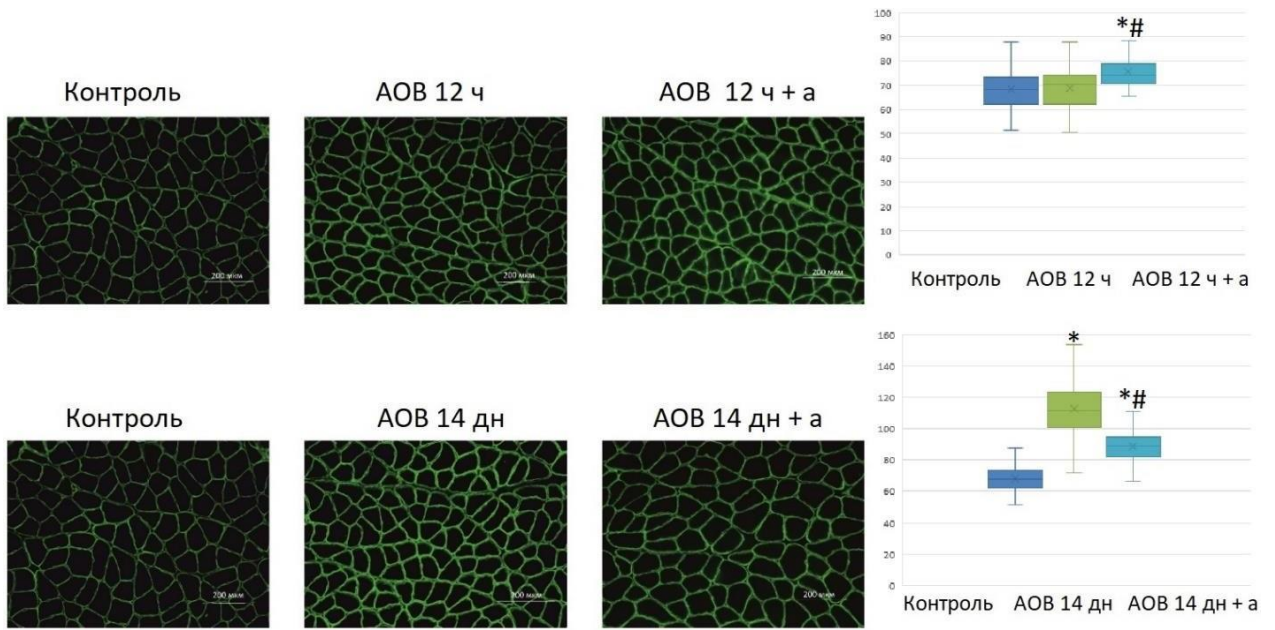


Рис. 2. Значения иммунофлуоресценции кавеоллина-3 при АОВ 12 ч и 14 дней, при АОВ 12 ч + amitriptilin и АОВ 14 дн + amitriptilin (в усл. ед.),
 * – $p < 0,05$ в сравнении с контролем; # – $p < 0,05$ в сравнении с АОВ

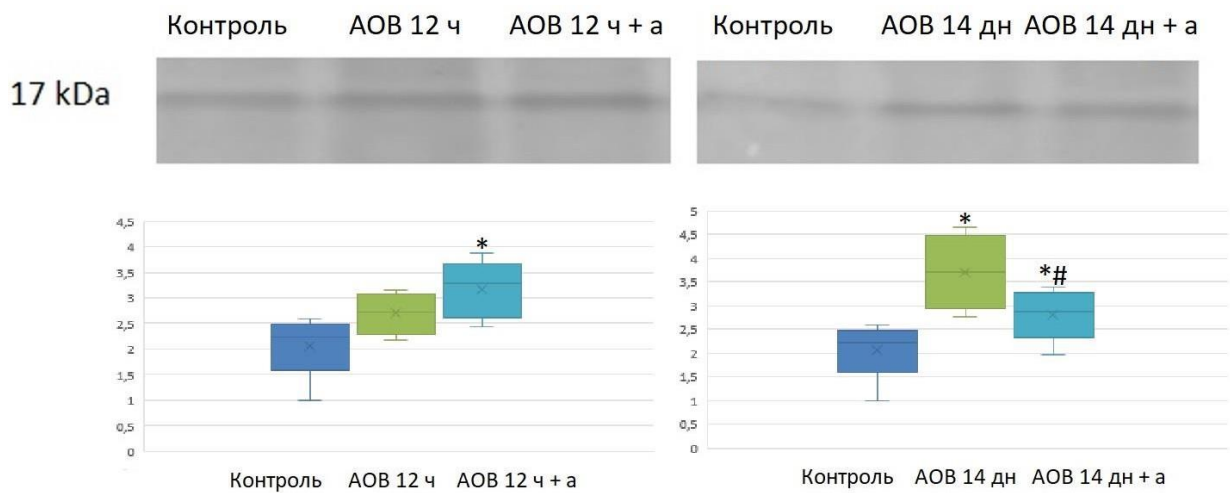


Рис. 3. Значения иммуноэкспрессии кавеоллина-3 при АОВ 12 ч и 14 дней, при АОВ 12 ч + amitriptilin и АОВ 14 дн + amitriptilin (в усл. ед.),
 * – $p < 0,05$ в сравнении с контролем; # – $p < 0,05$ в сравнении с АОВ

Сохранность взаимодействия кавеоллина-3 и липидных рафтов также продемонстрирована и подтверждена на основе корреляции пространственного распределения кавеоллина-3 и церамида. Отрицательная корреляция в условиях функциональной разгрузки с премедикацией amitriptilinom может характеризовать данное взаимодействие как липид-

опосредованное, а возникновение положительной корреляции при изолированной функциональной разгрузке, вероятно, является показателем переключения кавеолина-3 преимущественно на белок-белковую связь [Sargiacomo M. et al., 1995; Tang J.X. et al., 2006] (рис. 4).

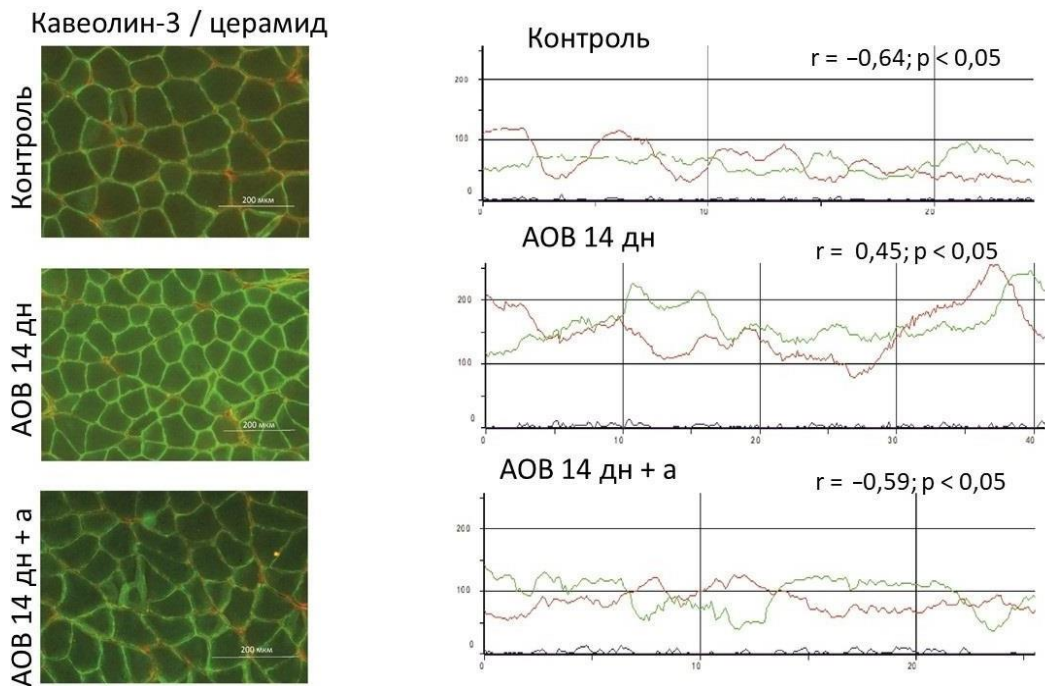


Рис. 4. Линейные профили пространственного распределения светимости кавеолина-3 (зеленый) и церамида (красный) при АОВ 14 дней и АОВ 14 дн + амитриптилин

В нашем исследовании мы показали, что прирост бета-дистрогликана на ранних сроках и его снижение в более поздний период функциональной разгрузки может быть связано с генерацией церамида, что подтверждается ограничением данных процессов на фоне премедикации амитриптилином (рис. 5, 6). Критическое значение для структурной целостности дистрогликанового комплекса и для регуляции им сигнальной трансдукции имеет сохранность мембранного холестерина; известно, что церамид способен вытеснять холестерин из липидных рафтов [Megha E., 2004; Lee E. et al., 2021]. При этом потеря специфического липидного микроокружения может приводить к нарушению функциональной связи альфа- и бета-дистрогликана, а также к интернализации данного белкового комплекса [Tresckow von B. et al., 2004; Shah W.A. et al., 2006].

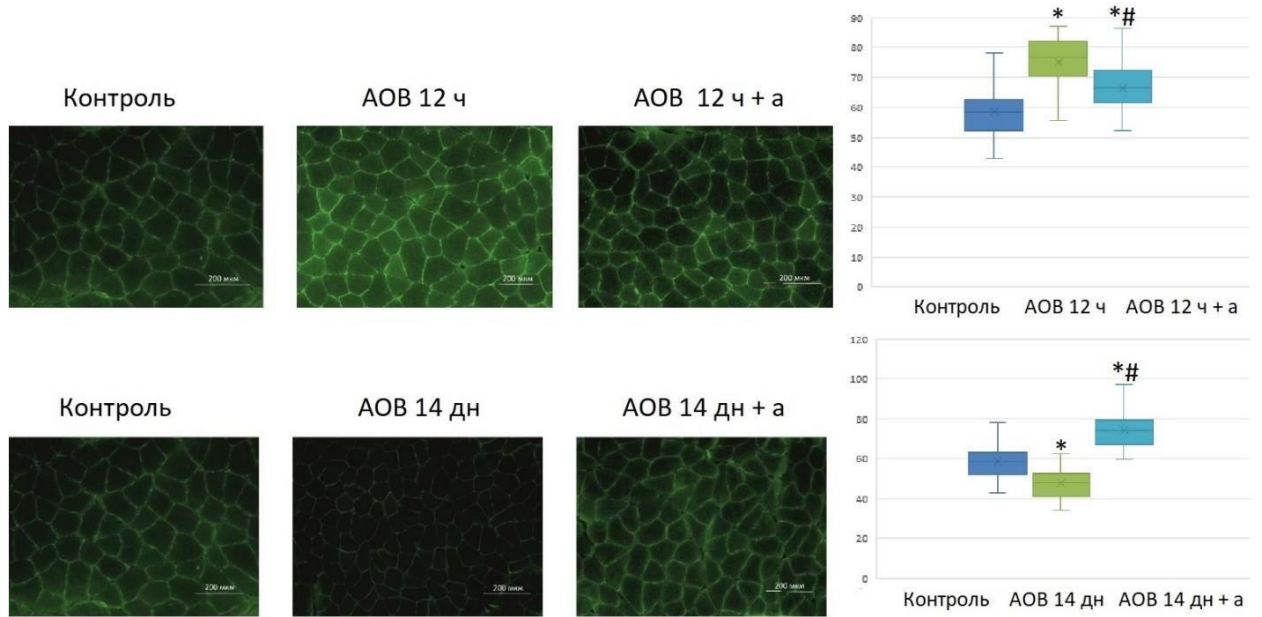


Рис. 5. Значения иммунофлуоресценции бета-дистрогликана при АОВ 12 ч и 14 дней, при АОВ 12 ч + amitриптилин и АОВ 14 дн + amitриптилин (в усл. ед.),
* – $p < 0,05$ в сравнении с контролем; # – $p < 0,05$ в сравнении с АОВ

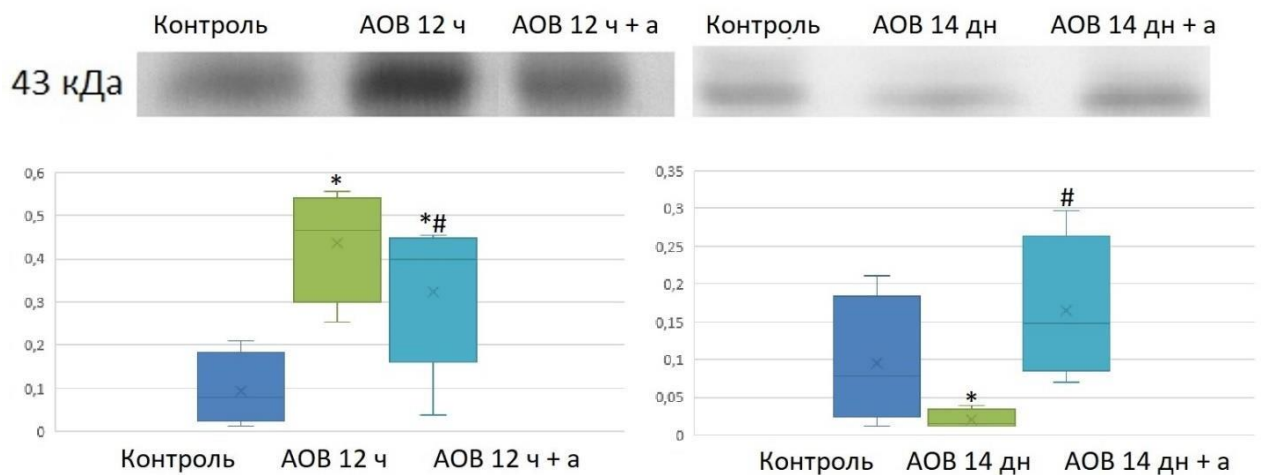


Рис. 6. Значения иммуноэкспрессии бета-дистрогликана при АОВ 12 ч и АОВ 14 дней, при АОВ 12 ч + amitриптилин и АОВ 14 дн + amitриптилин (в усл. ед.),
* – $p < 0,05$ в сравнении с контролем; # – $p < 0,05$ в сравнении с АОВ.

Уровни дистрофина достоверно снижались на обоих сроках функциональной разгрузки. Ранее сходные результаты изменения дистрофинового слоя в условиях функциональной разгрузки были продемонстрированы N.M. Gasnikova с соавторами (2005). Amitriptyline достоверно предотвращал изменения дистрофина, вызванные функциональной разгрузкой. Его эффект можно связать с подавлением генерации церамида и сохранением структурной целостности участков

сарколеммы, контактирующих с липид-связывающими доменами дистрофина (рис. 7, 8).

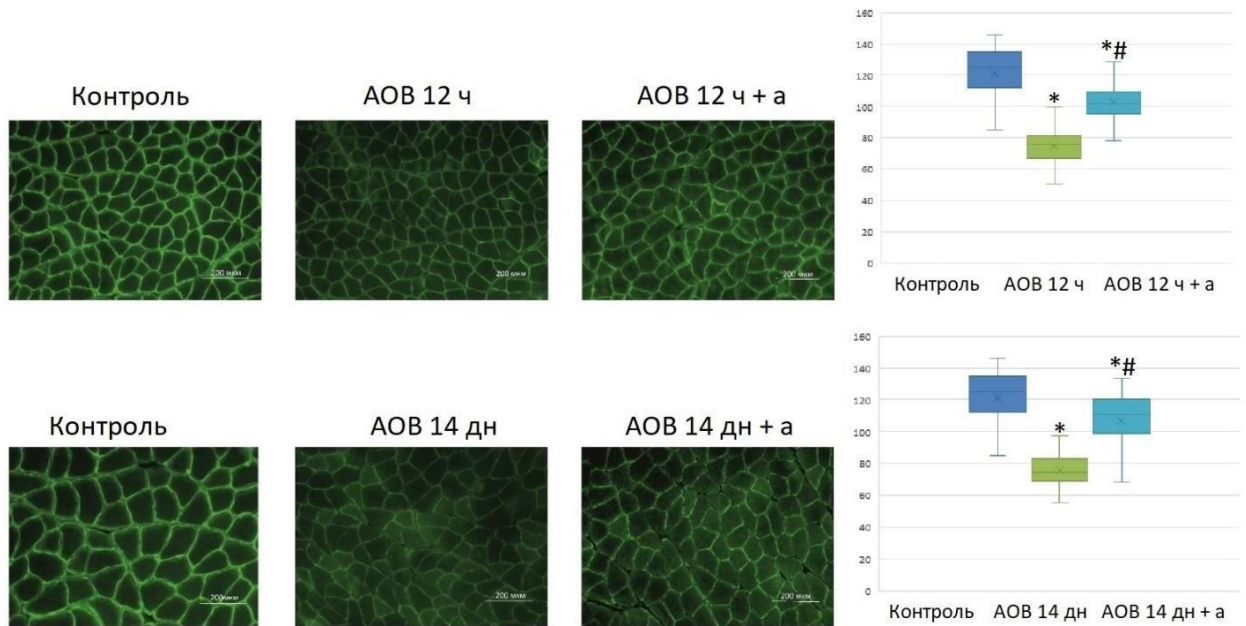


Рис. 7. Значения иммунофлуоресценции дистрофина при АОВ 12 ч и 14 дней, при АОВ 12 ч + amitриптилин и АОВ 14 дн + amitриптилин (в усл. ед.), * – $p < 0,05$ в сравнении с контролем; # – $p < 0,05$ в сравнении с АОВ

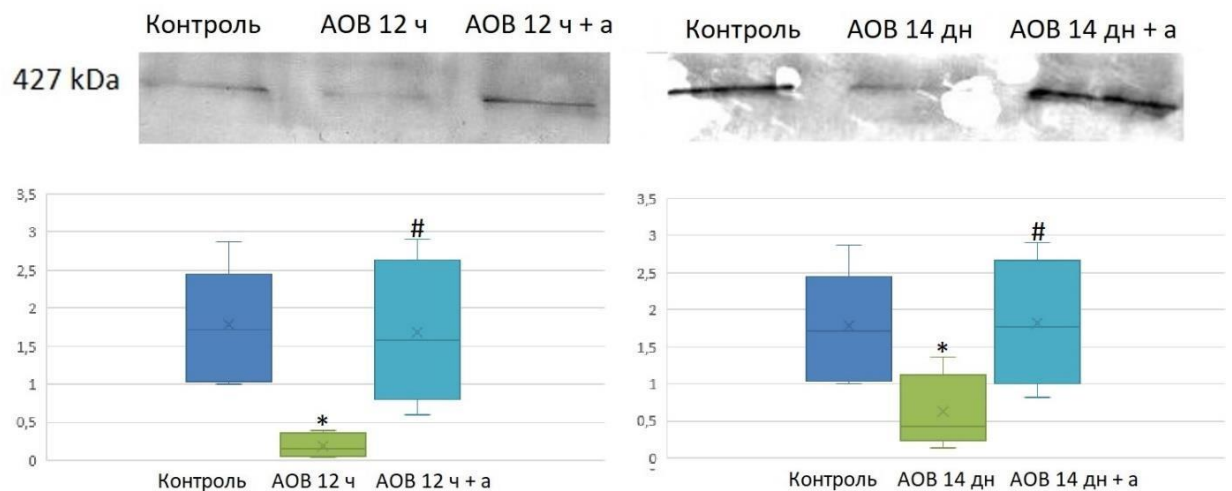


Рис. 8. Значения иммуноэкспрессии дистрофина при АОВ 12 ч и 14 дней, при АОВ 12 ч + amitриптилин и АОВ 14 дн + amitриптилин (в усл. ед.), * – $p < 0,05$ в сравнении с контролем; # – $p < 0,05$ в сравнении с АОВ

В данном исследовании также был обнаружен достоверный прирост уровней иммунофлуоресценции гамма-актина на фоне функциональной разгрузки в течение 12 часов и 14 дней. Иммуноблоттинг также показал прирост гамма-актина в сарколеммальной фракции в те же сроки. Данные изменения можно охарактеризовать как компенсаторную динамику реакции

костамерного гамма-актина в ответ на сарколеммальную делокализацию дистрофина. Изменения гамма-актина на фоне применения amitriptilina (при подавлении процессов сфингомиелиназного гидролиза в сарколемме) можно оценить, как снижение данной компенсаторной реакции при восстановлении липидной композиции сарколеммы и, соответственно, непосредственной связи гамма-актина с липидным бислоем [Valentijn K. et al., 1999] (рис. 9, 10).

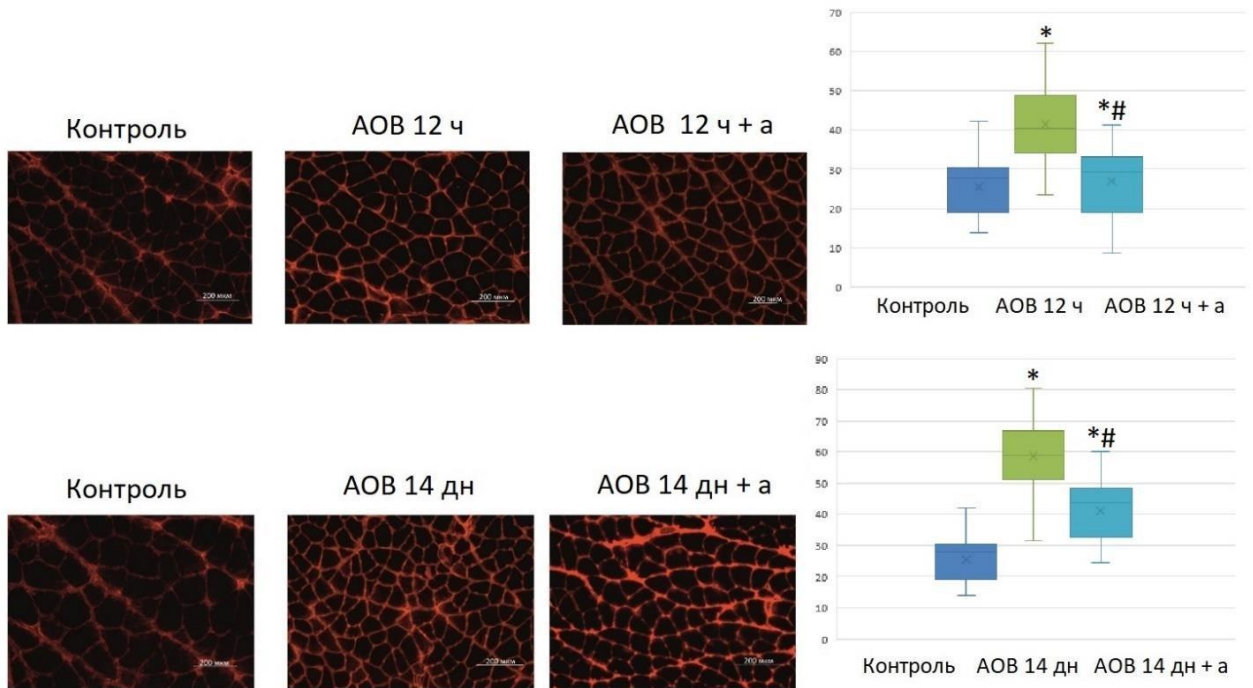


Рис. 9. Значения иммунофлуоресценции гамма-актина при АОВ 12 ч и 14 дней, при АОВ 12ч + amitriptilin и АОВ 14 дн + amitriptilin (в усл. ед.),
* – $p < 0,05$ в сравнении с контролем; # – $p < 0,05$ в сравнении с АОВ

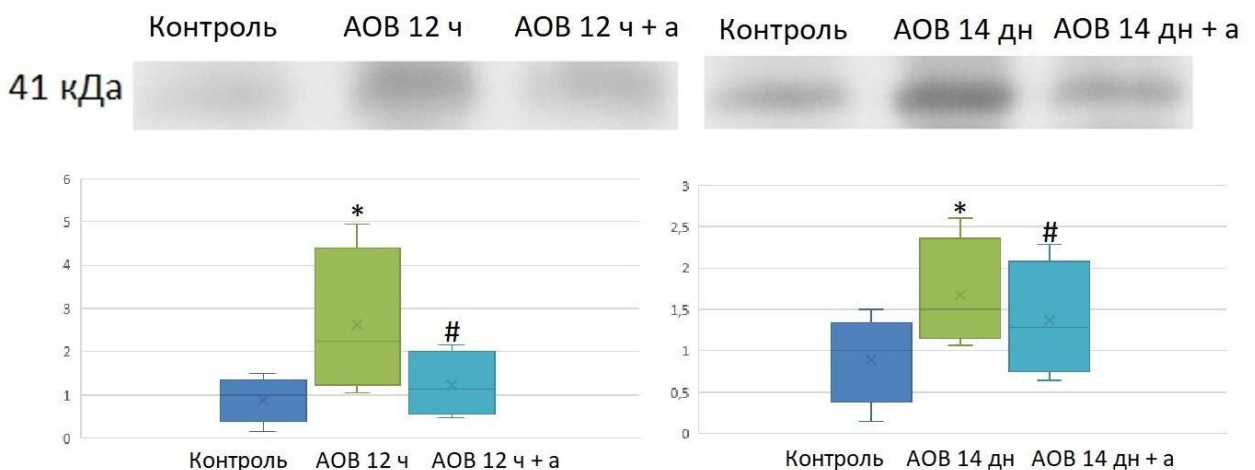


Рис. 10. Значения иммуноэкспрессии гамма-актина при АОВ 12 ч и 14 дней, при АОВ 12 ч + amitriptilin и АОВ 14 дн + amitriptilin (в усл. ед.),
* – $p < 0,05$ в сравнении с контролем; # – $p < 0,05$ в сравнении с АОВ

Исследование фенотипа мышечных волокон при 14-дневной функциональной разгрузке. При 14-дневном АОВ наблюдали достоверное снижение уровней мРНК, кодирующих «медленную» изоформу ТЦМ (МуНС 1 β), при этом экспрессия «быстрых» изоформ МуНС IIВ и МуНС IIд/х повышалась или имела тенденцию к повышению соответственно. На фоне применения кломипрамина только экспрессия «быстрых» изоформ миозина восстанавливалась до контрольных значений (МуНС IIВ) или понижалась (МуНС IIд/х), на экспрессию «медленной» изоформы кломипрамин воздействия не оказал, снижения МуНС IIА также не выявлено (рис. 11).

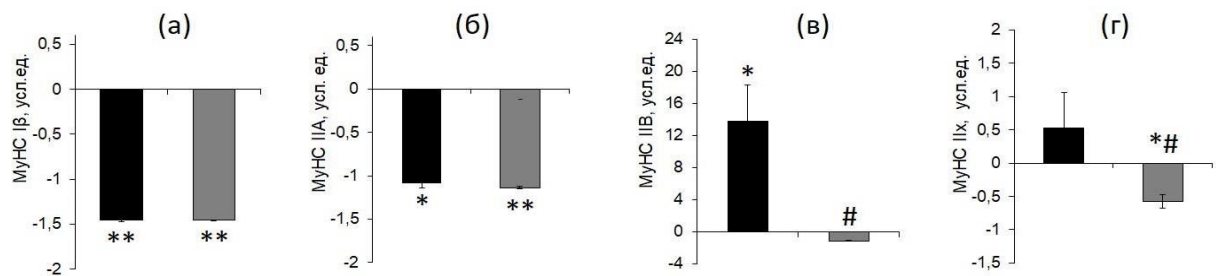


Рис. 11. Экспрессия миозинов «медленного» (а) и «быстрого» (б-г) типов в *m. soleus* крысы при АОВ 14 дн (черный столбик) и АОВ 14 дн + амитриптилин (серый столбик), * – $p < 0,01$ в сравнении с контролем; # – $p < 0,01$ в сравнении с АОВ, контрольные значения приняты за ноль

Также было показано, что на фоне применения FIASMA меньшая доля волокон вовлечена в повышение экспрессии «быстрых» изоформ миозина относительно аналогичного наблюдения в группе изолированной функциональной разгрузки (рис. 12).

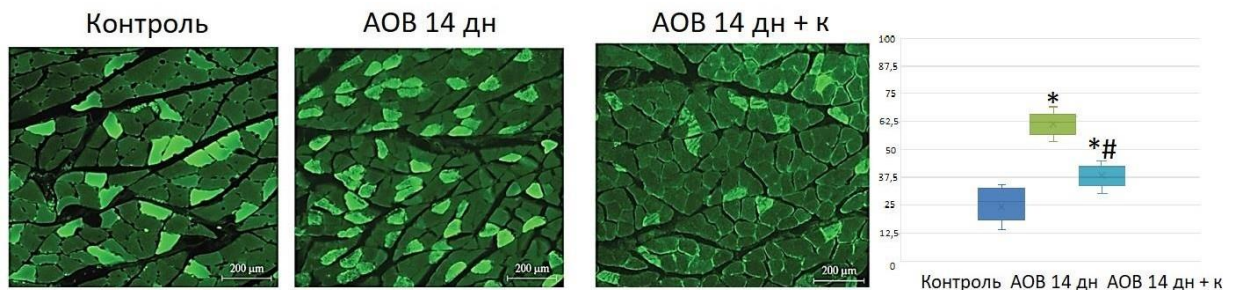


Рис. 12. Иммунофлуоресцентный анализ экспрессии «быстрых» изоформ ТЦМ на поперечных срезах *m. soleus* (* – $p < 0,05$ в сравнении с контролем; # – $p < 0,05$ в сравнении с АОВ; данные представлены как число волокон (n), экспрессирующих «быстрые» изоформы миозина, в поле зрения, равном 3 мм²)

На данный момент в литературе отсутствуют данные, позволяющие описать те сигнальные пути, которые связывают сфингомиелиназный гидролиз и генерацию церамида с повышением экспрессии «быстрых» изоформ миозина в мышцах, подвергнутых функциональной разгрузке. Однако, с одной стороны, имеется достаточно сильная взаимосвязь между экспрессией миогенного фактора MyoD и экспрессией гена MyHC ПВ [Seward D.J. et al., 2001], с другой стороны, существует возможность влияния церамида как вторичного мессенджера на стимулированную ростовыми факторами экспрессию MyoD [Strle K. et al., 2004]. На основании описанного представляется важным предполагаемое участие кислой сфингомиелиназы и церамида в процессах регуляции мышечной пластичности, протекающих при функциональной разгрузке.

Оценка атрофии *m. soleus* при функциональной разгрузке. В данной работе также был произведен морфометрический анализ *m. soleus*, подвергнутой 14-дневной АОВ. Мы наблюдали достоверное снижение массы мышц на 34,8% и уменьшение диаметра Ферета (максимального расстояния между краями каждого отдельного волокна) на 49%, частично предотвращаемое на фоне применения ингибитора кислой сфингомиелиназы. Данные результаты согласуются с ранее полученными данными, демонстрирующими эффекты disuse-атрофии [Kraemer W.J. et al., 2000; Ohira Y. et al., 2002; Shuenke M.D. et al., 2009; Bodine S.C. et al., 2013] (рис. 13).

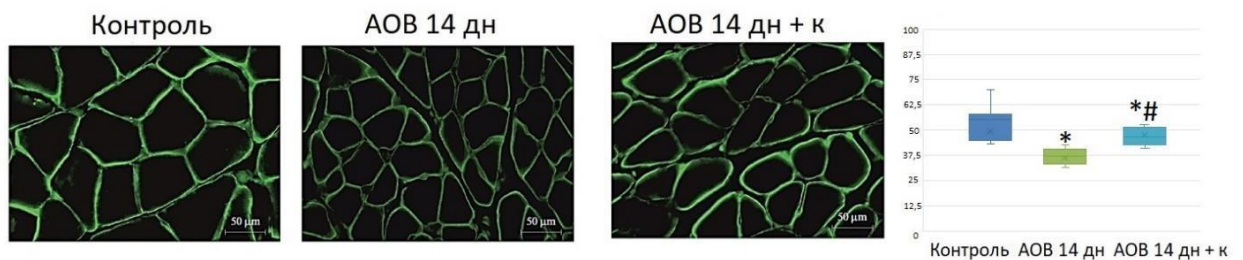


Рис. 13. Влияние ингибитора кислой сфингомиелиназы на диаметр Ферета мышечных волокон *m. soleus* при АОВ 14 дней и АОВ 14 дней + амитриптилин (в усл. ед.), * – $p < 0,05$ в сравнении с контролем; # – $p < 0,05$ в сравнении с АОВ

ВЫВОДЫ:

1. Функциональная разгрузка, вызванная 12-часовым антиортостатическим вывешиванием, ассоциирована с повышением уровней бета-дистрогликана и гамма-актина, а также снижением уровня дистрофина в сарколеммальной области волокон камбаловидной мышцы крыс (*m. soleus*). При 14-дневной разгрузке наблюдается прирост кавеолина-3 и гамма-актина с параллельным уменьшением бета-дистрогликана и дистрофина в области сарколеммы. Оба периода разгрузки характеризуются возрастанием экспрессии сарколеммального церамида.
2. Введение экспериментальным животным функциональных ингибиторов кислой сфингомиелиназы кломипрамина и амитриптилина, нацеленное на снижение активности процессов сфингомиелиназного гидролиза, предотвращает аккумуляцию церамида в области сарколеммы мышечных волокон как при 12-часовой, так и при 14-дневной разгрузке *m. soleus*.
3. Применение функционального ингибитора кислой сфингомиелиназы (амитриптилина) способствует частичному нивелированию выявленных при 12-часовой и 14-дневной разгрузке изменений бета-дистрогликана, дистрофина и гамма-актина. Корректирующее влияние ингибитора на вызванные разгрузкой изменения кавеолина-3 наблюдается при 14-дневном антиортостатическом вывешивании.
4. Ингибитор кислой сфингомиелиназы (кломипрамин) предотвращает усиление экспрессии генов «быстрых» изоформ тяжелых цепей миозина в волокнах *m. soleus* при 14-дневной функциональной разгрузке и не оказывает влияние на экспрессию генов «медленных» изоформ.
5. Применение ингибитора кислой сфингомиелиназы (кломипрамина) уменьшает степень атрофии разгруженной мышцы.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Сфинголипиды в реорганизации липидных мембранных доменов в скелетных мышцах в условиях кратковременного антиортостатического вывешивания / В.А. Протопопов, А.В. Секунов, В.Г. Сергеев, М.Н. Шалагина, А.А. Яковлев, И.Г. Брындына // Мат-лы XXIII съезда Физиологического общества им. И.П. Павлова с междунар. участием. – Воронеж, 2017. – С. 1018–1019.
- 2. Clomipramine counteracts lipid raft disturbance due to short-term muscle disuse / I.G. Bryndina, M.N. Shalagina, A.V. Sekunov, A.L. Zefirov, A.M. Petrov // Neuroscience Letters. – 2018. – Vol. 664. – P. 1–6.**
3. Role of ceramide in lipid raft disturbance in short-term hindlimb suspension / M.N. Shalagina, A.V. Sekunov, A.M. Petrov, I.G. Bryndina // Journal of Muscle Research and Cell Motility. – 2018. – Vol. 39, № 209. – P. 24–25.
4. Изменения мембранного церамида в камбаловидной мышце при функциональной разгрузке на фоне ишемии / В.А. Протопопов, А.В. Секунов, И.Г. Брындына // Новые подходы к изучению классических проблем: мат-лы IX Всерос. с междунар. участием конф. с элементами науч. школы по физиологии мышц и мышечной деятельности, посвященной памяти Е.Е. Никольского / Под общ. ред. И.Б. Козловской, О.Л. Виноградовой, Б.С. Шенкмана. – М., 2019. – С. 98.
- 5. Changes in membrane ceramide pools in rat soleus muscle in response to short-term disuse / A.M. Petrov, M.N. Shalagina, V.A. Protopopov, V.G. Sergeev, S.V. Ovechkin, N.G. Ovchinina, A.V. Sekunov, A.L. Zefirov, G.F. Zakirjanova, I.G. Bryndina // International Journal of Molecular Sciences. – 2019. – Vol. 20, № 19. – P. 4860.**
6. Изменение флуоресценции костамерного гамма-актина *m. soleus* в условиях 12-часовой функциональной разгрузки / О.А. Кельдибекова, А.Д. Ларионова, А.В. Секунов, В.А. Протопопов // Актуальные проблемы биомедицины – 2020: сб. XXVI Всерос. конф. молодых учёных с междунар. участием. – СПб., 2020. – С. 85–87.

7. Сфинголипидзависимая перестройка линкерных компонентов субсарколеммального цитоскелета камбаловидной мышцы крыс на ранних этапах функциональной разгрузки / А.В. Секунов, В.А. Протопопов, И.Г. Брындина // XLIV акад. чтения по космонавтике, посвящ. памяти акад. С.П. Королёва и других выдающихся отечественных ученых – пионеров освоения космического пространства. – М., 2020. – Т. 2. – С. 509–513.
8. Сфинголипидзависимые изменения иммунофлуоресценции кавеолина и компонентов дистрофин-ассоциированного гликопротеидного комплекса / А.Д. Ларионова, О.А. Кельдибекова, А.В. Секунов, В.А. Протопопов // Актуальные проблемы биомедицины–2020: сб. XXVI Всерос. конф. молодых учёных с междунар. участием. – СПб., 2020. – С. 111–113.
9. Metabolism and effects of skeletal muscle sphingolipids in functional unloading / I.G. Bryndina, M.N. Shalagina, V.A. Protopopov, A.V. Sekunov, A.A. Yakovlev // Zhurnal Evolyutsionnoi Biokhimii i Fiziologii. – 2020. – Vol. 56, № 7. – P. 743.
- 10. Мышечная пластичность в условиях функциональной разгрузки: эффекты ингибитора кислой сфингомиелиназы кломипрамина / А.В. Секунов, В.А. Протопопов, В.В. Скурыгин, М.Н. Шалагина, И.Г. Брындина // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. – 2021. – Т. 107, №. 6–7. – С. 911–924.**
- 11. Early lipid raft-related changes: interplay between unilateral denervation and hindlimb suspension / I.G. Bryndina, M.N. Shalagina, V.A. Protopopov, A.V. Sekunov, A.L. Zefirov, G.F. Zakirjanova, A.M. Petrov // International Journal of Molecular Sciences. – 2021. – Vol. 22, № 5. – P. 1–20.**
- 12. Muscle Plasticity under Functional Unloading: Effects of an Acid Sphingomyelinase Inhibitor Clomipramine / A.V. Sekunov, V.A. Protopopov, V.V. Skurygin, M.N. Shalagina, I.G. Bryndina // Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology. – 2021. – Vol. 57. – P. 925–935.**
13. Влияние ингибитора кислой сфингомиелиназы на сарколеммальное взаимодействие церамида и кавеолина-3 в камбаловидной мышце крыс при 14-дневной функциональной разгрузке / А.В. Секунов, В.А. Протопопов,

С.А. Зыкина, О.А. Ишкильдина, И.Г. Брындина // VI междисциплинарная конф. с междунар. участием «Современные проблемы системной регуляции физиологических функций», посвященная 90-летию со дня рождения акад. К.В. Судакова. – М., 2022. – С. 458–459.

14. Роль церамида в реорганизации плазматических мембран и индукции апоптоза при функциональной разгрузке и денервации скелетных мышц / И.Г. Брындина, В.А. Протопопов, А.В. Секунов // XLIV акад. чтения по космонавтике, посвящ. памяти акад. С.П. Королёва и других выдающихся отечественных ученых–пионеров освоения космического пространства. – М., 2022. – Т. 4. – С. 245–248.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АОВ – антиортостатическое вывешивание

БСА – бычий сывороточный альбумин

ЗФР – забуференный физиологический раствор

ПЦР-РВ – полимеразная цепная реакция в реальном времени

ТЦМ – тяжелые цепи миозина

FIASMA – функциональный ингибитор кислой сфингомиелиназы

Научное издание

Секунов Алексей Васильевич

**Роль сфинголипидов в нарушении
мембрано-цитоскелетных взаимодействий
и мышечной пластичности
при гравитационной разгрузке постуральных мышц**

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Подписано к печати 17.04.2023 г.
Формат 60 x 84 ¹/₁₆. Объем 1 усл. — п.л.
Тираж 100 экз. Заказ № .

Отпечатано в ООО «Альфа-принт».