

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«ИЖЕВСКАЯ ГОСУДАРСТВЕННАЯ МЕДИЦИНСКАЯ АКАДЕМИЯ»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

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

Диссертация
на соискание учёной степени
кандидата медицинских наук

Научный руководитель
доктор медицинских наук, профессор
Брындина Ирина Георгиевна

Саратов - 2023

ОГЛАВЛЕНИЕ

| | |
|--|----------|
| ВВЕДЕНИЕ | 5 |
| ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ | |
| 1.1. Гипогравитационный двигательный синдром, его характеристика и способы моделирования на грызунах | 14 |
| 1.2. Дистрофин-ассоциированный гликопротеидный комплекс в норме, при патологии и в условиях функциональной разгрузки | 17 |
| 1.3. Миозиновый фенотип мышечных волокон и его изменения в условиях функциональной разгрузки | 21 |
| 1.4. Сфинголипиды, их метаболизм и функции в скелетных мышцах | 25 |
| 1.5. Липидные рафты и кавеолы: физико-химическое структурирование холестерин-насыщенной липид-упорядоченной фазы и ее динамика в условиях функциональной разгрузки | 28 |
| ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ | |
| 2.1. Объекты исследования и экспериментальный протокол | 34 |
| 2.2. Флуоресцентная микроскопия | 37 |
| 2.2.1. Иммунофлуоресцентные исследования церамида и белков дистрофин-ассоциированного гликопротеидного комплекса на поперечных срезах мышц | 37 |
| 2.2.2. Исследование колокализации кавеолина-3 и церамида в мембране мышечных волокон | 40 |
| 2.3. Исследование экспрессии белков дистрофин-ассоциированного гликопротеидного комплекса методом иммуноблоттинга | 40 |
| 2.4. Оценка фенотипа мышечных волокон | 42 |
| 2.5. Оценка атрофии мышц при функциональной разгрузке | 43 |
| 2.6. Методы статистического анализа | 44 |

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

| | |
|--|-----------|
| 3.1. Результаты иммунофлуоресцентных исследований церамида, кавеолина-3 и компонентов дистрофин-гликопротеидного комплекса на поперечных срезах <i>m. soleus</i> крыс, подвергнутых 12-часовой и 14-дневной функциональной разгрузке | 45 |
| 3.1.1. Изменения иммунофлуоресценции церамида | 45 |
| 3.1.2. Изменения иммунофлуоресценции кавеолина-3 | 48 |
| 3.1.3. Анализ колокализации и линейного распределения церамида и кавеолина-3 в сарколемме волокон <i>m. soleus</i> | 50 |
| 3.1.4. Изменения иммунофлуоресценции сарколеммального β -дистрогликана | 52 |
| 3.1.5. Изменения иммунофлуоресценции субсарколеммального дистрофина | 55 |
| 3.1.6. Изменения иммунофлуоресценции γ -актина | 58 |
| 3.2. Результаты исследования экспрессии белков в <i>m. soleus</i> крыс методом иммуноблоттинга в условиях 12-часовой и 14-дневной функциональной разгрузки | 61 |
| 3.2.1. Изменения иммуноэкспрессии кавеолина-3 | 61 |
| 3.2.2. Изменения иммуноэкспрессии сарколеммального β -дистрогликана | 63 |
| 3.2.3. Изменения иммуноэкспрессии субсарколеммального дистрофина | 66 |
| 3.2.4. Изменения иммуноэкспрессии субсарколеммального γ -актина | 68 |
| 3.3. Исследование фенотипа мышечных волокон при 14-дневной функциональной разгрузке | 70 |
| 3.4. Оценка атрофии <i>m. soleus</i> при функциональной разгрузке | 73 |
| ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ | 75 |
| ЗАКЛЮЧЕНИЕ | 85 |

| | |
|--|-----------|
| ВЫВОДЫ..... | 87 |
| РЕКОМЕНДАЦИИ И ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ | 88 |
| СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ | 90 |
| СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ..... | 91 |

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования и степень её разработанности

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 [54, 138]. Для *disuse* характерна перестройка миозинового фенотипа мышц (снижение экспрессии «медленных» и повышение экспрессии «быстрых» изоформ в постуральных мышцах).

Существует мнение, что мембранный дистрофин-ассоциированный гликопротеидный комплекс является передатчиком механического сигнала и выполняет защитную роль, повышая устойчивость липопротеидного слоя к механическим альтерациям [163].

Кавеолин-3, специфичная для мышц форма кавеолина, входит в состав дистрофин-гликопротеинового комплекса [56], но не является его непосредственным компонентом [38]. 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 [44]. Бета-дистрогликан – связанная с сарколеммой, посредством трансмембранного домена, субъединица дистрогликанового комплекса [160]. С-концевым участком бета-дистрогликан регулирует передачу механического сигнала на дистрофиновый слой [67]. В свою очередь дистрофин является глубоким интегратором цитоскелета, критически важным для стабильности сарколеммы [51], 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 [128, 45].

Применительно к микрогравитационным эффектам было отмечено достоверное увеличение доли волокон с повреждениями дистрофинового слоя после 14 суток вывешивания [54], а также увеличение экспрессии сарколеммального кавеолина-3 на 7 день вывешивания [76].

Ранее исследователями отмечалось, что функциональная разгрузка мышц в остром периоде приводит к потере мембранного холестерина и деструктуризации липидных рафтов в сарколемме мышечных волокон [117], а моделируемое изъятие холестерина сопровождается мембранной делокализацией дистрофина, b-дистрогликана и кавеолина-3 [156]. Вопрос же о влиянии сфинголипидной динамики сарколеммы в условиях моделируемой гипогравитации на «поведении» дистрофин-ассоциированного гликопротеидного комплекса.

Ранее показано, что в процесс развития индуцированных функциональной разгрузкой мышечных изменений ассоциирован с ростом уровней церамида, образующегося в результате сфингомиелиназного гидролиза [1] причем, кломипрамин (функциональный ингибитор кислой сфингомиелиназы) частично устраняет этот эффект [9]. Однако не ясно, влияет ли мембранный церамид на целостность дистрофин-ассоциированного гликопротеидного комплекса и костамерного цитоскелета, и можно ли с помощью воздействия на активность кислой сфингомиелиназы повлиять на изменения мышечной пластичности происходящие в условиях функциональной разгрузки.

Цель исследования

Целью данной работы является 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

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

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.

Внедрение в практику

Результаты диссертационной работы внедрены в учебный процесс на кафедрах ФГБОУ ВО "Ижевская государственная медицинская академия"

МЗ РФ: патологической физиологии и иммунологии, нормальной физиологии.

Методология и методы исследования

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.

Основные 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.

Достоверность полученных результатов, личное участие автора

Достоверность полученных результатов 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.

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

Структура и объем работы

Диссертация изложена на 110 страницах, содержит 4 таблицы, 37 рисунков и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов исследования и их обсуждения, заключения и списка литературы. Список литературы представлен 168 источниками, из которых 9 отечественных и 159 зарубежных.

Соответствие паспорту специальности

Научные положения, описанные в диссертационном исследовании, соответствуют паспорту научной специальности 3.3.3 Патологическая

физиология: п. 1 (Исследование особенностей этиологических факторов, вызывающих развитие повреждения, и характера их воздействия на уровне клеток, органов и систем организма), п. 4 (Анализ механизмов саногенеза, направленных на предотвращение повреждающего действия патогенного агента на организм, его органы и системы, изучение причин и особенностей взаимной трансформации саногенетических и патогенетических процессов.), п. 8 (Изучение защитных, компенсаторных и приспособительных реакций организма, развивающихся в ответ на действие повреждающих факторов различной природы и при развитии патологических процессов).

Апробация 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).

Благодарности

Автор выражает благодарность В.А. Протопопову за помощь в реализации экспериментов и постановке лабораторных методов протеомного анализа, В.В. Скурыгину за помощь в постановке ПЦР-РВ. Автор выражает глубокую признательность научному руководителю д.м.н., профессору И.Г.

Брындиной. Научные исследования, проведенные в рамках данной работы, были выполнены при поддержке гранта РФФИ № 19-315-90099 (Аспиранты).

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Гипогравитационный двигательный синдром, его характеристика и способы моделирования на грызунах

Гравитация, как явление - это универсальное фундаментальное взаимодействие между телами, обладающими массой. На скоростях значительно меньших скорости света, описывается теорией тяготения Ньютона и носит характер движения параболически падающих [3]. На протяжении всего существования такого небесного тела как Земля гравитация определяла развитие на ней геосферы (гравитационная дифференцировка недр), биосферы и ноосферы (появление жизни в целом и разумной жизни, в частности).

На сегодняшний день достигнуты пределы безопасного постоянного пребывания человека в космосе в условиях невесомости (микрогравитации): год-полтора в околоземном космическом пространстве на орбитальных станциях «Мир» и Международной космической станции [6,8]. Для выхода за эти пределы необходимо внедрение новых технологических и медико-биологических подходов, начиная с медикаментозной поддержки и введения центрифуг короткого радиуса [5] в полётах до года, заканчивая переходом к полноценным системам для обеспечения людей в космосе на полном цикле их жизни. Но так как техническая составляющая данных идей далека до реализации, на первый план выходят програмно-тренировочные и фармакологические методы нивелирования физиологически «не родных» для человека условий микрогравитации.

Точное воспроизведение условий микрогравитации в наземных экспериментах не представляется возможным. Однако ее основные эффекты, такие как смещение жидких сред организма в краниальном направлении (fluid shift), безопорность, дефицит двигательной активности, которые испытывают на себе космонавты и биологические объекты в космосе, могут быть смоделированы в наземных условиях. В исследованиях на людях

широко применяются такие подходы как параболический полет, водная иммерсия, продолжительное нахождение в постели (bed rest) – как в горизонтальном положении, так и с наклоном ее головного конца под углом 6 и более градусов (head down tilt), «сухая» иммерсия. Для исследования вызванных гипогравитацией сдвигов в организме экспериментальных животных (чаще – крыс и мышей) разработана методика антиортостатического вывешивания (АОВ, hindlimb unloading – HU, hindlimb suspension - HS) в разных модификациях [4, 48, 96]. Кроме того, для моделирования неиспользования мышц применяют такие подходы как иммобилизация, вывешивание или тенотомия одной из конечностей (при этом вторая служит контролем). При изучении роли нейромышечных взаимодействий в условиях гипогравитации ценную информацию дают исследования с хирургической или химической денервацией, радикулотомией, хотя общепризнано, что денервационные эффекты в мышце лишь частично совпадают с эффектами АОВ. Все эти модели обеспечивают более глубокое понимание молекулярных механизмов, составляющих основу патогенеза мышечной атрофии, вызванной бездействием.

Модель АОВ была предложена в конце 70-х – начале 80-х годов прошлого века [4, 96] как метод, имитирующий определенные аспекты космического полета и позволяющий изучать эти аспекты контролируемым образом [97].

Мышечная разгрузка, вызванная АОВ или реальным гипогравитационным воздействием, приводит к серьезным структурным, функциональным и метаболическим изменениям мышечных волокон. Было показано, что данные эффекты сопряжены с неиспользованием / безопорностью мышцы [74] и характеризуются рядом морфофункциональных и молекулярных перестроек мышечного аппарата. Наиболее значительные изменения развиваются в постуральных мышцах, таких как *m. soleus* и *m. longissimus dorsi* [50,109].

Разгрузка постуральной мышцы (*m. soleus*) сопровождается нарушением ее биоэлектрической активности [10], атрофией, сменой медленных изоформ миозина на быстрые [138] перестройкой цитоскелета [107], изменением экспрессии генов и характера метаболических процессов в мышечных волокнах, активацией или ингибированием ряда ключевых внутриклеточных сигнальных путей и другими эффектами.

Биоэлектрическая активность камбаловидной мышцы значительно редуцируется на самом раннем этапе разгрузки. Так, в первый день АОВ она снижается на 91%; восстановление (до 81% от нормальной активности) наблюдается только к седьмому дню воздействия [10].

Признаки мышечной атрофии регистрируются с 7 дня АОВ, хотя ряд авторов относит начало атрофии уже к 3-4 дню; к 14 дню бездействия наблюдается максимальное снижение массы и диаметра мышечных волокон [23]. Показано, что большой вклад в мышечную атрофию вносит дисбаланс между синтезом и деградацией мышечных протеинов [138], аутофагия, активация прооксидантных [118, 121] и проапоптотических механизмов [11, 14, 47], хотя некоторые работы не подтверждают активацию апоптоза мио ядер при атрофии [25, 133].

Изменение экспрессии генов и эпигенетические модификации [142] направлены на адаптацию мышцы к разгрузке. С другой стороны, экспрессия определенных генов может являться предиктором дальнейших атрофических процессов. В соответствии с этим меняется характер метаболических процессов в мышечных волокнах, активация или ингибирование ряда ключевых внутриклеточных сигнальных путей.

Установлено, что разгрузка изменяет обмен сфинголипидов в постуральной мышце (*m. Soleus*), что сопровождается накоплением церамида [1, 2, 77, 78, 129].

Смена медленных изоформ миозина на быстрые с соответствующей перестройкой метаболизма также является ключевым событием для постуральной мышцы, в которой исходно преобладают оксидативные волокна I типа [16,108].

Перестройка элементов цитоскелета мышц при АОВ характеризуется реорганизацией стрессовых волокон F-актина [32], изменением экспрессии различных форм немышечных актинов [106], разрушением сарколеммального дистрофинового слоя [7].

1.2. Дистрофин-ассоциированный гликопротеидный комплекс в норме, при патологии и в условиях функциональной разгрузки

Дистрофин-ассоциированный гликопротеидный (ДАГ) комплекс — линкерный трансмембранный компонент, обуславливающий непосредственную связь между саркоплазматическим и экстрацеллюлярным матриксом и характеризующий устойчивость мышечного волокна к поперечным нагрузкам [67]. Важность этой многокомпонентной структуры в развитии мышечного волокна была показана в экспериментах с мышцами линии mdx, у которых генетически обусловленное нарушение дистрофинового слоя приводило к развитию фенотипа мышечной дистрофии Дюшенна [90].

Связанные с дистрофином белки можно разделить на три группы в зависимости от их клеточной локализации: внеклеточные (α -дистрогликан), трансмембранные (β -дистрогликан, саркогликаны, саркоспан), цитоплазматические (дистрофин, дистробревин, синтрофины, нейрональная синтаза оксида азота) [51].

Дистрофин представляет собой цитоскелетный белок массой 427 кДа, который локализован на цитоплазматической стороне сарколеммы и связан с костамерами в мышечных волокнах [120]. Дистрофин имеет четыре основных функциональных домена; актин-связывающий N-концевой домен

(ABD1), центральный стержневой домен, богатый цистеином домен и карбоксильный конец.

ABD1 содержит 2 домена гомолога кальпонины (СН1 и СН2) [71]. Эти домены контактируют непосредственно с F-актином, связывая ДАГ комплекс с субсарколеммальной актиновой сетью [159]. Стержневой домен также содержит актин-связывающий мотив (ABD2), который в своей структуре имеет уникальный набор спектриновых повторов, обогащенных основными аминокислотами, что позволяет предположить, что электростатическое взаимодействие лежит в основе взаимодействия с кислыми актиновыми филаментами [12]. Также было показано, что стержневой домен дистрофина связывает мембранные фосфолипиды *in vitro* через остатки триптофана в спектриноподобных повторах [80].

Мутации в генах, кодирующих компоненты ДАГ комплекса, дестабилизируют дистрофиновый комплекс, вызывая мышечную слабость и мышечную дистрофию [46].

Применительно к микрогравитационным эффектам было отмечено достоверное увеличение доли волокон с повреждениями дистрофинового слоя после 14 суток вывешивания [54].

Бета-дистрогликан является основным интегральным, трансмембранным компонентом ДАГ комплекса, связывающим субмембранный дистрофин с экстрацеллюлярным альфа-дистрогликаном и ламинином [46]. С-конец β -дистрогликана содержит мотив РРХУ, который связывается с WW-подобным доменом, содержащим два высококонсервативных остатка триптофана в богатом цистеином домене и первой половине С-концевого домена дистрофина. Эта связь стабилизируется двумя Ca^{2+} -связывающими доменами EF в дистрофине [70, 99]. Известно, что бета-дистрогликан играет в мембране мышечного

волокна не только роль механически связывающего линкера, но и роль трансдуктора в механосенсорном сигналинге.

Исследования лаборатории Carbonetto показали, что мышечные волокна с дефицитом дистрогликанового компонента у мышей характеризуются морфологически абберрантным фенотипом нейромышечного синапса [135]. Культивируемые мышечные трубки, нокаутные по дистрогликановому компоненту, также демонстрируют неорганизованные, нестабильные и высокодисперсные кластеры ацетилхолиновых рецепторов [68].

Достоверных данных о поведении бета-дистрогликана в условиях функциональной разгрузки на сегодняшний день не получено.

Гамма-актин — представитель семейства «немышечных» актиновых белков, участвующих в построении клеточного цитоскелета. По мнению некоторых авторов, данный вид актина в мышцах играет важную роль, являясь костамерным линкерным компонентом, механически связывающим сарколеммальный дистрофин и весь ДАГ комплекс с внутриклеточным цитоскелетом и вносящим вклад в стабильность сарколеммы [114, 128]. Данная гипотеза подтверждается рядом исследований. В частности, исследования, проведенные на mdx мышцах избыточно экспрессирующих гамма- и бета-актин, показали, что мышечные волокна таких животных более устойчивы к эксцентрическому сокращению, чем мышечные волокна mdx животных [17, 110]. А мышцы, дефицитные по гамма-актину, характеризуются фенотипом центронуклеарной миопатии [141].

Кавеолин-3 — специфический для скелетных мышц представитель семейства кавеолиновых белков [148]. Достоверно известно, что кавеолин входит в состав и является частью ДАГ комплекса, что ассоциировано со схожестью вызываемых «поломкой» кавеолина-3 мышечных дистрофий с дистрофиями, вызванными недостаточностью дистрофина и

дистрогликанового компонента [147]. Кавеолин-3 как трансмембранный протеин имеет уникальную структуру. Его С'- и N'-концевые домены располагаются в саркоплазматической части мышечного волокна, в то время как средняя часть образует трансмембранную петлю, «прошивающую» участок билипидного слоя. Цитоплазматическая С'-концевая область имеет три пальмитоилированных сайта. Прилегающая к ней часть N'-концевого цитоплазматического хвоста содержит каркасный домен, который взаимодействует со многими механотрансдукторными и сигнальными белками. Этот домен расположен внутри олигомеризационного мотива, который объединяет кавеолы в более крупные сборки по типу строительных лесов. Девять мономеров кавеолина-3 собираются в комплекс тороидальной формы диаметром ~ 16,5 нм и высотой ~ 5,5 нм [162]. Данные олигомеры кавеолинов собираются в более крупные многогранные структуры, вызывая инвагинацию мембраны и образование кавеол. Трансмембранная кавеолиновая петля имеет в своем составе несколько высокогидрофобных участков, что позволяет ей связываться с холестеринной фракцией билипидного слоя, что в свою очередь позволяет на участках мембраны, связанных с кавеолином-3, производить накопление сфинголипидов и формировать уникальные платформы липидупорядоченной фазы — липидные рафты [112, 119]. Так же интересно, что кавеолин-3, при его высокой экспрессии в сарколемме [49], посредством WW-домена способен конкурентно связываться с С-концом b-дистрогликана, диссоциируя дистрофин от дистрогликанового компонента [56]. Данные находки ранее стали основой для исследования отдельного вида кавеолинопатий — пояснично-конечностной мышечной дистрофии [49]. В экспериментах с функциональной разгрузкой тоже было замечено интересное поведение кавеолина-3. Его мембранная и цитозольная фракции показали количественное увеличение к 7 дню функциональной разгрузки [76].

На фоне всего вышесказанного вызывает интерес вклад, вносимый в динамику субсарколеммальных и трансмембранных протеинов самой мембраной мышечного волокна, и то, как качественные и количественные изменения этой мембраны влияют на цитоскелетные перестройки в условиях микрогравитации и функциональной разгрузки.

1.3. Миозиновый фенотип мышечных волокон и его изменения в условиях функциональной разгрузки

Как было указано выше, одним из ключевых процессов, регистрируемых в постуральной мышце при разгрузке, является перестройка ее фенотипа, являющаяся одним из проявлений высокой пластичности скелетных мышц [16, 108].

Эволюционируя в гравитационной среде, скелетные мышечные волокна развивались в три общих фенотипических кластера, определенных как двигательная единица. Двигательная единица состоит из мотонейрона и всех мышечных волокон, иннервируемых данным мотонейроном [26]. В зависимости от уровня активности, мышечные волокна в двигательной единице способны демонстрировать характерные метаболический и сократительный фенотип. Такие типы волокон можно классифицировать как медленно окисляющиеся, быстро окисляющиеся гликолитические и быстро гликолитические [116]. Присущая каждому кластеру волокон сократительная активность определяется преимущественной экспрессией тех или иных изоформ тяжелых цепей миозина (ТЦМ). Фенотип мышцы зависит от преобладающей в ней экспрессии генов каких-либо из известных изоформ ТЦМ. К настоящему времени описано 4 изоформы ТЦМ в мышечных волокнах, которые комбинируются в определенной пропорции в мышцах с разной функцией [131, 138]:

а) I тип - медленные окислительные волокна, характеризующиеся низкой скоростью сокращения, наличием большого количества митохондрий

и низкой утомляемостью. Эти волокна преобладают в постуральных мышцах и характеризуются высокой экспрессией ТЦМ I β ;

б) волокна II типа экспрессируют быстрые изоформы ТЦМ и подразделяются на следующие группы:

- IIa тип - быстрые окислительно-гликолитические волокна, в которых активны оба пути синтеза АТФ – аэробный и анаэробный.
- IIb тип - быстрые гликолитические волокна с большой скоростью и силой сокращения, но с высокой утомляемостью. Следует отметить, что данный тип волокон встречается только у мелких животных, в том числе мышей и крыс, при этом он характеризуется самой высокой скоростью сокращения.
- IIд/х тип также относится к быстрым гликолитическим волокнам, он был открыт позднее остальных типов. По сократительным свойствам эти волокна аналогичны IIa и IIb типам, а по утомляемости занимают промежуточное положение между ними.

К настоящему времени установлено, что мышечные волокна могут содержать один определенный изотип ТЦМ или их сочетание (т.н. гибридные волокна). Так, Schiaffino, Reggiani, (2011) приводят примеры таких гибридных волокон: 1/2A, 2A/2X, 2X/2B.

Белки ТЦМ (MyHC) скелетных мышц кодируются следующими генами (MYH): ТЦМ I β – MYH7, ТЦМ IIa – MYH2, ТЦМ IIb – MYH4, ТЦМ IIд/Х – MYH1. Помимо этого существуют еще несколько вариантов генов, кодирующих белки, специфически функционирующие в определенных мышцах.

Известно, что, как и у человека, большую часть *m. soleus* крыс (в отличие от мышей) составляют оксидативные волокна I типа; это соответствует ее функции как мышцы, поддерживающей позу

(постуральной). Функциональная разгрузка приводит к реорганизации экспрессии генов тяжелых цепей миозина и изменению фенотипа мышцы, при этом возрастает доля быстрых изоформ миозина, а доля медленных изоформ снижается [157]. Такая трансформация связана со снижением экспрессии гена *myh7*, кодирующего медленную изоформу ТЦМ, и увеличением экспрессии генов, кодирующих быстрые изоформы ТЦМ [131]. Смена фенотипа сопровождается соответствующей перестройкой метаболизма в мышечных волокнах. Характерным также является увеличение количества гибридных волокон, экспрессирующих разные изоформы ТЦМ.

Ранее поиск сигнальных путей, регулирующих экспрессию генов ТЦМ при функциональной разгрузке, основывался на двух основных явлениях: повышенный уровень кальция саркоплазмы и достаточно низкий уровень высокоэнергетических фосфатов [31, 150]. Считается, что кальцинейрин/NFAT (ядерный фактор активированных Т-клеток) является наиболее важным сигнальным каскадом, который влияет на экспрессию медленных изоформ ТЦМ. Кальцинейрин – белок, локализованный в области саркомерного Z-диска, при взаимодействии с кальций-кальмодулиновым комплексом он способен проявлять фосфатазную активность и дефосфорилировать NFATs1, с последующим его транслоцированием в мионуклеусы [31]. В ядре данный фактор либо хранится в упакованном гетерохроматине, либо взаимодействует с MEF-2, фактором транскрипции, специфически связанным с медленным промотором гена ТЦМ [137]. В свою очередь дефосфорилирование сигнального белка GSK3 β (киназы гликогенсинтазы) способствует экспорту NFAT из ядра и, напротив, сдвигает равновесие ТЦМ в сторону быстрых изоформ [136].

Другой механизм регуляции миозинового фенотипа реализуется через активность кальций-кальмодулиновой киназы. При активации данной киназы она способна фосфорилировать гистондеацетилазу-4 и препятствовать ее

попаданию в мионуклеарное пространство [86]. При низкой концентрации кальций-кальмодулинового комплекса и, соответственно, низкой киназной активности кальций-кальмодулиновой киназы комплекс гистондеацетилазы-4 не фосфорилируется в полной мере и часть его молекул транслоцируется в мионуклеусы. В мионуклеусах гистондеацетилаза-4 деацетилирует не только H3-гистон, но и транскрипционный фактор MEF-2, взаимодействующий с промотором гена *myh7*, регулирующего TЦM1 β [87].

Механизмы реализации сдвига экспрессии генов изоформ TЦM в сторону быстрого типа при функциональной разгрузке до сих пор в значительной степени не изучены. Ранее было показано, что 14-дневная функциональная разгрузка у крыс ассоциирована с интенсивной ядерной транслокацией NFATs1 в волокнах камбаловидной мышцы [42]. Также интересно, что повышенная экспрессия кальпастина, эндогенного ингибитора кальций-зависимой цистеиновой протеазы – кальпаина, за счет которой преимущественно происходит деградация цитоскелета при функциональной разгрузке, не приводила к трансформации миозинового фенотипа у вывешенных мышей [151], что может характеризовать активацию кальпаинов как один из факторов трансформации миозинового фенотипа.

Считается что в отсутствии стимулирующих влияний на экспрессию генов TЦM медленного типа, связывание ДНК с регулятором транскрипции MyoD усиливает экспрессию гена миозина быстрого типа [161]. В то же время животные с нокаутом MyoD в задних конечностях не демонстрировали трансформации миозина в сторону быстрого типа [134]. Это позволяет сделать предположение, что MyoD существенно влияет на экспрессию генов быстрых изоформ TЦM.

Роль сфинголипидов в регуляции мышечного фенотипа неизвестна. Влияние сфинголипидных механизмов на экспрессию разных изоформ TЦM, вызванную функциональной разгрузкой, ранее не изучалось. В данном исследовании нами было проанализирована возможность коррекции

изменений фенотипа постуральной мышцы путем воздействия на сфинголипидные механизмы с помощью ингибитора кислой сфингомиелиназы.

1.4. Сфинголипиды, их метаболизм и функции в скелетных мышцах

Сфинголипиды представляют собой один из основных классов липидов в клетках эукариот. Давно известным фактом является значение сфинголипидов как структурных компонентов наружной и внутриклеточных мембран. Многочисленные экспериментальные данные, полученные в последние два десятилетия, позволили выявить важную роль сфинголипидов в контроле ряда ключевых биологических процессов в клетке в качестве сигнальных молекул, регулирующих клеточную пролиферацию, дифференцировку, воспаление и апоптоз. В настоящее время представления о структурной роли сфинголипидов также дополнены данными о липидных рафтах (плотиках), в которых сфинголипидные молекулы наряду с холестерином участвуют в кластеризации функциональных протеинов и реорганизации мембранных процессов при различных воздействиях на клетки.

Церамид является ключевой молекулой в биосинтезе ряда производных - простых и сложных сфинголипидов. К настоящему времени биосинтез церамида хорошо изучен [55, 146]. Установлено, что его образование происходит в результате трех метаболических процессов (рис. 1):

1. Синтез *de novo* осуществляется в эндоплазматическом ретикулуме (ЭПР). Начальным (и ключевым) звеном этого пути является присоединение *l*-серина к пальмитоил-СоА при участии серинпальмитоилтрансферазы.

2. Образование церамида из сфингомиелина (СМ) реализуется под действием сфингомиелиназ (SMase).
3. Рециклизация (salvage pathway, от salvage - сбор и использование утильсырья, или recycling – утилизация отходов) представлен ферментативными реакциями, в которых церамид образуется в лизосомах в результате распада ранее образованных сложных сфинголипидов.

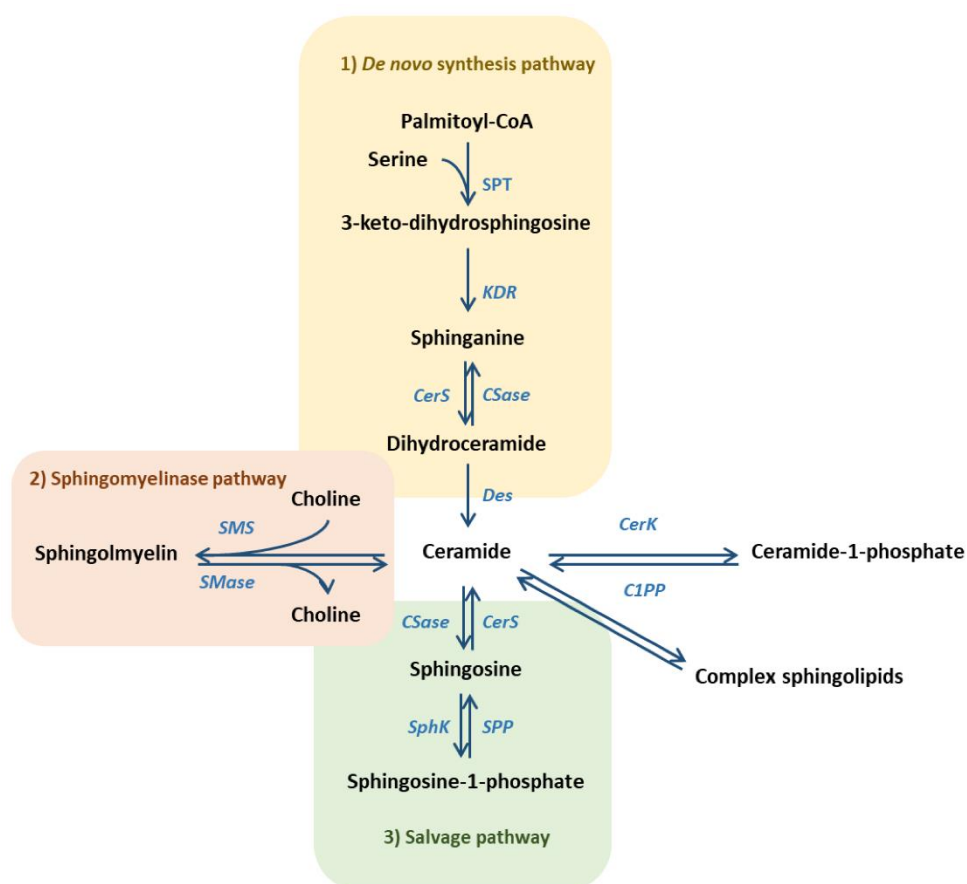


Рисунок 1. Основные пути образования церамида в клетках (по J.Simon et al., 2020)

Известные к настоящему времени плеiotропные эффекты сфинголипидов в скелетных мышцах описаны в ряде обзоров [18, 24, 104, 146] и оригинальных статей. Эти эффекты связывают в основном с теми же механизмами, которые характерны для сфинголипидной сигнализации в других клетках.

Важно, что действие церамида и его производных нередко является разнонаправленным. Так, показано, что церамид и сфингозин могут действовать как позитивные регуляторы апоптоза, тогда как их фосфорилированные производные церамид-1-фосфат и сфингозин-1-фосфат подавляют апоптоз [57, 95, 152, 167].

Известно также, что церамид подавляет миогенез, тогда как сфингозин-1-фосфат его стимулирует [41, 92]. Полагают, что проапоптотические эффекты церамида могут быть реализованы в результате: а) активации проапоптотического белка BAX; б) дефосфорилирования под действием активированной церамидом протеинфосфатазы 2A (PP2A) и последующей инактивации антиапоптотического белка BCL-2 [55, 69].

Установлено, что церамид тесно связан с индукцией прооксидантных процессов в скелетных мышцах [104]. Так, повышение активности АФК, снижение антиоксидантной защиты и активация NO-синтазы или НАДФН-оксидазы могут стимулировать оборот сложных сфинголипидов и образование таких биоактивных метаболитов как церамид, сфингозин и сфингозин-1-фосфат. С другой стороны, аналоги церамидов действуют непосредственно на изолированные митохондрии, ингибируя транспорт электронов в комплексе III, что ведет к увеличению продукции АФК [145].

Церамид в скелетных мышцах также вовлечен в ряд регуляторных процессов, связанных с действием инсулина и протеосинтезом. Так, показано, что церамид ингибирует сигнальный путь Akt (PKB) / mTOR, а также нарушает транспорт аминокислот в мышечные клетки [60, 66]. Эффекты церамида связаны с действием на Akt (PKB) протеинфосфатазы 2A (PP2A), которая дефосфорилирует его по активационным сайтам, а также с действием атипичной протеинкиназы C (PKC ζ) [89]. Известно, что для активации Akt (PKB) под действием инсулина необходимо перемещение данного протеина в клеточную мембрану, а именно – в область кавеоларных рафтов. При избыточном образовании и накоплении в рафтах церамида

последний активирует РКС ζ , которая оказывает ингибирующее действие на Akt (PKB) [61].

Данный факт является одним из примеров того, насколько важны эффекты церамида в клеточных мембранах при изменениях функций клеток, вызванных внешними воздействиями. Данный аспект более подробно рассматривается в следующем разделе обзора.

1.5. Липидные рафты и кавеолы: физико-химическое структурирование холестерин-насыщенной липид-упорядоченной фазы и ее динамика в условиях функциональной разгрузки

Липидная микрокомпозиция сарколеммы, латеральная организации мембранного билипидного слоя и физико-химическая гетерогенность липидных субпопуляций биологической мембраны легли в основу представлений о динамике взаимосвязи сарколеммальных белковых и липидных структур. Важной структурой биологической мембраны является липидный рафт (плотик), возможность существования которого является насущным вопросом и на сегодняшний день. Основой гипотезы «липидного рафта» стала идея компартментализации. Клеточная компартментализация – достаточно широко обоснованное понятие, заключающееся в принципиальной структурно-пространственной и функциональной неоднородности внутреннего состава клетки [35]. Ключевыми элементами в процессе компартментализации являются биологические мембраны, обеспечивающие, помимо барьерной ограничительной функции, формирование внутриклеточной структурной организации, митохондриального энергетического пула, а также биохимическую сигнальную трансдукцию [29]. Продолжением данных представлений о структурно-функциональной компартментализации стали идеи о неоднородности самой композиции биомембраны и возможности существования внутри нее особых рафтовых структур [164].

Фосфолипиды составляют основную часть липидного матрикса биомембраны. Они представляют собой эфирные и амидные производные глицерина (глицерофосфолипиды) или сфингозина (сфинголипиды) с остатками жирных кислот и фосфорной кислоты. Глицерофосфолипиды обычно представляют собой два остатка жирной кислоты, связанные двумя ацильными гидрофобными цепями, и сложный эфир фосфатной группы и глицерина. Дополнительно к этому фосфатная группа способна этерифицироваться холином, этаноламином, серином или инозитом в самом фосфолипиде [155]. Важно, что и состав головной группы и разнородные по длине и насыщенности остатки ацильных цепей влияют на физические свойства биомембраны [39].

Сфинголипиды являются вторым наиболее распространенным структурным липидом. Они содержат одну гидрофобную ацильную цепь и сложный эфир фосфатной головной группы, ассоциированный со сфингозином. Гидрофобная основа сфинголипидов представлена комплексом сфингозина и жирных кислот, простейшим представителем такого комплекса является церамид [154].

Холестерин наряду с фосфолипидами также является важным компонентом липидной композиции биомембран. Молекула холестерина представляет собой стероидный комплекс с внешней гидроксильной группой и небольшой разветвленной гидрофобной хвост. Интересно, что холестерин и сфинголипиды, содержащие ненасыщенные цепочки жирных кислот, способны к образованию конденсированных комплексов. Данное взаимодействие послужило одним из оснований для возможности избирательного ассоциирования липидных ансамблей в гетерогенные структуры [91].

Концепция липидного рафта изначально была введена для объяснения гетерогенности липидного состава апикальной мембраны эпителиальных клеток [140]. В настоящее время липидные рафты определяются как

динамические наноразмерные холестерин-обогащенные сфинголипидные платформы, включающие в себя белковые комплексы, регуляция которых происходит посредством специфических липид-липидных, белок-липидных и белок-белковых взаимодействий [85].

В живых клетках рафтовые сборки могут быть стабилизированы специфической олигомеризацией белков или липидов с низкоэнергетическими связями, так генерируются более крупные и стабильные домены, содержащие преимущественно крупные белковые конструкции [83]. Для мембранных белков различные типы их взаимодействия с липидами можно отличить по относительному времени циркуляции конкретного липида на границе раздела белок-липидной фазы [81]. Если липид проявляет низкую степень взаимодействия с трансмембранным доменом белка, то он считается «объемным» липидом и определяется быстрой скоростью обмена позициями с липидами, расположенными в непосредственной близости. Время пребывания перед обменом может быть опосредованно специфическими взаимодействиями белка с полярными головками липида или гидрофобным соответствием трансмембранного домена углеводородным цепям липида [103]. Такие взаимодействия приводят к образованию кольцевых липидных оболочек вокруг мембранных белков [13]. Липиды, чья обменная скорость еще ниже, чем у кольцевых оболочек, обозначаются как некольцевые.

Несколько механизмов управляют взаимодействием мембранных белков с различными липидами: а) гидрофобная толщина липидного слоя, б) латеральный профиль давления мембраны, в) распределение зарядов на границе фазового раздела белок-липид, г) присутствие специфически локализованных аминокислот трансмембранного домена [33]. Гидрофобная толщина липидного бислоя обычно определяет расстояние между противоположными головными группами внешнего и внутреннего листка, что обычно составляет 35-55 Å (ангстрем).

Латеральный профиль давления мембраны, также важный фактор белок-липидной ассоциации, определяется как выталкивающая сила мембраны, играющей роль растворителя, на белок, как растворимое вещество, и зависит от степени совместимости аминокислотной последовательности трансмембранного домена с окружающими его липидами на границе раздела фазы белок-липид [27]. Так реализуется мембранное связывание и регулирование механочувствительных каналов большой проводимости TREK-1 и TRAAK, для которых важно связывание анионных кольцевых липидов и положительно-заряженных аминокислотных остатков трансмембранных доменов, как заряд-зависимый и аминокислотно-зависимый механизм, а разность профиля латерального давления предположительно может являться механизмом их активации [122].

Важность аминокислотной последовательности также демонстрирует направленность различных аминокислотных остатков на головные группы липидов. Ароматические аминокислоты часто участвуют в липидной стабилизации [113], остатки тирозина, присутствующие в межфазной области, способны связывать фосфодиэфирную группу самостоятельно (через ионную пару или водородную связь) или в комплексе с положительно заряженными аминокислотами, аналогично остатки триптофана локализуются в основном в межфазной области, а индольная группа направлена к центру липидного бислоя [40]. Водородные связи часто наблюдаются между индольным атомом азота и липидной фосфодиэфирной группой [125].

Особую важность рафтового нацеливания белков представляет механизм белкового связывания с некольцевыми липидными структурами. Так, было показано, что в Na-АТФазе V-типа *Enterococcus hirae* липиды, находящиеся внутри олигомерных мембранных белковых сборок, проявляют активность «молекулярного клея», укрепляя контакты субъединиц [101]. Другим важным примером, в котором липиды идентифицированы как строительные блоки, являются кавеолы. Кавеолины, как основные белки

кавеол, способны связываться с холестерином со стехиометрией 1:1, в результате чего образуется устойчивый к воздействию детергентов комплекс [100], а в микросомах холестерин способствует олигомеризации субъединиц кавеолина [94], что подчеркивает его структурную роль.

Все вышеописанные закономерности характеризуют сложность рафтовой структуры, как белок-ассоциированной липид-упорядоченной фазы, а также зависимость целостности компонентов этой фазы от биохимической составляющей рафтового комплекса и физико-химических взаимодействий на уровне липид-липидных и белок-липидных связей.

Особую важность целостность мембранных доменов имеет в пластичности скелетно-мышечной ткани, в развитии атрофических и дистрофических процессов. Вышеописанная роль дистрофин-ассоциированного гликопротеидного комплекса в развитии некоторых патологических фенотипов неразрывно связана с динамикой липидных микродоменов. Так, ранее было показано, что изъятие холестерина из сарколеммы способно приводить к разрушению и делокализации компонентов ДАГ комплекса, а также последующей потере поперечной жесткости и снижению скоростно-силовых характеристик мышечных волокон [156].

Ранее было показано, что в ответ на кратковременную функциональную разгрузку происходит увеличение количества мембранного церамида, а эксперименты, проведенные с использованием кломипрамина (трициклического антидепрессанта, входящего в группу функциональных ингибиторов кислой сфингомиелиназы), в противовес экспериментам, проведенным группой Salaun et al. (2016) [129] с использованием мириоцина, показали что основной вклад в накопление церамида при функциональной разгрузке вносится гидролизом сфингомиелина [1]. Данные результаты хорошо ассоциировались с позднее вышедшей работой о разрушении липид-

упорядоченной мембранной фазы при кратковременной функциональной разгрузке [117].

Возможность вытеснения церамидом рафтового холестерина в свою очередь была показана ранее [93, 149], как и влияние липид-зависимых процессов на изменение актинового цитоскелета при функциональной разгрузке [106].

Вышеописанные изменения формируют один из важных аспектов проблемы атрофических изменений при функциональной разгрузке: мембрано-цитоскелетные взаимодействия, зависящие от липидных структурно-функциональных характеристик сарколеммальных микродоменов, динамически меняющихся в неиспользуемой мышце. Нами в данной работе рассмотрен вопрос о «поведении» структур дистрофин-ассоциированного гликопротеидного комплекса, костамерного гамма-актина и кавеолярного кавеолина-3 в аспекте изменения сфинголипидного компонента сарколеммальных липидных рафтов.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

2.1. Объекты 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. Работа выполнена в соответствии с Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (Страсбург, 18 марта 1986 года), приказом МЗ РФ от 19.06.2003 №267, правилам лабораторной практики в РФ, а также с соблюдением требований, предъявляемых к работе с экспериментальными животными, изложенными в Приказе Минздравсоцразвития от 23.08.2010 № 708 «Об утверждении Правил лабораторной практики». Для устранения влияния сезонной и циркадной зависимости на исследуемые показатели опыты проводили в осенне-зимний период. Животные содержались в стандартной обстановке вивария, в условиях свободного доступа к еде и воде с 12 часовым световым циклом.

Для создания функциональной разгрузки было использовано антиортостатическое вывешивание животных (АОВ) под углом 30° к поверхности в отдельных клетках, изготовленных из оргстекла и оборудованных системой для свободного передвижения согласно модели Ильина – Новикова [4] в модификации Morey-Holton [97]. Среди животных, используемых в экспериментах с вывешиванием (крысы, мыши, песчанки), методы моделирования функциональной разгрузки, а также оценка степени повреждения скелетных мышц на указанных сроках наиболее полно разработаны и широко апробированы именно у крыс. Также следует отметить, что именно у крыс состав мышечных волокон *m. soleus* и их пластичность наиболее близки к таковому у человека. Для сохранения популяции животных в эксперименте использовались только крысы-самцы.

Для уменьшения количества животных была разработана четкая стратегия исследования, соответствующая поставленным задачам:

гистологическая методика срезов и современная методика двойного иммуномечения позволяют использовать меньше мышечного материала для выявления иммуногистохимических меток, так как на каждом срезе будет определялось минимум две метки; иммунологические исследования так же позволяют исследовать несколько показателей в одном образце, что позволяет сократить количество используемого материала и экспериментальных животных.

Наименование проведенных исследований, и количество использованных животных представлены в таблице 1.

Моделирование гравитационной разгрузки мышц, а именно моменты введения животных в эксперимент и выведения их из него проводились под общей анестезией с использованием в качестве анестетика хлоралгидрата в дозе 0,1 мг/кг массы животного внутривенно.

Таблица 1. Наименование видов исследования.

| Биообъект: Крыса (n - количество животных) | | | | | | |
|---|-----------------|------------|---------|------------------------|----------------|-----------------|
| Вид исследования | Группы животных | | | | | |
| | Конт- роль | Группа АОВ | | Группа АОВ + ингибитор | | |
| | | 12 час | 14 дней | 14 дней + Кл | 12 час + Ам | 14 дней + Ам |
| Анализ изменения массы m. soleus и диаметра Ферета отдельных мышечных волокон | n=8 | | n=4 | n=4 | | |
| Исследование экспрессии генов изоформ ТЦМ методом ПЦР-РВ в m. soleus | n=6 | | n=6 | n=6 | | |
| Иммунофлуоресцентное исследование экспрессии | n=6 | | n=6 | n=6 | | |

| | | | | | | |
|--|-----|-----|-----|--|-----|-----|
| быстрых изоформ ТЦМ | | | | | | |
| Иммунофлуоресцентное исследование экспрессии кавеолина-3 | n=6 | n=6 | n=5 | | n=5 | n=5 |
| Иммунофлуоресцентное исследование экспрессии β -дистрогликана | n=6 | n=6 | n=5 | | n=5 | n=5 |
| Иммунофлуоресцентное исследование экспрессии дистрофина | n=6 | n=6 | n=5 | | n=5 | n=5 |
| Иммунофлуоресцентное исследование экспрессии γ -актина | n=6 | n=6 | n=6 | | n=6 | n=5 |
| Исследование экспрессии белка кавеолина-3 методом иммуноблоттинга | n=6 | n=6 | n=6 | | n=6 | n=5 |
| Исследование экспрессии белка β -дистрогликана методом иммуноблоттинга | n=6 | n=6 | n=6 | | n=6 | n=5 |
| Исследование экспрессии белка дистрофина методом иммуноблоттинга | n=6 | n=6 | n=6 | | n=6 | n=5 |
| Исследование экспрессии белка γ -актина методом иммуноблоттинга | n=6 | n=6 | n=6 | | n=6 | n=5 |

В качестве метода воздействия на анализируемые в экспериментах показатели, нами применялись препараты группы функциональных ингибиторов кислой сфингомиелиназы (FIASMA). Кломипрамин (Анафранил, ООО Новартис Фарма, Россия) вводили внутримышечно в дозе 0,5мг/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.

Выделение *m. soleus* проводилось под общим наркозом (Золетил, Вибрак, Франция, внутривенно в дозировке 10 мг/кг 0,1 мл) в три этапа.: 1) двустороннее послойное рассечение задней конечности по ходу *m. gastrocnemius*, 2) пересечение *t. calcaneus*, 3) тупое отделение препарата *m. soleus* с рассечением дистального конца *n. tibialis*. Далее животные выводились из эксперимента посредством кровопускания из сонной артерии. Часть выделенного мышечного материала подвергалась шоковой заморозке посредством мульти-порового криовиала в атмосфере жидкого азота с сохранением структуры мышечных волокон для последующего иммуногистохимического исследования. Для биохимического анализа мышечный материал сортировался в отдельные маркированные пробирки (эппендорфы) и замораживался при -80°C .

2.2. Флуоресцентная микроскопия

2.2.1. Иммунофлуоресцентное исследование церамида и белков дистрофин-ассоциированного гликопротеидного комплекса на поперечных срезах мышц

Для иммуногистохимического исследования из замороженных в жидком азоте мышечных препаратов изготавливались полутонкие срезы. С помощью микротомы HM525 NX Cryostat (Thermo Fisher Scientific, USA) была выполнена криосекция замороженной мышечной ткани, предварительно заключенной в блоки Tissue-Tek (Thermo Fisher Scientific, USA), после чего серийные поперечные срезы мышцы толщиной 14 мкм монтировались на предметные стекла Superfrost Plus (Thermo Fisher Scientific, USA). Подготовленные к иммуногистохимическому исследованию образцы хранились при 4°C .

Иммунофлуоресцентный анализ проводили на приготовленных с помощью криосекции поперечных срезах *m. soleus*. Смонтированные на предметных стеклах срезы фиксировали посредством 4% параформальдегида, приготовленного на фосфатно-солевом буфере (ЗФР в мМ: 3,2 NaH₂PO₄, 0,5 K₂HPO₄, 1,3 KCl, 135 NaCl, pH 7,4). После фиксации срезы троекратно промывались ЗФР и, для преамбилизации, во влажной камере инкубировались в течение часа раствором, в состав которого входил 1% Тритон-X100 и 5% раствор бычьего сывороточного альбумина (БСА), используемого для закрытия неспецифических антигенных детерминант. После этапа пермеабиллизации срезы обрабатывались растворами первичных антител, с которыми инкубировались при комнатной температуре в течение 24 часов. Используемые для исследования антитела представлены в таблице 2.

Таблица 2. Перечень первичных антител.

| Реактивность | Характеристика антител | Разведение | Производитель |
|------------------------|------------------------|------------|-------------------------|
| Церамид | Мышиные IgG | 1 : 300 | Enzo Life Sciences, США |
| Кавеолин-3 | Кроличьи IgG | 1 : 300 | Abcam, Великобритания |
| β-дистрогликан | Кроличьи IgG | 1 : 200 | Abcam, Великобритания |
| Дистрофин | Кроличьи IgG | 1 : 300 | Abcam, Великобритания |
| γ-актин | Мышиные IgG | 1 : 200 | Abcam, Великобритания |
| "Быстрые" изоформы ТЦМ | Кроличьи IgG | 1 : 300 | Abcam, Великобритания |

После суточной инкубации с первичными антителами срезы мышц вновь троекратно промывались ЗФР и обрабатывались растворами вторичных антител, ассоциированных с флуоресцентной меткой, и инкубировались в течение ночи при 4 °С. Используемые для иммунофлуоресцентного окрашивания вторичные антитела представлены в таблице 3.

Таблица 3. Перечень вторичных антител с флуоресцентной меткой.

| Реактивность | Характеристика антител | Флуоресцентная метка | Разведение | Производитель |
|---------------|------------------------|----------------------|------------|-----------------------|
| Анти-кроличьи | Козьи IgG | Alexa Fluor 488 | 1 : 300 | Abcam, Великобритания |
| Анти-мышинные | Козьи IgG | Alexa Fluor 647 | 1 : 300 | Abcam, Великобритания |

Получаемую иммунофлуоресценцию от использованных меток регистрировали при помощи микроскопа Nikon Eclipse E200, оснащенного тринокулярным тубусом и цифровой RGB камерой высокого разрешения Nikon серии DS-FI3 с матрицей CMOS, диапазоном светочувствительности от ISO 50 до ISO 3200, а также с EF-2E эпифлуоресцентной насадкой, где в качестве источника света использовался центрированный волоконный осветитель C-FLED2 в комбинации с двумя дихроичными зеркалами DM 500 BA 534/55 и DM 660 BA 700/75, создающими оптическую ось падающей флуоресценции, и набором кубов-фильтров EX 470/40 и EX 620/60 для возбуждения меток Alexa Fluor 488 и 647 соответственно. Весь получаемый аналоговый сигнал преобразовывался программным обеспечением NIS-Elements D (Nikon Instruments Inc., Japan).

Экспрессию церамида, кавеолина-3, β -дистрогликана, дистрофина и γ -актина оценивали на основании плотности флуоресцентного сигнала,

полученного от связавшихся с ними комплексов антител. На снимках иммуногистохимически окрашенных поперечных срезов плотность флуоресценции замерялась в соответствующих сарколеммальному компартменту краевых областях мышечных волокон и рассчитывалась как средняя плотность пикселей измеряемого цветового канала, преобразованная в условные единицы программным обеспечением Image-Pro Plus 6.0 (Media Cybernetics, США).

2.2.2. Исследование колокализации кавеолина-3 и церамида в мембране мышечных волокон

Для определения совместной локализации кавеолина-3 и церамида в сарколемме мышечных волокон нами была выполнена программная деконволюция общей саркоплазматической флуоресценции из парно меченных поперечных срезов *m. soleus* с помощью программы ImageJ. Затем 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. Кроме того, программа Image Pro Insight (Media Cybernetics, США) использовалась для создания линейных профилей флуоресценции иммуноокрашенных белков в продольных срезах мышц с целью оценки их совместной локализации путем визуализации перекрытия изображений.

Анализ интенсивности флуоресценции производили в относительных единицах (о.е.) с применением программного пакета Image Pro.

2.3. Исследование экспрессии белков дистрофин-ассоциированного гликопротеидного комплекса методом иммуноблоттинга

Для оценки сарколеммальных уровней белка из предварительно замороженных *m. soleus* нами была выделена сарколеммальная фракция посредством дифференциального центрифугирования в градиенте сахарозы. Мышечный материал был отделен от соединительной ткани и гомогенизирован с помощью погружного гомогенизатора Polytron двумя 10-секундными циклами в среде, содержащей RIPA-буфер, фенилметилсульфонил фторид (PMSF), ортованадат натрия, коктейль ингибиторов протеаз (Santa Cruz Biotechnology, США). Полученный мышечный гомогенат растворяли в буферной системе (20 мМ Трис, 100мМ KCl, pH 7,0) и центрифугировали при 12000g в течение 20 мин при 4 °С. После центрифугирования собирали супернатант, к которому добавляли нагрузочный раствор 0,6М KCl и инкубировали в течение 1 часа. После инкубации образцы центрифугировали при 140000 g в течение 40 минут при 4 °С. Полученный супернатант собирали и суспендировали в буферной системе (20мМ Трис, 250мМ сахароза) и переносили в сахарозные градиенты 23%, 26%, 29%, 35%, после чего вновь центрифугировали 40 минут при 140000 g. Осажденные мембраны из каждой фракции собирали отдельно и суспендировали в 500 мкл первоначальной буферной системы, после чего хранились при -20°C.

Для количественной оценки белков-мишеней был использован метод иммуноблоттинга. Первоначально после дифференциального центрифугирования в полученных образцах был выровнен уровень белка на основании его концентрации, рассчитанной спектрофотометрическим методом Бредфорда. После этого к 20 мкл каждого исследуемого образца был добавлен равный объем буфера Лэммли (0,125М Трис-HCl pH=6,8, 10% β-меркаптоэтанол, 20% глицерин, 4% SDS (додецилсульфат натрия), 0,004% бромфеноловый синий), затем образцы были подвергнуты кипячению при 95°C в течение 5 минут. Разделение белков проводили с помощью электрофореза в градиентном (4-11%) SDS-полиакриламидном геле (SDS-

PAGE) 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). Контроль переноса проводили посредством окраски Ponceau S. Полученные нитроцеллюлозные мембраны инкубировали с первичными антителами (табл. 2) в разведении 1:1000 в течение 12 часов при 4°C. Вторичные антивидовые антитела с пероксидазной меткой (козы IgG, Abcam, Великобритания) применяли в разведении 1:500, нитроцеллюлозные мембраны инкубировали с ними в течение 1 часа при 37°C. 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 для анализируемого образца принимали за 1, а интенсивность окрашивания других полос на этой мембране выражали отношением к минимальной интенсивности.

2.4. Оценка фенотипа мышечных волокон

Для выявления изменений фенотипа 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. Данные были рассчитаны морфометрическими инструментами Image-Pro Plus 6.0 (Media Cybernetics, США) и были представлены как число волокон, экспрессирующих «быстрые» формы миозина в поле зрения, равном 3 мм².

Полимеразную цепную реакцию в реальном времени применяли для количественной оценки экспрессии генов, кодирующих различные изоформы тяжелых цепей миозина. Для ПЦР анализа тотальную РНК выделяли из 10 мг замороженного образца мышцы с использованием набора РНК-экстрактов (Синтол, Россия). Выделение проводили согласно инструкции

Для исследования мышечной атрофии использовались снимки флуоресценции, полученной от антител, связавшихся с кавеолином-3. Кавеолин-3 был выбран как мембрано-специфический маркер сарколеммы. На основании геометрии детектируемого свечения для оценки изменения диаметра мышечных волокон был использован расчет диаметра Ферета, как характерного показателя формы неправильной окружности. На каждом снимке флуоресцентного сигнала выбирались по 5 произвольных участков, на которых проводилось по 10 измерений наибольшего расстояния между краями сарколеммы каждого отдельного волокна. Расчет диаметров Ферета проводился с помощью морфометрических инструментов программного обеспечения Image-Pro Plus 6.0 и Image Pro Insight (Media Cybernetics, США).

2.6. Методы статистического анализа

Статистическая обработка результатов произведена методом вариационной статистики с использованием стандартного пакета программ Microsoft Excel и SPSS Statistica (версия 6). Для оценки достоверности результатов в зависимости от характера распределения использовались непараметрические методы (критерии Краскелла-Уоллиса, Манна-Уитни, коэффициент пространственной корреляции Пирсона), различия считались достоверными при $p < 0,05$. Данные иммунофлуоресценции и иммуноэкспрессии представлены в виде медианы, значений Q1 и Q3; разница между группами представлена в процентах. Результаты ПЦР-РТ, анализа экспрессии быстрых изоформ ТЦМ и морфометрии мышечных волокон представлены в виде средних значений, выраженных в процентном отношении к значениям контрольной группы.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1. Результаты иммунофлуоресцентных исследований церамида, кавеолина-3 и компонентов дистрофин-гликопротеидного комплекса на поперечных срезах *m. soleus* крыс, подвергнутых 12-часовой и 14-дневной функциональной разгрузке

3.1.1. Изменения иммунофлуоресценции церамида

На поперечных срезах *m. soleus* крыс была проведена оценка яркости флуоресценции и распределения флуоресцентных меток, связавшихся с церамидом, комплексов первичных и вторичных антител. В контрольной группе иммуноэкспрессия церамида была представлена ярким флуоресцентным сигналом, преимущественно сарколеммальной области. По периметру сарколеммы данный сигнал имел неоднородный характер, наблюдались также участки более яркого свечения. Данные участки ассоциировались с диффузно рассеянной флуоресценцией, детектируемой в прилежащих к сарколемме областях саркоплазмы.

Функциональная разгрузка в течение 12 часов приводила к достоверному усилению яркости флуоресценции связанных с церамидом комплексов антител на 16% относительно контрольных значений: при этом детектируемая яркость в условных единицах составила 32,0 [29,3; 38,5] при 27,5 [21,5; 32,2] усл. ед. в контроле ($p < 0,05$). У животных, которые перед вывешиванием получали ингибитор кислой сфингомиелиназы, было отмечено достоверное изменение интенсивности флуоресценции не только по сравнению с АОВ, но и по сравнению с контролем: так, относительно контрольных значений флуоресценция снижалась до 12,1 [11,0; 14,3] усл. ед. ($p < 0,05$), или на 56% (Рис. 2,3).

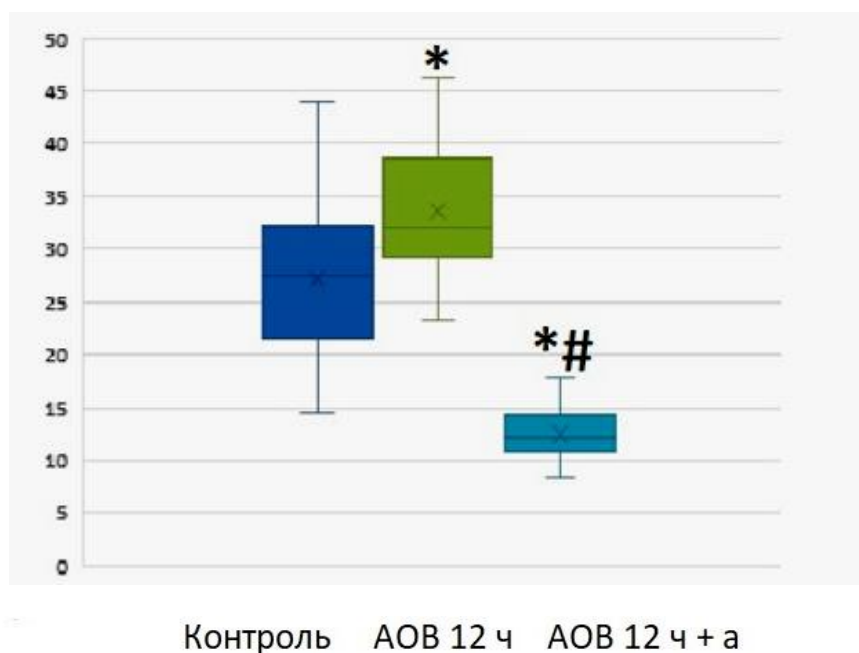


Рис. 2. Значения иммунофлуоресценции церамида при функциональной разгрузке (усл. ед.) в течение 12 часов (АОВ 12ч) и при функциональной разгрузке с предварительным введением ингибитора кислой сфингомиелиназы (АОВ 12ч + а), * – $p < 0,05$ в сравнении с контролем; # – $p < 0,05$ в сравнении с антиортостатическим вывешиванием.

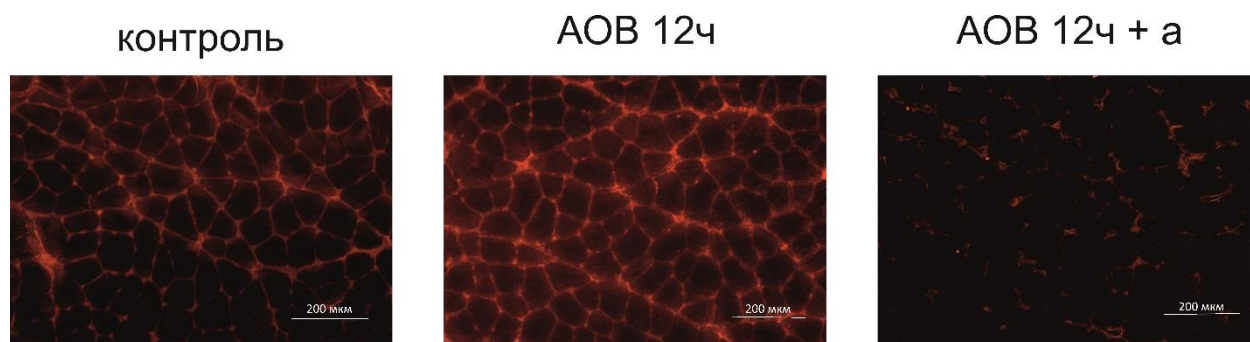


Рис. 3. Иммунофлуоресценция церамида при функциональной разгрузке в течение 12 часов (АОВ 12ч) и при функциональной разгрузке с предварительным введением ингибитора кислой сфингомиелиназы (АОВ 12ч + а).

Подобное усиление яркости флуоресценции связанных с церамидом комплексов антител также наблюдалось и при более продолжительной 14-дневной функциональной разгрузке. Относительно контрольных значений 27,5 [21,5; 32,2] усл. ед. детектируемая яркость возросла на 61,0% и составила 44,3 [38,6; 50,8] усл. ед. ($p < 0,05$). Предварительное введение ингибитора кислой сфингомиелиназы вывешенным в течение данного срока животным характеризовалось сходной с острым экспериментом тенденцией к

снижению яркости флуоресценции. Детектируемый флуоресцентный сигнал достоверно снижался на 31,7% и составил 18,8 [16,2; 23,5] усл. ед. ($p < 0,05$) (Рис. 4, 5).

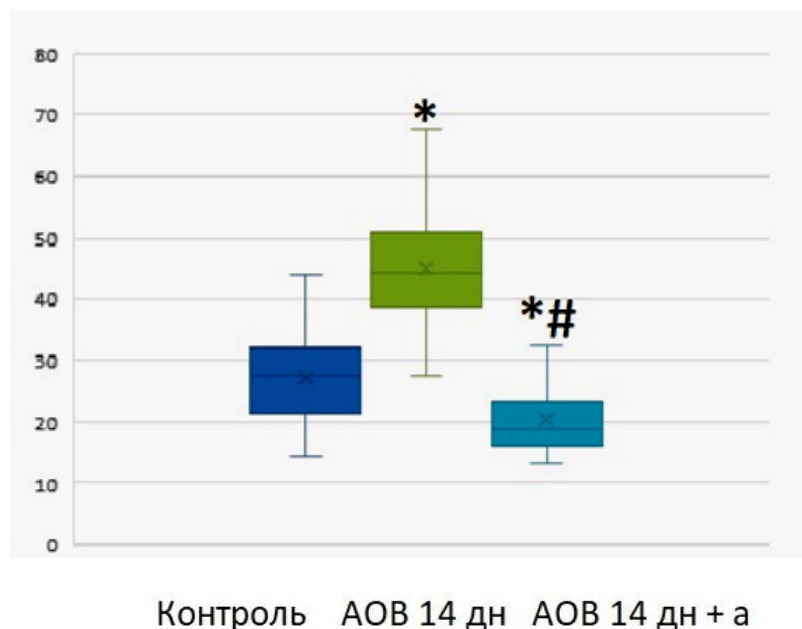


Рис. 4. Значения иммунофлуоресценции церамида при функциональной (усл. ед.) разгрузке в течение 14 дней (АОВ 14дн) и при функциональной разгрузке на фоне введения ингибитора кислой сфингомиелиназы (АОВ 14дн + а), * – $p < 0,05$ в сравнении с контролем; # – $p < 0,05$ в сравнении с АОВ.

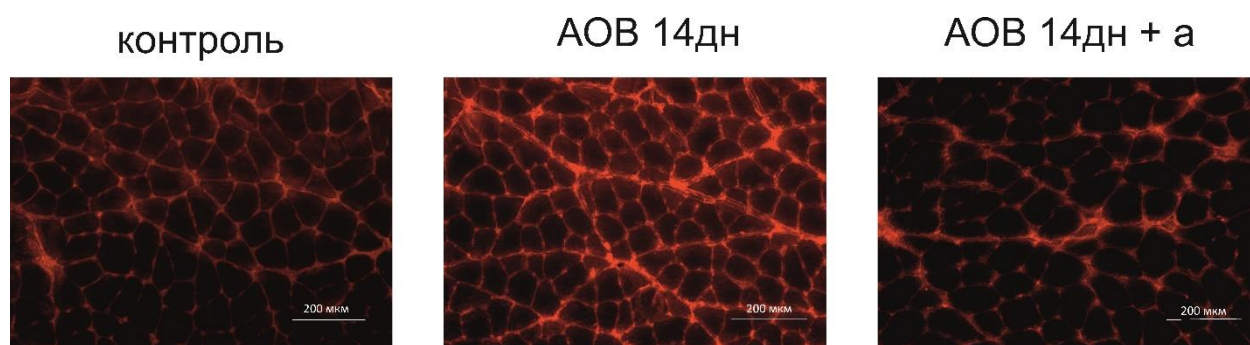


Рис. 5. Иммунофлуоресценция церамида при функциональной разгрузке в течение 14 дней (АОВ 14дн) и при функциональной разгрузке на фоне введения ингибитора кислой сфингомиелиназы (АОВ 14дн + а).

Распределение связанных с керамидом комплексов антител в мышечных волокнах на обоих сроках функциональной разгрузки имело тот же характер, что и в контрольной группе, т.е. локализовался преимущественно в области сарколеммы.

Полученные результаты соответствуют ранее проведенным исследованиям, характеризующим роль активации кислой сфингомиелиназы как основной причины повышенной генерации керамида в сарколемме мышечных волокон при функциональной разгрузке.

3.1.2. Изменения иммунофлуоресценции кавеолина-3

Кавеолин-3 на поперечных срезах *m. soleus* крыс контрольной группы был представлен равномерным по яркости четко локализованным в сарколеммальной области флуоресцентным сигналом (Рис. 6, 7).

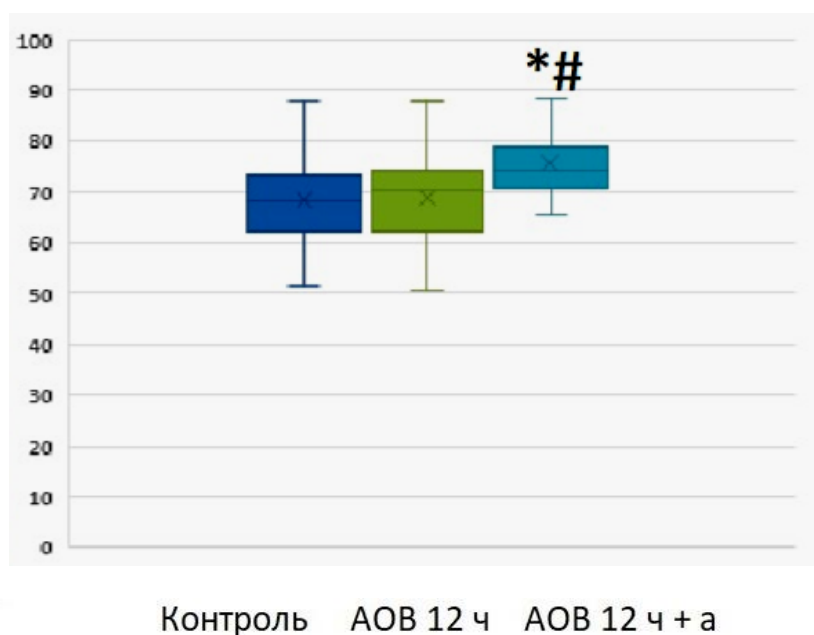


Рис. 6. Значения иммунофлуоресценции кавеолина-3 при функциональной разгрузке (усл. ед.) в течение 12 часов (АОВ 12ч) и при функциональной разгрузке с предварительным введением ингибитора кислой сфингомиелиназы (АОВ 12ч + а), * – $p < 0,05$ в сравнении с контролем; # – $p < 0,05$ в сравнении с АОВ.

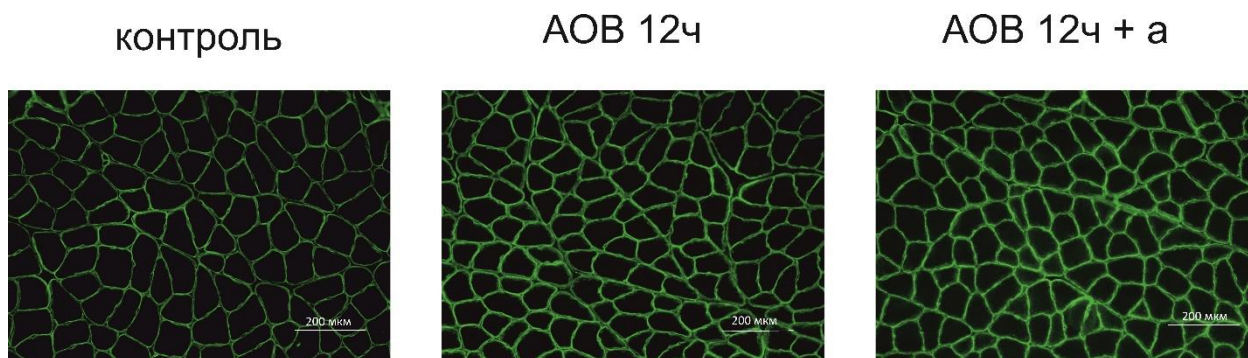


Рис. 7. Иммунофлуоресценция кавеолина-3 при функциональной разгрузке в течение 12 часов (АОВ 12ч) и при функциональной разгрузке с предварительным введением ингибитора кислой сфингомиелиназы (АОВ 12ч + а).

Функциональная разгрузка в течение 12 часов не приводила достоверным изменениям яркости флуоресценции по сравнению с контрольными значениями, однако в группе животных, предварительно получавших ингибитор кислой сфингомиелиназы, наблюдался достоверный рост детектируемой флуоресценции на 13,2% относительно контрольной группы, составив 74,3 [70,9; 78,7] усл. ед. ($p < 0,05$) (Рис. 6, 7).

Более яркая картина в изменении флуоресцентного сигнала наблюдалась в группе с 14-дневной функциональной разгрузкой. Яркость флуоресценции связанных с кавеолином-3 комплексов антител достоверно повышалась на 64,7%, составив 112,0 [100,8; 123,1] усл. ед. ($p < 0,05$) относительно контрольных значений - 68,0 [62,4; 73,4] усл. ед.. Введение животным ингибитора кислой сфингомиелиназы способствовало частичному предотвращению эффектов 14-дневной функциональной разгрузки: яркость флуоресцентного сигнала была на достоверно более низком уровне, чем у животных, не получавших ингибитор кислой сфингомиелиназы ($p < 0,05$), но при этом оставалась несколько выше контрольных значений и составила 88,9 [82,7; 94,7] усл. ед. ($p < 0,05$) (Рис. 8, 9).

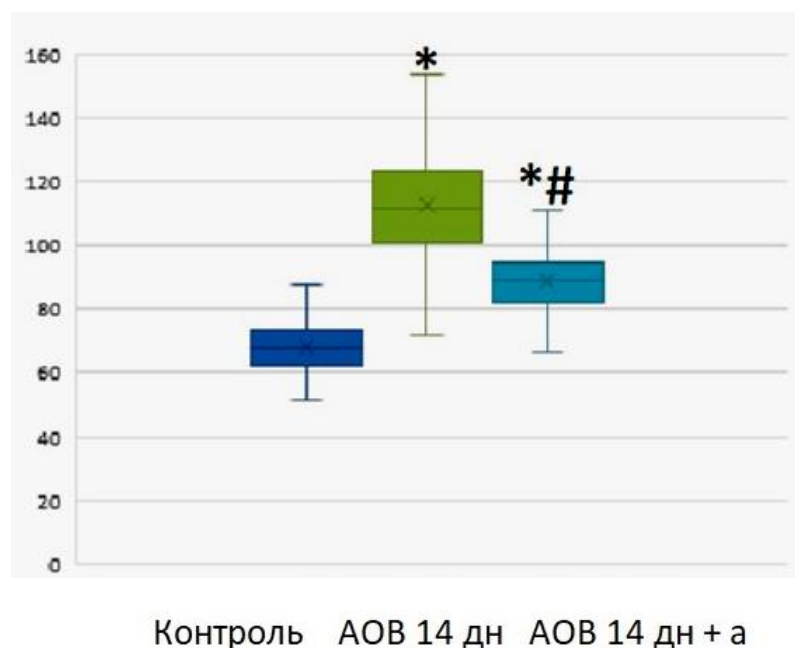


Рис. 8. Значения иммунофлуоресценции кавеоллина-3 при функциональной разгрузке (усл. ед.) в течение 14 дней (АОВ 14дн) и при функциональной разгрузке на фоне введения ингибитора кислой сфингомиелиназы (АОВ 14дн + а), * – $p < 0,05$ в сравнении с контролем; # – $p < 0,05$ в сравнении с АОВ.

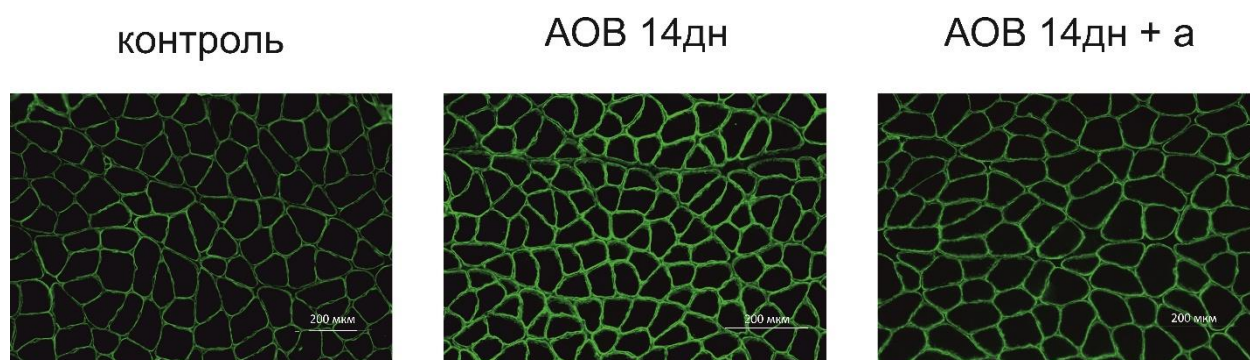


Рис. 9. Иммунофлуоресценция кавеоллина-3 при функциональной разгрузке в течение 14 дней (АОВ 14дн) и при функциональной разгрузке на фоне введения ингибитора кислой сфингомиелиназы (АОВ 14дн + а).

3.1.3. Анализ колокализации и линейного распределения церамида и кавеоллина-3 в сарколемме волокон *m. soleus*

При 14-дневной функциональной разгрузке наблюдалось неравномерное сарколеммальное распределение иммунофлуоресцентного сигнала от связанных с кавеолином-3 комплексов антител. По периметру

сарколеммы отдельных волокон были отмечены участки с более высоким и более низким уровнем яркости.

Анализ одновременного иммуномечения церамида и кавеолина-3 и их пространственного распределения показал чувствительность обоих исследуемых компонентов сарколеммы к длительной функциональной разгрузке и действию ингибитора кислой сфингомиелиназы (Рис.10).

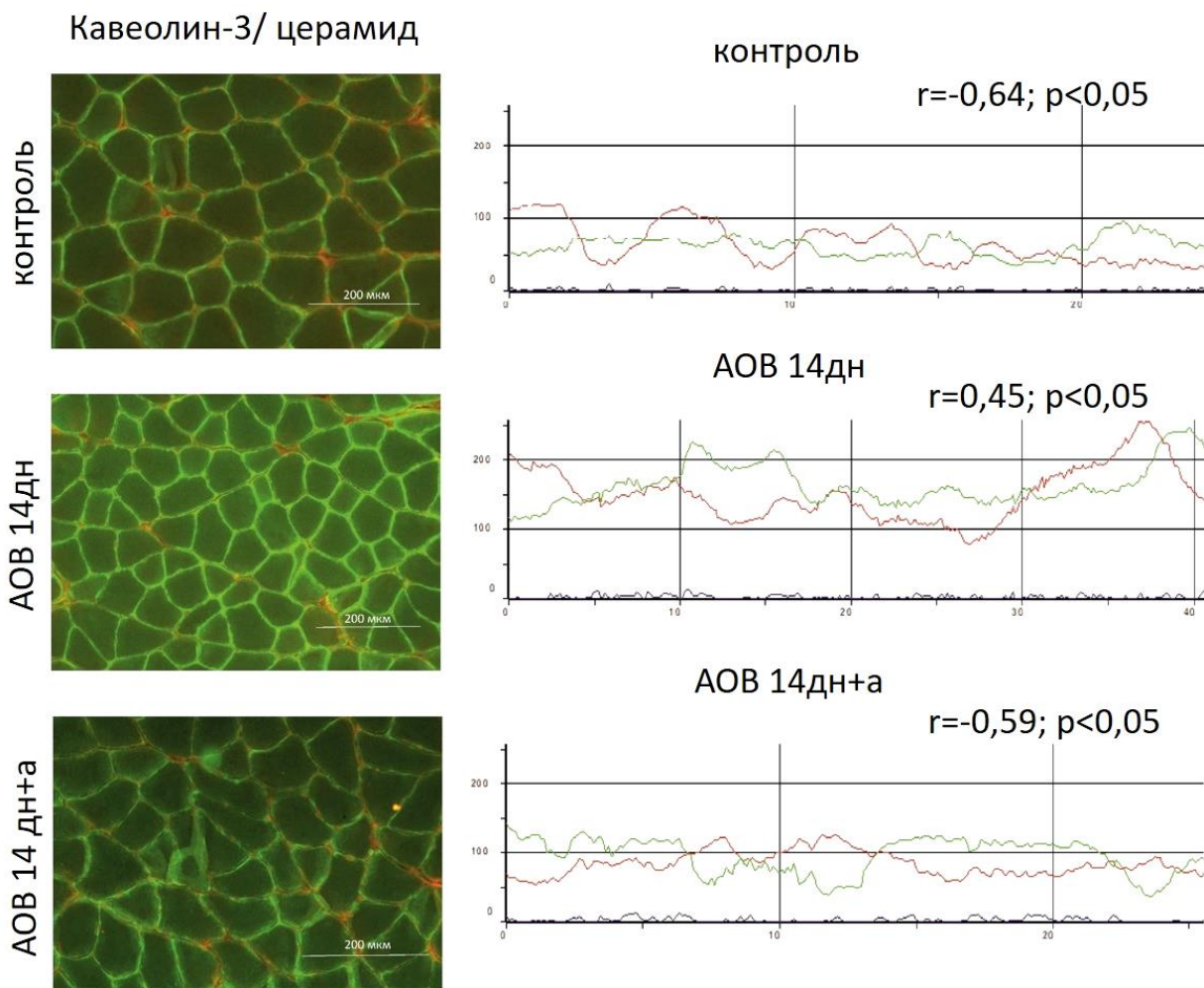


Рис. 10. Иммунофлуоресценция кавеолина-3 и церамида при параллельном иммуномечении. Линейные профили пространственного распределения светимости кавеолина-3 (зеленый) и церамида (красный) при функциональной разгрузке в течение 14 дней (АОВ 14дн) и при функциональной разгрузке на фоне введения ингибитора кислой сфингомиелиназы (АОВ 14дн + а).

Так, на поперечных срезах мышечных волокон животных, подвергшихся 14-ти дневной функциональной разгрузке, на равных участках сарколеммальных областей была выявлена положительная взаимосвязь в

пространственном распределении иммуноокрашенного церамида и кавеолина-3 ($r=0,45$; $p<0,05$), тогда как в мышечных волокнах контрольной группы взаимное распределение было охарактеризовано средней по силе отрицательной связью ($r=-0,64$; $p<0,05$). Введение ингибитора кислой сфингомиелиназы при 14-дневной функциональной разгрузке характеризовалось восстановлением отрицательной взаимосвязи в распределении кавеолина-3 и церамида ($r=-0,59$; $p<0,05$) в мышечных волокнах *m. soleus* крыс

Полученные результаты характеризуют процесс сарколеммального распределения кавеолина-3 как зависимый от изменения уровня церамида в области сарколеммы.

3.1.4. Изменение иммунофлуоресценции сарколеммального β -дистрогликана

На поперечных срезах *m. soleus* контрольной группы крыс трансмембранный компонент дистрофин-ассоциированного гликопротеидного комплекса β -дистрогликан был представлен достаточно ярким, но неоднородным флуоресцентным сигналом. В сарколеммальной области флуоресценция имела характер прерывистого слоя с равномерными участками усиления и ослабления яркости. В области саркоплазмы также был детектирован иммунофлуоресцентный сигнал, имеющий диффузный характер.

Функциональная разгрузка в течение 12 часов привела к достоверному увеличению яркости детектируемой флуоресценции связанных с β -дистрогликаном комплексов антител на 30,9% и составила 76,5 [70,5; 82,1] усл. ед. ($p<0,05$) при 58,4 [52,2; 62,8] усл. ед. в контроле. У группы животных, перед функциональной разгрузкой получавших ингибитор кислой сфингомиелиназы, наблюдалось достоверное предотвращение повышения

яркости сигнала от β -дистрогликана, составив 66,6 [61,4; 72,2] усл. ед. ($p < 0,05$), хотя повышение относительно значений контрольной группы сохранялось (на 14,1%, $p < 0,05$) (Рис. 11,12).

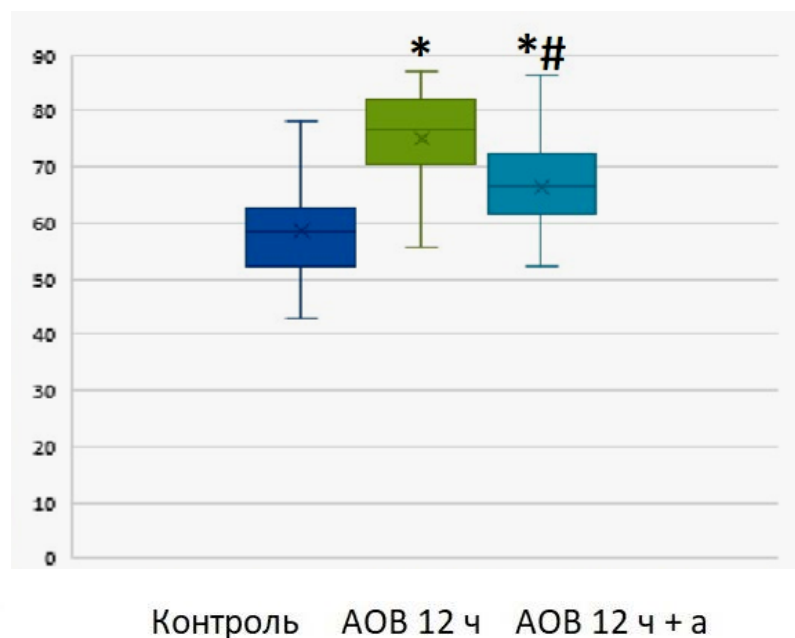


Рис. 11. Значения иммунофлуоресценции β -дистрогликана при функциональной разгрузке (усл. ед.) в течение 12 часов (АОВ 12ч) и при функциональной разгрузке с предварительным введением ингибитора кислой сфингомиелиназы (АОВ 12ч + а), * – $p < 0,05$ в сравнении с контролем; # – $p < 0,05$ в сравнении с АОВ.

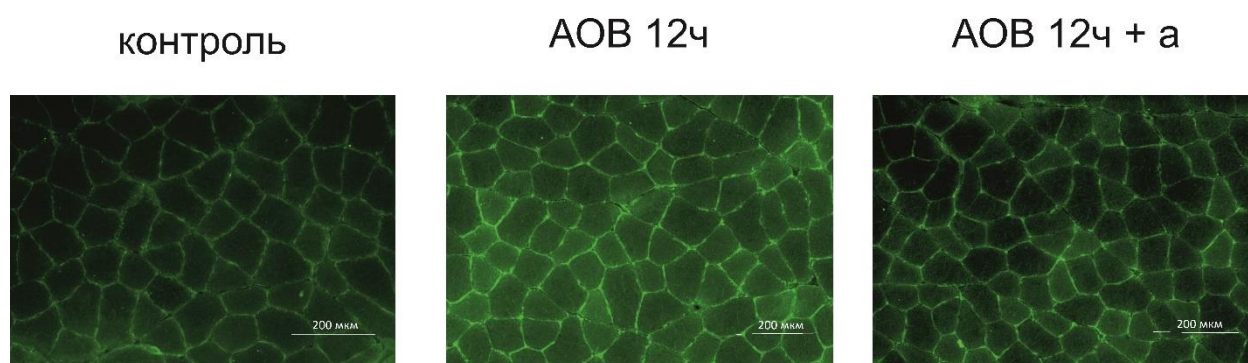


Рис. 12. Иммунофлуоресценция β -дистрогликана при функциональной разгрузке в течение 12 часов (АОВ 12ч) и при функциональной разгрузке с предварительным введением ингибитора кислой сфингомиелиназы (АОВ 12ч + а).

Функциональная разгрузка в течение 14 дней имела ряд противоположных острому эксперименту изменений в интенсивности флуоресцентного сигнала (Рис. 13, 14).

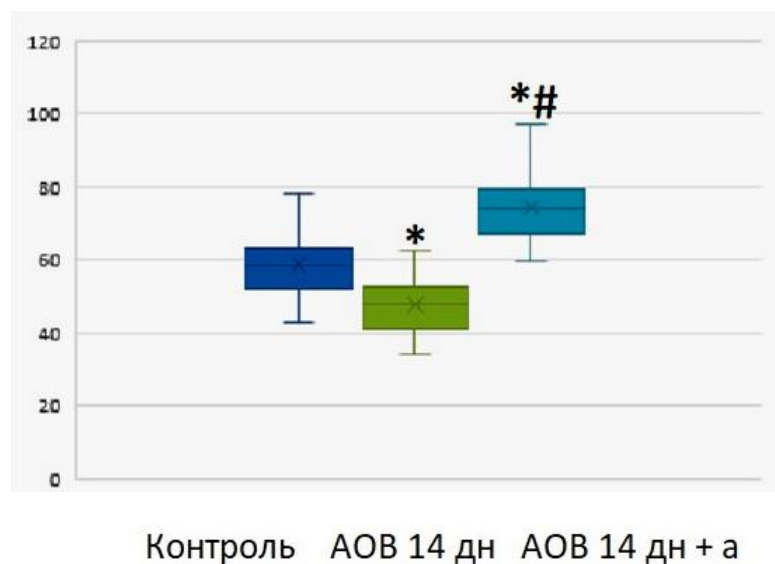


Рис. 13. Значения иммунофлуоресценции β -дистрогликана при функциональной разгрузке (усл. ед.) в течение 14 дней (АОВ 14дн) и при функциональной разгрузке на фоне введения ингибитора кислой сфингомиелиназы (АОВ 14дн + а), * – $p < 0,05$ в сравнении с контролем; # – $p < 0,05$ в сравнении с АОВ.

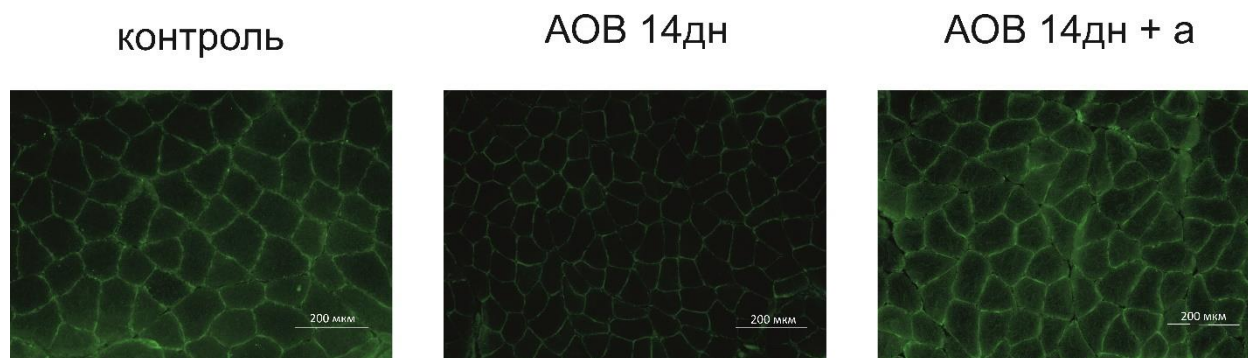


Рис. 14. Иммунофлуоресценция β -дистрогликана при функциональной разгрузке в течение 14 дней (АОВ 14дн) и при функциональной разгрузке на фоне введения ингибитора кислой сфингомиелиназы (АОВ 14дн + а).

Так, детектируемая яркость флуоресценции связанных с β -дистрогликаном комплексов антител достоверно снижалась на 18%, составив 47,9 [41,1; 52,3] усл. ед. ($p < 0,05$). Применение ингибитора кислой сфингомиелиназы предотвращало вызванные функциональной разгрузкой эффекты, при этом прирост яркости иммунофлуоресценции достоверно

превышал значения группы 14-ти дневной функциональной разгрузки и группы контроля на 44,4% и 26,4% соответственно, и составил 73,8 [67,0; 79,2] усл. ед. ($p < 0,05$) (Рис. 13, 14).

Полученные результаты характеризуют изменения иммунофлуоресценции β -дистрогликана как зависимые от динамики сфинголипидов сарколеммы, меняющихся в ходе функциональной разгрузки и на фоне применения ингибитора кислой сфингомиелиназы.

3.1.5. Изменения иммунофлуоресценции субсарколеммального дистрофина

Иммунофлуоресценция дистрофинового слоя на поперечных срезах *m. soleus* крыс контрольной группы была представлена слабым диффузным саркоплазматическим сигналом и, напротив, ярким равномерно распределенным сигналом, локализующимся преимущественно в сарколеммальной области.

Функциональная разгрузка в течение 12-ти часов характеризовалась достоверным снижением яркости иммунофлуоресценции связанных с дистрофином комплексов антител. Флуоресцентный сигнал снижался на 60,7%, составив 75,9 [67,2; 81,9] усл. ед. ($p < 0,05$) относительно контрольных значений 125,1 [111,7; 134,7] усл. ед.. Предварительное введение животным ингибитора кислой сфингомиелиназы достоверно частично нивелировало эффект функциональной разгрузки. Яркость иммунофлуоресценции оставалась достоверно ниже контрольных значений 101,4 [95,4; 109,5] усл. ед. ($p < 0,05$), но была значительно выше, чем значения группы без предварительного введения ингибитора кислой сфингомиелиназы ($p < 0,05$) (Рис 15,16).

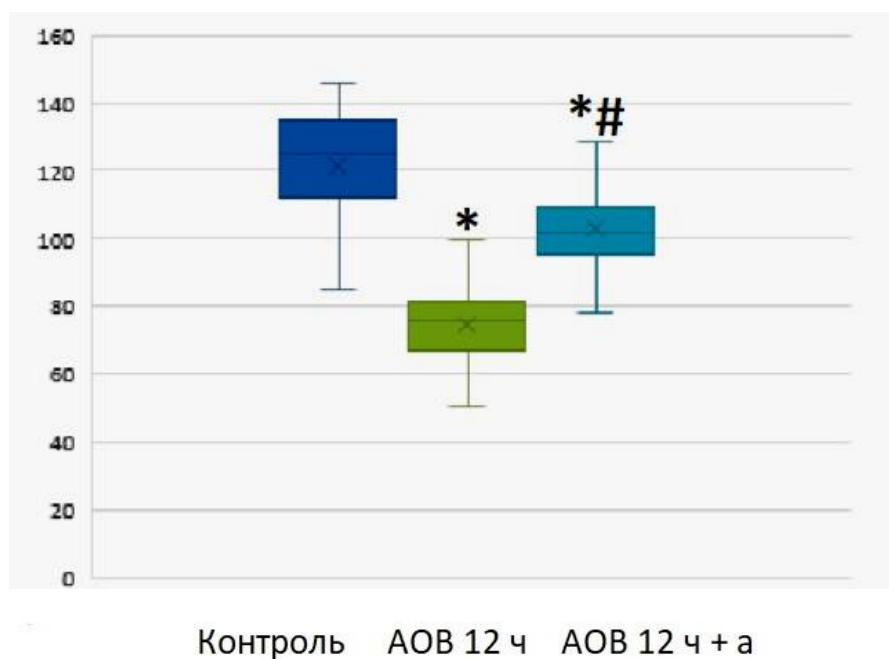


Рис. 15. Значения иммунофлуоресценции дистрофина при функциональной разгрузке (усл. ед.) в течение 12 часов (АОВ 12ч) и при функциональной разгрузке с предварительным введением ингибитора кислой сфингомиелиназы (АОВ 12ч + а), * – $p < 0,05$ в сравнении с контролем; # – $p < 0,05$ в сравнении с АОВ.

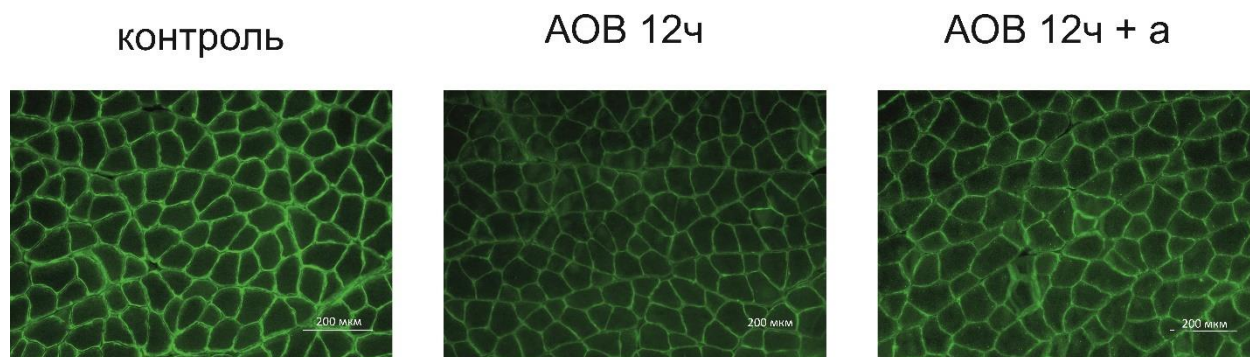


Рис. 16. Иммунофлуоресценция дистрофина при функциональной разгрузке в течение 12 часов (АОВ 12ч) и при функциональной разгрузке с предварительным введением ингибитора кислой сфингомиелиназы (АОВ 12ч+а).

При 14-дневной функциональной разгрузке наблюдалась сходная динамика изменений иммунофлуоресценции дистрофина. Яркость сигнала от связанных с дистрофином комплексов антител составляла 74,6 [69,3; 83,2] усл. ед. ($p < 0,05$) снижалась на 59,6% относительно значений группы контроля 125,1 [111,7; 134,7] усл. ед. (Рис. 17, 18).

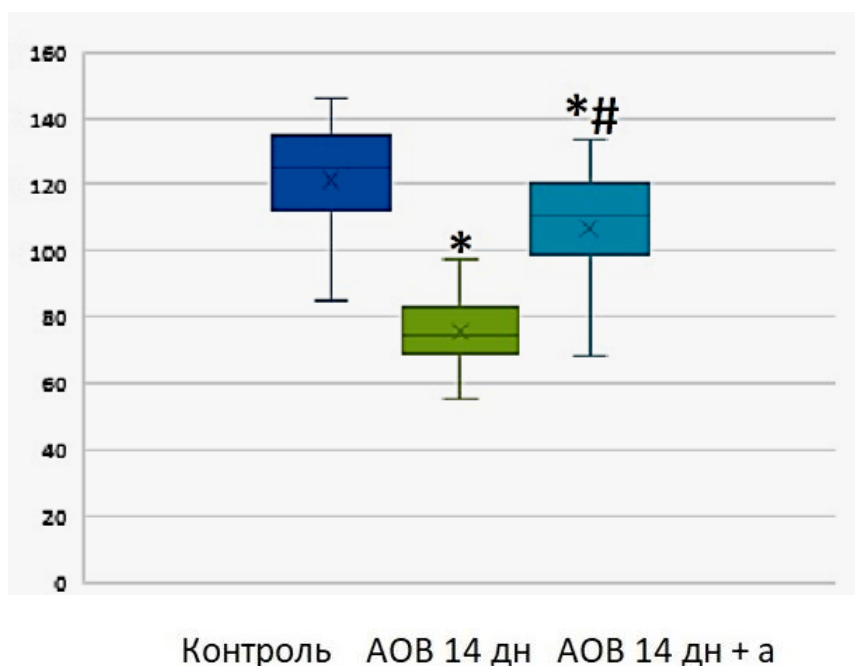


Рис. 17. Значения иммунофлуоресценции дистрофина при функциональной разгрузке (усл. ед.) в течение 14 дней (АОВ 14дн) и при функциональной разгрузке на фоне введения ингибитора кислой сфингомиелиназы (АОВ 14дн + а), * – $p < 0,05$ в сравнении с контролем; # – $p < 0,05$ в сравнении с АОВ.

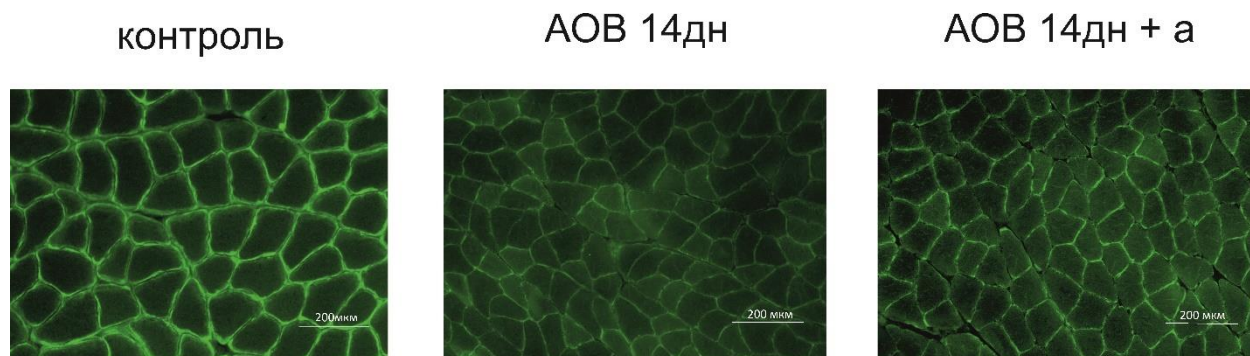


Рис. 18. Иммунофлуоресценция дистрофина при функциональной разгрузке в течение 14 дней (АОВ 14дн) и при функциональной разгрузке с предварительным введением ингибитора кислой сфингомиелиназы (АОВ 14дн + а).

Группа, получавшая ингибитор кислой сфингомиелиназы перед функциональной разгрузкой, так же как и в остром эксперименте, показала достоверно меньшее снижение иммунофлуоресценции дистрофина в *m. soleus* - 110,7 [98,9; 120,1] усл. ед., или только 11,5% относительно

контрольной группы ($p < 0,05$), что было также достоверно выше значений группы с вывешиванием без ингибитора ($p < 0,05$) (Рис. 17, 18).

Интересно, что значительных изменений в структуре сарколеммального распределения дистрофина при функциональной разгрузке, ранее описанных другими авторами, не наблюдалось. Однако достоверное предотвращение снижения иммуноэкспрессии на фоне применения ингибитора кислой сфингомиелиназы может свидетельствовать о влиянии целостности сфинголипидного компонента сарколеммы на плотность дистрофинового слоя.

3.1.6. Изменения иммунофлуоресценции γ -актина

На поперечных срезах *m.soleus* контрольной группы крыс иммунофлуоресценция γ -актина была представлена четким, равномерно распределенным сигналом, локализованным в области сарколеммы. Функциональная разгрузка в течение 12 часов приводила к достоверному повышению яркости флуоресценции связанных с γ -актином комплексов антител. Иммунофлуоресцентный сигнал повышался – с 27,8 [18,9; 30,4] усл. ед. в контроле до 40,3 [34,1; 48,7] усл. ед., или на 45,1% ($p < 0,05$) (Рис. 19, 20).

Предварительное введение животным ингибитора кислой сфингомиелиназы перед вывешиванием достоверно снижало прирост иммунофлуоресценции γ -актина по сравнению с группой вывешивания, в которой ингибитор не применялся – данный показатель был равен 29,2 [19,1; 33,2] усл. ед. ($p < 0,05$). Флуоресцентный сигнал также показал сохранение небольшого прироста (на 5,0%, $p < 0,05$) относительно контрольных значений.

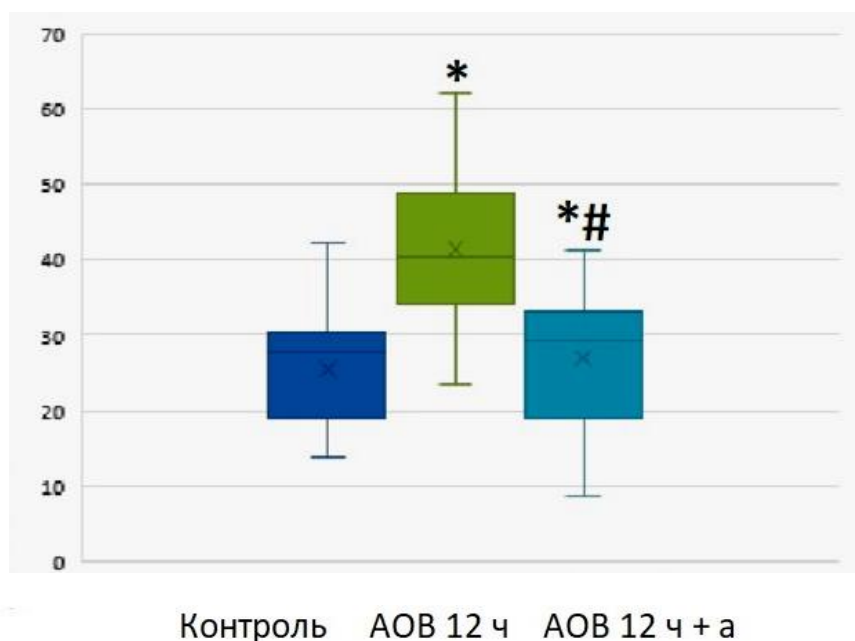


Рис. 19. Значения иммунофлуоресценции γ -актина при функциональной разгрузке (усл. ед.) в течение 12 часов (АОВ 12ч) и при функциональной разгрузке с предварительным введением ингибитора кислой сфингомиелиназы (АОВ 12ч + а), * – $p < 0,05$ в сравнении с контролем; # – $p < 0,05$ в сравнении с антиортостатическим вывешиванием.

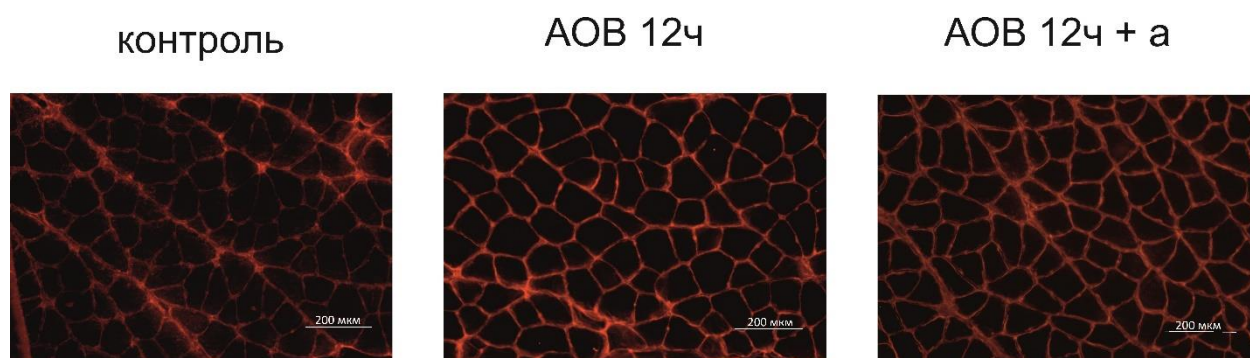


Рис. 20. Иммунофлуоресценция γ -актина при функциональной разгрузке в течение 12 часов (АОВ 12ч) и при функциональной разгрузке с предварительным введением ингибитора кислой сфингомиелиназы (АОВ 12ч + а).

При 14-дневной функциональной разгрузке наблюдалось сходное с острым экспериментом изменение яркости флуоресцентного сигнала от комплекса антител, связанных с γ -актином. Прирост яркости относительно группы контроля составил 111,8%, до 58,9 [50,9; 66,9] усл. ед. ($p < 0,05$). При длительной функциональной разгрузке применение ингибитора кислой

сфингомиелиназы снижало иммунофлуоресценцию γ -актина на 56,9% по сравнению с АОВ, составив при этом 43,6 [32,7; 48,3] усл. ед. ($p < 0,05$) (Рис. 21, 22).

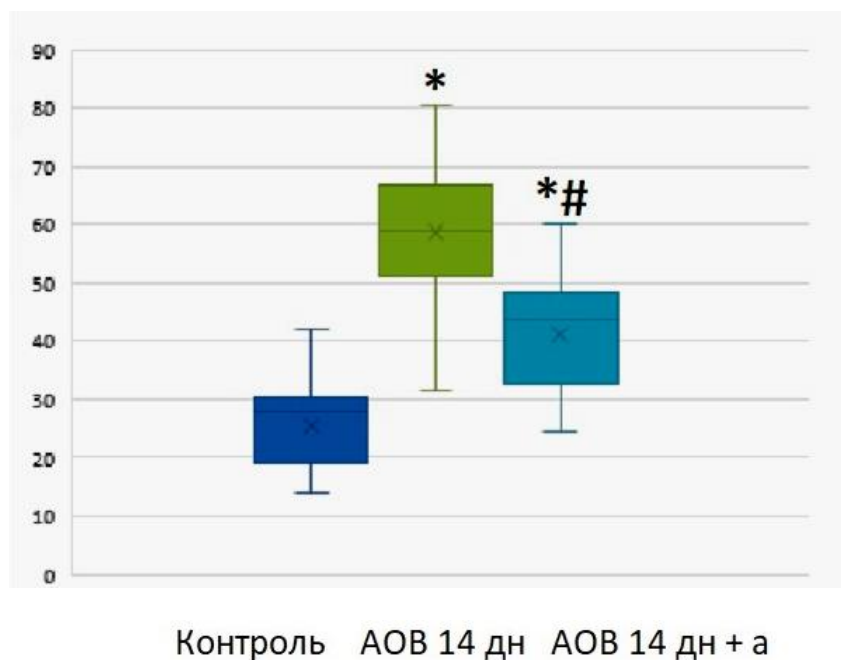


Рис. 21. Значения иммунофлуоресценции γ -актина при функциональной разгрузке (усл. ед.) в течение 14 дней (АОВ 14дн) и при функциональной разгрузке на фоне введения ингибитора кислой сфингомиелиназы (АОВ 14дн + а), * – $p < 0,05$ в сравнении с контролем; # – $p < 0,05$ в сравнении с АОВ.

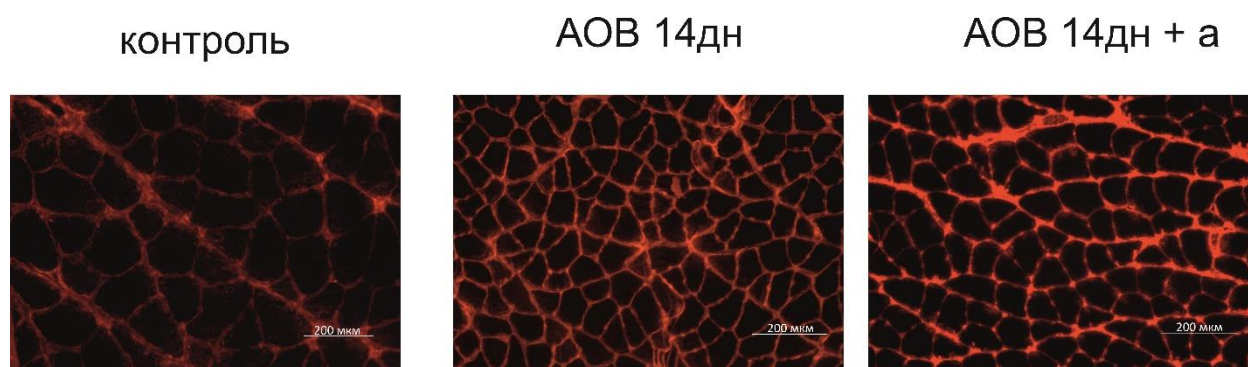


Рис. 22. Иммунофлуоресценция γ -актина при функциональной разгрузке в течение 14 дней (АОВ 14дн) и при функциональной разгрузке с предварительным введением ингибитора кислой сфингомиелиназы (АОВ 14дн + а).

Полученные результаты характеризуют влияние качественного изменения состава сфинголипидов сарколеммы при функциональной разгрузке на уровень иммунофлуоресценции γ -актина. Важно отметить, что

применение ингибитора кислой сфингомиелиназы, как патогенетического подхода для стабилизации сфинголипидного состава сарколеммы, эффективно в предотвращении прироста γ -актина как на ранних этапах функциональной разгрузки, так и при более длительном воздействии.

3.2. Результаты исследования экспрессии белков в *m. soleus* крыс методом иммуноблоттинга в условиях 12-часовой и 14-дневной функциональной разгрузки

3.2.1. Изменение иммуноэкспрессии кавеолина-3

Динамика и сложность молекулярных кавеолиновых структур, участвующих в построении специфических липидных рафтов, позволяет по-разному трактовать полученные при иммунофлуоресцентных исследованиях результаты. С целью количественной оценки уровня экспрессии кавеолина-3 у крыс после 12-часовой и 14-дневной функциональной разгрузки нами был применен метод иммуноблоттинга. В свою очередь иммуноблоттинг ставился на образцах сырой сарколеммальной фракции *m. soleus*, полученной посредством дифференциального ультрацентрифугирования. Сравнительный анализ иммуноэкспрессии кавеолина-3 контрольной группы и опытных групп после 12-часовой и 14-дневной функциональной разгрузки показал схожие с иммунофлуоресцентным исследованием изменения (Рис. 23).

Функциональная разгрузка в краткосрочном эксперименте не показала достоверной разницы в иммуноэкспрессии кавеолина-3 сарколеммальной фракции, хотя имелась тенденция к его увеличению. Применение ингибитора кислой сфингомиелиназы, в свою очередь, сопровождалось достоверным приростом иммуноэкспрессии на 47,38% ($p < 0,05$), при этом показатель был равен 3,29 [2,78; 3,45] усл. ед. при значении 2,24 [2,17; 2,37] усл. ед. в контроле (Рис. 24).

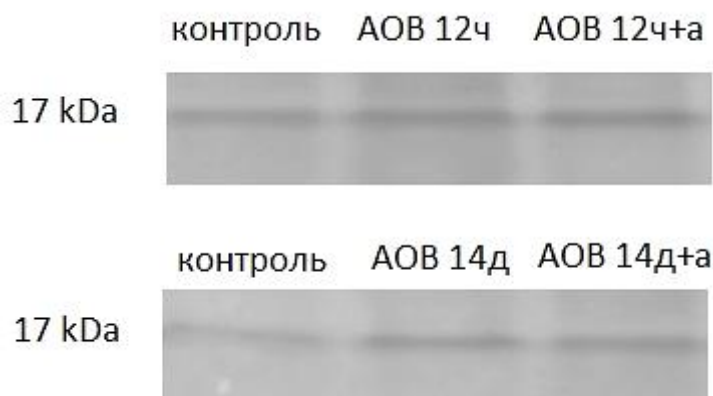


Рис. 23. Иммуноблоттинг кавеоллина-3 при функциональной разгрузке в течение 12 часов (АОВ 12ч) и 14 дней (АОВ 14дн) и при разгрузке с введением ингибитора кислой сфингомиелиназы (АОВ 12ч + а, АОВ 14дн + а).

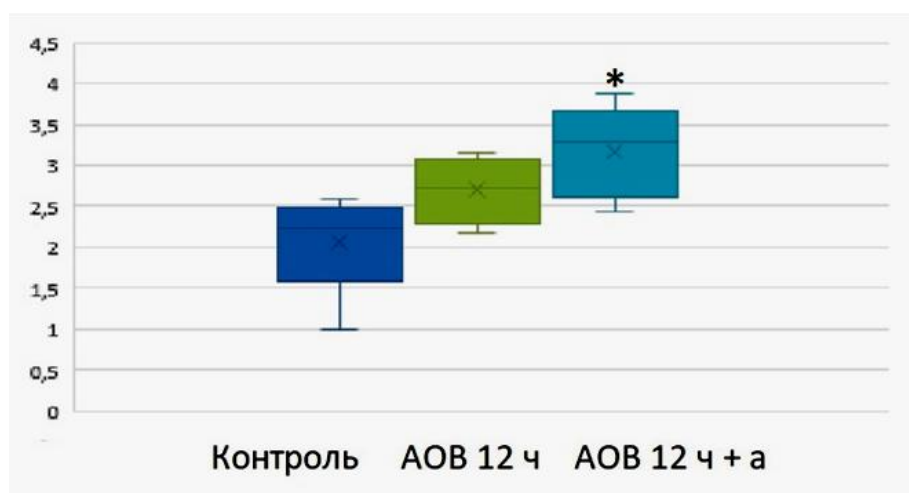


Рис. 24. Значения иммуноэкспрессии кавеоллина-3 при функциональной разгрузке (усл. ед.) в течение 12 часов (АОВ 12ч) и при функциональной разгрузке с предварительным введением ингибитора кислой сфингомиелиназы (АОВ 12ч + а), * – $p < 0,05$ в сравнении с контролем; # – $p < 0,05$ в сравнении с АОВ.

На 14 день функциональной разгрузки картина иммуноэкспрессии кавеоллина-3 также носила сходный с иммунофлуоресценцией характер. При этом обнаружен существенный прирост уровня кавеоллина-3 в сарколеммальной фракции на 66,0% ($p < 0,05$), составив 3,71 [3,1; 4,31] усл. ед. Применение ингибитора кислой сфингомиелиназы достоверно ограничивало

повышение экспрессии кавеолина-3 при АОВ (2,86 [2,72; 3,15] усл. ед., $p < 0,05$), но восстановление показателя до уровня контроля не наблюдалось ($p < 0,05$) (Рис. 25).

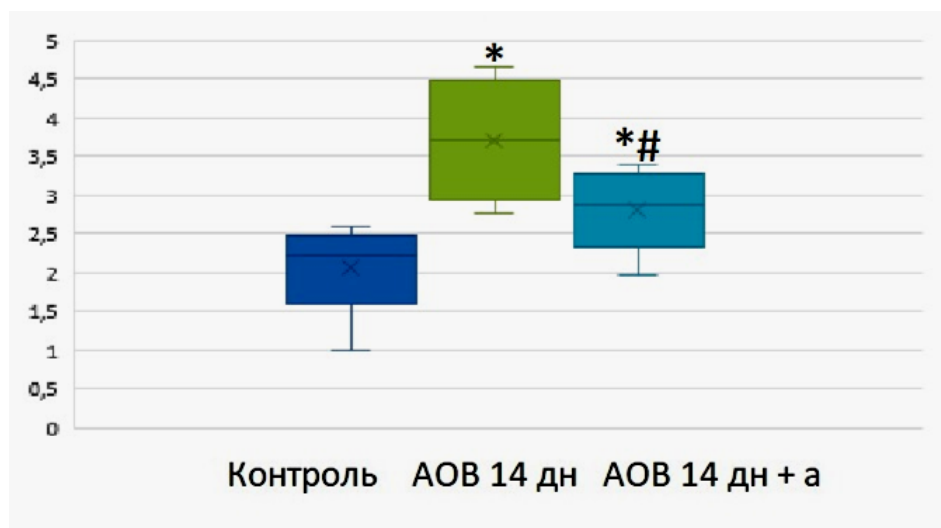


Рис. 25. Значения иммуноэкспрессии кавеолина-3 при функциональной разгрузке (усл. ед.) в течение 14 дней (АОВ 14дн) и при функциональной разгрузке на фоне введения ингибитора кислой сфингомиелиназы (АОВ 14дн + а), * – $p < 0,05$ в сравнении с контролем; # – $p < 0,05$ в сравнении с АОВ.

Сопоставление результатов иммунофлуоресцентного исследования с данными иммуноблоттинга позволяет нам сделать предположение о природе происходящих в сарколемме процессов, связанных с кавеолином-3, при функциональной разгрузке *m. soleus*. Не исключено, что усиление иммунофлуоресценции в сарколеммальном регионе связано с увеличением количества транспортируемых в сарколемму молекул кавеолина-3. При этом применение ингибитора кислой сфингомиелиназы способно, вероятно, снижать активность данного процесса, что может характеризовать прирост уровня иммуноэкспрессии кавеолина-3 при разгрузке как сфинголипид-зависимый процесс.

3.2.2. Изменение иммуноэкспрессии сарколеммального β -дистрогликана

Исследование иммуноэкспрессии β -дистрогликана также проводилось в полученной дифференциальным центрифугированием сырой саркоплазматической фракции. Относительно анализа иммунофлуоресценции, иммуноэкспрессия показала сходные тенденции в изменении уровня белка, но не идентичные (Рис. 26).

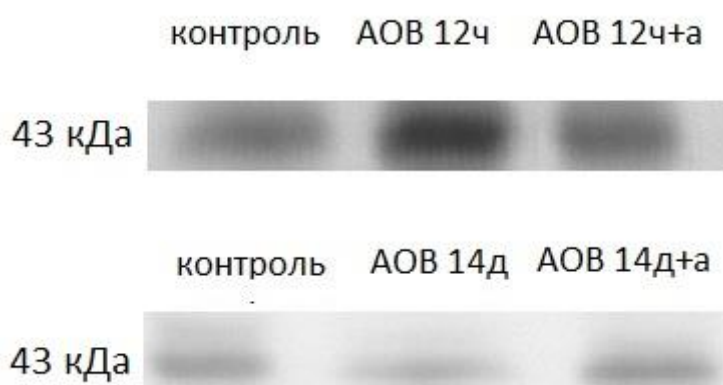


Рис. 26. Иммуноблоттинг β -дистрогликана в группах функциональной разгрузки в течение 12 часов (АОВ 12ч) и 14 дней (АОВ 14дн) и в группах с разгрузкой на фоне введения ингибитора кислой сфингомиелиназы (АОВ 12ч + а, АОВ 14дн + а).

Функциональная разгрузка в течение 12 часов характеризовалась значительным приростом иммуноэкспрессии β -дистрогликана на 494,01% относительно контрольных значений; уровень данного протеина составил 0,44 [0,3; 0,54] усл. ед. при 0,08 [0,01; 0,18] усл. ед. в контроле ($p < 0,05$). Предварительное введение ингибитора кислой сфингомиелиназы на данном сроке функциональной разгрузки уменьшало прирост иммуноэкспрессии β -дистрогликана: его уровень составил 0,4 [0,16; 0,44] усл. ед., при этом прирост был равен 408,18% по отношению к контролю ($p < 0,05$) (Рис. 27).

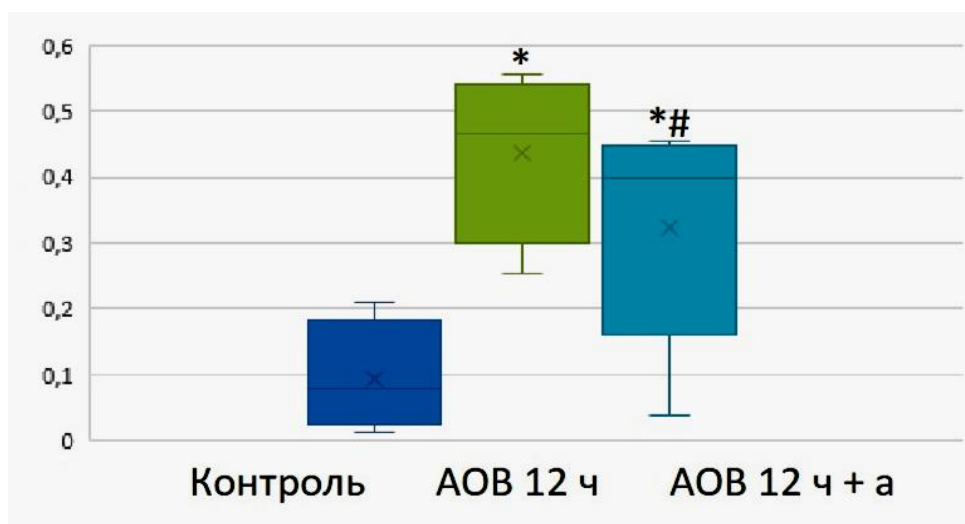


Рис. 27. Значения иммуноэкспрессии β -дистрогликана (усл. ед.) при функциональной разгрузке в течение 12 часов (АОВ 12ч) и при разгрузке с предварительным введением ингибитора кислой сфингомиелиназы (АОВ 12ч + а), * – $p < 0,05$ в сравнении с контролем; # – $p < 0,05$ в сравнении с АОВ.

Функциональная разгрузка в течение 14 дней, напротив, была охарактеризована достоверным снижением иммуноэкспрессии β -дистрогликана, до значений 0,03 [0,01; 0,03] усл. ед. ($p < 0,05$) (Рис. 28).

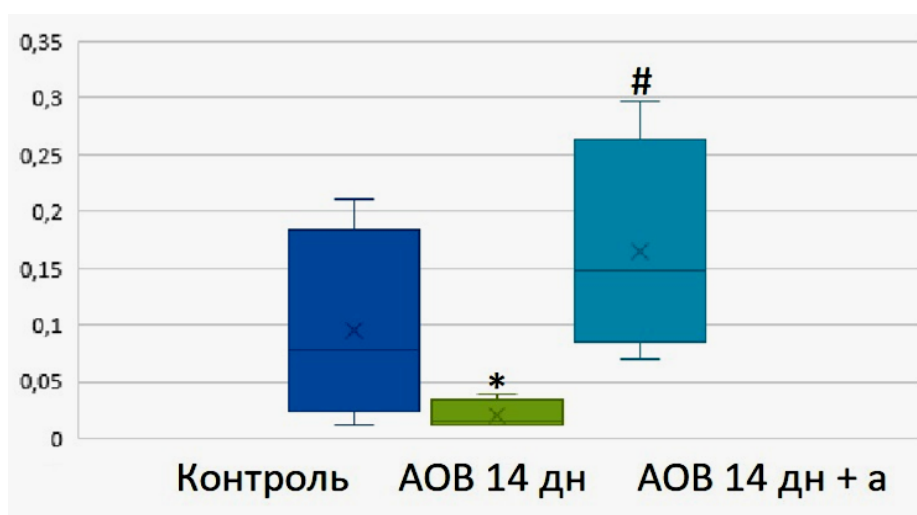


Рис. 28. Значения иммуноэкспрессии β -дистрогликана при функциональной разгрузке (усл. ед.) в течение 14 дней (АОВ 14дн) и при разгрузке на фоне введения ингибитора кислой сфингомиелиназы (АОВ 14дн + а), * – $p < 0,05$ в сравнении с контролем; # – $p < 0,05$ в сравнении с антиортостатическим вывешиванием.

Применение ингибитора кислой сфингомиелиназы достоверно предотвращало снижение уровня иммуноэкспрессии β -дистрогликана, который в данной группе дополнительно имел некоторую, хоть и не достоверную, тенденцию к увеличению относительно контрольной группы (на 48,73%, $p > 0,05$) при значениях 0,12 [0,08; 0,26] усл. ед.

3.2.3. Изменения иммуноэкспрессии субсарколеммального дистрофина

Субсарколеммальный дистрофин также исследовался во фракции сырой сарколеммы. Выбор данной фракции был обусловлен тем, что при ультрацентрифугировании вместе с сарколеммой выделяется ряд субсарколеммальных высокомолекулярных структур, что критически важно для определения дистрофина. Результаты исследования, полученные с помощью иммуноблоттинга, по направленности были такими же, как и результаты иммунофлуоресцентного анализа (Рис. 29).

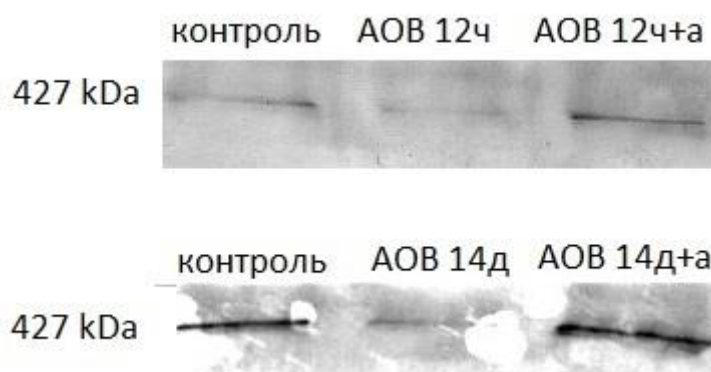


Рис. 29. Иммуноблоттинг дистрофина в группах функциональной разгрузки в течение 12 часов (АОВ 12ч) и 14 дней (АОВ 14дн) и в группах с разгрузкой на фоне введения ингибитора кислой сфингомиелиназы (АОВ 12ч + а, АОВ 14дн + а).

Функциональная разгрузка в течение 12 часов была охарактеризована снижением уровня дистрофина в исследуемой фракции. Относительно значений контроля 1,72 [1,06; 2,31] усл. ед., уровень иммуноэкспрессии

достоверно снижался на 81,82%, составив 0,31 [0,09; 0,96] усл. ед. ($p < 0,05$). Предварительное введение ингибитора кислой сфингомиелиназы достоверно предотвращало данный эффект: снижение показателя в этой экспериментальной группе составило 45,42% ($p < 0,05$), причем достоверных различий по сравнению с контрольными значениями не наблюдалось (Рис. 30).

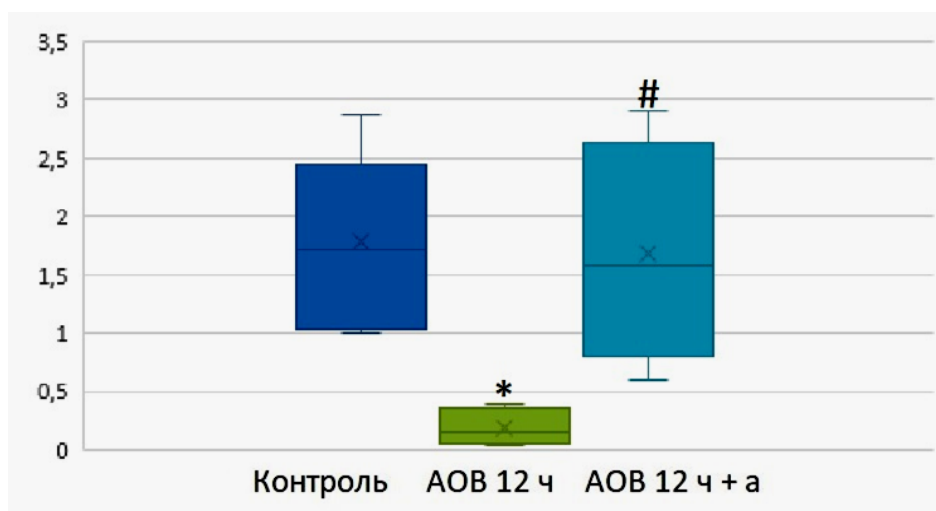


Рис. 30. Значения иммуноэкспрессии дистрофина при функциональной разгрузке (усл. ед.) в течение 12 часов (АОВ 12ч) и при функциональной разгрузке с предварительным введением ингибитора кислой сфингомиелиназы (АОВ 12ч + а), * – $p < 0,05$ в сравнении с контролем; # – $p < 0,05$ в сравнении с АОВ.

Сходная тенденция в динамике иммуноэкспрессии дистрофина наблюдалась и при более длительной 14-дневной функциональной разгрузке. В частности, наблюдалось его достоверное снижение на 75,47% относительно контроля до значений 0,42 [0,24; 1,12] усл. ед. ($p < 0,05$). Так же, как и при кратковременной разгрузке, применение ингибитора кислой сфингомиелиназы в данной серии опытов достоверно предотвращало снижение иммуноэкспрессии дистрофина (Рис. 31).

Полученные результаты подтверждают данные иммунофлуоресцентного анализа. В частности, они демонстрируют, что при

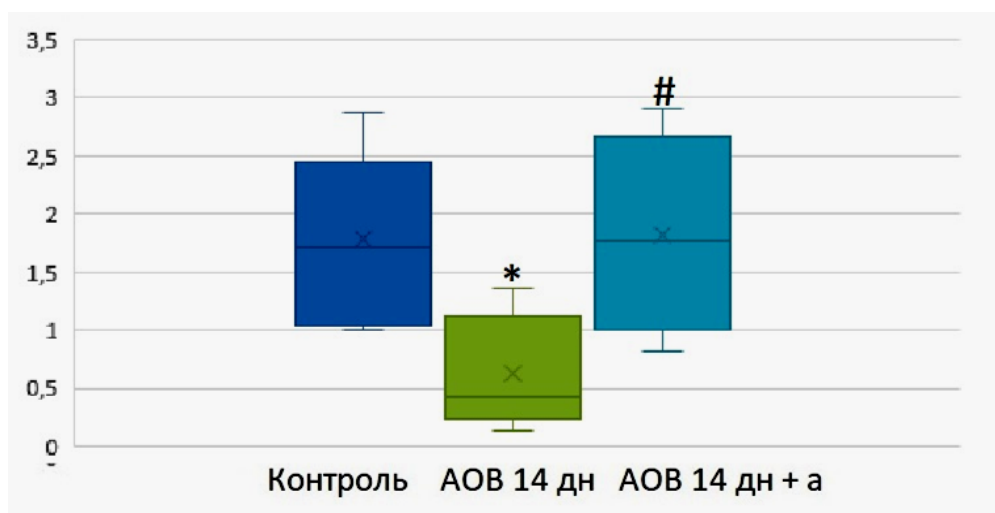


Рис. 31. Значения иммуноэкспрессии дистрофина при функциональной разгрузке (усл. ед.) в течение 14 дней (АОВ 14дн) и при функциональной разгрузке на фоне введения ингибитора кислой сфингомиелиназы (АОВ 14дн + а), * – $p < 0,05$ в сравнении с контролем; # – $p < 0,05$ в сравнении с АОВ.

функциональной разгрузке в субсарколеммальной области уменьшается количество дистрофина, возможно, в результате его делокализации. Однако сохранность сфинголипидного состава сарколеммы, поддерживаемая посредством применения ингибитора кислой сфингомиелиназы, предотвращает этот эффект.

3.2.4. Изменения иммуноэкспрессии субсарколеммального γ -актина

Определение γ -актина также проводилось во фракции сырой сарколеммы. Его динамика носила сходный с иммунофлуоресценцией характер (Рис. 32).

Функциональная разгрузка в течение 12 часов приводила к достоверному приросту уровня иммуноэкспрессии γ -актина до 2,32 [1,38; 3,87] усл. ед., или на 123,41% ($p < 0,05$) относительно контрольных значений. Предварительное введение ингибитора кислой сфингомиелиназы на данном

сроке функциональной разгрузки достоверно предотвращало рост уровня γ -актина, значения которого составили 1,14 [0,64; 1,83] ($p < 0,05$) (Рис. 33).

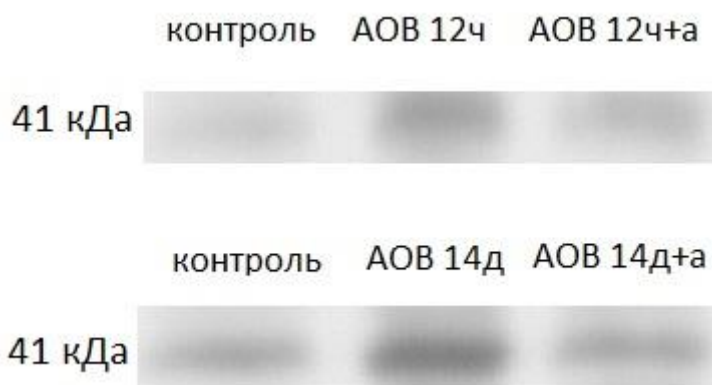


Рис. 32. Иммуноблоттинг γ -актина при функциональной разгрузке в течение 12 часов (АОВ 12ч) и 14 дней (АОВ 14дн) и в группах с введением ингибитора кислой сфингомиелиназы и последующей функциональной разгрузкой 12 часов (АОВ 12ч + а) и 14 дней (АОВ 14дн + а).

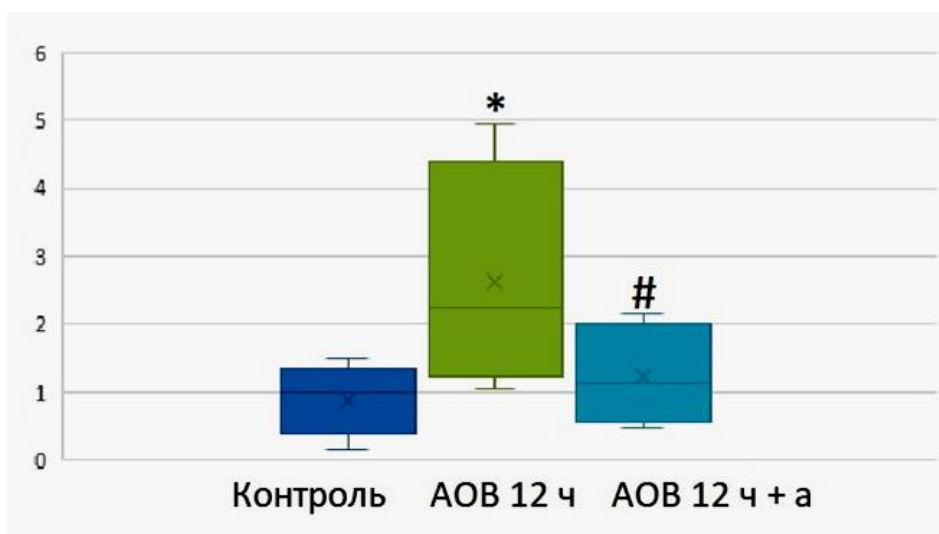


Рис. 33. Значения иммуноэкспрессии γ -актина при функциональной разгрузке (усл. ед.) в течение 12 часов (АОВ 12ч) и при функциональной разгрузке с предварительным введением ингибитора кислой сфингомиелиназы (АОВ 12ч + а), * – $p < 0,05$ в сравнении с контролем; # – $p < 0,05$ в сравнении с АОВ.

При 14-дневной функциональной разгрузке наблюдалось схожее с острым экспериментом изменение иммуноэкспрессии γ -актина. При значениях 1,50 [1,23; 2,1] усл. ед. его прирост составил 50,43% ($p < 0,05$)

относительно группы контроля. Применение ингибитора кислой сфингомиелиназы при 14-дневном АОВ не повлияло на данный показатель, т.к. прирост иммунофлуоресценции γ -актина относительно контроля сохранялся (до 1,29 [0,85; 1,89] усл. ед., $p < 0,05$), достоверных отличий от группы с вывешиванием без ингибитора не выявлено (Рис. 34).

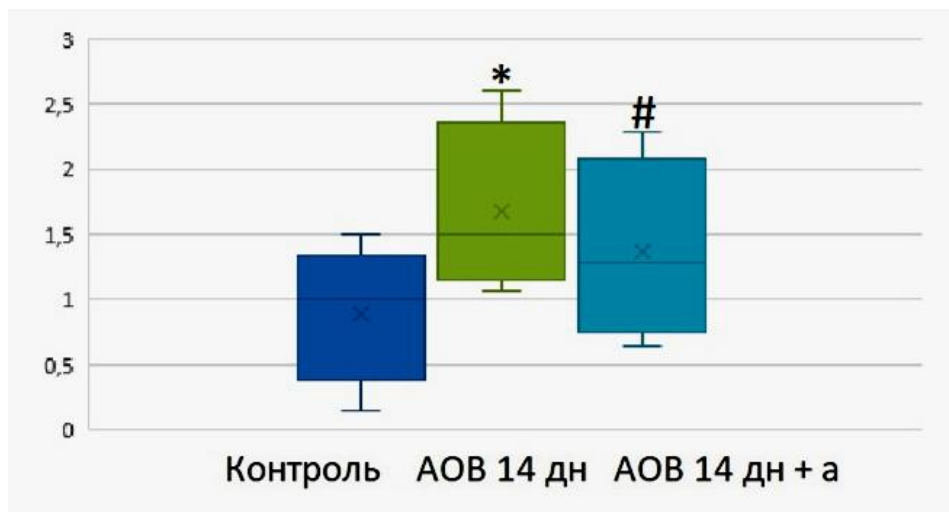


Рис. 34. Значения иммуноэкспрессии γ -актина при функциональной разгрузке (усл. ед.) в течение 14 дней (АОВ 14дн) и при функциональной разгрузке на фоне введения ингибитора кислой сфингомиелиназы (АОВ 14дн + а), * – $p < 0,05$ в сравнении с контролем; # – $p < 0,05$ в сравнении с АОВ.

3.3. Исследование фенотипа мышечных волокон при 14-дневной функциональной разгрузке

С целью оценки особенностей экспрессии различных изоформ тяжелых цепей миозина в контрольной и разгруженной мышце (в том числе на фоне введения ингибитора кислой сфингомиелиназы), применяли ПЦР в реальном времени. Как и следовало ожидать, в мышцах, подвергнутых двухнедельной функциональной разгрузке, ПЦР-анализ выявил изменения экспрессии как “быстрых”, так и “медленных” изоформ ТЦМ (рис. 35). Так, уровень мРНК “медленного” миозина (ТЦМ I β) уменьшился на $99,1 \pm 1,3\%$ ($p < 0,01$), а мРНК одной из быстрых изоформ (ТЦМ IIА) – на $88,0 \pm 3,7\%$ ($p < 0,01$). Введение ингибитора кислой сфингомиелиназы вывешенным животным не повлияло на экспрессию этих изоформ ТЦМ. Экспрессия

других изоформ “быстрого” миозина повышалась (ТЦМ IIВ) или имела тенденцию к повышению (ТЦМ II d/x). Интересно, что у животных, которым вводили ингибитор сфингомиелиназы, экспрессия мРНК данных изоформ восстанавливалась до уровня контроля (ТЦМ IIВ) или становилась достоверно более низкой, чем в контроле (ТЦМ II d/x).

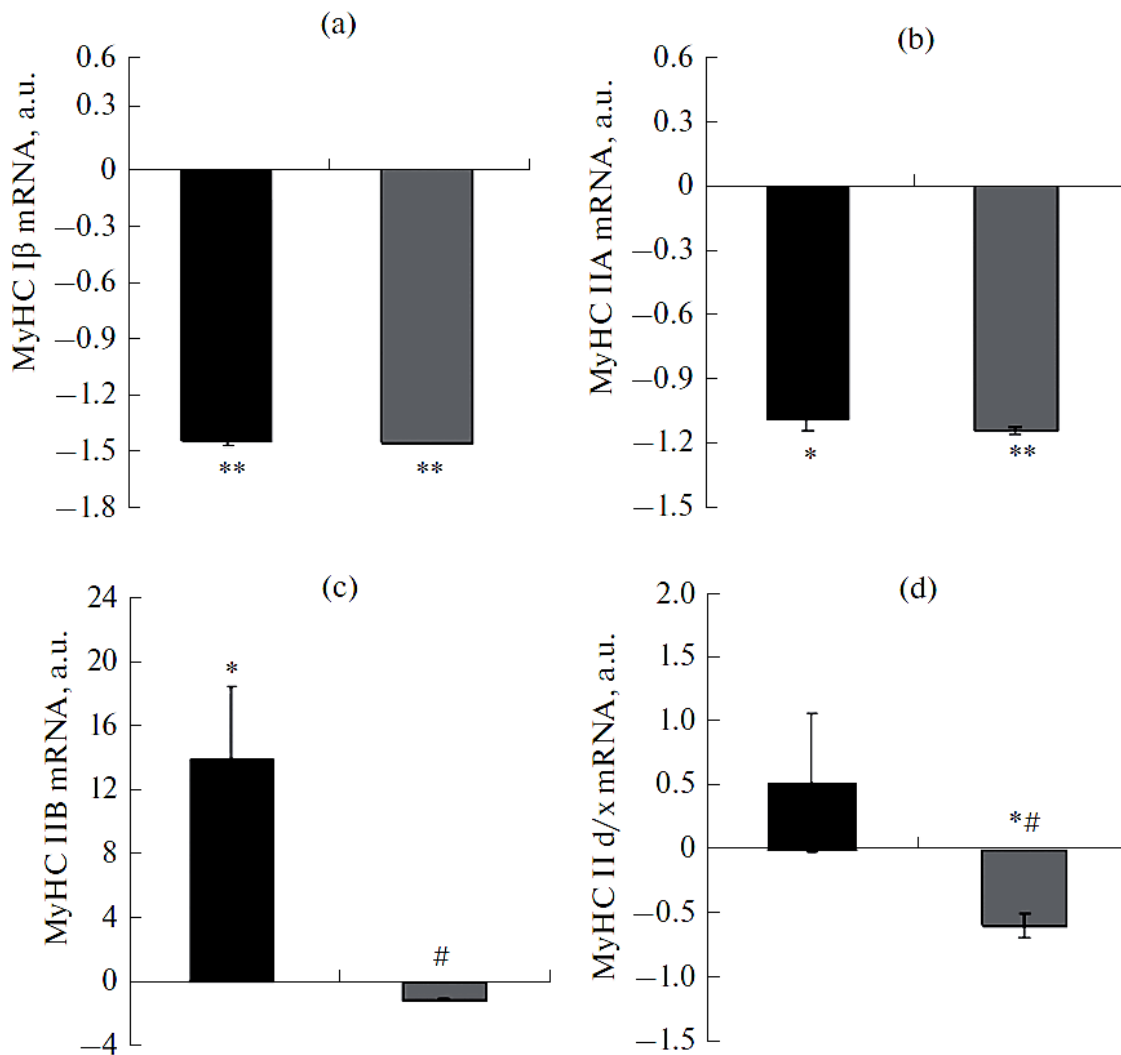


Рис. 35. Экспрессия миозинов “медленного” (а) и “быстрого” (b, c, d) типов в *m. soleus* крыс (усл. ед.) при функциональной разгрузке в течение 14 дней (АОВ 14дн, черные столбики) и при функциональной разгрузке на фоне введением ингибитора кислой сфингомиелиназы (АОВ 14дн + а, серые столбики), * – $p < 0,01$ в сравнении с контролем; # – $p < 0,01$ в сравнении с АОВ, контрольные значения приняты за ноль.

Изучение мышечных волокон, экспрессирующих преимущественно «быстрые» изоформы тяжелых цепей миозина, на поперечных срезах камбаловидных мышц проводилось на 14 день функциональной разгрузки (Рис. 36).

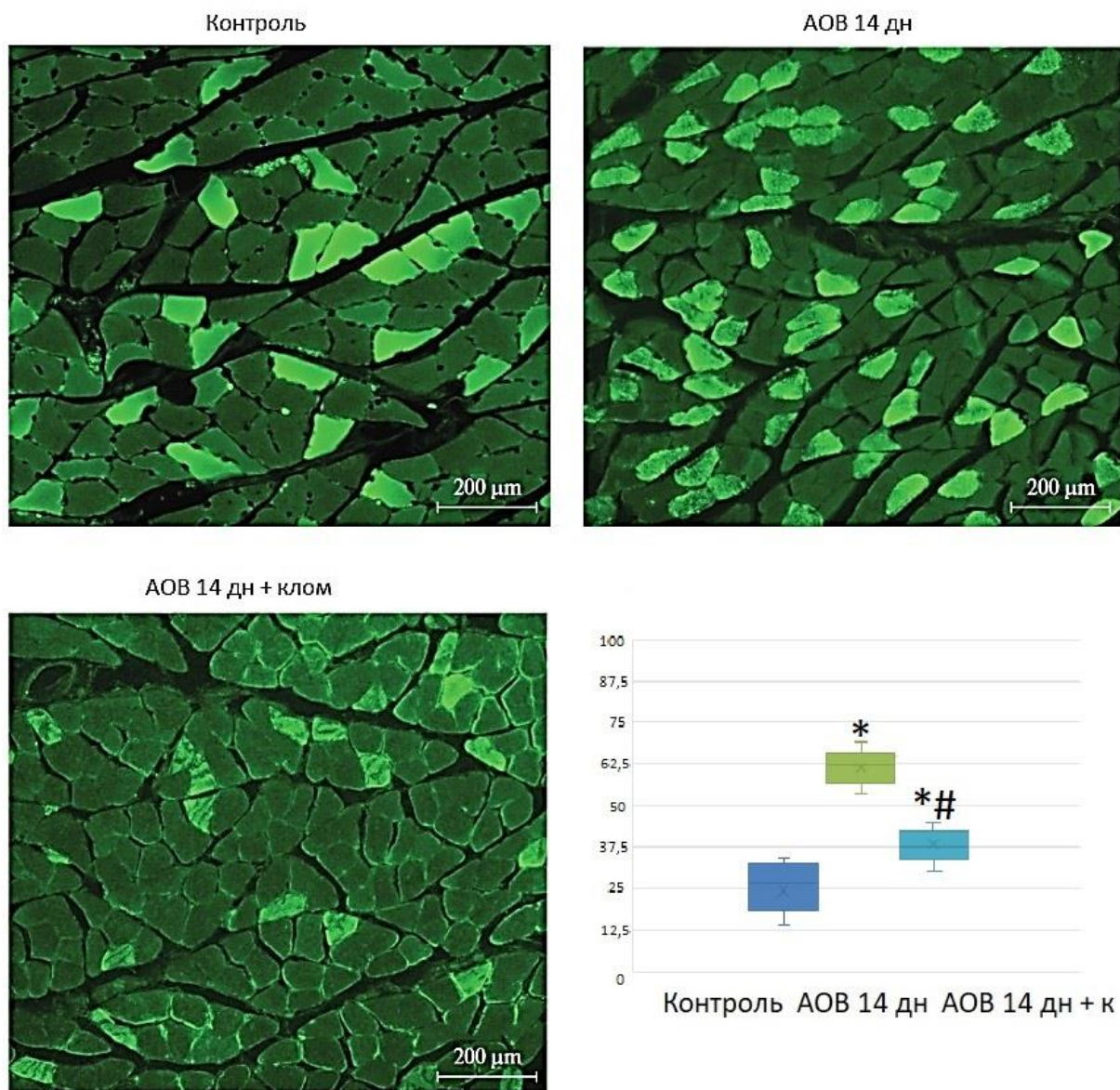


Рис. 36. Иммунофлуоресцентный анализ экспрессии быстрых изоформ тяжелых цепей миозина на поперечных срезах *m. soleus* при 14-дневном вывешивании (АОВ 14дн). * – $p < 0,05$ в сравнении с контролем; # – $p < 0,05$ в сравнении с АОВ без введения ингибитора кислой сфингомиелиназы кломипрамина (АОВ 14дн + клон). Данные представлены как число волокон (n), экспрессирующих «быстрые» изоформы миозина, в поле зрения, равном 3 мм^2 .

Данные волокна в исследуемых образцах определялись по характерной иммунофлуоресценции в пределах саркоплазматического

региона. В группе контроля такие волокна были немногочисленны и составляли $5,69 \pm 1\%$ ($p < 0,001$) от общего числа ($n = 703$) волокон в препарате

В группе, подвергнутой 14-дневной функциональной разгрузке, наблюдалось значительное увеличение количества волокон, экспрессирующих «быстрые» изоформы миозина: их доля составила $19,3 \pm 1\%$ ($p < 0,01$) от общего числа исследованных ($n = 545$); при этом прирост был равен $236 \pm 6\%$ ($p < 0,01$) в сравнении с контролем. В вывешенной на 14 дней группе, получавшей ингибитор кислой сфингомиелиназы, повышенная экспрессия «быстрых» изоформ тяжелых цепей миозина сохранялась, однако прирост по сравнению с контролем был существенно меньшим ($84,4 \pm 6\%$, $p < 0,01$). Доля волокон, экспрессирующих «быстрые» изоформы миозина (относительно общего количества исследованных, $n = 362$), составляла при этом лишь $10,49 \pm 1\%$ ($p < 0,01$).

Данные результаты показывают, что применение ингибитора кислой сфингомиелиназы достоверно предотвращает повышение экспрессия «быстрых» изоформ тяжелых цепей миозина при 14-дневной функциональной разгрузке.

3.4. Оценка атрофии *m. soleus* при функциональной разгрузке

14-дневная функциональная разгрузка сопровождалась потерей массы *m. soleus* крыс на $34,8\%$ ($p < 0,05$) и уменьшением диаметра Ферета мышечных волокон на 49% ($p < 0,05$) (Рис. 37).

Мышцы крыс, которым предварительно вводили ингибитор кислой сфингомиелиназы, были менее атрофичными, чем мышцы крыс, не получавших препарат. В этой группе масса мышц уменьшилась на $25,4\%$ ($p < 0,05$) по сравнению с контрольными величинами. Аналогичным образом изменялся и размер мышечных волокон: диаметра Ферета у особей,

получавших ингибитор, уменьшился на 24,7% ($p < 0,05$) по сравнению с контролем, при этом значения обоих показателей превышали таковые в сравнении с группой, подвергнутой функциональной разгрузке без введения ингибитора кислой сфингомиелиназы.

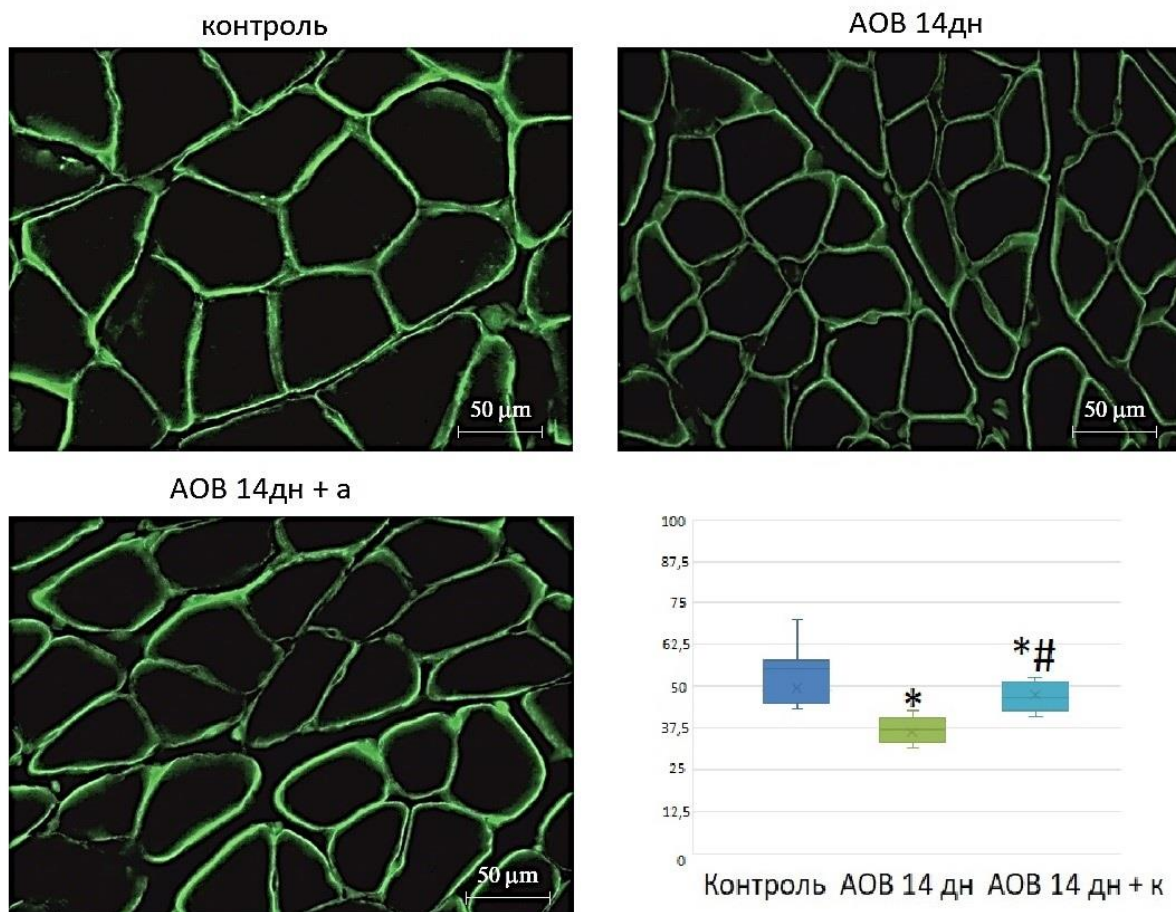


Рис. 37. Влияние ингибитора кислой сфингомиелиназы на диаметр Ферета мышечных волокон *m. soleus* (усл. ед.) в контроле, при функциональной разгрузке в течение 14 дней (АОВ 14дн) и при функциональной разгрузке на фоне введения ингибитора кислой сфингомиелиназы (АОВ 14дн + клон), * – $p < 0,05$ в сравнении с контролем; # – $p < 0,05$ в сравнении с АОВ.

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В данной работе нами было проанализировано изменение субсарколеммального цитоскелета и ряда его компонентов, имеющих непосредственный контакт с билипидным слоем. Взаимодействие сарколеммы и прилежащего к ней цитоскелета может являться одним из ключевых компонентов атрофического сигнального процесса, реализуя не только передачу биохимических сигналов, но также и механотрансдукторную функцию, что критически важно для функциональной разгрузки в условиях сниженной напряженности гравитационного поля. Принимая во внимание непосредственную чувствительность сарколеммального цитоскелета к приложению механической силы [105], мы проанализировали ответ сарколеммальных и субсарколеммальных структур на биохимически-индуцированное изменение липидной композиции сарколеммального слоя.

В нашем исследовании 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.

Далее был проведен анализ белковых структур, непосредственно связанных с сарколеммой через липид-ассоциированные участки. В частности, структура бета-дистрогликана, помимо его вне- и внутриклеточных доменов, имеет трансмембранный домен [63], образованный преимущественно альфа-спиральной конфигурацией неполярных аминокислот, что способствует его интегральной вставке в сарколеммальный бислой, а расположенные по обе стороны билипидного слоя N- и C-концевые участки играют роль якоря [160]. Дистрофин, несмотря на свое доменное устройство, также в экспериментах *in vitro* и *in*

vivo показывал липид-связывающую активность посредством не только хорошо известного цистеин-обогащенного домена, но и за счет групп спектрино-подобных повторов R1-3 и R10-12 [166]. Кавеолин-3 был рассмотрен нами как принципиально важный компонент липид-упорядоченной фазы. 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 [44].

Нами было показано, что функциональная разгрузка в течение 12-ти часов и 14-ти дней ассоциирована с разнонаправленными изменениями в уровнях экспрессии сарколеммального бета-дистрогликана. В частности, мы наблюдали усиление иммунофлуоресценции бета-дистрогликана в сарколеммальной области на раннем этапе функциональной разгрузки и его достоверное снижение на более поздних этапах. Изменения бета-дистрогликана на раннем этапе схожи с таковыми в ранее показанных исследованиях регуляции его пост-транскрипционного трафика, в частности, при активации дисульфидной изомеразы AGR2, осуществляющей гомеостаз эндоплазматического ретикулума и параллельно облегчающей трафик бета-дистрогликана, не влияя на уровень его транскрипции. Данный механизм представляет маловероятную зависимость прироста уровней бета-дистрогликана в зависимости от уровней церамида на раннем сроке функциональной разгрузки, однако интересно, что AGR2-зависимый процесс динамики бета-дистрогликана может быть запущен в виду усиления оксидативного стресса, что в частности было показано в экспериментах Lee et al. (2021) [82].

Несколько более очевидным выглядит возможный процесс снижения уровня бета-дистрогликана в сарколеммальной области и фракции сырой сарколеммы при 14-дневной функциональной разгрузке. В частности, известен механизм ретроградного трафика аутопротеолизированного бета-

дистрогликана с нацеливанием на ядерный компартмент [111], сами же процессы частичного протеолиза могут также быть обусловлены отщеплением как внутриклеточного, так и внеклеточного домена бета-дистрогликана [21, 37].

Изменения уровней иммунофлуоресценции дистрофина имели схожий характер. Уровни дистрофина достоверно снижались на обоих сроках функциональной разгрузки. Ранее сходные результаты изменения дистрофинового слоя в условиях функциональной разгрузки были продемонстрированы Gasnikova et al. (2005) [54]. Авторы установили, что на 14 день антиортостатического вывешивания наблюдалось нарушение дистрофинового слоя, однако, несмотря на сходные результаты, в наших экспериментах видимого разрушения дистрофинового слоя не наблюдалось, а снижение иммунофлуоресценции характеризовалось уменьшением плотности эмиссионного сигнала от комплексов, связанных с дистрофином антител.

Сами динамические изменения субсарколеммальной экспрессии дистрофина предположительно можно объяснить рядом процессов. В частности, описанная выше способность дистрофина непосредственно взаимодействовать с липидным слоем биомембраны в условиях функциональной разгрузки, вероятно, может являться причиной его делокализации из области сарколеммы на фоне роста уровней сарколеммального церамида. В отличие от бета-дистрогликана, связанного с сарколеммальным слоем посредством гидрофобного трансмембранного домена и, как следствие, принципиально независимого от окружающей его липидной композиции, мембрано-ассоциированные домены дистрофина, а именно критически важный участок спектриноподобных повторов R1-3, непосредственно проявляет чувствительность к форме и количеству образуемых липид-белковых связей с внутренним листком сарколеммы. Данная ассоциация дистрофина и сарколеммы необходима для устойчивости последней при латеральной нагрузке в процессе мышечного сокращения [34].

Напротив, снижение плотности дистрофина в сарколеммальной области при функциональной разгрузке, вероятно, может являться одной из причин потери латеральной жесткости мышечного волокна.

Наблюдаемые нами сарколеммальные изменения кавеолина-3, не показавшие достоверных изменений при 12-часовой функциональной разгрузке, в эксперименте с более длительным воздействием характеризовалась достоверным приростом его иммунофлуоресценции в области сарколеммы. Вероятный механизм наблюдаемых изменений может состоять в следующем. Кавеолин-3, имеющий в своей структуре аминокислотный участок распознавания и связывания холестерина, более других анализируемых нами компонентов сарколеммального цитоскелета может быть чувствителен к липидному микроокружению. В частности, в условиях функциональной разгрузки ассоциированное с приростом уровня мембранного церамида, образующегося посредством сфингомиелиназного гидролиза, вытеснение из фракции липидных рафтов холестеринового компонента? вероятно, может являться причиной потери механического взаимодействия кавеолина-3 и сарколеммы мышечного волокна и, как следствие, потери функциональной активности регулируемых кавеолином сигнальных и рецепторных компонентов. Сохранность многих локализованных в кавеолярных рафтах структур является критически важной для жизнеспособности клетки [115]. Помимо холестерин-ассоциированного рекрутирования кавеолина-3 в состав липидного рафта, сам кавеолин-3 также способен формировать сложные структуры по типу «строительных лесов» посредством олигомеризационного мотива [126]. Наблюдаемый нами прирост экспрессии сарколеммального кавеолина-3 в условиях функциональной разгрузки подтверждается схожими изменениями в ранее проведенных исследованиях Kuczmarski et al., (2018) [76]. Вероятно, полученные нами результаты могут характеризовать развитие процесса компенсации разрушения кавеолярных комплексов, наблюдаемых при разгрузке мышц. Данный процесс может быть предположительно реализован

посредством перехода мембрано-стабилизирующей функции кавеолина-3 с белок-липидной связи с холестерином, на участки повышенной плотности кавеолиновых олигомеров. Косвенно данный процесс подтверждается проведенным нами анализом линейного распределения иммунофлуоресценции сарколеммального церамида и кавеолина-3. Нами показано, что функциональная разгрузка в течение 14-ти дней связана со сменой формы корреляционной взаимосвязи между светимостью кавеолина-3 и церамида. В частности, на равных участках сарколеммы увеличение иммунофлуоресценции церамида ассоциировалось с ростом иммунофлуоресценции кавеолина-3. Это позволяет нам предположить, что на участках образования церамида и, как следствие, вытеснения холестерина увеличивалась плотность кавеолина-3, который, исходя из вышеописанного, предположительно компенсировал потерю связи с сарколеммой.

Для оценки состояния субсарколеммального цитоскелета нами был проанализирован уровень сарколеммального γ -актина. Ранее была задокументирована и подтверждена костамерная модель связи дистрофина с цитоскелетными нитями γ -актина [127], описывающая латерально лежащие спиралевидные коровые структуры, выполняющие каркасную функцию. Нами был обнаружен достоверный прирост уровней иммунофлуоресценции γ -актина на фоне функциональной разгрузки в течение 12-ти часов и 14-ти дней. Анализ уровня белка в те же сроки также показал прирост гамма-актина в сарколеммальной фракции. Данные изменения можно охарактеризовать как компенсаторную динамику реакцию костамерного гамма-актина в ответ на сарколеммальную делокализацию дистрофина, и вероятную «попытку» костамеров связаться с сарколеммальным слоем без участия дистрофина как посредника [147].

Для оценки мышечной пластичности, реализуемой в процессе функциональной разгрузки, нами была проанализирована экспрессия тяжелых цепей миозина. В частности, для 14-дневного срока функциональной разгрузки мы получили результат, хорошо согласующийся с

ранее проведенными исследованиями [88, 98, 132, 138]. Как и ожидалось, мы наблюдали достоверное снижение уровней мРНК, кодирующих «быстрые» и «медленные» изоформы ТЦМ.

Также нами был произведен морфометрический анализ *m. soleus*, подвергнутой 14-дневной функциональной разгрузке. Мы наблюдали достоверное снижение массы мышц на 34,8% и снижение диаметра Ферета (максимального расстояние между краями каждого отдельного волокна) на 49%. Данные результаты согласуются с ранее полученными данными, демонстрирующими эффекты *disuse*-атрофии [23, 75, 108, 132].

Кислая сфингомиелиназа представляет собой эндо-лизосомальный белок из 629 аминокислот с молекулярной массой 75/72 кДа [65]. Данный белок-фермент катализирует процесс гидролиза сфингомиелина до фосфорилхолина и церамида, проявляя наибольшую активность в слабокислой среде с оптимумом pH 5,0. Ранее было продемонстрировано, что активация кислой сфингомиелиназы связана с ее транслокацией в клеточную мембрану [58]. Причины и механизмы, способные инициировать данный процесс, довольно разнообразны. В частности, можно отметить активацию кислой сфингомиелиназы посредством фосфорилирования [165], частичного протеолиза [43], под влиянием различных патогенов [15], а также на фоне оксидативного стресса [30, 84]. Вышеуказанные причины способствуют транспорту кислой сфингомиелиназы из лизосом во внешний листок плазматической мембраны, где в областях гидролиза мембранного сфингомиелина образуются скопления церамида. Данные скопления сливаются в кластерные структуры, формируя тем самым церамид-обогащенные липидные микродомены [58]. Способность таких микродоменов избирательно, на основе биофизических параметров, интернировать и исключать из своего состава различные белки легла в основу представления о функционировании данных платформ, как важных участников ряда сигнальных клеточных процессов - апоптоза, аутофагии, старения, индукции воспаления [59]. В свою очередь медико-биологические

подходы к ингибированию кислой сфингомиелиназы стали рассматриваться как способы регуляции вышеописанных процессов [19,28, 64].

Функциональные ингибиторы кислой сфингомиелиназы (FIASMA) – это катионные препараты с липофильными свойствами, которые диффундируют в лизосоме путем пассивной диффузии и, вероятно, с использованием транспортера ABCB1, расположенного на лизосомальной мембране. Эта диффузия увеличивает внутренний лизосомальный pH, так что кислая сфингомиелиназа отделяется от внутреннего листка лизосомальной мембраны и далее деградирует путем протеолиза, что делает неэффективной ее активацию, связанную с транслокацией в клеточную мембрану [79]. Свойствами FIASMA обладает ряд препаратов, относящихся к группе трициклических антидепрессантов – имипрамин, дезипрамин, кломипрамин, amitриптилин и другие [73].

В наших исследованиях были использованы два препарата из группы FIASMA - amitриптилин и кломипрамин. Большинство экспериментов проводились посредством предварительной премедикации amitриптилином перед функциональной разгрузкой. В части опытов в качестве альтернативной замены amitриптилину использовался кломипрамин, также достоверно проявляющий основные свойства препаратов группы FIASMA [72].

Поскольку изменения субсарколеммальных белков и перестройка в период функциональной разгрузки хорошо «реагировали» на премедикацию ингибиторами кислой сфингомиелиназы, они интерпретировались нами как чувствительные к изменениям липидной композиции мембранных доменов в результате усиления образования церамида.

Наблюдаемые нами изменения сарколеммального церамида в условиях функциональной разгрузки и на фоне премедикации amitриптилином имели ожидаемое сходство с результатами ранее проведенных в нашей лаборатории исследований [1]. 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.

Несколько сложнее интерпретировать динамику изменений белковых и гликопротеидных комплексов сарколеммы при разгрузке мышц на фоне действия ингибитора. В частности, несмотря на отсутствие у бета-дистрогликана специфических липид-связывающих доменов и отсутствие подтвержденных механизмов его регуляции в условиях функциональной разгрузки, премедикация amitriptином частично предотвращала изменение иммунофлуоресценции данного белка на обоих экспериментальных сроках.

Ранее было показано, что бета-дистрогликан способен терять связь со структурой липидного рафта при удалении мембранного холестерина с помощью метил-бета-циклодекстрина, что сопровождается накоплением данного белка в нерафтовой сарколеммальной фракции, т.е. делокализацией бета-дистрогликана в пределах сарколеммы [156]. В наших наблюдениях мы показываем, что рост бета-дистрогликана на ранних сроках и его снижение в более поздний период функциональной разгрузки, а также ограничение данных процессов на фоне премедикации amitriptином связано с генерацией церамида, который, как известно, способен вытеснять холестерин из липидных рафтов [81, 93]. Сохранность холестерина имеет критическое значение для структурной целостности всего дистрогликанового комплекса, а также для регуляции им сигнальной трансдукции. Потеря специфического липидного микроокружения при удалении холестерина из микродомена может приводить к нарушению функциональной связи альфа- и бета-дистрогликана, а также к интернализации данного белкового комплекса [135, 158]. Данные механизмы и возможные промежуточные звенья процесса предстоит уточнить в дальнейших исследованиях, однако уже сейчас мы можем предположить, что сфинголипидный состав биомембраны критически

важен для сохранности уровня бета-дистрогликана в сарколеммальном регионе.

Амитриптилин также достоверно предотвращал изменения дистрофина, вызванные функциональной разгрузкой. В данном случае его эффект можно связать с подавлением генерации церамида, что способствует сохранению структурной целостности участков сарколеммы, контактирующих с липид-связывающими доменами дистрофина.

Интересна динамика изменений костамерного γ -актина, также проявляющего определенную «чувствительность» к действию амитриптилина. При разгрузке на фоне премедикации мы наблюдали достоверно меньшие уровни прироста γ -актина по сравнению с сериями, в которых препарат не применялся.

Мы можем оценить динамику γ -актина относительно снижения процессов сфингомиелиназного гидролиза в сарколемме, как снижение компенсаторной реакции в ответ на сохранение липидной композиции сарколеммы, за счет возможной непосредственной связи γ -актина с липидным бислоем [153]. Однако, учитывая вероятную направленность компенсаторных процессов костамера на сохранение жесткости и механической стабильности мышечного волокна, критически важной нам представляется сохранность дистрофинового слоя и его связи с субсарколеммальным цитоскелетом, а также обусловленное им распределение механического напряжения между сарколеммой и костамерной актиновой сетью. Вероятно, амитриптилин, ингибируя активность кислой сфингомиелиназы, предотвращает церамид-индуцированную делокализацию дистрофина из сарколеммального компартмента и потерю связи дистрофин/ γ -актин, за счет чего снижается потребность в компенсаторном увеличении γ -актина [20, 62].

Прирост уровня кавеолина-3 в плазматической мембране мышечных волокон, который мы наблюдали в условиях функциональной разгрузки на 14 день, также частично корригировался введением амитриптилина. 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 сохранность рафтовой интеграции кавеолина-3.

Сохранность взаимодействия кавеолина-3 и липидных рафтов, может быть продемонстрирована и подтверждена на основе обнаруженной нами корреляции пространственного распределения кавеолина-3 и церамида. Отрицательная корреляция в условиях функциональной разгрузки с премедикацией амитриптилином 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, реализуемую посредством олигомеризационных мотивов [130, 148].

В нашей работе часть экспериментов, в частности опыты по анализу мышечной пластичности, проводились с использованием еще одного ингибитора кислой сфингомиелиназы – кломипрамина. Нами впервые были получены данные о влиянии препарата из группы FIASMA на экспрессию тяжелых цепей миозина в мышцах, подвергнутых функциональной разгрузке. Интересно, что проведенный ПЦР-анализ мРНК «быстрых» и «медленных» изоформ ТЦМ показал неодинаковую чувствительность их экспрессии к премедикации ингибитором кислой сфингомиелиназы. Так, на фоне применения кломипрамина только экспрессия «быстрых» изоформ миозина (MyHC IIb, MyHC IIx) восстанавливалась до уровня контрольных значений, на экспрессию «медленных» изоформ (MyHC I β) кломипрамин эффекта не оказал.

Проверка эффектов воздействия кломипрамина на экспрессию «быстрых» изоформ ТЦМ в условиях мышечной разгрузки была проведена посредством анализа иммунофлуоресценции комплексов антител, связанных с этими изоформами ТЦМ. Результаты оказались аналогичными: было показано, что на фоне применения функционального ингибитора кислой сфингомиелиназы меньшая доля волокон вовлечена в повышение экспрессии «быстрых» изоформ миозина относительно аналогичного наблюдения в группе изолированной функциональной разгрузки.

На данный момент в литературе отсутствуют данные, позволяющие объяснить полученные нами результаты и описать те сигнальные пути, которые связывают сфингомиелиназный гидролиз и генерацию церамида с повышением экспрессии «быстрых» изоформ миозина в мышцах, подвергнутых функциональной разгрузке. Косвенно о такой возможности свидетельствуют следующие факты: с одной стороны, имеется достаточно сильная взаимосвязь между экспрессией миогенного фактора MyoD и экспрессией гена MyHC IIb [134], с другой стороны, существует возможность влияния церамида как вторичного мессенджера на стимулированную ростовыми факторами экспрессию MyoD [144]. На основании вышеописанного, нами представляется важным предполагаемое участие кислой сфингомиелиназы и церамида в процессах регуляции мышечной пластичности, протекающих при функциональной разгрузке, а также обнаруженная нами принципиальная возможность их регуляции посредством использования препаратов группы FIASMA.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе было рассмотрено влияние сфинголипидной динамики сарколеммы, развивающейся при функциональной разгрузке разной длительности, на изменения компонентов дистрофин-ассоциированного гликопротеидного комплекса, связанного с ним гамма-актинового

компонента костамеров мышечных волокон, а также на изменение генной экспрессии изоформ ТЦМ, характеризующих мышечную пластичность.

Функциональная разгрузка, ассоциированная с активацией кислой сфингомиелиназы, посредством транслокации ее на мембрану, приводит к усилению образования генераций церамида в сарколемме мышечных волокон постуральных мышц. Данный процесс вносит непосредственный вклад в структурную целостность, разделенных на основании физико-химических взаимодействий, различных липидных фаз, в норме циркулирующих в сарколеммальном слое. Физико-химическая неоднородность липидных агломераций, в частности, холестерин-сфинголипидные связи, лежащие в основе формирования липидупорядоченных микродоменов (рафтов), является одним из возможных механизмов нацеливания различных рецепторных, сигнальных и механотрансдукторных белковых структур на сарколемму мышечных волокон. Изменение липидной композиции сарколеммальных белок-связанных микродоменов может являться критическим для и реализации их функционала.

Нами показано, что функциональная разгрузка на разных сроках длительности приводит к увеличению количества церамида в сарколемме мышечных волокон, что сопровождается снижением экспрессии дистрофина и бета-дистрогликана, ключевых компонентов дистрофин-ассоциированного гликопротеидного комплекса, ответственного за поддержание структурной целостности сарколеммального слоя, передачу механического сигнала в мышечном волокне и связь саркоплазмы с внеклеточным матриксом; ростом уровней кавеолина-3, являющегося важным компонентом организации сарколеммальных инвагинаций (кавеол), реализующих функцию сигнальных платформ; а также ростом экспрессии гамма-актина, вероятно имеющей компенсаторный ответ костамерного цитоскелета на снижение механического напряжения мышечного волокна.

Нами также показано, что применение функционального ингибитора кислой сфингомиелиназы, снижающего активность процессов сфингомиелиназного гидролиза в сарколемме мышечных волокон, способно оказывать частичный нивелирующий эффект на, обусловленное функциональной разгрузкой, развитие изменений в экспрессии исследуемых сарколеммальных белков. Интересно также, что воздействие на, индуцированные разгрузкой, процессы генерации церамида в сарколемме мышечных волокон также оказывало влияние на характеристики массы мышц и диаметра мышечных волокон, на динамику мышечной пластичности. На фоне применения функционального ингибитора кислой сфингомиелиназы на повышенном уровне сохранялись показатели массы мышц и величина диаметра мышечных волокон; снижалась экспрессия генов «быстрых» изоформ тяжелых цепей миозина, что на уровне целой мышцы проявлялось в снижении количества мышечных волокон, вовлеченных в синтез данных изоформ.

Результаты данной работы показывают важность роли сфинголипидов мышечных волокон в реализации мембрано-цитоскелетных взаимодействий индуцированных функциональной разгрузкой, а также принципиальную возможность фармакологического воздействия на данные процессы посредством снижения активности сфингомиелиназного гидролиза и уменьшения продукции церамида.

ВЫВОДЫ

1. Функциональная разгрузка, вызванная 12-часовым АОВ, 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 (амитриптилин), 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 АОВ.
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 (кломипрамин) уменьшает степень атрофии разгруженной мышцы.

РЕКОМЕНДАЦИИ И ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

Изменения сарколеммальных и субсарколеммальных структур в условиях функциональной разгрузки, рассмотренные в рамках данной работы, являются основой для дальнейшего научного поиска. Так, важно оценить динамику ассоциированных с кавеолами сарколеммальных рецепторных и структурных комплексов, исследовать изменения поперечной жесткости мышц при функциональной разгрузке и действии ингибиторов кислой сфингомиелиназы, уточнить патогенетическую связь между

сфинголипидными изменениями сарколеммы и динамикой субсарколеммального цитоскелета, исследовать влияние растущих уровней кавеолина при функциональной разгрузке на структуру кавеол и оценить их участие в механизмах внутриклеточного сигналинга.

Также важным этапом в дальнейшем станет оценка возможности коррекции ассоциированных со сфинголипидами нарушений в клинических исследованиях, возможности использовать для этого положительные свойства зарекомендовавших себя антидепрессантов, входящих в группу функциональных ингибиторов кислой сфингомиелиназы. Немаловажно в дальнейшем комплексно транслировать результаты доклинических и клинических исследований в конкретные протоколы восстановительного лечения пациентов, которые ввиду длительного постельного режима оказались подвергнуты функциональной разгрузке постуральных мышц.

СПИСОК СКОРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

- АОВ – антиортостатическое вывешивание
- АФК – активные формы кислорода
- ДАГ – дистрофин-ассоциированный гликопротеидный комплекс
- ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота
- ПАГ – полиакриламидный гель
- ПЦР-РВ – полимеразная цепная реакция в реальном времени
- РНК – рибонуклеиновая кислота
- ТЦМ – тяжелые цепи миозина
- ЭПР – эндоплазматический ретикулум
- ABD – актин-связывающий домен
- СН – гомолог кальпонины
- FIASMA – функциональный ингибитор кислой сфингомиелиназы
- GSK3 β - киназа гликогенсинтазы
- MyHC – тяжелые цепи миозина
- NFAT - ядерный фактор активированных Т-клеток
- PMSF - фенилметилсульфонил фторид
- PP2A - протеинфосфатаза 2А
- SMase – сфингомиелиназа

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Брындина И.Г. Сфинголипиды скелетных мышц у мышей C57B1/6 в условиях непродолжительной моделированной гипогравитации/ И.Г. Брындина, М.Н. Шалагина, С.В. Овечкин [и др.] // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. - 2014. - Т.100. - № 11. - С. 1280-1286.
2. Брындина И.Г. Церамиды скелетных мышц, печени и легких грызунов при хроническом эмоциональном стрессе и моделируемой невесомости / И.Г. Брындина, М.Р. Багаутдинов, Н.Н. Васильева [и др.] // Вестник Уральской медицинской академической науки. - 2012. - № 2 (39). - С. 108-109.
3. Вайнберг С. Первые три минуты. / С. Вайнберг — М.: Энергоиздат, 1981. — С. 135.
4. Ильин Е.А. Стенд для моделирования физиологических эффектов невесомости в лабораторных экспериментах с крысами / Е.А. Ильин, В.Е. Новиков // Косм. биол. и авиакосм. мед. - 1980. - Т. 24. - №3. - С. 79–80.
5. Котовская А. Р. Медико-биологические аспекты проблемы создания искусственной силы тяжести / А.Р. Котовская, А.А. Шипов, И.Ф Виль-Вильямс - М.: Слово, 1996. - С 204.
6. Котовская А. Р. Переносимость человеком перегрузок в космических полётах и искусственная гравитация /А.Р. Котовская // Авиакосмическая и экологическая медицина. - 2017. - Т. 51. - № 5. - С. 5-21.
7. Кравцова В.В. Влияние функциональной разгрузки и дефицита дистрофина на локальную гиперполяризацию постсинаптической мембраны скелетного мышечного волокна/ В. В. Кравцова, Б. С. Шенкман, В. М. Михайлов [и др.] // Биофизика. – 2010. – Т. 55. – № 5. – С. 834-841.
8. Орлов О. И. Центрифуга короткого радиуса как новое средство профилактики неблагоприятных эффектов невесомости и перспективные планы по разработке проблемы искусственной силы тяжести применительно к межпланетным полётам / О.И. Орлов, М.И. Колотева //

- Авиакосмическая и экологическая медицина. - 2017. - Т. 51. - № 7. - С. 11-18.
9. Шалагина М.Н. Влияние физической нагрузки и ингибитора кислой сфингомиелиназы кломипрамина на уровень фосфо-рилированного mTOR в камбаловидной мышце мыши при функциональной разгрузке / М.Н. Шалагина, И.Г. Брындина // Здоровье и образование в XXI веке. - 2017. - №2. – С. 102-103.
 10. Alford, E.K. Electromyography of rat soleus, medial gastrocnemius, and tibialis anterior during hind limb suspension / E.K. Alford, R.R. Roy, J.A. Hodgson [et al.] // Exp. Neurol. - 1987 – Vol. 96(3). – P. 635-649.
 11. Allen, D.L., Apoptosis: a mechanism contributing to remodeling of skeletal muscle in response to hindlimb unweighting / D.L. Allen, J.K. Linderman, R.R. Roy // Am. J. Physiol. – 1997. – Vol. 273(2) – P. 579-587.
 12. Amann, K.J. A cluster of basic repeats in the dystrophin rod domain binds F-actin through an electrostatic interaction / K. J. Amann, B.A. Renley, J.M. Ervasti // J. Biol. Chem. – 1998. - Vol. 273(43). – P. 28419-28423.
 13. Anderson, R.G. A role for lipid shells in targeting proteins to caveolae, rafts, and other lipid domains / R.G. Anderson, K. Jacobson // Science. – 2002. - Vol. 296(5574). – P. 1821-1825.
 14. Andrianjafiniony, T. Oxidative stress, apoptosis, and proteolysis in skeletal muscle repair after unloading / T. Andrianjafiniony, S. Dupré-Aucouturier, D. Letexier [et al.] // Am. J. Physiol. Cell Physiol. – 2010. – Vol. 299(2). – P. 307-315.
 15. Avota, E. DC-SIGN mediated sphingomyelinase-activation and ceramide generation is essential for enhancement of viral uptake in dendritic cells / E. Avota, E. Gulbins, S. Schneider-Schaulies // PLoS Pathog. – 2011. – Vol. 7(2). – P. e1001290.
 16. Baldwin, K.M. Alterations in muscle mass and contractile phenotype in response to unloading models: role of transcriptional/pretranslational

- mechanisms // K.M. Baldwin, F. Haddad, C.E. Pandorf [et al.] // *Front. Physiol.* – 2013. – Vol. 4. – P. 284.
17. Baltgalvis, K.A. Transgenic overexpression of γ -cytoplasmic actin protects against eccentric contraction-induced force loss in mdx mice / K.A. Baltgalvis, M.A. Jaeger, D.P. Fitzsimons [et al.] // *Skelet. Muscle.* – 2011. – Vol. 1(1). – P. 32.
18. Bandet, C.L. Sphingolipid Metabolism: New Insight into Ceramide-Induced Lipotoxicity in Muscle Cells // C.L. Bandet, S. Tan-Chen, O. Bourron [et al.] // *Int. J. Mol. Sci.* – 2019. – Vol. 20(3). – P. 479.
19. Beckmann, N. Acid Sphingomyelinase Deficiency Ameliorates Farber Disease / N. Beckmann, K.A. Becker, S. Kadow [et al.] // *Int. J. Mol. Sci.* – 2019. – Vol. 20(24). – P. 6253.
20. Belyantseva, I.A. Gamma-actin is required for cytoskeletal maintenance but not development / I. A. Belyantseva, B.J. Perrin, K.J. Sonnemann [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* – 2009. – Vol. 106(24). – P. 9703-9708.
21. Berthon, P. Regulation of ubiquitin-proteasome system, caspase enzyme activities, and extracellular proteinases in rat soleus muscle in response to unloading // P. Berthon, S. Duguez, F.B. Favier [et al.] // *Pflugers Arch.* – 2007. – Vol. 454(4). – P. 625-633.
22. Bewick, G.S. Spatial relationships of utrophin, dystrophin, beta-dystroglycan and beta-spectrin to acetylcholine receptor clusters during postnatal maturation of the rat neuromuscular junction // G.S. Bewick, C. Young, C.R. Slater // *J. Neurocytol.* – 1996. – Vol. 25(7). – P. 367-379.
23. Bodine, S.C. Disuse-induced muscle wasting / S.C. Bodine // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* – 2013. – Vol. 45(10). – P. 2200-2208.
24. Bruni, P. Pleiotropic effects of sphingolipids in skeletal muscle / P. Bruni, C. Donati // *Cell Mol. Life Sci.* – 2008. – Vol. 65(23). – P. 3725-3736.

25. Bruusgaard, J.C. No change in myonuclear number during muscle unloading and reloading / J.C. Bruusgaard, I.M. Egner, T.K. Larsen [et al.] // *J. Appl. Physiol.* - 2012. – Vol. 113(2). – P. 290-296.
26. Burke, R.E. Mammalian motor units: physiological-histochemical correlation in three types in cat gastrocnemius / R.E. Burke, D.N. Levine, F.E. Zajac 3rd // *Science.* – 1971. – Vol. 174(4010). – P. 709-712.
27. Cantor, R.S. The influence of membrane lateral pressures on simple geometric models of protein conformational equilibria / R.S. Cantor // *Chem. Phys. Lipids.* – 1999. – Vol. 101(1) – P. 45-56.
28. Carpinteiro, A. Pharmacological Inhibition of Acid Sphingomyelinase Prevents Uptake of SARS-CoV-2 by Epithelial Cells / A. Carpinteiro, M.J. Edwards, M. Hoffmann [et al.] // *Cell Rep. Med.* – 2020. - Vol. 1(8). – P. 100142.
29. Casares, D. Membrane Lipid Composition: Effect on Membrane and Organelle Structure, Function and Compartmentalization and Therapeutic Avenues / D. Casares, P.V. Escribá, C.A. Rosselló // *Int. J. Mol. Sci.* – 2019. – Vol. 20(9). – P. 2167.
30. Charruyer, A. UV-C light induces raft-associated acid sphingomyelinase and JNK activation and translocation independently on a nuclear signal / A. Charruyer, S. Grazide, C. Bezombes [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2005. – Vol. 280(19). – P. 19196-19204.
31. Chin, E.R. Intracellular Ca²⁺ signaling in skeletal muscle: decoding a complex message / E.R. Chin // *Exerc. Sport Sci. Rev.* – 2010. – Vol.38(2). – P. 76-85.
32. Chubinskiy-Nadezhdin, V.I. Cholesterol depletion-induced inhibition of stretch-activated channels is mediated via actin rearrangement / V.I. Chubinskiy-Nadezhdin, Y.A. Negulyaev, E.A. Morachevskaya // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2011. – Vol. 412(1). – P. 80-85.

33. Contreras, F.X. Specificity of intramembrane protein-lipid interactions / F.X. Contreras, A.M Ernst, F. Wieland [et al.] // *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* - 2011. – Vol. 3(6). – P. a004705.
34. Cooper-Olson, G. Evaluation of the Lipid-binding Properties of Recombinant Dystrophin Spectrin-like Repeat Domains R1-3 / G. Cooper-Olson, L.R. Rodino-Klapac, R.A. Potter // *J. Neuromuscul. Dis.* – 2021. – Vol. 8(4). – P. 489-494.
35. Cornejo, E. Compartmentalization and organelle formation in bacteria / E. Cornejo, N. Abreu, A. Komeili // *Curr. Opin. Cell Biol.* – 2014. – Vol. 26. – P. 132–138.
36. Côté, P.D. Chimaeric mice deficient in dystroglycans develop muscular dystrophy and have disrupted myoneural synapses / P.D. Côté, H. Moukhles, M. Lindenbaum [et al.] // *Nat. Genet.* – 1999. – Vol. 23(3). – P. 338-342.
37. Court, F.A. MMP2-9 cleavage of dystroglycan alters the size and molecular composition of Schwann cell domains / F.A. Court, D. Zambroni, E. Pavoni [et al.] // *J. Neurosci.* – 2011. – Vol. 31(34). – P. 12208-12217.
38. Crosbie, R.H. Caveolin-3 is not an integral component of the dystrophin glycoprotein complex / R.H. Crosbie, H. Yamada, D.P. Venzke [et al.] // *FEBS Lett.* – 1998. – Vol. 427(2). – P. 279-282.
39. de Kroon, A.I. Checks and balances in membrane phospholipid class and acyl chain homeostasis, the yeast perspective / A.I. de Kroon, P.J. Rijken, C.H. de Smet // *Prog. Lipid. Res.* – 2013. – Vol. 52(4). – P. 374-394.
40. Deisenhofer, J. The photosynthetic reaction centre from the purple bacterium *Rhodospseudomonas viridis* / J. Deisenhofer, H. Michel // *EMBO J.* 1989 Aug;8(8):2149-70. doi: 10.1002/j.1460-2075.1989.tb08338.x. PMID: 2676514; PMCID: PMC401143.
41. Donati, C. Sphingosine 1-phosphate regulates myogenic differentiation: a major role for S1P2 receptor / C. Donati, E. Meacci, F. Nuti [et al.] // *FASEB J.* - 2005. – Vol. 19. – P. 449–451.

42. Dupont-Versteegden, E.E. Maintenance of muscle mass is not dependent on the calcineurin-NFAT pathway / E.E. Dupont-Versteegden, M. Knox, C.M. Gurley [et al.] // *Am J Physiol Cell Physiol.* – 2002. – Vol. 282(6). – P. 1387-1395.
43. Edelmann, B. Caspase-8 and caspase-7 sequentially mediate proteolytic activation of acid sphingomyelinase in TNF-R1 receptosomes / B. Edelmann, U. Bertsch, V. Tchikov [et al.] // *EMBO J.* – 2011. – Vol. 30(2). – P. 379-494.
44. Epand, R.M. Caveolin scaffolding region and cholesterol-rich domains in membranes / R.M. Epand, B.G. Sayer, R.F. Epand. // *J Mol Biol.* – 2005. – Vol. 345(2). – P. 339-350.
45. Ervasti, J.M. Dystrophin and the membrane skeleton / J.M. Ervasti, K.P. Campbell // *Curr Opin Cell Biol.* – 1993. - Vol. 5(1). – P. 82-87.
46. Ervasti, J.M. / Membrane organization of the dystrophin-glycoprotein complex / J.M. Ervasti, K.P. Campbell // *Cell.* – 1991. - Vol. 66(6). – P. 1121-1131.
47. Ferreira, R. Evidences of apoptosis during the early phases of soleus muscle atrophy in hindlimb suspended mice / R. Ferreira, M.J. Neuparth, R. Vitorino // *Physiol. Res.* – 2008. - Vol. 57(4). – P. 601-611.
48. Fitts, R. H. Models of disuse: a comparison of hindlimb suspension and immobilization / R.H. Fitts, J.M.Metzger, D.A. Riley [et al.] // *J. Appl. Physiol.* – 1986. – Vol. 60. – P. 1946–1953.
49. Galbiati, F. Limb-girdle muscular dystrophy (LGMD-1C) mutants of caveolin-3 undergo ubiquitination and proteasomal degradation. Treatment with proteasomal inhibitors blocks the dominant negative effect of LGMD-1C mutanta and rescues wild-type caveolin-3 / F. Galbiati, D. Volonte, C. Minetti [et al.] // *J Biol. Chem.* – 2000. - Vol. 275(48). - P 37702-37711.
50. Gambará, G. Microgravity-Induced Transcriptome Adaptation in Mouse Paraspinal longissimus dorsi Muscle Highlights Insulin Resistance-Linked

- Genes / G. Gambarà, M. Salanova, S. // *Ciciliot Front Physiol.* - 2017. - Vol. 8. - P. 279.
51. Gao, Q.Q. The Dystrophin Complex: Structure, Function, and Implications for Therapy / Q.Q. Gao, E.M. McNally // *Compr. Physiol.* – 2015. - Vol. 5(3). - P. 1223-1239.
52. Gao, Q.Q. The Dystrophin Complex: Structure, Function, and Implications for Therapy / Q.Q. Gao, E.M. McNally // *Compr. Physiol.* – 2015. - Vol. 5(3). - P. 1223-1239.
53. Garg, S. Actin-induced perturbation of PS lipid-cholesterol interaction: A possible mechanism of cytoskeleton-based regulation of membrane organization / S. Garg, J.X.Tang, J. Rùhe [et al.] // *J. Struct. Biol.* – 2009. – Vol. 168(1). – P. 11-20.
54. Gasnikova, N.M. Influence of rat hindlimb suspension on sarcolemmal dystrophin and its sensitivity to mechanical damage / N.M. Gasnikova, B.S. Shenkman // *J. Gravit. Physiol.* – 2005. – Vol.12. – P.125-126.
55. Gault, CR. An overview of sphingolipid metabolism: from synthesis to breakdown / C.R. Gault, L.M. Obeid, Y.A. Hannun // *Adv. Exp. Med Biol.* - 2010. – Vol. 688. – P.1-23.
56. Gazzo, E. Caveolinopathies: from the biology of caveolin-3 to human diseases / E. Gazzo, F. Sotgia, C. Bruno [et al.] // *Eur. J Hum Genet.* – 2010. - Vol. 18(2). – P. 137-45.
57. Gómez-Muñoz, A. Ceramide1-phosphate in cell survival and inflammatory signaling / A. Gómez-Muñoz, P. Gangoiti , M.H. Granado [et al.] // *Adv. Exp. Med Biol.* – 2010. – Vol. 688. – P. 118–130.
58. Grassme, H. CD95 signaling via ceramide-rich membrane rafts / H. Grassme, A. Jekle, A. Riehle // *J. Biol. Chem.* – 2001. – Vol. 276(23). – P. 20589-96.
59. Gulbins, E. Physiological and pathophysiological aspects of ceramide / E. Gulbins, P.L. Li // *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* – 2006. – Vol. 290(1). – P. 11-26.

60. Hajduch, E. Ceramide impairs the insulin-dependent membrane recruitment of protein kinase B leading to a loss in downstream signalling in L6 skeletal muscle cells / E. Hajduch, A. Balendran, I.H. Batty [et al.] // *Diabetologia* – 2001. – Vol. 44. – P.173–183.
61. Hajduch, E. Targeting of PKCzeta and PKB to caveolin-enriched microdomains represents a crucial step underpinning the disruption in PKB-directed signalling by ceramide / E. Hajduch, S. Turban, X. Le Liepvre [et al.] // *Biochem. J.* - 2008. – Vol. 410(2). – P. 369-379.
62. Hanft, L.M. Cytoplasmic gamma-actin contributes to a compensatory remodeling response in dystrophin-deficient muscle / L.M. Hanft, I.N. Rybakova, J. R. Patel [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* – 2006. – Vol. 103(14). – P. 5385-5390.
63. Henry, M.D. Dystroglycan: an extracellular matrix receptor linked to the cytoskeleton / M.D. Henry, K.P. Campbell // *Curr. Opin. Cell Biol.* – 1996. – Vol. 8(5). – P. 625-631.
64. Hoehn, R.S. Acid Sphingomyelinase Inhibition in Stored Erythrocytes Reduces Transfusion-Associated Lung Inflammation / R.S. Hoehn, P.L. Jernigan, L. Japtok [et al.] // *Ann. Surg.* – 2017. – Vol. 265(1). – P. 218-226.
65. Hurwitz, R. Processing of human acid sphingomyelinase in normal and I-cell fibroblasts / R. Hurwitz, K. Ferlinz, G. Vielhaber [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 1994. – Vol.269(7). – P. 5440-5445.
66. Hyde, R. Ceramide down-regulates System A amino acid transport and protein synthesis in rat skeletal muscle cells / R. Hyde, E. Hajduch, D.J. Powell [et al.] // *FASEB J.* – 2005. – Vol. 19(3). – P. 461-463.
67. Ibraghimov-Beskrovnaya, O. Primary structure of dystrophin-associated glycoproteins linking dystrophin to the extracellular matrix / O. Ibraghimov-Beskrovnaya, J.M. Ervasti, C.J. Leveille [et al.] // *Nature.* – 1992. – Vol. 355(6362). – P. 696-702.
68. Jacobson, C. The dystroglycan complex is necessary for stabilization of acetylcholine receptor clusters at neuromuscular junctions and formation of the

- synaptic basement membrane / C. Jacobson, P.D. Côté, S.G. Rossi [et al.] // *J. Cell Biol.* – 2001. – Vol. 152(3). – P. 435-450.
69. Jain, A. Diverting CERT-mediated ceramide transport to mitochondria triggers Bax-dependent apoptosis / A. Jain, O. Beutel, K. Ebell [et al.] // *J. Cell Sci.* – 2017. – Vol. 130. – P. 360–371.
70. Jung, D. Identification and characterization of the dystrophin anchoring site on beta-dystroglycan / D. Jung, B. Yang, J. Meyer [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 1995. - Vol. 270(45). – P. 27305-27310.
71. Korenbaum, E. Calponin homology domains at a glance / E. Korenbaum, F. Rivero // *J. Cell. Sci.* – 2002. – Vol. 115(22). – P. 4387.
72. Kornhuber, J. Identification of novel functional inhibitors of acid sphingomyelinase / J. Kornhuber, M. Muehlbacher, S. Trapp [et al.] // *PLoS One.* – 2011. – Vol. 6(8) – P. e23852.
73. Kornhuber, J. Identification of new functional inhibitors of acid sphingomyelinase using a structure-property-activity relation model / J. Kornhuber, P. Tripal, M. Reichel [et al.] // *J Med Chem.* – 2008. – Vol. 51(2). – P. 219-237.
74. Kozlovskaya, I. Gravitational mechanisms in the motor system. Studies in real and simulated weightlessness / I. Kozlovskaya, I. Dmitrieva, L. Grigorieva // *Stance and Motion.* - NY, USA. - 1988. - P. 37–48.
75. Kraemer, W.J. The effects of 10 days of spaceflight on the shuttle Endeavor on predominantly fast-twitch muscles in the rat / W.J. Kraemer, R.S. Staron, S.E. Gordon [et al.] // *Histochem Cell Biol.* – 2000. - Vol.114(5). – P. 349-55
76. Kuczmarski, J.M. Effect of Eukarion-134 on Akt-mTOR signalling in the rat soleus during 7 days of mechanical unloading / J.M. Kuczmarski, J.M. Hord, Y. Lee [et al.] // *Exp Physiol.* – 2018. - Vol. 103(4). – P. 545-558.
77. Kwon, O.S. Intramyocellular ceramides and skeletal muscle mitochondrial respiration are partially regulated by Toll-like receptor 4 during hindlimb

- unloading / O.S. Kwon, D.S. Nelson, K.M. [et al.] // *Barrows Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* – 2016. – Vol. 311(5). – P. R879-R887.
78. Kwon, O.S. MyD88 regulates physical inactivity-induced skeletal muscle inflammation, ceramide biosynthesis signaling, and glucose intolerance / O.S. Kwon, R.E. Tanner, K.M. Barrows [et al.] // *Am J Physiol Endocrinol Metab.* - 2015/ - Vol. 309(1). – P. E11-21.
79. Le Corre, P. Repurposing functional inhibitors of acid sphingomyelinase (fiasmas): an opportunity against SARS-CoV-2 infection? / P. Le Corre, G.J. Loas // *Clin Pharm Ther.* – 2021. - Vol. 46(5). – P. 1213-1219.
80. Le Rumeur, E. Interaction of dystrophin rod domain with membrane phospholipids. Evidence of a close proximity between tryptophan residues and lipids / E. Le Rumeur, Y. Fichou, J. Pottier Biol [et al] // *Chem.* – 2003. - Vol. 278(8). – P. 5993-6001.
81. Lee, A.G. Lipid-protein interactions in biological membranes: a structural perspective / A.G. Lee // *Biochim Biophys Acta.* – 2003. - Vol. 1612(1). - P. 1-40.
82. Lee, E. Anterior gradient 2 is involved in the post-transcriptional regulation of β -dystroglycan / E. Lee, D.H. Lee // *Anim Cells Syst (Seoul).* – 2021. - Vol. - 25(1). - P. 19-27.
83. Levental, I. Palmitoylation regulates raft affinity for the majority of integral raft proteins // I. Levental, D. Lingwood, M. Grzybek [et al.] // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2010. – Vol. 107(51). – P. 22050-22054.
84. Li, X. Oxidative stress triggers Ca-dependent lysosome trafficking and activation of acid sphingomyelinase // X. Li, E. Gulbins, Y. Zhang // *Cell Physiol Biochem.* – 2012. – Vol. 30(4). – P. 815-826.
85. Lingwood, D. Lipid rafts as a membrane-organizing principle / D. Lingwood, K. Simons // *Science.* – 2010. – Vol.327(5961). – P. 46-50.

86. Liu, Y. Activity-dependent and -independent nuclear fluxes of HDAC4 mediated by different kinases in adult skeletal muscle / Y. Liu, W.R. Randall, M.F. Schneider // *J Cell Biol.* – 2005. - Vol. 168(6). – P. 887-97.
87. Liu, Y. Signaling pathways in activity-dependent fiber type plasticity in adult skeletal muscle / Y Liu, T Shen, W. R. Randall [et al.] // *J Muscle Res Cell Motil.* – 2005. – Vol. 26(1). – P. 13-21.
88. Lomonosova, YN. Reduced expression of MyHC slow isoform in rat soleus during unloading is accompanied by alterations of endogenous inhibitors of calcineurin/NFAT signaling pathway / Y.N. Lomonosova, O.V. Turtikova, B.S. Shenkman // *J Muscle Res Cell Motil.* – 2016. – Vol. 37(1-2). – P. 7-16.
89. Mahfouz, R. Characterising the inhibitory actions of ceramide upon insulin signaling in different skeletal muscle cell models: a mechanistic insight / R. Mahfouz, R. Khoury, A. Blachnio-Zabielska [et al.] // *A PLoS One.* – 2014. – Vol. 9(7). – P. e101865.
90. Matsumura, K. Association of dystrophin-related protein with dystrophin-associated proteins in mdx mouse muscle / K. Matsumura, J.M. Ervasti, K. Ohlendieck [et al] // *Nature.* – 1992. – Vol. 360(6404). – P. 588-591.
91. McConnell, H.M. Condensed complexes of cholesterol and phospholipids / H.M. McConnell, A. Radhakrishnan // *Biochim Biophys Acta.* – 2003. – Vol. 1610(2). – P. 159-173.
92. Mebarek, S. Inhibition of de novo ceramide synthesis upregulates phospholipase D and enhances myogenic differentiation / S . Mebarek, H. Komati, F. Naro [et al] // *J Cell Sci.* – 2007. – Vol. 120. – P. 407 – 416.
93. Megha. Ceramide selectively displaces cholesterol from ordered lipid domains (rafts): implications for lipid raft structure and function / Megha, E. London // *J Biol Chem.* – 2004. – Vol. 279. – P. 9997–10004.
94. Monier, S. VIP21-caveolin, a membrane protein constituent of the caveolar coat, oligomerizes in vivo and in vitro / S. Monier, R.G. Parton, F. Vogel [et al] // *Mol Biol Cell.* – 1995. – Vol. 6(7). – P. 911-27.

95. Morales, A. Sphingolipids and cell death / A. Morales, H. Lee, F.M. GoÇi [et al.] // Apoptosis. – 2007. – Vol. 12. – P. 923 – 939.
96. Morey, E.R. A new rat model simulating some aspects of space flight / E.R. Morey, E.E. Sabelman, R.T. Turner [et al] // Physiologist. – 1979. – Vol. 22(6). – P. 23-4.
97. Morey-Holton, E. The hindlimb unloading rat model: literature overview, technique update and comparison with space flight data / E. Morey-Holton, R.K. Globus, A. Kaplansky [et al] // Adv Space Biol Med. – 2005 – Vol. 10. – P. 7-40.
98. Mukhina, A.M. Role of L-type Ca channels in Ca²⁺ accumulation and changes in distribution of myosin heavy chain and SERCA isoforms in rat M. soleus under gravitational unloading / A.M. Mukhina, E.G. Altaeva, T.L. Nemirovskaia [et al.] // Ross Fiziol Zh Im I M Sechenova. – 2006. – Vol. - 92(11). – P. 1285-1295.
99. Muntoni, F. Defective glycosylation in congenital muscular dystrophies / F. Muntoni, M. Brockington, S. Torelli [et al] // Curr Opin Neurol. – 2004. - Vol. 17(2). – P. 205-209.
100. Murata, M. VIP21/caveolin is a cholesterol-binding protein / M. Murata, J. Peränen, R. Schreiner [et al.] // Proc Natl Acad Sci U S A. – 1995. – Vol. 92(22). – P. 10339-10343.
101. Murata, T. Structure of the rotor of the V-Type Na⁺-ATPase from *Enterococcus hirae* / T. Murata, I. Yamato, Y. Kakinuma [et al] // Science. – 2005. – Vol. 308(5722). – P. 654-659.
102. Nichols, B. Nonmechanical Roles of Dystrophin and Associated Proteins in Exercise, Neuromuscular Junctions, and Brain / B. Nichols, S. Takeda, T. Yokota // Brain Sci. – 2015. – Vol. 5. – P. 275–298.
103. Niemelä, P.S. Membrane proteins diffuse as dynamic complexes with lipids / P.S. Niemelä, M.S. Miettinen, L. Monticelli [et al] // J Am Chem Soc. – 2010. - Vol. 132(22). – P. 7574-7575.

104. Nikolova-Karakashian, M.N. Sphingolipid metabolism, oxidant signaling, and contractile function of skeletal muscle / M.N. Nikolova-Karakashian, M.B. Reid // *Antioxid Redox Signal.* – 2011. – Vol. 15(9). – P. 2501-2517.
105. Ogneva, I.V. Possible role of non-muscle alpha-actinins in muscle cell mechanosensitivity / I.V. Ogneva, N.S. Biryukov, T.A. Leinsoo [et al] // *PLoS One.* – 2014. – Vol. 9(4). – P. e96395.
106. Ogneva, I.V. Lecithin Prevents Cortical Cytoskeleton Reorganization in Rat Soleus Muscle Fibers under Short-Term Gravitational Disuse / I.V. Ogneva, N.S. Biryukov // *PLoS One.* – 2016. – Vol. 11(4). – P. e0153650.
107. Ogneva, IV. The contents of desmin and α -actinin-1 in the human soleus muscle after seven-day "dry" immersion / I.V. Ogneva, B.S. Shenkman, I.B. Kozlovskaya // *Dokl Biol Sci.* – 2011. – Vol. 436. – P. 20-2.
108. Ohira, Y. Gravitational unloading effects on muscle fiber size, phenotype and myonuclear number / Y. Ohira, T. Yoshinaga, T. Nomura [et al] // *Adv Space Res.* – 2002. – Vol. 30(4). – P. 777-781.
109. Ohira, Y. Rat soleus muscle fiber responses to 14 days of spaceflight and hindlimb suspension / Y. Ohira, B. Jiang, J. Roy [et al] // *Appl. Physiol.* (1985). – 1992. – Vol. 73(2 Suppl). – P. 51-57.
110. Olthoff, J.T. Loss of peroxiredoxin-2 exacerbates eccentric contraction-induced force loss in dystrophin-deficient muscle / J.T. Olthoff, A. Lindsay, R. Abo-Zahrah [et al] // *Nat Commun.* – 2018. – Vol. 9(1). – P. 5104.
111. Oppizzi, M.L. Nuclear translocation of beta-dystroglycan reveals a distinctive trafficking pattern of autoproteolyzed mucins / M.L. Oppizzi, A. Akhavan, M. Singh [et al] // *Traffic.* – 2008. – Vol. 9(12). – P. 2063-2072.
112. Ortegren, U. Lipids and glycosphingolipids in caveolae and surrounding plasma membrane of primary rat adipocytes / U. Ortegren, M. Karlsson, N. Blazic [et al] // *Eur. J. Biochem.* – 2004. – Vol. 271(10). – P. 2028-36.

113. Palsdottir, H. Structure of the yeast cytochrome bc₁ complex with a hydroxyquinone anion Qo site inhibitor bound / H. Palsdottir, C.G. Lojero, B.L. Trumppower [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2003. – Vol.278(33). – P. 31303-31311.
114. Pardo, J.V. Subcellular sorting of isoactins: selective association of gamma actin with skeletal muscle mitochondria / J.V. Pardo, M.F. Pittenger, S.W. Craig // *Cell.* – 1983. – Vol.32(4). – P.1093-1103.
115. Parton, R.G. Caveolae: Formation, dynamics, and function / R.G. Parton, K.A. McMahon, Y. Wu // *Curr. Opin. Cell Biol.* – 2020. – Vol. 65. – P. 8-16.
116. Peter, J.B. Metabolic profiles of three fiber types of skeletal muscle in guinea pigs and rabbits / J.B. Peter, R.J. Barnard, V.R. Edgerton [et al.] // *Biochemistry.* – 1972 – Vol. 11(14). – P. 2627-2633.
117. Petrov, A.M. Membrane lipid rafts are disturbed in the response of rat skeletal muscle to short-term disuse / A.M. Petrov, V.V. Kravtsova, V.V. Matchkov [et al.] // *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* – 2017 – Vol. 312(5). – P. 627-637.
118. Pierre, N. From physical inactivity to immobilization: Dissecting the role of oxidative stress in skeletal muscle insulin resistance and atrophy / N. Pierre, Z. Appriou, A. Gratas-Delamarche [et al.] // *Free Radic. Biol. Med* - 2016. – Vol. 98. – P. 197–207.
119. Pitto, M. Use of a photoactivable GM1 ganglioside analogue to assess lipid distribution in caveolae bilayer / M. Pitto, J. Brunner, A. Ferraretto [et al.] // *Glycoconj. J.* – 2000. – Vol. 17(3-4). – P. 215-222.
120. Porter, G.A. Dystrophin colocalizes with beta-spectrin in distinct subsarcolemmal domains in mammalian skeletal muscle / G.A. Porter, G.M. Dmytrenko, J.C. Winkelmann [et al.] // *J. Cell. Biol.* – 1992. – Vol. 117(5). – P. 997-1005.
121. Powers, S.K. Redox control of skeletal muscle atrophy / S.K. Powers, A.B. Morton, B. Ahn [et al.] // *Free Radic. Biol. Med* – 2016. – Vol. 98. – P. 208–217.

122. Powl, A.M. Anionic phospholipids affect the rate and extent of flux through the mechanosensitive channel of large conductance MscL / A.M. Powl, J.M. East, A.G. Lee // *Biochemistry*. – 2008. – Vol. 47(14). – P. 4317-4328.
123. Pribiag, H. Dystroglycan mediates homeostatic synaptic plasticity at GABAergic synapses / H. Pribiag, H. Peng, W.A. Shah [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. – 2014 – Vol. 111(18). – P. 6810-6815.
124. Repetto, S. Increased number of caveolae and caveolin-3 overexpression in Duchenne muscular dystrophy / S. Repetto, M. Bado, P. Broda [et al.] // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1999. – Vol. 261(3). - P.547-550.
125. Ridder, A.N. Analysis of the role of interfacial tryptophan residues in controlling the topology of membrane proteins / A.N. Ridder, S. Morein, J.G. Stam [et al.] // *Biochemistry*. – 2000. – Vol. 39(21). – P. 6521-6528.
126. Root, K.T. Recent progress in the topology, structure, and oligomerization of caveolin: a building block of caveolae / K.T. Root, S.M. Plucinsky, K.J. Glover // *Curr. Top. Membr.* – 2015. – Vol. 75. – P. 305-336.
127. Rybakova, I.N. Dystrophin-glycoprotein complex is monomeric and stabilizes actin filaments in vitro through a lateral association / I.N. Rybakova, J.M. Ervasti // *J. Biol. Chem.* – 1997. – Vol. 272(45). – P. 28771-28778.
128. Rybakova, I.N. The dystrophin complex forms a mechanically strong link between the sarcolemma and costameric actin / I.N. Rybakova, J.R. Patel, J.M. Ervasti // *J. Cell Biol.* – 2000. – Vol. 150(5). – P. 1209-1214.
129. Salaun, E. Myriocin prevents muscle ceramide accumulation but not muscle fiber atrophy during short-term mechanical unloading / E. Salaun, L. Lefeuvre-Orfila, T. Cavey [et al.] // *J. Appl. Physiol.* (1985). - 2016. – Vol. 120(2). – P. 178-187.
130. Sargiacomo, M. Oligomeric structure of caveolin: implications for caveolae membrane organization / M. Sargiacomo, P.E. Scherer, Z. Tang [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. – 1995. – Vol. 92(20). – P. 9407-9411.

131. Schiaffino, S. Fiber types in mammalian skeletal muscles / S. Schiaffino, C. Reggiani // *Physiol. Rev.* – 2011. – Vol. 91(4). – P. 1447-1531.
132. Schuenke, M.D. Effects of 14 days of microgravity on fast hindlimb and diaphragm muscles of the rat / M.D. Schuenke, D.W. Reed, W.J. Kraemer [et al.] // *Eur. J. Appl. Physiol.* – 2009. – Vol. 106(6). – P. 885-892.
133. Schwartz, L.M. Skeletal muscles do not undergo apoptosis during either atrophy or programmed cell death-revisiting the myonuclear domain hypothesis / L.M. Schwartz // *Front. Physiol.* – 2019. – Vol. 9. - P. 1887.
134. Seward, D.J. bHLH transcription factor MyoD affects myosin heavy chain expression pattern in a muscle-specific fashion / D.J. Seward, J.C. Haney, M.A. Rudnicki [et al.] // *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* – 2001. – Vol. 280(2). – P. 408-413.
135. Shah, W.A. Role of non-raft cholesterol in lymphocytic choriomeningitis virus infection via alpha-dystroglycan / W.A. Shah, H. Peng, S. Carbonetto // *J. Gen. Virol.* – 2006. – Vol. 87(Pt 3). – P. 673-678.
136. Shen, T. Regulation of the nuclear export of the transcription factor NFATc1 by protein kinases after slow fibre type electrical stimulation of adult mouse skeletal muscle fibres / T. Shen, Z. Cseresnyés, Y. Liu [et al.] // *J. Physiol.* – 2007. – Vol. 579(Pt 2). – P. 535-551.
137. Shen T. DNA binding sites target nuclear NFATc1 to heterochromatin regions in adult skeletal muscle fibers / T. Shen, Y. Liu, M. Contreras [et al.] // *Histochem. Cell Biol.* – 2010. – Vol. 134(4). – P. 387-402.
138. Shenkman, B.S. From Slow to Fast: Hypogravity-Induced Remodeling of Muscle Fiber Myosin Phenotype / B.S. Shenkman // *Acta. Naturae.* – 2016. – Vol. 8(4). – P. 47-59.
139. Simons, K. Membrane organization and lipid rafts / K. Simons, J.L. Sampaio // *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* – 2011. – Vol. 3(10). – P. a004697.
140. Simons, K. Lipid sorting in epithelial cells / K. Simons, G. van Meer // *Biochemistry.* – 1988. – Vol. 27(17). – P. 6197-6202.

141. Sonnemann, K.J. Cytoplasmic gamma-actin is not required for skeletal muscle development but its absence leads to a progressive myopathy / K.J. Sonnemann, D.P. Fitzsimons, J.R. Patel [et al.] // *Dev. Cell.* – 2006. – Vol. 11(3). – P. 387-397.
142. Stevenson, E.J. Global analysis of gene expression patterns during disuse atrophy in rat skeletal muscle / E.J. Stevenson, P.G. Giresi, A. Koncarevic [et al.] // *J. Physiol.* – 2003. – Vol. 551. – P. 33–48.
143. Isfort, R.J. Proteomic analysis of rat soleus muscle undergoing hindlimb suspension-induced atrophy and reweighting hypertrophy / R.J. Isfort, F. Wang, K. Greis [et al.] // *Proteomics.* – 2002. – Vol. 2. – P. 543–550.
144. Strle, K. Proinflammatory cytokine impairment of insulin-like growth factor I-induced protein synthesis in skeletal muscle myoblasts requires ceramide / K. Strle, S.R. Broussard, R.H. McCusker [et al.] // *Endocrinology.* – 2004. – Vol. 145(10). – P. 4592-4602.
145. Summers, S.A. Ceramides in insulin resistance and lipotoxicity / S.A. Summers // *Prog. Lipid Res.* – 2006. – Vol. 45. – P. 42–72.
146. Tan-Chen S. Sphingolipid Metabolism and Signaling in Skeletal Muscle: From Physiology to Physiopathology / S. Tan-Chen, J. Guitton, O. Bourron [et al.] // *Front. Endocrinol. (Lausanne).* – 2020. – Vol. 11. – P. 491.
147. Tang J.X. Garg cholesterol interaction: A possible mechanism of cytoskeleton-based regulation of membrane organization / J.X. Tang, J. Rühle, C.A. Naumann // *J. Struct. Biol.* – 2009. – Vol. 168(1). – P. 11-20.
148. Tang, Z. Molecular cloning of caveolin-3, a novel member of the caveolin gene family expressed predominantly in muscle / Z. Tang, P.E. Scherer, T. Okamoto [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 1996. – Vol. 271(4). – P. 2255-2261.
149. Taniguchi, Y. Rapid phase change of lipid microdomains in giant vesicles induced by conversion of sphingomyelin to ceramide / Y. Taniguchi, T. Ohba, H. Miyata [et al.] // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2006. – Vol. 1758. – P. 145–153.

150. Tavi, P. The role of in vivo Ca^{2+} signals acting on Ca^{2+} -calmodulin-dependent proteins for skeletal muscle plasticity / P. Tavi, H. Westerblad // *J. Physiol.* – 2011. Vol. 589(Pt 21). – P. 5021-5031.
151. Tidball, J.G. Expression of a calpastatin transgene slows muscle wasting and obviates changes in myosin isoform expression during murine muscle disuse / J.G. Tidball, M.J. Spencer // *J. Physiol.* – 2002. – Vol. 545(3). – P. 819-828.
152. Turpin, S.M. Apoptosis in skeletal muscle myotubes is induced by ceramides and is positively related to insulin resistance / S.M. Turpin, G.I Lancaster, I. Darby [et al.] // *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* – 2006. – Vol. 291. – P. 1341-1350.
153. Valentijn, K. Role of actin in regulated exocytosis and compensatory membrane retrieval: insights from an old acquaintance / K. Valentijn, J.A. Valentijn, J.D. Jamieson // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1999. – Vol. 266(3). – P. 652-661.
154. van Meer, G. Sphingolipid transport: rafts and translocators // G. van Meer, Q. Lisman // *J Biol Chem.* – 2002. – Vol. 277(29). – P. 25855-25858.
155. van Meer, G. Membrane lipids: where they are and how they behave / G. van Meer, D.R. Voelker, G.W. Feigenson // *Nat Rev Mol Cell Biol.* – 2008. – Vol. 9(2). - P. 112-124.
156. Vega-Moreno, J. Cholesterol depletion uncouples β -dystroglycans from discrete sarcolemmal domains, reducing the mechanical activity of skeletal muscle / J. Vega-Moreno, A. Tirado-Cortes, R. Álvarez [et al.] // *Cell Physiol Biochem.* – 2012. – Vol. 29(5-6). – P. 905-918.
157. Vikne, H. Human skeletal muscle fiber type percentage and area after reduced muscle use: A systematic review and meta-analysis / H. Vikne, V. Strøm, A.H. Pripp [et al.] // *Scand J Med Sci Sports.* – 2020. – Vol. 30(8). – P. 1298-1317.
158. von Tresckow, B. Depletion of cellular cholesterol and lipid rafts increases shedding of CD30 / B. von Tresckow, K.J. Kallen, E.P. von Strandmann [et al.] // *J Immunol.* – 2004. – Vol. 172(7). – P. 4324-4331.

159. Way, M. Expression of the N-terminal domain of dystrophin in *E. coli* and demonstration of binding to F-actin / M. Way, B. Pope, R.A. Cross [et al.] // FEBS Lett. – 1992. – Vol. 301(3). - P. 243-245.
160. Wayne, R.R., Chapter 2 - Cell Membrane Structures and Functions / R.R. Wayne // Basic Neurochemistry (Eighth Edition). - Academic Press. – 2012. – P. 26-39.
161. Wheeler, MT. An E-box within the MHC IIB gene is bound by MyoD and is required for gene expression in fast muscle / M.T. Wheeler, E.C. Snyder, M.N. Patterson [et al.] // Am J Physiol. – 1999. - Vol. 276(5). - P. 1069-7108.
162. Whiteley, G. Characterization of the molecular architecture of human caveolin-3 and interaction with the skeletal muscle ryanodine receptor / G. Whiteley, R.F. Collins, A. Kitmitto // J Biol Chem. – 2012. – Vol. 287(48). – P. 40302-16.
163. Winder, S.J. The membrane-cytoskeleton interface: the role of dystrophin and utrophin / S.J. Winder // J Muscle Res Cell Motil. – 1997. – Vol. 18(6). – P. 617-629.
164. Yu, J. Selective solubilization of proteins and phospholipids from red blood cell membranes by nonionic detergents / J. Yu, D.A. Fischman, T.L. Steck // J Supramol Struct. – 1973. – Vol. 1(3). – P. 233-248.
165. Zeidan, YH. Activation of acid sphingomyelinase by protein kinase Cdelta-mediated phosphorylation / Y.H. Zeidan, Y.A. Hannun // J Biol Chem. – 2007. – Vol. 282(15). - P. 11549-11561.
166. Zhao, J. Dystrophin contains multiple independent membrane-binding domains / J. Zhao, K. Kodippili, Y. Yue [et al.] // Hum Mol Genet. – 2016. – Vol. 25(17). – P. 3647-3653.
167. Zhou, H. Inhibition of Akt kinase by cell-permeable ceramide and its implications for ceramide-induced apoptosis / H. Zhou, A. Summers, J. Birnbaum // Biol. Chem. – 1998. – Vol. 273. – P. 16568 – 16575.
168. Zinchuk, V. Quantitative colocalization analysis of multicolor confocal immunofluorescence microscopy images: pushing pixels to explore biological

phenomena / V. Zinchuk, O. Zinchuk, T. Okada // *Acta Histochem Cytochem.* – 2007. – Vol. 40(4). – P. 101-111.