



**Biological motility**

— Pushchino 2019 —

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК  
ИНСТИТУТ ТЕОРЕТИЧЕСКОЙ  
И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ БИОФИЗИКИ  
ИНСТИТУТ БИОФИЗИКИ КЛЕТКИ

## МАТЕРИАЛЫ

XII Всероссийского симпозиума  
с международным участием

### **«Биологическая подвижность»**,

посвященного памяти  
заслуженного деятеля науки РФ,  
профессора З.А. Подлубной

Пушино  
2019

УДК 577.3  
ББК 28.07  
Б633

Биологическая подвижность. Материалы XII Всероссийского симпозиума / Товарищество научных изданий КМК. – Пушино: 2019. – 344 с.

Сборник содержит материалы XII Международного симпозиума с международным участием «Биологическая подвижность», посвященного памяти заслуженного деятеля науки РФ, профессора З.А. Подлубной. Симпозиум состоялся в Пушино Московской области с 17 по 19 мая 2019 г. и был посвящен новым достижениям и перспективам в этой области знаний: основам сокращения мышц, пластичности мышц и цитоскелета, подвижности мышц, новым инструментам и методологии.

Материалы Симпозиума представляют интерес для биологов, медиков и других специалистов.

Все материалы даны в авторской редакции

Ответственный за выпуск С.Н. Удальцов

Симпозиум проведен при финансовой поддержке  
Российского фонда фундаментальных исследований,  
грант № 19-04-20005

**ISBN 978-5-907213-11-1**

© Институт теоретической  
и экспериментальной биофизики РАН, 2019  
© KMK Scientific Press Ltd., 2019



**Biological motility**

— Pushchino 2019 —

RUSSIAN ACADEMY OF SCIENCES  
INSTITUTE OF THEORETICAL  
AND EXPERIMENTAL BIOPHYSICS  
INSTITUTE OF CELL BIOPHYSICS

XII All-Russian Symposium  
with International participation  
dedicated to the memory  
of Honored Scientist of the Russian Federation,  
professor Z.A. Podlubnaya

## **BIOLOGICAL MOTILITY**

ABSTRACT BOOK

Pushchino • 2019



**ЗОЯ АЛЕКСАНДРОВНА ПОДЛУБНАЯ –  
ТАЛАНТЛИВЫЙ УЧЕНЫЙ И ОРГАНИЗАТОР НАУКИ**



З.А. Подлубная  
(24.03.1937 – 26.03.2018)

Зоя Александровна Подлубная родилась в Твери. Там прошли ее детство и юность. Мать работала водителем трамвая, и семья жила более чем скромно. Школу Зоя закончила в 1955 году с золотой медалью и в этом же году поступила на химический факультет Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова.

Закончив университет в 1960 году с красным дипломом, она поступила в аспирантуру химического факультета МГУ на кафедру высокомолекулярных соединений, руководимую академиком В.А. Каргиным. Свои научные исследования З.А. Подлубная сосредоточила на изучении биополимеров, в частности, белков, и в 1965 году успешно защитила кандидатскую диссертацию на тему «Процессы ассоциации и диссоциации белков при многокамерном электродиализе».

В 1965 году академик Г.М. Франк пригласил Зою Александровну на работу в Пущино, в Институт биологической физики АН СССР, с которым оказались неразрывно связаны вся ее дальнейшая жизнь и научная карьера. Под ее руководством была организована научная группа по изучению структурно-функциональных свойств мышечных белков, входившая в состав лаборатории Франка. В Институте З.А. Подлубная прошла путь от младшего научного сотрудника до зав. лабораторией, стала одним из ведущих специалистов в области мышечного сокращения; в 1990 году блестяще защитила докторскую диссертацию на тему «Структурно-функциональные

исследования сократительных нитей и их отдельных белковых компонентов в поперечно-полосатых мышцах позвоночных».

В первые годы работы в группе З.А. Подлубной были выполнены пионерские исследования фрагмента миозина – легкого меромиозина – и его упаковки в стволе толстой нити. В дальнейшем было показано, что толстая нить – сложный мультибелковый комплекс, в котором ряд минорных белков выполняет как ферментативные, так и регуляторные функции. Успеху исследований способствовало то, что Зоя Александровна была также прекрасным специалистом в электронной микроскопии, успешно применяя на практике свои навыки и умения.

Группа З.А. Подлубной в 1991 году была преобразована в лабораторию структуры и функции мышечных белков Института теоретической и экспериментальной биофизики РАН, образовавшегося при разделе Института биологической физики. Основными направлениями работы этой лаборатории стали структурно-функциональные исследования сократительных нитей и составляющих их белков скелетных, сердечных и гладких мышц; выяснение их роли в механизмах мышечного сокращения.

Теоретический и экспериментальный опыт, накопленный при изучении скелетных и сердечных мышц в норме, позволил в дальнейшем перейти к изучению адаптационных и патологических изменений в сократительном аппарате скелетных мышц и миокарда и поиску возможных путей коррекции миопатий.

Зоя Александровна участвовала в совместных исследованиях не только с советскими/российскими учеными, но и с коллегами из Польши, Венгрии, Германии. Она отличалась исключительной работоспособностью. Даже находясь в командировках, она часто сидела за микроскопом до позднего вечера. Уже в зрелом возрасте временами сетовала на то, что больше времени уделяла науке, чем семье. Самотверженность по отношению к науке стало своего рода завещанием для молодежной лаборатории, которую она сформировала в конце своей жизни.

Зоя Александровна проводила активную работу по подготовке молодых специалистов, руководя стажерами и аспирантами. Практически все они в дальнейшем успешно защищали диссертации и приобретали известность в научном сообществе. За консультациями к З.А. Подлубной и ее ученикам регулярно обращались как отечественные, так и зарубежные специалисты в области мышечных исследований.

После образования Пушинского государственного университета Зоя Александровна преподавала в нем в качестве профессора кафедры теоретической и прикладной цитотехнологии. Она была избрана членом Научного Совета по проблемам биологической физики РАН и руководила в нем секцией «Биологическая подвижность». Ее большая научно-организационная работа как председателя этой секции была направлена в первую очередь на объединение усилий ученых разных институтов России для решения актуальных проблем мышечного сокращения в рамках объединенных проектов.

Зоя Александровна Подлубная имела ученое звание профессора (1993 год), заслуженного деятеля науки Российской Федерации (2009 год). Была награждена правительственными наградами.

Стремление З.А. Подлубной к развитию полноценного научного общения ученых, объединению усилий ученых разных институтов России, стран ближнего и дальнего зарубежья привело к идее проведения регулярных научных встреч, объединенных понятием биологической подвижности во всех ее аспектах. Надо заметить, что с распадом Советского Союза прекратилась функционировать налаженная система регулярных конференций по биологической подвижности и немышечным формам подвижности, в результате чего в начале 90-х годов возник определенный «вакуум» в научных контактах. Поэтому в 1994 году в Пушинском научном центре благодаря усилиям сотрудников ИТЭБ РАН и ИБК РАН состоялся международный симпозиум «Биологическая подвижность», в работе которого участвовало около 160 ученых из России, ближнего и дальнего зарубежья, в том числе из Австрии, Англии, Азербайджана, Белоруссии, Венгрии, Польши, США, Франции, Швеции и других стран. Его главным организатором и председателем Оргкомитета была З.А. Подлубная. Симпозиум был приурочен к 90-летию со дня рождения академика Г.М. Франка, уделявшего при жизни большое внимание исследованиям мышечной и других форм подвижности. Эта научная встреча прошла с большим успехом, а ее участниками было принято решение сделать пушинские симпозиумы по биологической подвижности регулярными.

Из последующих мероприятий следует особо отметить состоявшийся в 2004 году V симпозиум по биологической подвижности. Он был посвящен 100-летию со дня рождения Г.М. Франка. З.А. Подлубная смогла разыскать родственников не только по отцу Глеба Михайловича – Михаила Людвиговича, но и по линии брата отца Глеба Михайловича – Семена Людвиговича. Живя за границей, многие из них уже не владели русским языком, но они сохранили много воспоминаний, демонстрировали семейные фотографии. Все родственники Глеба Михайловича горячо благодарили Зою Александровну за такой своеобразный праздник. Если оценивать с научной точки зрения, сам симпозиум прошел на высоком международном уровне.

Эффективность регулярного научного общения на пушинских симпозиумах подтверждалась и тем, что благодаря этим встречам возникали новые научные контакты, переходящие в длительное и плодотворное научное сотрудничество. Успешным примером его может служить многолетнее взаимодействие лаборатории структуры и функции мышечных белков ИТЭБ РАН с Институтом медико-биологических проблем и Кардиологическим научным центром.

Организаторы очередного, XII симпозиума, посвящают его светлой памяти Зои Александровны Подлубной.

к.б.н. З.И. Вишневская,  
к.б.н. С.Н. Удальцов

**ZOYA ALEKSANDROVNA PODLUBNAYA –  
TALENTED SCIENTIST AND ORGANIZER OF SCIENCE**



Z.A. Podlubnaya  
(24.03.1937 – 26.03.2018)

Zoya Alexandrovna Podlubnaya was born in Tver. There she spent her childhood and youth. Mother worked as a tram driver, and the family lived more than modestly. Zoya graduated from school in 1955 with a gold medal and in the same year entered the chemical faculty of Lomonosov Moscow State University.

After graduating from university in 1960 with a red diploma, she entered the post-graduate course of the chemical faculty of Moscow State University in the department of high-molecular compounds headed by academician V.A. Kargin. His research Z.A. Podlubnaya focused on the study of biopolymers, in particular, proteins, and in 1965 successfully defended her thesis on "The processes of association and dissociation of proteins in multi-chamber electro dialysis."

In 1965, academician G.M. Frank invited Zoya Alexandrovna to work in Pushchino, at the Institute of Biological Physics of the USSR Academy of Sciences, with which her entire future life and scientific career were inextricably linked. Under her leadership, a scientific group was organized to study the structural and functional properties of muscle proteins. This group was a part of the laboratory of Frank. In the Institute Z.A. Podlubnaya had a career from a junior researcher to the head of laboratory and has become one of the leading experts in the field of muscle contraction. In 1990, she brilliantly defended her doctoral thesis on the topic "Structural and functional studies of contractile filaments and their individual protein components in the striated muscles of vertebrates."



During the first years of work in the group of Z.A. Podlubnaya the pioneer studies of a fragment of myosin - light meromyosin - and its packaging in the thick filament were performed. Later it was shown that the thick filament is a multi-protein complex in which a number of minor proteins perform both enzymatic and regulatory functions. The success of research was promoted by the fact that Zoya Aleksandrovna was also an excellent expert in electron microscopy, successfully applying her skills in practice.

Group of Z.A. Podlubnaya in 1991 was transformed into the laboratory of the structure and function of muscle proteins of the Institute of Theoretical and Experimental Biophysics of the Russian Academy of Sciences, which was formed during the division of the Institute of Biological Physics. The main areas of this laboratory were structural and functional studies of the contractile filaments and their constituent proteins of skeletal, cardiac, and smooth muscles; finding out their role in the mechanisms of muscle contraction.

Theoretical and experimental experience gained in the study of skeletal and cardiac muscles in normal state, allowed to proceed further to the study of adaptation and pathological changes in the contractile apparatus of skeletal muscles and myocardium and the search for possible ways of myopathy correction.

Zoya Alexandrovna participated in joint investigations not only with Soviet / Russian scientists, but also with colleagues from Poland, Hungary, Germany. She had exceptional performance. Even on business trips, she often sat behind a microscope until late in the evening. At a mature age, at times she complained that she devoted more time to science than to her family. Selflessness towards science became a testament of sorts for the youth laboratory that she formed in the last years of her life.

Zoya Alexandrovna was actively involved in the training of young specialists, supervising trainees and graduate students. Practically all of them later successfully defended dissertations and gained fame in the scientific community. Both domestic and foreign specialist in the field of muscle research regularly contacted with Z.A. Podlubnaya and her students to obtain some consultations.

After the formation of Pushchino State University, Zoya Alexandrovna taught there as a professor in the Department of Theoretical and Applied Cytotechnology. She was elected a member of the Scientific Council on the Problems of Biological Physics of the Russian Academy of Sciences and chaired the section "Biological motility". Her great scientific and organizational work as the chairman of this section was aimed primarily at combining the efforts of scientists from various Russian institutions to solve actual problems of muscle contraction in the framework of joint projects.

Zoya Alexandrovna Podlubnaya had the academic title of professor (1993), honored worker of science of the Russian Federation (2009). She was awarded government awards.

The longing of Z.A. Podlubnaya to the full-fledged scientific communication of scientists, the unification of the efforts of scientists from different institutions of Russia, countries of near and far abroad led to the idea of holding regular scientific meetings, united by the concept of biological motility in all its aspects. It should be noted that with the collapse of the Soviet Union, the established system of regular conferences on biological motility and non-muscle forms of motility ceased to function, as a result in the early 1990s a certain "vacuum" arose in scientific contacts. Therefore, in 1994, due to the efforts of the staff of ITEB RAS and IBK RAS, an international symposium "Biological motility" was held in the Pushchino Scientific Center, in which about 160 scientists from Russia, the near and far abroad, including Austria, England, Azerbaijan, Belarus, Hungary, Poland, USA, France, Sweden and other countries participated. Its main organizer and

chairman of the Organizing Committee was Z.A. Podlubnaya. The symposium was dedicated to the 90th anniversary of the birth of Academician G.M. Frank, who during his life paid much attention to the study of muscle and other forms of motility. This scientific meeting was a great success, and its participants decided to make regular Pushchino's symposia on biological motility.

Of the follow-up activities, the V Symposium on Biological Motility held in 2004 should be particularly noted. It was dedicated to the 100th anniversary of the birth of G.M. Frank. Z.A. Podlubnaya could find relatives not only after Gleb Mikhailovich's father - Mikhail Lyudvigovich, but also through the line of Gleb Mikhailovich's brother - Semyon Lyudvigovich. While living abroad, many of them no longer knew Russian, but they retained many memories, showed family photos. All relatives of Gleb Mikhailovich warmly thanked Zoya Alexandrovna for such a kind of holiday. Scientifically evaluated, the symposium itself was held at a high international level.

The effectiveness of regular scientific communication at the Pushchino's symposia was also confirmed by the fact that due to these meetings new scientific contacts arose, turning into a long and fruitful scientific cooperation. A successful example of such contacts is the long-term interaction of the laboratory of the structure and function of muscle proteins of ITEB RAS with the Institute of Biomedical Problems and the Cardiology Research Center.

The organizers of the XII symposium dedicate it to the blessed memory of Zoya Alexandrovna Podlubnaya.

Z.I. Vishnevskaya,  
S.N. Udaltsov

## СОЧЕТАННОЕ ДЕЙСТВИЕ КОФЕИНА И ИОНОВ МАГНИЯ НА КАЛЬЦИЕВЫЕ ДЕПО СКЕЛЕТНЫХ МЫШЦ

О.М. Алексеева

*Институт биохимической физики РАН им. Н.М. Эмануэля*

*Россия, 119334, Москва, ул. Косыгина д. 4*

*(495)939-74-09, факс (499)137-41-01, e-mail: olgavek@yandex.ru*

В работе рассматривается роль эндогенных и экзогенных факторов на работу основного кальциевого депо скелетных поперечно полосатых мышц – саркоплазматического ретикулума (СР). Выбраны 2 вещества, которые в природе могут воздействовать на регуляцию функционирования СР. Кофеин, как экзогенное вещество, доступен для животного организма, так как широко распространен в растительных продуктах, потребляемых в пищу. Его аналоги теобромин, теofilлин, камфора также, как и кофеин активируют освобождение ионов  $\text{Ca}^{2+}$  через рианодинорый рецептор (РиР) из СР [1] и РиР в эндоплазматическом ретикулуме в других типах тканей. Поэтому фрагментированный СР (ФСР) является актуальным и доступным экспериментальным объектом. ФСР был выделен из белых скелетных мышц кролика, с быстрым гликолитическим путем получения энергии. Соответственно содержание митохондрий снижено, и препараты ФСР, практически не содержат митохондрий и их фрагментов. Эндогенные факторы -  $\text{Mg}^{2+}$  и  $\text{Ca}^{2+}$  играют ведущую роль в процессах регуляции ферментативной активности Са-АТФазы [2] и работы РиР [3]. В ходе ферментативного цикла Са-АТФазы ( $\text{Ca}^{2+}$ -насоса ФСР) и активации РиР  $\text{Mg}^{2+}$  и  $\text{Ca}^{2+}$  конкурируют за места связывания в зависимости от концентрации  $\text{Mg}^{2+}$  и  $\text{Ca}^{2+}$  [2, 3]. Кофеин снижает Са/АТФ - эффективность транспорта  $\text{Ca}^{2+}$  (соотношение количества перенесенного через мембрану  $\text{Ca}^{2+}$  к количеству гидролизованного АТФ), т.к. кофеин усиливает выход  $\text{Ca}^{2+}$  через РиР- $\text{Ca}^{2+}$  канал, увеличивая чувствительность РиР к  $\text{Ca}^{2+}$  [4]. Воздействие кофеина усиливается при увеличении концентрации  $\text{Mg}^{2+}$  и свободных жирных кислот (СЖК) в ФСР и снижается при экстракции СЖК из ФСР (табл. 1).

Полученные данные о том, что эффект кофеина на снижение  $\text{Ca}^{2+}/\text{АТФ}$  усиливается в присутствии СЖК в ФСР, и снижается при экс-

Таблица 1. Влияние  $\text{Mg}^{2+}$  и СЖК в ФСР на  $\text{Ca}^{2+}/\text{АТФ}$

ФСР	1мМ $\text{Mg}^{2+}$		4 мМ $\text{Mg}^{2+}$	
	-	5 мМ кофеина	-	5 мМ кофеина
ФСР*	0,8±0,05	0,3±0,05 63%	1,8±0,05	0,8±0,05 57%
ФСР	0,7±0,05	0,25±0,05 65%	1,2±0,05	0,35±0,05 70%

Примечание: ФСР\* - мембраны, освобожденные от СЖК при экстракции сывороточным альбумином человека.

тракции СЖК из ФСР, а также увеличение концентрации  $Mg^{2+}$  усиливает эффект кофеина, указывают на сочетанное воздействие на  $Ca^{2+}$ -связывающие центры  $Ca^{2+}$ -АТФ-азы и РнР кофеина и  $Mg^{2+}$  в механизме функционирования  $Ca^{2+}$ -депо СР и его нарушениях. Влияние изменения содержания СЖК в мембранах ФСР указывает на вклад пассивной проницаемости мембран в это сочетанное воздействие эндогенных и экзогенных факторов. Учитывая необходимость поддержания определенного  $Ca^{2+}$ -градиента через мембрану ФСР для функционирования  $Ca^{2+}$ -депо [5], СЖК и  $Mg^{2+}$  могут являться регуляторами процесса.

Необходимо отметить, что эффекты катионов  $Mg^{2+}$  и  $Ca^{2+}$  и кофеина являются общими для РнР как скелетных мышц, так и сердечных [4], что также подчеркивает необходимость исследований на простых моделях ФСР.

### Литература

1. Alekseeva O.M., Kim Yu. A. (2008). The influence of caffeine analogues and antagonists on the  $Ca^{2+}$ -accumulation by sarcoplasmic reticulum at skeletal muscle. Nova Science Publishers, New York, Ed. by G.E. Zaikov. Book Chapter V. 11. P. 120–125.
2. Zafar S., Hussain A., Liu Y., Lewis D., Inesi G. (2008). Specificity of ligand binding to transport sites:  $Ca^{2+}$  binding to the  $Ca^{2+}$  transport ATPase and its dependence on  $H^+$  and  $Mg^{2+}$  // Arch Biochem Biophys. V. 476. N 1. P. 87–94.
3. Laver D.R. (2018) Regulation of the RyR channel gating by  $Ca^{2+}$  and  $Mg^{2+}$ .// Biophys Rev. N. 4. P. 1087-1095.
4. Murayama T., Ogawa H., Kurebayashi N., Ohno S., Horie M., Sakurai T. (2018). A tryptophan residue in the caffeine-binding site of the ryanodine receptor regulates  $Ca^{2+}$ -sensitivity // Communications Biology. V. 1. P. 98.
5. Vekshina O., Kim Yu., Vekshin N. (2008). “Magic” calcium gradient for the operation of the sarcoplasmic reticulum”. Book “Progress in Biochemical Physics, Kinetics and Thermodynamics” Nova Science Publishers, New York, Ed. by G.E.Zaikov. pp. 141-155.

## COMPLEX ACTIONS OF CAFFEINE AND MAGNESIUM IONS TO THE CALCIUM DEPO OF SKELETAL MUSCLES

**O.M. Alekseeva**

*N.M. Emanuel Institute of Biochemical Physics RAS, Russia, 119334, Moscow,  
Kosygin St. 4, +74959397409, e-mail: olgavek@yandex.ru*

At our investigation of the roles of endogenic and exogenic factors to the function of basic calcium depot of rabbit skeleton muscles - sarcoplasmic reticulum (SR) were being considered. Two substances are used. These substances may have any effects to the regulation of functioning SR. Caffeine; the as exogenous substance was accessible to animals, since it is present at many plant products, and it is common in consumption as food. The methylxanthines - analogues of caffeine: theobromine, theophylline, the camphor, also, as caffeine activate the  $Ca^{2+}$ -ions releasing through the ryanodine receptor (RyR) from SR [1] and through the RyR contained at endoplasmic reticulum membranes at other types of tissues. By these the fragmented SR (FSR) is topical and available ex-

Table 1. Influence of  $Mg^{2+}$  concentrations and FFA to  $Ca^{2+}/ATP$  at FSR

FSR	1mM $Mg^{2+}$		4 mM $Mg^{2+}$	
	–	5 mM caffeine	–	5 mM caffeine
FSR *	0,8±0,05	0,3±0,05 63%	1,8±0,05	0,8±0,05 57%
FSR	0,7±0,05	0,25±0,05 65%	1,2±0,05	0,35±005 70%

Comment: FSR\* - membranes, which were treatment by the human serum albumin for FFA extraction.

perimental object. FSR was prepared from white rabbit skeletal muscles, with have quickly glycolytic pathway of energy generation. Respectively mitochondria content is diminished, and the preparations FSR, in practice contain no mitochondria and their fragments. The endogenic factors -  $Mg^{2+}$  and  $Ca^{2+}$  play the leading roles during regulation of enzyme activity of Ca-ATP-ase [2] and work of RyR [3]. At the processes of enzymatic cycle of Ca-ATP-ase ( $Ca^{2+}$ -pump of FSR) and of RyR activating  $Mg^{2+}$  competes with  $Ca^{2+}$  at the binding ions sites in depending of  $Mg^{2+}$  and  $Ca^{2+}$  to concentration [2, 3]. The caffeine addition reduces of value of  $Ca^{2+}/ATP$ , which is mirrored of the  $Ca^{2+}$  transport effectiveness (the amount of  $Ca^{2+}$  ions transported through the FSR membrane/to amount of ATP that was hydrolyzed). This phenomenon was take place because the caffeine increase the  $Ca^{2+}$ -releasing through the RyR- $Ca^{2+}$ -channel, by increasing the sensibility of RyR to  $Ca^{2+}$  ions [4]. Caffeine action increased when concentration of  $Mg^{2+}$  ions raises and free fatty acids (FFA) in FSR presence. And caffeine action reduced when extraction FFA from FSR was provided (table 1).

Obtained data about the caffeine action to the lowering of  $Ca^{2+}/ATP$  value was increased at the presence of FFA at the FSR membranes, and caffeine effect was reduced when extraction FFA from FSR was provided, and when also were increased the concentrations of  $Mg^{2+}$  ions the caffeine effect were increased too. These facts indicate that combined actions of caffeine and  $Mg^{2+}$  and  $Ca^{2+}$  ions to the  $Ca^{2+}$ -binding points at  $Ca^{2+}$ -ATP-ase and RyR molecules and its combined roles in functioning mechanism of  $Ca^{2+}$ -depot of SR at normal and pathology. Influence of FFA changing at FSR membranes indicates the contribution of membrane passive permeability to that combined actions of endogenic and exogenic factors. Taking into account the need of certain  $Ca^{2+}$ -gradient maintaining through the FSR membrane for functioning of  $Ca^{2+}$ -depot [5], FFA and  $Mg^{2+}$  may be the controllers of these processes. It should be noted that the effects of  $Mg^{2+}$  and  $Ca^{2+}$  cations and caffeine are common for RyRs at mammalian skeletal and cardiac muscle [4]. That fact also increased the researcher's interest of investigations of endogenic and exogenic factors actions to the  $Ca^{2+}$ -depot functions by using of simple models - FSR.

### References

1. Alekseeva O.M., Kim Yu. A. (2008). The influence of caffeine analogues and antagonists on the  $Ca^{2+}$ -accumulation by sarcoplasmic reticulum at skeletal muscle. Nova Science Publishers, New York, Ed. by G.E. Zaikov. Book Chapter V. 11. P. 120–125.
2. Zafar S., Hussain A., Liu Y., Lewis D., Inesi G. (2008). Specificity of ligand binding to transport sites:  $Ca^{2+}$  binding to the  $Ca^{2+}$  transport ATPase and its dependence on  $H^+$  and  $Mg^{2+}$  // Arch Biochem Biophys. V. 476. N 1. P. 87–94.

3. Laver D.R. (2018) Regulation of the RyR channel gating by  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Mg}^{2+}$  // *Biophys Rev.* N. 4. P. 1087-1095.
4. Murayama T., Ogawa H., Kurebayashi N., Ohno S., Horie M., Sakurai T. (2018). A tryptophan residue in the caffeine-binding site of the ryanodine receptor regulates  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitivity // *Communications Biology.* V. 1. P. 98.
5. Vekshina O., Kim Yu., Vekshin N. (2008). "Magic" calcium gradient for the operation of the sarcoplasmic reticulum". Book "Progress in Biochemical Physics, Kinetics and Thermodynamics" Nova Science Publishers, New York, Ed. by G.E.Zaikov. pp. 141-155.

## **ЭФФЕКТЫ ДОНОРА ОКСИДА АЗОТА И БЛОКАТОРА NO-СИНТАЗЫ НА ЭЛЕКТРИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НЕЙРОНОВ ВИНОГРАДНОЙ УЛИТКИ**

**В.В. Андрианов<sup>1</sup>, Т.Х. Богодвид<sup>1,2</sup>, Л.Н. Муранова<sup>1</sup>,  
И.Б. Дерябина<sup>1</sup>, Х.Л. Гайнутдинов<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>*Институт фундаментальной медицины и биологии Казанского федерального университета, Казань, ул. Кремлевская, 18*

<sup>2</sup>*Академия физической культуры, спорта и туризма, Казань, деревня Универсиады, 35, Россия*

Анализ механизмов обучения и памяти демонстрирует, что существуют клеточные корреляты, которые выражаются в повышении нейрональной возбудимости при формировании условных рефлексов [1]. Найдено, что существует прямая взаимосвязь между мембранными характеристиками командных нейронов оборонительного поведения и пластическими модификациями поведения, что свидетельствует о сложной динамике изменений этих параметров при обучении [1]. Система оксида азота (NO) является одной из наиболее изучаемых систем организма. Однако, несмотря на то, что на сегодняшний день накопилось огромное количество данных о сигнальных мишенях оксида азота, однозначное мнение на этот счет отсутствует [2]. Обнаружено, что NO координирует ряд поведенческих программ у моллюсков, найдено, что NO участвует в процессах обучения и памяти [3, 4]. NO контролирует также пластические свойства нейронов: блокатор NO-синтазы способствовал развитию привыкания, а доноры NO давали эффект сенситизации. Показано участие NO в пластических изменениях синаптической передачи в различных системах, в том числе для нервной системы *Helix*. В экспериментах на препаратах виноградной улитки показано, что доноры NO увеличивают частоту спайкирования и снижают латентность спайков в идентифицированных нейронах [5]. В данной работе мы провели исследование роли NO в функционировании нервных клеток через изменения электрических характеристик командных нейронов LPa3 и RPa3 виноградной улитки при действии донора NO и блокатора NO-синтазы L-NAME.

Для экспериментов была выбрана виноградная улитка *Helix lucorum*, нервная система которых хорошо описана. Перед началом экспериментов моллюски не менее 2-х недель находились в активном состоянии. Анализ

электрических характеристик проводили на командных нейронах LPa3 и RPa3 оборонительного поведения. Измерения проводили с помощью внутриклеточных стеклянных микроэлектродов сопротивлением 3-10 МОм. Регистрировали мембранный потенциал покоя –  $V_m$  (исходное значение перед началом серии тактильных раздражений или электрической стимуляции и его величина в ходе эксперимента) и порог генерации потенциала действия -  $V_t$ . Исследовали эффекты аппликации (в течение 30 мин) блокатора NO-синтазы L-NAME (L-NG-nitro L-arginine methyl ester, Sigma, USA) в концентрации  $10^{-4}$  моль/л и нитропруссид натрия (SNP) - донора NO (в концентрации  $10^{-4}$  моль/л), в раствор, омывающий препарат интактных улиток. В экспериментах не было найдено достоверных отличий значений  $V_m$  и  $V_t$  между группами премоторных интернейронов LPa3 и RPa3. Аппликация L-NAME в концентрации  $10^{-4}$  моль/л в раствор, омывающий изолированный препарат улиток, вызвала постепенное снижение в течение 30 мин мембранного потенциала с  $-60.2 \pm 0.8$  мВ до  $-55.4 \pm 1.7$  мВ,  $n=5$  ( $p < 0.05$ ). Через 30 мин мембранный потенциал становился стабильным. Изменений порога генерации потенциала действия при этом не наблюдалось. Аппликация донора NO SNP в концентрации  $10^{-4}$  моль/л в раствор, наоборот, вызывает нарастающую гиперполяризацию мембраны командных нейронов на 5.5 мВ к 10-й минуте ( $p < 0.05$ ). Таким образом, результаты говорят о зависимости мембранного потенциала покоя премоторных интернейронов LPa3 и RPa3 *Helix lucorum* от уровня NO.

Работа поддержана РФФИ (грант № 18-015-00274).

## THE EFFECTS OF A DONOR OF NITRIC OXIDE AND INHIBITOR OF NO-SYNTASE ON THE ELECTRICAL CHARACTERISTICS OF NEURONS OF TERRESTRIAL SNAIL

V.V. Andrianov<sup>1</sup>, T.Kh. Bogodvid<sup>1,2</sup>, L.N. Muranova<sup>1</sup>,  
I.B. Deryabina<sup>1</sup>, Kh.L. Gainutdinov<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Institute of fundamental medicine and biology, Kazan Federal University, Kazan, Kremlevskaya str., 18*

<sup>2</sup>*Academy of physical culture, sports and tourism, Kazan, Universiade village, 35, Russia*

Analysis of the mechanisms of learning and memory demonstrates that there are cellular correlates, which are expressed in increasing of neuronal excitability in the formation of conditioned reflexes [1]. It is found that there is a direct relationship between the membrane characteristics of the command neurons of defensive behavior and plastic modifications of behavior, which indicates the complex dynamics of changes in these parameters during learning [1]. The system of nitric oxide (NO) is one of the most studied systems of the body. However, despite for today has accumulated a huge amount of data on the signaling targets of NO, a clear opinion on this matter is missing [2]. It is discovered that NO coordinates a number of behavioral programs in mollusks, it is found that

NO is involved in the processes of learning and memory [3, 4]. NO also controls the plastic properties of neurons: an inhibitor of NOS contributed to the development of habituation, and the NO donors caused the effect of sensitization. It was shown the participation of NO in the plastic changes of synaptic transmission in various systems, including the nervous system of *Helix*. In experiments on preparations of *Helix* it was shown that NO donors increased the frequency of spikes and reduced the latency of spikes in identified neurons [5]. In this paper we investigated the role of NO in the functioning of nerve cells through changes in the electrical characteristics of the command neurons LPa3 and RPa3 of the terrestrial snail under the action of the donor NO and the inhibitor of NO-synthase (NOS) L-NAME.

The terrestrial snails *Helix lucorum*, the nervous system of which is well described, were used for the experiments. Before the experiments, the mollusks were in the active state for at least 2 weeks. The electrical characteristics of the command neurons LPa3 and RPa3 of the snail's pneumostome closure reflex were analysed. The recordings of the electrical characteristics were carried out using intracellular glass microelectrodes with resistance of 3-10 MoM. The following parameters of nerve cells were recorded: membrane resting potential -  $V_m$  (initial value before the beginning of each electrical stimulation), and a threshold of generation of AP -  $V_t$  (threshold potential). The effects of the application (during 30 min) of NOS inhibitor L-NAME (L-NG-nitro L-arginine methyl ester, Sigma, USA) (at a concentration of  $10^{-4}$  mol/l) and sodium nitropruside (SNP), a donor of NO (at a concentration of  $10^{-4}$  mol/l), into the solution bathing the preparation of intact snails, on the membrane and threshold potentials of the command neurons were studied.

The measurements of electrical characteristics were carried out on premotor interneurons of defensive behavior of snail LPa3 and RPa3. In the experiments it was not found significant differences in the values of  $V_m$  and  $V_t$  of premotor interneurons LPa3 and RPa3. Application of NOS inhibitor L-NAME at a concentration of  $10^{-4}$  mol/l into the solution bathing the preparation of the intact snails, caused the reliable decrease of the membrane potential of the premotor interneurons from  $-60.2 \pm 0.8$  mB to  $-55.4 \pm 1.7$  mB,  $n=5$ . The reliable difference from the control snails is  $p < 0.05$ . There are not observed the changes of the threshold of the action potential. Application of NO donor SNP at a concentration of  $10^{-4}$  mol/l, in opposite, causes the increasing hyperpolarization of the command neurons membrane by 5.5 mV by 10 minutes,  $n=12$ . This results make a suggestion about correlation between the level of NO in the neuron and its membrane potential.

Supported by RFBR (Grant No. 18-015-00274).

### References

1. Gainutdinov Kh.L. et al. Uspekhi Physiologicheskikh Nauk (Russian). 2011. V. 42. P. 33-52.
2. Park A-R. et al. Neural Plasticity. 2014. ID 628531.
3. Balaban P.M. et al. Eur. J. Neurosci. 2014. V. 40. No 6. P. 2963–2970.
4. Muranova, L.N. et al. Bull. Experim. Biol. Med. 2016. V. 160. No 4. P. 414-416.
5. Zsombok A. et al. Neurosci. Lett. 2000. V. 295. No 3. P. 85-88.



## РОЛЬ РЕТРОГРАДНО ДЕЙСТВУЮЩИХ МИОКИНОВ В РЕГУЛЯЦИИ МОТОРНЫХ СИНАПСОВ

О.П. Балезина

*Кафедра физиологии человека и животных биологического факультета  
МГУ им.М.В.Ломоносова, Ленинские горы, Москва, Россия*

Общепризнанный постулат синаптической физиологии об одностороннем действии медиаторов в химических синапсах в настоящее время пересмотрен. Обнаружились многочисленные регуляторные контуры обратной связи с вовлечением сигнализаторов, образующихся в постсинаптических структурах, способных высвобождаться и ретроградно регулировать синаптическую передачу. Явление получило название *ретроградной сигнализации* в синапсах. Первыми ретроградными регуляторами, обнаруженными в синапсах ЦНС, стали т.н. эндоканнабиноиды (Castillo et al., 2012), к которым со временем добавились газообразные медиаторы (NO, CO, H<sub>2</sub>S), активные формы кислорода (АФК), нейротрофины (BDNF, NT3/4, TGFβ) и другие. Что касается мышц, то скелетная мускулатура «переоткрыта» недавно как своеобразный «эндо- и паракринно активный» орган, высвобождающий большой список цитокинов и *миокинов*, - биологически активных веществ, предназначенных как для системных, так и локальных (паракринных и синаптических) регуляторных воздействий. Среди таких миокинов - интерлейкины, нейротрофины - BDNF, IGF1, FGF1/2, газы (NO, H<sub>2</sub>S, CO), АФК, эндоканнабиноиды, миогенные пурины (АТФ) и другие (Pederson, Febriano, 2007). Их роль как локальных быстродействующих трансинаптических регуляторов выброса медиатора АХ либо мышечных холинорецепторов в большинстве случаев мало либо вообще не известна.

В нашей работе методами электрофизиологии исследована спонтанная и вызванная активность нервно-мышечных синапсов скелетных мышц мышцы с целью обнаружения возможных изменений под действием двух высвобождаемых из мышцы миокинов – т.н. мозгового фактора роста нервов - BDNF и пурина АТФ - как возможных избирательных и быстродействующих регуляторов параметров нервно-мышечной передачи.

Проведенные исследования впервые показали, что активация мышечных рецепторов тромбина (PAR1-типа) запускает в мышце высвобождение миогенного BDNF и его дальнейшее ретроградное действие на спонтанную и вызванную секрецию АХ в моторных синапсах. Впервые показано, что прирост амплитуды миниатюрных потенциалов концевой пластинки (мПКП) под действием тромбина (10нМ) предотвращается блокадой пресинаптических TrkB-рецепторов. Установлено участие мышечного фермента ФЛС (но не ПКС) и выброса депонированного Са, в каскаде реакций, приводящих к высвобождению мышечного BDNF. Впервые показано, что активация пресинаптических TrkB-рецепторов под действием BDNF приводит к увеличению амплитуды, частоты мПКП, а также амплитуды вызванных ПКП. Благодаря использованию специфических блокаторов ферментов, впервые выявлены киназы, участвующие в реализации пресинаптических эффектов BDNF (это - пресинаптическая PKA, ФЛС, АКТ ½).

Наряду с анализом активности зрелых синапсов, у новообразуемых моторных синапсов мышцы голени мыши - в ходе постденервационной регенерации мышечных волокон и восстановления их иннервации,- также выявлена способность тромбина, действуя на PAR1-рецепторы мышечных волокон, вызывать быстрое и стойкое возрастание величины амплитудных параметров МПКП и ПКП (в среднем, на 20%), аналогично наблюдаемым у интактных, зрелых синаптических контактов мышцы.

Впервые установлено, что в случае пролонгирования присутствия как миогенной, так и экзогенной АТФ в моторных синапсах, вместо тормозного пресинаптического проявляется постсинаптическое потенцирующее передачу действие АТФ в виде увеличения длительности и амплитуды спонтанных и вызванных постсинаптических потенциалов концевой пластинки (Bogacheva, Balezina, 2015). Впервые раскрыта роль высокопроводящих транспортных белков – мышечных паннексинов - в высвобождении миогенной АТФ из мышечных волокон в покое и в ходе ритмической активности диафрагмы мыши. Благодаря использованию в работе мышцей-нокаут по гену белка паннексина1, получены доказательства ведущей роли мышечных белков паннексинов в высвобождении миогенных аденозина/АТФ и их доминирующем участии в пуринергической регуляции синаптической передачи в моторных синапсах скелетных мышц (Митева и соавт. , 2017).

Работа поддержана грантом РФФИ № 19-04-00616а.

#### **Литература**

1. Pedersen B.K., Febbraio M.A. 2008. Muscle as an endocrine organ: focus on muscle-derived interleukin-6. 2008. *Physiol Rev.* Oct; v. 88. N 4, p.p. 1379-406.
2. Bogacheva P.O., Balezina O.P. 2015. Postsynaptic Potentiation in Mouse Motor Synapses Induced by ATP Accumulation in Synaptic Cleft . *Bull Exper. Biol.Med.*, v. 159, № 5, p.p. 583-587.
3. Митева А.С., Гайдуков А.Е., Шестопапов В.И., Балежина О.П.2017. Роль паннексина 1 в пуринергической регуляции синаптической передачи в моторных синапсах мышцы. *Биол. мембраны*, изд-во Наука (М.), том 34, № 4, с. 48-57.

### **ROLE OF RETROGRADE ACTING MYOKINES IN REGULATION OF MOTOR SYNAPSES**

**O.P. Balezina**

*Department of Human and Animal Physiology, Biological Faculty  
of M.V. Lomonosov State University, Leninskye gory, Russia*

The generally accepted paradigm of synaptic physiology postulating the unidirectional action of mediators in chemical synapses is currently being revised. Numerous regulatory feedback loops have been discovered with the involvement of signaling agents formed in postsynaptic structures that can be released and retrogradely regulate synaptic transmission. The phenomenon is called retrograde signaling in synapses. The first retrograde regulators found in the CNS synapses were the so-called endocannabinoids, to which gaseous mediators (NO, CO, H<sub>2</sub>S), reactive oxygen species (ROS), neurotrophins (BDNF, NT3/4, TGFβ) and others have been added over time. As for the peripheral sys-

tem, the skeletal musculature has been recently “rediscovered” as a kind of “endo- and paracrine-active” organ, releasing a large list of cytokines and myokines, which are attested now as biologically active substances intended for both systemic and local (paracrine and synaptic) regulatory influences. Among such myokines are interleukins, neurotrophins - BDNF, IGF1, FGF1/2, gases (NO, H<sub>2</sub>S, CO), ROS, endocannabinoids, myogenic purines (ATP) and others (Pederson, Febriano, 2007). Their role as local high-speed trans-synaptic regulators of mediator release or muscle cholinoreceptors is little or not known at all.

In our work, the electrophysiological methods were used to investigate the spontaneous and evoked activity of the neuromuscular synapses of the skeletal muscles of the mouse. We try to reveal possible changes of synaptic activity under the action of two myokines released from the muscle - the so-called brain nerve growth factor – BDNF - and purinergic agent ATP - as possible selective and high-speed regulators of neuromuscular transmission parameters.

Studies have shown for the first time, that the activation of muscle thrombin receptors (of PAR1-type) triggers the release of myogenic BDNF and its further retrograde action on spontaneous and induced secretion of ACh in motor synapses of the diaphragm muscle. For the first time, it has been shown that the increase in the amplitude of miniature end plate potentials (mEPPs) under the action of thrombin (10nM) is prevented by the blockade of presynaptic Trk-B receptors. We established the involvement of the muscle enzyme PLC (but not PKC) and the release of deposited Ca in the cascade of reactions, leading to the release of muscular BDNF. It has been shown for the first time, that the activation of presynaptic TrkB receptors under the action of BDNF leads to an increase in amplitude, frequency of MEPPs, as well as amplitude of evoked EPPs. Due to the use of specific enzyme blockers, we identified for the first time the kinases involved in the implementation of the presynaptic effects of BDNF (there were presynaptic PKA, PLC, AKT ½).

Along with mature synapses, we analysed the newly formed motor synapses of the mouse tibial muscle, during its post-denervation and regeneration of motor innervation. We found the ability of thrombin, acting on the PAR1-receptors of regenerated muscle fibers, to induce a rapid and sustained increase in the amplitude of MEPPs and EPPs parameters (on average, by 20%), similar to that observed in intact, mature motor synaptic contacts. It was established for the first time, that under condition of prolonged presence of myogenic or exogenous ATP in motor synapses, instead of presynaptic inhibitory, the postsynaptic potentiating effects of ATP appear in the form of an increase in the duration and amplitude of the spontaneous and evoked EPPs of the end plate (Bogacheva, Balezina 2015). For the first time, the role of highly conducting transmembrane transport proteins - pannexins,- in the release of myogenic ATP from muscle fibers was revealed, under the conditions of resting or rhythmic active synapses of the mouse diaphragm. Thanks to the use of mice knockout with the gene of pannexin1, evidence has been obtained of the leading role of muscle pannexins in the release of myogenic adenosine/ATP and their dominant role in the purinergic regulation of synaptic transmission in skeletal muscle synapses (Miteva et al., 2017).

The work is supported by RFBR, grant N 19-04-00616A.

### References

1. Pedersen B.K., Febbraio M.A. 2008. Muscle as an endocrine organ: focus on muscle-derived interleukin-6. 2008. *Physiol. Rev.*, v. 88, N 4, p.p.1379-406.
2. Bogatcheva P.O., Balezina O.P. 2015. Postsynaptic Potentiation in Mouse Motor Synapses Induced by ATP Accumulation in Synaptic Cleft . *Bull Exper. Biol.Med.*, v. 159, № 5, p.p. 583-587.
3. Miteva A.S., Gaydukov A.E., Shestopalov V.I., Balezina O.P. 2017. Role of pan-nexin1 in purinergic regulation of synaptic transmission in mouse motor synapses. *Biolog.membr.(Russian)*, Nauka, v. 34, № 4, p.p. 48-57.

## **РОЛЬ НЕЙРОННЫХ И МЕХАНИЧЕСКИХ ВОЗДЕЙСТВИЙ В ПОДДЕРЖАНИИ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ СВОЙСТВ МЫШЦ ЗАДНЕЙ КОНЕЧНОСТИ У КРЫСЫ**

**М.Э. Балтин, А.О. Федянин, М.А. Зайцев, О.А. Саченков,  
А.А. Еремеев, Т.В. Балгина**

*Казанский Федеральный университет, ул. К.Маркса, 76, Россия*

Вопрос соотношения нейронных и механических воздействий для поддержания функционального состояния медленных и быстрых мышц у животных или человека остается до сих пор открытым. Чтобы решить эту проблему, мы изучили эффекты 7 и 14 дневной разгрузки задних конечностей (НУ) с или без тенотомии и / или денервации на параметры вызванных ответов мышц задней конечности крысы. Все эксперименты выполнены с соблюдением биоэтических норм.

При нарушении опорной афферентации, на 7 и 14 сутки амплитуда моторного ответа латеральной икроножной мышцы была ниже контрольной, амплитуда моторного ответа медиальной икроножной мышцы была равна контрольным значениям. Амплитуда моторного ответа камбаловидной мышцы достоверно снижалась. Мы предполагаем, что вероятным механизмом такого снижения амплитуды моторного ответа, является влияние нарушения опорной афферентации и развивающейся при этом атрофии скелетных мышц.

В условиях односторонней тенотомии (перерезка ахиллового сухожилия) амплитуда моторного ответа ипсилатеральной икроножной мышцы на 7 сутки уменьшилась на 22%, на 14 сутки амплитуда не отличалась от контроля. Амплитуда моторного ответа камбаловидной мышцы на 7 и 14 сутки была меньше, чем в контроле в 2 раза.

В условиях перерезки ахиллова сухожилия при антиортостатическом вывешивании происходило увеличение амплитуды моторных ответов как латеральной, так и медиальной головок икроножной мышцы, в камбаловидной ипсилатеральной мышце, амплитуда моторного ответа уменьшалась по отношению к контролю, изменения были аналогичны условиям вывешивания.

В условиях антиортостатического вывешивания, одновременное пережатие седалищного нерва (денервация) к 14 суткам привело к уменьшению амплитуды моторных ответов всех исследуемых мышц, падение амплитуды ответов икроножной мышцы было достоверно выше, чем в камбаловидной.

Таким образом, полученные результаты показали, что гравитация, как внешний механический фактор необходима для сохранения функций медленных и быстрых мышц, однако представляется более важной для функционального обеспечения медленной (камбаловидной) мышцы. По-видимому, медленные мышцы имеют большую зависимость от нарушения опорной афферентации, нежели нейронной активности, чем быстрые мышцы.

Исследование выполнено за счет гранта Российского Научного Фонда (проект № 18-75-10027).

**THE ROLE OF NEURAL AND MECHANICAL IMPACTS  
IN MAINTAINING THE FUNCTIONAL PROPERTIES  
OF THE MUSCLE OF THE BACK LIMB IN THE RAT  
M.E. Baltin, A.O. Fedianin, M.A. Zaytsev, O.A. Sachenkov,  
A.A. Eremeev, T.V. Baltina**

*Kazan Federal University, K. Marksa str. 76, Russia*

The question of the ratio of neural and mechanical effects to maintain the functional state of slow and fast muscles in animals or humans is still open. To solve this problem, we studied the effects of 7 and 14 days of unloading of the hind limbs (HU) with or without tenotomy and / or denervation on the parameters of the rat's hind limb triggered muscle responses. All experiments were performed in compliance with bioethical norms.

When the support afferentation was violated, on days 7 and 14 the amplitude of the motor response of the lateral gastrocnemius muscle was lower than the control one; the amplitude of the motor response of the medial gastrocnemius muscle was equal to the control values. The amplitude of the motor response of the soleus muscle was significantly reduced. We assume that the probable mechanism of such a decrease in the amplitude of the motor response is the influence of the disturbance of the reference afferentation and the skeletal muscle atrophy developing with it.

Under unilateral tenotomy (transection of the Achilles tendon), the amplitude of the motor response of the ipsilateral gastrocnemius muscle for 7 days decreased by 22%, for 14 days the amplitude did not differ from control. The amplitude of the motor response of the soleus muscle on days 7 and 14 was 2 times less than in the control.

When the Achilles tendon was transected, the amplitude of motor responses of the lateral and medial heads of the gastrocnemius muscle increased in the soleus ipsilateral muscle, the amplitude of the motor response decreased relative to the control, the changes were similar to the conditions of hanging.

Under conditions of antiorthostatic hanging, simultaneous clamping of the sciatic nerve (denervation) by 14 days resulted in a decrease in the amplitude of motor responses of all the studied muscles, a decrease in the amplitude of responses of the gastrocnemius muscle was significantly higher than in the soleus.

Thus, the obtained results showed that gravity, as an external mechanical factor, is necessary to preserve the functions of slow and fast muscles, but it seems more important for the functional support of the slow (soleus) muscle. Apparently, slow muscles are more dependent on impaired support afferentation, rather than neural activity, than fast muscles.

This work is supported by Russian Science Foundation, grant 18-75-10027.

**ВЛИЯНИЕ ИНГИБИТОРА ГИСТОНДЕАЦЕТИЛАЗЫ I  
НА ЭКСПРЕССИЮ КЛЮЧЕВЫХ E3-УБИКВИТИНЛИГАЗ  
ПРИ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ РАЗГРУЗКЕ M. soleus КРЫС**  
**С.П. Белова, Е.П. Мочалова, Б.С. Шенкман, Т.Л. Немировская**  
*ГНЦ РФ Институт медико-биологических проблем РАН,  
123007, Москва, Хорошевское шоссе, 76а, e-mail: swetbell@mail.ru*

В последнее время стали появляться работы, исследующие возможность гистондеацетилаз (HDAC) взаимодействовать с различными транскрипционными факторами, что дает возможность координировать и регулировать экспрессию генов в скелетных мышцах в ответ на функциональную разгрузку. В дополнение к регулированию транскрипции гена посредством ацетилирования гистонов, каталитическая активность HAT и HDAC регулирует экспрессию гена путем изменения статуса ацетилирования и функции транскрипционных факторов, таких как FoxO. В настоящее время существует ограниченная информация о конкретных HDACs, которые регулируют статус ацетилирования FoxO в скелетных мышцах при нормальных условиях и тех, которые способствуют снижению ацетилирования и активации FoxO во время катаболических состояний. Обнаружено, что HDAC1 активирует FoxO. Авторы ингибировали работу различных гистондеацетилаз в культуре клеток и обнаружили, что HDAC1 является ключевым регулятором FOXO и может запускать мышечную программу атрофии. Целью нашей работы являлась проверка, контролирует ли HDAC1 работу FOXO3a и экспрессию E3 лигаз (MuRF-1 и atrogin-1/MAFbx) при функциональной разгрузке мышц. Ингибируя работу HDAC1 ингибитором CI-994 мы определяли взаимосвязь между дезацетилазной активностью HDAC1 и индукцией программы атрофии мышц. Существенная экспрессия E3-лигаз наблюдается уже на первые сутки функциональной разгрузки мышц, и к третьим суткам достигает своего пика. Поэтому мы провели исследование с трехсуточным вывешиванием крыс.

Для проведения эксперимента 24 самца крыс линии Вистар (195-215 г) возрастом 10 недель были случайным образом разделены на три группы

(n=8): интактный контроль (С), вывешивание в течение 3 суток (HS) и вывешивание в течение 3 суток с введением ингибитора гистондеацетилазы 1 – CI-994 (HS+CI). Вывешивание проводилось согласно модели Ильина–Новикова в модификации Morey-Holton.

Вес крыс составлял 195-215 г и не различался между группами. Индекс мышцы (вес мышцы, нормированный на вес крысы) в группе HS был достоверно меньше, чем в группе контроля (на 10%,  $p<0,05$ ). В группе с введением препарата достоверного снижения индекса мышцы не наблюдалось.

Уровень pAkt и pFOXO3 были снижены в одинаковой степени у обеих вывешенных групп относительно группы контроля ( $p<0,05$ ). Уровень гистондеацетилазы 1 (HDAC1) в ядерной фракции оказался существенно повышен в группе HS относительно контроля ( $p<0,05$ ). В группе, которой при вывешивании вводился ингибитор HDAC1, ее содержание не отличалось от уровня контроля, и было существенно ниже, чем у животных HS.

Экспрессия мРНК убиквитина была повышена только в группе вывешенных без препарата животных, тогда как в группе с введением ингибитора его уровень не отличался от контроля. Интересно отметить, что уровень E3-лигазы MuRF1 был одинаково повышен в обеих вывешенных группах, в то время, как уровень E3-лигазы MAFbx был существенно увеличен только в группе HS ( $p<0,05$ ), тогда как в группе HS+CI он не отличался от уровня группы контроля.

Выводы: 1. Мы показали, что HDAC1 контролирует экспрессию E3 лигазы atrogen-1/MAFbx при функциональной разгрузке мышц. 2. Ингибирование HDAC1 снижает скорость развития атрофии.

Работа выполнена на средства гранта РФФ № 18-15-00062

## **INFLUENCE OF HDAC1 INHIBITOR ON THE E3 LIGASES EXPRESSION IN RAT SOLEUS DURING HINDLIMB UNLOADING**

**S.P. Belova, E.P. Mochalova, B.S. Shenkman, T.L. Nemirovskaya**

*Institute of Biomedical Problems RAS, Moscow, Russia*

Muscle unloading leads to its atrophy development. The MuRF-1 and MAFbx E3-ligases expression is increasing under this condition. FOXO3 was considered to be the only transcription factor that triggers E3-ligases expression. Beharry A.W. et al pinpoints HDAC1 as a primary regulator of FoxO in skeletal muscle that is both sufficient and required for skeletal muscle atrophy. We aimed to determine the role of histone deacetylase 1 (HDAC1) proteins in activation of MuRF-1 and MAFbx E3-ligases expression at the early stage of muscle unloading.

We investigate it by CI-994 (inhibitor of HDAC1) administration in male Wistar rats (180-200 g) upon 3-day hindlimb suspension. The method of hindlimb suspension was described in Morey-Holton E & Globus R (2002). 24 animals were divided into 3 groups (n=8 in each): C-control, CI - hindlimb suspension with CI-994 (i.p. 1 mg/kg/day), or placebo (HS group) administration. The animals were

anaesthetized with an i.p. injection of tribromoethanol (240 mg/kg), soleus muscles were surgically excised, frozen in liquid nitrogen.

The Western blot and RT-PCR analyzes were done. The statistical analysis was performed using REST 2009 v.2.0.12 and Bio-Rad CFX Manager programs at the significance level set at 0.05. The significant differences between groups were statistically analyzed using Mann-Whitney test. The evaluation of the levels of mRNA expression of MuRF-1 and MAFbx showed that CI-994 treatment inhibited unloading induced up-regulation of MAFbx in CI group but had no effect on mRNA expression of MuRF-1. After unloading, mRNA expression of MAFbx increased 2.12-fold ( $p < 0.05$ ) in HS group. There were statistically significant differences in MAFbx mRNA expression between HS and CI groups. When compared with the control, unloading increased MuRF-1 mRNA expression 1.67- and 1.56-fold in HS and CI groups, respectively. CI-994 treatment also inhibited unloading-induced up-regulation of mRNA expression of ubiquitin. The levels of ubiquitin mRNA expression when compared with the control were 4.21- and 2.32-fold in HS and CI groups, respectively. We did not find any differences in the content of phosphorylated anabolic signaling system components (Akt/mTOR/S6k) between both suspended groups (CI and HS).

Therefore, HDAC1 inhibiting prevented hindlimb suspension-induced up-regulation of MAFbx and ubiquitin, but did not any effect MuRF-1 expression. This work was supported by Russian Science Foundation (grant № 18-15-00062).

## **ОСОБЕННОСТИ СТРУКТУРЫ И ФУНКЦИИ БЕЛКОВОГО КОМПЛЕКСА $Ca^{2+}$ -УНИПОРТЕРА В МИТОХОНДРИЯХ ПЕЧЕНИ КРЫС С РАЗНОЙ УСТОЙЧИВОСТЬЮ К ГИПОКСИИ**

**К.Н. Белослудцев<sup>1,2</sup>, Н.В. Белослудцева<sup>1</sup>, К.С. Теньков<sup>2</sup>,  
Е.Ю. Таланов<sup>1</sup>, В.С. Старинец<sup>2</sup>, М.В. Дубинин<sup>2</sup>**

*<sup>1</sup>Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН,  
Пушино, ул. Институтская, 3, Россия*

*<sup>2</sup>Марийский государственный университет,  
Йошкар-Ола, пл. Ленина, 1, Россия*

Гипоксия/ишемия – чрезвычайно широко распространенное явление, возникающее как в условиях дефицита кислорода во внешней среде, так и в результате самых разных патологий, приводящих к снижению доставки кислорода к клетке до уровня, недостаточного для поддержания ее функций и структуры. Гипоксические состояния в организме наблюдаются при нарушениях гемодинамики, ишемических и реперфузионных повреждениях органов, кровопотерях, артериальной гипертензии, легочной недостаточности, последствиях травматического шока, воздействии неблагоприятных экологических факторов, экстремальных состояниях, синдромах системного воспалительного ответа и других стрессорных воздействиях.



Внутриклеточной мишенью гипоксии различной этиологии являются, в первую очередь, митохондрии и аэробный энергетический обмен. На сегодняшний день можно выделить несколько ключевых митохондриальных мишеней, повреждение или нарушение функционирования которых при гипоксии и последующей реоксигинации обуславливает гибель клетки, органа и организма. К ним можно отнести повреждение комплексов дыхательной цепи, увеличение скорости образования активных форм кислорода при реоксигенации ткани и нарушение митохондриального  $\text{Ca}^{2+}$ -гомеостаза.

Исследования, посвященные определению роли митохондриальных систем транспорта  $\text{Ca}^{2+}$  в развитии гипоксии, ведутся довольно давно. Вместе с тем, до сих пор остается не выясненным вопрос, как структурно и функционально регулируется работа митохондриальной системы транспорта ионов  $\text{Ca}^{2+}$  при развитии гипоксических состояний. Ответ на этот вопрос может быть найден при проведении исследований на животных, имеющих генетически закрепленные отличия по степени устойчивости к гипоксии. Известно, что в популяции животных, разные особи имеют неодинаковую резистентность к недостатку кислорода. При этом животные, которые принадлежат к двум противоположным, крайним фенотипам: высокоустойчивым (ВУ) и низкоустойчивым (НУ) к гипоксии, имеют существенно различные "функционально-метаболические профили" [1]. Так, ранее нами было показано, что митохондрии печени ВУ и НУ крыс имеют разную резистентность к образованию митохондриальных пор двух типов – МРТ (mitochondrial permeability transition pore) и липидной поры [2]. Целью настоящей работы было определить, отличаются ли животные с различной устойчивостью к гипоксии по кинетике входа ионов  $\text{Ca}^{2+}$  в митохондрии, и если да, то какие структурные перестройки могут быть за это ответственны.

Эксперименты проводились на митохондриях печени крыс линии Wistar, отобранных по устойчивости к нормобарической гипоксии в камере с пониженным содержанием кислорода ( $\text{pO}_2$  3.1%). В качестве высокоустойчивых животных были отобраны крысы, которые выдерживали гипоксию (до второго агонального вдоха) более 10 минут; в качестве низкоустойчивых животных - не более 1-2 минут.

В результате проведенной работы нами было установлено, что скорость поглощения ионов  $\text{Ca}^{2+}$  митохондриями печени ВУ и НУ животных достоверно различалась при добавлении 200 мкМ  $\text{Ca}^{2+}$  в присутствии 1 мкМ циклоспорина А. Скорость входа  $\text{Ca}^{2+}$  в митохондрии печени ВУ крыс была в ~ 1.3 раза выше таковой у НУ животных. Важно отметить, что параметр митохондриальной  $\text{Ca}^{2+}$  емкости был также в ~ 1.3 раза выше у ВУ животных, по сравнению с НУ крысами, что соотносится с результатами, полученными нами ранее [2].

В основе наблюдаемых нами изменений может лежать разное соотношение субъединиц (как канальных, так и регуляторных) мультибелково-

го комплекса митохондриального  $\text{Ca}^{2+}$  унипортера (MCU) у НУ и ВУ крыс. Методом иммуноблоттинга было показано, что у исследуемых групп животных не изменяется количество канальной субъединицы MCU, а также  $\text{MCU}^b$  – неактивного паралога MCU. Вместе с тем, у ВУ крыс, количество регуляторной (воротной) субъединицы  $\text{Mi}^b\text{MCU}^1$  было достоверно выше, по сравнению с НУ крысами. Вероятно, именно эта структурная особенность лежит в основе более быстрого поглощения ионов  $\text{Ca}^{2+}$  митохондриями печени ВУ животных.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (18-315-20011 мол\_а\_вед).

### Литература

1. Lukyanova L.D., Kirova Y.I. (2015) Mitochondria-controlled signaling mechanisms of brain protection in hypoxia. // *Front. Neurosci.* 9, 320.
2. Belosludtsev K.N., Saris N.-E.L., Belosludtseva N.V. et al (2009) Physiological aspects of the mitochondrial cyclosporin A-insensitive palmitate/ $\text{Ca}^{2+}$ -induced pore: tissue specificity, age profile and dependence on the animal adaptation to hypoxia. // *J. Bioenerg. Biomembr.*, 41(4), 395-401.

### FEATURES OF THE STRUCTURE AND FUNCTION OF THE $\text{Ca}^{2+}$ UNI-PORTER COMPLEX OF LIVER MITCHONDRIA OF RATS WITH DIFFERENT RESISTANCE TO HYPOXIA

K.N. Belosludtsev<sup>1,2</sup>, N.V. Belosludtseva<sup>1</sup>, K.S. Tenkov<sup>2</sup>, E.Y. Talanov<sup>1</sup>, V.S. Starinets<sup>2</sup>, M.V. Dubinin<sup>2</sup>

<sup>1</sup>*Institute of Theoretical and Experimental Biophysics RAS, Pushchino, Institutskaya st., 3, Russia*

<sup>2</sup>*Maria State University, Yoshkar-Ola, pl. Lenina, 1, Russia*

Hypoxia/ischemia is a widespread phenomenon that occurs both in conditions of oxygen deficiency in the environment and as a result of a number of pathologies leading to a decrease in oxygen delivery to the cell to a level insufficient to maintain its functions and structure. Hypoxic conditions in the body are observed in hemodynamic disorders, ischemic and reperfusion injuries of organs, blood loss, arterial hypertension, pulmonary insufficiency, traumatic shock, exposure to adverse environmental factors, extreme conditions, syndromes of the systemic inflammatory response, and other stress effects.

The intracellular targets of hypoxia of various etiologies are, first of all, mitochondria and aerobic energy metabolism. There are several key mitochondrial targets, whose structural damage or dysfunction during hypoxia and subsequent re-oxygenation can lead to the death of cells, organs, and the body. Damage to the respiratory chain complexes, an increase in the rate of formation of reactive oxygen species during tissue re-oxygenation, and disruption of mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis can be attributed to these factors.

Studies dedicated to determining the role of mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  transport systems in hypoxia have been conducted for quite some time. At the

same time, the question of how the mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  transport is structurally and functionally regulated in hypoxic conditions still remains unclear. The answer to this question can be found in studies on animals with genetically determined differences in the body's resistance to hypoxia. It is known that in the animal population, different individuals have unequal resistance to oxygen deficiency. At the same time, two opposite phenotypes, animals with high resistance (HR) and low resistance (LR) to hypoxia, have significantly different functional-metabolic patterns [1]. Thus, we have previously shown that liver mitochondria of the LR and HR rats differ in their resistance to the formation of mitochondrial pores of two types - MPT (mitochondrial permeability transition pore) and lipid pore [2]. The purpose of this work was to determine whether animals with unequal resistance to hypoxia differ in the kinetics of the entry of  $\text{Ca}^{2+}$  ions into the mitochondria, and if so, which structural rearrangements may be responsible for this difference.

The experiments were carried out on liver mitochondria of Wistar rats selected for resistance to normobaric hypoxia in a chamber with a reduced oxygen concentration ( $\text{pO}_2$  3.1%). Animals with high resistance suffered hypoxia (up to the second agonal inhalation) for more than 10 min; rats with low resistance – no more than 1-2 min.

It was found that the rate of accumulation of  $\text{Ca}^{2+}$  ions in liver mitochondria of HR and LR animals differed significantly when 200  $\mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$  in the presence of 1  $\mu\text{M}$  cyclosporin A was added. The rate of  $\text{Ca}^{2+}$  entry into the liver mitochondria of HR rats was approximately 1.3 times higher than that in LR animals. It is important to note that the parameter of the mitochondrial calcium retention capacity was also 1.3 times higher in HR animals, compared to LR rats. The latter is consistent with the results obtained earlier [2].

The rate of mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  uptake in HR and LR animals can be regulated by a ratio of subunits (both channel and regulatory) of the mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  uniporter (MCU) multiprotein complex. The immunoblot analysis revealed that, in the studied groups of animals, the level of channel-forming subunits of MCU does not change, as well as the inactive MCU paralogue, MCUB. At the same time, in HR rats, the level of the regulatory (gatekeeper) subunit, MiCU1 was significantly higher compared to that in LR rats. This structural feature appears to underlie the more rapid accumulation of  $\text{Ca}^{2+}$  ions by liver mitochondria of HR animals.

This work was supported by the Russian Foundation for Basic Research (grant # 18-315-20011 mol\_a\_ved).

## References

1. Lukyanova L.D., Kirova Y.I. (2015) Mitochondria-controlled signaling mechanisms of brain protection in hypoxia. // *Front. Neurosci.* 9, 320.
2. Belosludtsev K.N., Saris N.-E.L., Belosludtseva N.V. et al (2009) Physiological aspects of the mitochondrial cyclosporin A-insensitive palmitate/ $\text{Ca}^{2+}$ -induced pore: tissue specificity, age profile and dependence on the animal adaptation to hypoxia. // *J. Bioenerg. Biomembr.*, 41(4), 395-401.

# ОСОБЕННОСТИ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ МИТОХОНДРИАЛЬНЫХ СИСТЕМ ТРАНСПОРТА ИОНОВ КАЛЬЦИЯ У КРЫС ПРИ РАЗВИТИИ САХАРНОГО ДИАБЕТА I ТИПА

К.Н. Белослудцев<sup>1,2</sup>, Е.В. Лебедева<sup>2</sup>, И.Б. Михеева<sup>1</sup>, Н.В. Белослудцева<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН,*

*Пущино, ул. Институтская, 3, Россия*

<sup>2</sup>*Марийский государственный университет,*

*Йошкар-Ола, пл. Ленина, 1, Россия*

Сахарный диабет – одно из самых распространенных метаболических заболеваний, которое связано либо с нарушением секреции инсулина, либо с толерантностью клеток организма к этому гормону (диабет I и II типа, соответственно) [1]. В обоих случаях, общим патологическим изменением является повышение уровня глюкозы в крови - гипергликемия, которая со временем приводит к серьезному повреждению многих органов и систем организма. Известно, что одной из основных мишеней сахарного диабета на внутриклеточном уровне являются митохондрии. При этом наблюдаются нарушения работы систем окислительного фосфорилирования митохондрий, гиперпродукция активных форм кислорода и др. [2]. Показано, что фармакологическая и генетическая коррекция этих процессов приводит к клеточному и организменному перепрограммированию и ослаблению последствий сахарного диабета.

Одними из эффекторных структур, ответственных за митохондриальную дисфункцию при сахарном диабете, могут являться митохондриальные кальций-транспортирующие системы. Как известно, эти структуры обеспечивают не только поддержание внутриклеточного кальциевого гомеостаза и регуляцию энергетического метаболизма, но и запуск клеточной гибели через индукцию митохондриальных неселективных пор [3]. Вместе с тем, данные об участии  $Ca^{2+}$ -транспортирующих систем митохондрий и митохондриальных пор в развитии сахарного диабета достаточно противоречивы. В настоящей работе мы провели сравнительное исследование кинетических параметров транспорта  $Ca^{2+}$ , а также индукции  $Ca^{2+}$ -зависимых пор (МРТ поры и липидной, индуцированной пальмитиновой кислотой и  $Ca^{2+}$ ) в митохондриях печени крыс при развитии сахарного диабета I типа.

Сахарный диабет I типа был смоделирован у крыс линии Sprague Dawley массой 100 г путем введения животным внутрибрюшинно стрептозотоцита в дозе 80 мг/кг веса животного. Через неделю после введения животных забивали, предварительно устанавливая уровень глюкозы в крови. Животных с индуцированным диабетом I типа отобрали по концентрации глюкозы в сыворотке крови > 25 ммоль/л (у контрольных животных содержание глюкозы не превышало 8 ммоль/л). Последующие эксперименты проводили на митохондриях, изолированных из печени крыс.

В результате проведенной работы нами было установлено, что при развитии сахарного диабета I типа у крыс происходит ремоделирование

митохондриальной сети в гепатоцитах. При этом количество митохондрий в клетках существенно увеличивается. В митохондриях наблюдается деформация крист и наружной мембраны. Показано, что через одну неделю после индукции сахарного диабета I типа у крыс, скорость входа ионов  $\text{Ca}^{2+}$  в митохондрии, окисляющих сукцинат, практически не изменяется, по сравнению с контрольными значениями.

Для оценки параметров функционирования митохондриальной циклоспорин А-чувствительной поры (МРТ) были применены 2 подхода: определение кальциевой емкости митохондрий и измерение скорости митохондриального набухания, индуцированного  $\text{Ca}^{2+}$  и неорганическим фосфатом. Установлено, что в митохондриях печени диабетических крыс статистически значимо увеличивался показатель кальциевой емкости ( $\sim 1.4$  раза), а скорость митохондриального набухания, индуцированного  $100 \text{ мкМ Ca}^{2+}$  и  $1 \text{ мМ Pi}$ , достоверно снижалась. Полученный результат говорит о том, что митохондрии печени крыс с индуцированным диабетом I типа обладают большей резистентностью к индукции в них МРТ поры, по сравнению с контрольными животными. Можно предположить, что в основе этих изменений лежит снижение уровня экспрессии белков, входящих в состав МРТ поры (например, циклофилина Д или аденилаттранслокатора). Вместе с тем, скорость циклоспорин А-нечувствительного митохондриального набухания, индуцированного  $20 \text{ мкМ}$  пальмитиновой кислотой и  $30 \text{ мкМ Ca}^{2+}$ , у диабетических животных достоверно увеличивалась ( $\sim 1.5$  раза). Полученный результат может быть связан с изменением жирнокислотного состава мембран митохондрий при данной патологии. Проведение дополнительных экспериментов позволит установить механизмы указанных изменений.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (19-015-00117-а).

### Литература

1. American Diabetes Association (2011) Diagnosis and classification of diabetes mellitus. // *Diabetes Care*, 34, S62–S69.
2. Montgomery M.K., Turner N. (2015) Mitochondrial dysfunction and insulin resistance: an update. // *Endocr Connect*. 4(1), R1-R15
3. Elustondo P.A., Nichols M., Robertson G.S., Pavlov E.V. (2017) Mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  uptake pathways. // *J Bioenerg Biomembr*. 49(1), 113-119.

## FEATURES OF FUNCTIONING OF MITOCHONDRIAL CALCIUM ION TRANSPORT SYSTEMS IN RATS WITH TYPE I DIABETES MELLITUS

**K.N. Belosludtsev<sup>1,2</sup>, E.V. Lebedeva<sup>2</sup>, I.B. Mikheeva<sup>1</sup>, N.V. Belosludtseva<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>*Institute of Theoretical and Experimental Biophysics RAS, Pushchino, Institutskaya st., 3, Russia*

<sup>2</sup>*Maria State University, Yoshkar-Ola, pl. Lenina, 1, Russia*

Diabetes mellitus is one of the most common metabolic diseases, which is associated either with a disorder of the secretion of insulin, or with tolerance of

cells to this hormone (type I (insulin-dependent) and type II (non-insulin-dependent) diabetes mellitus, respectively) [1]. In both cases, an overall pathological alteration is the increase in serum glucose level - hyperglycemia, which eventually leads to serious damage to organs and systems. It is known that at the intercellular level, one of the main targets of diabetes mellitus is mitochondria. Indeed, disturbances in the system of oxidative phosphorylation of mitochondria, hyperproduction of reactive oxygen species, etc. are observed [2]. The pharmacological and genetic corrections of these processes were found to result in cellular and organism reprogramming and to reduce the severity of the pathological consequences of diabetes mellitus.

One of the effector structures responsible for mitochondrial dysfunction in diabetes mellitus can be the mitochondrial calcium ion transport systems. As known, these structures provide both maintenance of intracellular calcium homeostasis and regulation of energy metabolism, and the initiation of the mitochondrial pathway of cell death via the induction of the non-selective mitochondrial pores [3]. At the same time, data on the involvement of  $\text{Ca}^{2+}$  transport systems of mitochondria and the mitochondrial pores in the development of diabetes are quite contradictory. In this work, we conducted a comparative study of the kinetic parameters of  $\text{Ca}^{2+}$  transport, as well as the  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent pores (mitochondrial permeability transition pore (MPT pore) and palmitic acid/ $\text{Ca}^{2+}$ -induced lipid pore) in liver mitochondria of rats with type I diabetes mellitus.

Type I diabetes mellitus was induced in Sprague Dawley rats weighing 100 g by intraperitoneal injection of streptozotocin at a dose of 80 mg/kg of animal weight. One week after the injection, the rats were sacrificed, and the serum glucose level was preliminary measured. The animals with experimental type I diabetes were selected for the glucose level > 25 mmol/l (in control animals, this parameter did not exceed 8 mmol/l). Subsequent experiments were performed on isolated rat liver mitochondria.

As a result of the work, we found that with the development of type I diabetes in rats, mitochondrial network remodeling in hepatocytes occurs. At the same time, the number of mitochondria in the cells increases significantly. In the mitochondria, there is a deformation of the cristae and the outer membranes. It was shown that one week after the induction of type I diabetes mellitus in rats, the rate of entry of  $\text{Ca}^{2+}$  ions into the mitochondria oxidizing succinate remained almost unchanged compared with the control values.

To estimate the parameters of functioning of the cyclosporin A-sensitive mitochondrial pore (MPT), two indexes were measured: the mitochondrial calcium retention capacity and the rate of mitochondrial swelling induced by  $\text{Ca}^{2+}$  and inorganic phosphate. It was established that in the liver mitochondria of diabetic rats, the calcium retention capacity increased (by ~ 1.4 times), and the rate of mitochondrial swelling induced by 100  $\mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$  and 1 mM  $\text{P}_i$  decreased significantly. The result suggests that the mitochondria of the liver of rats with type I diabetes are more resistant to induction of the MPT pore, compared to control animals. It can be assumed that the mechanism of these changes is related to a

decrease in the expression level of the proteins that form the MPT pore complex (for example, cyclophilin D or adenylate translocator). At the same time, the rate of cyclosporin A-insensitive mitochondrial swelling, induced by 20  $\mu\text{M}$  palmitic acid and 30  $\mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$ , significantly increased in diabetic animals (by  $\sim 1.5$  times). This may be due to shifts in the fatty acid composition of mitochondrial membranes in this pathology. To elucidate the mechanisms of the changes obtained, further investigations is needed.

This work was supported by the Russian Foundation for Basic Research (grant #19-015-00117-a).

### References

1. American Diabetes Association (2011) Diagnosis and classification of diabetes mellitus. // *Diabetes Care*, 34, S62–S69.
2. Montgomery M.K., Turner N. (2015) Mitochondrial dysfunction and insulin resistance: an update. // *Endocr Connect.* 4(1), R1-R15
3. Elustondo P.A., Nichols M., Robertson G.S., Pavlov E.V. (2017) Mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  uptake pathways. // *J Bioenerg Biomembr.* 49(1), 113-119.

## СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ МИТОХОНДРИЙ ПЕЧЕНИ КРЫС ПРИ ГИПЕРТИРЕОЗЕ

**Н.В. Белослудцева, Л.Л. Павлик, Н.И. Венедиктова,  
Н.В. Хмиль, Е.Ю. Таланов, Г.Д. Миронова**

*Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН,  
Пуцзино, ул. Институтская, 3, Россия*

Повышенная секреция гормонов щитовидной железы, основных эндокринных регуляторов в организме, приводит, к серьезным метаболическим изменениям, основным из которых, как известно, является нарушение энергетического обмена [1]. Несмотря на то, что развитие патологического процесса в организме при гипертиреоидном состоянии в настоящее время изучено довольно детально, молекулярные механизмы взаимодействия избытка тиреоидных гормонов с внутриклеточными структурами, в частности, митохондриями, остаются до конца не выясненными. Долгое время усилия исследователей были направлены на изучение эффектов тироксина на митохондриальную энергетику и, главным образом, вызываемого этим гормоном процесса разобщения окислительного фосфорилирования. Недавние исследования показали, что механизм разобщающего действия гормонов щитовидной железы осуществляется как с помощью быстрых механизмов при их непосредственном взаимодействии с митохондриями (через эффекты на разобщающие белки), так и путем включения долгосрочных механизмов на уровне генов [2]. В настоящей работе было проведено комплексное исследование митохондриальной дисфункции при гипертиреозе, включающих изучение энергетического, ионного и окислительного обмена в митохондриях во взаимосвязи с изменениями их ультраструктуры, наблюдаемыми при данной патологии.

В настоящей работе гипертиреодное состояние у крыс было вызвано путем внутрибрюшинного введения животным гормона тироксина в дозе 100 мкг на 100 г массы тела в течение пяти дней, в соответствии с общепринятой методикой. Было установлено, что через 24 часа после последней инъекции тироксина, концентрации тиреоидных гормонов  $T_3$  и  $T_4$  в сыворотке крови крысы более чем в два раза превышало таковую у контрольных животных, что соответствует литературным данным об увеличении уровня гормонов при клиническом гипертиреозе и указывает на развитие у опытных животных данной патологии. С помощью метода электронной микроскопии, были определены ультраструктурные особенности митохондрий, выделенных из печени, сердца, и головного мозга крыс с измененным тиреоидным статусом. При анализе морфометрических параметров митохондрий выявлено, что гипертиреоз приводит к набуханию митохондрий, снижению плотности митохондриального матрикса, степени упаковки крист, площади внутренней мембраны, а также способствует возникновению необычных мембранных структур концентрической формы – ламеллярных телец. Показано, что наиболее выраженные патологические изменения в структуре митохондрий наблюдаются в ткани печени, тогда как в тканях сердца и коры головного мозга подобные изменения выявлены не были. С помощью полярографического метода установлено, что экспериментальный гипертиреоз сопровождается увеличением скорости дыхания митохондрий печени крысы во всех функциональных состояниях и снижением эффективности окислительного фосфорилирования при использовании как субстратов комплекса I, так и комплекса II дыхательной цепи. В основе увеличения скорости митохондриального дыхания в состоянии V4 при гипертиреозе может лежать усиление тока утечки протонов через мембрану митохондрий. Одним из возможных механизмов разобщения, функционирующим в митохондриях, является рециклизация основного иона клетки - калия. В настоящей работе показано, что при гипертиреозе скорость транспорта калия в митохондриях, регистрируемая двумя независимыми методами (с помощью ион-селективного микроэлектрода и спектрофотометрически) достоверно увеличивается. Активация калиевого цикла, наблюдаемая в условиях стимуляции процессов входа и выхода ионов калия в обмен на протон, может приводить к мягкому разобщению. Обнаружено также, что гипертиреоз приводит к увеличению скорости образования перекиси водорода в митохондриях печени крыс, по сравнению с контролем. В работе обсуждается роль АТФ-зависимого калиевого канала в поддержании адаптивных изменений митохондрий при гипертиреозе.

Работа поддержана грантом РФФИ №18-34-00297мол\_а.

#### Литература

1. Moreno M., de Lange P., Lombardi A., Silvestri E., Lanni A., Goglia F. (2008) Metabolic effects of thyroid hormone derivatives. // *Thyroid* 18: 239-253.
2. Lanni A., Moreno M., and Goglia F. (2016) Mitochondrial Actions of Thyroid Hormone. // *Comprehensive Physiology*. 6 ( 4): 1591-1607.



# ULTRASTRUCTURAL AND FUNCTIONAL CHANGES IN RAT LIVER MITOCHONDRIA OF RATS WITH HYPERTHYROIDISM

N.V. Belosludtseva, L.L. Pavlik, N.I. Venediktova,  
N.V. Khmil, E.Yu. Talanov, G.D. Mironova  
*Institute of Theoretical and Experimental Biophysics RAS,  
Institutskaya st., 3, Pushchino, Russia*

Increased secretion of thyroid hormones, the main endocrine regulators in the body, leads to serious metabolic changes, the main of which is a disturbance of energy metabolism [1]. Despite the fact that the development of the pathological process in hyperthyroidism is currently studied in some detail, the molecular mechanisms for the interaction of excess thyroid hormones with intracellular structures, in particular, mitochondria, remain poorly understood. For a long time, the efforts of researchers have been focused on studying the effects of thyroxin on mitochondrial energy and, mainly, the process of uncoupling of oxidative phosphorylation caused by this hormone. Recent studies have shown that the uncoupling action of thyroid hormones is mediated both by their direct interaction with mitochondria (via the effects on uncoupling proteins) and by long-term mechanisms at the level of genes [2]. In this work, a comprehensive study of mitochondrial dysfunction in hyperthyroidism was carried out, including the study of energy, ionic and oxidative exchanges in mitochondria in conjunction with their ultrastructural changes observed in this pathology.

In the present work, the state of hyperthyroidism in rats was provoked by intraperitoneal injection of thyroxin at a dose of 100  $\mu\text{g}$  per 100 g of body weight for five days, in accordance with the generally accepted methodology. It was found that 24 hours after the last injection of thyroxin, the concentrations of thyroid hormones T3 and T4 in the rat serum were more than two times higher than those in control animals, which corresponds to the literature data on an increase in the level of the hormones in clinical hyperthyroidism and indicates the development of this pathology in the experimental animals. Using electron microscopy, ultrastructural features of mitochondria isolated from the liver, heart, and brain of rats with altered thyroid status were identified. An analysis of the morphometric parameters of mitochondria revealed that hyperthyroidism leads to mitochondrial swelling, a decrease in the density of the mitochondrial matrix, the degree of cristae packing, the area of inner mitochondrial membrane, and also induces the formation of unusual concentric membrane structures - lamellar bodies. It was shown that pathological changes in the mitochondrial structure were more pronounced in the liver, whereas in the tissues of the heart and the brain cortex of the thyroxin-treated rats the same changes were not found. Using the polarographic method, it was established that experimental hyperthyroidism is accompanied by an increase in the respiration rate of rat liver mitochondria in all functional states and a decrease in the efficiency of oxidative phosphorylation using both substrates of complex I and complex II of the respiratory chain. The increased mitochondrial respiration in hyperthyroidism could be due to basal

leakage of protons across the inner mitochondrial membrane. One of the possible mechanisms of mitochondrial uncoupling is the recyclization of the main ion of the cell, potassium. In this work, it was shown that in hyperthyroidism, the rate of potassium transport in mitochondria, recorded by two independent methods (using an ion-selective microelectrode and by spectrophotometry), increases significantly. Activation of the futile potassium cycle, observed in the simultaneous stimulation of entry and release of potassium ions in exchange for a proton, may lead to a mild uncoupling in mitochondria. It was also found that hyperthyroidism leads to an increase in the rate of formation of hydrogen peroxide in rat liver mitochondria, compared with the control. This paper discusses the role of ATP-dependent potassium channel in the maintaining of adaptive changes in mitochondria in hyperthyroidism.

This work was supported by the Russian Foundation for Basic Research (grant №18-34-00297mol\_a).

### References

1. Moreno M., de Lange P., Lombardi A., Silvestri E., Lanni A., Goglia F. (2008) Metabolic effects of thyroid hormone derivatives. // *Thyroid* 18: 239-253.
2. Lanni A., Moreno M., and Goglia F. (2016) Mitochondrial Actions of Thyroid Hormone. // *Comprehensive Physiology*. 6 ( 4): 1591-1607.

## **МОРФО-БИОХИМИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ В МЫШЕЧНОЙ ТКАНИ КРЫС ПОСЛЕ ДЛИТЕЛЬНОГО ВВЕДЕНИЯ СИМВАСТАТИНА**

**Е.С. Белоусова, З.И. Микашинович, О.Г. Саркисян,  
Т.Д. Лосева, В.Ю. Мажугин**

*Ростовский государственный медицинский университет,  
Ростов-на-Дону, пер. Нахичеванский, 29, Россия*

Статины признаны наиболее эффективной группой гиполипидемических средств. Однако их применение ассоциируется с развитием специфического побочного эффекта статиновой миопатии.

Целью работы явился анализ морфо-молекулярных изменений в мышцах экспериментальных животных при длительном введении симвастатина (зокора).

Исследование проводилось на беспородных крысах-самцах в возрасте 12-14 месяцев. Контрольная группа – 35 интактных животных, которых содержали на общем рационе вивария. Группа сравнения – 35 животных с верифицированной экспериментальной гиперхолестеринемией, получавших рацион без добавления лекарственных веществ; экспериментальная группа – 35 животных с верифицированной экспериментальной гиперхолестеринемией, получавших в течение 3-х месяцев симвастатин (Zosog, 20 мг) по 0,001 г/ 100 г массы один раз в сутки в виде водной суспензии через пищеводный зонд. Для исследования отбирали фрагменты скелетных мышц из задней лапы животного. В гомогенатах мышечной ткани опреде-

ляя активность аденозинтрифосфатного ферментного комплекса ( $Mg^{2+}$  и  $Ca^{2+}$  - зависимой  $Na^+/K^+$  - АТФ-азы). Митохондрии выделяли дифференциальным центрифугированием после гомогенизации в солевом растворе (0,15 М КСl и 10 мМ трис-НСl). Определяли активность цитохромоксидазы (ЦХО) и дегидрогеназ цикла Кребса: пируватдегидрогеназы (ПДГ),  $\alpha$ -кетоглутаратдегидрогеназы ( $\alpha$ -КГ-ДГ), сукцинатдегидрогеназы (СДГ).

Для проведения морфологического исследования фрагменты мышечной ткани фиксировали в 10% нейтральном формалине в течение суток. После окраски срезы помещали под покровные стекла и осуществляли микроскопию с использованием микроскопа Nikon eclipse 50i.

В ранних исследованиях нами установлено, что формирование гиперхолестеринемии (группа сравнения), приводило к нарушению интеграции основных метаболических путей энергетического обмена, которое характеризовалось накоплением недоокисленных продуктов – пирувата и лактата, повышением активности ПДГ на 119% ( $p < 0,001$ ),  $\alpha$ -КГ-ДГ на 94,12% ( $p < 0,001$ ), активность ЦХО и СДГ не отличалась от показателей контрольной группы. При этом, в мышцах животных с экспериментальной гиперхолестеринемией выявлено повышение общей АТФ-азной активности на 28% ( $p < 0,05$ ), АТФ-азы  $Ca^{2+}$  на 98% ( $p < 0,001$ ) и АТФ-азы  $Mg^{2+}$  на 113,5% ( $p < 0,001$ ) относительно контрольной группы.

После введения симвастатина в мышцах животных наблюдали снижение активности ПДГ на 27,9% ( $p_1 < 0,05$ ),  $\alpha$ -КГ-ДГ на 54,6% ( $p_1 < 0,001$ ), СДГ на 67,62% ( $p_1 < 0,001$ ), ЦХО на 69,44% ( $p_1 < 0,001$ ) относительно группы сравнения. При этом было установлено снижение общей АТФ-азной активности на 68,00% ( $p_1 < 0,001$ ), АТФ-азы  $Ca^{2+}$  на 64,51% ( $p_1 < 0,001$ ) и АТФ-азы  $Mg^{2+}$  на 45,13% ( $p_1 < 0,001$ ) относительно группы сравнения.

При исследовании образцов ткани животных экспериментальной группы было выявлено нарушение характера расположения мышечных клеток. Обнаруживались участки с однонаправленным расположением миоцитов, которые чередовались с участками с разнонаправленным расположением клеток. При более сильном увеличении (в 880 раз) отмечалось наличие участков резко гипотрофированных миоцитов с узкими веретеновидными ядрами, часть ядер имели внутриядерные включения и выраженное снижение оптической плотности ядра, сменяющихся участками с относительно неизменными миоцитами. В миоцитах отмечалось наличие участков с относительно сохранными саркомерами, которые чередовались с резко просветленными за счет снижения миофибрилл и миоглобина в клетке, визуально отмечалось отсутствие поперечной исчерченности. Полученные данные свидетельствуют о наличии метаболической миопатии.

Полученные нами данные свидетельствуют, что в основе деградации мышечной ткани лежит дезинтеграция как энергопродуцирующих, так и энергозависимых механизмов. Можно полагать, что дефицит энергии в мышечной ткани формирует «порочный круг», в котором нарушение гомеостаза важнейших катионов приводит к изменению разности потенциа-

лов по обе стороны мембраны, накоплению ионов  $\text{Ca}^{2+}$ , искажению регуляторной роли важнейших катионов. Интересно отметить, что изменения биохимических параметров опережают структурные сдвиги, которые постепенно накапливаются в мышечной ткани.

## **MORPHO-BIOCHEMICALS CHANGES AT RATS MUSCLE TISSUE AFTER PROLONGED SIMVASTATIN INTAKE**

**E.S. Belousova, Z.I. Mikashinowich, O.G. Sarkisjan,**

**T.D. Loseva, V.Y. Mazhugin**

*Rostov state medical university, Rostov-on-Don, 29 Nakhichevan st., Russia*

Statins are known as the most effective medicine with hypolipidemic effect. But their intake is associated with statin myopathy side effect promotion.

The task of the work was to study the morpho-molecular changes in muscles of experimental animals at prolonged simvastatin intake (zokor).

Our investigation was done on purebred male rats at the age of 12-14 months. Control group - 35 intact animals which were contained on general diet of vivarium. Group of comparison - 35 animals with verified experimental hypercholesterolemia, receiving a diet without the addition of medicine; experimental group - 35 animals with verified experimental hypercholesterolemia who received simvastatin (Zocor, 20 mg) at a dose of 0.001 g / 100 g once a day for 3 months as an aqueous suspension through the esophageal probe.

Fragments of skeletal muscles from the hind leg of the animals were selected for the study. The activity of adenosine triphosphate enzyme complex ( $\text{Mg}^{2+}$  and  $\text{Ca}^{2+}$  - dependent  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  - ATP-ase) was determined in homogenates of muscle tissue. Mitochondria were isolated by differential centrifugation after homogenization in salt solution (0.15 M KCl and 10 mM Tris-HCl). The activity of cytochromoxidase (CCO) and Krebs cycle dehydrogenases: pyruvate dehydrogenase (PDG),  $\alpha$ -Ketoglutarate dehydrogenase ( $\alpha$ -KG-DG), succinate dehydrogenase (SDG) were determined.

To conduct a morphological study, muscle tissue fragments were fixed in 10% neutral formalin during the day. After painting, the sections were placed under cover glasses and microscopy was performed using Nikon eclipse 50i microscope.

In early studies, we found that the formation of hypercholesterolemia (comparison group), led to a violation of the integration of the main metabolic pathways of energy metabolism, which was characterized by the accumulation of underoxidized products - pyruvate and lactate, increased activity of PDG by 119% ( $p < 0.001$ ),  $\alpha$ -KG-DG by 94.12% ( $p < 0.001$ ), the activity of CCO and SDG did not differ from the control group. At the same time, in the muscles of animals with experimental hypercholesterolemia there was an increase in total ATP-ase activity by 28% ( $p < 0.05$ ),  $\text{Ca}^{2+}$  ATP-ase by 98% ( $p < 0.001$ ) and  $\text{Mg}^{2+}$ -ATP-ase by 113.5% ( $p < 0.001$ ) relative to the control group.

After administration of simvastatin in animal muscles, there was a decrease in PDG activity by 27.9% ( $p_1 < 0.05$ ),  $\alpha$ -KG-DG by 54.6% ( $p_1 < 0.001$ ),

SDG by 67.62% ( $p_1 < 0.001$ ), and CCO by 69.44% ( $p_1 < 0.001$ ) relative to the comparison group. At the same time, a decrease in total ATP-ase activity by 68.00% ( $p_1 < 0.001$ ),  $Ca^{2+}$ -ATP-ase by 64.51% ( $p_1 < 0.001$ ) and  $Mg^{2+}$ -ATP-ase by 45.13% ( $p_1 < 0.001$ ) relative to the comparison group was found.

In the study of animal tissue samples of the experimental group revealed a violation of the nature of the location of muscle cells. Discovered segments with a unidirectional arrangement of myocytes which are alternated with areas with a mixed arrangement of cells. For more severe increase (up to 880 times) noted the presence of sites dramatically hypotrophic myocytes, with a narrow spindle-shaped nuclei, part of the nuclei had intranuclear inclusions and a marked decrease in the optical density of the nucleus, alternating with areas of relatively constant myocytes. The presence of sites with relatively preserved sarcomeres, which alternated with sharply enlightened due to a decrease in myofibrils and myoglobin in the cell, the absence of transverse striations was visually noted in myocytes. The data obtained indicate the presence of metabolic myopathy.

We have obtained data evidence that the basis of muscle tissue degradation is the disintegration of both energy-producing and energy-dependent mechanisms. It can be assumed that the energy deficit in the muscle tissue forms a "vicious circle" in which the violation of the homeostasis of the most important cations leads to a change in the potential difference on both sides of the membrane, the accumulation of  $Ca^{2+}$  ions, distortion of the regulatory role of the most important cations. It is interesting to note that changes in biochemical parameters are ahead of structural changes that gradually accumulate in muscle tissue.

## **СРАВНЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ОМЕСАМТИВ МЕКАРБИЛ НА ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ СЕРДЕЧНОГО И СКЕЛЕТНОГО МИОЗИНА С ТОНКИМ ФИЛАМЕНТОМ**

**В.Ю. Берг<sup>1</sup>, С.Р. Набиев<sup>1</sup>, О.И. Кошчева<sup>1,2</sup>, М.А. Шаронова<sup>1,2</sup>,  
Л.В. Никитина<sup>1</sup>, С.Ю. Бершицкий<sup>1</sup>, Д.В. Щепкин<sup>1</sup>, Г.В. Копылова<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>*Институт иммунологии и физиологии УрО РАН,*

*Екатеринбург, ул. Первомайская, 106, Россия;*

<sup>2</sup>*УрФУ имени Первого Президента России Б.Н. Ельцина,*

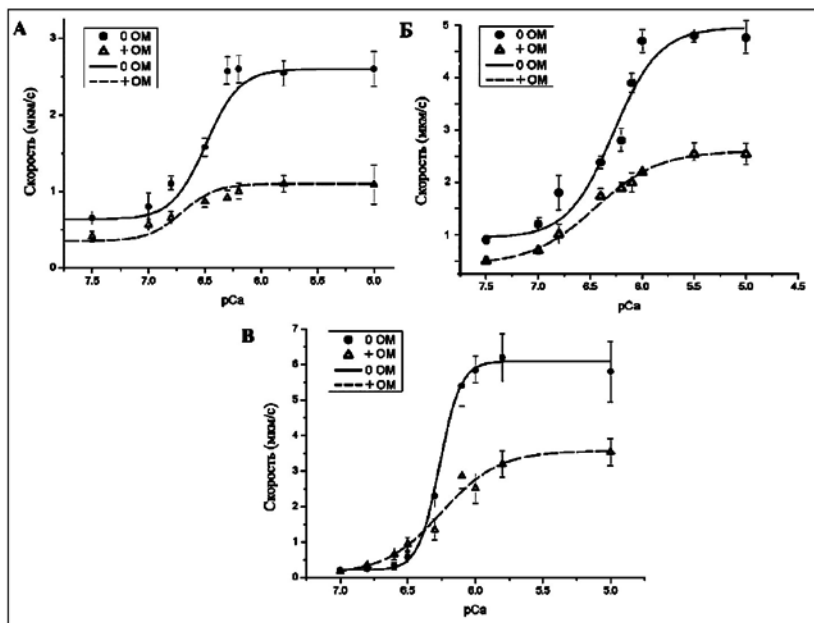
*Екатеринбург, ул. Мира, 19, Россия*

Омекамтив мекарбил (omesamtiv mearbil, СК-1827452; ОМ) был разработан как специфический модулятор функции сердечного миозина [1]. В скелетных мышцах экспрессируется медленная изоформа I тяжелых цепей миозина (ТЦМ) аналогичная  $\beta$ -изоформе ТЦМ сердечного миозина. Показано, что ОМ влияет на механизм генерации силы волокнами из *m. soleus* [2]. Мы исследовали влияние ОМ на  $Ca^{2+}$  регуляцию взаимодействия сердечного и скелетного миозина с актином в *in vitro* подвижной системе (ИПС) и оптической ловушке, а также на характеристики сокращения волокон из быстрой (*m. psoas*) и медленной (*m. soleus*) скелетных мышц.

Данные ИПС аппроксимировали уравнением Хилла:  $V = V_{max} \times (1 + 10^{h(pCa - pCa_{50})})^{-1}$ , где  $V$  и  $V_{max}$  – скорость скольжения тонких филаментов и их максимальная скорость при насыщающей концентрации  $Ca^{2+}$ ;  $pCa_{50}$  – значение  $pCa$ , при котором достигается половина  $V_{max}$ ;  $h$  – коэффициент Хилла. Использовался ОМ фирмы Selleck Chemicals. Сердечный миозин выделяли из желудочков и предсердий свиньи. Миозин из *m. psoas* содержал быстрые изоформы Пх и Пб ТЦМ и 2% изоформы I ТЦМ. Миозин из *m. soleus* содержал преимущественно изоформу I ТЦМ. Легкие цепи миозина (ЛЦМ) из *m. psoas* и *m. soleus* содержали изоформы, соответствующие изоформам ЛЦМ этих волокон.

Обнаружено, что ОМ уменьшает  $V_{max}$  и  $h$  зависимости  $pCa$ -скорость всех миозинов (рис. 1). ОМ увеличивает  $Ca^{2+}$  чувствительность ( $pCa_{50}$ ) зависимости  $pCa$ -скорость сердечных миозинов и не влияет на  $pCa_{50}$  зависимости  $pCa$ -скорость миозина из *m. psoas*.

В оптической ловушке 0.5 мкМ ОМ увеличивает продолжительность взаимодействия миозина предсердий с тонким филаментом в 1.6 раза, желудочков – в 1.3 раза, что согласуется с данными, полученными в ИПС по максимальной скорости скольжения тонких филаментов по сердечным миозинам. Таким образом, снижение скорости филаментов в присутствии ОМ объясняется увеличением продолжительности актин-миозинового взаимодействия.



**Рис. 1.** Влияние ОМ на зависимость  $pCa$ -скорость миозина желудочков (А), предсердий (Б) и миозина из *m. psoas* (В). Экспериментальные точки представлены как среднее  $\pm$  SD по трем экспериментам.

Влияние ОМ на характеристики сокращения одиночных демембранных волокон исследовано на микромеханометрической установке с использованием техники скачка температуры [3]. При 5°C 1 мкМ ОМ уменьшает жесткость волокна из *m. psoas*, при скачке температуры ОМ увеличивает жесткость на 20% и снижает напряжение на 20%. Ранее показано, что жесткость волокон из быстрых скелетных мышц при скачке температуры меняется незначительно, и силогенерация обеспечивается переходом поперечных мостиков из нестереоспецифического в стереоспецифическое состояние [3].

При 5°C ОМ увеличивает жесткость волокон из *m. soleus* на 40%, и жесткость не меняется при скачке температуры. После скачка температуры ОМ на 50% снижает максимальное напряжение волокна из медленной мышцы, и значительно замедляет его рост. Без ОМ при скачке температуры жесткость волокна из *m. soleus* значительно увеличивается [4], то есть силогенерация достигается за счет образования новых поперечных мостиков.

Таким образом, ОМ влияет на кальциевую регуляцию актин-миозинового взаимодействия в миокарде и на механизм силогенерации как в волокнах быстрой, так и медленной скелетных мышц, и эффект ОМ зависит от изоформ миозина.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (№18-015-00252) и Программы АААА-А18-118020590135-3 с использованием оборудования ЦКП ИИФ УрО РАН.

### Литература

1. Morgan *et al.*, *ACS Med Chem Lett.* (2010) 1(9): P. 472-7.
2. Caremani *et al.*, *Biophys J.*, (2018) 114(3): P. 644a.
3. Bershtitsky *et al.*, *Nature* (1997) 388(6638): P. 186-90.
4. Kochubei *et al.*, *J Muscle Res Cell Motil.* (2017) 38: P. 388.

## COMPARISON OF THE EFFECT OF OMECAMTIV MECARBIL ON THE INTERACTION OF CARDIAC AND SKELETAL MYOSIN WITH THE THIN FILAMENT

V.Y. Berg<sup>1</sup>, S.R. Nabiev<sup>1</sup>, O.I. Koshcheeva<sup>1,2</sup>, M.A. Sharonova<sup>1,2</sup>,  
L.V. Nikitina<sup>1</sup>, S.Y. Bershtitsky<sup>1</sup>, D.V. Shchepkin<sup>1</sup>, G.V. Kopylova<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Institute of Immunology and Physiology of the RAS,  
Yekaterinburg, St. Pervomayskaya, 106, Russia;*

<sup>2</sup>*Ural Federal University, Yekaterinburg, St. Mira, 19, Russia*

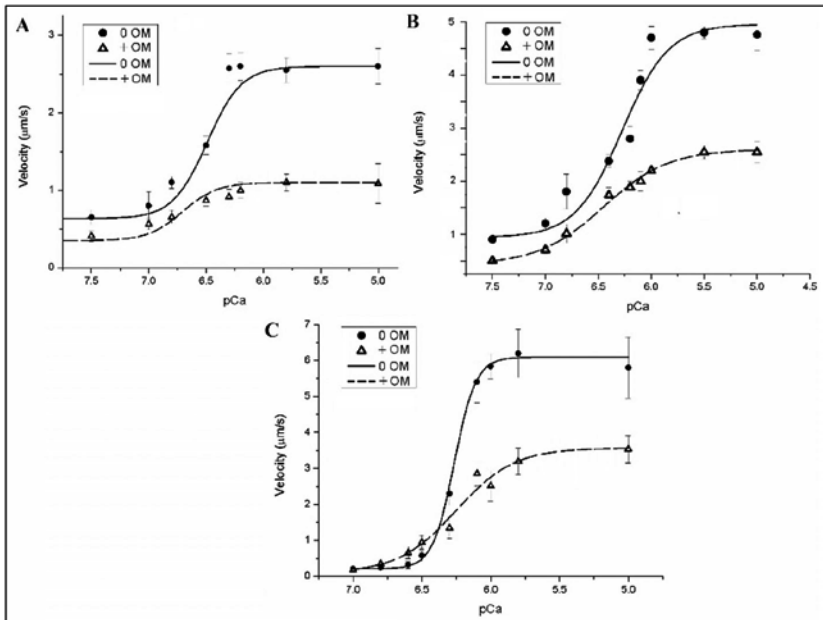
Omeamtiv mecarbیل (СК-1827452; ОМ) was designed as a specific modulator of cardiac myosin function [1]. In skeletal muscles, the slow isoform I of myosin heavy chain (MHC) is expressed similarly to the  $\beta$  isoform of cardiac MHC. It was shown that ОМ affects the mechanism of force generation of fibers from *m. soleus* [2]. We studied the effect of ОМ on the  $\text{Ca}^{2+}$  regulation of the interaction of cardiac and skeletal myosin with actin in an *in vitro* motility assay

(IVMA) and an optical trap, as well as on the contractile characteristics of single skinned fibers from fast (*m. psoas*) and slow (*m. soleus*) skeletal muscles.

Data obtained in IVMA were fitted to the Hill equation:  $V = V_{max} \times (1 + 10^{h(pCa - pCa_{50})})^{-1}$ , where  $V$  and  $V_{max}$  are the sliding velocity of thin filaments and the maximal velocity at the saturating concentration of  $Ca^{2+}$ , respectively;  $pCa_{50}$  ( $Ca^{2+}$  sensitivity) is  $pCa$  at which the velocity is half maximal;  $h$  is the Hill coefficient of cooperativity. We used OM of the Selleck Chemicals LLC. Cardiac myosin was obtained from ventricle and atria of a pig. Myosin from *m. psoas* contained fast isoforms IIx and IIb of MHC and 2% isoform I of MHC. MHCs of myosin from *m. soleus* were present predominantly isoform I. Light chains of myosin from *m. psoas* and *m. soleus* contained isoforms corresponding to the myosin light chain isoforms of these fibers.

We found that OM reduces the maximal sliding velocity of thin filaments and the Hill coefficient of the  $pCa$ -velocity relationship (Fig. 1). OM increases the  $Ca^{2+}$  sensitivity ( $pCa_{50}$ ) of the  $pCa$ -velocity relationship of cardiac myosins and does not affect the  $pCa_{50}$  of the  $pCa$ -velocity relationship of myosin from *m. psoas*.

In the optical trap, 0.5  $\mu M$  OM increases the duration of atrial myosin interaction with the thin filament by 1.6 times, of ventricular one – by 1.3 times, which is consistent with data obtained in IVMA on the maximal sliding velocity



**Fig. 1.** Effect of OM on the  $pCa$ -velocity relationship of ventricular myosin (A), atrial myosin (B), and myosin from *m. psoas* (C). Experimental data are presented as mean  $\pm$  SD for three experiments.



of thin filaments over cardiac myosins. Thus, a decrease in the filament sliding velocity in the presence of OM is explained by an increase in the duration of the actin-myosin interaction.

The effect of OM on the contractile characteristics of single skeletal fibers was studied using a micromechanical setup with the joule temperature jump technique (T-jump) [3]. At 5° C, 1 μM OM reduces the stiffness of the fiber from *m. psoas*. After the T-jump, OM increases stiffness by 20% and reduces tension by 20%. It was shown previously that after the T-jump, the stiffness of fibers from fast skeletal muscle changes slightly, and the force generation is provided by the transition of cross-bridges from a non-stereospecific to a stereospecific state [3].

At 5° C, OM increases the stiffness of fibers from *m. soleus* by 40%, and, after the T-jump, the stiffness does not change. After the T-jump, OM reduces the maximal tension of the fiber from the slow muscle by 50%, and significantly slows down its rise. After the T-jump without OM, the stiffness of the fiber from *m. soleus* increases significantly [4], that is, the force generation is due to the formation of new cross-bridges.

Thus, OM affects the calcium regulation of the actin-myosin interaction in the myocardium and the mechanism of force generation in both fast and slow skeletal muscle fibers, and the effect of OM depends on myosin isoforms.

This work was supported by RFBR (№ 18-015-00252) and Program AAAA-A18-118020590135-3. This work was performed using the equipment of SRC IP UrB RAS.

### References

1. Morgan *et al.*, *ACS Med Chem Lett.* (2010) 1(9): P. 472-7.
2. Caremani *et al.*, *Biophys J.*, (2018) 114(3): P. 644a.
3. Bershitsky *et al.*, *Nature* (1997) 388(6638): P. 186-90.
4. Kochubei *et al.*, *J Muscle Res Cell Motil.* (2017) 38: P. 388.

## ВЛИЯНИЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ДИАБЕТА 1 ТИПА НА ФУНКЦИЮ МИОЗИНА ИЗ ЛЕВОГО И ПРАВОГО ЖЕЛУДОЧКОВ КРЫС

В.Ю. Берг<sup>1</sup>, Д.В. Щепкин<sup>1</sup>, А.Д. Хохлова<sup>1,2</sup>, Г.В. Копылова<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт иммунологии и физиологии УрО РАН,  
Екатеринбург, ул. Первомайская, 106, Россия;

<sup>2</sup>УрФУ имени Первого Президента России Б.Н. Ельцина,  
Екатеринбург, ул. Мира, 19, Россия

Сахарный диабет (СД) 1 типа приводит к развитию диабетической кардиомиопатии. Левый (ЛЖ) и правый желудочки (ПЖ) различаются по своей структуре и функции как в здоровом сердце, так и при патологии [Belin *et al.*, *Pflugers Arch.* 2011]. Мы исследовали функцию миозина из ЛЖ и ПЖ при экспериментально вызванном СД 1 типа.

Исследование проводилось в соответствии с принципами, изложенными в Директиве 2010/63/EU. СД 1 типа индуцировали у самцов крыс ли-

нии Вистар в возрасте 12 недель путем трехкратного внутривентрикулярного введения аллоксана в дозе 100 мг/кг веса в течение одной недели. Через пять недель образцы плазмы крови были взяты для анализа, и СД был подтвержден увеличением концентрации глюкозы и уровня гликозилированного гемоглобина. Кальциевую регуляцию взаимодействия миозина с нативными тонкими филаментами (NTF) изучали с помощью *in vitro* подвижной системы [Matyushenko *et al.*, *Biochemistry* 2017]. NTF, содержащие F-актин, тропомиозин и тропонин, были выделены из ЛЖ и ПЖ здоровых крыс [Spiess *et al.*, *J. Struct. Biol.* 1999]. Кальциевую зависимость скорости скольжения NTF по миозину в *in vitro* подвижной системе ( $pCa$ -скорость) анализировали с помощью уравнения Хилла.

Скорости скольжения NTF при насыщающей концентрации  $Ca^{2+}$  (максимальная скорость) и F-актина по миозину из ЛЖ и ПЖ не отличались, как у крыс с СД, так и у интактных животных. Скорость скольжения F-актина по миозину из ЛЖ и ПЖ крыс с СД была примерно в два раза меньше, чем по миозину здоровых крыс. Максимальная скорость скольжения NTF по миозину крыс с СД снизилась на 30% по сравнению с контрольной группой. Кальциевая чувствительность зависимости  $pCa$ -скорость миозина крыс с СД была ниже на 0,2  $pCa$ .

Таким образом, СД оказывает существенное влияние на кальциевую регуляцию актин-миозинового взаимодействия как в ЛЖ, так и в ПЖ. Полученный результат можно объяснить изменением экспрессии изоформ тяжелых цепей миозина [Paulson *et al.* *J. Mol. Cell Biochem.* 1992] и его окислительным повреждением [Yudkin *et al.* *Diabet Med.* 1988].

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ №18-74-10059 с использованием оборудования ЦКП ИИФ УрО РАН.

## THE EFFECTS OF EXPERIMENTAL DIABETES TYPE 1 ON THE FUNCTION OF MYOSIN FROM THE LEFT AND RIGHT VENTRICLES

V.Y. Berg<sup>1</sup>, D.V. Shchepkin<sup>1</sup>, A.D. Khokhlova<sup>1,2</sup>, G.V. Kopylova<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Institute of Immunology and Physiology of the RAS,*

*Yekaterinburg, St. Pervomayskaya, 106, Russia;*

<sup>2</sup>*Ural Federal University, Yekaterinburg, St. Mira, 19, Russia*

Diabetes mellitus (DM) type 1 leads to diabetic cardiomyopathy. The left (LV) and right ventricles (RV) differ structurally and functionally. These inter-ventricular differences exist in both nondiseased and diseased cardiac muscle [Belin *et al.*, *Pflugers Arch.* 2011]. We studied the function of sarcomeric proteins from the RV and LV in experimental DM type 1.

The study followed the Directive 2010/63/EU. DM type 1 was induced in male Wistar rats at 12 weeks of age by three intraperitoneal injection of alloxan in a dose 100 mg/kg during one week. After five weeks, blood plasma samples were collected for analysis, and DM was confirmed by increasing the glucose

concentration and glycosylated hemoglobin level. The calcium regulation of the myosin interaction with native thin filaments (NTF) was studied using an *in vitro* motility assay [Matyushenko *et al.*, *Biochemistry* 2017]. NTF containing actin, tropomyosin, and troponin were extracted from LV and RV of healthy rats [Spiess *et al.*, *J. Struct. Biol.* 1999]. The calcium dependence of the sliding velocity of NTF (*pCa*-velocity relationship) was analyzed by Hill equation [Matyushenko *et al.*, *Biochemistry* 2017].

No significant differences in the sliding velocity of NTF at saturating calcium concentration (the maximal sliding velocity) and F-actin were found between the ventricles in both control and diabetic groups. The sliding velocity of F-actin over myosin from LV and RV of diabetic rats was about two times slower as compared with healthy rats. The maximal sliding velocity of NTF over myosins of DM rats decreased by 30% compared with the control group. Calcium sensitivity of the *pCa*-velocity relationship of myosin of DM rats was lower by 0.2 *pCa*.

Thus, DM significantly effects on the calcium regulation of the actin-myosin interaction in the LV and RV. The results may be explained by a shift of the myosin heavy chain isoforms [Paulson *et al.* *J.Mol Cell Biochem.* 1992] and oxidative damage of cardiac myosin [Yudkin *et al.* *Diabet Med.* 1988].

This work was supported by the Russian Science Foundation № 18-74-10059 and performed using the equipment of SRC IIP UB RAS.

## **ВЛИЯНИЕ ДИСУЛЬФИДНОЙ СШИВКИ ЦЕПЕЙ ТРОПОМИОЗИНА НА ЕГО СТРУКТУРНЫЕ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА**

**С.Ю. Бершицкий<sup>1</sup>, Г.В. Копылова<sup>1</sup>, Н.А. Кубасова<sup>2</sup>,  
Д.И. Левицкий<sup>3,4</sup>, А.М. Матюшенко<sup>3</sup>, С.Р. Набиев<sup>1</sup>,  
Л.В. Никитина<sup>1</sup>, Д.В. Щепкин<sup>1</sup>, А.К. Цатурян<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>*Институт иммунологии и физиологии РАН, Екатеринбург, Россия*

<sup>2</sup>*Институт механики МГУ, Россия*

<sup>3</sup>*Институт биохимии им. А.Н. Баха, ФИЦ биотехнологии РАН,  
Москва, Россия*

<sup>4</sup>*Институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, МГУ, Россия*

Тропомиозин поперечно-полосатых мышц (Тм) содержит остатки Cys190, которые обычно находятся в восстановленном состоянии, но при сердечной недостаточности образуют дисульфидные мостики. Изменения структурных и функциональных свойств Тм, вызванных дисульфидной сшивкой, изучали с использованием различных экспериментальных подходов и молекулярной динамики (МД).

Для сравнения структурных свойств сшитого и восстановленного Трпм использовали дифференциальную сканирующую калориметрию, круговой дихроизм и МД. Взаимодействие сшитого и восстановленного Тм с актином изучали методами косимедиации и светорассеяния. Изгибную жесткость реконструированных тонких нитей измеряли с помощью двух-

лучевой оптической ловушки, а их функциональные свойства – с помощью анализа подвижности *in vitro*.

Сшивка вызывала повышение термостабильности Тм (главным образом в С-концевой части) с одновременным снижением термостабильности его наименее стабильной центральной части и комплексов Тм с актином. После сшивки сродство Тм к актину снижалось в 3 раза, а изгибная жесткость Тм-тропонин-актиновых нитей увеличивалась на 44%. Сшивка также вызывала увеличение скорости скольжения *in vitro* реконструированных тонких филаментов по поверхности, покрытой миозином скелетных мышц, на 20-30% и увеличение в 2 раза, если скольжение вызывалось миозином желудочков (но не предсердий) сердца. МД-моделирование средней части Тм показало, что сшивка вызывает увеличение изгибной жесткости на ~40% при 27°C, в то время как при 40°C, наоборот, приводит к снижению жесткости на ~ 20% и, что интересно, снижает заселенность водородных связей остатков 129-138 Тм  $\alpha$ -спиралей. Последние результаты хорошо согласуются с данными по термостабильности и объясняют наблюдения Yampolsky и др. [Biophys J. 2011. 100: 112a], которые обнаружили, что сшивка ускоряет расщепление Тм трипсином между остатками Arg133 и Ala134 при 40°C, но не при 26°C.

Полученные данные свидетельствуют о том, что дисульфидная сшивка Тм оказывает дальнедействующее влияние на структуру значительно удаленных частей молекулы Тм и модулирует его регуляторные свойства в зависимости от типа миозина.

Работа выполнена при поддержке РФФИ 17-00-00066 (АКЦ), 17-00-00070 (СЮБ) и 17-00-00065 (ДИЛ) объединенного проекта 17-00-00071.

## **EFFECTS OF DISULFIDE CROSS-LINKING OF $\alpha$ -TROPOMYOSIN ON ITS STRUCTURE AND FUNCTION**

**S.Y. Bershitsky<sup>1</sup>, G.V. Kopylova<sup>1</sup>, N.A. Koubassova<sup>2</sup>,  
D.I. Levitsky<sup>3,4</sup>, A.M. Matyushenko<sup>3</sup>, S.R. Nabiev<sup>1</sup>, L.V. Nikitina<sup>1</sup>,  
D.V. Shchepkin<sup>1</sup>, A.K. Tsaturyan<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>*Institute of Immunology and Physiology RAS,  
Yekaterinburg, Russia*

<sup>2</sup>*Institute of Mechanics, Moscow State University, Russia*

<sup>3</sup>*A.N. Bach Institute of Biochemistry, Research Center of Biotechnology RAS,  
Moscow, Russia*

<sup>4</sup>*Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Moscow State University,  
Moscow, Russia*

Striated muscle tropomyosin (Tpm) contains a Cys190 residue. These residues Cys190 of two Tpm chains are normally in the reduced state, but in failing hearts, they form an interchange cross-linking. Changes in structural and functional properties of Tpm induced by the disulphide cross-linking were studied using different experimental approaches and molecular dynamics (MD).

Differential scanning calorimetry, circular dichroism, and molecular dynamics simulation were used to compare the structural properties of cross-linked and unlinked Tpm. The interaction of cross-linked and unlinked Tpm with actin was studied with cosedimentation and light scattering methods. The bending stiffness of the reconstructed Tpm-actin filaments was measured using a two-beam optical trap. Functional properties of cross-linked and unlinked Tpm was studied with the in vitro motility assay.

The cross-linking induced an increase in general thermal stability of Tpm (mainly in the C-terminal part) with a simultaneous decrease in thermal stability of its less stable middle part and of the actin-Tpm complexes. Upon the cross-linking, Tpm affinity for actin decreased 3-fold and the bending stiffness of the actin-Tpm-troponin filaments increased by 44%. The cross-linking induced a 20-30% increase in the in vitro sliding velocity of reconstructed thin filaments over the surface covered by skeletal muscle myosin and a 2-fold velocity increase if the sliding was driven by ventricular (but not atrial) cardiac myosin. MD simulation of the middle part of Tpm showed a ~40% increase in its bending stiffness upon the cross-linking at 27 °C, while at 40 °C the cross-linking caused a decrease ~20% in the stiffness and, interestingly, in the occupancy of the backbone hydrogen bonds in the region of residues 129-138 of the Tpm  $\alpha$ -helices. The last findings agree well with our thermal stability data and explain the observations of Yampolsky et al. [Biophys J. 2011. 100: 112a] who found that the cross-linking accelerated Tpm trypsin cleavage between residues Arg133 and Ala134 at 40 °C, but not at 26 °C.

The data suggest that the disulphide Tpm cross-linking has a long-range effect on the structure of quite distal parts of the Tpm molecule and modulates its regulatory properties in a myosin-dependent manner.

Supported by research grants 17-00-00066 (to A.T.), 17-00-00070 (to S.B.), and 17-00-00065 (to D.L.) of the collaboration project 17-00-00071 of the Russian Foundation for Basic Research.

## **САРКОМЕРНЫЕ БЕЛКИ МИОЗИН И $\alpha$ -АКТИНИН ВЫХОДЯТ ИЗ АКТИН-СОДЕРЖАЩИХ СТРУКТУР ПРИ ПЕРЕСТРОЙКЕ СОКРАТИТЕЛЬНОГО АППАРАТА КАРДИОМИОЦИТОВ**

**Н.Б. Бильдюг**

*Институт цитологии РАН,*

*Санкт-Петербург, Тихорецкий пр., 4, Россия*

*e-mail: nbildyug@gmail.com*

В процессе культивирования кардиомиоцитов происходит обратимая перестройка их сократительного аппарата с преобразованием типичных миофибрилл в структуры, напоминающие стресс-фибриллы немых клеток. Данные нашей предыдущей работы указывают на то, что такая перестройка вызвана замещением сердечного актина – основного белка миофиб-

рилл – на его гладкомышечную изоформу (Bilyug et al., 2016), которая в норме характерна для гладкомышечных клеток и миофибробластов, а также экспрессируется в кардиомиоцитах в ходе эмбрионального развития (Ruzicka and Schwartz, 1988) и при патологических изменениях (Suurmeijer et al., 2003). Целью настоящей работы было выяснить, что происходит при перестройке сократительного аппарата кардиомиоцитов с ключевыми взаимодействующими с актином белками миофибрилл – миозином и альфа-актинином. Работу проводили на первичной культуре неонатальных кардиомиоцитов крыс с использованием метода непрямой иммунофлуоресценции. До начала перестройки сократительного аппарата моноклональные антитела против сердечных изоформ миозина и альфа-актина выявляли указанные белки в составе миофибрилл, тогда как на стадии полной перестройки эти белки выявлялись в цитоплазме клеток в виде не связанных с полимерным актином включений. Таким образом, было показано, что смена изоформ актина сопровождается выходом ключевых саркомерных белков из актин-содержащих структур. Полученные данные подтверждают несовместимость гладкомышечного актина с саркомерными изоформами белков, взаимодействующих с актином, и миофибриллярной организацией в целом.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ № 18-74-00129.

### Литература

- Bilyug N., Bozhokina E., Khaitlina S. 2016. Contribution of  $\alpha$ -smooth muscle actin and extracellular matrix to the in vitro reorganization of cardiomyocyte contractile system. Cell Biol Int, 40 (4) : 472–7*
- Ruzicka D.L., Schwartz R.J. 1988. Sequential activation of alpha-actin genes during avian cardiogenesis: vascular smooth muscle alpha-actin gene transcripts mark the onset of cardiomyocyte differentiation. J Cell Biol. 107 : 2575–2586*
- Suurmeijer A.J.H., Clément S., Francesconi A., Bocchi L., Angelini A., Van Veldhuisen J., Spagnoli L.G., Gabbiani G., Orlandi A. 2003.  $\alpha$ -Actin isoform distribution in normal and failing human heart: a morphological, morphometric, and biochemical study. J Pathol. 199 : 387–397.*

## **SARCOMERIC MYOSIN AND $\alpha$ -ACTININ RELEASE FROM THE ACTIN STRUCTURES DURING THE REARRANGEMENT OF CONTRACTILE APPARATUS IN CARDIOMYOCYTES**

**N. Bilyug**

*Institute of Cytology RAS, Saint-Petersburg, Tikhoretsky ave. 4, Russia  
e-mail: nbilyug@gmail.com*

Cardiac myocytes in culture undergo reversible rearrangement of their contractile apparatus with conversion of typical myofibrils into the structures resembling stress-fibers of non-muscle cells. Our previous data suggest that this rearrangement is induced by the replacement of cardiac actin, the main protein of myofibrils, by its smooth muscle isoform (Bilyug et al., 2016), which is normally restricted to smooth muscle cells and myofibroblasts, and is also expressed

in cardiomyocytes during embryonic development (Ruzicka and Schwartz, 1988) and pathological changes (Suurmeijer et al., 2003). This study was aimed to learn the fate of the key actin-interacting sarcomeric proteins, myosin and alpha-actinin, during the rearrangement of contractile apparatus in cardiac myocytes. The primary culture of rat neonatal cardiomyocytes and the indirect immunofluorescence technique were used. Prior to the contractile apparatus rearrangement cardiac myosin and cardiac  $\alpha$ -actinin were detected within myofibrils using monoclonal antibodies, whereas at the total rearrangement stage these proteins were detected in cell cytoplasm as inclusions non-bound with actin polymeric structures. Thus, actin isoform replacement was shown to be accompanied by the release of key sarcomeric proteins from the actin structures. The data obtained confirm that smooth-muscle actin is incompatible with sarcomeric isoforms of actin-interacting proteins and myofibrillar organization, in general.

Supported by the Russian Science Foundation (grant No. 18-74-00129).

### References

- Bildyug N., Bozhokina E., Khatlina S.* 2016 Contribution of  $\alpha$ -smooth muscle actin and extracellular matrix to the in vitro reorganization of cardiomyocyte contractile system. *Cell Biol Int*, 40 (4) : 472–7
- Ruzicka D.L., Schwartz R.J.* 1988. Sequential activation of alpha-actin genes during avian cardiogenesis: vascular smooth muscle alpha-actin gene transcripts mark the onset of cardiomyocyte differentiation. *J Cell Biol.* 107 : 2575–2586
- Suurmeijer A.J.H., Clément S., Francesconi A., Bocchi L., Angelini A., Van Veldhuizen J., Spagnoli L.G., Gabbiani G., Orlandi A.* 2003.  $\alpha$ -Actin isoform distribution in normal and failing human heart: a morphological, morphometric, and biochemical study. *J Pathol.* 199 : 387–397.

## ВОЗМОЖНАЯ ФИЗИОЛОГИЧЕСКАЯ РОЛЬ ОБРАТИМОЙ АМИЛОИДНОЙ АГРЕГАЦИИ ТИТИНА А.Г. Бобылёв<sup>1</sup>, Э.И. Якупова<sup>1</sup>, Я.А. Шоно<sup>2</sup>, Л.Г. Бобылёва<sup>1</sup>, И.М. Вихлянцев<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН;

<sup>2</sup>Кубанский государственный университет;

<sup>3</sup>Пуцинский государственный естественно-научный институт

e-mail: bobylev1982@gmail.com

Агрегация белков и, в частности, формирование амилоидных агрегатов, рассматривается, в основном, как негативный процесс, сопровождающийся развитием патологических изменений. Накопление амилоидных отложений (нерастворимых белковых агрегатов) связывают с развитием амилоидозов – конформационных заболеваний. Однако все больше исследователей обращают внимание на другой тип амилоидных агрегатов – функциональные амилоиды, формирование которых обратимо и не связано с заболеваниями, а наоборот, необходимо для выполнения определенных функций в организме. Теория обратимой агрегации белка в последнее время

стала новой концепцией клеточной регуляции [1]. Хотя регуляторные механизмы, лежащие в основе обратимой белковой агрегации, еще не идентифицированы, обратимая агрегация белка может представлять собой физиологическую форму патологической агрегации белка.

Объектом нашего исследования является мышечный белок титин [2]. Титин (м.м. 500-3700 кДа) является самым большим из известных на сегодняшний день белков. Локализация титина в гладких мышцах остается неизвестной. В саркомерах поперечно-полосатых мышц титин взаимодействует как с миозиновыми, так и актиновыми нитями. Его молекулы длиной около 1 мкм и диаметром 3–4 нм перекрывают половину саркомера от М-зоны до Z-диска, формируя третий тип нитей, получивших название эластичных.

Результаты наших исследований, опубликованные в 2016 году, показали, что титин гладких мышц (изоформа с м.м. 500 кДа) способен формировать амилоидные агрегаты *in vitro*, которые оказывали токсическое действие на культуру гладкомышечных клеток [3]. Также было показано, что гладкомышечный титин способен формировать *in vitro* амилоидные агрегаты различного типа. Они имели кросс-бета структуру, но отличались по способности связываться с красителем тиофлавином Т, при этом у одного из типов амилоидных агрегатов была выявлена способность к дезагрегации [4].

Для выяснения возможных причин обратимой амилоидной агрегации титина, нами были проведены дальнейшие исследования структурных изменений в этом белке в процессе его агрегации. При исследовании агрегатов титина методом инфракрасной спектроскопии с преобразованием Фурье было обнаружено, что в процессе формирования амилоидных агрегатов двух типов изменений во вторичной структуре белка не происходит. При изучении структуры агрегатов титина методом малоуглового рентгеновского рассеяния также не было выявлено значительных конформационных отличий у двух типов амилоидных агрегатов вышеуказанной изоформы гладкомышечного титина. При этом были обнаружены одинаковые радиусы инерции (18,4 нм и 19,5 нм), полученные для молекулярного титина и его агрегатов, сформированных в условиях 200 mM KCl, 10 mM имидазола, pH 7.5, соответственно. Средний радиус ( $R_g$ ) агрегатов титина, сформированных в условиях 0,15 M Глицин-КОН, pH 7.0, был равен 14,0 нм, что существенно не отличалось от вышеуказанных значений.

Таким образом, на основании результатов, полученных с использованием инфракрасной спектроскопии с преобразованием Фурье и малоуглового рентгеновского рассеяния, можно заключить, что при формировании агрегатов в условиях 200 mM KCl, 10 mM имидазола, pH 7.5 не происходит изменений во вторичной структуре титина. Поскольку по данным динамического светорассеяния титин уже в течение 20 мин формирует обратимые агрегаты [3,4], можно предположить, что способность титина к



агрегации может иметь функциональное значение в клетке. В частности, агрегация титина может играть роль в создании дополнительной жесткости, например, при перерастяжении или усиленной работе мышц, за счет формирования временно обратимых кросс-бета структурированных участков между соседними молекулами белка.

Работа выполнена в рамках Государственного задания Института теоретической и экспериментальной биофизики (ИТЭБ) РАН при финансовой поддержке гранта РФФИ (№18-04-00125) с использованием оборудования коллективного пользования ИТЭБ РАН и ИБК РАН.

### **Литература**

1. S. Saad, G. Cereghetti, Y. Feng, P. Picotti, M. Peter & R. Dechant Reversible protein aggregation is a protective mechanism to ensure cell cycle restart after stress *Nature Cell Biology* volume 19, pages 1202–1213 (2017)
2. Alberti, S., Mateju, D., Mediani, L. & Carra, S. Granulostasis: protein quality control of RNP granules. *Front. Mol. Neurosci.* 10, 84 (2017)
3. Bobylev, A.G., et. all., *Biosci Rep.*, 2016
4. E. I. Yakupova, I. M. Vikhlyantsev, L. G. Bobyleva, N. V. Penkov, A. A. Timchenko, M. A. Timchenko, G. A. Enin, S. S. Khutzian, O. M. Selivanova and A. G. Bobylev Different amyloid aggregation of smooth muscles titin in vitro // *Journal of Biomolecular Structure & Dynamics*, 2018, Vol. 36, No. 9, 2237–2248, <https://doi.org/10.1080/07391102.2017.1348988>

## **A POSSIBLE PHYSIOLOGICAL ROLE OF REVERSIBLE AMYLOID AGGREGATION OF TITIN**

**A.G. Bobylev<sup>1</sup>, E.I. Yakupova<sup>1</sup>, Ya.A. Shono<sup>2</sup>,  
L.G. Bobyleva<sup>1</sup>, I.M. Vikhlyantsev<sup>1,3</sup>**

<sup>1</sup>*Institute of Theoretical and Experimental Biophysics RAS, Pushchino, Moscow Region, Russia*

<sup>2</sup>*Kuban State University, Krasnodar, Krasnodar Krai, Russia*

<sup>3</sup>*Pushchino State Institute of Natural Sciences,*

*Pushchino, Moscow Region, Russia, e-mail: bobylev1982@gmail.com*

Protein aggregation, especially the formation of amyloid aggregates, is generally recognized as being a negative process accompanied by development of pathological changes. The accumulation of amyloid deposits (insoluble protein aggregates) is thought to be linked to development of amyloidoses - conformational diseases. At the same time, more and more scientists turn their attention to another type of amyloid aggregates – functional amyloids, the formation of which is reversible and do not lead to disease, and their presence is needed to carry out specific functions in the body. In recent years reversible protein aggregation has become a new theory for cellular regulation [1]. Although regulatory mechanisms that underlie reversible protein aggregation have yet to be identified, reversible protein aggregation can be considered to be a structure that exerts a physiological function in pathological protein aggregation.

The object of our study is titin, a muscle protein [2]. Titin (molecular weight of 500-3700 kDa) is the largest currently known protein. The localization of this protein in smooth muscles remains unknown. In the striated muscle sarcomere titin interacts both with myosin and actin filaments. Molecules of titin about 1  $\mu\text{m}$  in size and 3-4 nm in diameter overlap the half sarcomere extending from the M-band to Z disc, forming the third filament system called elastic connections.

The results of our studies published in 2016 showed that smooth muscle titin (isoform with molecular weight of 500 kDa) is able to form *in vitro* amyloid aggregates which have the toxic effect on smooth muscle cells [3]. It has also been shown that smooth muscle titin is able to form *in vitro* different amyloid aggregates. They all have cross-beta structure but distinguish by the ability to bind the dye thioflavin T. Herewith it has been found that titin amyloid aggregation has disaggregation ability.

For better understanding of possible causes of reversible amyloid aggregation of titin, we further studied structural changes in this protein during its aggregation. By exploring titin aggregates with the use of Fourier-transform infrared spectroscopy, we found that there were no changes in the secondary structure of the protein during the formation of two different amyloid aggregation types. Also, while studying the structure of titin aggregates by small-angle x-ray scattering, no significant conformational differences were revealed in two different amyloid aggregation types of the smooth muscle titin isoform. However, it has been found that radii of inertia were equal (18.4 nm and 19.5 nm) for molecular titin and its aggregates, formed in the presence of 200 mM KCl, 10 mM imidazole, pH 7.5, respectively. The average radius of gyration,  $R_g$ , of titin aggregates formed in the presence of 0.15 M Glycine-KOH, pH 7.0 was equal to 14.0 nm, that did not significantly differ from the above values.

Therefore, on the basis of data obtained with the use of Fourier-transform infrared spectroscopy and small-angle x-ray scattering, we may conclude that during the formation of aggregates in the presence of 200 mM KCl, 10 mM imidazole, pH 7.5 no changes occur in the secondary structure of titin. Taking into account that according to the dynamic light scattering data titin is able to form reversible aggregates for 20 min [3, 4], we may suggest that the ability of titin to aggregate can have a functional role in the cell. Notably, titin aggregation may have a role in the development of extra stiffness, for instance in hyperextension or intensive work of muscles by virtue of the formation of temporally reversible cross-beta structure sites between neighboring molecules of the protein.

The work has been done under the State task of the Institute of Theoretical and Experimental Biophysics of the Russian Academy of Sciences, funded by the Russian Foundation for Basic Research, grant number 18-04-00125 with the use of research equipment of the centers for collective use at ITEB RAS and ICB RAS.

### References

1. S. Saad, G. Cereghetti, Y. Feng, P. Picotti, M. Peter & R. Dechant Reversible protein aggregation is a protective mechanism to ensure cell cycle restart after stress Nature Cell Biology volume 19, pages 1202–1213 (2017)

2. Alberti, S., Mateju, D., Mediani, L. & Carra, S. Granulostasis: protein quality control of RNP granules. *Front. Mol. Neurosci.* 10, 84 (2017)
3. Bobylev, A.G., et. all., *Biosci Rep.*, 2016
4. E. I. Yakupova, I. M. Vikhlyantsev, L. G. Bobyleva, N. V. Penkov, A. A. Timchenko, M. A. Timchenko, G. A. Enin, S. S. Khutzian, O. M. Selivanova and A. G. Bobylev Different amyloid aggregation of smooth muscles titin in vitro // *Journal of Biomolecular Structure & Dynamics*, 2018, Vol. 36, No. 9, 2237–2248, <https://doi.org/10.1080/07391102.2017.1348988>

## **МИОЗИН-СВЯЗЫВАЮЩИЙ БЕЛОК С ФОРМИРУЕТ АМИЛОИДОПОДОБНЫЕ АГРЕГАТЫ *in vitro***

**Л.Г. Бобылёва<sup>1</sup>, С.А. Шумейко<sup>1</sup>, Э.И. Якупова<sup>1</sup>, А.Д. Уланова<sup>1</sup>,  
Н.Н. Салмов<sup>1</sup>, И.М. Вихлянецв<sup>1,2</sup>, А.Г. Бобылёв<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>*Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт  
теоретической и экспериментальной биофизики РАН;*

<sup>2</sup>*Пушчинский государственный естественно-научный институт,  
e-mail: liamar@rambler.ru*

Агрегация белков является достаточно распространенным процессом, происходящим в клетках живого организма. Агрегация, в свою очередь, может разделяться на амилоидную и неамилоидную. Амилоидная агрегация вызывает большой интерес среди исследователей во всем мире, в связи с широким распространением у человека и животных амилоидозов – заболеваний, при которых в разных органах и тканях находят амилоидные отложения, в состав которых входят неправильно свернутые белки. К амилоидозам относятся болезнь Альцгеймера, Паркинсона, диабет II типа, прионные заболевания, а также системные амилоидозы [1,2,3,4]. Однако все больше исследователей обращают внимание на другой тип амилоидных агрегатов – функциональные амилоиды, формирование которых не связано с заболеваниями, а наоборот, необходимо для выполнения определенных функций в организме. Функциональные амилоиды формируют такие белки, как курлин (curli, *E. Coli*) [5], тафи (tafi, *Salmonella* spp.) [6], чаплины (chaplins, *Streptomyces coelicolor*) [7]. К функциональным амилоидам относятся и фибриллы спидроина, которые входят в состав паутиновых нитей [8], а также фибриллы Pmel17 у млекопитающих [9].

Поскольку, все амилоидные агрегаты имеют общие свойства, и, в частности, свойственную всем амилоидам кросс-бета структура, совершенно не ясно, какие механизмы регулируют процесс образования патологических и функциональных амилоидов в организме. Ответы на эти вопросы могут дать результаты исследований амилоидных свойств мультидоменных мышечных белков семейства титина (титин и миозин-связывающий белок С). Предполагается, что титин имеет высокую склонность к агрегации, несмотря на низкую идентичность в аминокислотной последовательности между соседними доменами белка [10]. Полученные

методом молекулярной динамики данные на двух иммуноглобулиновых доменах титина свидетельствуют о возможности формирования этими доменами структур с разным типом укладки, среди которых была отмечена группа конформаций, имеющих структуру амилоидного типа [11]. Авторы назвали их «intramolecular amyloid» [11]. В наших исследованиях, проведенных на гладкомышечном титине *in vitro*, обнаружена способность этого белка формировать амилоидные структуры [12]. При этом были выявлены следующие особенности агрегации этого белка: высокая скорость агрегации (наблюдаются крупные частицы уже в первые минуты агрегации), обратимость агрегации, отсутствие изменений во вторичной структуре при формировании кросс-бета структуры [13]. Учитывая эти данные можно говорить о возможной функциональной роли агрегации титина.

В данной работе мы исследовали особенности амилоидной агрегации миозин-связывающего С-белка (МуВР-С) скелетных мышц млекопитающих. МуВР-С – белок саркомерного цитоскелета поперечно-полосатых мышц. Он расположен в А-диске саркомера и связан с белками толстых и тонких нитей. Также как и титин, МуВР-С состоит из Ig-подобных и FnIII-подобных доменов [14]. Две скелетные изоформы этого белка экспрессируются в медленных и быстрых мышечных волокнах. Показано, укороченная форма сердечного МуВР-С может участвовать в формировании белковых агрегатов при развитии гипертрофической кардиомиопатии [15]. Исследования, проведенные нами с помощью электронной и атомно-силовой микроскопии, показали, что МуВР-С скелетных мышц кролика в условиях с низкой ионной силой (0,15М Глицин-КОН, pH-7,0) формирует аморфные агрегаты и фибриллы. Изучение кинетики агрегации методом динамического светорассеяния выявило способность МуВР-С подобно титину формировать крупные агрегаты уже в первые минуты при понижении ионной силы. Помимо крупных агрегатов МуВР-С формировал олигомеры, состоящих из 5-7 молекул белка, которые наблюдались и через 12 часов после начала агрегации.

Структурные исследования агрегатов МуВР-С, проведенные методом рентгеновской дифракции, выявили наличие рефлексов, которые предполагают наличие четвертичной кросс-бета структуры, свойственной амилоидным агрегатам. Методом кругового дихроизма показано, что в процессе агрегации МуВР-С не происходит изменений во вторичной структуре белка. Полученные результаты указывают на то, что в процессе агрегации МуВР-С происходят внутримолекулярные перестройки, которые протекают без значительных энергетических затрат на формирование кросс-бета структуры. Можно предположить, что формирование кросс-бета структуры происходит как за счет частичного или полного разворота доменов внутри белка, так и между доменами соседних молекул белка. Полученные результаты расширяют представления о процессе агрегации мультидоменных мышечных белков.

Работа выполнена в рамках Государственного задания Института теоретической и экспериментальной биофизики (ИТЭБ) РАН при финансовой поддержке гранта РФФИ (№18-015-00268) с использованием оборудования коллективного пользования ИТЭБ РАН и ИБК РАН.

### Литература

1. Knowles TP, Vendruscolo M, Dobson CM. The amyloid state and its association with protein misfolding diseases. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2014 Jun;15(6):384-96. doi: 10.1038/nrm3810.
2. Dobson, C.M. (2004) Experimental investigation of protein folding and misfolding. *Methods.* 34, 4–14.
3. Buxbaum, J.N., and Linke, R.P. (2000) A molecular history of the amyloidoses. *J. Mol. Biol.*, 421, 142–159.
4. Dobson C.M. (2004) Principles of protein folding, misfolding and aggregation // *Semin. Cell Dev. Biol. V. 15. P. 3-16.*
5. Olsen, A., Jonsson, A. and Normark, S. (1989) Fibronectin binding mediated by a novel class of surface organelles on *Escherichia coli*. *Nature* 338, 652 – 655
6. Rçmling, U., Bian, Z., Hammar, M., Sierralta, W. D. and Normark, S. (1998) Curli fibers are highly conserved between *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* with respect to open structure and regulation. *J. Bacteriol.* 180, 722 – 731.
7. Claessen, D., Rink, R., de Jong, W., Siebring, J., de Vreughd, P., Boersma, F. G. H., Dijkhuizen, L. and Wçsten, H. A. B. (2003) A novel class of secreted hydrophobic proteins is involved in aerial hyphae formation in *Streptomyces coelicolor* by forming amyloid-like fibrils. *Genes Dev.* 17, 1714 – 1726.
8. Slotta U., Hess S., Spiess K., et al. 2007. Spider silk and amyloid fibrils: a structural comparison. *Macromol. Biosci.* 7, 183–188.
9. Fowler, D.M. et al. (2006) Functional amyloid formation within mammalian tissue. *PLoS Biol.* 4, e6.
10. C. F. Wright, S. A. Teichmann, J. Clarke & C. M. Dobson. The importance of sequence diversity in the aggregation and evolution of proteins. *Nature* 438, 878-881 (2005) doi:10.1038/nature04195.
11. A. Borgia, K. R. Kemplen, M. B. Borgia, A. Soranno, S. Shammas, B. Wunderlich, D. Nettels, R. B. Best, J. Clarke & B. Schuler. Transient misfolding dominates multidomain protein folding. *Nat Commun.* (2015) 6:8861. doi: 10.1038/ncomms9861.
12. Bobylev AG, Galzitskaya OV, Fadeev RS, Bobyleva LG, Yurshenas DA, Molochkov NV, Dovidchenko NV, Selivanova OM, Penkov NV, Podlubnaya ZA, Vikhlyantsev IM. Smooth muscle titin forms in vitro amyloid aggregates. *Biosci Rep.* 2016 May 20;36(3). pii: e00334. doi: 10.1042/BSR20160066
13. E. I. Yakupova, I. M. Vikhlyantsev, L. G. Bobyleva, N. V. Penkov, A. A. Timchenko, M. A. Timchenko, G. A. Enin, S. S. Khutzian, O. M. Selivanova and A. G. Bobylev Different amyloid aggregation of smooth muscles titin in vitro // *Journal of Biomolecular Structure & Dynamics*, 2018, Vol. 36, No. 9, 2237–2248, <https://doi.org/10.1080/07391102.2017.1348988>.
14. J.W. McNamara, S. Sadayappan Skeletal myosin binding protein-C: An increasingly important regulator of striated muscle physiology // *Archives of Biochemistry and Biophysics* 660 (2018) 121–128.
15. G. Mearini, S. Schlossarek, M. S. Willis, L. Carrier The ubiquitin–proteasome system in cardiac dysfunction // *Biochimica et Biophysica Acta* 1782 (2008) 749–763.

**MYOSIN BINDING PROTEIN-C FORMS  
AMYLOID-LIKE AGGREGATES *in vitro***

**L.G. Bobyleva<sup>1</sup>, S.A. Shumeyko<sup>1</sup>, E.I. Yakupova<sup>1</sup>, A.D. Ulanova<sup>1</sup>,  
N.N. Salmov<sup>1</sup>, I.M. Vikhlyantsev<sup>1,2</sup>, A.G. Bobylev<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>*Institute of Theoretical and Experimental Biophysics RAS,  
Pushchino, Moscow Region, Russia*

<sup>3</sup>*Pushchino State Institute of Natural Sciences,  
Pushchino, Moscow Region, Russia, e-mail: liamar@rambler.ru*

Protein aggregation is a widespread process that occur in cells of a living organism. Protein aggregation can be amyloid and non-amyloid. Amyloid aggregation is of great interest among researchers around the world because of wide occurrence of amyloidosis in humans and animals, the disease in which amyloid deposits with misfolded proteins was found in different organs and tissues. There are a variety of amyloidoses including Alzheimer's and Parkinson's diseases, type II diabetes, prion diseases, and systemic amyloidosis [1,2,3,4]. At recent time, more and more researchers focus their attention on functional amyloids, the other type of amyloid aggregates, the formation of which is not associated with diseases, but rather serve specific functions in the organism. There are different types of functional amyloids such as curli created by *E.coli* [5], tafi formed by *Salmonella* spp. [6], Chaplins produced by *Streptomyces coelicolor* [7]. Spidroin protein fibrils in spider web silk [8] and fibrils from the Pmel17 protein in mammals [9] are also referred to functional amyloids.

While all amyloid aggregates have general properties, for instance, all amyloid fibrils share a common cross- $\beta$  structure, it is unclear what mechanisms regulate the process of the formation of pathological and functional amyloids in the organism. The answers to these questions could be found with the results of studies of amyloid properties in multidomain muscle proteins of the titin family (titin and myosin-binding protein-C). It is suggested that titin has high aggregation propensity regardless of low identity in amino acid sequence between adjacent protein domains [10]. The findings obtained by molecular dynamics method on two Ig-like domains of titin show that these domains may most likely form structures with different types of packing, among which a group of conformations with amyloid-like structure is revealed [11]. Authors described them as "intramolecular amyloid" [11]. In our *in vitro* experiments, smooth muscle titin was found to be able to form amyloid aggregates [12]. Simultaneously, the following specific features of aggregation of this protein were identified: high rate of aggregation (large particles were observed from the first minutes of aggregation), reversibility of aggregation, the lack of alterations in the secondary structure during the formation of cross- $\beta$  structure [13]. Taken all together the results suggest a potential functional role of titin aggregation.

In this study we explored particularities of amyloid aggregation of myosin-binding protein-C (MyBP-C) of mammalian skeletal muscles. MyBP-C is a protein of the striated muscles. This protein found in the A-band of the sarco-

mere. Similar to titin, MyBP-C comprises Ig- and FnIII-like domains [14]. Two skeletal isoforms of this protein are expressed in slow and fast muscles. It has been shown that the truncated form of cardiac MyBP-C may participate in the formation of protein aggregates during development of hypertrophic cardiomyopathy [15]. Our experiments done with the use of transmission electron microscopy and atomic force microscopy showed that MyBP-C in rabbit skeletal muscle at low ionic strength (0,15M glycine-KOH, pH 7.0) forms amorphous and fibrillar aggregates. The study of the kinetics of aggregation by dynamic light scattering method revealed the ability of MyBP-C similar to titin to form large aggregates from the first minutes after reducing the ionic strength. Moreover, MyBP-C was capable of producing oligomers which were composed of 10-12 molecules that were still present in 12 after the beginning of aggregation.

Structural investigations of MyBP-C aggregates carried out with the use of x-ray diffraction showed the presence of reflexes which suggested the presence of a quaternary cross- $\beta$  structure typical of amyloid aggregates. With circular dichroism it has been found that during MyBP-C there are no alterations in the secondary structure of the protein. Our findings indicate that in the process of MyBP-C aggregation intramolecular rearrangements occur without considerable energy demand for the formation of the cross- $\beta$  structure. We may conclude that the formation of the cross- $\beta$  structure is the result of partial or full unfolding of domains inside the protein as well as between the domains of the adjacent protein molecules. Data obtained expand knowledge of the aggregation pathway of multidomain muscle proteins.

The work has been done under the State task of the Institute of Theoretical and Experimental Biophysics of the Russian Academy of Sciences, funded by the Russian Foundation for Basic Research, grant number 18-015-00268 with the use of research equipment of the centers for collective use at ITEB RAS and ICB RAS.

## References

1. Knowles TP, Vendruscolo M, Dobson CM. The amyloid state and its association with protein misfolding diseases. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2014 Jun;15(6):384-96. doi: 10.1038/nrm3810.
2. Dobson, C.M. (2004) Experimental investigation of protein folding and misfolding. *Methods.* 34, 4–14.
3. Buxbaum, J.N., and Linke, R.P. (2000) A molecular history of the amyloidoses, *J. Mol. Biol.*, 421, 142–159.
4. Dobson C.M. (2004) Principles of protein folding, misfolding and aggregation // *Semin. Cell Dev. Biol.* V. 15. P. 3-16.
5. Olsen, A., Jonsson, A. and Normark, S. (1989) Fibronectin binding mediated by a novel class of surface organelles on *Escherichia coli*. *Nature* 338, 652 – 655
6. Rçmling, U., Bian, Z., Hammar, M., Sierralta, W. D. and Normark, S. (1998) Curli fibers are highly conserved between *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* with respect to open structure and regulation. *J. Bacteriol.* 180, 722 – 731.
7. Claessen, D., Rink, R., de Jong, W., Siebring, J., de Vreughd, P., Boersma, F. G. H., Dijkhuizen, L. and Wçsten, H. A. B. (2003) A novel class of secreted hydrophobic proteins is involved in aerial hyphae formation in *Streptomyces coelicolor* by forming amyloid-like fibrils. *Genes Dev.* 17, 1714 – 1726.

8. Slotta U., Hess S., Spiess K., et al. 2007. Spider silk and amyloid fibrils: a structural comparison. *Macromol. Biosci.* 7, 183–188.
9. Fowler, D.M. et al. (2006) Functional amyloid formation within mammalian tissue. *PLoS Biol.* 4, e6.
10. C. F. Wright, S. A. Teichmann, J. Clarke & C. M. Dobson. The importance of sequence diversity in the aggregation and evolution of proteins. *Nature* 438, 878–881 (2005) doi:10.1038/nature04195.
11. A. Borgia, K. R. Kemplen, M. B. Borgia, A. Soranno, S. Shammas, B. Wunderlich, D. Nettels, R. B. Best, J. Clarke & B. Schuler. Transient misfolding dominates multidomain protein folding. *Nat Commun.* (2015) 6:8861. doi: 10.1038/ncomms9861.
12. Bobylev AG, Galzitskaya OV, Fadeev RS, Bobyleva LG, Yurshenas DA, Molochkov NV, Dovidchenko NV, Selivanova OM, Penkov NV, Podlubnaya ZA, Vikhlyantsev IM. Smooth muscle titin forms in vitro amyloid aggregates. *Biosci Rep.* 2016 May 20;36(3). pii: e00334. doi: 10.1042/BSR20160066
13. E. I. Yakupova, I. M. Vikhlyantsev, L. G. Bobyleva, N. V. Penkov, A. A. Timchenko, M. A. Timchenko, G. A. Enin, S. S. Khutzian, O. M. Selivanova and A. G. Bobylev Different amyloid aggregation of smooth muscles titin in vitro // *Journal of Biomolecular Structure & Dynamics*, 2018, Vol. 36, No. 9, 2237–2248, <https://doi.org/10.1080/07391102.2017.1348988>.
14. J.W. McNamara, S. Sadayappan Skeletal myosin binding protein-C: An increasingly important regulator of striated muscle physiology // *Archives of Biochemistry and Biophysics* 660 (2018) 121–128.
15. G. Mearini, S. Schlossarek, M. S. Willis, L. Carrier The ubiquitin–proteasome system in cardiac dysfunction // *Biochimica et Biophysica Acta* 1782 (2008) 749–763.

**ТРОМБИН ПОТЕНЦИРУЕТ СИНАПТИЧЕСКУЮ ПЕРЕДАЧУ  
В МОТОРНЫХ СИНАПСАХ МЫШИ  
С РАЗНЫМ ФУНКЦИОНАЛЬНЫМ СТАТУСОМ**

**П.О. Богачева, Е.О. Тарасова, А.С. Митева, Е.С. Правдивцева,  
А.Е. Гайдуков, О.П. Балезина**

*Московский Государственный Университет имени М.В. Ломоносова,  
Москва, Ленинские горы 1/12, Россия*

Тромбин – сериновая протеаза, способная, помимо участия в гемостазе, действовать и как сигнальная молекула. В этом случае тромбин вызывает ограниченный протеолиз внеклеточного участка связанных с G-белками рецепторов - PARs (*Proteinase-Activated Receptors*), высвобождая «привязанный лиганд», который и активирует рецептор. В ЦНС показана экспрессия тромбина при физиологических условиях и возможность участия тромбина и PARs в регуляции синаптической передачи и ее пластичности как в норме, так и при патологии [1]. Присутствие активируемых тромбином PAR1-рецепторов обнаружено в зрелых и развивающихся моторных синапсах, причем PAR1 локализованы на мембране мышечных волокон и шванновских клеток [2,3]. Экспрессия и возрастание концентрации эндогенного тромбина до уровня, активирующего PAR1, показано при воспалении или повреждении мышечной ткани [4]. При этом возможная роль тромбина как эндогенного



активатора PAR1 в регуляции синаптической передачи как в синапсах, новообразованных при реиннервации мышцы, так и в зрелых моторных синапсах млекопитающих, остается практически неизученной. Целью работы было изучение модулирования квантовой секреции ацетилхолина (АХ) в зрелых и новообразованных моторных синапсах мышцы под действием тромбина (1 нМ) и сравнение острых эффектов тромбина с выявленными нами ранее эффектами пептида-агониста PAR1 [5]. Эксперименты проводили на нервно-мышечных препаратах *m. diaphragma - n. phrenicus* (зрелые синапсы) и *m. extensor digitorum longus (m. EDL) - n. peroneus* (зрелые и новообразованные синапсы на 11 сутки после передавливания нерва) взрослых мышей (30-35 г) обоих полов линии BALB/c. Использовали стандартную микроэлектродную технику для внутриклеточной регистрации миниатюрных потенциалов концевой пластинки (МПКП) и многоквантовых вызванных потенциалов концевой пластинки (ПКП). Достоверность различий между выборками оценивали с использованием t-критерия Стьюдента и двухфакторного дисперсионного анализа. Уровень значимости отличий между двумя выборками составлял 0.05. Тромбин (1 нМ) в зрелых диафрагмальных синапсах равномерно увеличивал амплитуду каждого ПКП в коротком залпе на 25-30% ( $p < 0.05$ ). Параллельно возрастала амплитуда МПКП. Расчет квантового состава показал, что прирост амплитуды ПКП в залпе не сопровождается возрастанием их квантового состава ( $p > 0.05$ ). Эффект тромбина в отношении амплитуды постсинаптических потенциалов был устойчив к отмывке в течение 1 часа. Регистрация только спонтанной активности на нерассеченных нервно-мышечных препаратах диафрагмы выявила увеличение средней амплитуды МПКП на 30% под действием тромбина при отсутствии статистически значимых изменений во временном ходе МПКП и их частоты. Анализ кумулятивных вероятностей распределения амплитуд МПКП выявил их сдвиг вправо, в область более высоких значений амплитуд МПКП под действием тромбина, и этот сдвиг сохранялся при отмывке. Прирост амплитуд МПКП устранялся предварительной аппликацией 1 мкМ везамикола – ингибитора везикулярного транспортера АХ. Совокупность полученных данных позволяет говорить о том, что вызываемое тромбином возрастание амплитуд постсинаптических потенциалов связано с увеличением размера кванта АХ на пресинаптическом уровне за счет увеличения накачки АХ в везикулы. Далее исследовали действие 1 нМ тромбина на спонтанную активность в функционально зрелых и новообразованных синапсах *m. EDL*. В зрелых синапсах *m. EDL* тромбин оказывал действие, аналогичное действию на спонтанную активность зрелых синапсов диафрагмы мышцы: на фоне тромбина амплитуда МПКП возрастала на 28% по сравнению с контролем ( $p < 0.05$ ). В новообразованных синапсах эффект тромбина был еще более выражен – амплитуда МПКП устойчиво увеличивалась на 41% ( $p < 0.05$ ). Таким образом, как в зрелых, так и в функционально незрелых новообразуемых синапсах наблюдается сходство эффектов тромбина в отношении параметров спонтанной секреции, выражающиеся в стойком потенцировании амплитуды МПКП. Учитывая полученные нами ранее данные [5], это позволяет предполагать существование одинакового сигнального механизма, запускаемого активацией тромбиновых рецеп-

торов как в зрелых, так и в формирующихся заново синапсах, несмотря на их разный функциональный статус.

Работа поддержана грантом РФФИ 19-04-00616.

### Литература

1. Ben Shimon M. et al. // Front. Cell. Neurosci. 2015. 9:151.
2. Lanuza M.A. et al. // J. Neurosci. Res. 2007. № 85. P. 748-756.
3. Lanuza M.A. et al. // J. Neurosci Res. 2003 № 73. P. 10-21.
4. Chowdhury M.H. et al. // Acta Neurol. Scand. 2008 № 118 P. 106-114.
5. Gaydukov A.E. et al. // Biochem. Moscow Suppl. Ser. A. 2018 № 12 P. 33-42.

## THROMBIN POTENTIATES SYNAPTIC TRANSMISSION IN MOUSE MOTOR SYNAPSES WITH DIFFERENT FUNCTIONAL STATUS

**P.O. Bogacheva, E.O. Tarasova, A.S. Miteva, E.S. Pravdivceva,  
A.E. Gaydukov, O.P. Balezina**

*Lomonosov Moscow State University, Leninskie Gory 1/12, Moscow, Russia*

Thrombin is a serine protease that can, in addition to participating in hemostasis, act as a signaling molecule. In this case, thrombin causes limited proteolysis of the extracellular region of G-protein-coupled receptors - PARs (Proteinase-Activated Receptors), releasing the "bound ligand", which activates the receptor. In CNS, the expression of thrombin under physiological conditions and the possibility of participation of thrombin and PARs in regulation of synaptic transmission and its plasticity are shown both in normal conditions and in pathology [1]. The presence of thrombin-activated PAR1 receptors was detected in mature and developing motor synapses, with PAR1 localized on the membrane of muscle fibers and Schwann cells [2, 3]. The expression and increase in the concentration of endogenous thrombin to a level that activates PAR1 is indicated after inflammation or muscle damage [4]. At the same time, the possible role of thrombin as an endogenous PAR1 activator in regulation of synaptic transmission both in synapses that are newly-formed during muscle reinnervation and in mature mammalian synapses remains largely unexplored. The aim of this work was to study the modulation of acetylcholine (ACh) quantal secretion in mature and newly-formed mouse motor synapses in presence of thrombin (1 nM) and to compare the acute effects of thrombin with the effects of PAR1 agonist identified earlier [5]. Experiments were performed on neuromuscular preparations of m. diaphragma - n. phrenicus (mature synapses) and m. extensor digitorum longus (m. EDL) - n. peroneus (mature and newly-formed synapses on day 11 after the nerve crush) of adult BALB/c mice (30-35 g body weight, male and female). A standard microelectrode technique was used for intracellular recording of miniature endplate potentials (MEPPs) and multiquantal evoked endplate potentials (EPPs). The significance of differences between the samples was evaluated using Student's t-test and two-way analysis of variance. The level of significance of differences between the two samples was 0.05. Thrombin (1 nM) in mature synapses of m. diaphragma uniformly increased the amplitude of each EPP in a short train by 25–30% ( $p < 0.05$ ). This was accompanied by an increase in the amplitude of MEPPs. The calculation of quantal content showed that the increase

in the amplitude of EPPs in short train was not due to increase in their quantal content ( $p > 0.05$ ). The effect of thrombin on the amplitude of postsynaptic potentials persisted after 1 hour of washout. Registration of only spontaneous activity from untreated neuromuscular preparations of the diaphragm revealed an increase in the average amplitude of MEPPs by 30% in presence of thrombin without any significant changes in their time course or frequency. Analysis of the cumulative probability curves of MEPPs amplitude distribution revealed their shift to the right, towards higher values, under action of thrombin, and this shift was maintained during washout. The increase in the amplitudes of MEPPs was eliminated by preincubation with vesamicol (1  $\mu\text{M}$ ), an inhibitor of ACh vesicular transporter. The data obtained suggest that the increase in the amplitude of postsynaptic potentials caused by thrombin is associated with an increase of ACh quantal size at presynaptic level due to enhanced loading of ACh into vesicles. Next, the effect of 1 nM thrombin on spontaneous activity in functionally mature and newly-formed synapses of m. EDL was studied. In mature synapses of m. EDL thrombin had an effect similar to its effect on spontaneous activity of mature synapses of mouse diaphragm: in presence of thrombin, MEPPs amplitude increased by 28% compared to control ( $p < 0.05$ ). In newly-formed synapses, the effect of thrombin was even more pronounced - the amplitude of MEPPs steadily increased by 41% ( $p < 0.05$ ). Thus, both in mature and functionally immature newly-formed synapses, thrombin has similar effects on parameters of spontaneous secretion, causing persistent potentiation of MEPPs amplitude. Considering the previously obtained data [5], this suggests the existence of the same signaling mechanism triggered by the activation of thrombin receptors in both mature and newly-formed synapses, despite their different functional status.

#### References

1. Ben Shimon M. et al. // Front. Cell. Neurosci. 2015. 9:151.
2. Lanuza M.A. et al. // J. Neurosci. Res. 2007. № 85. P. 748-756.
3. Lanuza M.A. et al. // J. Neurosci Res. 2003 № 73. P. 10-21.
4. Chowdhury M.H. et al. // Acta Neurol. Scand. 2008 № 118 P. 106-114.
5. Gaydukov A.E. et al. // Biochem. Moscow Suppl. Ser. A. 2018 № 12 P. 33-42.

### ВЛИЯНИЕ АЭРОБНОЙ ТРЕНИРОВКИ НА РЕГУЛЯЦИЮ ЭКСПРЕССИИ МИТОХОНДРИАЛЬНЫХ БЕЛКОВ В СКЕЛЕТНОЙ МЫШЦЕ ЧЕЛОВЕКА

Р.О. Боков<sup>1</sup>, Е.И. Шагимарданова<sup>4</sup>, Г.Р. Газизова<sup>4</sup>, В.Г. Згода<sup>3</sup>,  
П.А. Махновский<sup>1</sup>, Е.А. Лысенко<sup>1,2</sup>, О.А. Гусев<sup>4</sup>, Д.В. Попов<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>ГНЦ РФ-ИМБП РАН, Москва, Хорошевское шоссе, 76А, Россия

<sup>2</sup>МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, Ленинские горы, 1, Россия

<sup>3</sup>ИБМХ РАН, Москва, Погодинская улица, 10, ст. 8, Россия

<sup>4</sup>КФУ, Казань, Кремлевская улица, 18, Россия

Известно, что регулярные аэробные тренировки приводят к увеличению содержания митохондриальных белков в тренируемых скелетных мышцах. Цель работы – изучить на уровне транскрипции механизмы, регу-

лирующие увеличение содержания митохондриальных белков в скелетной мышце человека.

Семь молодых нетренированных мужчин в течение 8 нед (5 раз/нед, 1 ч/день) выполняли аэробную тренировку на велоэргометре. Биопсические образцы из *m. vastus lateralis* брали в покое до и после периода тренировки. Для оценки изменений в содержании митохондриальных белков после тренировочного периода применяли метод панорамной протеомики с использованием изобарической метки. Для оценки изменений в экспрессии генов был использован метод высокопроизводительного РНК-секвенирования.

Нами было обнаружено около 200 митохондриальных белков. Восьминедельная тренировка привела к значимому увеличению (на 20–50%,  $p < 0,05$ ) содержания 120 белков. При этом ни для одного митохондриального белка не было обнаружено значимого уменьшения содержания. Помимо этого, не было обнаружено значимых изменений базальной экспрессии генов, кодирующих обнаруженные нами митохондриальные белки. Можно предположить, что отсутствие увеличения экспрессии этих генов связано с увеличенной скоростью деградации их мРНК. Однако анализ доступных баз данных [Schwanhäusser et al., 2011] показал, что период полураспада обнаруженных в нашем исследовании мРНК, кодирующих митохондриальные белки, значимо выше, чем средний период полураспада всех мРНК. По-видимому, увеличение содержания митохондриальных белков, происходящее без увеличения содержания их мРНК, связано с повышенной скоростью синтеза и/или пониженной скоростью деградации этих белков. Последнее косвенно подтверждается тем, что, согласно доступным базам данным [Schwanhäusser et al., 2011], митохондриальные белки имеют значимо больший период полураспада (т.е. значительно стабильнее), чем все остальные белки.

Таким образом, вызванное 8-недельной тренировкой увеличение содержания митохондриальных белков в скелетной мышце человека может быть связано с увеличением скорости их синтеза и/или со снижением скорости их деградации в покое.

Исследование финансировалось за счет гранта РФФИ №17-00-00308К (17-00-00242).

### Литература

1. Schwanhäusser B. et al. Global quantification of mammalian gene expression control // Nature, 2011. – Vol. 473. – P. 337-342.

### EFFECT OF AEROBIC TRAINING ON THE REGULATION OF THE EXPRESSION OF MITOCHONDRIAL PROTEINS IN HUMAN SKELETAL MUSCLE

R.O. Bokov<sup>1</sup>, E.I. Shagimardanova<sup>4</sup>, G.R. Gazizova<sup>4</sup>, V.G. Zgoda<sup>3</sup>, P.A. Makhnovsky<sup>1</sup>, E.A. Lysenko<sup>1,2</sup>, O.A. Gusev<sup>4</sup>, D.V. Popov<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>IBMP RAS, Moscow, Khoroshevskoe shosse, 76A, Russia

<sup>2</sup>Lomonosov Moscow State University, Moscow, Leninskiye gory, 1, Russia

<sup>3</sup>IBMC RAS, Moscow, Pogodinskaya ulitsa, 10, st. 8, Russia

<sup>4</sup>KFU, Kazan, Kremlovskaya ulitsa, 18, Russia

Regular aerobic training increases the content of mitochondrial proteins in the trained skeletal muscles. We aimed to study the mechanism regulating the increase of mitochondrial proteins content at the transcription level in human skeletal muscle.

Seven young untrained males performed aerobic training on a cycling ergometer for 8 wks (5/wk, 1 h/day). Biopsies from *m. vastus lateralis* were taken before and after the training period at baseline. The changes in the content of mitochondrial proteins after 8-wk training were evaluated by the panoramic proteomics with isobaric labeling. To evaluate the changes in gene expression after training the high-throughput RNA sequencing was used.

We identified about 200 mitochondrial proteins. The content of 120 proteins significantly increased (by 20-50%,  $p < 0.05$ ) after 8-wk training. No decrease in the content of any mitochondrial protein was found. In addition, there were no changes in the baseline expression of genes encoding mitochondrial proteins. It can be assumed, that the absence of increased expression of these genes is associated with high mRNA degradation rate. However, an analysis of the available databases [Schwanhäusser et al., 2011] showed that the half-life of the mitochondrial proteins mRNA is higher than the average half-life of all mRNA. Apparently, an increase in the mitochondrial proteins content, which occurs without an increase in their mRNA content, is associated with the increase in protein synthesis rate and/or with the decrease in protein degradation rate. The latter is indirectly confirmed by the fact, that the mitochondrial proteins half-life is greater than that for all other proteins [Schwanhäusser et al., 2011].

In conclusion, the 8-wk training-induced increase in the content of mitochondrial proteins in human skeletal muscle may be associated with the increase in protein synthesis and/or with the decrease in protein degradation rate.

This work was supported by the Russian Foundation for Basic Research №17-00-00308K (17-00-00242).

### References

1. Schwanhäusser B. et al. Global quantification of mammalian gene expression control // Nature, 2011. – Vol. 473. – P. 337-342.

### ПОДВИЖНОСТЬ ERES В ЦИТОПЛАЗМЕ УВЕЛИЧИВАЕТСЯ ПРИ ОТХОДЕ ОТ НИХ ТРАНСПОРТНЫХ ВЕЗИКУЛ

И.Б. Бродский<sup>1</sup>, О. Шомрон<sup>2</sup>, К. Гиршберг<sup>2</sup>, Е.С. Надеждина<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, Ленинские Горы, 1-40, Россия

<sup>2</sup>Department of Pathology, Sackler Faculty of Medicine, Tel Aviv University

<sup>3</sup>Институт белка РАН, Пущино, ул. Институтская, 4, Россия

В эукариотических клетках секреторный путь транспорта белков начинается в специальных доменах эндоплазматического ретикулума (ЭР) – в сайтах экспорта (ERES endoplasmic reticulum exit sites). На ERES происходит образование транспортных контейнеров с помощью белков COPII

окаймления при участии малой ГТФазы Sar1a, которая в ГТФ форме привлекает белки внутреннего слоя окаймления: Sec23 и Sec24, с которыми связываются белки внешнего слоя: Sec13 и Sec31. Отпочковавшиеся транспортные контейнеры по микротрубочкам направляются в аппарат Гольджи для дальнейшего процессинга секреторных белков. Молекулярный механизм направленного перемещения транспортных контейнеров остается малоизученным. Известно, что минус концевой моторный белок динеин необходим для достижения транспортными везикулами центральной области клетки, где расположен аппарат Гольджи.

Сами ERES являются малоподвижными структурами в клетке и в основном претерпевают флуктуирующие перемещения вокруг исходной точки. Однако при прижизненных наблюдениях примерно в 1 % случаев можно наблюдать перемещения равные или более наблюдаемого диаметра ERES (>0,6 мкм). При этом данные перемещения исчезают при деполимеризации микротрубочек или ингибировании динеинового мотора. В нашей работе мы использовали модельный секреторный белок VSVG, который при активируемой секреции начинает накапливаться в секреторных везикулах. При одновременных прижизненных наблюдениях за перемещениями VSVG и ERES нами было зафиксировано, что часто значительные перемещения ERES сопровождаются расхождением с VSVG контейнером.

В другой экспериментальной системе при использовании конститутивно- активной формы ГТФазы – Sar1a[H79G] при стабилизации COPII окаймления происходит агрегация ERES в центральной области клетки, данная агрегация зависит от наличия микротрубочкового цитоскелета и является обратимой при восстановлении микротрубочек. Действительно известно взаимодействие одного из белков COPII окаймления с С- концевым участком белка динен-динактинового комплекса p150Glued. Однако сверх-продукция С концевого фрагмента p150Glued не влияет на агрегацию ERES в условиях Sar1a[H79G].

Также данный фрагмент не ингибирует взаимодействие самих ERES с микротрубочками, что может свидетельствовать о участии других белков в активации перемещения транспортных контейнеров в клетке. Однако наблюдаемая сходная направленность перемещения ERES и транспортного контейнера может свидетельствовать об активации динеинового мотора еще до момента полного отпочковывания его от ERES.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ 18-04-00742.

## **CARGO LOADING INCREASES ERES MOTILITY IN CYTOPLASM**

**I.B. Brodsky<sup>1</sup>, O. Shomron<sup>2</sup>, K. Hirschberg<sup>2</sup>, E.S. Nadezhdina<sup>1,3</sup>**

<sup>1</sup>*A.N. Belozersky Institute for Physico-Chemical Biology of M.V.Lomonosov Moscow State University, Leninskie Gory 1-40, Moscow, Russian Federation*

<sup>2</sup>*Department of Pathology, Sackler Faculty of Medicine, Tel Aviv University*

<sup>3</sup>*Institute of Protein Research of Russian Academy of Science, Pushchino, Institutskaya 4, Russian Federation*

In eukaryotic cells secretory proteins exit endoplasmic reticulum (ER) in special sites called ERES (ER exit sites). ERESes are covered with COPII coat consisting of inner layer formed by Sec23-Sec24 heterodimer and outer layer by Sec13-Sec31 proteins. Post-ER transport containers represent either vesicles or membrane tubes and they move to Golgi area. The mechanism of their movement remains rather illusive. It is assumed that ERES-derived containers are driven by dynein to the Golgi. ERES itself also moves chaotically and sporadically, and such a movement was confirmed in our experiments with live cell imaging.

We have found that ERESes undergo chaotic low-amplitude movements in cells. They are located along the microtubules, and the destruction of microtubules or the inhibition of dynein leads to a further decrease in their mobility. Using VSVG release assay we have shown that ERES long range movements are frequently compelled with transport container formation and departure.

Sar1a[H79G] GTPase expression induced COPII coat stabilization, and ERESes formed a cluster. Formation of the cluster depends on microtubules and on dynein activity. After microtubule disruption or dynein inhibition cluster dispersed and spread in cytoplasm. Restoration of microtubules lead to discontinuous movement of vesicles to central part of the cell and cluster rebuilding. What is the basis for such discontinuity of motion? Indeed, Sec23 is known to bind transitory to p150Glued dynactin protein. Inhibition of p150-Sec23 interaction with C-terminal fragment of p150Glued didn't influence ERES clustering in Sar1a[H79G] expression. C-terminal fragment of p150Glued also didn't inhibit ERES MT interaction suggesting another protein should be responsible for ERES MT binding,

Increase of ERES motility in the same direction of cargo carrier displacement can be caused by the fact that dynein may start pushing transport carrier prior to its full detachment from ERES. It seems that in this situation dynein is activated also by other than dynactin cofactor.

This work is supported by RFBR grant 18-04-00742.

## **ВЛИЯНИЕ МЕХАНИЧЕСКИХ УСЛОВИЙ ДЕФОРМАЦИИ НА СОКРАТИТЕЛЬНЫЙ ОТВЕТ МИОКАРДА**

**К.А. Бутова<sup>1,2</sup>, О.Н. Лукин<sup>1,2</sup>**

*<sup>1</sup>Уральский федеральный университет имени первого Президента России  
Б.Н. Ельцина, г. Екатеринбург, Россия*

*<sup>2</sup>Институт иммунологии и физиологии УрО РАН, г. Екатеринбург, Россия*

Характер механической деформации сердечной мышцы в ходе текущего цикла сокращения оказывают существенное влияние на процесс силогенерации как в первом сокращении сразу после прекращения деформации (мгновенный эффект), так и в последующих циклах сокращения (отсроченный эффект). Эти изменения на молекулярном уровне обусловлены кооперативным взаимодействием миофиламентов и кальциевой регуляцией этого взаимодействия. Многофакторный феномен влияния динамической

деформации на сократимость миокарда нуждается в разработке комплексного метода для адекватной количественной оценки изменений сократимости с учетом различных параметров деформации.

В рамках поставленной цели нами были разработаны специальные биомеханические тесты, в которых мышце навязывалась серия полусинусоидных профилей укорочения-удлинения, причем в ходе одного сокращения мышцы применялся одиночный профиль для имитации аутокотонического режима сокращения. В серии задавали различное число последовательно идущих циклов укорочения-удлинения. Между двумя сериями динамических деформаций мышце позволяли сокращаться в изометрическом режиме до наступления стационарного состояния. Мгновенное и отсроченное влияния различных параметров динамического воздействия (амплитуды и длительности воздействия, а также числа циклов в серии динамической деформации) оценивалось по изменению характеристики изометрических сокращений непосредственно после воздействия и в ходе переходного процесса по отношению к величине конкретной характеристики в стационарных сокращениях до воздействия. В качестве характеристик сократительного ответа были выбраны величина развиваемой активной силы, время достижения пика силы и время расслабления до определенного уровня силы. Апробация биомеханических тестов осуществлялась при температуре 25оС и 30оС и при различных частотах электрической стимуляции (1, 2 и 3.5 Гц).

Нами получены новые данные, касающиеся степени влияния различных факторов механической деформации на проявление феномена длинозависимой (ин)активации сократительного ответа сердечной мышцы. Механическое воздействие на активно сокращающуюся сердечную мышцу в значительной степени модулирует ее сократительный ответ после прекращения воздействия, причем не только в первом после воздействия сокращении, но и в последующих циклах сокращения. Эта модуляция в зависимости от условия воздействия и условий эксперимента может проявляться в уменьшении силы сокращения (инактивации) или приросте силы сокращения (активации). Как правило, за начальной инактивацией в первом изометрическом сокращении после воздействия следует существенно более значимая активация сокращения в ходе переходного процесса после прекращения воздействия.

Установлено, что число циклов воздействия и, в меньшей степени, амплитуда воздействия являются самыми эффективными параметрами, способными существенно активировать сократительный ответ миокарда, т.е. обеспечить дополнительный прирост силы на десятки % от начального уровня. Длительность воздействия при условии ее физиологически релевантных значений оказывает минимальное влияние на феномен (ин)активации изометрического сокращения сердечной мышцы после серии деформаций.

Влияние параметров механического воздействия на сократимость в здоровом миокарде крысы проявляется только в условиях квазифизиологи-



ческих частот сокращения сердечной мышцы, что означает чрезвычайно важную роль исходного состояния (внутри)клеточного кальциевого гомеостаза и диастолического интервала в восстановлении баланса сократительного и регуляторного аппарата сердечных клеток, нарушенного при циклической динамической деформации.

Результаты наших исследований показывают, что динамическая деформация сердечной мышцы хоть и приводит к последующей инактивации ее сократительного ответа, но эта инактивация кратковременная (как правило, наиболее выражена в первом сокращении после воздействия) и по выраженности значительно уступает последующей активации сокращения. В дальнейшем существенно больший интерес представляет изучение возможностей дополнительной активации сократимости миокарда (в особенности, патологически измененного) путем обеспечения адекватных механических воздействий, нежели чем изучение феномена инактивации.

Работа выполнена в рамках госзадания ИИФ УрО РАН (регистрационный номер НИОКТР №АААА-А18-118020590031-8) и поддержана Российским Фондом Фундаментальных Исследований (грант №18-04-00572-а).

## **THE EFFECTS OF MECHANICAL CONDITIONS OF DEFORMATION ON MYOCARDIAL CONTRACTILE RESPONSE**

**K.A. Butova<sup>1,2</sup>, O.N. Lookin<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup>*Ural Federal University, Yekaterinburg, Russia*

<sup>2</sup>*Institute of Immunology and Physiology UB RAS, Yekaterinburg, Russia*

The shape of mechanical deformation of cardiac muscle during a contractile cycle significantly affects the process of force development, both in the first cycle immediately after the end of deformation (instant effect) and in subsequent cycles of contraction (delayed effect). At the molecular level these changes are due to the cooperative interaction of myofilaments and calcium regulation of this cooperativity. The multifactor phenomenon of the effect of deformation on myocardial contractility raises the need to develop the comprehensive method for adequate quantitative assessment of contractile variability taking into account various parameters of deformation.

To achieve this aim we have designed special biomechanical tests. In each test a series of half-sinus shortening-relengthening profiles was applied to muscle, and, during one contraction cycle, a single profile was used to imitate auxotonic contraction. In the given series, a number of consecutive shortening-relengthening cycles can be varied. Two series of dynamical deformation were separated by isometric contractions of the muscle until its force reached steady-state. The instant and delayed effects of various parameters of dynamic deformation (the amplitude and duration of deformation cycle as well as the number of cycles in a series) were estimated by the changes in characteristics of isometric contraction immediately after deformation and during the transient process relatively to the value in steady-state contraction before deformation. The magni-

tude of active force, time-to-peak and time-to-relaxation were chosen as characteristics of the cardiac muscle contractile response. Biomechanical tests were run at sub- and quasi-physiological temperatures (25° C and 30° C) at different pacing rate (1, 2 and 3.5 Hz).

We obtained new data about the influence of certain parameters of mechanical deformation on the extent of length-dependent (in)activation of cardiac muscle contraction. The deformation applied to actively contracting muscle modulates in a great extent its contractile response not only in the first isometric twitch after the deformation but also during transiently developed changes in contractility. This modulation depends on the deformation parameters as well as on experimental conditions and can be either inactivation (a decrease in contractility) or activation (an increase in contractility). We found that the initial activation in the first isometric twitch after the end of deformation is followed by more pronounced activation during transient changes occurred after the end of deformation.

It was revealed that the number of repetitive deformation cycles and, in a lesser extent, the amplitude of deformation are the most effective parameters in terms of activation of myocardial contractility after the end of deformation, providing extra force up to several tens of % relatively to the initial pre-deformation isometric level. The duration of deformation assuming its physiological relevant values plays minimal role in the extent of deformation effects on further post-deformation contractility.

The influence of the parameters of mechanical deformation on contractility of healthy rat myocardium is pronounced only under quasi-physiological pacing rates. This indicates an ultimate significance of the initial state of (intra)cellular calcium homeostasis and diastolic interval in regards to how the balance of contractile and regulatory proteins of cardiac cells is reestablished after cyclic dynamical deformation.

The results show that the dynamic deformation of cardiac muscle leads to a subsequent inactivation of its contractile response, but it is short-term (generally, most pronounced in the first contraction after a series of deformation) and significantly smaller than the subsequent activation of the contraction. We conclude that the additional extra activation of myocardial contractility (especially, under pathological conditions) by providing adequate mechanical deformations is of greater interest for further studies compared to the phenomenon of shortening-induced inactivation.

The study was carried out within the framework of the IIF UrB RAS theme No AAAA-A18-118020590031-8 and supported by Russian Foundation for Basic Research (#18-04-00572-a).

**ВЛИЯНИЕ СООТНОШЕНИЯ АТФ/АМФ  
НА ЭКСПРЕССИЮ МЕДЛЕННОГО МИОЗИНА  
ВО ВРЕМЯ ГРАВИТАЦИОННОЙ РАЗГРУЗКИ**

**Н.А. Вильчинская., И.И. Парамонова, Б.С. Шенкман**

*ГНЦ РФ – Институт медико-биологических проблем РАН, Москва*

В условиях гравитационной разгрузки вместе с атрофией скелетных мышц наблюдается сдвиг миозинового фенотипа мышц в быструю сторону. Причиной таких изменений является снижение экспрессии гена, кодирующего ТЦМ медленного типа, и увеличение экспрессии генов, кодирующих ТЦМ быстрого типа. Известно, что такие сигнальные каскады как кальцинейрин/NFAT и АМФ-зависимая протеинкиназа способны регулировать экспрессию генов, кодирующих медленные изоформы тяжелых цепей миозина. Ранее нами было показано значительное снижение фосфорилирования АМФ-зависимой протеинкиназы (АМПК) в *m. soleus* на ранних этапах гравитационной разгрузки (Vilchinskaya et al., 2017). Было обнаружено, что при стимуляции активности АМПК на ранней стадии гравитационной разгрузки не наблюдается снижения экспрессии медленной изоформы ТЦМ. Мы предположили, что снижение активности АМПК в камбаловидной мышце крыс на ранней стадии гравитационной разгрузки связано с изменениями соотношения макроэргических фосфатов (АТФ / АДФ). Цель нашей работы состояла в исследовании влияния изменений соотношения макроэргических фосфатов (АТФ / АДФ) на активность АМПК и экспрессию медленной изоформы ТЦМ в камбаловидной мышце крыс на ранних этапах гравитационной разгрузки.

Для проверки этой гипотезы проводилось 24-ч. антиортостатическое вывешивание (HS) задних конечностей крыс по методике Ильина-Новикова в модификации Морей-Холтон на фоне введения  $\beta$ -гуанидинпропионовой кислоты ( $\beta$ GPA).  $\beta$ -гуанидинпропионовая кислота, являясь конкурентным ингибитором мышечной креатинфосфокиназы сдвигает соотношение АТФ/АДФ/АМФ сторону более интенсивного распада АТФ (Mahanna et al., 1980). Содержание фосфо-АМПК, фосфо-АСС, фосфо-PKD, HDAC4 / 5 в *m. soleus* крыс определяли методом Вестерн-блоттинга. Количество пре-мРНК *MyHC1* ( $\beta$ ) и мРНК оценивали с помощью ОТ-ПЦР.

После 24-ч. HS наблюдалось снижение ( $p < 0,05$ ) содержания фосфо-АМПК по сравнению с контрольной группой, а в группе HS +  $\beta$ GPA достоверных отличий от группы контроля не обнаружено. После 24-ч гравитационной разгрузки обнаружено значительное увеличение содержания HDAC4 в ядерной фракции белков, а в группе HS +  $\beta$ GPA содержание HDAC4 в ядерной фракции белков не отличалось от контрольной группы. 24-ч. HS приводило к уменьшению экспрессии мРНК *MyHC1* ( $\beta$ ) и мРНК по сравнению с контрольной группой. Уровень экспрессии пре-мРНК *MyHC1* ( $\beta$ ) и мРНК в группе HS +  $\beta$ GPA не отличался от контроля.

Таким образом, введение  $\beta$ GPA на раннем этапе гравитационной разгрузки предотвращает снижение фосфорилирования АМПК, ядерный импорт HDAC4 и редукцию экспрессии медленного миозина. Эти данные подтверждают наше предположение о том, что накопление высокоэнергетических фосфатов (АТФ, АДФ) на ранних этапах гравитационной разгрузки приводит к снижению активности АМПК и сдвигу миозинового феноти-

па мышц в более быструю сторону. Исследование было поддержано грантом РФФ №18-15-00107.

## **THE INFLUENCE OF THE ATP/AMP RATIO ON THE EXPRESSION OF SLOW MYOSIN DURING GRAVITATIONAL UNLOADING**

**N.A. Vilchinskaya, I.I. Paramonova, B.S. Shenkman**

*SSC RF-Institute of Biomedical Problems, RAS, Khorochevskoe Shosse 76 a,  
Moscow, 123007, Russia*

Gravitational unloading leads to postural muscles atrophy and a slow to fast fibre type transition. The reason of such changes is a decrease in slow-type MyHC isoform expression and an increase in fast-type MyHC isoform expression. It is known that calcineurin/NFAT and AMP-activated protein kinase (AMPK) can regulate the expression of genes encoding slow isoform of MyHCI( $\beta$ ). Previously we showed that AMPK phosphorylation is significantly decreased in rat soleus after 24 h of hindlimb suspension (HS) (Vilchinskaya et al., 2017). We hypothesized that a decrease in AMPK phosphorylation at the early stage of gravitational unloading could be associated with changes in the ratio of intracellular high-energy phosphates (ATP/ADP). The goal of the study was to estimate the impact of high-energy phosphates ratio changes on AMPK activity and slow-type MyHC isoform expression in rat soleus muscle at the early stages of gravitational unloading.

Wistar rats were treated with  $\beta$ -guanidinopropionic acid ( $\beta$ GPA) for 6 d before HS as well as during 24-h HS. The content of phospho-AMPK, phospho-ACC, phospho-PKD, HDAC4/5 in rat soleus was determined by Western-blotting. The amount of MyHCI( $\beta$ ) pre-mRNA and mRNA was evaluated by RT-PCR.

After 24-h HS we observed a decrease ( $p < 0.05$ ) in phospho-AMPK content vs. control group, but in HS+  $\beta$ GPA group didn't differ from the control. After 24-h unloading we found a significant increase in the content of nuclear HDAC4 in the HS group, but in the HS+  $\beta$ GPA group the content of nuclear HDAC4 didn't differ from the control group. 24-h unloading resulted in a decrease in MyHCI( $\beta$ ) pre-mRNA and mRNA expression vs. the control group. The expression level of MyHCI( $\beta$ ) pre-mRNA and mRNA in HS+  $\beta$ GPA group didn't differ from the control.

Thus  $\beta$ GPA administration prevents a decline in AMPK phosphorylation. Therefore, we can conclude that at the early stage of gravitational unloading an accumulation of high-energy phosphates (ATP, ADP and creatine phosphate) takes place and leads to reduced AMPK activity and a slow to fast myosin fibre type transition. The study was supported by RSF grant # 18-15-00107.

**ПРЕОБЛАДАЮЩИЙ СИНТЕЗ ГИГАНТСКИХ БЕЛКОВ  
САРКОМЕРНОГО ЦИТОСКЕЛЕТА В ПОПЕРЕЧНО-ПОЛОСАТЫХ  
МЫШЦАХ ДЛИННОХВОСТОГО СУСЛИКА (*Spermophilus undulatus*)  
В ПЕРИОДЫ ЗИМНЕЙ АКТИВНОСТИ**

**И.М. Вихлянцев<sup>1,4</sup>, С.С. Попова<sup>1</sup>, А.Д. Уланова<sup>1</sup>, Ю.В. Грицына<sup>1</sup>,  
Н.Н. Салмов<sup>1</sup>, В.В. Рогачевский<sup>2</sup>, Г.З. Михайлова<sup>1</sup>, А.Г. Бобылёв<sup>1</sup>,  
Я.А. Юцкевич<sup>3</sup>, О.С. Моренков<sup>2</sup>, Н.М. Захарова<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>*Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН*

<sup>2</sup>*Институт биофизики клетки Российской академии наук –  
обособленное подразделение ФИЦ «Пуцинский научный центр  
биологических исследований РАН»*

<sup>3</sup>*Кубанский государственный университет*

<sup>4</sup>*Пуцинский государственный естественно-научный институт*

Молекулярные механизмы, лежащие в основе предотвращения мышечной атрофии или уменьшения степени ее развития у гибернирующих животных, широко обсуждаются в последние годы [Chang et al., *Comp Biochem Physiol Part D Genomics Proteomics*, 2018]. В частности, обсуждается роль  $Ca^{2+}$ -кальцинейрин-NFAT сигнального пути в развитии гипертрофии миокарда и в снижении развития атрофии скелетных мышц у тринадцатиполосного суслика (*Ictidomys tridecemlineatus*) в период гибернации [Zhang, Storey, *Mol Cell Biochem.*, 2016; Zhang, Storey, *Cell Stress Chaperones*, 2016]. Важную роль в активации этого сигнального каскада играет кальпаин-опосредованная активация кальцинейрина [Wu et al., *J Biol Chem.*, 2004]. Известны данные о гиперактивации белкового синтеза [Zhegunov et al., *Cryo-Letters*, 1988] и активации mTOR-сигнального пути синтеза белка [Wu, Storey, *J Exp Biol.*, 2012] в мышцах зимнеящих в периоды выхода из состояния гипотермии и кратковременной «зимней» активности (нормотермии). Нельзя исключить, что важную роль при этом играют кальпаиновые протеазы, которые протеолизуют белки саркомерного цитоскелета и, тем самым, запускают белковый обмен в саркомерах.

Кальпаины – цитозольные кальций-активируемые цистеиновые протеазы [Goll, et al., *Physiol. Rev.*, 2003]. Показано, что ряд саркомерных белков, в том числе, гигантские белки саркомерного цитоскелета титин и небулин, подвергаются протеолизу кальпаинами, в частности, кальпаином-1 [Mohrhauser, Underwood, Weaver, *J. Anim. Sci.*, 2011]. Высказано предположение, что белковый обмен в мышечных клетках инициируется кальпаин-зависимым протеолизом титина, небулина и других саркомерных белков с последующей деградацией их фрагментов до аминокислотных остатков по убиквитин-протеасомному пути [Goll et al., *J. Anim. Sci.*, 2008].

Цель нашего исследования заключалась в проверке предположения, что гиперактивация белкового синтеза в периоды «зимней» активно-

сти должна сопровождаться увеличением активности кальпаина-1 в поперечнополосатых мышцах длиннохвостого суслика (*Spermophilus undulatus*).

Эксперименты проводились на животных следующих экспериментальных групп: «Летняя активность» (нормотермия, 38°C, май–июль); «Гипотермия» (глубокое оцепенение, декабрь–март, температура сердечной мышцы 1.5-2.0°C, продолжительность периода гипотермии 4-11 суток); «Зимняя активность» (нормотермия, 36°C-37°C, периодически повторяющиеся временные промежутки (не более суток) между периодами гипотермии, взятие материала проводилось через 10-14 ч. эутермного состояния после пробуждения).

Методом Вестерн-блоттинга обнаружено повышенное (в 1.5-1.6 раза,  $n=7$ ) содержание аутолитических фрагментов кальпаина-1 в миокарде левого желудочка сердца, *m. longissimus dorsi* и *m. soleus* активных «зимних» сусликов. Результаты свидетельствуют об увеличении активности кальпаина-1 в поперечно-полосатых мышцах сусликов в период «зимней» активности. Значительных сезонных различий в содержании кальпаина-3/p94, кальпастина (ингибитора кальпаинов), Hsp 70 и Hsp 90 в исследованных мышцах не выявлено. С помощью нерадиоактивного метода определения скорости синтеза белка (SUnSET) обнаружено уменьшение (в 2-3 раза,  $n=3$ ) скорости синтеза общего белка (в диапазоне м.м. 15-180 кДа) в исследованных поперечно-полосатых мышцах активных «зимних» сусликов. Скорость синтеза тяжелых цепей миозина (м.м. 205 кДа), небулина (м.м. 700 кДа) и титина (м.м. 3000–3700 кДа) в мышцах активных «зимних» сусликов не отличалась от таковой в мышцах активных «летних» животных. Обнаружено восстановление массы *m. soleus* и объема мышечных волокон *m. longissimus dorsi*, атрофированных в период спячки, а также выявлен тренд к увеличению массы сердечной мышцы у активных «зимних» животных. При этом наблюдалось восстановление нормального содержания титина, сниженного в исследуемых поперечнополосатых мышцах в период гипотермии. Вывод: гиперактивация кальпаина-1 в поперечнополосатых мышцах длиннохвостого суслика (*Spermophilus undulatus*) в период «зимней» активности сопровождается преобладающим синтезом гигантских белков саркомерного цитоскелета, что вносит вклад в предотвращение мышечной атрофии или уменьшение степени ее развития.

Работа выполнена в рамках Государственного задания Института теоретической и экспериментальной биофизики (ИТЭБ) РАН при финансовой поддержке гранта РФФИ (№17-04-00326) с использованием оборудования коллективного пользования ИТЭБ РАН и ИБК РАН.

**THE PREDOMINANT SYNTHESIS OF GIANT MYOFIBRILLAR PROTEINS IN STRIATED MUSCLES OF LONG-TAILED GROUND SQUIRREL (*Spermophilus undulatus*) DURING INTERBOUT AROUSAL**

**I.M. Vikhlyantsev<sup>1,4</sup>, S.S. Popova<sup>1</sup>, A.D. Ulanova<sup>1</sup>, Yu.V. Gritsyna<sup>1</sup>, N.N. Salmov<sup>1</sup>, V.V. Rogachevsky<sup>2</sup>, G.Z. Mikhailova<sup>1</sup>, A.G. Bobylev<sup>1</sup>, Y.A. Yutskevich<sup>3</sup>, O.S. Morenkov<sup>2</sup>, N.M. Zakyarova<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>*Institute of Theoretical and Experimental Biophysics RAS, Pushchino, Moscow Region, Russia*

<sup>2</sup>*Federal Research Center “Pushchino Scientific Center for Biological Research of the Russian Academy of Sciences”; Institute of Cell Biophysics RAS; Pushchino, Moscow Region, Russia*

<sup>3</sup>*Kuban State University, Krasnodar, Krasnodar Krai, Russia*

<sup>4</sup>*Pushchino State Institute of Natural Sciences, Pushchino, Moscow Region, Russia*

The molecular mechanisms underlying muscle mass retention during hibernation are extensively discussed in recent years [Chang et al., *Comp Biochem Physiol Part D Genomics Proteomics*, 2018]. In particular, the role of Ca<sup>2+</sup>-calcineurin-NFAT signaling pathway in the development of myocardial hypertrophy and in reducing the development of skeletal muscle atrophy in thirteen-lined ground squirrels (*Ictidomys tridecemlineatus*) during hibernation is discussed [Zhang, Storey, *Mol Cell Biochem.*, 2016; Zhang, Storey, *Cell Stress Chaperones*, 2016]. Calpain-mediated activation of calcineurin plays an essential role in activation of this signaling cascade [Wu et al., *J Biol Chem.*, 2004]. There are data on the hyperactivation of protein synthesis [Zhegunov et al., *Cryo-Letters*, 1988] and activation of the mTOR signaling pathway of protein synthesis [Wu, Storey, *J Exp Biol.*, 2012] in muscles of hibernating animals during arousal from torpor and interbout arousal. It is possible that calpain proteases play an important role in this.

Calpains are cytosolic calcium-activated cysteine proteases [Goll et al., *Physiol. Rev.*, 2003]. It has been shown that a set of sarcomeric proteins including giant proteins of the sarcomeric cytoskeleton, titin and nebulin, can be cleaved by calpains, in particular, by calpain-1 [Mohrhauser, Underwood, Weaver, *J. Anim. Sci.*, 2011]. It has been suggested that muscle protein turnover is initiated by calpain-mediated proteolysis of titin, nebulin and other sarcomeric proteins with subsequent degradation of their fragments to amino acid residues by the ubiquitin-proteasome pathway [Goll et al., *J. Anim. Sci.*, 2008]. The aim of our study was to test the assumption that hyperactivation of protein synthesis during interbout arousal should be accompanied by an increase in the activity of calpain-1 in the striated muscles of the long-tailed ground squirrel (*Spermophilus undulatus*).

The experiments were carried out on animals of the following experimental groups: “Summer Activity” (normothermia, 38°C, May-July), “Hypothermia (deep torpor, December-March, temperature of cardiac muscle, 1.5-2.0°C; duration of hypothermia, 4-11 days), “Winter Euthermia (normothermia, 36-37°C, the periodic interbout arousal (no longer than a day) between bouts of

torpor (hypothermia), samples were taken 10-14 hours of interbout euthermic state after arousal).

Western blot analysis detected the increased (by 1.5-1.6 times, n=7) content of the autolytic fragments of calpain-1 in the left ventricular myocardium, m. longissimus dorsi and m. soleus of ground squirrels during interbout arousal. The results indicate that activity of calpain-1 in the striated muscles of ground squirrels increases during winter euthermia. No significant seasonal changes in the content of calpain 3/p94, calpastatin (an inhibitor of calpains), Hsp 70 and Hsp 90 were found in the muscles. SUnSET, a non-radioactive method for measuring rates of protein synthesis, was applied and it was determined that in the striated muscles of ground squirrels during winter euthermia the rate of total protein synthesis declined by 2-3 times (n=3, molecular weight range 15 to 180 kDa). The synthesis rates of heavy chains of myosin (molecular weight 205 kDa), nebulin (molecular weight 700 kDa) and titin (molecular weight 3000-3700 kDa) in the muscles during interbout arousal were not different from those in muscles of active ground squirrels in summer. Recovery of soleus mass and recovery of volume of muscle fiber of m. longissimus dorsi were found, as well as a trend towards an increase in the mass of the heart muscle during interbout arousal was revealed. At the same time, there was observed a restoration of the normal titin content, reduced in the muscles during hibernation. Conclusion: hyperactivation of calpain 1 in striated muscles of long-tailed ground squirrels (*Spermophilus undulatus*) during interbout arousal is accompanied by the predominant synthesis of giant sarcomeric cytoskeleton proteins, which contributes to the muscle mass retention during hibernation. This work was supported by the Russian Foundation for Basic Research (grant No. 17-04-00326) using the equipment of the Centre for Collective Employment of ITEB RAS and IBC RAS.

**ОСОБЕННОСТИ ГОМЕОСТАЗА ИОНОВ ХЛОРА  
В РАННЕМ ПОСТНАТАЛЬНОМ ОНТОГЕНЕЗЕ:  
СХОДСТВО КЛЕТОК СОСУДИСТОЙ СИСТЕМЫ И ЦНС**

**Д.К. Гайнуллина<sup>1</sup>, Д.С. Костюнина<sup>1</sup>, А.А. Швецова<sup>1</sup>,  
В. Мачков<sup>2</sup>, О.С. Тарасова<sup>1,3</sup>**

<sup>1</sup>Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,  
Москва, Россия.

<sup>2</sup>Department of Biomedicine, Aarhus University, Aarhus, Denmark.

<sup>3</sup>ГНЦ РФ – Институт медико-биологических проблем РАН, Москва, Россия

Cl<sup>-</sup>, который является самым распространенным неорганическим анионом в организме человека и животных, участвует в регуляции множества функций различных органов и систем, включая сердечно-сосудистую систему. Хорошо известно, что ион-транспортные функции клеток организма могут претерпевать значительные изменения в ходе раннего постнатального онтогенеза. В частности, в нейронах ЦНС в процессе созревания



организма происходит изменение влияния хлорного тока при активации ГАМК<sub>A</sub> рецепторов с деполяризующего на гиперполяризующее, что отражает изменения в уровне экспрессии мембранных переносчиков Cl<sup>-</sup> (Ben-Ari *et al.*, 2007). В гладкомышечных клетках сосудов взрослого организма Cl<sup>-</sup> играет просократительную роль: открытие хлорных каналов вызывает выход Cl<sup>-</sup> из клеток, деполяризацию и сокращение (Voedtkjer *et al.*, 2016). Данная работа была направлена на проверку гипотезы, что созревание сосудистого русла в ходе раннего постнатального онтогенеза связано с изменением роли Cl<sup>-</sup> в регуляции мембранного потенциала и сократительных характеристик гладкомышечных клеток.

Для исследования этого вопроса мы изучали сократительные ответы подкожной артерии (a. saphena) с удаленным эндотелием на агонист α<sub>1</sub>-адренорецепторов метоксамин в изометрическом режиме у двух групп крыс: в возрасте 1-2 недели и 2-3 месяца (взрослые). Удаление Cl<sup>-</sup> из раствора (путем эквимольной замены NaCl и KCl на соответствующие соли аспартата; CaCl<sub>2</sub> на CaSO<sub>4</sub>) приводило к уменьшению сократительных ответов артерий обеих групп животных, однако это уменьшение было намного сильнее у 1-2-недельных крыс (на 66 ± 2%) по сравнению со взрослыми (на 31 ± 4%). Вклад Cl<sup>-</sup> токов в формирование мембранного потенциала гладкой мышцы артерий исследовали с помощью микроэлектродной техники. Уменьшение сократительных ответов на метоксамин в бесхлорном растворе было связано с более выраженным снижением вызываемой метоксамином деполяризации гладкой мышцы у 1-2-недельных животных по сравнению со взрослыми. Блокада Ca<sup>2+</sup>-зависимых хлорных каналов с помощью MONNA в концентрации 3 мкМ также в большей степени подавляла сократительные ответы у 1-2-недельных крыс (на 39 ± 5%) по сравнению со взрослыми (на 22 ± 3%).

Важно, что большой вклад Cl<sup>-</sup> в регуляцию сократительных ответов артерий 1-2-недельных крыс сопровождался повышением экспрессии генов, кодирующих белки Ca<sup>2+</sup>-зависимых Cl<sup>-</sup> каналов (бестрофин 3 и TMEM16A). Согласно данным ПЦР в реальном времени уровень экспрессии мРНК бестрофина 3 был в 16 раз выше, а TMEM16A - в 1.6 раза выше в артериях 1-2-недельных крыс по сравнению со взрослыми.

Совокупность полученных данных убедительно свидетельствует о том, что Cl<sup>-</sup> более важен для регуляции тонуса артериальных сосудов в раннем постнатальном периоде. Таким образом, как в ЦНС, так и в сосудистой системе в процессе созревания организма происходит уменьшение деполяризующего влияния Cl<sup>-</sup>, что может обеспечивать оптимальное функционирование этих систем на каждом из этапов постнатального онтогенеза и должно учитываться при фармакологической коррекции нарушений клеточных функций.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (грант № 18-015-00216-а).

#### Литература

Ben-Ari Y, Gaiarsa J-L, Tyzio R & Khazipov R (2007). GABA: a pioneer transmitter

that excites immature neurons and generates primitive oscillations. *Physiol Rev* **87**, 1215–1284.  
Boedtkjer E, Matchkov V V, Boedtkjer DMB & Aalkjaer C (2016). Negative news: Cl<sup>-</sup> and HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> in the vascular wall. *Physiology (Bethesda)* **31**, 370–383.

**HOMEOSTASIS OF CHLORIDE IONS  
IN EARLY POSTNATAL ONTOGENESIS:  
THE SIMILARITY OF VASCULAR SYSTEM AND CNS  
D.K. Gaynullina<sup>1</sup>, D.S. Kostyunina<sup>1</sup>, A.A. Shvetsova<sup>1</sup>,  
V. Matchkov<sup>2</sup>, O.S. Tarasova<sup>1,3</sup>**

<sup>1</sup>*Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia.*

<sup>2</sup>*Department of Biomedicine, Aarhus University, Aarhus, Denmark.*

<sup>3</sup>*Institute for Biomedical Problems RAS, Moscow, Russia*

Cl<sup>-</sup>, which is the most common inorganic anion in humans and animals, is involved in the regulation of the many functions of various organs and systems, including the cardiovascular system. It is well known that the ion-transport functions of the cells of the organism can undergo significant changes during early postnatal ontogenesis. In particular, in the neurons of CNS during maturation of the organism, the effect of the chloride current induced by GABA<sub>A</sub> receptor activation changes from depolarizing to hyperpolarizing, which reflects alterations in the expression level of membrane Cl<sup>-</sup> transporters (Ben-Ari et al., 2007). In vascular smooth muscle cells of an adult organism, Cl<sup>-</sup> plays a procontractile role: the opening of chloride channels causes the efflux of Cl<sup>-</sup> from cells, depolarization and contraction (Boedtkjer et al., 2016). This work tested the hypothesis that maturation of the vascular bed during early postnatal ontogenesis is associated with a change in the role of Cl<sup>-</sup> in the regulation of membrane potential and contractile characteristics of smooth muscle cells.

We studied the isometric contractile responses of the endothelium-denuded saphenous artery to the  $\alpha_1$ -adrenoreceptor agonist methoxamine in two groups of rats: 1-2 weeks old and 2-3 months old (adults). Removing of Cl<sup>-</sup> from the solution (by equimolarly replacing NaCl and KCl with the corresponding aspartate salts; CaCl<sub>2</sub> with CaSO<sub>4</sub>) resulted in a decrease in the contractile responses of the arteries of both groups of animals, but this decrease was much stronger in 1-2 week old rats (by  $66 \pm 2\%$ ) compared with adults (by  $31 \pm 4\%$ ). The contribution of Cl<sup>-</sup> currents to the smooth muscle membrane potential was investigated using microelectrode technique. A decrease in the contractile responses to methoxamine in a Cl<sup>-</sup>-free solution was associated with a more pronounced decrease in smooth muscle depolarization caused by methoxamine in 1–2-week-old animals compared with adults. The blockade of Ca<sup>2+</sup>-dependent chloride channels using MONNA (3  $\mu$ M) also more strongly suppressed contractile responses in 1-2 week-old rats (by  $39 \pm 5\%$ ) compared with adults (by  $22 \pm 3\%$ ).

Importantly, the greater contribution of Cl<sup>-</sup> to the regulation of the arterial contractile responses of 1-2 week old rats was accompanied by an increase in

the expression of genes encoding the proteins of  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent  $\text{Cl}^-$  channels (bestrophin 3 and TMEM16A). According to real-time PCR data, the expression level of bestrophin 3 was 16 times higher, and TMEM16A was 1.6 times higher in the arteries of 1–2 week old rats compared to adults.

These data suggest that  $\text{Cl}^-$  is more important for the regulation of arterial tone in the early postnatal period. Thus, during maturation of the organism both in the CNS and in the vascular system the depolarizing effect of  $\text{Cl}^-$  decreases, which can ensure optimal functioning of these systems at each stage of postnatal ontogenesis and should be taken into account when pharmacologically correcting cellular dysfunctions.

This work was supported by the Russian Foundation for Basic Research (Grant No. 18-015-00216-a).

### References

- Ben-Ari Y, Gaiarsa J-L, Tyzio R & Khazipov R (2007). GABA: a pioneer transmitter that excites immature neurons and generates primitive oscillations. *Physiol Rev* **87**, 1215–1284.
- Boedtker E, Matchkov V V, Boedtker DMB & Aalkjaer C (2016). Negative news:  $\text{Cl}^-$  and  $\text{HCO}_3^-$  in the vascular wall. *Physiology (Bethesda)* **31**, 370–383.

## **ВЫРАБОТКА УСЛОВНОГО ОБОРОНИТЕЛЬНОГО РЕФЛЕКСА НА ОБСТАНОВКУ У ВИНОГРАДНОЙ УЛИТКИ ВЫЗЫВАЕТ УВЕЛИЧЕНИЕ ВОЗБУДИМОСТИ КАК КОМАНДНЫХ НЕЙРОНОВ, ТАК И СЕРОТОНИНСОДЕРЖАЩИХ НЕЙРОНОВ ПЕДАЛЬНОГО ГАНГЛИЯ**

**Х.Л. Гайнутдинов<sup>1</sup>, В.В. Андрианов<sup>1</sup>, Т.Х. Богодвид<sup>1,2</sup>,  
И.Б. Дерябина<sup>1</sup>, Л.Н. Муранова<sup>1</sup>, Д.И. Силантьева<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>*Институт фундаментальной медицины и биологии Казанского  
федерального университета, Казань, ул. Кремлевская, 18,*

<sup>2</sup>*Академия физической культуры, спорта и туризма,  
Казань, деревня Универсиады, 35, Россия*

Изучение роли мембранных характеристик нейронов и параметров синаптической передачи в механизмах обучения, представляет большой интерес [1]. Речь идет о мембранных системах клетки, что определяется, во-первых, ключевой ролью нейрона в интегративной деятельности мозга, а во-вторых, тем, что в основе клеточных механизмов обучения и памяти лежат биофизические и биохимические характеристики нервных клеток. Эти характеристики дают важное звено для перехода кратковременных пластических изменений в долговременные. В целом, выделяют две основные стратегии исследований клеточных механизмов: 1) проведение обучения и затем анализ на клеточном уровне, 2) использование клеточных аналогов обучения, когда эксперименты проводятся на изолированном или полуинтактном препарате, а также в диссоциированной клеточной культуре. Данные литературы показывают, что важную роль в механизмах ассоциативного обучения, вы-

полненного как на препаратах обученных животных, так и в клеточных аналогах обучения играют мембранные процессы [1, 2]. Интересной моделью является условный оборонительный рефлекс на обстановку у виноградной улитки [3, 4]. С одной стороны, этот условный рефлекс является оборонительным, т.е. в нем задействованы системы оборонительного поведения [4, 5]. С другой стороны, в этот рефлекс включена модуляция серотонином, который выделяется из серотонин-содержащих нейронов педального ганглия [3]. Поэтому в данной работе мы провели сравнительное исследование изменений электрических характеристик командных нейронов LPa3 и RPa3 виноградной улитки, а также серотонинсодержащих нейронов педального ганглия Pd4 и Pd2, которые задействованы в модуляторном выбросе серотонина при формировании данного рефлекса [3].

У животных вырабатывали условный обстановочный рефлекс по контекстуальной парадигме «на шаре» в ситуации, когда животные были жестко закреплены за раковину. Обучение заключалось в предъявлении безусловного стимула (электрическое раздражение) при нахождении улитки в определенном контексте - на шаре. Животных каждый день на протяжении 5 дней помещали в экспериментальную обстановку (на шар) и предъявляли по 5 электрических раздражений в день (1-2 мА, 1 с, 50 Гц) прикосновением двух макроэлектродов – к дорзальной передней части ноги и к хвосту [5]. До начала выработки условного рефлекса и после процедуры обучения проводили тестирование уровня оборонительной реакции как показателя сформированной долговременной памяти. Для этого измеряли амплитуду втягивания омматофоров в ответ на тактильную стимуляцию передней части ноги в процентах. При этом максимальное втягивание омматофоров принимали за 100% и записывали, как сильно улитка отдергивала омматофоры (на 0%, 10%, 25%, 50%, 75%, 90% или 100%). Тестирование проводили в двух обстановках – при свободном ползании животных на плоской поверхности (стеклянная крышка аквариума), а также в ситуации обстановки обучения (на шаре). В препаратах обученных улиток измерили электрические характеристики командных нейронов оборонительного поведения LPa3 и RPa3, а также серотонинсодержащих нейронов педального ганглия Pd4 и Pd2. Было найдено, что после обучения мембранный потенциал снижается, а пороговый потенциал, наоборот, увеличивается и, в итоге, происходит достоверное снижение критического уровня деполяризации нейронов Pd4 и Pd2. В командных нейронах LPa3 и RPa3 продемонстрировано достоверное снижение мембранного и порогового потенциалов. Таким образом, показано, что после выработке условного обстановочного рефлекса происходит повышение возбудимости исследованных нейронов.

Работа поддержана РФФИ (грант № 18-015-00274).

#### **Литература**

1. Gainutdinov Kh.L. et al. Uspekhi Physiologicheskikh Nauk (Russian). 2011. V. 42. P. 33-52.
2. Gainutdinov Kh.L. et al. Zhurnal vysshei nervnoi deiatelnosti imeni I. P. Pavlova (Russian). 1996. V. 46. P. 614-616.

3. Balaban P.M. et al. *Neurobiol. Learn. Mem.* 2001. V. 75. P. 30–50.
4. Deryabina I.B. et al. *Front. Pharmacol.* 2018. V. 9. Article 607.
5. Gainutdinova T.H. et al. *Zhurnal vysshei nervnoi deiatelnosti imeni I P Pavlova* (Russian). 2004. V. 54. No 6. P. 795-800.

**ELABORATION OF CONDITIONED DEFENSIVE REFLEX  
TO THE ENVIRONMENT IN THE TERRESTRIAL SNAIL CAUSES  
AN INCREASE IN EXCITABILITY AS OF COMMAND NEURONS  
AND SEROTONINERGIC NEURONS OF THE PEDAL GANGLION**

**Kh.L. Gainutdinov<sup>1</sup>, V.V. Andrianov<sup>1</sup>, T.Kh. Bogodvid<sup>1,2</sup>,  
I.B. Deryabina<sup>1</sup>, L.N. Muranova<sup>1</sup>, D.I. Silantyeva<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>*Institute of fundamental medicine and biology, Kazan Federal University,  
Kazan, Kremlevskaya str., 18,*

<sup>2</sup>*Academy of physical culture, sports and tourism,  
Kazan, Universiade village, 35, Russia*

The study of the role of membrane characteristics of neurons and parameters of synaptic transmission in learning mechanisms causes the great interest [1]. We are talking about the membrane systems of the cell, which is determined, firstly, by the key role of the neuron in the integrative activity of the brain, and secondly, by the fact that the biophysical and biochemical characteristics of nerve cells lie in the bases of cellular mechanisms of learning and memory. These characteristics provide an important link for the transition of short-term plastic changes in the long-term. In general, there are two main strategies for the study of cellular mechanisms: 1) training and then analysis at the cellular level, 2) the use of cellular analogues of learning, when experiments are conducted on an isolated or semi-intact drug, as well as in dissociated cell culture. The literature data show that membrane processes play an important role in the mechanisms of associative learning performed both on the preparations of trained animals and of cellular analogues of learning [1, 2]. An interesting model is a conditioned defensive reflex on the environment in the terrestrial snail [3, 4]. On the one hand, this conditioned reflex is defensive, i.e. it involves systems of defensive behavior [4, 5]. On the other hand, this reflex includes modulation by serotonin, which is released from serotonin-containing neurons of the pedal ganglia [3]. Therefore, in this paper we conducted a comparative study of changes in the electrical characteristics of the command neurons LPa3 and RPa3 of terrestrial snails, as well as serotonin-containing neurons of the pedal ganglion Pd4 and Pd2, which are involved in the modulatory release of serotonin during formation of this reflex [3].

The conditioned situation reflex in contextual paradigm "on the ball" was developed in a situation when the animals were rigidly fixed through their shells. In so doing it was preserved the freedom of movement of snails over the surface of a ball floating in the water and the snails was completely elongated out of the shell. The training consisted in the presentation of the unconditioned stimulus (electrical stimulation) when the snails were placed in a different context, such as on the ball. The 5 electrical stimulations per day (1-2 mA, 1 s, 50 Hz) were presented to snails

within 5 days at their location on a ball for contextual learning by touching of two macroelectrodes: dorsally to the front of the foot and to the tail [5]. Before the start of elaboration of the conditioned situation reflex and after learning the testing of the level of defensive reaction as an indicator of formed long-term memory was performed. To do this, the amplitude of retraction of ommatophores in response to tactile stimulation of the anterior part of foot in percentage was measured. The maximum retraction of ommatophores was taken as 100% and it was recorded how much the snail withdraw ommatophore (0%, 10%, 25%, 50%, 75%, 90% or 100%). Testing was carried out in two contexts: during the free crawling of animals on a flat surface (glass cover of the aquarium) and in the situation of learning context (on the ball). In preparations of learned animals it were measured the electrical characteristics of command neurons of defensive behavior LPa3 and RPa3, as well as the serotonin-containing neurons of the pedal ganglion Pd4 and Pd2. It was shown that after this training the membrane potential decreases, and the threshold potential, on the contrary, increases and, as a result, there is a significant decrease in the critical level of depolarization of neurons Pd4 и Pd2. It was also found that the command neurons LPa3 and RPa3 significantly reduced membrane and threshold potentials. It is concluded that after the development of a conditioned reflex on the situation there is an increase in the excitability of the studied neurons. Thus, it is shown that after the elaboration of a conditioned environmental reflex, the excitability of the studied neurons increases.

Supported by RFBR (Grant No. 18-015-00274).

#### References

1. Gainutdinov Kh.L. et al. Uspekhi Physiologicheskikh Nauk (Russian). 2011. V. 42. P. 33-52.
2. Gainutdinov Kh.L. et al. Zhurnal vysshei nervnoi deiatelnosti imeni I. P. Pavlova (Russian). 1996. V. 46. P. 614-616.
3. Balaban P.M. et al. Neurobiol. Learn. Mem. 2001. V. 75. P. 30–50.
4. Deryabina I.B. et al. Front. Pharmacol. 2018. V. 9. Article 607.
5. Gainutdinov T.H. et al. Zhurnal vysshei nervnoi deiatelnosti imeni I P Pavlova (Russian). 2004. V. 54. No 6. P. 795-800.

### **СУЩЕСТВУЕТ ЛИ ДВОЙНАЯ СПИРАЛЬ АКТИНА? НОВАЯ МОДЕЛЬ УКЛАДКИ МОНОМЕРОВ АКТИНА В ФИБРИЛЛЕ** **О.В. Галзитская<sup>1</sup>, А.В. Глякина<sup>1,2</sup>, А.К. Сури<sup>1</sup>, О.М. Селиванова<sup>1</sup>, Л.Г. Бобылёва<sup>3</sup>, М.Ю. Суворина<sup>1</sup>, И.М. Вихлянец<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>Институт белка РАН, Пуцино, ул. Институтская, 4, Россия

<sup>2</sup>Институт математических проблем биологии РАН,

ИПМ им. М.В. Келдыша РАН, Пуцино, ул. проф. Виткевича, 1, Россия

<sup>3</sup>Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН,

Пуцино, ул. Институтская, 3, Россия

Актин является самым распространенным белком в организме эукариот. В клетке актин может существовать в двух формах: глобулярной (G-

актин) и фибриллярной (F-актин). Длина глобулярного актина составляет 375 аминокислотных остатков, а молекулярная масса 42 кДа. Переход актина между глобулярной и фибриллярной формами осуществляется под влиянием различных факторов (ионов, актин-связывающих белков и т.д.) [1]. Актин участвует во множестве белок-белковых взаимодействий [2], что позволяет ему играть важную роль в подвижности клеток и поддержании ими своей формы. Взаимодействие фибриллярного актина с миозином является основой в сокращении мышц. С 1950-тых годов ведутся интенсивные исследования структуры мономерного и фибриллярного актина. На основании данных рентгеноструктурного анализа полимерного актина делается предположение, что актиновые фибриллы могут быть спиральными [3], а согласно данным ЭМ анализа и данным [3] впервые утверждается, что фибриллы актина представляют собой двойную спираль [4]. С этих пор данное представление о двуспиральной организации фибриллярного актина является общепризнанным.

Перед нами стояла задача проанализировать разницу между фибриллогенезом нормального и патологических форм актина, для чего были применены теоретические и экспериментальные подходы, а также анализ существующих данных.

Мономерный актин, выделенный из скелетных мышц кролика, был переведен в фибриллярное состояние путем добавления KCl. Методом ограниченного протеолиза и масс-спектрометрического анализа были определены защищенные от воздействия протеазы участки в структуре фибриллярного актина [5]. Экспериментальные данные по обработке F-актина смесью протеаз (трипсин, химотрипсин и протеиназа К) позволили определить аминокислотные остатки, составляющие остов актиновой фибриллы (нумерация приведена по последовательности): 97-107, 130-155, 164-171, 307-312, 331-339 и 343-348. Следует отметить, что участки 130-149 и 164-195 являются амилоидогенными по предсказаниям программы FoldAmyloid (<http://bioinfo.protres.ru/fold-amyloid/>).

Логично предположить, что площадь поверхности доступной растворителю (ASA) для этих участков в фибрилле, должна быть меньше, чем в одиночной молекуле актина. Этот параметр был рассчитан для мономерной (2zwh) и фибриллярных (2w49, 1m8q, 3g37, 3j8k, 6bnp) структур актина, состоящих из 16, 14, 12, 10 и 8 мономеров, соответственно. Было определено, что для всех участков кроме одного (164-171) площадь поверхности доступной растворителю одинакова как для мономерного актина, так и для актина, входящего в структуру фибриллы. То есть, в данных структурах эти участки (97-107, 130-155, 307-312, 331-339 и 343-348) являются доступными для взаимодействия с протеазами. Следует отметить, что все рассмотренные выше структуры фибриллярного актина представляют собой двойную спираль. Методом электронной микроскопии были получены микрофотографии фибриллярного актина, из которых однако не следует, что актиновые фибриллы являются двойной спиралью. На ЭМ изображе-

ниях видно, что фибриллы актина неоднородны по диаметру и в широкой части имеют размер около 7-8 нм, в узкой – около 5-6 нм, что, с учетом разрешения ЭМ, приблизительно соответствует размеру актинового мономера. Полученные результаты не согласуются с общепринятым представлением о двуспиральной организации фибриллярного актина.

В настоящей работе предлагается новая модель укладки мономеров актина в фибрилле: мономеры актина взаимодействуют между собой таким образом, что перекрывают друг друга, образуя районы, недоступные для взаимодействия с протеазами. Данная модель не препятствует взаимодействию фибриллярного актина с его многочисленными партнерами. Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ.

### Литература

1. Oda T., Iwasa M., Aihara T., Maeda Y., Narita A. 2009. 457(7228):441–445.
2. Kovar DR., Harris E.S., Mahaffy R., Higgs H.N., Pollard T.D. Cell. 2006. 124(2):423–435.
3. Selby C.C., Bear R.S. 1956. J. Biophysic. and biochem. cytol., 2(1): 71–85.
4. Hanson J., Lowy J. J. Mol. Biol. 1963. 6:46–60.
5. Tikhomirova T.S., Ievlev R.S., Suvorina M.Y., Bobyleva L.G., Vikhlyantsev I.M., Surin A.K., Galzitskaya O.V. Mol Biol (Mosk). 2018. 52(1):136-151.

### IS THERE ACTIN DOUBLE HELIX? NEW MODEL OF STACKING ACTIN MONOMERS IN FIBRILS

**O.V. Galzitskaya<sup>1</sup>, A.V. Glyakina<sup>1,2</sup>, A.K. Surin<sup>1</sup>, O.M. Selivanova<sup>1</sup>, L.G. Bobyleva<sup>3</sup>, M.Yu. Suvorina<sup>1</sup>, I.M. Vikhlyantsev<sup>3</sup>**

<sup>1</sup> *Institute of Protein Research RAS, Pushchino, St. Institutskaya, 3, Russia*

<sup>2</sup> *Institute of Mathematical Problems of Biology RAS, Keldysh Institute of Applied Mathematics RAS, Pushchino, St. Professor Vitkevich, 1, Russia*

<sup>3</sup> *Institute of Theoretical and Experimental Biophysics of RAS, Pushchino, St. Institutskaya, 3, Russia*

Actin is the most abundant protein in eukaryotes. In a cell, actin can exist in two forms: globular (G-actin) and filamentous (F-actin). The length of the globular actin is 375 amino acid residues, and the molecular weight is 42 kDa. In vertebrates, depending on the isoelectric point, there are three actin isoforms:  $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\gamma$ .  $\alpha$ -actins are mostly located in muscle cells, while  $\beta$  and  $\gamma$ -actins – in non-muscle cells.  $\alpha$ -actins are divided into three types:  $\alpha$ -actin of the smooth muscles,  $\alpha$ -actin of the skeletal muscles, and  $\alpha$ -actin of the heart muscles. The transition of actin between its globular and filamentous forms is carried out under the influence of different factors (ions, actin-binding proteins, etc.) [1]. Actin is involved in a variety of protein-protein interactions [2], which allows it to play an important role in the mobility of cells and in the maintaining of their shape. The interaction of actin filaments with myosin is the basis for the muscle contraction. Since the 1950s, intensive studies of the structure of monomeric and filamentous actin have been conducted. According to the X-ray data analysis of polymeric actin, it was suggested that actin filaments can be helical [3]. Based on



the EM analysis and data from paper [3], for the first time was stated that actin filaments are a double helix [4]. Since then, the idea of the double helix organization of filamentous actin is generally accepted.

Our task was to analyze the difference between the fibril formation of normal and pathological forms of actin, for which theoretical and experimental approaches were used, as well as the analysis of existing data.

Monomeric actin isolated from rabbit skeletal muscles was transferred to the filamentous state by adding KCl. The regions protected from the action of proteases in the structure of F-actin were determined [5] using the limited proteolysis technique and mass spectrometry analysis. Thus, experimental data on the treatment of F-actin with a mixture of proteases (trypsin, chymotrypsin and proteinase K) allowed us to determine the amino acid residues that make up the core of actin filament (numbering is given by sequence): 97-107, 130-155, 164-171, 307-312, 331-339 and 343-348. It should be noted that regions 130-149 and 164-195 are amyloidogenic according to the predictions of the FoldAmyloid program (<http://bioinfo.protres.ru/fold-amyloid/>).

It is logical to assume that the accessible surface area (ASA) for these regions in the F-actin should be less than in a single actin molecule. This parameter was calculated for the monomeric (PDB file: 2zwh) and filamentous (2w49, 1m8q, 3g37, 3j8k, 6bnp) actin structures consisting of 16, 14, 12, 10, and 8 monomers, respectively. It was determined that for all regions except one (164-171) this parameter is the same for both G- and F-actin. Thus, in these filamentous structures, these regions are accessible for interaction with proteases. It should be noted that all the filamentous actin structures discussed above are organized in a double helix. The micrographs of actin filaments were obtained using the electron microscopy technique. However, from these micrographs, it does not follow that actin filaments are a double helix. From these EM images we can see that actin filaments are heterogeneous. In diameter and in a wide part they have a size of about 7-8 nm and in a narrow part about 5-6 nm. Taking into account the resolution of EM, these sizes approximately corresponds to the size of actin monomer. The obtained results do not agree with the generally accepted view that F-actin is in the form of a double helix.

In this paper, a new model for stacking actin monomers in filaments is proposed: actin monomers overlap in such a way to form regions that are inaccessible for interaction with proteases. This model does not contradict the interaction of F-actin with its numerous partners. The reported study was supported by the Russian Science Foundation.

## References

1. Oda T., Iwasa M., Aihara T., Maéda Y., Narita A. 2009. 457(7228):441–445.
2. Kovar DR., Harris E.S., Mahaffy R., Higgs H.N., Pollard T.D. Cell. 2006. 124(2):423–435.
3. Selby C.C., Bear R.S. 1956. J. Biophysic. and biochem. cytol., 2(1): 71–85.
4. Hanson J., Lowy J. J. Mol. Biol. 1963. 6:46–60.
5. Tikhomirova T.S., Ievlev R.S., Suvorina M.Y., Bobyleva L.G., Vikhlyantsev I.M., Surin A.K., Galzitskaya O.V. Mol Biol (Mosk). 2018. 52(1):136-151.

## БИОЛОГИЧЕСКАЯ ПОДВИЖНОСТЬ МОЧЕВОГО ПУЗЫРЯ КРЫС С ИНФРАЗЕВИКАЛЬНОЙ ОБСТРУКЦИЕЙ

В.Ю. Глоба, Г.А. Божок, Т.П. Бондаренко, Е.И. Легач

*Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины,  
г. Харьков, ул. Переяславская, 23, Украина*

Мочевой пузырь (МП) представляет собой многокомпонентную динамическую систему. Динамические связи между внутренними электрическими, химическими (нейрогормональными) и механическими процессами при накоплении и выведение мочи необходимы мочевому пузырю для того, чтобы орган функционировал как физиологический объект [1, с. 13]. Многочисленные патологические состояния, патогенетическим механизмом которых является инфразевикальная обструкция (ИВО), могут существенно нарушить работу мочевого пузыря. При этом изменяется сократительная способность гладких мышц, что влияет на важнейшие процессы сложного взаимодействия между структурными и анатомическими частями мочевыводящих путей и между нервными системами контроля [2, с.937]. В настоящее время, проблема исследования процессов, происходящих в мочевом пузыре, актуальна, особенно в моделях *in vitro*.

Целью представленной работы на начальном этапе являлось изучение особенностей сократительной активности детрузора (САД) крыс с ИВО.

Материалы и методы: ИВО моделировали на беспородных белых самках крыс 6 месячного возраста лигатурным методом [3, с. 415]. Вес животных колебался от 180 до 340 г. Животные были разделены на 3 группы: 1-я – 8 крыс с ИВО и снятием лигатуры после 6 недель обструкции, которые были выведены из эксперимента на 9-й неделе (n=8); 2-я – 3 крысы с ИВО без снятия лигатуры, аналогично 1-й группе выведены из эксперимента на 9-й неделе (n=3); 3-я – 11 крыс, интактный контроль, которых не подвергали какому-либо воздействию (n=11). САД исследовали на изолированных полосках МП по методу [4, с. 2, 3]. Исследовали спонтанную сократительную активность, а также ее изменение в ответ на воздействие КС1 в концентрации 80 mM и холиномиметика пилокарпина в дозе 0,03 мг/мл.

В 1-й и 2-й группах спонтанная САД незначительно увеличилась на 1,84 и 2,04%, соответственно, по сравнению с интактным контролем. Установлено, что в ответ на воздействие КС1 в концентрации 80 mM получено улучшение САД в 1-й группе на 43,86% и ее ухудшение во 2-й группе на 34,27% от контроля. Интересно, что при применении холиномиметика пилокарпина в 1-й и 2-й группах наблюдались аналогичные результаты: увеличение САД на 27,35% и снижение ее на 40,6% по сравнению с контролем, которое возможно объясняется появлением дополнительных механизмов, связанных с изменением структуры МП и его функциональной активности.

Результаты эксперимента свидетельствуют об изменении спонтанной сократительной активности при ИВО в сторону увеличения в зависи-

мости от сроков патологии, что характеризуется как нестабильность МП в ответ на обструкцию. Меняется также система регуляции активности МП. Так на начальном этапе ИВО отмечалось усиление САД в ответ на воздействие КС1 и пилокарпином, что объясняется появлением так называемой гиперактивности детрузора, и активацией холинэргического звена в инициации сократимости МП. В последующем при увеличении сроков ИВО и прогрессировании патологических изменений САД снижается на фоне уменьшения влияния холинэргического звена регуляции, что свидетельствует об активации других механизмов регуляции с целью поддержания функциональной полноценности МП. Полученные результаты подтверждают положение о наличии множественных биодинамических процессов в МП, механизмы которых нуждаются в дальнейшем изучении. Это позволит в дальнейшем применить на следующих этапах работы методы воздействия на функцию МП для полного ее восстановления при ИВО.

### **Литература**

1. Miftahof R.N. and Nam H.G. Biomechanics of the Human Urinary Bladder. DOI: 10.1007/978-3-642-36146-3\_10, Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2013.
2. Andersson, Karl-Erik, and Anders Arner. Urinary Bladder Contraction and Relaxation: Physiology and Pathophysiology. *Physiol Rev* 84: 935–986, 2004; 10.1152/physrev.00038.2003.
3. Nian-zhao Zhang, Lin Ma et al. Improved model for the establishment and evaluation of detrusor overactivity in female Wistar rats. *Int. Braz. J. Urol.* 2014. Vol. 40, № 3. P. 414-422.
4. Kullmann F.A., Daugherty S.L., de Groat W.C., Birder L.A. Bladder Smooth Muscle Strip Contractility as a Method to Evaluate Lower Urinary Tract Pharmacology. *J. Vis. Exp.* (90), e51807, doi:10.3791/51807 (2014).

## **BIOLOGICAL MOTILITY OF THE URINARY BLADDER OF RATS WITH BLADDER OUTLET OBSTRUCTION**

**V.Yu. Globa<sup>1</sup>, G.A. Bozhok<sup>1</sup>, T.P. Bondarenko, E.I. Lehach**

*Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv, St. Pereyaslavskaya, 23, Ukraine*

The urinary bladder (UB) is a multicomponent dynamic system. Dynamic connections between internal electrical, chemical (neurohumoral) and mechanical processes under accumulation and excretion of urine are necessary in order for the organ to function as a physiological object [1, p. 13]. Many pathological conditions that engage bladder outlet obstruction (BOO) can significantly disrupt the bladder. The contractile ability of smooth muscles change, which affects the most important processes of complex interaction between the structural and anatomical parts of the urinary tract and between the nervous control systems [2, p.937]. Currently, the problem of studying the processes occurring in the bladder is impotent, especially in vitro models.

The research aim was to investigate the contractile activity of detrusor in rats with BOO.

Materials and methods: BOO was simulated by the ligation in 6-month-old white breedless female rats [3, p. 415]. The weight of animals ranged from 180 to 340 g. Animals were divided into 3 groups. Group 1 (n = 8) with BOO. In group 1 the ligation was removed after 6 weeks. Group 2 (n = 3) with BOO, without removing the ligature. Group 3 (n = 11) was a control. All rats were sacrificed by week 9. The detrusor contractile activity (DCA) was studied in isolated UB-strips according to the method [4, p. 2, 3]. The spontaneous contractile activity was investigated under normal and pathological conditions. The change in spontaneous contractile activity in response to 80 mM KCl exposure and cholinomimetic pilocarpine at a dose of 0.03 mg / ml.

In groups 1 and 2, the spontaneous DCA increased by 1.84 and 2.04%, comparing with control. It was shown that using 80 mM KCl causes an increase in DCA in the group 1 by 43.86% and its decrease in the group 2 by 34.27% of the control. Interestingly, when cholinomimetic pilocarpine was used, similar results were observed. The DCA was increased by 27.35% in group 1 and was decreased by 40.6% in group 2 compared to the control. This may be explained by appearance of additional mechanisms of detrusor functional activity.

The results of experiment shown that spontaneous DCA increases with BOO. It depends on the duration of the pathological process and is characterized as instability of the UB in response to obstruction. The system of regulation of UB activity is also changing. There was an increase in the DCA in response to exposure of KCl and pilocarpine in initial stage of BOO. This is due to the appearance of the detrusor hyperactivity and activation of a cholinergic link in the initiation of UB contractility. DCA decreases with a weakening of the cholinergic regulation, with an increase in the duration of BOO and the progression of pathological changes. This indicates the activation of other regulatory mechanisms in order to maintain the functional usefulness of the UB. The results confirm multiple biodynamic processes in UB. The mechanisms of these processes need further study. This will allow in further studies to apply methods of influence on the function of MP with the aim of recovery.

### References

1. Miftahof R.N. and Nam H.G. Biomechanics of the Human Urinary Bladder. DOI: 10.1007/978-3-642-36146-3\_10, Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2013.
2. Andersson, Karl-Erik, and Anders Arner. Urinary Bladder Contraction and Relaxation: Physiology and Pathophysiology. *Physiol Rev* 84: 935–986, 2004; 10.1152/physrev.00038.2003.
3. Nian-zhao Zhang, Lin Ma et al. Improved model for the establishment and evaluation of detrusor overactivity in female Wistar rats. *Int. Braz. J. Urol.* 2014. Vol. 40, № 3. P. 414-422.
4. Kullmann F.A., Daugherty S.L., de Groat W.C., Birdier L.A. Bladder Smooth Muscle Strip Contractility as a Method to Evaluate Lower Urinary Tract Pharmacology. *J. Vis. Exp.* (90), e51807, doi:10.3791/51807 (2014).

## ОСОБЕННОСТИ ТРАНСПОРТА КАЛЬЦИЯ И ИНДУКЦИИ КАЛЬЦИЙ-ЗАВИСИМОЙ ПОРЫ В МИТОХОНДРИЯХ СКЕЛЕТНЫХ МЫШЦ ДИСТРОФИН-ДЕФИЦИТНЫХ МЫШЕЙ MDX

М.В. Дубинин<sup>1</sup>, К.С. Теньков<sup>1</sup>, В.С. Старинец<sup>1</sup>,  
Е.Ю. Таланов<sup>2</sup>, К.Н. Белослудцев<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Марийский государственный университет,  
Йошкар-Ола, пл. Ленина, 1, Россия

<sup>2</sup>Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН,  
Пуцзино, ул. Институтская, 3, Россия

Нервно-мышечные заболевания, в частности, обусловленные генетическими дефектами миопатии, являются наиболее частыми и нередко фатальными наследственными заболеваниями человека. Одной из таких патологий является прогрессирующая мышечная дистрофия Дюшенна. Причиной этого заболевания является мутация в гене дистрофина, расположенного на X-хромосоме. Ген дистрофина экспрессируется, в основном, в мышечных клетках, в кардиомиоцитах и в клетках Пуркинью в мозге (Muntoni and Ferlini, 2003). В результате мутаций нарушаются экспрессия, структура и функция белка дистрофина, который принимает участие в образовании сложной функциональной сети, необходимой для поддержания структуры мышечной клетки, — так называемого дистрофин-ассоциированного белкового комплекса. Это приводит к развитию симптомов, затрагивающих экспрессирующие данный белок ткани: прогрессирующей мышечной слабости, кардиомиопатии и умственной отсталости (Muntoni and Ferlini, 2003). Большой интерес в исследованиях патогенетических механизмов миопатий привлекают митохондрии (Vila et al., 2017; Kennedy et al., 2017). Известно, что при мышечной дистрофии Дюшенна эти внутриклеточные органеллы претерпевают значительные морфологические и функциональные изменения. Предполагается, что в основе этих изменений лежат, в том числе, нарушения в митохондриальных системах транспорта ионов  $Ca^{2+}$ . Установлено, что при дефиците дистрофина наблюдается изменение проницаемости клеточной мембраны, увеличивается концентрация  $Ca^{2+}$  в цитоплазме клетки, что, в свою очередь, приводит к активации кальпаина и деградации клеточных белков. Эти процессы ассоциированы с накоплением АФК в митохондриях, снижением активности окислительного фосфорилирования, перекисным окислением мембранных липидов, открытием МТР поры, что, в конечном счете, приводят к некрозу клетки (Vila et al., 2017). До сих пор не изученным остается вопрос, что лежит в основе изменений в функционировании митохондрий при развитии мышечной дистрофии Дюшенна – уровень субъединиц кальциевого унипортера и других кальций-транспортирующих белков, белков МРТ поры.

В настоящей работе нами проведено сравнительное исследование кинетических параметров транспорта  $Ca^{2+}$ , а также индукции  $Ca^{2+}$ -зависимой поры в митохондриях скелетных мышц дистрофин-дефицитных мышей ли-

нии C57BL/10ScSn-Dmdmdx (mdx мыши) и мышей C57BL/10 «дикого типа», использованных в качестве контрольных животных. В результате проведенной работы нами установлено, что для митохондрий mdx мышей, окисляющих глутамат и малат, характерно существенное (более чем в 2 раза) снижение скорости  $\text{Ca}^{2+}$  унипорта, а также резкое уменьшение кальциевой емкости (~3,5 раза) по сравнению с мышами «дикого типа». Схожие изменения обнаружены и в случае применения сукцината как субстрата окисления, в этом случае скорость  $\text{Ca}^{2+}$  унипорта в митохондриях mdx мышей снижалась в 3,8, а кальциевая емкость в 3 раза по сравнению с мышами «дикого типа». В то же время мы не обнаружили существенных различий в кинетике  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -антипорта, осуществляющего выход  $\text{Ca}^{2+}$  из матрикса митохондрий в обмен на  $\text{Na}^+$ . Кроме того, методом иммуноблоттинга нами оценена экспрессия субъединиц кальциевого унипортера (MCU, MCUb, MICU1, MICU2, EMRE) и  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -антипортера, белков МРТ поры (циклофилина Д и аденилаттранслокатора) в митохондриях скелетных мышц двух групп животных. Установлено, что в митохондриях mdx мышей наблюдается снижение экспрессии канальной субъединицы MCUb кальциевого унипортера, а также существенное снижение экспрессии регуляторной субъединицы MICU1 по сравнению с контрольными животными. Экспрессия других изучаемых белков не претерпела существенных изменений. Обсуждается, как наблюдаемые изменения могут влиять на функционирование митохондрий скелетной мускулатуры при развитии мышечной дистрофии Дюшенна.

Работа поддержана грантом Российского научного фонда (№ 18-75-00011).

### Литература

- Kennedy T.L., Moir L., Hemming S., Edwards B., Squire S., Davies K., Guiraud S. (2017) Utrophin influences mitochondrial pathology and oxidative stress in dystrophic muscle. *Skelet. Muscle*, 7(1), 22.
- Muntoni F.T., Ferlini A. (2003) Dystrophin and mutations: One gene, several proteins, multiple phenotypes. *Lancet Neurol.*, 2, 731-740.
- Vila M.C., Rayavarapu S., Hogarth M.W. et al. (2017) Mitochondria mediate cell membrane repair and contribute to Duchenne muscular dystrophy. *Cell Death and Differentiation*, 24, 330–342.

### FEATURES OF CALCIUM TRANSPORT AND INDUCTION OF CALCIUM-DEPENDENT PORE IN SKELETAL MUSCLE MITOCHONDRIA OF THE DYSTROPHIN-DEFICIENT MDX MOUSE

M.V. Dubinin<sup>1</sup>, K.S. Tenkov<sup>1</sup>, V.S. Starinets<sup>1</sup>,  
E.Yu. Talanov<sup>2</sup>, K.N. Belosludtsev<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Mari State University, Yoshkar-Ola, pl. Lenina, 1, Russia

<sup>2</sup>Institute of Theoretical and Experimental Biophysics RAS, Pushchino, St. Institutskaya, 3, Russia

Neuromuscular diseases, in particular, myopathies caused by genetic defects, are the most frequent and often fatal hereditary human diseases. One of

these pathologies is Duchenne progressive muscular dystrophy. The disease is caused by a mutation in the dystrophin gene located on the X chromosome. The dystrophin gene is expressed mainly in muscle cells, cardiomyocytes and Purkinje cells in the brain (Muntoni and Ferlini, 2003). As a result of mutations, the expression, structure and function of the dystrophin protein, which takes part in the formation of a complex functional network necessary to maintain the structure of the muscle cell, the so-called dystrophin-associated protein complex, are violated. This leads to the development of symptoms affecting the tissues expressing this protein: progressive muscle weakness, cardiomyopathy and mental retardation (Muntoni and Ferlini, 2003). Much of the interest in the studies of the pathogenetic mechanisms of myopathies involves mitochondria (Vila et al., 2017; Kennedy et al., 2017). It is known that in the case of DMD these intracellular organelles undergo significant morphological and functional changes. It is assumed that the basis of these changes are, in particular, violations in the mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  transport systems. It is known that in the case of a deficiency of dystrophin, a change in the permeability of the cell membrane is observed, the concentration of  $\text{Ca}^{2+}$  in the cytoplasm of the cell increases, which in turn leads to the activation of calpain and the degradation of cellular proteins. These processes are associated with the accumulation of ROS in the mitochondria, a decrease in the activity of oxidative phosphorylation, peroxide oxidation of membrane lipids, MTP pore opening, and they ultimately lead to cell necrosis (Vila et al., 2017). It is still not known what causes the change in the functioning of mitochondria during the development of Duchenne muscular dystrophy - the level of subunits of calcium uniporter, other calcium-transporting proteins and/or MPT pore proteins.

In this work, we carried out a comparative study of the kinetic parameters of  $\text{Ca}^{2+}$  transport, as well as the induction of MPT pore in skeletal muscle mitochondria of C57BL/10ScSn-Dmdmdx mice (mdx mice) and C57BL/10 wild-type mice used as control animals. We found that mitochondria of mdx mice, which oxidize glutamate and malate, are characterized by a significant (more than 2 times) decrease in the rate of  $\text{Ca}^{2+}$  uniport, as well as a sharp decrease in calcium capacity ( $\sim 3.5$  times) compared with wild type mice. Similar changes were found when succinate was used as an oxidation substrate; in this case, the rate of  $\text{Ca}^{2+}$  uniport in the mitochondria of mdx mice decreased by 3.8 and the calcium capacity by 3 times compared with wild-type mice. At the same time, we found no significant differences in the kinetics of the  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  antiport, which releases  $\text{Ca}^{2+}$  from the mitochondrial matrix in exchange for  $\text{Na}^+$ . In addition, we evaluated the expression of calcium uniporter subunits (MCU, MCUb, MICU1, MICU2, EMRE) and  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  antiporter, MPT pore proteins (cyclophilin D and adenylate translocator) in the skeletal muscle mitochondria of two groups of animals using the Western blot method. We found a decrease in the expression of the MCUb channel subunit of the calcium uniporter, as well as a significant decrease in the expression of the MICU1 regulatory subunit in mitochondria of mdx mice, compared with control animals. The expression of other studied proteins did not

undergo significant changes. It is discussed how the observed changes can affect the functioning of skeletal muscle mitochondria during the development of Duchenne muscular dystrophy.

The work was supported by grant from the Russian Science Foundation (№ 18-75-00011).

### References

- Kennedy T.L., Moir L., Hemming S., Edwards B., Squire S., Guiraud S. (2017) Utrophin influences mitochondrial pathology and oxidative stress in dystrophic muscle. *Skelet. Muscle*, 7(1), 22.
- Muntoni F.T., Ferlini A. (2003) Dystrophin and mutations: One gene, several proteins, multiple phenotypes. *Lancet Neurol.*, 2, 731-740.
- Vila M.C., Rayavarapu S., Hogarth M.W. et al. (2017) Mitochondria mediate cell membrane repair and contribute to Duchenne muscular dystrophy. *Cell Death and Differentiation*, 24, 330–342.

## ИССЛЕДОВАНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ДЕСМИНА С МИТОХОНДРИЯМИ *in vitro*

С. Духалин, Н. Медведева, Т. Некрасова, А. Даял, А. Минин  
*Институт белка РАН, Россия*

Митохондрии играют критическую роль в физиологии клеток. Они отвечают за многие процессы, такие как производство АТФ, регуляция концентрации кальция или инициация апоптоза, поэтому факторы, регулирующие их функции, важны для нормального функционирования тканей. Одним из таких факторов являются промежуточные филаменты (ПФ), один из трех компонентов цитоскелета в животных клетках. Ранее в нашей лаборатории было обнаружено, что виментиновые ПФ связывают митохондрии, и при этом снижается их внутриклеточная подвижность и увеличивается мембранный потенциал [1,2]. Десмин, белок ПФ в мышечных клетках является близким родственником виментина, и мутации в нем приводят к нарушению функций митохондрий, как в сердечной, так и в скелетных мышцах[3], являясь причинами некоторых наследственных болезней. Исходя из этих данных, мы предположили, что десминовые ПФ также могут связывать митохондрии. Для проверки этой гипотезы мы использовали со-осаждение рекомбинантного десмина с митохондриями из печени крысы через градиент плотности сахарозы. Оказалось, что десмин связывается с митохондриями и осаждается с ними через сахарозную «подушку». Однако, в процессе инкубации с митохондриями часть молекул десмина укорачивается в результате протеолиза и теряет способность связываться. Ингибиторный анализ показал, что за частичную деградацию десмина отвечает связанный с митохондриями атипичный кальпаин, цистеиновая протеаза, активируемая кальцием. Наши данные позволяют предположить, что взаимо-



действие десминовых ПФ с митохондриями регулируется кальций-зависимой протеазой кальпаином.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 17-04-01775.

### Литература

1. Nekrasova, O. E., et al. (2011). Vimentin Intermediate Filaments Modulate the Motility of Mitochondria . Mol Biol Cell 22(13): 2282-2289.
2. Chernoiivanenko I. S. , et al. (2015). Mitochondrial membrane potential is regulated by vimentin intermediate filaments. FASEB J 29(3):820-827.
3. Capetanaki, Y. (2002) Desmin cytoskeleton: a potential regulator of muscle mitochondrial behavior and function. Trends Cardiovasc. Med. 12, 339–348.

## ANALYSIS OF DESMIN INTERACTION WITH MITOCHONDRIA *in vitro*

**S. Dukhalin, N. Medvedeva, T. Nekrasova, A. Dayal, A. Minin**

*Institute of Protein Research, RAS, Russia*

Mitochondria play a critical role in a cell physiology. Since they are responsible for such processes as ATP synthesis,  $Ca^{2+}$  concentration, and apoptosis initiation, regulation of their functions is important for normal functions of tissues. One of regulatory factors are the intermediate filaments (IF), a cytoskeleton component in animal cells. We have previously demonstrated that vimentin IFs bind mitochondria resulting in a decrease of their motility and an increase of their membrane potential [1,2]. Desmin, an IF protein specific for muscle cells is closely related to vimentin, and its mutations result in the disturbance of mitochondria functions in skeletal muscles and a heart [3]. We supposed that like vimentin desmin might also interact with mitochondria. To test this we used sedimentation through a sucrose gradient. It turned out that desmin binds to mitochondria and co-sediments with them through the "cursion". However, an incubation with mitochondria leads to a partial degradation of desmin resulting in the loss of its binding ability. An inhibitory analysis showed that the enzyme responsible for this degradation is  $Ca^{2+}$ -dependent cystein protease which belongs to the atypical calpains. These data indicate that interaction of desmin IFs with mitochondria is regulated by calpain.

This work was supported by Russian Foundation for Basic Research (RFBR) grant #17-04-01775.

### References

1. Nekrasova, O. E., et al. (2011). Vimentin Intermediate Filaments Modulate the Motility of Mitochondria . Mol Biol Cell 22(13): 2282-2289.
2. Chernoiivanenko I. S. , et al. (2015). Mitochondrial membrane potential is regulated by vimentin intermediate filaments. FASEB J 29(3):820-827.
3. Capetanaki, Y. (2002) Desmin cytoskeleton: a potential regulator of muscle mitochondrial behavior and function. Trends Cardiovasc. Med. 12, 339–348.

# РЕЗИСТЕНТНОСТЬ КЛЕТОК ОСТРОГО МИЕЛОИДНОГО ЛЕЙКОЗА К TRAIL-ИНДУЦИРОВАННОМУ АПОПТОЗУ, ОПОСРЕДОВАННАЯ АДГЕЗИЕЙ К ВНЕКЛЕТОЧНОМУ МАТРИКСУ

Я.В. Евстратова<sup>1</sup>, М.И. Кобякова<sup>1</sup>, А.С. Сенотов<sup>1</sup>,  
А.И. Ломовский<sup>1</sup>, В.С. Акатов<sup>1,2</sup>, Р.С. Фадеев<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>*Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН,  
Пуцзино, Россия;*

<sup>2</sup>*Пуцинский Государственный естественно-научный институт,  
Пуцзино, Россия, e-mail: yannaevstratova@gmail.com*

Ранее нами было показано, что монобластные клетки острого миелоидного лейкоза (ОМЛ) могут приобретать фенотип более зрелых макрофагоподобных клеток на фоне сохранения пролиферативной активности и приобретения устойчивости к TRAIL-индуцированному апоптозу. Основная характеристика, отличающая такие макрофагоподобные клетки ОМЛ от монобластных клеток ОМЛ, является способность к адгезии к внеклеточному матриксу (ВКМ).

Известно, что адгезия к ВКМ опосредуется интегринами, а их лигирование активирует протеинкиназу фокальной адезии (ФАК) и Src-киназу, что повышает выживаемость опухолевых клеток путем инициации антиапоптотических сигнальных каскадов, связанных с активацией пути PI3K/AKT, увеличением активности транскрипционного фактора NF- $\kappa$ B, снижением активации p53 и повышенной экспрессии антиапоптотических белков BCL-2 и FLIP. Основными компонентами ВКМ, за счет которых осуществляется клеточная адгезия, являются пептиды с RGD-последовательностью, участок распознавания которой, присутствует на интегринах рецепторах с  $\alpha$ V субъединицей. Хорошо известно, что повышенная экспрессия интегринов  $\alpha$ V $\beta$ 3 и  $\alpha$ V $\beta$ 5 коррелирует со злокачественностью многих опухолевых заболеваний [1, 2] и опосредует выживаемость и устойчивость к индукции клеточной гибели многих опухолевых клеток, включая клетки гематологических злокачественных новообразований [3].

Таким образом, адгезия лейкозных клеток к ВКМ может опосредовать резистентность к TRAIL-индуцированному апоптозу, а, следовательно, требуется выяснить какие интегрины у макрофагоподобных лейкозных клеток участвуют в адгезии к ВКМ и их роль в формировании устойчивости к TRAIL-индуцированному апоптозу. Рассматривая способность макрофагоподобных клеток к адгезии к ВКМ как фактор, опосредующий лекарственную устойчивость, было сделано предположение о повышении чувствительности клеток к TRAIL-индуцированному апоптозу после ингибирования взаимодействия интегринов с их лигандами в ВКМ.

Мы провели оценку действия на адгезию лейкозных клеток агониста  $\alpha$ V интегринов – Cilengitide, который представляет собой RGD-пептид,

блокирующий связывание  $\alpha V$  – субъединицы интегринов клеточной мембраны с белками ВКМ [4].

Было выяснено, что применение Cilengitide полностью подавляет адгезию макрофагоподобных лейкозных клеток и способствует их откреплению от поверхности ВКМ в течение 24 часов после его добавления к клеткам. Таким образом, адгезия макрофагоподобных клеток ОМЛ к ВКМ основана на активации интегринов группы  $\alpha V$ . В то же время, при цитотоксическом анализе действия белка izTRAIL совместно с Cilengitide, было показано, что блокирование адгезии у макрофагоподобных клеток ОМЛ не повлияло на устойчивость к TRAIL-индуцированному апоптозу. Вероятно, данный эффект связан с тем, что устойчивость к TRAIL-индуцированному апоптозу у макрофагоподобных клеток ОМЛ основана на функционировании сигнальных путей, ассоциированных с рецепторами TRAIL, но не с адгезией к компонентам ВКМ.

### Литература

1. Reynolds, L. E., Wyder, L., Lively, J. C., Taverna, D., Robinson, S. D., Huang, X., Sheppard, D., Hynes, R. O. and Hodivala-Dilke, K. M. Enhanced pathological angiogenesis in mice lacking beta3 integrin or beta3 and beta5 integrins // *Nat. Med.* 2002. Vol. 8. P. 27-34.
2. Taverna, D., Moher, H., Crowley, D., Borsig, L., Varki, A. and Hynes, R. O. Increased primary tumor growth in mice null for beta3- or beta3/beta5-integrins or selectins // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2004. Vol. 101. P. 763-768.
3. Fawzi Aoudjit, Kristiina Vuori. Integrin Signaling in Cancer Cell Survival and Chemoresistance // *Chemotherapy Research and Practice.* 2012. Vol. 2012. 16 pages.
4. Carlos Mas-Moruno, Florian Rechenmacher, Horst Kessler. Cilengitide: The First Anti-Angiogenic Small Molecule Drug Candidate. Design, Synthesis and Clinical Evaluation // *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry.* 2010. Vol. 10. P. 753-768.

### RESISTANCE OF ACUTE MYELOID LEUKEMIA CELLS TO TRAIL-INDUCED APOPTOSIS MEDIATED BY ADHESION TO EXTRACELLULAR MATRIX

Y.V. Evstratova<sup>1</sup>, M.I. Kobyakova<sup>1</sup>, A.S. Senotov<sup>1</sup>,  
A.I. Lomovsky<sup>1</sup>, V.S. Akatov<sup>1,2</sup>, R.S. Fadeev<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>*Institute of Theoretical and Experimental Biophysics RAS,  
Pushchino, Moscow Region 142290, Russia;*

<sup>2</sup>*Pushchino State Institute of Natural Sciences, Pushchino, Moscow Region,  
142290, Russia, e-mail: yannaevstratova@gmail.com*

We previously showed that monoblastic cells of acute myeloid leukemia (AML) can acquire the phenotype of more mature macrophage-like cells, maintain proliferative activity and acquiring resistance to TRAIL-induced apoptosis. The main characteristic of macrophage-like AML cells is the ability to adhere to the extracellular matrix (ECM).

It is known that adhesion to ECM is mediated by integrins, and their ligation activates protein kinase of focal adhesion (FAK) and Src kinase, which increases the survival of tumor cells by initiating antiapoptotic signaling cascades associated with activating the PI3K / AKT pathway, increasing the activity of the transcription factor NF- $\kappa$ B, decreased p53 activation and increased expression of the anti-apoptotic proteins BCL-2 and FLIP. Cell adhesion is carried out by the main components of the ECM, they are peptides with the RGD sequence, the recognition site of which is present at the integrin receptors with  $\alpha$ V subunit. There is data that increased expression of  $\alpha$ V $\beta$ 3 and  $\alpha$ V $\beta$ 5 integrins correlates with the malignancy of many tumor diseases [1, 2] and mediates survival and resistance to the induction of cell death of many tumor cells, including leukemic malignant cells [3].

Thus, the adhesion of leukemic cells to ECM can mediate resistance to TRAIL-induced apoptosis, and therefore, it is required to find out which integrins in macrophage-like leukemic cells are involved in adhesion to ECM and their role in the formation of resistance to TRAIL-induced apoptosis. We proposed that the ability of macrophage-like cells to adhere to ECM is a factor mediating drug resistance, therefore, it is possible to increase the sensitivity of cells to TRAIL-induced apoptosis after inhibiting the interaction with their ligands in ECM.

We analysed the action of an  $\alpha$ V integrin agonist, Cilengitide, on the adhesion of leukemic cells. Cilengitide is an RGD peptide that blocks the binding of  $\alpha$ V, the integrin subunit of the cell membrane to ECM proteins [4].

It was found that the use of Cilengitide completely suppresses the adhesion of macrophage-like leukemic cells and contributes to their detachment from the surface of the ECM within 24 hours after treatment. Thus the adhesion of macrophage-like AML cells to ECM is based on the activation of  $\alpha$ V integrins. At the same time, it was shown that with the combined use of izTRAIL and Cilengitide, blocking adhesion in macrophage-like AML cells did not affect resistance to TRAIL-induced apoptosis. Probably, this effect is due to the fact that resistance to TRAIL-induced apoptosis in AML macrophage-like cells is based on the functioning of signaling pathways associated with TRAIL receptors, but not with adhesion to ECM components.

### References

1. Reynolds, L. E., Wyder, L., Lively, J. C., Taverna, D., Robinson, S. D., Huang, X., Sheppard, D., Hynes, R. O. and Hodivala-Dilke, K. M. Enhanced pathological angiogenesis in mice lacking beta3 integrin or beta3 and beta5 integrins // *Nat. Med.* 2002. Vol. 8. P. 27-34.
2. Taverna, D., Moher, H., Crowley, D., Borsig, L., Varki, A. and Hynes, R. O. Increased primary tumor growth in mice null for beta3- or beta3/beta5-integrins or selectins // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2004. Vol. 101. P. 763-768.
3. Fawzi Aoudjit, Kristiina Vuori. Integrin Signaling in Cancer Cell Survival and Chemoresistance // *Chemotherapy Research and Practice.* 2012. Vol. 2012. 16 pages.
4. Carlos Mas-Moruno, Florian Rechenmacher, Horst Kessler. Cilengitide: The First Anti-Angiogenic Small Molecule Drug Candidate. Design, Synthesis and Clinical Evaluation // *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry.* 2010. Vol. 10. P. 753-768.

# **N-АЦЕТИЛЦИСТЕИНАТ-2-ЭТИЛ-6-МЕТИЛ-3-ГИДРОКСИПИРИДИН ПРЕДОТВРАЩАЕТ ДИСФУНКЦИЮ МИТОХОНДРИЙ В УСЛОВИЯХ СТРЕССА**

**И.В. Жигачева<sup>1</sup>, И.Ф. Русина<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>*Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН,  
г. Москва, ул. Косыгина, 4, Россия*

<sup>2</sup>*Институт химической физики им Н.Н. Семенова РАН,  
119334 г. Москва, ул. Косыгина, 4, Россия*

Митохондрии, являясь одним из центральных звеньев энергетического обмена, вносят значительный вклад в ответы организма на стрессовые воздействия. Однако, при сильных или длительных стрессовых воздействиях эти органеллы становятся одним из основных источников избыточной генерации активных форм кислорода (АФК) [Зоров Д.Б. и др., 2007]. Взаимодействие АФК с полиненасыщенными жирными кислотами, входящими в состав липидов мембран, возможно, имеет следствием активацию перекисного окисления липидов (ПОЛ), приводящего к нарушению осмотического баланса между матриксом и межмембранным пространством митохондрий, что, вероятно, сопровождается набуханием митохондрий, высвобождением апоптогенных белков из межмембранного пространства в цитоплазму и активацией митохондриального пути апоптоза [Рязанцева Н.В. и др., 2009]. По-видимому, препараты, снижающие генерацию АФК митохондриями, будут повышать устойчивость организма к действию стрессовых факторов. На эту роль, в первую очередь претендуют антиоксиданты. В качестве объекта исследования были выбраны антиоксиданты - производные 3-оксипиридина (3-ОП). Известно, что производные 3-ОП активно реагируют с гидроксильными радикалами, первичными свободными радикалами белков и перекисными свободными радикалами [Сапежинский И.И. и др., 1980]. В связи с этим было исследовано влияние стресса и нового синтезированного водорастворимого соединения N-ацетилцистеинат 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридина (3-ГП), являющееся производным 3-оксипиридинол, на функциональное состояние митохондрий печени крыс, ингибирование ПОЛ которым может быть обусловлено наличием гидроксила фенольного типа при сопряженной циклической системе связей. В качестве стрессового воздействия использовали модель острой гипобарической гипоксии (ОГГ). Выбор данной модели объясняется тем, что энергетический обмен является мишенью для гипоксии и одним из первых среди других метаболических процессов нарушается в условиях дефицита кислорода [Лукьянова Л.Д., Власова И.Г., 1991].

Для проведения исследований необходимо было подобрать концентрацию препарата эффективно снижающую интенсивность ПОЛ, т.к в условиях ОГГ наблюдается перекисидация липидов мембран, в том числе и мембран митохондрий. Для этих целей использовали модель «старения» митохондрий (инкубация митохондрий печени крыс в гипотонической среде при

комнатной температуре). «Старение» приводило к росту генерации АФК, что нашло отражение в увеличении интенсивности флуоресценции продуктов ПОЛ в мембранах митохондрий в 3-4 раза. Препарат 3-ГП в концентрационном интервале от  $10^{-5}$ - $10^{-11}$ М снижал генерацию АФК митохондриями и, следовательно, предотвращал активацию ПОЛ. При исследованиях протекторных свойств была выбрана концентрация препарата -  $10^{-6}$ М.

ОГГ сопровождалась 1,5-3-кратным ростом интенсивности флуоресценции продуктов ПОЛ в мембранах митохондрий печени крыс. При этом происходило 29,5% снижение максимальных скоростей окисления НАД-зависимых субстратов и 35% снижение эффективности окислительного фосфорилирования. Введение крысам  $10^{-6}$  М 3-ГП за 45 минут до воздействия предотвращало изменения функциональных характеристик митохондрий печени: предупреждалась активация ПОЛ и восстанавливались биоэнергетические характеристики митохондрий (максимальные скорости окисления НАД-зависимых субстратов не отличались от контрольных значений, а величина дыхательного контроля была сопоставима с соответствующими значениями в контрольной группе животных).

Изменения в структурно-функциональных характеристиках митохондрий отразились и на физиологических показателях. Инъекция  $10^{-6}$ М 3-ГП в 1,8-4,5 раза увеличивала продолжительность жизни и на 12-40% повышала выживаемость мышей в условиях различных видов гипоксии.

Исходя из полученных данных можно предположить, что защитный эффект 3-ГП обусловлен его антирадикальными и антиоксидантными свойствами: эффективная константа ингибирования свободнорадикального окисления ( $k_{InH}$ ) этилбензола ( $60^\circ$ ) составляет от 3,3 до  $3,84 \times 10^4$  (Мс) $^{-1}$ . Предотвращая активацию ПОЛ, 3-ГП, по-видимому, способствует поддержанию функционального состояния митохондрий, что отражается на повышении устойчивости организма к стрессовым воздействиям, в частности к различным видам гипоксии.

## **N-ACETYLCYSTEININATE-2-ETHYL-6-METHYL-3-HYDROXYPYRIDINE PREVENTS MITOCHONDRIAL DYSFUNCTION IN STRESS CONDITIONS**

**I.V. Zhigacheva<sup>1</sup>, I.F. Rusina<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>*Emanuel Institute of Biochemical Physics RAS,  
street Kosygin, 4, Moscow, Russia*

<sup>2</sup>*N. Semenov Institute of Chemical physics RAS,  
street Kosygin, 4, Moscow, Russia*

Mitochondria, being one of the central links of energy metabolism, make a significant contribution to the body's responses to stress. However, under strong or prolonged stress, these organelles become one of the main sources of excessive generation of reactive oxygen species (ROS) [Zorov D. et al, 2007].

The interaction of ROS with polyunsaturated fatty acids that are part of membrane lipids may result in the activation of lipid peroxidation (LPO), which leads to disruption of the osmotic balance between the matrix and the intermembrane space of mitochondria, which is probably accompanied by swelling of mitochondria, the release of apoptogenic proteins from the intermembrane space to the cytoplasm and activation of the mitochondrial pathway of apoptosis [Ryazantseva N. In. et al., 2009]. Apparently, drugs that reduce the generation of ROS by mitochondria will increase the body's resistance to stress factors. This role is primarily claimed by antioxidants. Antioxidants - derivatives of 3-hydroxypyridine (3-HP) were chosen as the object of study. It is known that 3-HP derivatives actively react with hydroxyl radicals, primary free radicals of proteins and peroxide free radicals [Sapezhinsky II et al, 1980]. In this regard, the effect of stress and a new synthesized water-soluble compound N-acetylcysteinate 2-ethyl-6-methyl-3-hydroxypyridine (3-AHP), which is a derivative of 3- hydroxypyridine, on the functional state of the liver mitochondria of rats, inhibition of lipid peroxidation with this drug may be due to the presence of phenolic hydroxyl type with a conjugated cyclic system of bonds. A model of acute hypobaric hypoxia (AHH) was used as a stress effect. The choice of this model is explained by the fact that energy metabolism is a target for hypoxia and is one of the first among other metabolic processes that is disturbed under conditions of oxygen deficiency [Lukyanova L.D., Vlasova I.G., 1991].

For research it was necessary to choose the concentration of the drug effectively reduces the intensity of the LPO, because in the conditions of AHH there is peroxidation of membrane lipids, including lipids of mitochondrial membranes. For these purposes, a model of mitochondrial "aging" was used (incubation of rat liver mitochondria in a hypotonic medium at room temperature). "Aging" led to an increase in the generation of ROS, which was reflected in an increase in the fluorescence intensity of LPO products in mitochondrial membranes by 3-4 times. The drug 3-AHP in the concentration range from  $10^{-5}$ - $10^{-11}$  M reduced the generation of ROS by mitochondria and, consequently, prevented the activation of LPO. In studies of the protective properties, the concentration of the drug was chosen -  $10^{-6}$  M.

AHH was accompanied by a 1.5-3-fold increase in the fluorescence intensity of LPO products in rat liver mitochondrial membranes. In this case, a 29.5% decrease in the maximum oxidation rates of NAD-dependent substrates and a 35% decrease in the efficiency of oxidative phosphorylation occurred. Introduction to rats  $10^{-6}$  M 3-AHP 45 minutes before exposure prevented changes in the functional characteristics of liver mitochondria: prevented activation of LPO and restored bioenergetic characteristics of mitochondria (the maximum rates of oxidation of NAD-dependent substrates did not differ from the control rates, and the respiration control rates were comparable to the corresponding values in the control group of animals).

Changes in the structural and functional characteristics of mitochondria affected the physiological parameters. Injection of  $10^{-6}$  M 3-AHP increased life

expectancy by 1.8-4.5 times and increased survival of mice in different types of hypoxia by 12-40%.

Based on the data obtained we can assume that the protective effect of 3-AHP is due to its antiradical and antioxidant properties: the effective inhibition constant of free radical oxidation ( $k_{\text{InH}}$ ) of ethylbenzene ( $60^\circ$ ) is from  $3.3$  to  $3.84 \times 10^4$  (Ms)<sup>-1</sup>. Preventing the activation of lipid peroxidation, 3-AHP, apparently, contributes to the maintenance of the functional state of mitochondria, which is reflected in an increase in the body's resistance to stress, in particular, to various types of hypoxia.

## **НЕФРОПРОТЕКТОРНЫЕ ЭФФЕКТЫ АДЕМЕТИОНИНА ПРИ РАБДОМИОЛИТИЧЕСКОМ ОСТРОМ ПОВРЕЖДЕНИИ ПОЧЕК**

**И.И. Заморский, В.М. Драчук, Т.С. Щудрова, А.М. Горошко**

*Буковинский государственный медицинский университет,  
Черновцы, Театральная пл., 2, Украина*

Несмотря на значительные достижения в медикаментозном лечении и внедрение современных методов почечно-заместительной терапии, смертность от острого повреждения почек (ОПП) остается высокой и составляет около 25–70% [1]. Основой патогенеза почечной патологии является развитие оксидативного стресса, который характеризуется прооксидантно-антиоксидантным дисбалансом [2]. Поэтому, средства ренопротекции должны быть направлены на усиление антиоксидантной защиты, индукцию мембрано- и цитопротекторных механизмов. Адемeтионин — активный серосодержащих метаболит метионина, природный антиоксидант и антидепрессант, содержится во всех тканях организма. Как лекарственное средство относится к группе гепатопротекторов, однако благодаря плеiotропным эффектам обладает цитопротекторным, противовоспалительным, анальгезирующим, антидепрессантным, нейропротекторным и противозиплептическим действием [3].

Цель работы — изучение влияния адемeтионина на функциональное состояние почек и прооксидантно-антиоксидантный баланс в почках в условиях экспериментального рабдомиолитического ОПП.

**Материалы и методы.** Исследование проведено на белых беспородных половозрелых крысах-самцах массой 120–180 г, которые находились в стандартных условиях вивария со свободным доступом к воде и пище. Животные были разделены на три группы ( $n=7$ ): первая – контрольная, вторая – животные с рабдомиолитическим ОПП, третья – животные, которым вводили адемeтионин при ОПП. Рабдомиолитическое повреждение почек воспроизводили путем введения крысам внутримышечно 50% раствора глицерина в дозе 8 мл/кг. Адемeтионин («Гептрал», «Abbott S.p.A.», Италия) вводили в дозе 20 мг/кг внутривентриально через 40 мин после моделирования ОПП и продолжали вводить в течение 6 дней. Забор материала



ла осуществляли на 7-е сутки эксперимента в условиях водной нагрузки. Протекторное действие препарата оценивали по показателям функционального состояния почек, активности липидной и белковой перекисидации и ферментов антиоксидантной защиты.

**Результаты и обсуждение.** В результате эксперимента на 7-й день развития рабдомиолитической формы ОПП выявлялись признаки повреждения почечной ткани, что проявлялось снижением диуреза на 33,4%, скорости клубочковой фильтрации (СКФ) — в 2 раза по сравнению с животными интактной группы. Несмотря на тенденцию к восстановлению экскреторной функции почек, сохранялась гиперазотемия (уровень креатинина в плазме крови превышал показатель контроля в 1,7 раза) и протениурия (концентрация белка в моче выросла в 3 раза). Курсовое 7-ми дневное введение адеметионина способствовало улучшению функционального состояния почек, что подтверждалось возрастанием диуреза до уровня контроля, увеличением СКФ в 1,6 раза. Креатининемия у леченых животных снижалась до показателей нормы в среднем в 1,4 раза. При этом отмечалось значительное (в 2,8 раза) уменьшение концентрации белка в моче. Кроме того, адеметионин способствовал нормализации канальцевой функции, уменьшая показатель фракционной экскреции ионов натрия в 2,9 раза.

У крыс группы патологии сохранялась высокая интенсивность процессов перекисного окисления наряду с истощением системы антиоксидантной защиты: содержание малонового диальдегида (МДА) и окислительно модифицированных белков (ОМБ) в ткани почек достоверно превышало показатели контроля на 23,6% и 46,1% соответственно. Курсовое применение адеметионина содействовало уменьшению окислительных процессов: содержание МДА уменьшалось на 19,3%, а содержание ОМБ — на 31,7%. Кроме того, применение адеметионина способствовало увеличению активности глутатионпероксидазы на 58,8% и восстанавливало активность каталазы до уровня контроля.

**Выводы.** Адеметионин в условиях рабдомиолитического острого повреждения почек проявляет нефропротекторные свойства, повышая СКФ и диуреза, а также снижая проявления гиперазотемии, протениурии, восстанавливая реабсорбционную способность нефронов и нормализуя прооксидантно-антиоксидантный баланс.

### Литература

1. Makris K, Spanou L. Acute kidney injury: definition, pathophysiology and clinical phenotypes. *Clin Biochem Rev.* 2016; 37(2):85–98.
2. Huerta-Alardin AL, Varon J, Marik PE. Bench-to-bedside review: Rhabdomyolysis — an overview for clinicians. *Crit Care.* 2005; 9(2):158-69. doi: 10.1186/cc2978.
3. Anstee QM, Day CP. S-adenosylmethionine (SAME) therapy in liver disease: a review of current evidence and clinical utility. *J Hepatol.* 2012; 57(5):1097–109. doi: 10.1016/j.jhep.2012.04.041.

## NEPHROPROTECTIVE EFFECTS OF ADEMETHIONINE IN ACUTE KIDNEY INJURY INDUCED BY RHABDOMYOLYSIS

I.I. Zamorskii, V.M. Drachuk, T.S. Shchudrova, O.M. Goroshko

*Bukovinian State Medical University, Chernovtsy, Teatral'naya Sq., 2, Ukraine*

Despite significant advances in treatment and introduction of the modern methods of renal replacement therapy, the lethality from acute kidney injury (AKI) remains high, at about 25–70% [1]. The background of renal pathology is the development of oxidative stress, which is characterized by prooxidant-antioxidant imbalance [2]. Therefore, methods of renoprotection should be aimed at enhancing antioxidant protection, induction of membrane- and cytoprotective mechanisms. Ademetionine is an active sulfur-containing metabolite of methionine, a natural antioxidant and antidepressant found in all tissues of the body. As a drug, it belongs to the group of hepatoprotectors, however, due to pleiotropic effects it has a cytoprotective, anti-inflammatory, analgesic, antidepressant, neuroprotective and anti-epileptic effect [3].

The aim of this study was to investigate the effect of ademetionine on renal function and the prooxidant-antioxidant balance in rat kidneys in experimental AKI induced by rhabdomyolysis.

**Materials and methods.** This study was conducted on white mature male rats weighing 120–180 g, maintained under the standard vivarium conditions with free access to food and water. The animals were divided into three groups ( $n = 7$ ): the first group included the control subjects, the second group included animals with rhabdomyolysis-induced AKI, and the third group was the animals that received taurine for AKI. Rhabdomyolysis-induced renal injury in rats was modeled by intramuscular injection of a 50% glycerol solution at a dose of 8mL/kg. Ademetionine (Heptral, «Abbott SpA», Italy) was administered at a dose of 20 mg/kg intraperitoneally for 7 days after modeling of AKI. The material was taken on the 7th day of the experiment under water load conditions. The protective effect of the drug was assessed by the indices of the functional state of kidneys, intensity of lipid and protein oxidation and activity of antioxidant enzymes.

**Results and discussion.** As a result of the experiment, on the 7th day of the rhabdomyolytic AKI development the signs of renal tissue injury were detected, which was manifested by a decrease in diuresis by 33,4%, glomerular filtration rate (GFR) by 2 times comparing to animals of the intact group. Despite the tendency to restoration of the excretory kidney function a significant hyperazotemia (plasma creatinine level was 1,7 times higher than the control value) and proteinuria (urine protein concentration increased by 2,8 times) was observed. The 7-day administration of ademetionine contributed to the improvement of the functional state of kidneys, which was confirmed by an increase in diuresis to the level of control and an increase in GFR by 1,6 times. Creatininemia in treated animals declined to normal values by an average of 1,4 times. It was noted a significant (3-fold) decrease in urine protein level. In addi-

tion, ademetionine contributed to the normalization of tubular function, reducing the fractional excretion of sodium ions by 2,9 times.

In rats of the pathology group, a high intensity of peroxidation processes was found along with the depletion of the antioxidant defense system: the levels of malondialdehyde (MDA) and oxidatively modified proteins (OMP) in kidney tissue significantly exceeded the control values by 23,6% and 46,1%, respectively. Treatment with ademetionine contributed to the reduction of oxidative processes intensity: the level of MDA decreased by 19,3%, and the level of OMP - by 31,7%. In addition, the use of ademetionine caused an increase in the activity of glutathione peroxidase by 58,8% and restored the activity of catalase to the level of control.

**Conclusions.** In conditions of rhabdomyolysis-induced acute kidney injury ademetionine exhibits nephroprotective properties, increasing GFR and diuresis, as well as reducing the manifestations of hyperazotemia, proteinuria, and restoring the reabsorption ability of nephrons along with normalization of the prooxidant-antioxidant balance.

### References

4. Makris K, Spanou L. Acute kidney injury: definition, pathophysiology and clinical phenotypes. Clin Biochem Rev. 2016; 37(2):85–98.
5. Huerta-Alardin AL, Varon J, Marik PE. Bench-to-bedside review: Rhabdomyolysis — an overview for clinicians. Crit Care. 2005; 9(2):158-69. doi: 10.1186/cc2978.
6. Anstee QM, Day CP. S-adenosylmethionine (SAME) therapy in liver disease: a review of current evidence and clinical utility. J Hepatol. 2012; 57(5):1097–109. doi: 10.1016/j.jhep.2012.04.041.

## УСИЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ ЦЕРУЛОПЛАЗМИНОМ В УСЛОВИЯХ РАБДОМИОЛИЗА

**И.И. Заморский, Т.М. Унгуриян**

*Буковинский государственный медицинский университет.*

*Черновцы, пл. Театральная, 2, Украина*

Рабдомиолиз — угрожающий жизни синдром, возникающий вследствие повреждения скелетных мышц и приводящий к острому ренальному тубулярному некрозу и острому повреждению почек (ОПП) из-за воздействия миоглобина, вышедшего из разрушенных миоцитов [1]. Неадекватность оценки состояния пациентов с риском ОПП приводит к тому, что около 60% случаев его развития после госпитализации можно было бы предсказать, а 21% — избежать [2]. Активные формы кислорода и окислительный стресс, как полагают, являются движущими факторами при ОПП и хронических заболеваниях, таких как сердечно-сосудистые заболевания и сахарный диабет, которые предрасполагают к ОПП [3, 4].

Система естественной защиты в условиях окислительного стресса состоит из неферментативных антиоксидантов, таких как восстановленный глутатион, витамин Е, витамин С, ферритин, трансферрин, церулоплазмин

и альбумин, а также таких ферментов, как супероксиддисмутаза, каталаза, глутатионпероксидаза и др. Все эти антиоксиданты тесно взаимодействуют на разных этапах различных патологических процессов. В плазме крови главным антиоксидантом является церулоплазмин, обладающий множеством физиологических функций, включая роль в транспорте меди и метаболизме железа. Кроме того, церулоплазмин имеет несколько других каталитических активностей. Как сообщалось, церулоплазмин обладает как NO-оксидазной, так и глутатион-пероксидазной активностью, участвует в окислении липопротеинов низкой плотности, способен окислять обширную группу органических субстратов, включая ксенобиотики и биогенные амины, такие как адреналин, норадреналин, серотонин, дофамин [5]. Поэтому целью нашей работы стало изучение влияния церулоплазмينا на интенсивность липидной перекисидации и активность антиоксидантной системы в ткани почек и крови крыс в условиях острого повреждения почек, вызванного рабдомиолизом.

**Материалы и методы.** Опыты проведены на белых нелинейных половозрелых крысах весом 160–200 г, содержащихся в стандартных условиях вивария. Животных разделили на 3 группы (n=10): 1 группа — контроль, который составляли интактные животные; 2 группа — животные с экспериментальным ОПП, которое моделировали однократным введением 50% водного раствора глицерина в мышцы задних лапок, из расчета 8 мл/кг массы тела; животным 3 группы применяли церулоплазмин в дозе 7 мг/кг/сутки на протяжении трех дней до моделирования ОПП. С целью взятия материала для исследований осуществляли эвтаназию животных путем декапитации под легким эфирным наркозом на 24 ч развития ОПП.

**Результаты и обсуждение.** В результате экспериментальных исследований установлено, что церулоплазмин в профилактическом режиме введения, уменьшает прооксидантные процессы в условиях ОПП, о чем свидетельствовало уменьшение содержания малонового диальдегида в крови в 1,8 раза, а также в ткани почек в 1,5 раза в сравнении с модельной патологией. В то же время, уровень церулоплазмينا в плазме крови повышался на 24%, а молекул с SH-группами на 38%. Такие данные указывают на уменьшение проявлений окислительного стресса в организме животных, что способствует повышению защитных механизмов клеток и противодействию повреждающим факторам при рабдомиолизе. Кроме того, при исследовании экскреторной функции почек обнаружено, что профилактическое введение церулоплазмينا увеличивало диурез у животных в 1,9 раза и уменьшало экскрецию белка в 1,5 раза в сравнении с группой патологии, что свидетельствует о нефропротекции в условиях рабдомиолизиндуцированного ОПП.

**Выводы.** Церулоплазмин в профилактическом режиме введения уменьшает прооксидантные процессы и повышает активность антиоксидантной системы, способствуя нефропротекции в условиях рабдомиолизиндуцированного острого повреждения почек.

## Литература

1. Stahl K, Rastelli E, Schoser B. A systematic review on the definition of rhabdomyolysis. *J Neurol*. 2019. doi: 10.1007/s00415-019-09185-4.
2. Harty J. Prevention and Management of Acute Kidney Injury. *Ulster. Med J*. 2014; 83(3):149–57.
3. Dennis JM, Witting PK. Protective Role for Antioxidants in Acute Kidney Disease. *Nutrients*. 2017; 9(7):718. doi: 10.3390/nu9070718.
4. Tamay-Cach F, Quintana-Perez JC, Trujillo-Ferrara JG, et al. A review of the impact of oxidative stress and some antioxidant therapies on renal damage. *Ren Fail*. 2016; 38(2):171–5. doi: 10.3109/0886022X.2015.1120097.
5. Vashchenko G, MacGillivray RTA. Multi-copper oxidases and human iron metabolism. *Nutrients*. 2013; 5(7):2289–313. doi: 10.3390/nu5072289

### THE STRENGTHENING OF THE ACTIVITY OF ANTIOXIDANT SYSTEM BY CERULOPLASMIN IN THE CONDITIONS OF RABDOMIOLIZ

I.I. Zamorskii, T.M. Unguryan

*Bukovinian State Medical University, Chernovtsy, Teatral'naya Sq. 2, Ukraine*

Rhabdomyolysis is a life-threatening syndrome that occurs as a result of damage of skeletal muscles and leads to acute renal tubular necrosis and acute kidney injury (AKI) due to the impact of myoglobin released from destroyed myocytes [1]. The inadequacy of assessing the condition of patients with the risk of AKI leads to the fact that about 60% of cases of its development after hospitalization could be predicted, and 21% could be avoided [2]. Reactive oxygen species and oxidative stress are moving factors for AKI and chronic diseases such as cardiovascular diseases and diabetes mellitus, that predispose to AKI [3, 4].

The system of natural protection against oxidative stress consists of non-enzymatic antioxidants, such as reduced glutathione, vitamin E, vitamin C, ferritin, transferrin, ceruloplasmin and albumin, and enzymes, such as superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase, etc. All these antioxidants interact at different stages of various pathological processes. Ceruloplasmin is basic antioxidant of blood plasma, that has many physiological functions, including its role in copper transport and iron metabolism. In addition, ceruloplasmin has several other catalytic activities. It also has NO-oxidase and glutathione-peroxidase activity, participates in the oxidation of low-density lipoproteins, and is capable of oxidizing a large group of organic substrates, including xenobiotics and biogenic amines, such as adrenaline, noradrenaline, serotonin, dopamine [5]. Therefore, the purpose of our work was to study the effect of ceruloplasmin on the intensity of lipid peroxidation and the activity of the antioxidant system in the tissues of the kidneys and blood of rats in conditions of acute kidney injury due rhabdomyolysis.

**Materials and methods.** The experiments were conducted on white non-linear adult rats weighing 160–200 g that were kept in standard vivarium conditions. The animals were divided into 3 groups (n=10): 1 group — control, that was composed of intact animals; group 2 — animals with experimental AKI, that

was modeled by a single injection of 50% glycerol solution into the muscles of the hind legs, at the rate of 8 ml/kg body weight; 3 groups of animals were treated with ceruloplasmin at a dose of 7 mg/kg/day for three days prior to the AKI simulation. In order to take material for research, animals were euthanized by decapitation under light ether anesthesia for 24 hours development of AKI.

**Results and discussion.** As a result of experimental studies, it was established that ceruloplasmin in the prophylactic administration regimen reduces prooxidant processes in conditions of AKI, that evidenced by a decrease in the content of malondialdehyde in the blood by 1.8 times, as well as in the kidney tissue by 1.5 times in comparison with the model pathology. At the same time, the level of ceruloplasmin in the blood plasma increased by 24%, and of molecules with SH-groups by 38%. These data indicate a decrease of the manifestations of oxidative stress in the organism of animals, that contributes the increase of cells protective mechanisms and counteracting against the damaging factors in rhabdomyolysis. In addition, it was found that prophylactic administration of ceruloplasmin increased diuresis in animals by 1.9 times and reduced protein excretion by 1.5 times in comparison with the pathology group, that indicates nephroprotection in conditions of rhabdomyolysis-induced AKI.

**Conclusions.** Ceruloplasmin reduces prooxidant processes and increases the activity of the antioxidant system in prophylactic administration, promoting nephroprotection in conditions of rhabdomyolysis-induced acute kidney damage.

#### References

6. Stahl K, Rastelli E, Schoser B. A systematic review on the definition of rhabdomyolysis. *J Neurol*. 2019. doi: 10.1007/s00415-019-09185-4.
7. Harty J. Prevention and Management of Acute Kidney Injury. *Ulster. Med J*. 2014; 83(3):149–57.
8. Dennis JM, Witting PK. Protective Role for Antioxidants in Acute Kidney Disease. *Nutrients*. 2017; 9(7):718. doi: 10.3390/nu9070718.
9. Tamay-Cach F, Quintana-Perez JC, Trujillo-Ferrara JG, et al. A review of the impact of oxidative stress and some antioxidant therapies on renal damage. *Ren Fail*. 2016; 38(2):171–5. doi: 10.3109/0886022X.2015.1120097.
10. Vashchenko G, MacGillivray RTA. Multi-copper oxidases and human iron metabolism. *Nutrients*. 2013; 5(7):2289–313. doi: 10.3390/nu5072289

## ЗАЩИТНОЕ ДЕЙСТВИЕ МЕЛАТОНИНА ПРИ РАБДОМИОЛИЗ-ИНДУЦИРОВАННОМ ПОВРЕЖДЕНИИ ПОЧЕК

**И.И. Заморский, Т.С. Щудрова, Е.А. Дудка**

*Буковинский государственный медицинский университет,  
Черновцы, Театральная пл., 2, Украина*

Рабдомиолиз — это нарушение целостности скелетных мышц, приводящее к попаданию содержимого мышечных клеток, включая электролиты, миоглобин, креатинкиназу, лактатдегидрогеназу и другие внутриклеточные белки в системный кровоток и внеклеточное пространство. Рабдомиолиз может быть вызван различными физическими или химическими повреждения-

ми, такими как прямое травматическое повреждение, физическая нагрузка или длительный постельный режим, мышечная ишемия, инфекции, электролитные и метаболические расстройства, генетические заболевания, токсины и лекарственные средства, а также температурно-индуцированные состояния, такие как злокачественный нейрорептический синдром и злокачественная гипертермия [1–3]. Клинически рабдомиолиз варьирует от бессимптомного, с повышением уровня креатинкиназы, до угрожающего жизни состояния, связанного с острым повреждением почек (ОПП) и диссеминированным внутрисосудистым свертыванием (ДВС). ОПП является наиболее распространенным опасным для жизни системным осложнением рабдомиолиза, которое встречается с частотой от 10 до 55% и сопровождается плохим прогнозом, особенно при наличии полиорганной недостаточности. Развитие ОПП обусловлено накоплением нефротоксического миоглобина в почках, а также гипоперфузией почек в результате системной гиповолемии. В настоящее время лечение ОПП, вызванного рабдомиолизом, основано на поддерживающей терапии, а смертность остается высокой [1–3]. Гормон шишковидной железы мелатонин известен как основной регулятор биоритмов, обладающий цитопротекторными, антиоксидантными, иммуномодулирующими и противовоспалительными свойствами в условиях различных патологий, в том числе почечных, что способствует его активному изучению с целью расширения спектра клинического применения [4, 5].

**Материалы и методы.** Исследование было проведено на 24 нелинейных зрелых белых крысах, рандомизированно разделенных на 3 равные группы: группа I – контроль, группа II – рабдомиолиз-индуцированное ОПП, вызванное внутримышечной инъекцией 50% раствора глицерола (8 мл/кг), группа III – введение мелатонин в дозе 5 мг/кг («Sigma», США) через 1 ч и 24 ч после введения глицерола. Крыс умерщвляли через 48 ч после инъекции глицерола. Статистическую обработку данных проводили с помощью программного обеспечения SPSS Statistica 17.0 и теста Манна-Уитни.

**Результаты и обсуждение.** Рабдомиолиз-индуцированное ОПП характеризовалось повышенным уровнем креатинина и калия в плазме крови, значительной протеинурией, гипернатриурией, гиперкалиурией и снижением pH мочи. Повреждение почечных канальцев подтверждено значительным увеличением уровня гамма-глутамилтранспептидазы ( $\gamma$ -ГТП) в моче. Также было установлено увеличение содержания малонового диальдегида (МДА) и окислительно-модифицированных белков (ОМБ), наряду со снижением активности глутатионпероксидазы (ГП) и сукцинатдегидрогеназы (СДГ) в почках.

Введение мелатонина значительно улучшало функцию почек у крыс с ОПП. Цитопротекторное действие мелатонина по отношению к проксимальным почечным канальцам подтверждено 3-кратным снижением уровня  $\gamma$ -ГТП в моче ( $p < 0,05$ ), что привело к увеличению клиренса креатинина в 1,4 раза ( $p < 0,05$ ) с соответствующим снижением ретенционной азотемии, гиперкалиемии, уменьшением протеинурии в 1,5 раза ( $p < 0,05$ ), 2-кратным

снижением фракционной экскреции натрия ( $p < 0,05$ ). Ренопротекторный эффект мелатонина может быть частично объяснен его мощным антиоксидантным действием, что подтверждается значительным ( $p < 0,05$ ) снижением содержания МДА и ОМБ в ткани почек, наряду с увеличением активности ГП по сравнению с нелечеными животными ( $p < 0,05$ ), а также способностью поддерживать клеточный энергетический баланс путем сохранения активности СДГ.

**Выводы.** Полученные данные об эффективности мелатонина в условиях рабдомиолиз-индуцированного ОПП свидетельствуют о его ренопротекторной активности, обусловленной влиянием на ключевые звенья патогенеза. Результаты исследования подтверждают перспективы дальнейшего экспериментального изучения мелатонина в условиях почечной патологии различного генеза.

## **PROTECTIVE EFFECT OF MELATONIN AGAINST RHABDOMYOLYSIS-INDUCED ACUTE KIDNEY INJURY IN RATS**

**I.I. Zamorskii, T.S. Shchudrova, Ye.A. Dudka**

*Bukovinian State Medical University, Chernovtsy, Teatral'naya Sq., 2. Ukraine*

Rhabdomyolysis is the disruption of skeletal muscle integrity leading to the leakage of muscle cell contents, including electrolytes, myoglobin, creatine kinase, lactate dehydrogenase and other intracellular proteins into the circulation and extracellular space. Rhabdomyolysis can be caused by different physical or chemical damages such as direct traumatic injury, physical exertion or prolonged bed rest, muscle ischemia, infections, electrolyte and metabolic disorders, genetic disorders, toxins and drugs, as well as temperature-induced states such as neuroleptic malignant syndrome and malignant hyperthermia [1-3]. Clinically rhabdomyolysis ranges from an asymptomatic with elevation in the creatine kinase level to a life-threatening condition associated with kidney injury (AKI) and disseminated intravascular coagulation. AKI is the most common systemic life-threatening complication of severe rhabdomyolysis which occurs at an incidence ranging between 10 and 55 % and is associated with a poor outcome, particularly in the presence of multiple organ failure. Development of AKI is caused by accumulation of nephrotoxic myoglobin in the kidney and renal hypoperfusion as a result of systemic hypovolemia. Current treatment for rhabdomyolysis-induced AKI relies on supportive therapies (IV fluids, bicarbonate, hemodialysis) and the mortality remains considerably high [1-3].

Pineal hormone melatonin is known as a main regulator of biorhythms, possessing cytoprotective, antioxidant, immunomodulatory, and anti-inflammatory properties under the conditions of various pathologies, including renal, which contributes to its active study in order to expand the range of clinical use [4, 5].

**Materials and methods.** Research was conducted on 24 nonlinear mature white rats randomly divided into 3 equal groups: group I – control, group II –



rhabdomyolysis-induced AKI caused by intramuscular injection of 50% glycerol solution (8 ml/kg), group III – administration of melatonin at a dose of 5 mg/kg (“Sigma”, USA) 1 h and 24 h after glycerol administration. The rats were sacrificed 48 h after the glycerol injection. All interventions were conducted in accordance with the criteria outlined in the European Union Directive 2010/63/EU «On the protection of animals used for scientific purposes» (2010). Data were compared by SPSS Statistica 17.0 software and Mann-Witney test at  $p < 0.05$ .

**Results and discussion.** Rhabdomyolysis-induced AKI was characterized by increased plasma creatinine and potassium level, significant proteinuria, hyponatriuria, hyperkaliuria, and decrease in urine pH. Severe tubular injury was confirmed by a marked increase in gamma glutamyl transpeptidase ( $\gamma$ -GTP) level in urine. An increase in renal malondialdehyde (MDA) and oxidatively modified proteins (OMP) content along with a decrease in glutathione peroxidase (GPx) and succinate dehydrogenase activity (SDH) in kidney tissue was also established.

It was found that co-administration of melatonin significantly ameliorated kidney function in rats with AKI. Cytoprotective effect on the proximal renal tubules is verified by 3-fold decrease in urine  $\gamma$ -GTP level ( $p < 0.05$ ), and resulted in an increase in creatinine clearance by 1.4 times ( $p < 0.05$ ) with subsequent reduction of retention azotemia, decrease in plasma potassium level, reduction of proteinuria by 1.5 times ( $p < 0.05$ ), 2-fold decrease in fractional sodium excretion ( $p < 0.05$ ). Renoprotective effect of melatonin may be partially attributed to its potent antioxidant effect, verified by a significant ( $p < 0.05$ ) reduction in renal MDA and OMP content along with an increase in GPx activity comparing to untreated animals ( $p < 0.05$ ), as well as an ability to maintain cellular energy balance by preservation of SDH activity in kidney tissue.

**Conclusions.** The obtained data on the effectiveness of melatonin under the conditions of rhabdomyolysis-induced AKI indicate its potent renoprotective activity resulting from the influence on the key links of pathogenesis. The results of the research confirm the prospects for further experimental study of melatonin in conditions of various renal pathologies.

### References

1. Chavez LO, Leon M, Einav S, Varon J. Beyond muscle destruction: a systematic review of rhabdomyolysis for clinical practice. *Crit Care*. 2016; 20(1):135. doi: 10.1186/s13054-016-1314-5.
2. Reiter RJ, Rosales-Corral S, Tan DX, Jou MJ, Galano A, Xu B. Melatonin as a mitochondria-targeted antioxidant: one of evolution's best ideas. *Cell Mol Life Sci*. 2017; 74(21):3863-81. doi: 10.1007/s00018-017-2609-7.
3. Sharman EH, Bondy SC. Melatonin: A safe nutraceutical and clinical agent. *Nutraceuticals*. 2016:501-9. doi: 10.1016/B978-0-12-802147-7.00036-X.
4. Torres PA, Helmstetter JA, Kaye AM, Kaye AD. Rhabdomyolysis: pathogenesis, diagnosis, and treatment. *Ochsner J*. 2015; 15(1):58-69.
5. Williams J, Thorpe C. Rhabdomyolysis. *Continuing Education in Anaesthesia, Critical Care & Pain*. 2014;14(4):163-6. doi: 10.1093/bjaceaccp/mkt051.

## ПРОСТРАНСТВЕННАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ РОСТА МИКРОТРУБОЧЕК В КЛЕТКАХ С МЕЗЕНХИМАЛЬНЫМ ТИПОМ ПОДВИЖНОСТИ

Е.И. Зворыкина<sup>1</sup>, А.В. Творогова<sup>2</sup>, И.А. Воробьев<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>Биологический факультет Московского Государственного Университета,

<sup>2</sup>Научно-исследовательский институт физико-химической биологии Московского Государственного Университета<sup>2</sup>,

<sup>3</sup>Школа наук и технологии Назарбаев Университета

Для большинства типов животных клеток предполагается, что ведущим центром организации микротрубочек (ЦОМТ) является centrosoma. Однако исследования последних лет указывают на то, что на краю клетки возникает большое число растущих микротрубочек (МТ), независимо от centrosomas. Ранее нами было показано на клетках 3Т3, что в области centrosomas постоянно присутствуют в среднем более 30 комет EB-белка, однако расти из этой области начинает значительно меньшее число продолжительных МТ.

В настоящей работе был проведен анализ пространственной организации роста МТ в фибробластоподобных клетках (линии 3Т3 (n=89) и Vero(n=60)) и трансформированных клетках (линии HT1080 (n=50) и A549(n=50)). Растущие концы МТ визуализировались в результате трансфекции клеток плазмидой плюс-концевого белка МТ EB3. Движение «комет» флуоресцирующего белка в клетке оценивалось с помощью цейтраферной съемки на флуоресцентном микроскопе по z-оси с шагом 0,5 мкм. Centrosomальный ЦОМТ был виден на полученных фильмах как скопление комет с постоянным свечением в канале свечения EB3-RFP на 3-5 последовательных кадрах при съемке по z-оси. Мы определяли яркость centrosomального ЦОМТ через плотность скопления одиночных комет EB3-RFP в этой области для каждой рассматриваемой клетки отдельно. Также мы оценивали нуклеирующую активность centrosomального ЦОМТ по количеству продолжительно растущих МТ из этой области в минуту.

Мы сравнивали систему МТ в фибробластоподобных клетках (линии 3Т3 и Vero) и трансформированных клетках (линии HT1080 и A549) по динамическим параметрам роста МТ: скорость, время и длина периодов роста. Динамика МТ в рассматриваемых клеточных линиях различалась. Наиболее высокие значения длины, скорости и времени периодов роста были характерны для клеток с наибольшей площадью (клетки линии 3Т3). Они составили  $6,1 \pm 3,6$  мкм,  $20,6 \pm 8,1$  мкм/мин,  $18,6 \pm 9,6$  сек, соответственно. В различных областях цитоплазмы динамические параметры роста МТ также несколько различались. Так, на краю клеток для всех клеточных линий достоверно снижалась длина периодов роста. Для клеток 3Т3 она составила  $5,1 \pm 2,6$  мкм, для клеток Vero  $3,5 \pm 1,6$  мкм, для клеток HT1080 -  $3,7 \pm 1,6$  мкм, для клеток A549 -  $3,9 \pm 1,4$  мкм. В клетках линий Vero и A549 достоверно отличались, в том числе, и скорость роста, и время роста на краю. Для клеток Vero они составили:  $16,6 \pm 6,4$  мкм/мин на краю клетки vs

17,5±8,5 мкм/мин в цитоплазме и 13,0±3,0 сек vs 14,5±9,6 сек, соответственно. В клетках линии А549 скорость роста составила 17,9±4,9 мкм/мин на краю vs 21,7±5,5 мкм/мин в цитоплазме, а время роста - 12,2±4,0 сек на краю и 14,2±4,5 сек соответственно.

Отметим также, что для фибробластоподобных клеток была характерна большая площадь и более высокая яркость centrosомального ЦОМТ. Его яркость была наибольшей в клетках Vero и составляла более 50 одиночных комет EB3-RFP. В клетках 3Т3 яркость centrosомального ЦОМТ составляла 31,5±18,2 одиночных комет, в клетках HT1080 15,6±5,2 комет EB3-RFP, а в клетках А549 - 23,5±7,5 одиночных кометы. Нуклеирующая активность centrosомального ЦОМТ наблюдалась в клетках с наиболее ярким свечением в этой области и для клеток Vero составила 34,0±1,2 события в минуту. Тогда как в клетках 3Т3 нуклеирующая активность составляла 18,0±7,0 событий в минуту, в клетках HT1080 - 25,3±6,0 событий в минуту, а в клетках А549 - 18,2±4,0 событий в минуту. Следует отметить, что в клетках 3Т3 centrosомальный ЦОМТ с высокой яркостью наблюдался только в половине анализируемых клеток. В небольшом числе клеток линии А549 (n=5) и HT1080 (n=7) на краю клетки наблюдались области роста МТ с постоянным свечением в канале EB3-RFP.

Таким образом, на centrosоме постоянно присутствует большое число одиночных комет белка EB3, однако расти из нее начинает значительно меньшее число продолжительных МТ и нуклеирующая активность centrosомального ЦОМТ может определяться плотностью комет в этой области (ее яркостью). Число комет в области centrosомы, в свою очередь, зависит от функционального состояния системы МТ и клетки в целом.

## **SPATIAL ORGANISATION OF MICROTUBULES IN CELLS WITH THE MESENCYMAL TYPE OF MOTILITY**

**E.I. Zvorykina<sup>1</sup>, A.V. Tvorogova<sup>2</sup>, I.A. Vorobjev<sup>1,2,3</sup>**

<sup>1</sup>*Biological Department, M.V. Lomonosov Moscow State University, 1-12  
Leninskie Gory, Moscow, Russia*

<sup>2</sup>*A.N. Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Department,  
.V. Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia*

<sup>3</sup>*Department of Biology, School of Science and Technology,  
Nazarbayev University, Astana, Kazakhstan*

Centrosome is considered the major microtubule organizing center (MTOC) in fibroblast-like cells. However, growing body of evidence indicates that a significant number of growing microtubules (MTs), are nucleated at the cell margin in centrosome-independent way. In our previous studies we demonstrated that in 3T3 cells the region of the centrosome accumulates more than 30 EB protein comets at a time. Nonetheless a few long MTs start to grow from it.

In the recent research, we analysed spatial organization of MTs growth in fibroblast-like cells (3T3 lines (n = 89) and Vero (n = 60)) and transformed cells

(HT1080 lines (n = 50) and A549 (n = 50)). The assay was performed on cell lines expressing EB3-RFP (MT plus-end tracking protein). We analyzed the dynamic parameters and distribution of MT growing plus-ends on time-lapse and z-stack movies of interphase cells. The centrosomal MTOC was presented in EB3-RFP channel as a cluster of comets with a high brightness visible at 3-5 consecutive frames at a z-axis movie. We defined the brightness of the centrosomal MTOC as a number of single EB3-RFP comets presented at a time in the MTOC region. We also evaluated the nucleating activity of centrosomal MTOC as the number of persistently growing MTs from this area per minute.

We compared the MT system in fibroblast-like cells (3T3 and Vero cell lines) and transformed cells (HT1080 and A549 cell lines) by the MT growth parameters: speed, time, and length of growth periods. The dynamics of MTs in analysed cell lines varied. The highest values of the length, speed and duration of growth periods were observed in the cells with the largest area (3T3 cells). They were reckoned as  $6.1 \pm 3.6 \mu\text{m}$ ,  $20.6 \pm 8.1 \mu\text{m}/\text{min}$ ,  $18.6 \pm 9.6 \text{ sec}$ , respectively. Somehow in the dynamic parameters of MT growth also varied in different areas of cytoplasm. So, the length of growth periods for all observed cells was significantly reduced at the cell margin. For 3T3 cells, it was  $5.1 \pm 2.6 \mu\text{m}$ , for Vero cells  $3.5 \pm 1.6 \mu\text{m}$ , for HT1080 cells -  $3.7 \pm 1.6 \mu\text{m}$ , for A549 cells -  $3.9 \pm 1.4 \mu\text{m}$ , respectively. The growth rate and growth time at the cell margin in Vero and A549 cells were also significantly different in comparison to other areas in cytoplasm. For Vero cells, they were defined as  $16.6 \pm 6.4 \mu\text{m}/\text{min}$  at the cell margin vs  $17.5 \pm 8.5 \mu\text{m}/\text{min}$  in the cytoplasm and  $13.0 \pm 3.0 \text{ sec}$  vs  $14.5 \pm 9.6 \text{ sec}$ , respectively. In A549 cells, the growth rate was  $17.9 \pm 4.9 \mu\text{m}/\text{min}$  at the edge vs  $21.7 \pm 5.5 \mu\text{m}/\text{min}$  in the cytoplasm, and the time of growth was  $12.2 \pm 4.0 \text{ sec}$  at the cell margin and  $14.2 \pm 4.5 \text{ seconds}$ , respectively.

Note also that the fibroblast-like cells were characterized by a larger area and a higher nucleating activity of the centrosomal MTOC. The centrosomal MTOC brightness was the highest in Vero cells and was reckoned as more than 50 EB3-RFP comets. In 3T3 cells, the brightness of the centrosomal MTOC was  $31.5 \pm 18.2$  single comets, in HT1080 cells  $15.6 \pm 5.2$  EB3-RFP comets, and in A549 cells -  $23.5 \pm 7.5$  single comets. Interestingly the nucleating activity of the centrosomal MTOC increased with the brightness of the centrosomal area in EB3-RFP channel and for Vero cells it was  $34.0 \pm 1.2$  events per minute. While in 3T3 cells, the nucleating activity was  $18.0 \pm 7.0$  events per minute, in HT1080 cells -  $25.3 \pm 6.0$  events per minute, and in A549 cells -  $18.2 \pm 4.0$  events per minute. It should be noted that we observed bright centrosomal MTOC only in a half of the analysed 3T3 cells, In some A549 (n=5) and HT1080 (n=7) cells, non-centrosomal MT growth local areas with permanent brightness in EB3-RFP channel were observed at the cell margin.

Thus, centrosomal MTOC accumulates a significant number of single comets of the EB3 protein, but the number of persistently growing MTs from this area is low. The nucleating activity of the centrosomal MTOC can be determined by the density of comets in this area (brightness parameter). The number

of comets in the centrosomal region of the centrosome, in turn, depends on the functional state of the MT system and the cell type.

**ИНТЕНСИВНОСТЬ РЕПОПУЛЯЦИИ БИОМАТЕРИАЛОВ  
НА ОСНОВЕ СЕРОЗНЫХ ОБОЛОЧЕК ЗАВИСИТ  
ОТ ПОЛЯРНОГО ИНДУЦИРУЮЩЕГО ЭФФЕКТА  
ИХ ВНЕКЛЕТОЧНОГО МАТРИКСА**

**А.И. Звягина<sup>1</sup>, А.С. Сенотов<sup>1</sup>, П.О. Кирсанова<sup>1</sup>,  
О.А. Одинцова<sup>1,2</sup>, В.С. Акатов<sup>1,3</sup>, И.С. Фадеева<sup>1,3</sup>**

<sup>1</sup>*Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН,  
Пуццо, Россия;*

<sup>2</sup>*Тульский государственный университет, Тула, Россия;*

<sup>3</sup>*Пуцинский государственный естественно-научный институт,  
Пуццо, Россия*

Листовые биоматериалы на основе серозных оболочек широко используются в качестве основных материалов для изготовления биопротезов сосудов и клапанов сердца, а также барьерных мембран для нужд реконструктивной хирургии. Особый интерес в данной области представляет ксеноперикард, который характеризуется низкой клеточной плотностью, высокими механическими характеристиками и удобством применения в клинической практике.

Ранее в Лаборатории тканевой инженерии ИТЭБ РАН при имплантации перикардиальных биоматериалов был обнаружен эффект полярности биологического действия, обусловленной природной структурной полярностью серозной (*p.serosum*) и фиброзной (*p.fibrosum*) поверхностей перикарда [1]. Таким образом, возникла необходимость детального исследования особенностей процессов биоинтеграции (клеточной миграции, репопуляции и васкуляризации) полярных поверхностей девитализированных материалов на основе ксеноперикарда, обработанных в соответствии с авторским методом [2, 3].

В исследованиях *in vivo* на модели подкожной имплантации крысам на длительных сроках был обнаружен полярный индуцирующий эффект поверхностей экспериментальных материалов, проявляющийся как в самом матриксе материалов, так и в контактных тканях реципиента. Со стороны *p.fibrosum* наблюдались признаки перестройки фиброзной капсулы, посредством которой осуществлялся плотный контакт материала с тканями реципиента. Также на фиброзной поверхности наблюдалось полярное ремоделирование матрикса материала с формированием неоэластиновых фибрилл и гликозаминогликанов. Репопуляция материала клетками реципиента была равномерной, однако миграция клеток наблюдалась исключительно с фиброзной стороны, в то время как на серозной поверхности был обнаружен тонкий «стоп-слой» из одного ряда клеток, препятствующий клеточной миграции и плотному контакту материала с окружающими тка-

нями. Кроме того, в окружающих тканях, контактирующих с *p.serosum* наблюдалась индукция неоваскуляризации.

Также в группе образцов с удаленным фиброзным слоем (неполярные материалы) наблюдалось полное подавление полярного индуцирующего эффекта. Плотного срастания образцов с тканями реципиента не наблюдалось, с обеих сторон материала был обнаружен интенсивный неоваскулогенез контактных тканей реципиента, а также активная клеточная миграция с признаками ремоделирования матрикса перикарда.

Таким образом, представленные результаты свидетельствуют о значительном влиянии обнаруженного полярного индуцирующего эффекта на интенсивность репопуляции биоматериалов на основе ксеноперикарда. Дальнейшим этапом работ в данном направлении станут детальные исследования структурных компонентов полярных поверхностей перикарда, обуславливающих обнаруженные эффекты.

Работа выполнена при поддержке ЦКП ИТЭБ РАН и Фонда содействия инновациям.

### Литература

1. Фадеева И.С., Соркомов М.Н., Звягина А.И., Бритиков Д.В., Сачков А.С., Евстратова Я.В., Фадеев Р.С., Муратов Р.М., Акатов В.С. Исследование биоинтеграции и прочностных свойств нового биоматериала, изготовленного из ксеногенного перикарда для реконструктивной сердечно-сосудистой хирургии // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.
2. Фадеева И.С., Акатов В.С., Муратов Р.М., Бритиков Д.В., Сачков А.С. Способ повышения биосовместимости трансплантатов клапанов сердца и сосудов / Патент на изобретение РФ №2499611. 2013. Бюл. № 33
3. Фадеева И.С., Акатов В.С., Звягина А.И., Фадеев Р.С., Соркомов М.Н., Сенотов А.С., Минайчев В.В. Способ повышения биосовместимости перикардальных биоматериалов для реконструктивной хирургии / Патент на изобретение РФ №2678966. 2019. Бюл. No 4

### THE INTENSITY OF REPOPULATION OF BIOMATERIALS BASED ON SEROUS MEMBRANES DEPENDS ON THE POLAR INDUCING EFFECT OF THEIR EXTRACELLULAR MATRIX

A.I. Zvyagina<sup>1</sup>, A.S. Senotov<sup>1</sup>, P.O. Kirsanova<sup>1</sup>,  
O.A. Odintsova<sup>1,2</sup>, V.S. Akatov<sup>1,3</sup>, I.S. Fadeeva<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>*Institute of Theoretical and Experimental Biophysics RAS,*

*Pushchino, Moscow Region 142290, Russia;*

<sup>2</sup>*Tula State University, Tula, 300012, Russia;*

<sup>3</sup>*Pushchino State Institute of Natural Sciences,*

*Pushchino, Moscow Region 142290, Russia, e-mail: aurin.fad@gmail.com*

Biomaterials based on serous membranes are widely used in reconstructive surgery as the main materials for the bioprostheses of the heart valves and barrier membranes fabrication. In this field, xenopericardium is of particular

interest because of its low cell density, appropriate mechanical characteristics and clinical manageability.

In our preliminary studies of pericardium biomaterials, it was revealed that the natural structural polarity of the *p.serousum* and *p.fibrosus* surfaces exhibit polarity biological effect in the recipient body [1]. Thus, it is necessary to investigate in detail the features of biointegration processes (cell migration, repopulation and vascularization) of the polar surfaces of devitalized materials based on xenopericardium, processed by the author's method [2, 3].

Subcutaneous implantation in rats demonstrated the polar inducing effect the surfaces of experimental materials which was found in both the matrix of materials and the contact recipient tissues. On the *p.fibrosus* was observed rearrangement of the fibrous capsule, as a result material formed dense contact with the recipient's tissues. Also on the *p.fibrosus* was observed polar remodeling of the material matrix with the formation of neolastin fibrils and glycosaminoglycans. The repopulation of the material by the recipient cells was uniform, however, cells migrated through the fibrous layer only. At the same time *p.serousum* was covered with a thin "stop layer" of cells which prevented cell migration and close contact of the material with the surrounding tissues. In addition, it was found induction of neovascularization of recipient tissues in contact with *p.serousum*.

Also in the group of samples with the fibrous layer removed (non-polar materials), complete suppression of the polar inducing effect was observed. There was no dense contact of samples with the recipient tissues. Intensive neovasculogenesis of the recipient tissues, as well as active cell repopulation and remodeling of the sample matrix was detected on both sides of the material.

Thus, the presented results indicate a significant effect of the detected polar inducing effect on the intensity of the repopulation of biomaterials based on xenopericardium. The further step in this direction will be detailed studies of the structural components of the polar surfaces of the pericardium, causing the observed effects.

This work was supported by centre of collective usage of ITEB RAS and Foundation for Assistance to Small Innovative Enterprises (FASIE).

### References

1. Fadeeva I.S., Sorkomov M.N., Zvyagina A.I., Britikov D.V., Sachkov A.S., Evstratova Ya.V., Fadeev R.S., Muratov R.M., Akatov V.S. Study of biointegration and strength properties of a new biomaterial made from xenogenic pericardium for reconstructive cardiovascular surgery // Bulletin of Experimental Biology and Medicine.
2. Fadeeva I.S., Akatov V.S., Muratov R.M., Britikov D.V., Sachkov A.S. Method for improving biocompatibility of valve and vascular grafts / Patent for the invention of the Russian Federation No. 2499611. 2013. Bull. Number 33
3. Fadeeva, IS, Akatov, VS, Zvyagina, AI, Fadeev, RS, Sorkomov, M.N., Senotov, AS, Minaychev, V.V. Method for improving biocompatibility of pericardial biomaterials for reconstructive surgery / Patent for the invention of the Russian Federation No. 2678966. 2019. Bull. No 4

**ТРАНСФОРМАЦИЯ МИОЗИНОВОГО ФЕНОТИПА В МЫШЦЕ,  
ВЫПРЯМЛЯЮЩЕЙ ПОЗВОНОЧНИК, ПРИ ХРОНИЧЕСКИХ  
НЕСПЕЦИФИЧЕСКИХ БОЛЯХ В СПИНЕ**

**О.Е. Зиновьева<sup>1</sup>, Д.О. Рожков<sup>2</sup>, Л.Г. Бобылева<sup>3</sup>,  
С.С. Попова<sup>3</sup>, В.А. Яшин<sup>4</sup>, Г.З. Михайлова<sup>3</sup>**

*<sup>1</sup>Первый Московский государственный университет им. И.М. Сеченова,  
Москва, Россия*

*<sup>2</sup>Клиника нервных болезней им. А.Я. Кожевникова, Москва, Россия*

*<sup>3</sup>Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН,  
Пуцзино, Московская обл., Россия*

*<sup>4</sup>Федеральный исследовательский центр "Пуцинский научный центр  
биологических исследований РАН"  
142290, г. Пуцзино, Московская обл., Россия*

Проблема патогенеза хронической боли в спине и рационального обезболивания сохраняет актуальность в течение многих лет. Предполагались различные теории хронизации мышечной боли, но наибольшее распространение получила теория миофасциального болевого синдрома. В данной работе проводили анализ размеров поперечного сечения мышечных волокон, а также определяли соотношение изоформ тяжелых цепей миозина (ТЦМ) I и II типа в мышцах пациентов с хроническим болевым синдромом в нижней части спины. С этой целью получали серийные фронтальные срезы замороженной мышцы, выпрямляющей позвоночник, с помощью криомикротомы (толщиной 15 мкм). Для определения соотношения изоформ ТЦМ криосрезы инкубировали с антителами против тяжелых цепей миозина быстрого (II) или медленного (I) типов (1:400 при 37°C в течение часа). Инкубацию со вторичными антителами, конъюгированными с Alexa Fluor (1:200), проводили в течение 40 мин при комнатной температуре. Срезы анализировали с использованием флуоресцентного микроскопа Leica DM 6000B с встроенной цифровой камерой. Анализ изображений проводили с помощью программы Igl Trace SEM Align. Измеряли диаметр поперечного сечения, а также число волокон медленного и быстрого типов. Поскольку срезы были серийными, можно было достаточно четко судить о том, к какому типу относятся окрашенные волокна. Было обнаружено, что у 8 из 10 обследованных наблюдается увеличение количества медленных волокон в 1,4 раза без изменения диаметра поперечного сечения волокон данного типа. Количество быстрых волокон снижалось в 3-4 раза, что свидетельствует об изменении миозинового фенотипа у данных пациентов. Диаметр поперечного сечения волокон быстрого типа снижался с  $351 \pm 8,9$  до  $243 \pm 15,9$  мкм. Результаты позволяют предположить, что эти изменения являются негативными и, несомненно, вносят вклад в нарушение функциональной активности спинной мышцы пациентов с хронической болью в спине.



**TRANSFORMATION OF THE MYOSIN PHENOTYPE  
IN THE MUSCLE STRAIGHTENING THE SPINE  
WITH CHRONIC NONSPECIFIC BACK PAIN**

**O.E. Zinovieva<sup>1</sup>, D.O. Rozhkov<sup>2</sup>, L.G. Bobyleva<sup>3</sup>,  
S.S. Popova<sup>3</sup>, V.A. Yashin<sup>4</sup>, G.Z. Mikhailova<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>*I.M. Sechenov First Moscow State University, Moscow, Russia*

<sup>2</sup>*A.Ya. Kozhevnikov Moscow Clinic for Nervous Diseases, Moscow, Russia*

<sup>3</sup>*Institute of Theoretical and Experimental Biophysics RAS,  
Pushchino, Moscow Region, Russia*

<sup>4</sup>*Federal Research Center "Pushchino Scientific Center for Biological Research  
of the Russian Academy of Sciences", Pushchino, Moscow region, Russia*

The problem of the pathogenesis of chronic back pain and rational pain relief remains relevant for many years. Various theories of chronic muscle pain were suggested but the theory of myofascial pain syndrome was most prevalent. In this work, we analyzed the size of the cross section of muscle fibers and also determined the ratio of isoforms of heavy chains of type I and II myosin in the muscles of patients with chronic pain syndrome in the lower back. For this purpose, serial 15  $\mu\text{m}$ -thick frontal sections of the frozen muscle straightening the spine were obtained using a cryomicrotome. To determine the ratio of isoforms of myosin heavy chains, cryosections were incubated with antibodies against myosin heavy chains of the fast (II) or slow (I) types (1: 400 at 37°C for an hour). Incubation with secondary antibodies conjugated to Alexa Fluor was performed at a dilution of 1: 200 for 40 min at room temperature. Sections were analyzed using a Leica DM 6000B fluorescence microscope with an integrated digital camera. Image analysis was performed using the Igl Trace SEM Align program. The diameter of the cross section was measured, as well as the number of fibers of the slow and fast types. Since the sections were serial, it was possible to quite clearly judge what type of dyed fibers is. It was found that in 8 patients out of 10 examined there was an increase in the number of slow fibers 1.4 times without changing the cross-sectional diameter of fibers of this type. The number of fast fibers decreased by 3-4 times indicated a change in the myosin phenotype in these patients. The cross-sectional diameter of the fast-type fibers was reduced from  $351 \pm 8.9$  to  $243 \pm 15.9$  microns. The results suggest that these changes are negative and undoubtedly contribute to the impairment of the functional activity of the spinal muscles of patients with chronic back pain.

**СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ РИТМОИНОТРОПНЫХ  
ХАРАКТЕРИСТИК В ПАПИЛЛЯРНОЙ МЫШЦЕ СЕРДЦА  
СУСЛИКА И ЧАСТОТЫ СЕРДЕЧНЫХ СОКРАЩЕНИЙ  
ИНТАКТНЫХ ЖИВОТНЫХ**

**Д.А. Игнатъев, А.С. Аверин, Л.С. Косарский, О.В. Накипова**  
*Федеральный исследовательский центр "Пушкинский научный центр  
биологических исследований РАН" 142290, г. Пушкино, Московская обл.,  
перспект Науки, д.3*

Частота сердцебиений – жизненно важный модулятор, обеспечивающий способность сердца влиять на сердечный выброс и силу сокращений и определяющий его адаптационную способность к изменению внешних и внутренних факторов. Ионам кальция принадлежит ведущая роль в реализации связи «частота-сила» (ритмоинотропные отношения). Изменения динамического баланса ионов  $Ca^{2+}$  в цитоплазме являются основной причиной нарушений зависимости частота–сила при патологиях миокарда, однако ясного и однозначного понимания механизмов этих нарушений до сих пор не сложилось. В сердце зимоспящих животных доля участия различных источников кальция в активации сокращения обратимо меняется при смене сезонного состояния животных (активность, спячка, пробуждение). Показано, что при этом также изменяется и характер ритмоинотропных отношений (Kondo, Shibata, 1984). Однако имеющиеся данные об особенностях частотной регуляции силы сокращения сердца зимоспящих животных малочисленны и противоречивы. Проведено исследование особенностей зависимости силы сокращения (изометрический режим) от частоты стимуляции папиллярных мышц правого желудочка сердца сусликов при изменении их функционального состояния на протяжении годового цикла в широком диапазоне частоты стимуляции (от 0.1 до 6.0 Гц). Впервые получены данные об особенностях ритмоинотропных явлений в процессе вхождения в спячку и пробуждения. Проведено сопоставление с результатами, полученными нами ранее на интактных животных (Игнат'ев и др., 2001). В результате проведенных исследований показано, что в зависимости от характера реакции папиллярных мышц на изменение частоты стимуляции, сусликов можно условно разделить на 2 типа: с относительно слабой и выраженной частотной зависимостью (Nakipova et al., 2007). Первый тип ритмоинотропии имеет преимущественно отрицательную направленность во всей области исследованных частот, а 2 тип – двухфазную: резко-отрицательную в области низких частот стимуляции и положительную – в области высоких частот (свыше 1.0 Гц). Наиболее выраженные частотные изменения наблюдаются у животных переходных периодов. Обсуждается, что изменения типов ритмоинотропии в сердце суслика происходят в соответствии с основной стратегией сезонных изменений соотношения вклада внеклеточных и внутриклеточных источников кальция в активацию сокращения (Kondo & Shibata, 1984; Heinis et al., 2015; Nakipova et al., 2017).

### Литература

- Kondo, N. Shibata, S. Calcium source for excitation-concentration coupling in myocardium of nonhibernating and hibernating chipmunks. *Science*. 1984, v. 225, p. 641 – 643.
- Nakipova O.V., Zakharova N.M., Andreeva L.A., Chumaeva N.N., Averin A.S., Kosarskii L.S., Anufriev A.I., Lewinski D.V., Kockskamper J., Pieske B. The seasonal peculiarities of force-frequency relationships in active ground squirrel *Spermophilus undulatus* ventricle. *Cryobiology* 2007. V .55. P. 173-181.
- Ignat'ev DA; Sukhova GS, Sukhov VP Analysis of changes in the heart rate and body temperature of the ground squirrel *Citellus Undulatus* in different physiological states. *Zh Obshch Biol*. 2001; 62(1):66–67.

Heinis FI, Vermillion KL, Andrews MT, Metzger JM. Myocardial performance and adaptive energy pathways in a torpid mammalian hibernator. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2015; 309(4): R368–R377. doi:10.1152/ajpregu.00365.2014

Nakipova O.V., Averin A.S., Evdokimovskii E.V., Pimenov O.Y., Kosarski L., Ignat'ev D., Anufriev A., Kokoz Y.M., Reyes S., Terzic A., Alekseev A.E. Store-operated  $Ca^{2+}$  entry supports contractile function in hearts of hibernators. *PLoS ONE*. 2017. №12 P. e0177469.

**COMPARATIVE ANALYSIS OF THE RHYTHMOINOTROPIC  
CHARACTERISTICS IN THE PAPILLARY MUSCLE  
OF THE GROUND SQUIRRELS HEART  
AND HEART RATE OF INTACT ANIMALS**

**D.A. Ignat'ev, A.S. Averin, L.S. Kosarski, O.V. Nakipova**

*Federal Research Center "Pushchino Scientific Center for Biological Research  
of the Russian Academy of Sciences" (PSCBR RAS). 142290, Pushchino,  
Moscow region, pr. Nauki 3*

Heart rate is a vital modulator that provides the ability of the heart to influence cardiac output and the force of contractions and determines its adaptive ability to change external and internal factors. Calcium ions play a leading role in the implementation of the force - frequency relationships (FFR). Changes in the dynamic balance of  $Ca^{2+}$  ions in the cytoplasm are the main cause of FFR disorders in myocardial pathologies; however, a clear and unambiguous understanding of the mechanisms of these disorders has not yet been established. In the heart of hibernating animals, the share of various sources of calcium in the activation of contraction changes reversibly when the seasonal state of the animals changes (activity, hibernation, awakening). It is shown that this also changes the nature of FFR (Kondo, Shibata, 1984). However, the available data on the characteristics of frequency regulation of the force of contraction of the heart of hibernating animals are few and contradictory. The features of the dependence of the contractile force (isometric mode) on the frequency of stimulation of papillary muscles of the right ventricle of a ground squirrel's heart when their functional state changes during the annual cycle in a wide range of the frequency of stimulation (from 0.1 to 6.0 Hz) have been studied. For the first time, data were obtained on the characteristics of rhythmoinotropic phenomena in the process of hibernation and awakening. A comparison is made with the results obtained earlier on intact animals (Ignatiev et al., 2001). As a result of the research, it was shown that depending on the nature of the papillary muscle response to changes in the frequency of stimulation, ground squirrels can be divided into 2 types: with a relatively weak and pronounced frequency dependence (Nakipova et al., 2007). The first type of FFR has a predominantly negative directivity in the entire range of frequencies studied, and type 2 has a two-phase mode: sharply negative in the low-frequency region of stimulation and positive in the high-frequency region (above 1.0 Hz). The most pronounced frequency changes are observed in animals of transitional periods. It is discussed that changes in the types of FFR in the heart of

ground squirrel occur in accordance with the basic strategy of seasonal changes in the ratio of the contribution of extracellular and intracellular sources of calcium to the activation of contraction (Kondo & Shibata, 1984; Heinis et al., 2015; Nakipova et al., 2017).

### References

- Kondo, N. Shibata, S. Calcium source for excitation-concentration coupling in myocardium of nonhibernating and hibernating chipmunks. *Science*. 1984, v. 225, p. 641 – 643.
- Nakipova O.V., Zakharova N.M., Andreeva L.A., Chumaeva N.N., Averin A.S., Kosarskii L.S., Anufriev A.I., Lewinski D.V., Kockskamper J., Pieske B. The seasonal peculiarities of force-frequency relationships in active ground squirrel *Spermophilus undulatus* ventricle. *Cryobiology* 2007. V. 55. P. 173-181.
- Ignat'ev DA; Sukhova GS, Sukhov VP Analysis of changes in the heart rate and body temperature of the ground squirrel *Citellus Undulatus* in different physiological states. *Zh Obshch Biol*. 2001; 62(1):66–67.
- Heinis FI, Vermillion KL, Andrews MT, Metzger JM. Myocardial performance and adaptive energy pathways in a torpid mammalian hibernator. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2015; 309(4): R368–R377. doi:10.1152/ajpregu.00365.2014
- Nakipova O.V., Averin A.S., Evdokimovskii E.V., Pimenov O.Y., Kosarski L., Ignat'ev D., Anufriev A., Kokoz Y.M., Reyes S., Terzic A., Alekseev A.E. Store-operated  $Ca^{2+}$  entry supports contractile function in hearts of hibernators. *PLoS ONE*. 2017. №12 P. e0177469.

## ПАЛЬМИТИНОВАЯ КИСЛОТА ВЫЗЫВАЕТ КАРБОНИЛЬНЫЙ СТРЕСС И ИЗМЕНЯЕТ БАРЬЕРНЫЕ СВОЙСТВА ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК HUVEC

**О.А. Казакова, М.В. Самсонов, Н.В. Подкуйченко,  
С.С. Мичурина, Ю.С. Стафеев, Е.Е. Ефремов, Т.Н. Власик,  
В.З. Ланкин, А.В. Воротников, В.П. Ширинский**

*НИИ экспериментальной кардиологии,*

*Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии,  
ул. 3-я Черепковская, д. 15а, Москва, Россия*

Повышенный уровень свободных жирных кислот (СЖК) в кровотоке является основным фактором риска развития периферической инсулиновой резистентности, гипергликемии и диабета 2 типа. Сосудистый эндотелий выступает первичной мишенью СЖК, которые вызывают дисфункцию сосудистого эндотелия и сердечно-сосудистые осложнения при диабете. Кроме того, эндотелий обеспечивает барьер между кровотоком и подлежащими тканями, однако мало известно, влияют ли СЖК, и каким образом, на эндотелиальный барьер. Мы использовали прижизненную видеомикроскопию для анализа отдельных и совместных эффектов пальмитиновой кислоты (в концентрациях 0,3, 0,5, 0,8 и 1,0 мМ) и гипергликемии (28 мМ глюкозы против 3,5 мМ в норме) на жизнеспособность и барьерные свойства эндотелиальных клеток пупочной вены человека (HUVEC). Мы обнаружили,

что пальмитат изменяет типично "брусчатую" морфологию эндотелиального монослоя на "сократительный" фенотип. Ни вместе, ни по отдельности, пальмитат и высокая глюкоза не влияли на базовую проницаемость эндотелиального монослоя, но ослабляли транзиторное усиление проницаемости (гипергликемия) и восстановление барьера ( $\geq 0,8$  мМ пальмитата) под действием тромбина. Пальмитат, но не гипергликемия, вызывал накопление малонового диальдегида (МДА), продукта перекисного окисления липидов, и МДА-зависимую модификацию белка в клетках HUVEC. Экзогенный МДА усиливал проницаемость, нарушая эндотелиальный барьер, что указывает на МДА как возможного участника повреждающего действия пальмитата на сосудистый эндотелий.

Работа поддержана РФФИ 18-315-00377 мол\_а и РНФ 14-15-00245; 19-15-00361.

## **PALMITATE INDUCES CARBONYL STRESS AND ALTERS BARRIER PROPERTIES OF HUVECS**

**O.A. Kazakova, M.V. Samsonov, N.V. Podkuychenko,**

**S.S. Michurina, I.S. Stafeev, E.E. Efremov, T.N. Vlasik,**

**V.Z. Lankin, A.V. Vorotnikov, V.P. Shirinsky**

*Institute of Experimental Cardiology, National Medical Research Center  
for Cardiology, Moscow, Russia*

Increased level of free fatty acids (FFA) in circulation is the major risk factor for periferal insulin resistance, hyperglycemia and type 2 diabetes development. Vascular endothelium is the primary target of the bloodstream FFA that cause endothelial dysfunction leading to cardiovascular complications in diabetes. The endothelium also provides a barrier between circulation and underlying tissues, however little is known whether and how FFA affect the endothelial barrier. We used the live cell time-lapse microscopy and transendothelial electric resistance assay to investigate the effects of a typical FFA, palmitate (0.3, 0.5, 0.8 and 1.0 mM), hyperglycemia (28 mM vs. normal 3.5 mM glucose), and both, on viability and the barrier properties of human umbilical vein endothelial cells (HUVEC). We find that palmitate induces the loss of the cobble-stone morphology of HUVEC monolayers leading to 'contractile'-like cell phenotype. Neither palmitate, nor high glucose, nor both, altered the basal endothelial barrier integrity, however decreased the transient permeability response (hyperglycemia) or the barrier recovery ( $\geq 0,8$  mM palmitate) after thrombin stimulation. Palmitate, but not high glucose induced production of lipid peroxidation adduct malone dialdehyde (MDA) and MDA modification of a cellular protein. Exogenous MDA deteriorated the HUVEC barrier, suggesting it may mediate damaging effects of palmitate.

Supported by RFBR 18-315-00377 мол\_а, RSF 14-15-00245; 19-15-00361.

## МЕХАНИЗМЫ МЫШЕЧНОЙ ДИСФУНКЦИИ ПРИ ТОЧЕЧНЫХ МУТАЦИЯХ В ТРОПОМИОЗИНЕ

О.Е. Карпичева<sup>1</sup>, В.В. Сиренко<sup>1</sup>, А.О. Симонян<sup>1,2</sup>, Е.А. Роговец<sup>1</sup>,  
С.В. Аврова<sup>1</sup>, Ч.С. Редвуд<sup>3</sup>, Ю.С. Боровиков<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Тихорецкий пр., 4, Россия

<sup>2</sup>Санкт-Петербургский государственный университет,  
Санкт-Петербург, Университетская наб., 7-9, Россия

<sup>3</sup>Университет Оксфорда, Больница Джона Рэдклиффа,  
Оксфорд, OX3 9DU, Великобритания

Точечные мутации в генах, кодирующих изоформы скелетномышечного тропомиозина человека, ассоциированы с развитием нескольких патологий мышечной ткани, среди которых выделяются немалиновая миопатия (NM), «кэп»-миопатия (Cap), врожденная диспропорция типов мышечных волокон (CFTD) и дистальный артрогрипоз (DA). Молекулярные механизмы мышечной дисфункции при этих патологиях остаются неизвестными, диагностика затруднена, а терапевтические подходы к их лечению все еще не разработаны. Целью работы стало исследование влияния аминокислотных замен E173A, R90P, E150A и A155T в  $\gamma$ -тропомиозине (Trp3.12), связанных с различными мышечными заболеваниями, на позицию Trp в тонких нитях мышечного волокна и на конформационные перестройки актомиозина в цикле гидролиза АТФ с помощью метода поляризационной микрофлуориметрии. Ф-актин, Trp и головки миозина (S1) были специфически модифицированы флуоресцентными зондами и встроены в теневые мышечные волокна. Сравнительный анализ конформационных перестроек мышечных белков показал, что все точечные мутации приводят к аномальному поведению Trp в АТФазном цикле и к связанным с этим отклонениям в работе сократительной системы. Обнаружено, что замены E173A, R90P и E150A приводят к значительному смещению Trp к внутренним доменам актина и увеличивают относительное количество головок миозина в сильной форме связывания с актином при разных концентрациях  $Ca^{2+}$  в саркомере. Исключение составляет замена A155T, которая вызывает смещение Trp к внутренним доменам актина и увеличение количества сильно связанных с актином головок миозина только при низкой концентрации  $Ca^{2+}$ . Полученные в этой работе и ранее данные позволили выявить те особенности функционирования регуляторной системы мышечного волокна, которые характерны для NM, Cap, DA и CFTD на молекулярном уровне. Обнаружено, что характер изменения количества миозиновых поперечных мостиков в конформации сильного связывания с актином в АТФазном цикле при высокой концентрации  $Ca^{2+}$  может быть одним из критериев классификации миопатий. При CFTD и DA количество таких головок миозина значительно увеличивается, тогда как при Cap и NM уменьшается, что, несомненно, сказывается на генерации силы миозиновым мотором.

Для всех исследованных мутантных форм Trp, вне зависимости от локализации мутации и характера миопатии, была обнаружена корреляция

между изменением количества поперечных мостиков в конформации сильного связывания с актином при низких концентрациях  $\text{Ca}^{2+}$  и изменением  $\text{Ca}^{2+}$ -чувствительности тонких нитей. Увеличение чувствительности к  $\text{Ca}^{2+}$  может быть связано как с тем, что головки миозина ингибируют выключение тонкой нити тропонином, так и с ингибированием включения тонкой нити самой головкой миозина. Уменьшение  $\text{Ca}^{2+}$ -чувствительности коррелирует с аномальной локализацией мутантного Trm ближе к внешним доменам актина. Несмотря на то, что количество головок миозина в конформации, характерной для сильного связывания с актином, и  $\text{Ca}^{2+}$ -чувствительность могут увеличиваться или уменьшаться в зависимости от мутации в Trm, результат этих нарушений одинаковый – мышечная слабость. Для эффективной работы миозиновых мостиков, прохождения ими полного цикла и генерации силы важно не только сильное связывание миозина с актином, но и расслабление. Появление аномально высокого количества поперечных мостиков, образующих с актином сильную форму связывания, в цикле гидролиза АТФ при высоких концентрациях  $\text{Ca}^{2+}$ , а также при расслаблении мышечного волокна, могут привести к падению сократительной способности мышечной ткани, возникновению ригора и появлению разрывов миофибрилл и морфологических изменений мышечной ткани, типичных для Cap или DA. С другой стороны, фиксация Trm вблизи блокирующей позиции вызывает уменьшение количества поперечных мостиков, существенных для развития мышечного напряжения, что также может привести к падению сократительной способности мышечной ткани, типичному для большинства наследственных миопатий человека. Полученные данные могут быть использованы при классификации миопатий, при тестировании некоторых фармакологических агентов и при выборе мишеней с целью разработки стратегии лечения различных наследственных мышечных патологий. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект 17-14-01224).

**MECHANISMS OF MUSCLE DYSFUNCTION  
IN THE PRESENCE OF POINT MUTATIONS IN TROPOMYOSIN  
O.E. Karpicheva<sup>1</sup>, V.V. Sirenko<sup>1</sup>, A.O. Simonyan<sup>1,2</sup>, E.A. Rogozovets<sup>1</sup>,  
S.V. Avrova<sup>1</sup>, C.S. Redwood<sup>3</sup>, Y.S. Borovikov<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> *Institute of Cytology RAS, Tikhoretsky Av., 4, St. Petersburg, 194064, Russia;*

<sup>2</sup> *Saint Petersburg State University, Universitetskaya nab., 7-9,  
Saint Petersburg, 199034, Russia;*

<sup>3</sup> *University of Oxford, John Radcliffe Hospital,  
Oxford OX3 9DU, United Kingdom*

Point mutations in genes encoding isoforms of skeletal muscle tropomyosin are associated with the development of several pathologies of muscle tissue among which are nemaline myopathy (NM), «cap»-myopathy (Cap), congenital fiber-type disproportion (CFTD) and distal arthrogryposis (DA). The molecular

mechanisms underlying the muscle dysfunction in these pathologies remain unclear, diagnosis is ambiguous, and therapeutic approaches to their treatment have not yet been developed. The present work aims to study an impact of several amino acid substitutions E173A, R90P, E150A, and A155T in  $\gamma$ -tropomyosin (Tpm3.12) associated with different myopathies on the position of Tpm in thin filaments of muscle fiber and on the actomyosin conformational changes during the ATP hydrolysis cycle using polarization fluorimetry technique. F-actin, Tpm and the myosin heads (S1) were specifically modified with the fluorescent probes and incorporated into ghost muscle fibers. A comparative analysis of conformational rearrangements of muscle proteins in the presence of mutant forms of Tpm showed that all point mutations lead to abnormal behavior of Tpm in the ATPase cycle and to the associated abnormalities in the work of the contractile system of the muscle fiber. We show that the E173A, R90P, and E150A Tpm produced abnormally large displacement of Tpm to the inner domains of actin and a transition of a higher number of the myosin heads to the strong-binding conformation at different  $\text{Ca}^{2+}$  concentrations in sarcomere. On the contrary, the A155T mutation induces a displacement of Tpm to the inner domains of actin and increase in the number of the strong-binding myosin heads only at low  $\text{Ca}^{2+}$ . Taking into account the data obtained earlier, we tried to highlight the features of functioning of muscle fiber regulatory system that would be typical for CFTD, Cap, DA and NM at the molecular level. One of the criteria that allows an accurate identification of the disease can be the nature of the change in the number of myosin cross-bridges in the strong binding conformation in the ATPase cycle at high concentrations of  $\text{Ca}^{2+}$ . The increase in the number of such bridges was typical for mutations associated with CFTD and DA. In contrast, under similar experimental conditions with Cap and NM, a decrease in the number of such cross-bridges was observed.

For all studied mutant forms of Tpm, regardless of the location of the mutation and the nature of myopathy, a correlation was found between the change in the relative amount of myosin cross-bridges in the strong-binding conformation at low concentrations of  $\text{Ca}^{2+}$  and the change in  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitivity of thin filaments. An increase in sensitivity to  $\text{Ca}^{2+}$  ions may be due both to the fact that the myosin heads inhibit the switching off of a thin filament by troponin, and to the inhibition of the switching on of a thin filament by the myosin head itself. The decrease in  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitivity correlates with the abnormal localization of mutant Tpm closer to the outer domains of actin. Despite the fact that the number of myosin heads in the conformation characteristic of strong binding to actin and  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitivity may increase or decrease depending on the mutation in Tpm, the result of these disorders is the same – muscle weakness. For effective work of the myosin cross-bridges, the passage of a full cycle and the generation of force, not only the strong binding of the myosin heads to actin, but also relaxation is important. The appearance of an abnormally high amount of myosin cross-bridges that form a strong binding form with actin in the ATP hydrolysis cycle at high concentrations of  $\text{Ca}^{2+}$ , as well as the appearance of rigor bridges during



muscle fiber relaxation, can lead to a decrease in muscle contractility, the appearance of rigor, breaks in myofibrils and morphological changes in muscle tissue typical of Cap or DA. On the other hand, the fixation of Tpm near the blocking position causes a decrease in the number of strongly bound cross-bridges essential for the development of muscle tension, which can also lead to a decrease in the contractility of muscle tissue typical of most human congenital myopathies. Our work on identifying the features of the functioning of the contractile system in the presence of various mutations in Tpm is, in our opinion, an important step towards the early and accurate classification of skeletal myopathies and the correct choice of pharmacological agents for the normalization of muscle function. This work was supported by the Russian Science Foundation (grant 17-14-01224).

## **НОВАЯ МОДЕЛЬ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ АТФазного МОЛЕКУЛЯРНОГО МОТОРА**

**Э.А. Касумов, Р.Э. Касумов, И.В. Касумова**

*Научно-производственный центр «КОРВЕТ»,*

*дер. Чулпаново, стр. 1, 2-о Домодедово, Московская обл., Россия*

В живых организмах большинство клеточных АТФ синтезируется молекулярным мотором - FoF<sub>1</sub> АТФ-синтетазой из АДФ и неорганического фосфата (Фн). Предполагается, что [1] АТФ-синтетаза состоит из двух моторов, где роторы обоих двигателей конструктивно связаны друг с другом и вращаются совместно в противоположных направлениях в зависимости от источника энергии. Комплекс F<sub>1</sub> (содержащий субъединицы α<sub>3</sub>, β<sub>3</sub>, γ, ε и δ) является вращательным механохимическим мотором, работающим на основе АТФазной активности и состоящим из оси (γ-субъединицы), которая вращается внутри своего (αβ)<sub>3</sub>-кольцевого статора. (αβ)<sub>3</sub>-кольцо с каталитическим участком, расположенным между тремя α- и β-субъединицами, окружает домен со спирально скрученной γ-субъединицы. Прилегающий домен - «нога» γ-субъединицы прикреплен к с-кольцу из с-субъединиц в Fo. Встроенный в мембрану электромотор - Fo (транспортирующее протон с-кольцо и a, b<sub>2</sub>-субъединицы) использует энергию электрохимического потенциала - ΔμH<sup>+</sup> в качестве источника энергии для вращения с-кольца в противоположном направлении от вращения F<sub>1</sub> мотора. Однако, мы не согласны с тем, что Fo является электромотором, и предлагаем механосмотический механизм синтеза АТФ [2]. Согласно нашей модели АТФ-синтетаза представляет собой Ca<sup>2+</sup>/H<sup>+</sup> - K<sup>+</sup> - Cl<sup>-</sup> -насос-пора-фермент комплексом, в котором γ-субъединица вращается на 360° с шагами 30° и 90° из-за связывания ионов фосфата с положительно заряженными аминокислотными остатками в N-концевой части γ-субъединицы в электрическом поле. Спирально скрученные b<sub>2</sub>-субъединицы, как мы предполагаем, действуют как канат, который укорачивается при связывании ионов фосфата с

положительно заряженными лизинами или аргининами, в результате чего  $\alpha_3\beta_3$ -гексамер притягивается к мембране во время процесса энергизации. АТФ затем синтезируется во время обратного вращения  $\gamma$ -субъединицы при дефосфатизации N-концевой части  $\gamma$ -субъединицы и  $b_2$ -субъединиц под действием ионов  $Ca^{2+}$ , которые перекачиваются из хранилища - межмембранного пространства во время набухания органелл. [Ссылка на анимацию: <http://www.youtube.com/watch?v=PgKoKnVvBi4>].

Следует отметить, что, по нашему мнению, протонирование положительных аминокислотных остатков, их фосфатизация и дефосфатизация могут лежать на основе многих процессов биологической мобильности, включая сокращение мышц. Мы предполагаем, что такой механизм притягивания  $b_2$ -субъединиц к мембране может являться эволюционно самым первым примитивным сократительным механизмом.

### Литература

1. Junge W, Sialaff H, Engelbrecht S (2009) Torque generation and elastic power transmission in the rotary FoF1 – ATPase. Nature 459:364-370
2. Kasumov EA, Kasumov RE, Kasumova IV (2015) A mechano-chemiosmotic model for the coupling of electron and proton transfer to ATP synthesis in energy-transforming membranes: a personal perspective //Photosynthesis Research, Vol. 123, Pp. 1-22.

## A NEW MODEL OF FUNCTIONING OF THE ATPase MOLECULAR MOTOR

E.A. Kasumov, R.E. Kasumov, I.V. Kasumova

*Research and Production Center «KORVET»,*

*Chulpanovo village, building 1, Domodedovo, Moscow region, Russia*

In living organisms, the majority of cellular ATP is synthesized by the molecular motor FoF<sub>1</sub> ATP synthase from ADP and phosphate (Pi). It is assumed that [1] the ATP synthase consists of two motors, where the rotors of both the motors are constructively linked with each other and rotate jointly in opposite directions depending on the energy source. The F<sub>1</sub> complex (comprising subunits  $\alpha_3$ ,  $\beta_3$ ,  $\gamma$ ,  $\epsilon$  and  $\delta$ ) is a rotary mechano-chemical motor powered by ATPase activity and is composed of an axle (the  $\gamma$ -subunit) that rotates within its  $(\alpha\beta)_3$ -ring stator. The  $(\alpha\beta)_3$ -ring, with a catalytic site located between three  $\alpha$ - and  $\beta$ -subunits, surrounds the  $\gamma$ -subunit coiled-coil domain. The adjacent  $\gamma$ -“foot” domain docks to the c-ring of c-subunits in Fo. The membrane-embedded electric motor – F<sub>O</sub> (the proton transporting c-ring and  $a$ ,  $b_2$  subunits) utilizes energy of the electrochemical potential -  $\Delta\mu H^+$  as an energy source to rotate the c-ring in the opposite direction from that powered by the F<sub>1</sub> motor. However, we do not agree that Fo is an electric motor and we offer a mechano-chemiosmotic mechanism of ATP synthesis [2]. According to our model ATP synthase is a  $Ca^{2+}/H^+ - K^+ - Cl^-$  -pump-pore-enzyme complex, in which  $\gamma$ -subunit rotates 360° in steps of 30°, and 90° due to the binding of phosphate ions to positively charged amino acid residues in the N-terminal  $\gamma$ -

subunit in the electric field. The coiled-coil  $b_2$  subunits, as we suggest, act as ropes that are shortened by binding of phosphate ions to positively charged lysines or arginines; this process is suggested to pull the  $\alpha_3\beta_3$ -hexamer to the membrane during the energization process. ATP is then synthesized during the reverse rotation of the  $\gamma$ -subunit by the phosphorylation N-terminal  $\gamma$ -subunit and  $b_2$ -subunits under the influence of  $\text{Ca}^{2+}$  ions, which are pumped over from storage - intermembrane space, during swelling of the organelles. [A link to the animation: <http://www.youtube.com/watch?v=PgKoKnVvBi4>].

It should be noted that, in our opinion, the protonation of positive amino acid residues, their phosphorylation and dephosphorylation may lie on the basis of many processes of biological mobility, including muscle contraction. We assume that such a mechanism of attracting  $b_2$ -subunits to the membrane may be the evolutionary very first primitive contractile mechanism.

### References

1. Junge W, Sielaff H, Engelbrecht S (2009) Torque generation and elastic power transmission in the rotary FoF1 – ATPase. Nature 459:364-370
2. Kasumov EA, Kasumov RE, Kasumova IV (2015) A mechano-chemiosmotic model for the coupling of electron and proton transfer to ATP synthesis in energy-transforming membranes: a personal perspective //Photosynthesis Research, Vol. 123, Pp. 1-22.

## ПОВЫШЕНИЕ УСТОЙЧИВОСТИ КЛЕТОК ОСТРОГО МИЕЛОИДНОГО ЛЕЙКОЗА К ДЕЙСТВИЮ АНТРАЦИКЛИНОВ ПРИ АКТИВАЦИИ ГОМОТИПИЧЕСКОЙ МЕЖКЛЕТОЧНОЙ АДГЕЗИИ

М.И. Кобякова<sup>1</sup>, А.С. Сенотов<sup>1</sup>, Я.В. Евстратова<sup>1</sup>,  
К.С. Краснов<sup>1,2</sup>, В.С. Акатов<sup>1,3</sup>, Р.С. Фадеев<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН,  
Пуццоно, Россия;

<sup>2</sup>Тульский государственный университет, Тула, Россия;

<sup>3</sup>Пуццинский Государственный естественно-научный институт,  
Пуццоно, Россия

В настоящее время одной из основных причин недостаточной эффективности терапии острого миелоидного лейкоза (ОМЛ) считается формирование лекарственной устойчивости у лейкозных клеток. Ранее нами было показано повышение устойчивости клеток острого миелоидного лейкоза при активации гомотипической межклеточной адгезии в многоклеточных структурах (агрегатах) к действию антрациклиновых антибиотиков, таких как доксорубин, эпирубин, идарубин. В данной работе обсуждаются некоторые механизмы, лежащие в основе данного феномена.

В многоклеточных агрегатах клеток ОМЛ не происходит снижение проникновения низкомолекулярных веществ, и повышение лекарственной устойчивости не связано с изменением транспорта веществ в центральную

часть агрегата. В повышении лекарственной устойчивости в многоклеточных агрегатах не принимают участия основные белки множественной лекарственной устойчивости, такие как Р-гликопротеид, MRP1 и BCRP. В свою очередь, в многоклеточных агрегатах происходит активация транскрипционного фактора NF- $\kappa$ B и повышение экспрессии основных антиапоптотических белков Mcl-1, Bcl-2 и XIAP.

Таким образом, полученные результаты указывают на то, что механизм повышения устойчивости у клеток ОМЛ в многоклеточных агрегатах к действию антрациклиновых антибиотиков, может быть связан с активацией транскрипционного фактора NF- $\kappa$ B, с последующей транскрипционной регуляцией экспрессии антиапоптотических белков, таких как Bcl-2, Mcl-1 и XIAP.

## INCREASE RESISTANCE OF ACUTE MYELOID LEUKEMIA CELLS TO ANTHRACYCLINES TREATMENT UPON ACTIVATION OF HOMOTYPIC INTERCELLULAR ADHESION

M.I. Kobyakova<sup>1</sup>, A.S. Senotov<sup>1</sup>, Y.V. Evstratova<sup>1</sup>,  
K.S. Krasnov<sup>1,2</sup>, V.S. Akatov<sup>1,3</sup>, R.S. Fadeev<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>*Institute of Theoretical and Experimental Biophysics RAS,*

*Pushchino, Moscow Region 142290, Russia;*

<sup>2</sup>*Tula State University, Tula, 300012, Russia;*

<sup>3</sup>*Pushchino State Institute of Natural Sciences,  
Pushchino, Moscow Region 142290, Russia*

One of the main causes of low efficiency of the therapy for acute myeloid leukemia (AML) is drug resistance of leukemic cells. Earlier, we showed the increased resistance of acute myeloid leukemia cells upon activation of homotypic intercellular adhesion in multicellular aggregates to anthracycline antibiotics, such as doxorubicin, epirubicin and idarubicin. In this work, we have discussed some mechanisms underlying this phenomenon.

Decrease of small molecular substances penetration does not occur in multicellular aggregates of acute myeloid leukemia cells, and increase in drug resistance is not associated with changes in the transport of substances into the central part of the multicellular aggregate. The main proteins of multidrug resistance, such as P-glycoprotein, MRP1 and BCRP, are not involved in the increase of drug resistance in multicellular aggregates. In turn, the transcription factor NF- $\kappa$ B is activated and the expression of the main anti-apoptotic proteins Mcl-1, Bcl-2 and XIAP is increased in multicellular aggregates.

Thus, the obtained results indicate that the mechanism of increasing resistance of AML cells in multicellular aggregates to anthracycline antibiotics may be associated with the activation of the transcription factor NF –  $\kappa$ B, followed by transcriptional regulation of the expression of antiapoptotic proteins, such as Bcl-2, Mcl -1 and XIAP.

## **ИЗУЧЕНИЕ МЕХАНИЗМОВ ВЛИЯНИЯ ГАЗОТРАНСМИТТЕРОВ И ГИПОКСИИ НА ГЛАДКИЕ МЫШЦЫ**

**И.В. Ковалев, Ю.Г. Бирулина, С.В. Гусакова,  
Л.В. Смаглий, А.В. Носарев, И.В. Петрова,  
В.С. Рыдченко, Т.Н. Зайцева, М.А. Медведев**

*Сибирский государственный медицинский университет, Томск, Московский тракт, 2, Россия*

Наряду с традиционными (ионы кальция, циклические нуклеотиды (ЦН), продукты распада фосфоинозитидов и протеинкиназа С) механизмами регуляции сократительной функции гладкомышечных клеток (ГМК), все чаще рассматривается возможность участия в этом процессе газотрансмиттеров ( $H_2S$ , CO) [1, 2]. Многочисленные данные о зависимости уровня их содержания от ряда физиологических и патологических процессов требуют изучения газотрансмиттеров не только в качестве участников сигнальных звеньев патогенеза, но и возможных перспектив их применения в фармакотерапии [3, 4]. Кроме того, осуществляя свои внутриклеточные эффекты, они подвергаются влиянию парциального давления кислорода. В этом случае, дополнительное вовлечение внутриклеточных сигнальных и эффекторных систем, обусловленное особенностями их собственного влияния на клетки, включая ГМК, может при гипоксии изменяться и быть дополнительным указанием на молекулярные мишени, оперирование которых требует коррекции в первую очередь.

Методом двойного сахарозного моста и механографии изучалось влияние доноров газотрансмиттеров ( $H_2S$  – NaHS и CO – CORM-2) на электрическую и сократительную активность ГМК в норме и в условиях гипоксии. Уровень  $Ca^{2+}$  и ЦН модулировались влиянием на эффекторные системы, отражающие сократительные свойства ГМК: рецепторуправляемый вход  $Ca^{2+}$ , аденилат(АЦ)- и гуанилат(ГЦ)-циклазы, фосфодиэстеразу. Механизмы влияния газомедиаторов и гипоксии на ион-транспортные системы исследовали с помощью блокаторов калиевой проводимости мембраны, ингибиторов  $Na^+$ -зависимых ионообменных систем и модифицированных по ионному составу растворов.

Были обнаружены различия в направленности миогенных эффектов газотрансмиттеров и гипоксии на ГМК сосудов и мочеочника. Так было показано, что активация рецепторуправляемого входа  $Ca^{2+}$  фенилэфрином в клетку усиливала релаксирующее влияние газотрансмиттеров и гипоксии на сосудистые ГМК. Наоборот, угнетение процессов, сопряженных с калиевой и натриевой проводимостью мембраны, ослабляло эти эффекты. Наоборот, ГМК мочеочника отвечали на понижение уровня кислорода увеличением амплитуды сокращения. На фоне возрастания внутриклеточного уровня цАМФ активирующее влияние гипоксии снижалось, но на фоне угнетения калиевой проводимости мембраны при помощи ТЭА цАМФ-зависимые процессы, индуцированные форсколином, активировали

электрическую и сократительную активность гладкомышечных сегментов мочеточника морской свинки.

Влияние уровня ЦН на степень и направленность эффектов газотрансмиттеров на сокращение ГМК, позволяет считать цАМФ- и цГМФ-зависимую калиевую проводимость мембран их непосредственной мишенью. Применение безнатриевого раствора, ингибиторов  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -обмена,  $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$ -котранспорта изменяло направленность сократительных ответов (для CO), либо практически их отменяло (для  $\text{H}_2\text{S}$ ), показывая натрий-зависимый характер влияния газотрансмиттеров на ГМК.

Полученные результаты свидетельствуют о возможности разнонаправленного вмешательства ЦН в миогенные эффекты гипоксии на гладкие мышцы. В отличие от сосудистых гладких мышц, модуляция внутриклеточного уровня ЦН нивелировала активирующее и констрикторное влияние гипоксии на ГМК мочеточника, вызванное увеличением калиевой проводимости мембраны мышечных клеток.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и Томской области в рамках научного проекта № 18-44-700009, РФФИ в рамках научного проекта № 16-34-00419.

#### Литература

1. Гусакова С.В., Ковалев И.В., Бирулина Ю.Г., Смаглий Л.В., Петрова И.В., Носарев А.В., Алейник А.Н., Орлов С.Н. Влияние монооксида углерода и сероводорода на трансмембранный ионный транспорт. *Биофизика*. 2017. Т. 62, вып. 2. С. 290-297.
2. Ковалев И.В., Гусакова С.В., Бирулина Ю.Г., Смаглий Л.В., Медведев М.А., Орлов С.Н., Кубышкин А.В., Носарев А.В. Роль газовых посредников в регуляции функций гладких мышц: вероятные эффекторные системы. *Бюллетень сибирской медицины*. 2014. Т. 13, № 6. С. 139-145.
3. Polhemus D.J., Lefer D.J. Emergence of Hydrogen Sulfide as an Endogenous Gaseous Signaling Molecule in Cardiovascular Disease. *Circ. Res.* 2014. V. 114. P. 730-737.
4. Wilkinson W.J., Kemp P.G. Carbon monoxide: an emerging regulator of ion channels. *J. Physiol.* 2011. vol. 589, № 13, pp. 3055-3062.

#### MECHANISMS OF THE ACTION OF GASOTRANSMITTERS AND HYPOXIA ON SMOOTH MUSCLES

**I.V. Kovalev, Yu.G. Birulina, S.V. Gusakova, L.V. Smagliy, A.V. Nosarev, I.V. Petrova, V.S. Rydchenko, T.N. Zaytseva, M.A. Medvedev**  
*Siberian State Medical University, Tomsk, Moscow Trakt, 2, Russia*

Along with the traditional mechanisms of regulation of the contractile function of smooth muscle cells (SMC) (calcium, cyclic nucleotides, phosphoinositides products and protein kinase C), the participation of gasotransmitters ( $\text{H}_2\text{S}$ , CO) is shown in this process [1, 2]. Numerous data on the dependence of their content on a number of physiological and pathological processes requires

the study of gasotransmitters as participants in pathogenesis signaling units, as well as in the future their use in pharmacotherapy [3, 4]. Through their intracellular effects, they are exposed to oxygen. In this case, the involvement of intracellular signaling and effector systems, due to the peculiarities of their influence on SMC, may change during hypoxia and be an additional indication of molecular targets that require correction.

The effect of donor gasotransmitters ( $H_2S$  - NaHS and CO - CORM-2) on the electrical and contractile activity of the SMC in normal and hypoxic conditions was studied using by the double sucrose bridge method and mechanography. The levels of  $Ca^{2+}$  and cyclic nucleotides were modulated by the action on effector systems that provide the contractile properties of SMC: receptor-operated  $Ca^{2+}$  entry, adenylate (AC) - and guanylate (GC) cyclase, phosphodiesterase. The mechanisms of the effect of gasomediators and hypoxia on ion-transporting systems were investigated using potassium conductivity blockers, inhibitors of  $Na^+$ -dependent ion exchange systems, and solutions modified by ionic composition.

We found differences in the direction of the myogenic effects of  $H_2S$ , CO and hypoxia on the SMC of the vessels and the ureter. We have shown that activation of the receptor-operated  $Ca^{2+}$  entry into the cells by phenylephrine increased the relaxing effect of gasotransmitters and hypoxia on vascular SMC. On the contrary, the inhibition of the processes associated with the potassium and sodium conductivity of the membrane, reduced these effects. With an increase in the intracellular level of cAMP, the activating effect of hypoxia decreased, but with a decrease in the potassium conductivity of the membrane using TEA cAMP-dependent processes activated the electrical and contractile activity of the guinea pig ureter.

The effect of cyclic nucleotides on the action of gasotransmitters on the contraction of SMC allows us to consider cAMP and cGMP-dependent potassium conductivity of membrane as their direct target. The use of a sodium-free solution, inhibitors of  $Na^+/H^+$  exchange,  $Na^+, K^+, 2Cl^-$  cotransport changed the direction of contractile responses (for CO), or eliminated (for  $H_2S$ ). This indicates that the gas transmitters have a sodium-dependent influence on the SMC.

The results suggest the possibility of multidirectional action of cyclic nucleotides on the myogenic effects of hypoxia in smooth muscles. Unlike vascular smooth muscles, the modulation of the intracellular level of cyclic nucleotides eliminated the activating and constricting effect of hypoxia on the ureteral SMC, caused by an increase in the potassium conductivity of the SMC membrane.

The reported study was funded by RFBR and Tomsk Region according to the research project № 18-44-700009, and RFBR according to the research project № 16-34-00419.

## References

1. Gusakova S.V., Kovalev I.V., Birulina Yu.G., Smaglyi L.V., Petrova I.V., Nosarev A.V., Aleinyk A.N., Orlov S.N. The Effects of Carbon Monoxide and Hydrogen Sulfide on Transmembrane Ion Transport Biophysics. 2017. V. 62, N. 2. P. 290-297.

2. Kovalev I.V., Gusakova S.V., Birulina Yu.G., Smaglyi L.V., Medvedev M.A., Orlov S.N., Kubishkin A.V., Nosarev A.V. The role of gasotransmitters in regulating of the functions of smooth muscles: the possible effector systems. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2014. V. 13, N 6. P. 139-145.
3. Polhemus D.J., Lefer D.J. Emergence of Hydrogen Sulfide as an Endogenous Gaseous Signaling Molecule in Cardiovascular Disease. *Circ. Res.* 2014. V. 114. P. 730–737.
4. Wilkinson W.J., Kemp P.G. Carbon monoxide: an emerging regulator of ion channels. *J. Physiol.* 2011. V. 589, N 13. P. 3055-3062.

## **РОЛЬ МИКРОТРУБОЧЕК В ДИНАМИКЕ ФОКАЛЬНЫХ КОНТАКТОВ ПРИ РАСПЛАСТЫВАНИИ ФИБРОБЛАСТОВ**

**А.В. Ковалева<sup>1</sup>, А.В. Творогова<sup>2</sup>, А.А. Саидова<sup>1</sup>, И.А. Воробьев<sup>1,2,3</sup>**

*<sup>1</sup>Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, Москва, Ленинские горы, 1-12, Россия*

*<sup>2</sup>Научно-исследовательский институт физико-химической биологии имени А. Н. Белозерского московского государственного университета, Москва, Ленинские горы, 1-40, Россия*

*<sup>3</sup>Школа наук и технологий, Назарбаев Университет, Астана, проспект Кабанбай Батыра 53, Казахстан*

Динамичные микротрубочки (МТ) играют важную роль в клеточной миграции, поддерживая поляризацию и направленность движения клеток. Предполагается, что динамичные МТ могут напрямую регулировать динамику фокальных контактов.

В эксперименте были проанализированы параметры МТ и фокальных контактов (ФК) в процессе распластывания (с момента прикрепления и в последующие 60 минут) в норме и при подавлении динамической нестабильности МТ сочетанным воздействием 100 нМ нокодазола и 50 нМ таксола. Кинетика распластывания фибробластов ЗТЗ описывается нелинейно, включая быструю и медленную фазы. Под воздействием ингибиторов МТ кинетика распластывания приобретает линейную зависимость (исчезает фаза быстрого распластывания).

Средняя скорость роста плюс-концов МТ (маркерный белок – EB3) в быстрой фазе распластывания составляет  $34.0 \pm 1.40$  мкм/мин и  $48.0 \pm 2.77$  мкм/мин в медленной фазе распластывания. Средняя длина трека МТ в быстрой фазе распластывания –  $4.02 \pm 0.21$  мкм, в медленной –  $5.05 \pm 0.33$  мкм. Под воздействием ингибиторов средняя длина треков составляет  $2.17 \pm 0.23$  и  $2.24 \pm 0.22$  мкм в начале и условном конце фазы распластывания соответственно (конец распластывания совпадает с окончанием съемки и составляет 60 минут). Средние скорости роста плюс-концов МТ составляют в начале и конце распластывания  $16.37 \pm 1.15$  и  $20.67 \pm 2.13$  мкм/мин соответственно. Таким образом, подавление динамической нестабильности МТ



Таблица 1. Стадии существования ФК в норме и при подавлении динамической нестабильности МТ (данные приведены в формате среднее±ошибка среднего)

Параметр	Мелкие ФК		Крупные ФК	
	Контроль	Опыт	Контроль	Опыт
Стадия сборки, мин	5.58±0.76	4.11±0.53	8.58±1.76	7.00±1.75
Стабильное существование, мин	6.27±0.89	3.38±0.55*	5.58±1.33	2.00±0.82*
Стадия разборки, мин	7.79±1.12	7.22±0.66	10.25±1.72	9.13±2.01

\*-статистически достоверные отличия, критерий Манна-Уитни.

приводит к уменьшению продолжительности фазы роста и скорость роста плюс-концов МТ.

Фокальные контакты (ФК) (маркерный белок – винкулин) в распластывающихся фибробластах ЗТЗ динамичны (возникают, растут, уменьшаются и исчезают). ФК были разделены по максимальной площади на мелкие ФК (площадь менее 3 мкм<sup>2</sup>) и крупные ФК с площадью 3 и больше мкм<sup>2</sup>. Площадь крупных ФК всегда больше площади мелких ФК (в 2.3 раза в момент появления,  $p=0.0006$ ; в 2 раза в момент исчезновения,  $p<0.0001$ ). Среднее время жизни крупных и мелких ФК (24.42±3.48 минут и 19.85±1.95 минут соответственно) статистически не отличается. Продолжительности стадий сборки, стабильного существования и разборки крупных и мелких ФК статистически не отличаются.

Максимальное значение интегральной яркость флуоресценции (отражает количество винкулина) соответствует временной точке максимальной площади ФК: как крупные, так и мелкие ФК в момент образования имеют большую площадь и яркость, чем в момент исчезновения. Крупные ФК являются всегда более яркими, чем мелкие ФК. Плотность молекул винкулина в ФК (измерена по средней яркости флуоресценции) минимальна в точке с максимальной площадью, и всегда больше в момент исчезновения, чем в момент появления. При этом плотность мелких ФК всегда больше, чем плотность крупных ФК.

Под воздействием 100 нМ нокодазола и 50 нМ таксола также выделяются 2 группы ФК по площади (мелкие и крупные). В присутствии ингибиторов МТ уменьшается продолжительность стадии стабильного существования как мелких, так и крупных контактов.

Таким образом, динамичные МТ главным образом участвуют в формировании фазы быстрого распластывания и, возможно, задействованы в поддержании стадии стабильного существования ФК.

### Литература

1. Творогова А. В., Воробьев И. А. 2012. Динамические микротрубочки подавляют блэббинг и стимулируют распластывание фибробластов. Цитология, том 54, (10).
2. Kaverina, I., O. Krylyshkina, and J.V. Small. 1999. Microtubule targeting of substrate contacts promotes their relaxation and dissociation. J. Cell Biol.V. 146. P. 1033–1044.
3. Krylyshkina O., Anderson K.I., Kaverina I., Upmann I., Manstein D.J., Small J.V. and Toomre D.K. 2003. Nanometer targeting of microtubules to focal adhesions.1. J Cell Biol V. 161. P. 853-859.

## ROLE OF MT'S IN FOCAL ADHESION DYNAMICS DURING FIBROBLASTS SPREADING

A.V. Kovaleva<sup>1</sup>, A.V. Tvorogova<sup>2</sup>, A.A. Saidova<sup>1</sup>, I.A. Vorobjev<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>*Lomonosov Moscow State University, Moscow, Leninskie Gory, 1-12, Russia*

<sup>2</sup>*A. N. Belozersky Institute of physico-Chemical Biology,  
Moscow, Leninskie Gory, 1-40, Russia*

<sup>3</sup>*School of Science and Technology, Nazarbayev University, Astana Kabanbay  
Batyr ave. 53, Kazakhstan*

Dynamic microtubules (MTs) maintain cell polarization and play a crucial role in targeted cell migration where cell spreading represents its initial stage. MTs are thought to directly regulate focal adhesion dynamics in spreading cells.

The dynamic parameters of microtubules (MTs) and focal adhesions (FAs) were assessed simultaneously in spreading cells (during 60 minutes after attachment). Control cells were compared to cells with suppressed MT dynamic instability (simultaneously treated with 100 nM nocodazole and 50 nM taxol). The process of spreading of 3T3 fibroblasts is normally non-linear and includes the fast and slow spreading phases. MT inhibitors diminish the fast spreading phase and thus promote linear spreading.

Average MT growth speed (assessed by plus-end protein EB3) during fast spreading is  $34.0 \pm 1.40$   $\mu\text{m}/\text{min}$  and  $48.0 \pm 2.77$   $\mu\text{m}/\text{min}$  during slow spreading. Average MT track length is  $4.02 \pm 0.21$   $\mu\text{m}$  during fast spreading and  $5.05 \pm 0.33$   $\mu\text{m}$  during slow spreading. MT inhibitors decrease average MT track length to  $2.17 \pm 0.23$  and  $2.24 \pm 0.22$   $\mu\text{m}$  during initial and late spreading phase respectively (late spreading phase corresponds to 60 minutes after cell attachment time point). Average MT growth speed is  $16.37 \pm 1.15$  and  $20.67 \pm 2.13$   $\mu\text{m}/\text{min}$  during initial and late spreading phase respectively. Thus, suppressing MT dynamic instability decreases the growth phase duration and MT growth speed.

Focal adhesions (FAs) (assessed by vinculin) in spreading 3T3 fibroblasts are dynamic (form, grow, shrink and disappear). FAs were segregated by maximal area into small FAs (area less than 3  $\mu\text{m}^2$ ) and large FAs (area over 3  $\mu\text{m}^2$ ). Large FAs are always larger than small FAs ( $x$  2.3 larger area at formation time,  $p=0.0006$ ;  $x$  2 larger area before disappearing,  $p<0.0001$ ). Average lifespan for large and small FAs is  $24.42 \pm 3.48$  and  $19.85 \pm 1.95$  minutes respectively (the difference is not significant). Durations of formation, stability and shrinkage phases is not significantly different for large and small FAs.

Maximum integral fluorescence intensity (amount of vinculin in FA) corresponds to FA maximum area: both large and small FAs have larger area and fluorescence intensity upon formation than upon disappearing. Large FAs always have higher fluorescence intensity than small FAs. The density of vinculin molecules in FA (measured by the average fluorescence intensity) is minimal at the point with the maximum area, and is always greater at the time of disappearance than at the moment of appearance. In this case, the density of small FAs is always higher than the density of large FAs.

Table 1. FA dynamics in control cells and after treatment with MT inhibitors (mean±SEM).

Parameter	Small FA		Large FA	
	Control	Experiment	Control	Experiment
Assembly, min	5.58±0.76	4.11±0.53	8.58±1.76	7.00±1.75
Stabilization, min	6.27±0.89	3.38±0.55*	5.58±1.33	2.00±0.82*
Disassembly, min	7.79±1.12	7.22±0.66	10.25±1.72	9.13±2.01

\*statistically significant differences, the criterion of Mann-Whitney.

Large and small FAs can be distinguished after 100 nM nocodazole and 50 nM taxol treatment. MT inhibitors decrease the duration of FA stability phases for both groups.

Thus, dynamic MTs mainly participate in fast spreading phase and possibly maintain FA stability phases.

### References

1. Tvorogova A.V., Vorobiev I.A. 2012. Dynamic microtubules suppress blabbing and stimulate fibroblast spreading. *Cytology*, volume 54, (10).
2. Kaverina, I., O. Krylyshkina, and J.V. Small. 1999. Microtubule targeting of substrate contacts promotes their relaxation and dissociation. *J. Cell Biol.* 146. P. 1033–1044.
3. Krylyshkina O., Anderson K.I., Kaverina I., Upmann I., Manstein D.J., Small J.V. and Toomre D.K. 2003. Nanometer targeting of microtubules to focal adhesions.1. *J Cell Biol* V. 161. P. 853-859.

## ВЛИЯНИЕ СЕРДЕЧНОГО МИОЗИН СВЯЗЫВАЮЩЕГО БЕЛКА С НА КАЛЬЦИЕВУЮ РЕГУЛЯЦИЮ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ МИОЗИНА МЕДЛЕННОЙ СКЕЛЕТНОЙ МЫШЦЫ (*M. SOLEUS*) С АКТИНОМ

Г.В. Копылова, С.Р. Набиев, Д.В. Щепкин

*Институт иммунологии и физиологии УрО РАН,  
Екатеринбург, Первомайская, 106, Россия*

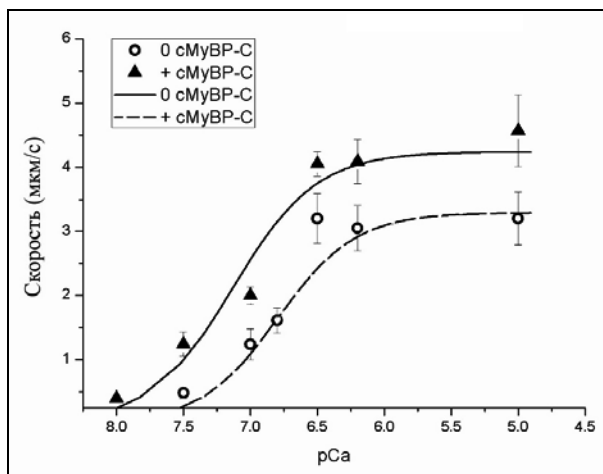
Важная роль в регуляции актин-миозинового взаимодействия в миокарде, кроме тропонина и тропомиозина, принадлежит сердечному миозин-связывающему белку С (сМуВР-С) [1-2]. сМуВР-С имеет стержнеобразную форму длиной 48 нМ и молекулярную массу около 140-150 кДа. Молекула сМуВР-С состоит из 8 иммуноглобулиновых и 3 фиброниктиновых доменов от С0 на N-конце до С10 на С-конце. сМуВР-С взаимодействует с миозином в нескольких местах: С-конец (домены С7-С10) связывает стержневую часть миозина; N-конец (домены С1-С2) – S2 часть миозина, а С0 домен – регуляторную легкую цепь миозина [3]. N-концевые домены (С0-С2) и линкерные участки между ними связывают актин [4]; С1 домен может непосредственно взаимодействовать с тропомиозином [5]. В медленных скелетных мышцах экспрессируется та же самая β-изоформа тяжелых цепей миозина, что и в миокарде. Мы исследовали влияние сМуВР-С на

кальциевую регуляцию взаимодействия миозина медленной скелетной мышцы (*m. soleus*) с актином, используя *in vitro* подвижную систему и оптическую ловушку.

сМуВР-С был получен из куриных сердец [2]. Миозин выделялся из *m. soleus*, актин, тропониновый комплекс и тропомиозин – из *m. psoas* кроликов. Миозин содержал преимущественно медленную изоформу I тяжелых цепей миозина и изоформы легких цепей, соответствующие медленному скелетному миозину. Регулируемые тонкие филаменты были реконструированы из F-актина, тропонинового комплекса и тропомиозина. Эксперименты в *in vitro* подвижной системе проведены как описано ранее [2]. Концентрации миозина и сМуВР-С, загружаемых в проточную камеру, составляли 300 мкг/мл (0,65 мкМ) и 20 мкг/мл (0,13 мкМ), что соответствует их отношению в мышце.

В оптической ловушке обнаружено, что сМуВР-С не влияет на размер шага миозина, но увеличивает продолжительность его взаимодействия с актином в 1.8 раза. В отличие от сердечного миозина [2] сМуВР-С не влияет на коэффициент кооперативности Хилла зависимости рСа-скорость миозина из *m. soleus* и увеличивает скорость скольжения тонких филаментов по миозину из *m. soleus* в *in vitro* подвижной системе: максимальная скорость выросла с  $3.2 \pm 0.2$  мкм/с до  $4.2 \pm 0.2$  мкм/с (рис. 1). сМуВР-С увеличивает кальциевую чувствительность скорости по миозину из *m. soleus* с  $6.80 \pm 0.01$  до  $7.13 \pm 0.08$ , также, как и по сердечному миозину [2].

Таким образом, сМуВР-С оказывает существенное влияние на кальциевую регуляцию взаимодействия миозина из *m. soleus* с актином, а также



**Рис. 1.** Влияние сМуВР-С на кальциевую зависимость скорости скольжения тонких филаментов по миозину, выделенному из медленной скелетной мышцы (*m. soleus*). Скорость представлена как среднее значение  $\pm$  стандартное отклонение по трем экспериментам. Линия регрессии соответствует уравнению Хилла.

продолжительность актин-миозинового взаимодействия. Эффект сМуВР-С на кальциевую регуляцию взаимодействия сердечного миозина и миозина из *m. soleus* с актином различаются, что может объясняться отличием изоформного состава легких цепей этих миозинов, с которыми связывается С0 домен сМуВР-С [3].

Работа выполнена при поддержке РФФИ (грант №18-04-00122) и Программы АААА-А18-118020590135-3 с использованием оборудования ЦКП ИИФ УрО РАН.

### Литература

1. Saber, W. *et al.* (2008) *J. Mol. Cell. Cardiol.* **44** 1053-1061.
2. Shchepkin, D.V. *et al.* (2010) *Biochem Biophys Res Commun.* **401**, 159-163.
3. Starr, R., Offer, G. (1978) *Biochem. J.* **171**, 813-816.
4. Squire, J.M., Luther, P.K., Knupp, C. (2003) *J. Mol. Biol.* **331**, 713-724.
5. Harris, S.P. *et al.* (2016). *Proc Natl Acad Sci U S A.* **113(6)**, 1558-63.

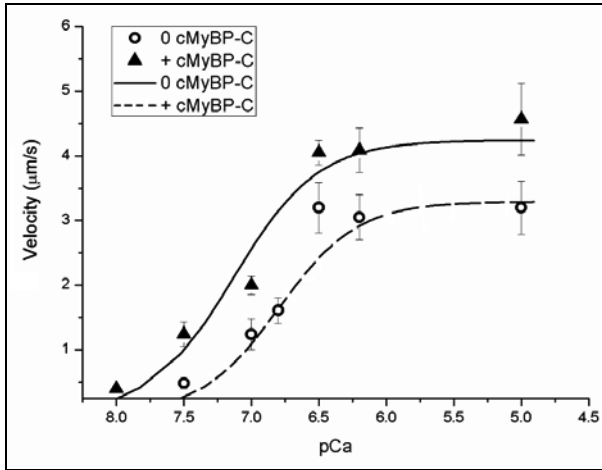
## EFFECT OF THE CARDIAC MYOSIN BINDING PROTEIN C ON THE CALCIUM REGULATION OF THE INTERACTION OF MYOSIN FROM SLOW SKELETUS MUSCLE (*M. SOLEUS*) WITH ACTIN

G.V. Kopylova, S.R. Nabiev, D.V. Shchepkin

*Institute of Immunology and Physiology of the RAS,  
Yekaterinburg, St. Pervomayskaya, 106, Russia*

Except troponin and tropomyosin, cardiac myosin-binding protein C (сМуВР-С) plays an important role in the regulation of the actin-myosin interaction in the myocardium [1-2]. сМуВР-С has a rod-like shape 48 nm in length and a molecular weight of 140-150 kDa. The сМуВР-С molecule consists of 8 immunoglobulin and 3 fibronectin domains from C0 at the N-terminus to C10 at the C-terminus. сМуВР-С interacts with myosin in several sites: the C-terminus (C7-C10 domains) binds the rode of myosin; the N-terminus (C1-C2 domains) binds the S2 part of myosin, and the C0 domain interacts with the regulatory light chain of myosin [3]. N-terminal domains (C0-C2) and linker sites between them bind actin [4]. The C1 domain can directly interact with tropomyosin [5]. In the slow skeletal muscles, the same  $\beta$ -isoform of the myosin heavy chain is expressed as in the myocardium. We studied the effect of сМуВР-С on the calcium regulation of the interaction of myosin from slow skeletal muscle (*m. soleus*) with actin, using an *in vitro* motility assay and an optical trap.

сМуВР-С was obtained from chicken hearts [2]. Myosin was extracted from *m. soleus*, actin, troponin complex and tropomyosin was obtained from *m. psoas* of the rabbits. Myosin contained predominantly the slow isoform I of the myosin heavy chains and the isoforms of the light chains corresponding to slow skeletal myosin. Regulated thin filaments were reconstructed from F-actin, the troponin complex and tropomyosin. Experiments in the *in vitro* motility assay were carried out as previously described [2]. The concentrations of myosin and



**Fig 1.** Effect of cMyBP-C on the calcium dependence of the sliding velocity of thin filaments over myosin from slow muscle (*m. soleus*). Each data point represents mean  $\pm$  SD from three experiments. Data are fitted to the Hill equation.

cMyBP-C loaded into the flow cell were 300  $\mu\text{g/ml}$  (0.65  $\mu\text{M}$ ) and 20  $\mu\text{g/ml}$  (0.13  $\mu\text{M}$ ) that corresponds to their ratio in muscle.

In the optical trap, it was found that cMyBP-C does not affect the step size of myosin, but increases the duration of its interaction with actin by 1.8 times. In contrast to cardiac myosin [2], cMyBP-C does not affect the Hill coefficient of the *pCa*-velocity relationship of myosin from *m. soleus* and increases the sliding velocity of thin filaments over myosin from *m. soleus* in the *in vitro* motility assay: the maximal sliding velocity increases from  $3.2 \pm 0.2$   $\mu\text{m/s}$  to  $4.2 \pm 0.2$   $\mu\text{m/s}$  (Fig. 1). cMyBP-C increases the calcium sensitivity of the filament sliding velocity over myosin from *m. soleus* from  $6.80 \pm 0.01$  to  $7.13 \pm 0.08$ , as well as over cardiac myosin [2].

Thus, cMyBP-C has a significant effect on the calcium regulation of the interaction of myosin from *m. soleus* with actin, as well as the duration of the actin-myosin interaction. The effect of cMyBP-C on the calcium regulation of the interaction of cardiac myosin and myosin from *m. soleus* is different. This can be explained by the difference in the isoform composition of the myosin light chains, to which the C0 domain of cMyBP-C interacts [3].

This work was supported by RFBR (№18-04-00122) and Program AAAA-A18-118020590135-3 and performed using the equipment of SRC IIP UrB RAS.

### References

1. Saber, W. *et al.* (2008) *J. Mol. Cell. Cardiol.* **44** 1053-1061.
2. Shchepkin, D.V. *et al.* (2010) *Biochem Biophys Res Commun.* **401**, 159-163.
3. Starr, R., Offer, G. (1978) *Biochem. J.* **171**, 813-816.
4. Squire, J.M., Luther, P.K., Knupp, C. (2003) *J. Mol. Biol.* **331**, 713-724.
5. Harris, S.P. *et al.* (2016). *Proc Natl Acad Sci U S A.* **113**(6),1558-63.

# ВЛИЯНИЕ $Tl^+$ НА СПОНТАННОЕ СОКРАЩЕНИЕ СЕРДЕЧНОЙ МЫШЦЫ И НА ЭНЕРГЕТИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ В МИТОХОНДРИЯХ КАРДИОМИОЦИТОВ

С.М. Коротков, В.П. Нестеров, К.В. Соболев

*Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН;  
Санкт-Петербург, Тореза 44, Россия*

$^{201}Tl$  является радиофармакологическим препаратом, наиболее апробированным в оценке жизнеспособности и перфузии миокарда при использовании компьютерной томографии [1]. Однако таллий и его соединения высокотоксичны. Тяжесть токсического поражения зависит от дозы, времени экспозиции, скорости абсорбции таллия, возраста и индивидуальной чувствительности. Учитывая высокую абсорбционную способность таллия в миокарде, его широкое использование в медицинской практике, в частности в клинической кардиологии, мы исследовали влияние таллия на спонтанные сокращения миокарда лягушки.

Исследовано инотропное действие ионов  $Tl^+$  на сердечную мышцу лягушки *Rana Ridibunda*. Кроме того, изучено действие  $Tl^+$  на дыхание митохондрий сердца крысы (МСК), находящихся в различных энергетических состояниях, и потенциал их внутренней мембраны в условиях избытка  $Ca^{2+}$  и  $Na^+$  во внешней среде. Методика описана в [2].

Препараты из сердца лягушки представляли собой сегменты предсердий, используемых для спонтанных сокращений [3]. Установлено, что ионы  $Tl^+$  в концентрации 2,5 мМ в растворе Рингера снижали амплитуду спонтанных сердечных сокращений ( $F_{max}$ ) на 15  $\square$  2% ( $n = 3$ ). При этом значительно увеличивался период полурасслабления на 47  $\square$  5%, что свидетельствует о снижении удаления кальция из цитозоля. Кроме того, во всех экспериментах было обнаружено дозозависимое урежение ритма сердечных сокращений. Частота сокращения при данной концентрации  $Tl^+$  уменьшалась на 39  $\square$  6%. При отмывании препарата нормальным раствором Рингера наблюдали некоторое восстановление амплитуды сокращения. Однако отрицательный хронотропный эффект не исчезал. Полученные данные свидетельствуют о том, что  $Tl^+$  оказывает отрицательное инотропное и хронотропное действие на миокард.

Не исключено, что отрицательный инотропный эффект  $Tl^+$  мог быть обусловлен не только его конкурентным действием на кальциевые каналы плазматической мембраны, но и влиянием на кальциевые транспортеры митохондрий кардиомиоцитов. В этой связи представлялось важным определить влияние  $Tl^+$  на энергетическое состояние митохондрий и установить его действие на дыхание МСК, находящихся в состоянии 3 по Чансу (АДФ и субстрат в среде) или разобщенных 2,4-динитрофенолом (ДНФ) в условиях избытка  $Ca^{2+}$  и  $Na^+$  во внешней среде. Было обнаружено, что  $Tl^+$  увеличивал транспорт ионов  $Na^+$  в митохондрии через внутреннюю мембрану. Нагрузка МСК кальцием в среде с 25-75 мМ  $TiNO_3$  и 125 мМ  $NaNO_3$

стимулировала открытие в их мембране кальций-зависимой поры, что приводило к заметному снижению потенциала их внутренней мембраны. Эти эффекты  $\text{Ca}^{2+}$  заметно снижались в присутствии специфических ингибиторов поры - циклоспорина А и АДФ.

Полученные данные важны для лучшего понимания механизмов повреждающего действия  $\text{Tl}^+$  на  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимые процессы в миокарде позвоночных. Предполагается, что индуцируемая ионами  $\text{Tl}^+$  кальциевая перегрузка клеток сердца может вносить свой вклад в токсическое действие  $\text{Tl}^+$  на миокард.

Исследования по определению митохондриального потенциала проводили на базе Центра коллективного пользования в ИЭФБ РАН. Работа выполнена в рамках государственного задания ФАНО России (тема № АААА-А18-118012290142-9).

### Литература

1. A. L. Baggish and C. A. Boucher. *Circulation*. 2008, 118 (16), 1668.
2. С. М. Коротков и др. *Биологические мембраны*. 2018, том 35, № 3, с. 200–207.
3. Соболев К.В., Коротков С.М., Нестеров В.П. *Биофизика*. 2014, 59 (5), 959–966.

### EFFECT OF $\text{Tl}^+$ ON SPONTANEOUS CONTRACTION OF THE HEART MUSCLE AND ON THE ENERGY PROCESSES IN THE HEART MYOCYTE MITOCHONDRIA

S.M. Korotkov, V.P. Nesterov, K.V. Sobol

*Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, RAS, St. Petersburg, Thorez 44, Russia.*

$^{201}\text{Tl}$  is the radiopharmaceutical preparation, the most used in assessing the viability and perfusion of myocardium using computer tomography [1]. However, thallium and its compounds are highly toxic. The severity of toxicity depends on the dose, the duration of the exposure, the rate of absorption of thallium, the age and the individual sensitivity. Considering the high absorption of thallium in the myocardium, its widespread use in medical practice, in particular in clinical cardiology, we examined the effect of thallium on the spontaneous contractions of myocardium of the frog.

The inotropic action of  $\text{Tl}^+$  ions on the heart muscle contraction of the frog *Rana Ridibunda* was examined. In addition, the effect of  $\text{Tl}^+$  on respiration of rat heart mitochondria (RHM) at different energy states and the inner membrane potential under conditions of an excess of  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Na}^+$  into a medium were studied. Method was described in details [2].

Preparations from the heart of the frog presented by the atrium segments were used for spontaneous contractions [3]. It was shown that  $\text{Tl}^+$  ions at a concentration of 2.5 mM in the Pinger solution reduced the amplitude of spontaneous contractions (Fmax) by 15 □2% (n = 3). At the same time, the period of half relaxation was significantly increased by 47 □5%, which indicates a decrease in the removal of calcium from the cytosol. In addition, in all the experiments, a



dose-dependent reduction of heart rate contraction was observed. The frequency of contraction at a given  $\text{TI}^+$  concentration was decreased by 39–6%. After washing the preparation with the normal Pinger solution, a certain increase in the amplitude of contraction was observed. However, the negative chronotropic effect did not disappear. These data indicate that  $\text{TI}^+$  has a negative inotropic and chronotropic action on the myocardium.

In this connection, it was important to test the effect of  $\text{TI}^+$  on the mitochondrial energetic state and to establish effect of  $\text{TI}^+$  on state 3 or 2,4-dinitrophenol-uncoupled respiration of RHM under  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Na}^+$  excess into the medium. It was found that  $\text{TI}^+$  increased  $\text{Na}^+$  transport into mitochondria across the inner membrane. Calcium load of RHM, injected into the medium containing 25–75 mM  $\text{TiNO}_3$  and 125 mM  $\text{NaNO}_3$ , did stimulate the permeability transition pore (MPTP) opening in the inner membrane that led to a visible decrease in the inner membrane potential. These effects of  $\text{Ca}^{2+}$  were decreased markedly in the presence of specific MPTP inhibitors, cyclosporine A and ADP.

The data obtained are important for a better understanding of the mechanisms of toxic action of  $\text{TI}^+$  on  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent processes in the myocardium of the vertebrae. Calcium overload of cardiac cells induced by  $\text{TI}^+$  ions is supposed to play some action in toxic action of  $\text{TI}^+$  on the myocardium. Studies on the mitochondrial potential were carried out on the basis of the Center for Collective Use in the IEPH RAS. The work was supported by the Federal Agency for Scientific Organizations of Russia (topic no. AAAA-A18-118012290142-9).

### References

1. A. L. Baggish and C. A. Boucher. *Circulation*. 2008, 118 (16), 1668.
2. S. Korotkov et al. *Biological membranes*. 2018, Vol. 35, No. 3, p. 200–207.
3. Sobol K.V., Korotkov S.M., Nesterov V.P. *Biophysics*. 2014, 59 (5), 959–966.

## ЭЛЕКТРОСТИМУЛЯЦИЯ МЫШЦ В УСЛОВИЯХ СНИЖЕННОЙ АКТИВНОСТИ И ЕЕ ВЛИЯНИЕ НА АРХИТЕКТУРУ И ФУНКЦИЮ

Ю.А. Коряк

Институт медико-биологических проблем РАН, Москва, Хорошевское ш., 76-а, Россия

Общеизвестный факт воздействия микрогравитации — это снижение сократительных свойств мышц и активности тонической мускулатуры [Kozlovskaya et al., 1988; Vachl et al., 1997; Koryak, 2003]. Наибольшему действию микрогравитации подвергаются мышцы-разгибатели бедра и особенно стопы [Григорьева, Козловская, 1983; LeBlanc et al., 1988; Akima et al., 2002], вероятно из-за большей механической нагрузки их в условиях Земли. Более того, отмечается непропорционально большая потеря силы сокращения мышцы по сравнению с ее размером [Kawakami et al., 2001], указывая тем

самым, что кроме атрофии существенный вклад в «слабость» мышцы вносят другие факторы. Важным детерминантом функциональных характеристик мышцы является ее внутренняя архитектура [Gans, Bock, 1965; Alexander, Vernon, 1975; Fukunaga et al., 1992]. Архитектура мышцы человека может быть изучена в условиях *in vivo* в реальном времени как в условиях покоя, так и во время сокращения мышцы, используя ультразвуграфию (Kawakami et al., 1993; Kuno, Fukunaga, 1995). ЭСТ, как метод повышения функциональных возможностей скелетных мышц у человека, занимает особое место и широко используется в клинике (Бредикас, 1979; Kern et al., 2005), в системе подготовки спортсменов [Коц, 1971; Selkowitz, 1985; Коряк, 1993; Коруяк, 1995]. Целью настоящего исследования было изучить изменения архитектуры медиальной икроножной (МИМ), латеральной (ЛИМ) икроножных мышц и камбаловидной (КМ) мышцы в условиях механической разгрузки с применением электростимуляции (ЭСТ). В исследовании приняли участие группа мужчин без симптомов заболеваний мышечно-скелетной системы. В качестве модели, имитирующей микрогравитацию, использовали «сухую» водную иммерсию (ИМ) [Шульженко, Виль-Вильямс, 1976] длительностью 7 суток. ЭСТ мышц передней и задней поверхности нижних конечностей проводили с использованием стимуляторов («СТИМУЛ НЧ-01», Россия), генерирующих двухполярные симметричные прямоугольные электрические импульсы длительностью 1 мс, частотой 25 Гц и амплитудой до 45 В в режиме 1 с сокращение и 2 с пауза. ЭСТ выполнялась на протяжении 6 суток по 3 часа в день с применением «сухих» электродов («Axelgaard», USA). Максимальный суставной момент (максимальная произвольная сила — МПС), развиваемый трехглавой мышцей голени (ТМГ), регистрировали на изокинетическом динамометре («Biodex», USA). Для определения архитектуры МИМ, ЛИМ и КМ использовали В-режим изображения ультразвуковой системы «SonoSite MicroMaxx» (USA) линейным электронным датчиком 7.5 МГц и апертурой 60 мм. Визуализация осуществлялась в условиях покоя (пассивное состояние) и при усилении 50 % МПС (активное состояние) с нейтральной угловой позицией ( $\sim 90^\circ$ ) в коленном и голеностопном суставах. По сонограммам определялись длина ( $L$ ) и угол ( $\theta$ ) наклона волокон [Kawakami et al., 1993; Fukunaga et al., 1997]. Ультразвуковые изображения обрабатывались с использованием пакета программы «Dr. Reallyvision» (ООО «Альянс-Холдинг», Россия). После ИМ МПС ТМГ увеличилась в среднем на 11 %. В пассивном состоянии  $L$  волокон МИМ, ЛИМ и КМ уменьшилась на 12, 13 и 13 %, а при усилении 50 % МПС — на 18, 22 и 21 %;  $\theta$  наклона волокон при пассивном состоянии уменьшился на 22, 20 и 16 %; а при активном состоянии — на 17, 22 и 17 %, соответственно. Таким образом, ЭСТ мышц в условиях ИМ способствует увеличению МПС мышц, тогда как отсутствие тренировочных мероприятий приводит к снижению МПС более чем на 30 % [Коруяк, 2001; Коряк, 2006]. Снижение  $L$  и  $\theta$  наклона мышечных волокон указывает, по-видимому, на потерю не только последовательно расположенных, но и параллельно расположенных саркомеров, что отразится на

взаимоотношения *сила—длина* и *сила—скорость*. Уменьшение числа последовательно соединенных саркомеров способствует снижению величины развиваемого мышечного сокращения [Tabary et al., 1972; Narici et al., 1998]. Меньший  $\theta$  наклона волокон во время сокращения мышцы после ИМ, по-видимому, частично компенсирует потерю силы, благодаря более эффективной передаче силы от волокон к сухожилию. Увеличение МПС позволяет предположить, что ЭСТ в условиях ИМ является дополнительным афферентным раздражителем [Мартьянов, Коряк, 1973], повышая центральную роль в поддержании активности систем управления произвольными движениями. Повышенная корковая возбудимость стимулирует ЦНС [Heckman et al., 2005], облегчая корковую активность при произвольной активации мышц. Из приведенных результатов следует, во-первых, что архитектура разных головок ТМГ значительно различается, отражая, вероятно, их функциональные роли, во-вторых, различные изменения  $L$  и  $\theta$  наклона между мышцами, возможно, связаны с различиями в силовых и упругих характеристиках сухожилий или мышечно-сухожильного комплекса и, наконец, в-третьих, ЭСТ-тренировка, в целом, оказывает профилактическое действие на стимулируемые мышцы: частично уменьшает потерю силы мышц, вызванную длительной разгрузкой.

## ELECTROSTIMULATION IN CONDITIONS OF MICROGRAVITATION AND ITS INFLUENCE ON ARCHITECTURE AND FUNCTION OF HUMAN MUSCLE

**Yu. Koryak**

*Institute of Biomedical Problems RAS,  
Moscow, Khoroshevskoye Shosse 76-a, Russia*

Studies simulating microgravity have shown that exercise countermeasures can attenuate, but not completely prevent the loss of muscle mass and force [Koryak, 2000; Kawakami et al., 2001]. The muscle groups most affected by exposure to microgravity appear to be the antigravity extensors of the knee and ankle [Grigor'eva, Kozlovskaya, 1983; Akima et al., 2001]. Most notable after exposure to microgravity is a disproportionate loss of force as compared to that of muscle size [Kawakami et al., 2001], indicating that factors other than atrophy contribute to muscle weakness. The internal architecture of a muscle is an important determinant of its functional characteristics. The purpose of the present study was to investigate the internal architecture of the triceps surae [medial (GM) and lateral (LG) and soleus (SOL) muscles] in relation to the functional characteristics of the plantar-flexors after 7 days of «dry» water immersion (DI) with exercise countermeasures [neuromuscular electrical stimulation (NMES)]. To simulate microgravity the DI model has been used [Shulzhenko, Vil-Villiams, 1976]. Six healthy males aged 20 to 24 years ( $22.3 \pm 0.6$ ) volunteered for the study. Their average height and mass were  $1.78 \pm 0.4$  m, and  $78.3 \pm 3.4$  kg, respectively. NMES is applied to 4 muscle groups of both lower extremities. «Dry» electrodes (Ltd. «Axelgaard», USA) are

placed on the skin above the quadriceps femoris muscles, the hamstrings, the tibialis anterior, the peroneal, and the triceps surae muscles. The synchronous stimulation of antagonistic muscle groups prevents unwanted joint movements. The electrical stimulus was provided by the «STIMUL LF-1» stimulator (Russia). The technical equipment consists of electrode trousers carrying stimulation electrodes for the 12-channels, and 2 interconnected 6-channel stimulators carried on a belt. NMES-training of muscles of the examinee was carried out directly in a bath. The intensity level stimulation is determined by a threshold of bearableness of subjects. NMES-training continued for six days, during which daily five days on end (from Monday to Friday inclusive) including one day of rest (Saturday). Duration of NMES-training was 3 hours per day with 1 s « on » and 2 s « off » trains at intensity levels of 20-30 % of maximum tetanic force and with a frequency of 25 Hz and amplitude of stimulus from 0 up to 45 V for training. Used biphasic rectangular by 1 ms pulse width. Each subjects instructed "*increase amplitude stimulation pulse during training*". Subjects performed of the plantar flexors on the isokinetic dynamometer («Biodex», USA) at ankle angles of 0° (neutral ankle position) following instructions to "*push down as if you were pressing a gas pedal, increase force to a maximum*" with the subsequent measurement of the maximal torque moment (maximum voluntary isometric contraction — MVIC). Each subject performed between two and four MVICs. There was a 1-min rest between the set. The MVIC was determined as the highest value of voluntary force recorded during the entire contraction. A real-time B-mode ultrasound apparatus ("SonoSite" MicroMaxx, USA) with a 7.5 MHz linear-array probe was used to obtain sagittal images of the GM, GL and SOL at rest and at 50 % of plantarflexor MVIC at the neutral ankle position. The fascicle pennation angle ( $\theta$ ) was measured from the angles between the echo of the deep aponeurosis of each muscle and interspaces among the fascicles of that muscle. The length of fascicles ( $L$ ) across the deep and superficial aponeurosis was measured as a straight line [Abe et al., 2000]. After DI with by NMES-training, maximal plantar flexion torque by three subjects has increased on the average by 11.3 % and at one has decreased for 9.6 %. After DI, in the passive condition,  $L$  fibres in the MG, and LG, and SOL has decreased for 12, 13, and 13 % but in the active condition by 18, 22, and 21 %, respectively.  $\theta$ , in the passive condition, was decreased by 22, 20 and 16%; but in the active condition by 17, 22 and 17 %, respectively. After DI a considerable increased of force, was observed in the exercise groups whereas absence of preventive actions results in reduction in MVIC more than on 30 % (Koryak, 1996-2006). Efficacy of NMES-training for increased the contractile properties of skeletal muscles during unweighting has been suggested in previous studies [Mayr et al., 2000; Koryak et al., 2002]. NMES may lead to a reorganization of brain structures and descending motor outputs. It is known that afferent stimulation implicated in a focal increase of motor cortical excitability of the trained muscle [Ridding et al. 2000]. In a recent study, Khaslavskaja and Sinkjaer (2005) demonstrated that motor evoked potentials of the muscle (tibialis anterior) elicited after the training were increased in conditions rest by 38%. Thus, increasing cortical excitability of the triceps surae muscle, stimulating CNS further at voluntary activation triceps surae muscle would

facilitate cortical activity, as well as it is shown in this study. Both  $\Theta$  and  $L$  were reduced after DI, this strongly suggests a loss of both in-series and in-parallel sarcomeres, respectively. The loss of in-series sarcomeres would mean that this is likely to have implications both on the *force-length* and *force-velocity* relationships of the muscle. The observation of a smaller  $\Theta$  during contraction after DI will partially compensate for the loss of force, because of a more efficient force transmission to the tendon. The reduced initial resting  $\Theta$  probably, grows out reduction decreased tendon stiffness or of the muscle-tendon complex [Kubo et al., 2000].

## **СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ КОНЦЕВЫХ ПЛАСТИНОК ПРИ РАЗЛИЧНЫХ ФОРМАХ НАРУШЕНИЯ ДВИГАТЕЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ**

**В.В. Кравцова, Е.А. Сабурова, И.И. Кривой**

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

Моторная концевая пластинка представляет собой высокоспециализированную область сарколеммы, лежащую непосредственно под двигательным нервным окончанием и характеризующуюся высокой плотностью распределения никотиновых холинорецепторов (нХР). Важнейшими факторами надежности и пластичности нервно-мышечной передачи являются структурная организация концевой пластинки и ее электрогенез. Ультраструктура концевой пластинки существенно зависит от двигательной активности. Снижение двигательной активности сопровождается изменением площади концевых пластинок и усилением фрагментации в распределении нХР. Среди различных механизмов поддержания мышечного электрогенеза и сократительной функции важнейшую роль играет активность Na,K-АТФазы. В скелетных мышцах ко-экспрессируются альфа1- и альфа2-изоформы каталитической альфа-субъединицы Na,K-АТФазы. Хорошо известно, что самые разнообразные формы усиления двигательной активности характеризуются ростом общего количества Na,K-АТФазы в сарколемме скелетных мышечных волокон; длительное снижение двигательной активности вызывает противоположный эффект. Исследование самых начальных этапов двигательной разгрузки показало, что нарушения функционирования Na,K-АТФазы относятся к наиболее ранним событиям, предшествующим мышечной атрофии, вызванной двигательной дисфункцией. Перспективными для изучения изоформ-специфичности функционирования и регуляции Na,K-АТФазы в скелетной мышце могут быть экспериментальные модели различных форм нарушений двигательной активности.

Наша работа проведена на диафрагмальной и камбаловидной мышцах мышечных линий Vla/J и mdx, мышцы C57Bl/6 были использованы в качестве контрольных. Мыши Vla/J являются одной из моделей дисферлинопатий, развивающихся при дефиците дисферлина, ключевого белка мультимолекулярного комплекса, ответственного за процессы восстановления

целостности сарколеммы при сократительной активности. Мыши mdx являются лабораторной моделью миодистрофии Дюшенна, вызываемой утратой связи между цитоскелетом, дистрофингликановым комплексом и белками внеклеточного матрикса вследствие снижения синтеза белка дистрофина. Таким образом, эти модели хронических нарушений двигательной активности принципиально отличаются по молекулярным механизмам их развития. Кроме того, в качестве модели кратковременного нарушения двигательной активности в камбаловидной мышце был использован метод вывешивания задних конечностей крысы в течение 1 – 3 суток.

Все исследованные мышцы, в зависимости от модели двигательных нарушений, характеризовались различным уровнем изменений фрагментации концевых пластинок и их площади, а также плотности распределения nXP в мембране. Однако все мышцы демонстрировали сходное снижение плотности распределения в мембране альфа2-изоформы Na,K-АТФазы. Предположительно, нарушение мембранной локализации этого транспортного белка является результатом адаптационных перестроек в скелетной мышце в условиях двигательной дисфункции.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФ № 18-15-00043.

## **THE STRUCTURAL AND FUNCTIONAL CHARACTERISTICS OF THE ENDPLATES UNDER DIFFERENT FORMS OF MOTOR ACTIVITY DISORDER**

**V.V. Kravtsova, E.A. Saburova, I.I. Krivoi**

*St. Petersburg State University, St. Petersburg, University emb., 7/9, Russia*

The motor endplate is a highly specialized sarcolemma region that lies just below the motor nerve terminal and is characterized by a high density of distribution of nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs). The most important factors of reliability and plasticity of neuromuscular transmission are the structural organization of the endplate and its electrogenesis. The ultrastructure of the endplate is highly dependent on motor activity. A decrease in motor activity is accompanied by a change in the area of the endplates and increased fragmentation in the distribution of nAChRs. Among different mechanisms involved in maintaining skeletal muscle electrogenesis and contractile function, the activity of Na,K-ATPase plays a crucial role. In the skeletal muscles, the alpha1 and alpha2 isoforms of Na,K-ATPase are co-expressed. It is well known that increase in the motor activity is characterized by an increase in the Na,K-ATPase abundance in the sarcolemma of skeletal muscle fibers while a prolonged decrease in the motor activity causes the opposite effect. The study of initial changes during muscle unloading demonstrated that functional disturbances of the Na,K-ATPase are among the earliest events preceding the muscle atrophy caused by motor dysfunction. The experimental models of various forms of disturbances in motor activity will be important for studies of function and regulation of different isoforms of the Na,K-ATPase in the skeletal muscles.

Our study is carried out on the diaphragm and soleus muscles of Bla/J and mdx mice lines, C57Bl/6 mice were used as control. The mice of the Bla/J line are one of the models for dysferlinopathy induced by a deficiency of dysferlin, the key protein of multimolecular complex responsible for the repair of the integrity of sarcolemma during contractile activity. The mice of the mdx line are the laboratory model of Duchenne muscular dystrophy, caused by loss of integrity between the cytoskeleton, the dystrophin-glycoprotein complex, and extracellular matrix proteins due to decreased synthesis of dystrophin protein. So, these models of chronic disturbances of motor activity differ fundamentally in their molecular mechanisms. In addition, the method of hind limb suspension of the rat during 1 – 3 days was used as a model of short-term disorder of motor activity in soleus muscles.

All studied muscles were characterized by different level of changes in the endplate fragmentation and their area, as well as the density of the membrane distribution of nAChRs, depending on the model of motor activity disorder used. However, all muscles demonstrated similar decrease in the density of the membrane distribution of alpha2 isoform of the Na,K-ATPase. Presumably, impaired membrane localization of this transport protein is resulted from adaptive skeletal muscle remodeling following motor dysfunction.

This work was supported by RSF Grant #18-15-00043.

## **МИКРОЭЛЕКТРОДНОЕ КАРТИРОВАНИЕ ИЗОЛИРОВАННОГО СЕРДЦА КРЫСЫ ПОСЛЕ ПЕРЕНЕСЕННОГО ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ИНФАРКТА МИОКАРДА**

**И.В. Кубасов, М.Г. Добрецов, П.П. Вдовкин, А.А. Панов**

*Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН,  
Санкт-Петербург, пр. Тореза, 44, Россия*

В ряде наших последних исследований было показано, что использование внеклеточной микроэлектродной регистрации (loose patch метод) представляет собой перспективный неинвазивный метод исследования электрогенной активности скелетных мышц и кардиомиоцитов в составе интактных препаратов (1, 2). В частности, нами было показано, что указанный метод позволяет эффективно регистрировать электрогенез в виде внеклеточных потенциалов действия (ПД) в функционально различных компартментах кардиомиоцитов (в Т-системе и наружной плазматической мембране) желудочков изолированного сердца крысы. При использовании микроэлектродов стандартного диаметра 5 мкм от кардиомиоцитов желудочков изолированного сердца регистрируются многофазные ПД, у которых вторая, негативная и наиболее выраженная фаза, как правило, состоит из двух пиков, завершающихся фазой медленного спада (поздней деполяризации) (2). Фармакологический анализ природы этих сигналов дает основания полагать, что первый негативный пик обусловлен активацией натрия

евых токов наружной плазматической мембраны, тогда как последующий негативный пик и фаза поздней деполяризации обусловлены, соответственно, активацией кальциевых токов и натрий-кальциевого обменника Т-системы кардиомиоцитов.

Известно, что, по сравнению с желудочками сердца, в кардиомиоцитах предсердий сердца крысы Т-система выражено слабо. В согласии с этим, в данной работе на препаратах изолированного и ретроградно перфузируемого сердца крысы мы наблюдали выраженное различие формы внеклеточно регистрируемых ПД предсердных и желудочковых кардиомиоцитов. Эти различия заключались в менее выраженном втором пике и в отсутствии, характерной для большинства внеклеточных ПД желудочковых миоцитов, фазы поздней позитивной фазы ПД предсердных миоцитов.

Ряд авторов полагает, что входящий кальциевый ток и ток натрий-кальциевого обменника в значительной степени может изменяться при ремоделировании Т-системы кардиомиоцитов, сопутствующем сердечной недостаточности (3, 4). Для проверки этого предположения нами было выполнено внеклеточное электрофизиологическое картирование левого желудочка и предсердий изолированного сердца крысы через 3 месяца после экспериментального инфаркта миокарда, вызванного перманентным лигированием левой ветви коронарной артерии.

Показано, что экспериментальный инфаркт имел выраженный эффект, как на форму ПД кардиомиоцитов левого желудочка сердца, так и на ПД непосредственно не охваченных инфарктом предсердных кардиомиоцитов. Предполагается, что функциональный эффект инфаркта на Т-систему сердечной мышцы носит глобальный характер.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 19-015-00139 и темы Госзадания № АААА-А18-118012290371-3.

### Литература

1. Kubasov I V, Dobretsov M (2012) Two types of extracellular action potentials recorded with narrow-tipped pipettes in skeletal muscle of frog, *Rana temporaria*. *J. Physiol* 590: 2937–2944.
2. Igor V. Kubasov, Andrei Stepanov, Danila Bobkov, Przemysław B. Radwanski, Maxim A. Terpilowski, Maxim Dobretsov and Sandor Gyorke (2018). Sub-cellular Electrical Heterogeneity Revealed by Loose Patch Recording Reflects Differential Localization of Sarcolemmal Ion Channels in Intact Rat // *Front. Physiol.*, <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00061>
3. Bito V, Heinzel FR, Biesmans L, Antoons G, Sipido KR (2008) Crosstalk between L-type Ca<sup>2+</sup> channels and the sarcoplasmic reticulum: Alterations during cardiac remodelling. *Cardiovasc Res* 77:315–324.
4. Ibrahim M, Gorelik J, Yacoub MH, Terracciano CM (2011) The structure and function of cardiac t-tubules in health and disease. *Proc R Soc B Biol Sci* 278:2714–2723 Available at: <http://rspb.royalsocietypublishing.org/cgi/doi/10.1098/rspb.2011.0624>.



## EXTRACELLULAR MICROELECTRODE MAPPING OF THE RAT MYOCYTES IN NORMAL AND POST-INFARCTIAL HEARTS

I.V. Kubasov, M.G. Dobretsov, P.P. Vdovkin, A.A. Panov

*Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry RAS,  
St. Petersburg, Russia.*

Our recent studies demonstrated extracellular recording (loose patch clamp method) utilizing narrow-tipped pipettes as useful technique for non-invasive evaluation of focal electric activity of intact heart or skeletal muscle fibers. Specifically, we have shown that this method allows easy and efficient evaluation of activity of electrogenic mechanisms located in t-tubular and superficial plasma membrane compartments of ventricular cardiomyocytes of isolated rat hearts.

As a rule for this preparation, with standard, 5  $\mu\text{m}$ -outer tip diameter electrodes multi-phase action potentials (AP) are being recorded, which second, negative and most prominent phase has usually two peaks followed by the period of slow decay (late depolarization) (2). Pharmacological analysis of these signals suggests that the first negative peak can be attributed to activation of voltage-dependent Na channels of the myocyte superficial sarcolemma, while subsequent negative peak and the phase of the late depolarization represent, respectively, activity of Ca channels and Na/Ca exchangers of the T-system of the cardiomyocyte.

Cytological data show that T-system of rat heart atrial cardiomyocytes is much less developed than that of ventricular myocytes. In a good agreement with these data, in the present study of preparations of isolated rat hearts we have observed clear-cut difference between AP waveforms of atrial and ventricular cardiomyocytes. First, compared to ventricular, atrial cardiomyocytes' AP had relatively weak to absent second negative peak in its waveform. Second, the great proportion of waveforms of ventricular but none of atrial myocyte extracellular APs, recorded in this work, ended with well-pronounced positive phase.

Existing literature data suggest that inward Ca and Na/Ca exchanger currents substantially change during structural remodeling of the T-system progressing in cardiomyocytes during heart failure. To test this suggestion we conducted experiments with extracellular recordings from the left ventricles and atriums of hearts isolated from rats after 3 months of experimental myocardial infarction induced by permanent ligation of the left coronary artery. Interestingly, that experimental myocardial infarction had well appreciated effect on the waveform of extracellular APs of both, ventricular and atrial cardiomyocytes. As atrium is the part of the heart not directly affected by infarction, the latter finding suggests global character of the effect of infarction on T-system of the heart muscle.

The reported study was funded by RFBR according to the research project № 19-015-00139 and the Government Contract topic № AAAA-A18-118012290371-3.

## Literature

1. Kubasov I V, Dobretsov M (2012) Two types of extracellular action potentials recorded with narrow-tipped pipettes in skeletal muscle of frog, *Rana temporaria*. *J. Physiol* 590: 2937–2944.
2. Igor V. Kubasov, Andrei Stepanov, Danila Bobkov, Przemysław B. Radwanski, Maxim A. Terpilowski, Maxim Dobretsov and Sandor Gyorke (2018). Sub-cellular Electrical Heterogeneity Revealed by Loose Patch Recording Reflects Differential Localization of Sarcolemmal Ion Channels in Intact Rat // *Front. Physiol.*, <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00061>
3. Bito V, Heinzel FR, Biesmans L, Antoons G, Sipido KR (2008) Crosstalk between L-type Ca<sup>2+</sup> channels and the sarcoplasmic reticulum: Alterations during cardiac remodeling. *Cardiovasc Res* 77:315–324.
4. Ibrahim M, Gorelik J, Yacoub MH, Terracciano CM (2011) The structure and function of cardiac t-tubules in health and disease. *Proc R Soc B Biol Sci* 278:2714–2723 Available at: <http://rspb.royalsocietypublishing.org/cgi/doi/10.1098/rspb.2011.0624>.

### ВЛИЯНИЕ ТОЧЕЧНЫХ АМИНОКИСЛОТНЫХ ЗАМЕН В С- И N-КОНЦЕВЫХ ФРАГМЕНТАХ МОЛЕКУЛЫ ТРОПОМИОЗИНА НА ЕЕ СВОЙСТВА

Н.А. Кубасова<sup>1</sup>, Г.В. Копылова<sup>2</sup>, А.М. Матюшенко<sup>3</sup>, С.Р. Набиев<sup>2</sup>,  
Л.В. Никитина<sup>2</sup>, Д.В. Щепкин<sup>2</sup>, С.Ю. Бершицкий<sup>2</sup>,  
А.К. Цатурян<sup>1</sup>, Д.И. Левицкий<sup>3,4</sup>

<sup>1</sup>*Институт механики МГУ, Россия*

<sup>2</sup>*Институт иммунологии и физиологии РАН, Екатеринбург, Россия*

<sup>3</sup>*Институт биохимии им. А.Н. Баха, ФИЦ биотехнологии РАН,  
Москва, Россия*

<sup>4</sup>*Институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, МГУ, Россия*

Тропомиозин (Трп) – длинный суперспиральный белок мышечных клеток, который располагается на нити актина и вместе с тропонином регулирует сокращение мышц. Соседние молекулы тропомиозина связываются друг с другом “голова к хвосту” через перекрывающиеся соединения своих N- и С-концов, образуя полужесткий тяж, который способен перекапываться по спиральной поверхности актиновой нити. Высокая изгибная жесткость тяжа, необходимая для высокой кооперативности мышечной регуляции [Gordon et al. 2000. *Physiol. Rev.* 80: 853–924], обусловлена не только жесткостью самой молекулы, но и жесткостью области перекрытия. Мы исследовали структурные и функциональные свойства области перекрытия, изучая эффекты внесенных точечных мутаций. Точечные мутации M8R и K15N в N-концевой части тропомиозина и A277V в С-концевой части связаны с дилатационной кардиомиопатией, в то время как мутации M281T и I284V связаны с гипертрофической кардиомиопатией. Несколько экспериментальных подходов, включая дифференциальную сканирующую калориметрию, измерение вязкости, коседиментацию и количественный электрофорез, рассеяние света, метод двухлучевой оптической ловушки, анализ

подвижности *in vitro* и молекулярно-динамическое моделирование, были использованы для выявления молекулярных механизмов, лежащих в основе этих патологий.

Мы обнаружили, что N-концевые мутации M8R и K15N ослабляют взаимодействие между N- и C-концами Трм в области перекрытия и снижают сродство Трм к актину. Эти изменения, возможно, привели к снижению кооперативного регулирования. С-концевые мутации вызывали только небольшие и противоречивые изменения свойств Трм и его комплекса с актином. Наши результаты согласуются с данными, показывающими разное функционирование N- и C-концов Трм, и подтверждают, что С-концевая часть не является критической для взаимодействия Трм "голова к хвосту" и имеет независимые функции, кроме формирования перекрывающегося соединения [J. Moraczewska, S.E. Hitchcock-DeGregori. 2000. *Biochemistry* 39:6891–6897].

Работа выполнена при поддержке РФФИ 17-00-00066 (АКЦ), 17-00-00070 (СЮБ) и 17-00-00065 (ДИЛ) объединенного проекта 17-00-00071.

#### **EFFECTS OF POINT SUBSTITUTIONS IN THE HEAD-TO-TAIL OVERLAP JUNCTION OF TROPOMYOSIN**

**N.A. Koubassova<sup>1</sup>, G.V. Kopylova<sup>2</sup>, A.M. Matyushenko<sup>3</sup>, S.R. Nabiev<sup>2</sup>,  
L.V. Nikitina<sup>2</sup>, D.V. Shchepkin<sup>2</sup>, S.Y. Bershtitsky<sup>2</sup>, A.K. Tsaturyan<sup>1</sup>,  
D.I. Levitsky<sup>3,4</sup>**

<sup>1</sup>*Institute of Mechanics, Moscow State University, Russia*

<sup>2</sup>*Institute of Immunology and Physiology RAS, Yekaterinburg, Russia*

<sup>3</sup>*A.N. Bach Institute of Biochemistry, Research Center of Biotechnology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia*

<sup>4</sup>*Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Moscow State University, Russia*

Tropomyosin (Tpm) is a long coiled-coil protein of muscle cells that locates on actin filament and together with troponin regulates muscle contraction. Adjacent Tpm molecules bind each other via overlap junctions of their N- and C-termini thus forming a semi-rigid strand that rolls over the helical surface of an actin filament. The high bending stiffness of the strand essential for high cooperativity of muscle regulation [Gordon et al. 2000. *Physiol. Rev.* 80:853–924] is due not only to the stiffness of the molecule itself but also to the stiffness of the overlap regions. We probed structural and functional properties of the overlap region studying effect of point mutations in the junction. Point mutations M8R and K15N in the N-terminal part of the junction and the A277V one in the C-terminal part are associated with dilated cardiomyopathy, while the M281T and I284V mutations are related to hypertrophic cardiomyopathy. Several experimental approaches including differential scanning calorimetry, viscosity measurements, cosedimentation and quantitative electrophoresis, light scattering, two-beam optical trap technique, *in vitro* motility assay and molecular dynamic simulation were exploited to reveal molecular mechanism(s) underlying these pathologies.

We found that the N-terminal mutations M8R and K15N weakened the interaction between the N- and C-termini of Tpm in the overlap region and reduced the Tpm affinity for actin. These changes possibly led to a reduction in the regulation cooperativity. The C-terminal mutations caused only small and controversial changes in properties of Tpm and its complex with actin. Our results are in agreement with data showing different functioning of N- and C- termini of Tpm and confirm that C-terminal part is not crucial for head-to-tail Tpm interaction and has independent functions beyond the formation of the overlap junction [J. Moraczewska, S.E. Hitchcock-DeGregori. 2000. Biochemistry 39:6891–6897].

Supported by research grants 17-00-00066 (to A.T.), 17-00-00070 (to S.B.), and 17-00-00065 (to D.L.) of the collaboration project 17-00-00071 of the Russian Foundation for Basic Research.

## **ИЗМЕНЕНИЕ ИЗОФОРМНОГО СОСТАВА ТИТИНА В РАННЕЙ СТАДИИ ХРОНИЧЕСКОЙ СЕРДЕЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ**

**В.Л. Лакомкин<sup>1</sup>, А.А. Абрамов<sup>1</sup>, А.Д. Уланова<sup>2</sup>, И.М. Вихляnceв<sup>2</sup>,  
А.В. Просвирнин<sup>1</sup>, Е.В. Лукошкова<sup>1</sup>, В.И. Капелько<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>*Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии Минздрава России, ул. 3-я Черепковская, 15а, Москва 121552, Россия*

<sup>2</sup>*Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН; Пуццино, ул. Институтская, 3, 142290, Московская область.*

Диастолическая дисфункция (ДД) является начальной стадией ХСН, она характеризуется замедленным расслаблением и повышенным диастолическим давлением, но нормальной сократимостью миокарда. Последняя может поддерживаться за счет лучшего наполнения левого желудочка (ЛЖ). Диастолическая податливость миокарда в физиологическом диапазоне длины саркомеров главным образом определяется состоянием титина [1]. В сердечной мышце титин находится в I-диске саркомера и существует в двух изоформах –эластичной N2BA и жесткой N2B.

Задача данной работы состояла в определении содержания изоформ титина и уровня фосфорилирования в миокарде крыс с одновременной характеристикой сократительной функции сердца при ДД, возникающей после 4 недель введения доксорубина (ДОК).

**Материалы и методы.** В работе использованы крысы-самцы популяции Wistar весом 250-300 г. ДОК (2 мг/кг подкожно) вводили раз в неделю в течение 4 недель. Трансторакальная эхокардиография была выполнена на аппарате фирмы VUJIFILM Visual Sonic модель Vevo 1100, а катетеризация ЛЖ - при помощи стандартного PV-катетера FTH-1912B-8018 и усилителя ADV500 (Transonic, Канада) под золотиловым наркозом (5 мг/кг). Определение изоформ титина и степени фосфорилирования белка выполняли в замороженных образцах миокарда, взятых после острого опыта по методу [2]. Результаты представлены как M±SEM.

**Результаты и обсуждение.** Фракция изгнания через 4 недели после начала применения ДОК оказалась в пределах нормы ( $64 \pm 2\%$ , контроль -  $67 \pm 3\%$ ). Индекс расслабления у этих крыс ( $67 \pm 6 \text{ с}^{-1}$ ) был снижен на 19% ( $p < 0.05$ ), а давление в течение всей диастолы было повышено приблизительно вдвое. Эти признаки характеризуют ДД сердца.

Содержание титина в миокарде крыс, получавших ДОК, было снижено незначительно, но содержание его метаболитов достоверно увеличилось на  $74 \pm 11\%$ , что свидетельствует об интенсивном метаболизме этого белка. Соотношение N2BA/N2B изоформ титина в контрольных опытах составило 14/86%, а у ДОК крыс содержание N2BA составило  $26 \pm 2\%$ . Уровень фосфорилирования титина был увеличен на  $60 \pm 18\%$  ( $p < 0.05$ ) по сравнению с контролем и отлично коррелировал ( $r = 0.94$ ) с содержанием изоформы N2BA, что позволяет предполагать, что фосфорилирование направлено на снижение жесткости молекул титина. С таким предположением согласуется и снижение диастолической упругости миокарда.

Анализ известных данных о соотношении N2BA/N2B-изоформ титина при различных видах кардиомиопатии показывает широкую вариабельность. Повышенное соотношение N2BA/N2B характерно для дилатационной кардиомиопатии, хронической ишемической кардиомиопатии и ХСН со сниженной фракцией выброса [3], а пониженное – при концентрической кардиомиопатии или гипертонии [4]. Эти данные показывают, что в ситуациях, когда требуется мобилизация растяжения, соотношение сдвигается в сторону N2BA, а когда требуется усиление сокращений, преобладает увеличение изоформы N2B.

Работа поддержана грантом РФФИ № 18-015-00271.

### **Литература**

1. Guo W, Sun M (2018) RBM20, a potential target for treatment of cardiomyopathy via titin isoform switching. *Biophys Rev*;10(1):15-25.
2. Vikhlyantsev IM, Podlubnaya ZA (2017) Nuances of electrophoresis study of titin/connectin. *Biophys Rev*, 9(3):189-199.
3. Makarenko I, Opitz CA, Leake MC, Neagoe C, Kulke M, Gwathmey JK, del Monte F, Hajjar RJ, Linke WA (2004) Passive stiffness changes caused by upregulation of compliant titin isoforms in human dilated cardiomyopathy hearts. *Circ Res* 95:708–716.
4. Hamdani N, Bishu KG, von Frieling-Salewsky M, Redfield MM, Linke WA (2013) Deranged myofilament phosphorylation and function in experimental heart failure with preserved ejection fraction. *Cardiovasc Res* 97:464–471.

## **ALTERATIONS IN ISOFORM TITIN COMPOSITION IN THE EARLY STAGE OF CHRONIC HEART FAILURE**

**V.L. Lakomkin<sup>1</sup>, A.A. Abramov<sup>1</sup>, A.D. Ulanova<sup>2</sup>, I.M. Vikhlyantsev<sup>2</sup>,  
A.V. Prosvirnin<sup>1</sup>, E.V. Lukoshkova<sup>1</sup>, V.I. Kapelko<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>*National Medical Research Center of Cardiology, Ministry of Health,  
3-rd Cherepkovskaya Str, 15a, Moscow, 121552 Russia*

<sup>2</sup>*Institute of Theoretical and Experimental Biophysics RAS,  
Pushchino, Moscow Region, Russia*

Diastolic dysfunction (DD) is the initial stage of the chronic heart failure, it is characterized by slowed relaxation and increased diastolic pressure but normal myocardial contractility. The latter may be maintained due to facilitated filling of the left ventricle (LV). Diastolic myocardial distensibility in physiological length range of sarcomers is determined by the status of titin [1]. Titin, a spring-like protein, is situated in I-disk of sarcomers and exists in two isoforms - elastic N2BA and rigid N2B.

The objective of this work was to determine the content of titin isoforms and the level of phosphorylation in the myocardium with simultaneous characteristics of the cardiac contractile function in rats with DD arising after 4 weeks of doxorubicin (DOX) introduction.

**Materials and methods.** Male rats of Wistar population weighing 250-300 g were used. DOX (2 mg/kg subcutaneously) has been injected once a week for 4 weeks. Transthoracic echocardiography was performed in VUJIFILM Visual Sonic model Vevo 1100 and LV catheterization with standard PV-FTH-catheter 1912B-8018 and ADV500 amplifier (Transonic, Canada) under zoletil anesthesia (5 mg/kg). The content of titin isoforms and degree of protein phosphorylation were determined in frozen samples taken after an acute experiment by method [2]. The results are presented as  $M \pm SEM$ .

**Results and discussion.** The ejection fraction 4 weeks after DOX administration has been found within the normal range ( $64 \pm 2$  %, control -  $67 \pm 3$  %). The relaxation index in these rats ( $67 \pm 6$  s<sup>-1</sup>) was reduced by 19 % ( $p < 0.05$ ) and LV pressure throughout the diastole was elevated approximately twice showing cardiac DD.

Titin content in the myocardium of rats received DOX was reduced slightly, but the content of its metabolites reliably increased by  $74 \pm 11$ % that testifies to intense metabolism of this protein. The ratio of N2BA/N2B titin isoforms in control experiments amounted 14/86%, while in DOX rats the N2BA part increased to  $26 \pm 2$ %. Titin phosphorylation level increased by  $60 \pm 18$ % ( $p < 0.05$ ) compared to the control and perfectly correlated ( $r=0.94$ ) with N2BA isoform content suggesting that phosphorylation of N2BA was predominant thus decreasing the rigidity of titin molecules. Such assumption is consistent with lowering myocardial diastolic stiffness.

The analysis of known data of the ratio N2BA/N2B titin isoforms shows a wide variation for different types of cardiomyopathy. Increased ratio of N2BA/N2B is characteristic for dilated cardiomyopathy, chronic ischemic cardiomyopathy and chronic heart failure with reduced ejection fraction [3] while lower N2BA/N2B ratio is associated with concentric cardiomyopathy or hypertension [4]. These data suggest that in situations when myocardial distensibility should be mobilized the ratio shifts toward N2BA, and when myocardial contractions should be strengthened the ratio shifts toward N2B isoform.

This research was supported by Russian Foundation for Basic Research grant number 18-015-00271.

## References

1. Guo W, Sun M (2018) RBM20, a potential target for treatment of cardiomyopathy via titin isoform switching. *Biophys Rev*;10(1):15-25.

2. Vikhlyantsev IM, Podlubnaya ZA (2017) Nuances of electrophoresis study of titin/connectin. *Biophys Rev*, 9(3):189-199.
3. Makarenko I, Opitz CA, Leake MC, Neagoe C, Kulke M, Gwathmey JK, del Monte F, Hajjar RJ, Linke WA (2004) Passive stiffness changes caused by upregulation of compliant titin isoforms in human dilated cardiomyopathy hearts. *Circ Res* 95:708–716.
4. Hamdani N, Bishu KG, von Frieling-Salewsky M, Redfield MM, Linke WA (2013) Deranged myofilament phosphorylation and function in experimental heart failure with preserved ejection fraction. *Cardiovasc Res* 97:464–471.

## СРАВНИТЕЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ СТРУКТУРНЫХ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ СВОЙСТВ РАЗЛИЧНЫХ ИЗОФОРМ ТРОПОМИОЗИНА СКЕЛЕТНЫХ МЫШЦ ЧЕЛОВЕКА

Д.И. Левицкий<sup>1,2</sup>, А.М. Матюшенко<sup>1</sup>, Д.В. Щепкин<sup>3</sup>,  
Г.В. Копылова<sup>3</sup>, С.Ю. Клейменов<sup>1,4</sup>, С.Ю. Бершицкий<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Институт биохимии им. А.Н. Баха, ФИЦ биотехнологии РАН,  
Москва, Ленинский просп. 33, Россия;

<sup>2</sup>Институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ,  
Москва, Россия;

<sup>3</sup>Институт иммунологии и физиологии Уральского отделения РАН,  
Екатеринбург, Россия;

<sup>4</sup>Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва, Россия

Изоформы тропомиозина (Трп)  $\alpha$  (Трп 1.1) и  $\gamma$  (Трп 3.12) экспрессируются в быстрых и медленных скелетных мышцах человека, соответственно, тогда как  $\beta$ -Трп (Трп 2.2) экспрессируется как в быстрых, так и в медленных мышцах. В результате они могут образовывать как  $\alpha\alpha$ - и  $\gamma\gamma$ -гомодимеры димерных молекул Трп ( $\beta\beta$ -гомодимеры нестабильны и потому встречаются крайне редко), так и  $\alpha\beta$ - и  $\gamma\beta$ -гетеродимеры. Свойства  $\alpha\alpha$ -гомодимеров Трп хорошо изучены, тогда как почти ничего не известно о свойствах  $\gamma\gamma$ -гомодимеров и  $\gamma\beta$ -гетеродимеров. Методом дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК) мы показали, что термостабильность  $\gamma\gamma$ -гомодимеров Трп гораздо выше, чем у  $\alpha\alpha$ -гомодимеров, а  $\beta\beta$ -Трп – самые нестабильные гомодимеры Трп. При этом показано, что стабильность  $\gamma\beta$ -гетеродимеров Трп гораздо ниже, чем у  $\gamma\gamma$ -гомодимеров, а тепловая денатурация  $\alpha\beta$ -гетеродимеров Трп во многом напоминает денатурацию  $\alpha\alpha$ -гомодимеров Трп [1]. Методом искусственной подвижной системы (*in vitro motility assay*) показано, что скорость скольжения регулируемых тонких филаментов, содержащих  $\gamma\gamma$ -гомодимеры или  $\gamma\beta$ -гетеродимеры Трп, по поверхности с иммобилизованным быстрым или медленным миозином значительно ниже, чем у филаментов, содержащих  $\alpha\alpha$ -гомодимеры,  $\beta\beta$ -гомодимеры или  $\alpha\beta$ -гетеродимеры Трп. При этом как  $\gamma\gamma$ -гомодимеры, так и  $\gamma\beta$ -гетеродимеры Трп значительно снижали кальциевую чувствительность скорости скольжения филаментов по поверхности, покрытой миозином из быстрых скелетных мышц, но увеличивали скорость их

скольжения по поверхности с миозином из медленных скелетных мышц. Таким образом, нам впервые удалось показать, что структурные и функциональные свойства  $\gamma\gamma$ -гомомеров и  $\gamma\beta$ -гетеродимеров Трм существенно отличаются от свойств как  $\alpha\alpha$ - и  $\beta\beta$ -гомомеров Трм, так и  $\alpha\beta$ -гетеродимеров Трм. На основании этих данных сделано заключение, что  $\gamma$ -цепь Трм является одним из важных факторов, определяющих свойства медленных скелетных мышц.

Работа выполнена при поддержке Российского Научного Фонда (грант № 16-14-10199).

### Литература

1. Matyushenko A.M., Kleymenov S.Y., Susorov D.S., Levitsky D.I. "Thermal unfolding of homodimers and heterodimers of different skeletal muscle isoforms of tropomyosin". *Biophysical Chemistry*, 2018, Vol. 243, No. 1, p. 1–7.

## COMPARATIVE STRUCTURAL AND FUNCTIONAL STUDIES ON DIFFERENT ISOFORMS OF HUMAN SKELETAL MUSCLE TROPOMYOSIN

D.I. Levitsky<sup>1,2</sup>, A.M. Matyushenko<sup>1</sup>, D.V. Shchepkin<sup>3</sup>,  
G.V. Kopylova<sup>3</sup>, S.Y. Kleymenov<sup>1,4</sup>, S.Y. Bershtitsky<sup>3</sup>

<sup>1</sup>*Bach Institute of Biochemistry, Research Center of Biotechnology of RAS,  
Moscow, Leninsky prosp., 33, Russia;*

<sup>2</sup>*Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Moscow State University,  
Moscow, Russia;*

<sup>3</sup>*Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch of RAS,  
Yekaterinburg, Russia;*

<sup>4</sup>*Koltzov Institute of Developmental Biology RAS, Moscow, Russia*

The tropomyosin (Tpm) isoforms  $\alpha$  (Tpm 1.1) and  $\gamma$  (Tpm 3.12) are expressed in fast and slow human skeletal muscles, respectively, while  $\beta$ -Tpm (Tpm 2.2) is expressed in both fast and slow muscles. This results in formation of  $\alpha\alpha$ - and  $\gamma\gamma$ -homodimers ( $\beta\beta$ -homodimers are unstable and occur rarely) of dimeric Tpm molecules as well as  $\alpha\beta$ - and  $\gamma\beta$ -heterodimers. The properties of  $\alpha\alpha$ -homodimer are well studied, whereas nothing is known about the properties of  $\gamma\gamma$ -homodimer and  $\gamma\beta$ -heterodimer. Using differential scanning calorimetry, we showed that the thermal stability of  $\gamma\gamma$ -Tpm homodimer is much higher than that of  $\alpha\alpha$ -Tpm homodimer, and  $\beta\beta$ -homodimer is the least stable Tpm. The stability of  $\gamma\beta$ -Tpm heterodimer is much lower than that of  $\gamma\gamma$ -Tpm homodimer, and the thermal unfolding of  $\alpha\beta$ -Tpm heterodimer is roughly similar to that of  $\alpha\alpha$ -Tpm homodimer [1]. Sliding velocity of regulated thin filaments containing either Tpm  $\gamma\gamma$ -homodimers or  $\gamma\beta$ -heterodimers moving over fast or slow skeletal myosin measured in an *in vitro* motility assay was significantly less than that of the filaments with  $\alpha\alpha$ - or  $\beta\beta$ -homodimers, or  $\alpha\beta$ -heterodimers. Both  $\gamma\gamma$ - and  $\gamma\beta$ -Tpm dimers significantly decreased the calcium sensitivity of the sliding velocity over fast myosin but increased it over slow myosin. Thus, in this study we show



for the first time that structural and functional properties of  $\gamma\gamma$ -Tpm homodimer and  $\gamma\beta$ -Tpm heterodimer are quite different from those of  $\alpha\alpha$ - and  $\beta\beta$ -Tpm homodimers and  $\alpha\beta$ -Tpm heterodimer. We conclude that the Tpm  $\gamma$ -chain is one of essential factors that determine the properties of slow skeletal muscles.

Supported by Russian Science Foundation (grant 16-14-10199).

### References

1. Matyushenko A.M., Kleymenov S.Y., Susorov D.S., Levitsky D.I. "Thermal unfolding of homodimers and heterodimers of different skeletal muscle isoforms of tropomyosin". *Biophysical Chemistry*, 2018, Vol. 243, No. 1, p. 1–7.

## ВЛИЯНИЕ АМИНОКИСЛОТ НА ЭКСПРЕССИЮ ГЕНА *IGF1* В МИОТУБАХ И СКЕЛЕТНОЙ МЫШЦЕ ЧЕЛОВЕКА

Е.М. Леднев<sup>1,2</sup>, И.В. Кравченко<sup>3</sup>, В.А. Фуралев<sup>3</sup>,  
Е.А. Лысенко<sup>1,2</sup>, В.Э. Дубров<sup>2</sup>, Д.В. Попов<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>ГНЦ РФ - ИМБП РАН, Москва, Хорошевское ш., 76А, Россия

<sup>2</sup>Московский государственный университет, факультет фундаментальной медицины, Москва, Ломоносовский просп., 27 корпус 1, Россия

<sup>3</sup>ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, Ленинский просп., 33 стр. 2, Россия

Снижение повреждаемости мышц при выполнении физических нагрузок является важной задачей. Инсулиноподобный фактор роста 1 (IGF1) регулирует экспрессию коллагенов и белков внеклеточного матрикса. Исследования на животных и с участием добровольцев показали, что уровень IGF1 в крови, регулируемый печенью, увеличивается после курса приема смеси аминокислот или только лейцина [1-3]. Известно, что эффекты IGF1 связаны главным образом с ауто- и паракриной регуляцией. Поэтому целью работы было исследовать влияние приема аминокислот на экспрессию гена *IGF1* и IGF1-зависимых генов в скелетной мышце человека.

В первом эксперименте исследовалось влияние аминокислот и их сочетаний с инсулином на экспрессию изоформ мРНК *IGF1* в культуре миотуб человека. После старвации (48 ч) клетки инкубировали (24 ч) в растворе Кребса-Рингера с добавлением лейцина, аргинина и инсулина в различных сочетаниях.

Во второй части работы исследовали эффекты курсового приема аминокислот людьми, регулярно выполняющими физические нагрузки. Шесть молодых (18-22 года) мужчин спортсменов-лыжников на протяжении 2,5 мес. ежедневно потребляли незаменимые аминокислоты (лейцин:изолейцин:валин 2:1:1, 0,1 г/кг массы тела в сутки); 6 спортсменов из контрольной группы потребляли плацебо (мальтодекстрин). До и после курса брали пробы ткани *m.vastus lateralis* с помощью игольчатой биопсии.

Инкубация миотуб с различными аминокислотами и с инсулином привела к сопоставимому и небольшому увеличению (в 1,2 – 1,8 раза) экспрессии изоформы мРНК *IGF-1Ea*. При этом аддитивного эффекта при комбинации аминокислот с инсулином не наблюдалось.

Ежедневный прием аминокислот после физической нагрузки привел к росту базального уровня белка IGF1 в крови в 1,5 раза ( $P < 0,05$ ), при этом экспрессия гена *IGF1* в скелетных мышцах увеличилась на уровне тенденции ( $P < 0,1$ ). Прием аминокислот вызвал снижение базального уровня миоглобина и активности КФК – маркеров повреждения мышечных мембран в плазме крови. Подобные эффекты могут быть связаны с наблюдавшимся в нашем эксперименте ростом экспрессии генов, регулирующих биогенез мышечных мембран и внеклеточного матрикса (*HMGCR*, *COL1A1*, *COL3A1*, *COL5A1* и *LOX*), в скелетной мышце. Экспрессия этих генов коррелировала ( $r = 0,79 - 0,94$ ;  $P < 0,002$ ) с экспрессией гена *IGF1* в скелетной мышце и не зависела от базального уровня белка IGF1 в плазме крови.

Исследования *in vitro* и *in vivo* свидетельствуют о том, что экспрессия гена *IGF1* может регулироваться аминокислотами через инсулиннезависимый механизм. Возможно, увеличение дозировки/длительности приема аминокислот приведет к более выраженному увеличению экспрессии *IGF1* и IGF1-зависимых генов в мышцах человека.

Исследование поддержано Программой президиума РАН «Фундаментальные исследования для биомедицинских технологий» 2018-2020 гг. и грантом ОКР № Д 378-2015.

#### Литература

1. Pedrosa RG, Donato J, Jr., Pires IS, Tirapegui J. Leucine supplementation increases serum insulin-like growth factor 1 concentration and liver protein/RNA ratio in rats after a period of nutritional recovery. *Appl Physiol Nutr Metab* 2013; 38(6):694-697.
2. Pedroso JA, Nishimura LS, de Matos-Neto EM, Donato J, Jr., Tirapegui J. Leucine improves protein nutritional status and regulates hepatic lipid metabolism in calorie-restricted rats. *Cell Biochem Funct* 2014; 32(4):326-332.
3. Schurch MA, Rizzoli R, Slosman D, Vadas L, Vergnaud P, Bonjour JP. Protein supplements increase serum insulin-like growth factor-I levels and attenuate proximal femur bone loss in patients with recent hip fracture. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Ann Intern Med* 1998; 128(10):801-809.

### EFFECT OF AMINO ACIDS ON *IGF1* GENE EXPRESSION IN HUMAN MYOTUBES AND SKELETAL MUSCLE

**E.M. Lednev<sup>1,2</sup>, I.V. Kravchenko<sup>3</sup>, V.A. Furalyov<sup>3</sup>,  
E.A. Lysenko<sup>1,2</sup>, V.E. Dubrov<sup>2</sup>, D.V. Popov<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup>*Russian Federation State Science Center – Institute of Biomedical Problems of Russian Academy of Science, Moscow, Khoroshevskoye rd., 76A, Russia*

<sup>2</sup>*Lomonosov Moscow State University, Faculty of Fundamental Medicine, Lomonosovsky ave., 27, 1, Moscow, Russia*

<sup>3</sup>*A.N. Bach Institute of Biochemistry of Russian Academy of Science, Moscow, Leninsky ave., 33, 2, Russia*

Preventing of exercise-induced muscle damage is an important task. Insulin-like growth factor 1 (IGF1) regulates expression of collagens and extracellu-

lar matrix proteins. Studies in animals and volunteers have shown an increase of IGF1 level in blood (which is regulated by liver) in response to mixed amino acid or leucine administration [1-3]. It is known that effects of IGF1 are mostly related to autocrine and paracrine regulation. Therefore, the aim of our study was to investigate the effect of amino acids on expression of *IGF1* and IGF1-dependent genes in the human skeletal muscle.

In the first experiment, effect of treatment by amino acids and their combination with insulin on expression of mRNA isoforms of *IGF1* was examined in human myotubes. After starvation (48 h), cells were incubated for 24 h in Krebs-Ringer buffer with leucine, arginine and insulin in different combinations.

In the second part of study, effect of amino acids administration was investigated in males. Six young cross country skiers (18-22 yy) consumed essential amino acids daily during 2,5 months (leucine:isoleucine:valin 2:1:1, 0,1 g/1 kg of body mass daily; experimental group); six other athletes (control group) consumed placebo (maltodextrin) in the same manner. M. vastus lateralis tissue samples were taken before and after amino acids course using small using needle biopsy technique.

Incubation of myotubes with amino acids and insulin led to comparable and mild (1,2-1,8-fold) increase in *IGF-1Ea* mRNA isoform expression. Combination of amino acids with insulin did not lead to additive effect.

Amino acids intake after physical activity led to increase of baseline IGF1 protein level in the blood (1,5-fold,  $P < 0,05$ ), whereas *IGF1* gene expression in skeletal muscles showed upward trend only ( $P < 0,1$ ). Amino acids administration decreased the baseline level of myoglobin and the activity of CPK – markers of muscle membrane damage. This effect may be associated with an increase in expression of genes related to muscle membrane and extracellular matrix (*HMGR*, *COL1A1*, *COL3A1*, *COL5A1* and *LOX*). The expression of these genes correlated with the expression of *IGF1* in muscle ( $r = 0,79 - 0,94$ ;  $P < 0,002$ ) and did not depend on the IGF1 level in the blood.

*In vitro* and *in vivo* studies suggest that *IGF1* gene expression may be regulated by amino-acids via an insulin-independent mechanism. An increase in the dosage/duration of amino acids intake may induce a more pronounced increase in expression of *IGF1* and IGF1-dependent genes in human skeletal muscles.

The study was supported by the Program of the RAS Presidium “Fundamental research for biomedical technologies” 2018-2020 and by the ROC grant № D 378-2015.

### References

1. Pedrosa RG, Donato J, Jr., Pires IS, Tirapegui J. Leucine supplementation increases serum insulin-like growth factor 1 concentration and liver protein/RNA ratio in rats after a period of nutritional recovery. *Appl Physiol Nutr Metab* 2013; 38(6):694-697.
2. Pedroso JA, Nishimura LS, de Matos-Neto EM, Donato J, Jr., Tirapegui J. Leucine improves protein nutritional status and regulates hepatic lipid metabolism in calorie-restricted rats. *Cell Biochem Funct* 2014; 32(4):326-332.
3. Schurch MA, Rizzoli R, Slosman D, Vadas L, Vergnaud P, Bonjour JP. Protein supplements increase serum insulin-like growth factor-I levels and attenuate

proximal femur bone loss in patients with recent hip fracture. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Ann Intern Med* 1998; 128(10):801-809.

**АНАЛИЗ РАННИХ ЭТАПОВ  
ЭПИТЕЛИАЛЬНО-МЕЗЕНХИМАЛЬНОГО ПЕРЕХОДА:  
МЕХАНИЗМЫ ФОРМИРОВАНИЯ МИГРАЦИОННОГО  
ФЕНОТИПА У ЭПИТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК**  
**Н.И. Литовка, С.Н. Рубцова, И.Ю. Житняк, Н.А. Глушанкова**  
*НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина Минздрава России,  
Москва, Каширское шоссе, 24. Россия*

Эпителиально-мезенхимальный переход (ЭМП) играет важную роль в эмбриональном развитии и во взрослом организме при заживлении ран. ЭМП также является главным драйвером опухолевой прогрессии. Раковые клетки используют ЭМП для инвазии и метастазирования, при вступлении в ЭМП клетки карцином приобретают резистентность к химиотерапии и способность подавлять иммунный ответ организма.

В ходе ЭМП эпителиальные клетки утрачивают стабильную межклеточную адгезию и приобретают способность к миграции. В культуре эпителиоцитов IAR-20 нами были впервые изучены ранние этапы ЭМП, индуцированного эпидермальным фактором роста (EGF). При видеомикроскопическом наблюдении было обнаружено, что EGF уже через 5-10 мин индуцировал быстрые изменения в клетках – утрату контактного паралича, появление псевдоподий на межклеточных границах и через 15-20 мин – разрушение стабильных межклеточных контактов и расхождение клеток. Клетки IAR-20, обработанные EGF, приобретали гибридный эпителиально-мезенхимальный фенотип: на протяжении 24 час сохраняли экспрессию E-кадгерина и мигрировали, как коллективно, так и индивидуально. Как показала конфокальная видеомикроскопия, через 5-10 мин после начала инкубации с EGF на межклеточных границах происходили драматические изменения структуры и динамики актиновых систем, а также межклеточных адгезионных контактов (АК): разрушался кольцевой актиновый пучок, ассоциированный со стабильными тангенциальными АК, индуцировалась полимеризация Rac-Arp2/3-зависимой актиновой сети во вновь образующихся псевдоподиях, появлялся ретроградный ток актина-миозина, тангенциальные АК замещались динамичными и нестабильными E-кадхериновыми радиальными АК. С помощью Вестерн-блоттинга через 5-15 мин после начала инкубации с EGF было детектировано фосфорилирование актин-связывающего белка EPLIN, стабилизирующего структуру кольцевого актинового пучка; фосфорилированный EPLIN подвергается протеасомной деградации. В условиях конкуренции актиновых систем клетки за G-актин высвобождение мономерного актина из разрушающегося кольцевого пучка приводило к его встраиванию в актиновую сеть псевдоподий. При иммунофлуоресцентном окрашивании клеток IAR-20, обрабо-

таных EGF, было обнаружено, что альфа-катенин, высвобождающийся из разрушающихся тангенциальных АК, вместе с p115RhoGEF начинал концентрироваться в перинуклеарной области, что могло приводить к активации Rho в эпителиальных клетках и возникновению у них передне-задней поляризации и направленной миграции.

Работа поддержана грантом РФФ №16-15-10288 и грантом РФФИ №18-54-16005.

## **STUDY OF THE EARLY STAGES OF EPITHELIAL-MESENCHYMAL TRANSITION: MECHANISMS OF ACQUISITION OF THE MIGRATORY PHENOTYPE BY EPITHELIAL CELLS**

**N.I. Litovka, S.N. Rubtsova, I.Y. Zhitnyak, N.A. Gloushankova**

*N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Moscow, Kashirskoye shosse, 24, Russia*

Epithelial-mesenchymal transition (EMT) is a process that plays the key role in normal embryonic development and wound healing in adult organisms; however, EMT is also the main driver of tumor progression. Tumor cells undergo EMT to invade and metastasize to healthy tissues. EMT also promotes resistance to chemotherapy and ability to suppress the body's immune response against tumor cells.

During EMT, epithelial cells lose stable cell-cell adhesion and acquire migratory properties. Early stages of epidermal growth factor (EGF)-induced EMT were first studied during this project in IAR-20 epithelial cells. Live cell imaging showed that treatment with EGF induced rapid response in the cells – loss of contact paralysis, appearance of pseudopodia at cell-cell borders within 5-10 minutes and disruption of stable cell-cell adhesion and scattering of the cells within 15-20 minutes. As a result of treatment with EGF, IAR-20 cells acquired a hybrid epithelial-mesenchymal phenotype: during 24 hours of treatment, the cells retained the expression of the main epithelial adhesion protein E-cadherin and migrated either individually or collectively. Confocal microscopy revealed that 5-10 minutes of incubation with EGF resulted in dramatic changes in structure and dynamics of the actin cytoskeleton and adherens junctions (AJs). Specifically, the circumferential actin bundles associated with stable tangential AJs, were disrupted; induction of the Rac-Arp2/3-dependent actin network polymerization was detected in newly forming pseudopodia; actin-myosin retrograde flow appeared at the cell-cell borders; stable tangential AJs were replaced by dynamic unstable E-cadherin based radial AJs.

Western blot analysis detected phosphorylation of an actin-binding protein EPLIN after 5-15 minutes of treatment with EGF. Non-phosphorylated EPLIN stabilizes the circumferential actin bundles, while phosphorylation of EPLIN leads to its proteasomal degradation. In competition for the limited amount of the G-actin between the different actin cytoskeleton elements, release of the monomeric actin from the disrupting circumferential bundles immediately

led to its incorporation into pseudopodial actin network. Immunofluorescent staining of the IAR-20 cells treated with EGF revealed that  $\alpha$ -catenin released from the disrupting tangential AJs, concentrated in the perinuclear region together with p115RhoGEF. This could lead to activation of Rho in epithelial cells and their subsequent front-rear polarization and directional migration.

This work was supported by the Russian Science Foundation (grant №16-15-10288) and the Russian Foundation for Basic Research (grant №18-54-16005).

## **СРАВНЕНИЕ БАЗАЛЬНОГО ТРАНСКРИПТОМА В НЕТРЕНИРОВАННОЙ И В АДАптиРОВАННОЙ К СИЛОВЫМ НАГРУЗКАМ СКЕЛЕТНОЙ МЫШЦЕ ЧЕЛОВЕКА**

**Е.А.Лысенко<sup>1,2</sup>, П.А.Махновский<sup>1</sup>, Е.И. Шагимарданова<sup>3</sup>,  
Г.Р. Газизова<sup>3</sup>, О.А. Гусев<sup>3</sup>, Д.В.Попов<sup>1,2</sup>, О.Л.Виноградова<sup>1,2</sup>**

*<sup>1</sup>Институт медико-биологических проблем РАН,  
Москва, Хорошевское шоссе 76А, Россия*

*<sup>2</sup>МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, Ломоносовский проспект 27-1, Россия*

*<sup>3</sup>Казанский федеральный университет, Казань, Кремлевская улица 18, Россия*

Скелетная мышца адаптируется к силовой тренировке посредством увеличения мышечной массы и силы. В процессе тренировки может изменяться базальное содержание регуляторных и структурных белков, а также экспрессия генов. Ранее мы обнаружили большее содержание изоформы миозина МНСIIа и меньшее содержание изоформы МНСIIх, большее содержание белка FOXO1 и меньшее содержание белка eEF2, а также больший уровень базальной экспрессии миостатина в пробах мышечной ткани тренированных добровольцев (Lysenko et al. 2018). Мы предположили, что адаптация скелетной мышцы к регулярным силовым нагрузкам приведет к выраженному изменению транскриптома в базальном состоянии.

У 8 добровольцев, тренирующих силовые показатели/возможности мышц, и у 8 нетренированных добровольцев с помощью игольчатой микробиопсии (Hayot et al. 2005) в покое были взяты пробы из m. vastus lateralis. РНК-секвенирование проводили на приборе Illumina HiSeq 2000 с глубиной от 40 до 50 миллионов прочтений на образец. Дифференциально экспрессируемые гены (ДЭГ) определяли при  $P_{adj} < 0,01$  (Р-значение с поправкой Бенджамина-Хохберга) и при кратности изменения 1,25.

При сравнении транскриптома мышц тренированных и нетренированных добровольцев было выявлено 662 ДЭГ. Для генов, которые снизили свою экспрессию в тренированной скелетной мышце, относительно нетренированной мышцы, значимо обогащенных GO-терминов не было выявлено. Напротив, гены с увеличенной экспрессией в тренированной мышце были ассоциированы с регуляцией рибосомальных (45 генов) и митохондриальных белков (51 ген). С помощью метода позиционных весовых матриц и базы данных HOCOMOCS был произведен поиск ключевых тран-

скрипционных факторов, ассоциированных с увеличением генной экспрессии. Увеличение базальной экспрессии рибосомальных белков в тренированной мышце может быть ассоциировано с активностью транскрипционных факторов FLI1, TYY1, TYY2, ELF2, KAISO, ZBED1 и ETV6. Увеличение базальной экспрессии митохондриальных белков в тренированной мышце может быть ассоциировано с активностью транскрипционных факторов GLI3 и HSFY1.

Таким образом, адаптированная к силовым нагрузкам скелетная мышца характеризуется увеличением базальной экспрессии ряда генов, кодирующих рибосомальные и митохондриальные белки.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ №17-04-00878.

#### Литература

Hayot M, Michaud A, Koechlin C, et al (2005) Skeletal muscle microbiopsy: a validation study of a minimally invasive technique. *Eur Respir J* 25:431–440. doi: 10.1183/09031936.05.00053404

Lysenko EA, Popov DV, Vepkhvadze TF, et al (2018) Moderate-intensity strength exercise to exhaustion results in more pronounced signaling changes in skeletal muscles of strength-trained compared with untrained individuals. *JSCR* 00:1–10

### COMPARISON OF THE BASAL TRANSCRIPTOME IN UNTRAINED AND STRENGTH TRAINED HUMAN SKELETAL MUSCLE

E.A.Lysenko<sup>1,2</sup>, P.A.Makhnovskii<sup>1</sup>, E.I. Shagimardanova<sup>3</sup>,  
G.R. Gazizova<sup>3</sup>, O.A. Gusev<sup>3</sup>, D.V.Popov<sup>1,2</sup>, O.L.Vinogradova<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>*SSC RF Institute of biomedical problems RAS,*

*Moscow, Khoroshevskoye sh. 76a, Russia*

<sup>2</sup>*Lomonosov Moscow State University, Moscow, Lomonosov av. 27-1, Russia*

<sup>3</sup>*Kazan Federal University, Kazan, 18 Kremlyovskaya Street, Russia*

Skeletal muscle adapts to strength training by increasing muscle mass and strength. In addition, the baseline content of regulatory and structural proteins, as well as gene expression, may change during training. In skeletal muscle samples of trained volunteers, baseline content of the MHCIIa isoform, FOXO1 protein and myostatin gene expression were higher and content of the MHCIIx isoform and eEF2 protein were lower compared to untrained (Lysenko et al. 2018). We assumed that adaptation of the skeletal muscle to strength training markedly changes the transcriptome at the baseline state.

Muscle samples were taken from m. vastus lateralis using needle micro-biopsy (Hayot et al. 2005) in 8 trained and 8 untrained volunteers. RNA sequencing was performed by an Illumina HiSeq 2000 instrument with a depth of 40 to 50 million reads per sample. Differentially expressed genes (DEG) were determined at  $P_{adj} < 0.01$  (P-value with the Benjamin-Hochberg correction) and at fold change of 1.25.

After comparison of the transcriptome in muscles of trained and untrained volunteers, 662 DEG were detected. For genes with reduced expression in trained skeletal muscle, no significantly enriched GO terms were identified. In

contrast, up-regulated genes in the trained muscle were associated with regulation of ribosomal (45 DEGs) and mitochondrial proteins (51 DEGs). To predict the transcription factors associated with DEGs the transcription factor binding sites in the promoter region of each DEG were identified using HOCOMOCO database. An increased baseline expression of ribosomal proteins in a trained muscle was associated with the transcription factors FLI1, TYY1, TYY2, ELF2, KAISO, ZBED1 and ETV6. An increased baseline expression of mitochondrial proteins in a trained muscle was associated with the transcription factors GLI3 and HSFY1.

In conclusion, skeletal muscle adapted to strength training is characterized by an increased baseline expression of a number of genes encoding ribosomal and mitochondrial proteins.

This work was supported by the RFBR grant №17-04-00878.

#### References

- Hayot M, Michaud A, Koechlin C, et al (2005) Skeletal muscle microbiopsy: a validation study of a minimally invasive technique. *Eur Respir J* 25:431–440. doi: 10.1183/09031936.05.00053404
- Lysenko EA, Popov DV, Vepkhvadze TF, et al (2018) Moderate-intensity strength exercise to exhaustion results in more pronounced signaling changes in skeletal muscles of strength-trained compared with untrained individuals. *JSCR* 00:1–10

## ФАКТОРЫ, ИНИЦИИРУЮЩИЕ ОБРАЗОВАНИЕ ЛАМЕЛЛЫ У ТРОМБОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА

**М.С. Макаров**

*НИИ скорой помощи им. Н.В. Склифосовского ДЗ г. Москвы,  
Москва, Б. Сухаревская пл., д.3., Россия*

При контакте с адгезивным субстратом в тромбоцитах человека происходит активная реорганизация элементов цитоскелета – акто-миозиновых комплексов, спектрина, микротрубочек. В процессе адгезии наиболее активные тромбоциты формируют обширную ламеллу по всему периметру клетки. Сформированная ламелла значительно расширяет площадь контакта тромбоцитов с субстратом и с другими тромбоцитами, что ускоряет их активацию и образование агрегатов. Таким образом, рост ламеллы влияет на интенсивность функционального ответа всей популяции тромбоцитов. Вместе с тем, даже у здоровых людей в норме не все биологически полноценные тромбоциты активно формируют ламеллу при адгезии. Это связано с работой отдельных элементов внутриклеточного сигналинга, контролирующих перестройку цитоскелета. (факторы RhoA, Rac, RTP18). В норме эти факторы запускают разные пути активации тромбоцитов, но при этом способны ограничивать полимеризацию актина. Так, фосфорилированная форма RhoA стимулирует экзоцитоз тромбоцитами секреторных везикул (гранул), тогда как дефосфорилированная RhoA стимулирует активный рост ламеллы без дегрануляции. Поэтому, в условиях, когда требуется со-



здать тромбоцит-насыщенный матрикс, необходимо стимулировать адгезию тромбоцитов без их дегрануляции, т.е. инициировать ламеллообразование. В норме подавление роста ламеллы факторами RhoA, Rac, RPT18 инициируется специфическими белками кальпаинами. Показано, что активность этих белков резко падает под действием специфического ингибитора кальпаинов MDL. В присутствии MDL средняя площадь адгезирующих тромбоцитов возрастает почти в 3 раза. Однако *in vitro* эффект MDL требует использования сильных детергентов, которые не всегда могут быть применимы в регенеративной медицине. Наши исследования показывают, что активный рост ламеллы может быть инициирован под действием некоторых неканонических факторов тромбоцитарной активации. Так, значительное увеличение площади тромбоцитов наблюдается при действии слабо-гипотонических растворов (0,10-0,12 М хлорида натрия), воздействии животных и растительных лектинов, а также некоторых наночастиц, в первую очередь, на основе оксида кремния. Установлено, что субстраты, насыщенные оксидом кремния, резко увеличивают рост ламеллы биологически активных тромбоцитов. Кроме того, установлена возможность предстимуляции тромбоцитов человека с помощью низкоимпульсного лазерного излучения в красном диапазоне. По нашим наблюдениям, при воздействии лазерного света с длиной волны 630-637 нм в течение короткого времени (до 5 мин) *in situ* тромбоциты, насыщенные гранулами, меняют свою форму, становясь более распластанными, и при нанесении на адгезивный субстрат активно формируют ламеллу, переходя в состояние ранней стадии активации. При этом быстрой дегрануляции тромбоцитов не происходит. Ранее нами было показано, что тромбоциты ранней стадии активации могут быть стабилизированы в таком состоянии и могут сохранять секреторные гранулы в своем составе в течение длительного времени. Предстимуляция тромбоцитов с помощью облучения красным светом позволяет ускорить адгезию тромбоцитов на субстрате, что упрощает процедуру их дальнейшей стабилизации. В отсутствие стабилизации высок риск вымывания и потери компонентов гранул. Поэтому при создании тромбоцит-насыщенных матриксов необходимо совмещать инициацию ламеллообразования и стабилизацию гранул в составе тромбоцитов.

## **FACTORS, INITIATING LAMELLA FORMING IN HUMAN PLATELETS**

**M.S. Makarov**

*N.V. Sklifosovsky Research Institute for Emergency Medicine of Moscow  
Healthcare Department, Moscow, B. Sukharevskaya, 3, Russia*

Human platelets' contact with substrate is followed by active cytoskeleton reorganization, involving actin-myosin complex, spectrin, microtubules. During adhesion the most effective platelets form wide lamella around cell perimeter.

Lamella enhances platelet attachment with substrate and other platelets, upraising velocity of common platelet activation and aggregation. Even though, that platelet lamella has functional necessarily, many normal platelets do not form it fluently. This effect is based on work of different factors (RhoA, Rac, PTP18). controlling cytoskeleton reorganization. In norm these factors stimulate major ways of platelet activation, but, on the other hand, they may reduce actin polymerization. Thus, phosphorylated form of RhoA stimulates exocytosis of platelet secretor vesicles (granules), whereas non-phosphorylated RhoA stimulates lamella growth without rapid degranulation. So, creation of platelet-rich matrixes needs to stimulate platelet spreading without degranulation, i.e. needs to initiate lamella forming. In norm anti-spreading effect RhoA, Rac, PTP18 is regulated by calpain proteins. Calpains may be inhibited by specific drug agent MDL. In presence of MDL mean square of spreading platelets rises at 3 times. But in vitro MDL treatment needs detergent using, that may be rejected in biomedicine. According to our study, one could find different non-canonical factors of platelet activation, which could enhance lamella growth. For example, low-hypotonic measures (0,10-0,12 M of sodium chloride) significantly increase area of platelet cover. Similar effect is proved by mammalian and plant lectins and several nanoparticles, especially silicate oxide. It was shown, that silicate oxide – filled matrixes mainly enhance platelet lamella growth. What is more, human platelet could be pre-stimulated with low-dose laser excitation at red zone (630-637 nm). Human platelets, irradiated with red laser at about 5 min, change their shape and form prominent lamella without rapid degranulation, becoming platelets at early activation stage. We found, that such platelets could be stabilized and maintain their granules for long time. Laser pre-stimulation allows to increase velocity of platelet spreading, conforming their stabilization. In absence of stabilization platelet granules could be lost and disappeared. So, creation of platelet rich-matrixes for biomedicine cases needs combining lamella initiation ant platelet granule stabilization.

## **ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ**

### **Na,K-АТФазы И КЛАУДИНОВ**

**А.Г. Марков, И.И. Кривой**

*Санкт-Петербургский государственный университет,*

*Санкт-Петербург, Университетская наб. 7/9, Россия*

Na,K-АТФаза – ферментная система, поддерживающая трансмембранные градиенты  $\text{Na}^+$  и  $\text{K}^+$  за счет активного транспорта этих ионов, что обеспечивает мембранный потенциал и возбудимость, а также ряд других транспортных механизмов клетки. Na,K-АТФаза состоит из транспортной альфа-субъединицы, бета-субъединицы, а также включает белок семейства FXD, являющийся модулятором активности фермента (Clausen et al., 2017). Благодаря ряду структурных доменов Na,K-АТФаза способна образовывать

мультимолекулярные комплексы с мембранными и цитоскелетными белками и участвовать в качестве скаффолда в формировании функциональных микрокомпарментов клетки и в межклеточных взаимодействиях.

Интегральные белки плазматической мембраны семейства клаудинов (24 члена семейства) входящие в состав структуры плотных контактов, являются основными молекулярными детерминантами, определяющими парацеллюлярную проницаемость и барьерные свойства эпителиальных тканей: эпителия, эндотелия и мезотелия (Zihni et al. 2016). Исследование функций этих белков лежит в основе понимания векторности транспортных процессов в эпителии, а также в функционировании тканевых барьеров, которые отделяют внутреннюю среду организма от окружающей среды и обеспечивают компарментализацию процессов, протекающих в различных органах.

Новейшие данные свидетельствуют, что Na,K-АТФаза не только критически важна для поддержания полярности и транспорта через эпителиальные клетки, но участвует также в формировании плотных контактов и в регуляции их структуры и проницаемости за счет функционального взаимодействия между Na,K-АТФазой и клаудинами (Dietze et al., 2015). Основным инструментом исследования этого взаимодействия является специфический ингибитор Na,K-АТФазы убаин. Внеклеточные участки альфа-субъединицы Na,K-АТФазы формируют специфический рецептор для дигиталисоподобных лигандов растительного и животного происхождения (убаин, маринобуфагенин и др.), которые имеют сходную стероидную структуру (Lingrel, 2010). Из различных тканей и биологических жидкостей животных и человека выделены эндогенные аналоги убаина и других специфических лигандов Na,K-АТФазы. Концентрация эндогенного убаина в плазме крови и цереброспинальной жидкости в норме лежит в наномолярном диапазоне концентраций, но возрастает при ряде патофизиологических состояний. Эндогенный убаин синтезируется в коре надпочечников и в гипоталамусе и предполагается, что этот циркулирующий лиганд может действовать как гормон (Blaustein, 2018).

В опытах с культивированием клеток IPEC-J2 показана способность убаина в наномолярных концентрациях эффективно влиять на проницаемость эпителия не только в условиях уже сформированного монослоя клеток, но и на сам процесс формирования барьерных свойств эпителия. Поскольку клетки линии IPEC-J2 экспрессируют клаудины, преимущественно уменьшающие проницаемость эпителия, эти клетки можно рассматривать как потенциально перспективную модель для изучения функционального взаимодействия Na,K-АТФазы и однородного спектра уплотняющих клаудинов.

Обсуждается возможность реализации эффектов наномолярных концентраций убаина через активацию Na,K-АТФазы и изменение ионного баланса. Однако имеющиеся данные подтверждают скорее Src-зависимый сигнальный механизм регуляции фенотипа эпителия убаином.

Работа поддержана грантом РФФ № 18-15-00043.

### **Литература**

- Blaustein M.P. The Pump, the Exchanger and the Holy Spirit: Origins and 40 year evolution of ideas about the ouabain-Na<sup>+</sup> pump endocrine system. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2018. 314(1): C3–C26.
- Clausen M.V., Hilbers F., Poulsen H. The Structure and Function of the Na,K-ATPase Isoforms in Health and Disease. *Front Physiol*. 2017. 8:371.
- Dietze R., Shihan M., Stammler A., Konrad L., Scheiner-Bobis G. Cardiotoxic steroid ouabain stimulates expression of blood–testis barrier proteins claudin-1 and -11 and formation of tight junctions in Sertoli cells. *Mol Cell Endocrinol*. 2015. 405: 1–13.
- Lingrel J.B. The physiological significance of the cardiotoxic steroid/ouabain-binding site of the Na,K-ATPase. *Annu Rev Physiol*. 2010. 72: 395–412.
- Zihni C., Mills C., Matter K., Balda M.S. Tight junctions: from simple barriers to multifunctional molecular gates. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2016. 17(9): 564–580.

## **FUNCTIONAL INTERACTION BETWEEN Na,K-ATPase AND CLAUDINS**

**A.G. Markov, I.I. Krivoi**

*St. Petersburg State University, St. Petersburg, University emb., 7/9, Russia*

Na,K-ATPase is an enzyme that maintains Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> ion gradients across plasma membrane by active transport thus providing membrane potential, excitability and the number of other cell transporting mechanisms. Na,K-ATPase consists of transporting alpha-subunit, beta-subunit and includes FXYD protein considered to be a modulator of enzyme activity (Clausen et al., 2017). Owing to a series of structural domains the Na,K-ATPase is capable of forming multimolecular complexes with membrane and cytoskeletal proteins and participating as a scaffold in formation of functional cell microcompartments and in intercellular interactions

The integral proteins of the plasma membrane of the claudins family (24 family members) that form the tight junction are the main molecular component that determines the paracellular permeability and barrier properties of epithelial tissues: epithelium, endothelium and mesothelium (Zihni et al., 2016). Investigation of claudins function is necessary for understanding of transport process in epithelium and functioning of tissues barrier, which act as a surface structure between environment and internal milieu and form the basis for compartmentalization of processes.

While the Na,K-ATPase is critical for the polarity and vectorial transport across epithelial cells, modern data indicates an additional role in the formation of tight junctions and in the regulation of tight junction structure and permeability due to functional interaction between Na,K-ATPase and claudins (Dietze et al., 2015). Ouabain, specific Na,K-ATPase inhibitor, serves as the main tool in such investigations. Extracellular loops of the alpha-subunit of Na,K-ATPase form a specific receptor for digitalis-like ligands of plant and animal origins (ouabain, marinobufagenin etc), which share a similar steroid structure (Lingrel, 2010). An endogenous analogs of ouabain and other specific lig-

ands of Na,K-ATPase have been isolated from various tissues and biological fluids of animals and humans. The concentration of endogenous ouabain in the blood plasma and the cerebrospinal fluid is normally in the nanomolar concentration range, but can increase under a number of pathophysiological conditions. Endogenous ouabain was found to be synthesized in the adrenal cortex and the hypothalamus raising the possibility that this circulating ligand may act as a hormone (Blaustein, 2018).

In experiments with the cultivation of IPEC-J2 cells, the ability of ouabain in nanomolar concentrations to effectively influence epithelial permeability was demonstrated. This effect was observed not only in the conditions of an already formed cell monolayer, but also in the process of formation of barrier properties of the epithelium. Since IPEC-J2 cells express claudins, which predominantly reduce the permeability of the epithelium, these cells can be considered as a potentially promising model for studying the functional interaction of the Na,K-ATPase and the uniform spectrum of sealing claudins.

The possibility that effects of nanomolar ouabain concentrations are realized via activation of the Na,K-ATPase and changes in the ionic balance is discussed. However, the available data confirm the Src-dependent signaling mechanism of epithelial phenotype regulation by ouabain.

Supported by RSF grant № 18-15-00043.

### References

- Blaustein M.P. The Pump, the Exchanger and the Holy Spirit: Origins and 40 year evolution of ideas about the ouabain-Na<sup>+</sup> pump endocrine system. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2018. 314(1): C3–C26.
- Clausen M.V., Hilbers F., Poulsen H. The Structure and Function of the Na,K-ATPase Isoforms in Health and Disease. *Front Physiol.* 2017. 8:371.
- Dietze R., Shihan M., Stammler A., Konrad L., Scheiner-Bobis G. Cardiotoxic steroid ouabain stimulates expression of blood–testis barrier proteins claudin-1 and -11 and formation of tight junctions in Sertoli cells. *Mol Cell Endocrinol.* 2015. 405: 1–13.
- Lingrel J.B. The physiological significance of the cardiotoxic steroid/ouabain-binding site of the Na,K-ATPase. *Annu Rev Physiol.* 2010. 72: 395–412.
- Zihni C., Mills C., Matter K., Balda M.S. Tight junctions: from simple barriers to multifunctional molecular gates. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2016. 17(9): 564–580.

## ВЛИЯНИЕ $\beta$ -ЦЕПИ ТРОПОМИОЗИНА НА СВОЙСТВА ТОНКОЙ НИТИ И ХАРАКТЕРИСТИКИ АКТИН-МИОЗИНОВОГО ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ В МЫШЦЕ

А.М. Матюшенко<sup>1,2</sup>, Д.С. Логвинова<sup>1,2</sup>, Д.В. Щепкин<sup>1</sup>,  
Г.В. Копылова<sup>1</sup>, Д.И. Левицкий<sup>2</sup>, С.Ю. Бершицкий<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт иммунологии и физиологии УрО РАН, Екатеринбург, Россия;

<sup>2</sup>Институт биохимии им. А.Н. Баха, ФИЦ биотехнологии РАН,  
Москва, Россия

Целью работы было исследование того, как  $\beta$ -цепь в составе молекулы тропомиозина модифицирует свойства тонкой нити и

характеристики актин-миозинового взаимодействия. Для этого в *in vitro* подвижной системе зарегистрированы скорости скольжения реконструированных тонких нитей, состоящих из филаментарного актина, скелетного тропонина и трех разных димеров тропомиозина,  $\alpha$ - и  $\beta$ -гомомеров и  $\alpha\beta$ -гетеродима, по поверхности с иммобилизованным скелетным миозином. Результаты показывают, что присутствие  $\beta$ -цепи в молекуле тропомиозина, как в гомо-, так и в гетеродимере снижает максимальную скорость скольжения тонких нитей по скелетному миозину и ее кальциевую чувствительность. При этом кальциевая чувствительность  $\alpha\beta$ -гетеродимера и  $\beta\beta$ -гомодимера одинакова.

С помощью двухлучевой оптической ловушки и разработанного нами метода (Nabiev et al., Biophys. J., 2015) была измерена изгибная жесткость тонких нитей с теми же димерами тропомиозина. Установлено, что наибольшей изгибной жесткостью и максимальной скоростью скольжения обладают тонкие нити, содержащие  $\alpha$ -гомодимер тропомиозина, а наименьшими –  $\beta$ -гомодимер. Тонкие нити с  $\alpha\beta$ -гетеродимером показывают промежуточные значения обоих этих параметров.

Механическая прочность актин-миозинового комплекса и длительность одиночного взаимодействия головки миозина с реконструированное тонкой нитью с исследуемыми димерами тропомиозина, измеренные оптической ловушкой, прямо коррелируют с изгибной жесткостью тонкой нити, которая, в свою очередь зависит от характеристик тропомиозина в ее составе.

Исследовано влияние миопатических мутаций R133W и N202K в  $\beta$ -цепи тропомиозина на характеристики взаимодействия тонких нитей со скелетным миозином. В экспериментах в *in vitro* подвижной системе обнаружено, что эти мутации как в  $\beta\beta$ -гомодимере, так и в  $\alpha\beta$ -гетеродимере драматически снижают максимальную скорость скольжения тонких нитей по быстрому скелетному миозину и ее кальциевую чувствительность.

Полученные данные показывают, что свойства  $\alpha\beta$ -гетеродимера с миопатическими мутациями значительно отличаются от свойств  $\beta\beta$ -гомодимера с такими же заменами. Различие в свойствах  $\alpha\beta$ -гетеродимера и  $\alpha\alpha$ -гомодимера указывает на физиологическую необходимость образования гетеродимера. Результаты демонстрируют также, что  $\alpha\beta$ -гетеродимер отличается от  $\alpha\alpha$ -гомодимера по регуляторным свойствам. Максимальная скорость скольжения тонких нитей с  $\alpha\beta$ -гетеродимером тропомиозина и ее кальциевая чувствительность были меньше, чем с  $\alpha\alpha$ -гомодимером. Эти различия могут иметь важное значение для работы скелетных мышц, которые подвергаются различным нагрузкам. Разница в содержании гетеродимера в скелетных мышцах может быть одним из механизмов, контролирующих функционирование их разных типов.

Работа поддержана программой АААА-А18-118020590135-3.

**THE EFFECT OF THE TROPOMYOSIN  $\beta$ -CHAIN  
ON THE PROPERTIES OF A THIN FILAMENT  
AND THE CHARACTERISTICS OF THE ACTIN-MYOSIN  
INTERACTION IN MUSCLE**

**A.M. Matyushenko<sup>1,2</sup>, D.S. Logvinova<sup>1,2</sup>, D.V. Shchepkin<sup>1</sup>,  
G.V. Kopylova<sup>1</sup>, D.I. Levitsky<sup>2</sup>, S.Y. Bershitkiy<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Institute of Immunology and Physiology RAS, Yekaterinburg, Russia;

<sup>2</sup>A.N. Bach Institute of Biochemistry, Research Center of Biotechnology RAS,  
Moscow, Russia

The work aimed to study how the  $\beta$ -chain in the tropomyosin molecule modifies the properties of a thin filament and the characteristics of the actin-myosin interaction. For this, the sliding velocity of reconstructed thin filaments consisting of filamentary actin, skeletal troponin, and three different tropomyosin dimers,  $\alpha$ - and  $\beta$ -homodimers and  $\alpha\beta$ -heterodimer, over the surface with immobilized skeletal myosin was recorded in an *in vitro* motility assay. The results show that the presence of the  $\beta$ -chain in the tropomyosin molecule, both in the homo- and in the heterodimer, reduced the maximum sliding velocity of thin filaments along the skeleton myosin and its calcium sensitivity. The calcium sensitivity of the  $\alpha\beta$ -heterodimer and  $\beta\beta$ -homodimer was the same.

Using a two-beam optical trap and the method we developed (Nabiev *et al.*, *Biophys. J.*, 2015), the bending stiffness of thin filaments with the same tropomyosin dimers was measured. It has been established that thin filaments containing tropomyosin  $\alpha$ -homodimer have the highest bending stiffness and maximum sliding velocity, and those containing  $\beta$ -homodimer have the lowest one. Thin threads with  $\alpha\beta$ -heterodimer showed intermediate values of both of these parameters.

The mechanical strength of the actin-myosin complex and the duration of a single interaction of the myosin head with the reconstructed thin filament containing the tropomyosin dimers measured by the optical trap, directly correlate with the bending stiffness of the thin filament, which in turn depends on the characteristics of tropomyosin in its composition.

The effect of myopathic mutations R133W and N202K in the  $\beta$ -chain of tropomyosin on the interaction characteristics of thin filaments with skeletal myosin was studied. In the *in vitro* motility assay experiments, it was found that these mutations both in the  $\beta\beta$ -homodimer and in the  $\alpha\beta$ -heterodimer dramatically reduce the maximum sliding velocity of the filaments over fast skeletal myosin and calcium sensitivity of the velocity.

The data obtained show that the properties of the  $\alpha\beta$ -heterodimer with myopathic mutations are significantly different from the properties of the  $\beta\beta$ -homodimer with the same substitutions. The difference in the properties of the  $\alpha\beta$ -heterodimer and the  $\alpha\alpha$ -homodimer indicates the physiological necessity of the formation of a heterodimer. The results also demonstrate that the  $\alpha\beta$ -heterodimer differs from the  $\alpha\alpha$ -homodimer in its regulatory properties. The maximum sliding speed of thin filaments with tropomyosin  $\alpha\beta$ -heterodimer and

its calcium sensitivity were less than that with  $\alpha\alpha$ -homodimer. These differences may be necessary for the performance of skeletal muscles that are subjected to various stresses. The difference in the heterodimer content in skeletal muscle can be one of the mechanisms controlling the functioning of their different types.

The work is supported by the program АААА-А18-118020590135-3.

## **РОЛЬ ТРАНСКРИПЦИИ В РЕГУЛЯЦИИ СОДЕРЖАНИЯ ВЫСОКОПРЕДСТАВЛЕННЫХ БЕЛКОВ В СКЕЛЕТНОЙ МЫШЦЕ ЧЕЛОВЕКА**

**П.А. Махновский<sup>1</sup>, В.Г. Згода<sup>2</sup>, Г.Р. Газизова<sup>3</sup>, Е.И. Шагимарданова<sup>3</sup>,  
Е.А. Лысенко<sup>1,4</sup>, О.А. Гусев<sup>3</sup>, Д.В. Попов<sup>1,4</sup>**

*<sup>1</sup>Институт медико-биологических проблем РАН,  
Москва, Хорошевское шоссе, 76А, Россия*

*<sup>2</sup>НИИ биомедицинской химии имени В.Н.Ореховича,  
Москва, Погодинская улица, 10, Россия*

*<sup>3</sup>Казанский федеральный университет,  
Казань, Кремлевская улица, 18, Россия*

*<sup>4</sup>МГУ имени М.В. Ломоносова,  
Москва, Ломоносовский проспект, 27-1, Россия*

Цель работы – сопоставить вызванные аэробной тренировкой изменения протеома с изменениями транскриптома в скелетной мышце человека.

Семь нетренированных мужчин в течение 2 месяцев тренировались на велоэргометре (1 час/день; пять раз в неделю). После тренировочного периода, в базальных пробах *m. vastus lateralis* были оценены изменения протеома и транскриптома. Для оценки транскриптома использовали высокопроизводительное секвенирование мРНК, для оценки протеома был проведен панорамный масс-спектрометрический анализ с использованием изобарической метки iTRAQ.

Мы обнаружили около 800 белков (главным образом, высокопредставленных), среди которых около 400 значимо увеличили содержание после тренировочного периода. Только для части из них увеличение содержания белка сопровождалось повышением уровня мРНК: эта группа была связана с белками внеклеточного матрикса. Значимое увеличение содержания белка при неизменном уровне мРНК наблюдалось для генов, кодирующих митохондриальные белки.

Таким образом, содержание высокопредставленных мышечных белков, выполняющих различные функции, регулируется по-разному: увеличение содержания митохондриальных белков не зависит от изменения содержания мРНК, то есть не регулируется на уровне транскрипции, в то время как увеличение содержания белков внеклеточного матрикса регулируется на транскрипционном уровне.

Работа поддержана грантом РФФИ № 17-00-00308К(17-00-00242).



**THE ROLE OF TRANSCRIPTION IN REGULATION  
OF HIGHLY ABUNDANT PROTEIN CONTENT  
IN HUMAN SKELETAL MUSCLE**

**P.A. Makhnovskii<sup>1</sup>, V.G. Zgoda<sup>2</sup>, G.R. Gazizova<sup>3</sup>, E.I. Shagimardanova<sup>3</sup>,  
E.A. Lysenko<sup>1,4</sup>, O.A. Gusev<sup>3</sup>, D.V. Popov<sup>1,4</sup>, O.L. Vinogradova<sup>1,4</sup>**

<sup>1</sup>*Institute of Biomedical Problems of the RAS,  
Moscow, Khoroshevskoe shosse, 76A, Russia*

<sup>2</sup>*Orekhovich Research Institute of Biomedical Chemistry,  
Moscow, Pogodinskaja str., 10, Russia*

<sup>3</sup>*Kazan Federal University, Kazan, Kremlyovskaya st., 18, Russia*

<sup>4</sup>*M.V. Lomonosov Moscow State University,  
Moscow, Lomonosovskiy Prospekt, 27-1, Russia*

The aim of the study is to compare the changes of the proteome caused by aerobic training with transcriptome changes in human skeletal muscle.

Seven untrained men performed aerobic training program for 2 months (1 hour / day; five times a week) on a cycle ergometer. After the training period, in the baseline samples of m. vastus lateralis changes in the proteome and transcriptome were estimated. High-throughput mRNA sequencing was used to evaluate the transcriptome, and panoramic mass spectrometric analysis was performed using the iTRAQ isobaric label to evaluate the proteome.

We found ~ 800 proteins (mainly highly abundant), among which about 400 significantly increased expression after the training period. Only for a part of them, an increase in the protein content was accompanied by an increase in the level of mRNA: this group was associated with extracellular matrix proteins. A significant increase in the protein content with a constant mRNA level was observed for genes encoding mitochondrial proteins.

Thus, the content of highly abundant muscle proteins that perform various functions is regulated differently: an increase in the content of mitochondrial proteins does not depend on changes in the content of mRNA, i.e. is not regulated at the transcription level, while the increasing content of the extracellular matrix proteins is regulated at the transcriptional level.

This work was supported by the RFBR grant No. 17-00-00308K (17-00-00242).

**ВЛИЯНИЕ L-АРГИНИНА НА КАЛЬПАИН-ЗАВИСИМУЮ  
ДЕГРАДАЦИЮ БЕЛКОВ ЦИТОСКЕЛЕТА И ЖЕСТКОСТЬ  
M.SOLEUS В УСЛОВИЯХ МОДЕЛИРУЕМОЙ НЕВЕСОМОСТИ**

**И.Ю. Мельников<sup>1</sup>, К.А. Шарло<sup>1</sup>, И.М. Вихлянец<sup>2,3</sup>,  
С.А. Тыганов<sup>1</sup>, Б.С. Шенкман<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>*Государственный научный центр российской федерации  
Институт медико-биологических проблем РАН, Москва, Россия*

<sup>2</sup>*Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино*

<sup>3</sup>*Пущинский государственный естественно-научный институт, Пущино*

В постуральной мускулатуре млекопитающих на фоне реальной или моделируемой гравитационной разгрузки происходит падение мышечной жесткости. Известно, что основным источником мышечной эластичности считается титин и другие структурные белки (небулин, альфа-актинин-2 и -3, десмин, телетонин). Показано, что NO, снижающийся при вывешивании, может участвовать в регуляции белкового обмена в скелетных мышцах путем ингибирования кальпаин-зависимой деградациии белка (Kanzaki K. et al 1985, Y.N. Lomonosova et al. 2011). В связи с этим мы предположили, что NO может быть связан с регуляцией метаболизма структурных белков в условиях вывешивания задних конечностей. Чтобы исследовать эту гипотезу, мы обрабатывали животных предшественником NO L-аргинином во время функциональной разгрузки и оценивали количество каркасных белков m. soleus.

Самцы крыс Вистар весом 180-200 г были разделены на три группы: 1) виварный контроль (С), 2) 7HS – группа 7-суточного вывешивания и 3) HSA - группа 7-суточного вывешивания с ежедневными инъекциями L-аргинина (500 мг/кг) в течение периода проведения эксперимента. С помощью вестерн-блоттинга определили содержание белков: альфа-актинина-2 альфа-актинина-3, небулина, а так же с помощью электрофореза - содержание телетонина и десмина в тотальной мышечной фракции. Группам С и HS ежедневно вводили эквивалентную дозу физраствора. Пассивную жесткость мышц измеряли с помощью установки Aurora Scientific 1310A: для измерений жесткости на сухожилиях мышца прикрепляется к датчику силы с одного конца и к фиксированному крепежу с другого. Тонус мышцы измерялся путем растяжения мышцы на 15% от оптимальной длины. Использовались максимальные показатели силы после 10 повторов для каждой мышцы, после чего брался средний показатель силы, соотносившийся с площадью поперечного сечения мышцы..

После 7-суточного вывешивания показано, что в группе HS пассивная жесткость камбаловидной мышцы снизилась ( $p < 0,05$ ) на 28% по сравнению с контрольной группой. Для группы HSA не наблюдалось снижения жесткости по сравнению с группой контроля. После 7 суток было выявлено достоверное снижение ( $p < 0,05$ ) уровня содержания альфа-актинина 2 на 55% в группе вывешивания по сравнению с группой контроля, которое отсутствовало в группе с введением L-аргинина. При этом не было выявлено различий в уровне содержания альфа-актинина 3 между всеми экспериментальными группами. Также, не было обнаружено достоверных различий в уровне десмина у групп контроля, вывешивания и с введением L-аргинина. Однако было выявлено достоверное снижение ( $p < 0,05$ ) содержания телетонина на 35% в группе вывешивания по сравнению с группой контроля. Данное снижение предотвращалось введением L-аргинина. Также, введение L-аргинина предотвратило протеолиз гигантских белков саркомера титина и небулина. Было отмечено достоверное снижение ( $p < 0,05$ ) содержания T1 изоформы титина на 20% в группе вывешивания на фоне кон-

троля, которое предотвращалось введением L-аргинина. Содержание T2 изоформы титина достоверно увеличивалось ( $p < 0,05$ ) на 48% в группе HS. Для небулина в группе HS наблюдалось ( $p < 0,05$ ) снижение на 38%.

Таким образом нами впервые была подтверждена гипотеза о том, что использование L-аргинина, за счет предотвращения кальпаин-зависимого распада цитоскелетных белков позволяет сохранить жесткость *m. soleus*.

Работа поддержана грантом РФФИ 16-04-00529.

**AN EFFECT OF L-ARGININE ON CALPAINE-DEPENDENT  
DEGRADATION OF CYTOSKELETAL PROTEINS AND A STIFFNESS  
OF *M.SOLEUS* UNDER GRAVITATIONAL UNLOADING CONDITIONS**

**I.Y. Melnikov<sup>1</sup>, K.A. Sharlo<sup>1</sup>, I.M. Vikhlyantsev<sup>2,3</sup>,  
S.A. Tyganov<sup>1</sup>, B.S. Shenkman<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>*Institute of Biomedical Problems, RAS, Moscow, Russia*

<sup>2</sup>*Institute of Theoretical and Experimental Biophysics RAS,  
Pushchino, Moscow Region, Russia*

<sup>3</sup>*Pushchino State Institute of Natural Sciences, Pushchino, Moscow Region, Russia*

Passive stiffness was found to be decreased in mammals soleus muscle under unloading conditions. It is known, that titin and other structural proteins (nebulin, alpha-actinin-2 and -3, desmin, teletonin) is considered to be the major source of muscle elasticity. It is shown that NO which decreases during unloading may be involved in regulation of protein metabolism in skeletal muscle by the inhibition of calpain-dependent protein degradation (Kanzaki K. et al 1985, Y.N. Lomonosova et al. 2011). Therefore, we have supposed that NO can be related to the regulation of structural protein metabolism upon hindlimb suspension conditions. To investigate this hypothesis, we treated animals with the NO precursor L-arginine during functional unloading and estimated the content of soleus muscle scaffold proteins.

Male Wistar rats weighing 180–200 g were randomly divided into three groups: 1) vivarium control (C), 2) 7HS — hindlimb suspension for 7 days, and 3) HSA — hindlimb suspension for 7 days with daily L-arginine injections (500 mg / kg). Groups C and HS was treated with daily equivalent dose of saline. Alpha-actinin-2, alpha-actinin-3, teletonin and desmin content was measured in total muscle fraction using Western blot. Nebulin and titin content was measured using gel-electrophoresis. The passive muscle stiffness was measured using the Aurora Scientific Dual-Mode Lever System: muscle was attached to a force transducer with one tendon and to a fixed hook from the other end. Muscle stiffness was measured by stretching the muscle by 15% of the optimal length. The maximum strength was measured after 10 repetitions and then normalized to muscle CSA.

After a 7-day HS the passive soleus muscle stiffness was significantly ( $p < 0,05$ ) decreased by 28% compared to control group, and there was no chang-

es in HSA group compared to control group. After 7 days, there was a significant ( $p < 0,05$ ) reduction in the of alpha-actinin 2 content by 55% in the HS compared to control, which was absent in the group with L-arginine. It was also found a similar decrease in the content of teletonin by 35% in the HS group compared with the control group, which was tooprevented by the L-arginine treatment. However, there were no differences in the alpha-actinin-3 and desmin content among all experimental groups.

Also, the L-arginine injection prevented the proteolysis of giant sarcomere proteins titin and nebulin. A significant ( $p < 0,05$ ) decrease in the T1 titin isoform content by 20% was noted in the HS compared to control, which was also prevented by the L-arginine treatment. The T2 titin isoform significantly increased ( $p < 0.05$ ) by 48% in the HS group. For nebulin in the HS group, a decrease of 38% was observed ( $p < 0.05$ ).

Thus, we confirm the hypothesis that using of L-arginine allow to maintain soleus muscle stiffness by preventing calpain-dependent degradation of cytoskeletal proteins.

This work is supported with RSSF grant 16-04-00529.

## **ГАЛОПЕРИДОЛ МОДУЛИРУЕТ ВЛИЯНИЕ ГЛУТОКСИМА НА ТРАНСПОРТ $\text{Na}^+$ В КОЖЕ ЛЯГУШКИ**

**А.В. Мельницкая, З.И. Крутецкая, Н.И. Крутецкая, В.Г. Антонов**  
*Санкт-Петербургский государственный университет, Университетская  
наб. 7/9, Санкт-Петербург, 199034 Россия*

Кожа амфибий – классический модельный объект для исследования механизмов транспорта ионов через биологические мембраны. Транспорт  $\text{Na}^+$  в осморегулирующих эпителиях представляет собой сложную, многокомпонентную систему, работа которой обеспечивает создание и поддержание электролитического и водного гомеостаза. Различные белковые компоненты этой системы могут являться мишенью для окислительного стресса. Ранее [1] нами было обнаружено, что транспорт  $\text{Na}^+$  в коже лягушки модулируется различными окисляющими и восстанавливающими агентами. Впервые было показано, что окисленный глутатион (GSSG) и препарат глутоксим® (динатриевая соль GSSG с нанодобавкой *d*-металла, “ФАРМА–ВАМ”, Россия), приложенные к базолатеральной поверхности кожи лягушки, имитируют действие инсулина и стимулируют трансэпителиальный транспорт  $\text{Na}^+$ . Сигма-1 рецепторы представляют собой уникальные лигандрегулируемые молекулярные шапероны, локализованные как в плазмалемме, так и в мембране эндоплазматического ретикулума на границе с митохондриями. Эти рецепторы широко экспрессированы в центральной нервной системе и в периферических тканях, в том числе в клетках почки и печени [2]. Их лигандами являются эндогенные стероиды, антидепрессанты, антипсихотические, противосудорожные и анальгетические средства [3]. Сигма-1 рецепторы взаимодействуют с многочисленными

белками-мишенями, включая ионные каналы и рецепторы, а также участвуют в модуляции многих клеточных процессов [4]. Ранее нами было показано, что антагонист рецепторов сигма-1 галоперидол подавляет транспорт  $\text{Na}^+$  в коже лягушки [5]. В связи с этим, представлялось целесообразным исследовать участие сигма-1 рецепторов в регуляции глутоксिमом транспорта  $\text{Na}^+$  в коже лягушки. В экспериментах использовали антагонист сигма-1 рецепторов – нейролептик галоперидол, широко используемый при лечении шизофрении.

**Материалы и методы.** Опыты проводили на самцах лягушки *Rana temporaria*. Для регистрации вольт-амперных характеристик (ВАХ) кожи лягушки использовали автоматизированную установку фиксации потенциала. В интервалах между измерениями ВАХ трансэпителиальный потенциал ( $V_T$ ) кожи поддерживали при 0 мВ (режим короткого замыкания) или при потенциале открытой цепи  $V_{OC}$  ( $V_{OC} = V_T$  при трансэпителиальном токе  $I_T = 0$ ). Из ВАХ определяли электрические параметры кожи: ток короткого замыкания  $I_{SC}$  ( $I_{SC} = I_T$  при  $V_T = 0$ ),  $V_{OC}$  и трансэпителиальную проводимость  $g_T$ . Транспорт  $\text{Na}^+$  оценивали как амилорид-чувствительный  $I_{SC}$ . Статистический анализ проводили с применением критерия *t* Стьюдента. Данные представлены в виде  $x \pm s_x$ .

**Результаты и обсуждение.** Значения электрических характеристик кожи лягушки в контроле составили (по данным 10 экспериментов):  $I_{SC} = 24,46 \pm 4,08$  мкА,  $V_{OC} = -80,67 \pm 12,35$  мВ,  $g_T = 0,27 \pm 0,12$  мСм. Глутоксим (100 мкг/мл), приложенный к базолатеральной поверхности кожи лягушки, подобно инсулину, стимулировал транспорт  $\text{Na}^+$ . После приложения глутоксима,  $I_{SC}$  возрос на  $41,13 \pm 8,01$  %;  $V_{OC}$  – на  $49,31 \pm 8,34$  %; величина  $g_T$  не изменилась. Обнаружено, что обработка кожи лягушки галоперидолом снижает стимулирующее влияние глутоксима на транспорт  $\text{Na}^+$ . В среднем (по данным 10 экспериментов) после обработки апикальной или базолатеральной поверхности кожи 100 мкг/мл галоперидола в течение 30 минут перед приложением к базолатеральной поверхности кожи 100 мкг/мл глутоксима  $I_{SC}$  увеличился на  $25,34 \pm 7,12$  или  $30,02 \pm 9,34$  %,  $V_{OC}$  увеличился на  $32,19 \pm 8,41$  или  $29,76 \pm 7,48$  %, а  $g_T$  – на  $6,37 \pm 2,07$  или  $9,13 \pm 2,09$  %, при приложении галоперидола со стороны апикальной или базолатеральной поверхности кожи, соответственно. Таким образом, в настоящей работе впервые на эпителии кожи лягушки показано, что антагонист рецепторов сигма-1 галоперидол снижает стимулирующее влияние глутоксима на транспорт  $\text{Na}^+$ , что свидетельствует об участии рецепторов сигма-1 в сигнальных каскадах, запускаемых глутоксिमом в эпителии кожи лягушки, и приводящих к стимуляции транспорта  $\text{Na}^+$ .

#### Литература

1. Krutetskaya Z.I., Lebedev O.E., Melnitskaya A.V., et al. // Dokl. Biol. Sci. 2008. Vol. 421. P. 235-238.
2. Hellewell S.B., Bruce A., Feinstein G., et al. // Eur. J. Pharmacol. 1994. V. 268. P. 9-18.
3. Cobos E.J., Entrena J.M., Nieto F.R., et al. // Curr. Neuropharmacol. 2008. V. 6. P. 344-366.

4. Su T.-P., Hayashi T., Maurice T., et al. // Trends Pharmacol. Sci. 2010. V. 31. P. 557–566.
5. Krutetskaya Z.I., Melnitskaya A.V., Butov S.N., et al. // In Modern trends in biological physics and chemistry. BPPC – 2017: proceedings of XII International science-technical conference. Sevastopol State University. 2017. 536 p. P. 272 – 275.

## **HALOPERIDOL MODULATES THE EFFECT OF GLUTOXIM ON Na<sup>+</sup> TRANSPORT IN FROG SKIN**

**A.V. Melnitskaya, Z.I. Krutetskaya, N.I. Krutetskaya, V.G. Antonov**  
*Saint-Petersburg State University, 7/9 University emb.,  
Saint-Petersburg, 199034, Russia*

The skin of amphibians is a classic model object for studying the mechanisms of ion transport through biological membranes. Na<sup>+</sup> transport in osmoregulatory epithelia is a complex multicomponent system whose functioning ensures the creation and maintenance of electrolytic and water homeostasis. Protein components of this system may be a target for oxidative stress. Previously [1], we found that Na<sup>+</sup> transport in the epithelial cells of the frog skin is modulated by oxidizing and reducing agents. In the cited paper, we for the first time showed that oxidized glutathione (GSSG) and drug glutoxim® (disodium salt of GSSG with a nano additive of a d-metal, PHARMA-VAM, Russia), when applied to the basolateral surface of the frog skin, mimic the effect of insulin and stimulate the transepithelial transport of Na<sup>+</sup>. Sigma-1 receptors are unique ligand-regulated molecular chaperones localized in endoplasmic reticulum membranes at the interface with mitochondria. These receptors are widely expressed in the central nervous system and in peripheral tissues, including kidney and liver cells [2]. Their ligands are endogenous steroids, antidepressants, antipsychotics, anticonvulsants, and analgesics [3]. Sigma-1 receptors interact with target proteins, including ion channels and receptors, and modulate many cellular processes [4]. We have previously shown that the sigma-1 receptor antagonist haloperidol significantly decreases Na<sup>+</sup> transport in the frog skin epithelium [5]. In view of above, it was reasonable to study the possible involvement of sigma-1 receptors in the effect of glutoxim on Na<sup>+</sup> transport in the frog skin epithelium. In experiments, we used the sigma-1 receptor antagonist neuroleptic haloperidol, which is widely used for the treatment of schizophrenia.

**Materials and methods.** Experiments were performed on frog *Rana temporaria* males. Frog skin electrical characteristics were measured with the automatic device for voltage-clamp and registration of current-voltage relations (I–V relations). To measure I–V relations, transepithelial potential  $V_T$  was changed periodically to a series of nonzero values. From skin I–V relations the electrical characteristics of frog skin were determined: the short – circuit current ( $I_{SC}$ ), the open – circuit potential ( $V_{OC} = V_T$  at the total transepithelial current -  $I_T = 0$ ), and transepithelial conductance ( $g_T$ ). The transepithelial Na<sup>+</sup> transport was measured as amiloride – sensitive short – circuit current ( $I_{SC}$ ). Statistical analysis was performed using Student’s t-test. The data are presented as  $\bar{x} \pm s_x$ .

**Results and discussion.** The mean values of frog skin electrical characteristics in control (from 10 experiments) are:  $I_{SC} = 24,46 \pm 4,08 \mu A$ ,  $V_{OC} = -80,67 \pm 12,35$  mV, and  $g_T = 0,27 \pm 0,12$  mS. Glutoxim (100  $\mu g/ml$ ), applied to the basolateral surface of the intact frog skin, stimulated  $Na^+$  transport. After glutoxim application  $I_{SC}$  increased in average by  $41,13 \pm 8,01$  %;  $V_{OC}$  – by  $49,31 \pm 8,34$  %; and  $g_T$  did not change (the data from 10 experiments). We found that the pretreatment of the frog skin with haloperidol (100  $\mu g/ml$ ) for 30 min before the addition of glutoxim inhibited the stimulatory effect of glutoxim on  $Na^+$  transport. On average (the results of 10 experiments), after the preincubation of the apical or basolateral skin surface with 100  $\mu g/ml$  haloperidol for 30 min before application of glutoxim to the frog skin basolateral surface,  $I_{SC}$  increased by  $25,34 \pm 7,12$  or  $30,02 \pm 9,34$  %,  $V_{OC}$  increased by  $32,19 \pm 8,41$  or  $29,76 \pm 7,48$  %, and  $g_T$  – by  $6,37 \pm 2,07$  or  $9,13 \pm 2,09$  % for the apical or basolateral application of haloperidol, respectively. Thus, using frog skin epithelium, we have shown for the first time that sigma-1 receptor antagonist haloperidol attenuates the effect of glutoxim on  $Na^+$  transport, which indicates the possible involvement of sigma-1 receptors in the signaling cascade triggered by immunomodulator glutoxim and leading to the  $Na^+$  transport stimulation in the frog skin.

#### References

1. Krutetskaya Z.I., Lebedev O.E., Melnitskaya A.V., et al. // Doklady Biol. Sci. 2008. Vol. 421. P. 235-238.
2. Hellewell S.B., Bruce A., Feinstein G., et al. // Eur. J. Pharmacol. 1994. V. 268. P. 9-18.
3. Cobos E.J., Entrena J.M., Nieto F.R., et al. // Curr. Neuropharmacol. 2008. V. 6. P. 344–366.
4. Su T.-P., Hayashi T., Maurice T., et al. // Trends Pharmacol. Sci. 2010. V. 31. P. 557–566.
5. Krutetskaya Z.I., Melnitskaya A.V., Butov S.N., et al. // In Modern trends in biological physics and chemistry. BPPC – 2017: proceedings of XII International science-technical conference. Sevastopol State University. 2017. 536 p. P. 272 – 275.

### **ТРИЦИКЛИЧЕСКИЙ АНТИДЕПРЕССАНТ АМИТРИПТИЛИН МОДУЛИРУЕТ $Ca^{2+}$ -ОТВЕТЫ, ИНДУЦИРУЕМЫЕ ГЛУТОКСИМОМ И МОЛИКСАНОМ В МАКРОФАГАХ**

**Л.С. Миленина, З.И. Крутецкая, Н.И. Крутецкая, В.Г. Антонов**

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

Рецепторы сигма-1 представляют собой уникальные молекулярные шапероны в мембране эндоплазматического ретикулума, имеющие уникальную структуру и фармакологический профиль. Выполняя функции шаперонов, рецепторы сигма-1 взаимодействуют с белками-мишенями (ионными каналами, рецепторами и др.) и модулируют многие клеточные процессы, включая процессы  $Ca^{2+}$ -сигнализации [1].

Ранее [2] нами было впервые показано, что дисульфидсодержащие иммуномодуляторы глутоксим® (динатриевая соль окисленного глутатиона с d-металлом в наноконцентрации, «ФАРМА-ВАМ», Россия) и моликсан® (комплекс глутоксима и нуклеозида инозина, «ФАРМА-ВАМ») увеличивают внутриклеточную концентрацию  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , вызывая мобилизацию  $\text{Ca}^{2+}$  из тапсигаргинчувствительных  $\text{Ca}^{2+}$ -депо и последующий депо-зависимый вход  $\text{Ca}^{2+}$  в перитонеальные макрофаги крыс. В связи с этим, представлялось целесообразным исследовать возможное участие рецепторов сигма-1 во влиянии глутоксима и моликсана на  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  в перитонеальных макрофагах.

В экспериментах использовали агонист рецепторов сигма-1 – трициклический антидепрессант амитриптилин, широко используемый для лечения тревожно-депрессивных состояний [3]. Эксперименты проводили на культивируемых резидентных перитонеальных макрофагах крыс популяции Wistar. Для измерения  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  использовали флуоресцентный зонд Fura-2AM («Sigma-Aldrich», США). Подробно процедура культивирования макрофагов и описание автоматизированной установки для измерения  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  на базе флуоресцентного микроскопа Leica DM 4000B («Leica Microsystems», Германия) изложены нами ранее [4].

В контрольных экспериментах было показано, что инкубация макрофагов в течение 20 мин с 100 мкг/мл глутоксима или 100 мкг/мл моликсана в бескальциевой среде вызывает медленно нарастающее увеличение  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , отражающее мобилизацию  $\text{Ca}^{2+}$  из внутриклеточных депо. При введении в наружную среду 2 мМ  $\text{Ca}^{2+}$  наблюдалось дальнейшее повышение  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , отражающее вход  $\text{Ca}^{2+}$  в цитозоль. В наших экспериментах впервые было обнаружено, что преинкубация макрофагов с 20 мкг/мл амитриптилина в течение 20 мин до введения 100 мкг/мл глутоксима приводила к значительному подавлению как мобилизации  $\text{Ca}^{2+}$  из депо (в среднем по данным 7 экспериментов на  $39,6 \pm 9,2\%$ ), так и последующего входа  $\text{Ca}^{2+}$  в клетку (в среднем по данным 7 экспериментов на  $46,3 \pm 10,1\%$ ), индуцируемых глутоксимом. Сходные данные были получены в опытах по влиянию 20 мкг/мл амитриптилина на  $\text{Ca}^{2+}$ -ответы, вызываемые 100 мкг/мл моликсана. Кроме того, нами было показано, что добавление 40 мкг/мл амитриптилина на фоне развившегося входа  $\text{Ca}^{2+}$ , индуцированного глутоксимом или моликсаном, вызывает значительное (в среднем по данным 12 экспериментов на  $67,8 \pm 15,0\%$ ) подавление депозависимого входа  $\text{Ca}^{2+}$  в макрофаги.

Таким образом, в настоящей работе мы впервые на перитонеальных макрофагах крысы показали, что агонист рецепторов сигма-1 трициклический антидепрессант амитриптилин подавляет обе фазы  $\text{Ca}^{2+}$ -ответов, вызываемых глутоксимом или моликсаном в макрофагах. Полученные нами данные свидетельствуют о возможном участии рецепторов сигма-1 в комплексном сигнальном каскаде, запускаемом глутоксимом и моликсаном и приводящем к увеличению  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  в перитонеальных макрофагах крыс. Результаты указывают также на нежелательность совместного применения в



клинической практике препаратов глутоксим или моликсан и антидепрессанта amitриптилина.

### Литература

1. Rousseaux C.G., Greene S.F. Sigma receptors [σRs]: biology in normal and diseased states. *J. Recept. Signal Transduct.* 2016. V. 36. P. 327-388.
2. Kurilova L.S., Krutetskaya Z.I., Lebedev O.E., Antonov V.G. The effect of oxidized glutathione and its pharmacological analogue glutoxim on intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration in macrophages. *Cell Tissue Biol.* 2008. V. 2. P. 322-332.
3. Gillman P.K. 2007. Tricyclic antidepressant pharmacology and therapeutic drug interactions updated. *British J. Pharmacol.* V.151. P. 737-748.
4. Миленина Л.С., Крутецкая З.И., Наумова А.А., Бутов С.Н., Крутецкая Н.И., Антонов В.Г. Влияние ингибиторов эпоксигеназ на Ca<sup>2+</sup>-ответы, вызываемые глутоксимом и моликсаном в макрофагах. *Цитология.* 2015. Т. 57. № 7. С. 518 – 525.

### TRICYCLIC ANTIDEPRESSANT AMITRIPTYLINE MODULATES Ca<sup>2+</sup> RESPONSES INDUCED BY GLUTOXIM AND MOLIXAN IN MACROPHAGES

L.S. Milenina, Z.I. Krutetskaya, N.I. Krutetskaya, V.G. Antonov  
*Saint-Petersburg State University, University emb. 7/9, Saint-Petersburg, 199034, Russia*

Sigma-1 receptors—molecular chaperones of endoplasmic reticulum membranes—have unique structure and pharmacological properties. When functioning as chaperones, sigma-1 receptors interact with the target proteins (ion channels, receptors, etc.) and modulate many cellular processes, including Ca<sup>2+</sup> signaling [1].

Previously [2], we have shown for the first time that the disulfide-containing immunomodulators glutoxim® (disodium salt of oxidized glutathione with an additive of a *d*-metal at a nanoconcentration, PHARMA-VAM, Russia) and molixan® (a complex of glutoxim and nucleoside inosine, PHARMAVAM) increase the intracellular concentration of Ca<sup>2+</sup> ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>), causing Ca<sup>2+</sup> mobilization from the thapsigargin-sensitive Ca<sup>2+</sup> stores and subsequent store-dependent entry of Ca<sup>2+</sup> into rat peritoneal macrophages. In this connection, it was reasonable to study the possible involvement of sigma-1 receptors in the effect of glutoxim and molixan on [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> in peritoneal macrophages.

We used the sigma-1 receptor agonist, tricyclic antidepressant amitriptyline, which is widely used to treat anxiety and depression [3]. Experiments were performed on cultured residential peritoneal macrophages of Wistar rats. [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> was measured using the Fura-2AM fluorescent probe (Sigma-Aldrich, United States). The procedure of macrophage culturing and an automated system for [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> recording with the use of the fluorescent probe Fura-2AM were described earlier [4].

It has been demonstrated in control experiments that incubation of macrophages in the presence of 100 µg/ml molixan or 100 µg/ml glutoxim for 20 min in a medium without calcium causes a significant increase in [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>, which

reflects mobilization of  $\text{Ca}^{2+}$  from intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  stores. Addition of 2 mM  $\text{Ca}^{2+}$  to the external medium induces entry of  $\text{Ca}^{2+}$  into the cytosol, which is mediated by depletion of the  $\text{Ca}^{2+}$  stores. We found that the preincubation of macrophages with 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  amitriptyline for 20 min before the addition of 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  glutoxim significantly attenuated the glutoxim-induced  $\text{Ca}^{2+}$  mobilization from the stores (on average by  $39.6 \pm 9.2\%$ , according to the results of seven experiments) and subsequent  $\text{Ca}^{2+}$  entry into the cell (on average by  $46.3 \pm 10.1\%$ , according to the results of seven experiments). Similar data were obtained when studying the effect of 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  amitriptyline on the  $\text{Ca}^{2+}$ -responses induced by 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  molixan. The addition of 40  $\mu\text{g}/\text{ml}$  amitriptyline on the background of developed  $\text{Ca}^{2+}$  entry induced by glutoxim or molixan caused a significant (on average,  $67.8 \pm 15.0\%$ , according to the results of 12 experiments) inhibition of the store-dependent  $\text{Ca}^{2+}$  entry into the macrophages.

Thus, in this study, we have shown for the first time that the sigma-1 receptor agonist tricyclic antidepressant amitriptyline inhibits both phases of the  $\text{Ca}^{2+}$ -response induced by glutoxim or molixan in rat peritoneal macrophages. The results obtained in the present study suggest a possible involvement of sigma-1 receptors in the complex signaling cascade triggered by glutoxim or molixan and leading to an increase in  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  in rat peritoneal macrophages. The results also indicate that a combined use of drugs glutoxim or molixan and the antidepressant amitriptyline in clinical practice is undesirable.

#### References

1. Rousseaux C.G., Greene S.F. Sigma receptors [ $\sigma\text{Rs}$ ]: biology in normal and diseased states. *J. Recept. Signal Transduct.* 2016. V. 36. P. 327-388.
2. Kurilova L.S., Krutetskaya Z.I., Lebedev O.E., Antonov V.G. The effect of oxidized glutathione and its pharmacological analogue glutoxim on intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  concentration in macrophages. *Cell Tissue Biol.* 2008. V. 2. P. 322-332.
3. Gillman P.K. 2007. Tricyclic antidepressant pharmacology and therapeutic drug interactions updated. *British J. Pharmacol.* V.151. P. 737-748.
4. Milenina L.S., Krutetskaya Z.I., Naumova A.A., Butov S.N., Krutetskaya N.I., Antonov V.G. The effect of epoxygenase inhibitors on  $\text{Ca}^{2+}$ -responses induced by glutoxim and molixan in macrophages. *Tsitologiya.* 2015. V. 57. № 7. P. 518-525.

### АГРЕГАЦИЯ ЧАСТИЦ НАНОРАЗМЕРНОГО ГИДРОКСИАПАТИТА КАК ОСНОВНОЙ ФАКТОР ОГРАНИЧЕНИЯ БИОИНТЕГРАЦИИ ОСТЕОПЛАСТИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ НА ЕГО ОСНОВЕ

В.В. Минайчев<sup>1</sup>, И.С. Фадеева<sup>1,2</sup>, П.О. Кирсанова<sup>1</sup>,  
К.А. Меньших<sup>3</sup>, А.С. Сенотов<sup>1</sup>, В.С. Акатов<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН,  
Пуццо, Россия; e-mail: vminaychev@gmail.com

<sup>2</sup>Пуцинский государственный естественно-научный институт,  
Пуццо, Россия;

<sup>3</sup>Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,  
Москва, Россия;

В настоящее время повсеместное распространение в реконструктивной хирургии костной ткани получило использование синтетического гидроксиапатита (ГАп) в качестве остеопластического материала для заполнения различных дефектов. Особый интерес представляет синтетический наноразмерный гидроксиапатит (нГАп), поскольку он наиболее схож с минеральным компонентом кости и способен стимулировать дифференцировку мезенхимальных стволовых клеток в остеобласты костной ткани.

Однако при всех своих преимуществах нГАп также обладает рядом недостатков. Так, в проведенных нами исследованиях было выявлено несколько факторов, ограничивающих биоинтеграцию нГАп в организме, таких как слабые osteoconductive свойства и агрегация частиц нГАп в организме.

В исследованиях *in vitro* было показано, что нГАп не обладает osteoconductive свойствами и проявляет контактную токсичность по отношению к клеткам посредством анокиза.

При проведении исследований *in vivo* в модели субкутанной имплантации крысам было обнаружено, что нГАп в условиях *in vivo* образует слабо-резорбирующийся агрегат, блокирующий адгезию, миграцию и пролиферацию клеток на материале, а также процессы неокollaгенеза на нем, включая образование фиброзной капсулы. При этом вокруг агрегатов нГАп происходило формирование плотных слоев мертвых клеток (клеточного детрита), погибших при активном фагоцитозе частиц нГАп. В то же время, добавление osteoconductive компонента, например, деминерализованного костного collagena, к нГАп способствовало заселению материала клетками, построению неокollaгенового матрикса и резорбции нГАп.

Таким образом, представленные результаты указывают на необходимость модификации н-ГАп osteoconductive компонентом для повышения его биоинтеграции в организме. При этом остается открытым вопрос использования различных синтетических полимеров, например, таких как полигидроксикапроаты, в качестве osteoconductive, что является следующим этапом в цикле работ.

Работа выполнена при поддержке ЦКП ИТЭБ РАН и Фонд содействия инновациям.

### Литература

1. Minaychev V. V., Teleshev A. T., Gorshenev V. N., Yakovleva M. A., Fomichev V.A., Pankratov A. S., Menshikh K. A., Fadeev R. S., Fadeeva I. S., Senotov A. S., Kobayakova M. I., Yurasova Yu. B. and Akatov V. S. Limitation of biocompatibility of hydrated nanocrystalline hydroxyapatite. IOP Conf. Series: Materials Science and Engineering. Vol. 347. 2018.
2. Pankratov A.S., Fadeeva I.S., Minaychev V.V., Kirsanova P.O., Senotov A.S., Yurasova Yu.B., Akatov V.S.. *A biointegration of micro- and nanocrystalline hydroxyapatite: problems and perspectives*. Article in Genes and Cells. XIII(3).2018. pp. 46-51.
3. Shi X., Zhou K., Huang F., Zhang J., Wang C. Endocytic mechanisms and osteoinductive profile of hydroxyapatite nanoparticles in human umbilical cord Wharton's

- jelly-derived mesenchymal stem cells. *International Journal of Nanomedicine*. 2018. Vol 13. pp. 1457-1470.
4. Teleshev A.T., Fomichev V.A., Gorshenev V.N., Yakovleva M.A., Fadeev R.S., Akatov V.S., Minaychev V.V. Hydroxyapatite for Filling Bone Tissue Defects. *Biomedical Engineering*. Vol. 52, No. 1. 2018. pp. 19-22.

## **AGGREGATION OF NANOSIZED HYDROXYAPATITE PARTICLES AS THE MAIN LIMITING FACTOR OF NANOSIZED HYDROXYAPATITE BASED OSTEOPLASTIC MATERIALS BIOINTEGRATION**

**V.V. Minaychev<sup>1</sup>, I.S. Fadeeva<sup>1,2</sup>, P.O. Kirsanova<sup>1</sup>,  
K.A. Menshikh<sup>3</sup>, A.S. Senotov<sup>1</sup>, V.S. Akatov<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup>*Institute of Theoretical and Experimental Biophysics RAS, Pushchino, Moscow Region 142290, Russia; e-mail: vminaychev@gmail.com*

<sup>2</sup>*Pushchino State Institute of Natural Sciences, Pushchino, Moscow Region 142290, Russia;*

<sup>3</sup>*Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119991, Russia;*

Currently the use of synthetic hydroxyapatite (HAP) as an osteoplastic material for filling various defects has become widespread in reconstructive bone tissue surgery. Synthetic nanosized hydroxyapatite (n-HAP) is of particular interest because of its obvious similarity to the mineral component of bone and ability to stimulate the differentiation of mesenchymal stem cells into osteoblasts.

However, with all its advantages, n-HAP also has several disadvantages. In our studies several factors which limit the biointegration of n-HAP in the organism were identified, such as weak osteoconductive properties and the agglomeration of n-HAP particles in the organism.

*In vitro* studies it was shown that n-HAP doesn't possess osteoconductive properties and exhibits contact cytotoxicity by means of anoikis.

It was found *in vivo* that in a model of subcutaneous implantation in rats n-HAP forms a weakly resorbable agglomerate which blocks adhesion, migration and proliferation of cells in the sample as well as neocollagenesis processes in it, including fibrous encapsulation. At the same time formation of dense layers of dead cells (cell debris) around the n-HAP agglomerates, which died during the active phagocytosis of n-HAP particles, was observed. Also, the addition of an osteoconductive component to n-HAP, for example, demineralized bone collagen, contributed to cell migration into the sample and formation of the neocollagen matrix and n-HAP resorption.

Thus the presented results indicate the need for modifying the n-HAP with an osteoconductive component to increase its biointegration in the body. At the same time, it remains an open question to use various synthetic polymers, for example, such as polyhydroxyalkanoates, as osteoconductors which is a further step in the work cycle.

This work was supported by center of collective usage of ITEB RAS and Foundation for Assistance to Small Innovative Enterprises (FASIE).

### References

1. Minaychev V. V., Teleshev A. T., Gorshenev V. N., Yakovleva M. A., Fomichev V.A., Pankratov A. S., Menshikh K. A., Fadeev R. S., Fadeeva I. S., Senotov A. S., Kobyakova M. I., Yurasova Yu. B. and Akatov V. S. Limitation of biocompatibility of hydrated nanocrystalline hydroxyapatite. IOP Conf. Series: Materials Science and Engineering. Vol. 347. 2018.
2. Pankratov A.S., Fadeeva I.S., Minaychev V.V., Kirsanova P.O., Senotov A.S., Yurasova Yu.B., Akatov V.S.. *A biointegration of micro- and nanocrystalline hydroxyapatite: problems and perspectives*. Article in Genes and Cells. XIII(3). 2018. pp. 46-51.
3. Shi X., Zhou K., Huang F., Zhang J., Wang C. Endocytic mechanisms and osteoinductive profile of hydroxyapatite nanoparticles in human umbilical cord Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells. International Journal of Nanomedicine. 2018. Vol 13. pp. 1457-1470.
4. Teleshev A.T., Fomichev V.A., Gorshenev V.N., Yakovleva M.A., Fadeev R.S., Akatov V.S., Minaychev V.V. Hydroxyapatite for Filling Bone Tissue Defects. Biomedical Engineering. Vol. 52, No. 1. 2018. pp. 19-22.

## МЕХАНИЗМЫ АДАПТАЦИИ ОРГАНИЗМА К ГИПОКСИИ, РОЛЬ МИТОХОНДРИАЛЬНОГО АТФ-ЗАВИСИМОГО КАЛИЕВОГО КАНАЛА

Г.Д. Миронова, Н.В. Хмиль, Н.В. Белослудцева

*Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН,  
Пушchino, ул. Институтская, 3, Россия*

Изучение механизмов адаптации организма к гипоксии в настоящее время ведется во многих лабораториях мира. Любое патологическое состояние, а также повышенная физическая нагрузка, прямо или косвенно связаны с нарушением кислородного гомеостаза и развитием гипоксии, что зачастую сопровождается развитием патологических изменений в организме. Многочисленными исследованиями установлено, что основным патогенетическим звеном при развитии в организме гипоксии является повреждение митохондрий, приводящее к нарушениям энергообеспечения ткани. Связано это с накоплением в митохондриях при гипоксии повышенного количества активных форм кислорода (АФК). Известно, что до 85% перекисных соединений образуются в митохондриях. Как было нам ранее показано они, в малой концентрации ( $10^{-6}$  М), необходимы для нормального функционирования дыхательной цепи, однако большое их накопление, как известно, приводит к развитию окислительного стресса. В настоящее время положительная роль АФК как сигнальных молекул для запуска различных функций уже не вызывает сомнения. Образование в митохондриях перекиси, как было показано Каплан Бресдер еще в 1966г., связано с состоянием дыхательных переносчиков. Авторы показа-

ли, что количество перекиси в митохондриях увеличивается при ингибировании дыхания антимицином А, что эмитирует состояние гипоксии, и резко снижается при разобщении митохондрий. Позднее в работах лаборатории Скулачева, было установлено, что слабое (мягкое) разобщение дыхания значительно снижает скорость образования перекисей. В настоящей работе, используя современные методы определения скорости потребления кислорода и скорости образования пероксида в митохондриях, на известной модели колебания ионных потоков и других параметров митохондрий, в динамике, показана реципрокная связь между скоростью дыхания и скоростью образования  $H_2O_2$  в митохондриях. Из полученных данных следует, что любая активация дыхания снижает скорость образования АФК в митохондриях, и, по определению, снижает вероятность развития окислительного стресса. Факторами, поддерживающими слабое разобщение, в нормальных условиях могут являться: разобщающий белок- UCP-3 и митохондриальный АТФ- зависимый калиевый канал (миток<sub>АТФ</sub>). активация или экспрессия которых, может ускорять дыхание митохондрий и, тем самым, снижать скорость образования АФК. Нами ранее было установлено, что активность миток<sub>АТФ</sub> канала, который был впервые обнаружен и выделен из митохондрий в нашей лаборатории, значительно выше у устойчивых к гипоксии животных по сравнению с неустойчивыми. В то же время адаптация организма неустойчивых животных к гипоксии сопровождается активацией этого канала. Проведенные в настоящей работе сравнительные исследования структурных и биохимических различий между устойчивыми и неустойчивыми к гипоксии животными, выявили существенные различия между ними, которые исчезают у неустойчивых животных при создании небольшой гипоксии, имеющей адаптационный характер, так как при этом у животных повышается толерантность к гипоксии. С этим согласуются литературные данные о том, что прекондиционирование (создание эпизодов гипоксии, что повышает устойчивость к ней) снимается ингибитором миток<sub>АТФ</sub>, а активатор канала эмитирует прекондиционирование. Известно также, что фармакологические активаторы миток<sub>АТФ</sub> обладают кардиопротекторным действием. Установлено, что они снижают повышенное образование в организме АФК и, тем самым, защищают сердце от гипоксического повреждения. Ранее нами было показано, что уридиндифосфат (УДФ) является метаболическим активатором миток-АТФ. В настоящей работе установлено, что введенный в организм уридин, который в отличие от УДФ проникает в клетку, увеличивая в ней концентрацию УДФ, предупреждает развитие окислительного стресса. Было воспроизведено 6 экспериментальных моделей различных заболеваний, связанных с развитием окислительного стресса, а именно: острый инфаркт миокарда, гипоксическое повреждение сердца при ишемии-реперфузии, бактериальное воспаление у мышей, отек легкого при тяжелой нормобарической гипоксии (7%  $O_2$  во вдыхаемом воздухе), плавание крыс с нагрузкой до изнеможения и по-

вреждение сердца при тяжелой нормобарической гипоксии. В работе использовались электронно-микроскопические, биохимические, биофизические и иммунохимические методы. На перечисленных выше моделях показано, что уридин обладает антигипоксическим действием, предупреждая в клетках накопление АФК. Защитный эффект уридина полностью или отчасти снимался специфическим ингибитором митоК-АТФ 5-гидроксидеканоатом. Полученные данные подтверждают существенную роль митоК-АТФ в защите тканей от гипоксии и показывают, что модулятор канала- уридин, может быть использован в медицинской практике для защиты различных тканей, таких как сердце, мышцы, легкие и селезенка от развития в них окислительного стресса.

Работа поддержана грантами Российского Научного фонда (№16-15-00157) и Российского фонда фундаментальных исследований (№16-04-00692а).

## **MECHANISMS OF ANIMAL ADAPTATION TO HYPOXIA, THE ROLE OF MITOCHONDRIAL ATP-DEPENDENT POTASSIUM CHANNEL**

**G.D. Mironova, N.V.Khmil, N.V. Belosludtseva**

*Institute of Theoretical and Experimental Biophysics RAS,*

*Pushchino, st. Institutskaya, 3, Russia*

The study of the body's adaptation mechanisms to hypoxia is currently being conducted in many laboratories around the world. Any pathological condition, as well as increased physical activity, are directly or indirectly associated with impaired oxygen homeostasis and the development of hypoxia, which is often accompanied by the development of pathological changes in the body. Numerous studies have established that the main pathogenetic link in the development of hypoxia in the body is mitochondrial damage, leading to disruption of tissue energy supply. This is due to the accumulation in mitochondria during hypoxia of an increased number of reactive oxygen species (ROS). It is known that up to 85% of peroxide compounds are formed in mitochondria. As we have previously shown, in low concentrations (10<sup>-6</sup> M), they are necessary for the normal functioning of the respiratory chain, but their large accumulation, as is well known, leads to the development of oxidative stress. At present, the positive role of ROS as signaling molecules to trigger various functions is no longer in doubt. Formation in peroxide mitochondria, as was shown by Kaplan Bresder back in 1966, is associated with the state of respiratory carriers. The authors showed that the amount of peroxide in mitochondria increases with the inhibition of respiration by antimycin A, which emits a state of hypoxia, and decreases sharply with the dissociation of mitochondria. Later in the work of Skulachev's laboratory, it was found that weak (mild) breathing dissociation significantly reduces the rate of formation of peroxides. In the present work, using modern methods for determining the rate of oxygen consumption and the rate of peroxide formation in mitochondria, the known model of fluc-

tuations in ionic fluxes and other parameters of mitochondria, in dynamics, shows a reciprocal relationship between the respiration rate and the rate of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> formation in mitochondria. From the data obtained, it follows that any activation of respiration reduces the rate of ROS formation in mitochondria, and, by definition, reduces the likelihood of oxidative stress. Under normal conditions, factors supporting weak dissociation can be: uncoupling protein, UCP-3, and the mitochondrial ATP-dependent potassium channel (mitoCATP), activation or expression of which can accelerate the respiration of mitochondria and, thereby, reduce the rate of ROS formation. It was established by us that the activity of the mitocapt channel, which was first detected and isolated from mitochondria in our laboratory, is significantly higher in animals resistant to hypoxia compared to unstable animals. At the same time, the adaptation of the organism of unstable animals to hypoxia is accompanied by the activation of this channel. Comparative studies of structural and biochemical differences between resistant and hypoxia-resistant animals conducted in this work revealed significant differences between them, which disappear in unstable animals when creating a small hypoxia, which has an adaptive nature, as this increases tolerance to hypoxia in animals. The literature data agree with this that preconditioning (creating episodes of hypoxia, which increases resistance to it) is removed by the mitocATP inhibitor, and the channel activator emits preconditioning. It is also known that pharmacological mitocATP activators have a cardioprotective effect. It is established that they reduce the increased formation of ROS in the body and, thereby, protect the heart from hypoxic damage. Earlier, we showed that uridine diphosphate (UDP) is a metabolic activator of mitox-ATP. In the present work, it was established that uridine introduced into the body, which, unlike UDP, penetrates the cell, increasing the concentration of UDP in it, prevents the development of oxidative stress. Six experimental models of various diseases associated with the development of oxidative stress were reproduced, namely: acute myocardial infarction and chronic (ischemia-reperfusion), hypoxic heart damage in rats, bacterial inflammation in mice, damage to heart, pulmonary edema with severe hypoxia and swimming rats under load in rats. In this work, electron microscopic, biochemical, biophysical, and immunochemical methods were used. The models listed above show that uridine has an antihypoxic effect, preventing the accumulation of ROS in cells. The protective effect of uridine is removed by a specific inhibitor of mitoc-ATP 5-hydroxidecanoate. The obtained data confirm the significant role of mitoc-ATP in protecting tissues from hypoxia and show that the canal-uridine modulator can be used in medical practice to protect various tissues such as the heart, muscles, lungs and spleen from the development of oxidative stress in them.

This work was supported by grants the Russian Scientific Foundation №16-15-00157, and the Russian Foundation for Basic Research №16-04-00692a.



## АКТИВАЦИЯ P2X7-РЕЦЕПТОРОВ ПОТЕНЦИРУЕТ СИНАПТИЧЕСКУЮ ПЕРЕДАЧУ И ФУНКЦИОНАЛЬНО ПРОТИВОДЕЙСТВУЕТ P2Y13-РЕЦЕПТОРАМ В МОТОРНЫХ СИНАПСАХ МЫШИ

А.С. Митева, А.И. Молчанова, А.Е. Гайдуков, О.П. Балезина  
*Московский государственный университет им М.В. Ломоносова,  
Москва, ул. Ленинские Горы д.1, стр.12*

На пресинаптической мембране нервно-мышечных синапсов присутствует несколько типов пуринорецепторов для АТФ и аденозина, способных оказывать разнонаправленное воздействие на секрецию ацетилхолина (АХ) [1-3]. Паннексины 1 обеспечивают появление в синаптической щели этих пуринов, преимущественно тормозящих синаптическую передачу через активацию A<sub>1</sub>- и P2Y<sub>13</sub>-рецепторов [4]. Регуляторная роль P2X7-рецепторов, несмотря на их пресинаптическую локализацию в моторных синапсах, практически не изучена. Целью данной работы стало выявление условий и последствий активации P2X7-рецепторов у мышей дикого типа (WT) и мышей, нокаутных по гену паннексина 1 (Panx<sup>-/-</sup>), а также установление функциональной связи P2X7-рецепторов с другими типами пуриновых рецепторов.

Работу проводили на нервно-мышечных препаратах диафрагмы мышцей WT и Panx<sup>-/-</sup>. Регистрировали спонтанные миниатюрных потенциалов концевой пластинки (МПКП) и вызванные стимуляцией нерва (50 Гц, 1 с) многоквантовые потенциалы концевой пластинки (ПКП) в ритмических залпах.

Отсутствие (Panx<sup>-/-</sup>) или блокирование паннексина 1 с помощью пробенцида (500 мкМ) у мышей WT не изменяло значения параметров спонтанной и вызванной секреции АХ по сравнению с таковыми у мышей WT. Агонист P2X7-рецепторов VzАТР (30 мкМ) не изменял параметры секреции АХ у мышей WT. В синапсах мышцей Panx<sup>-/-</sup> и мышцей WT на фоне пробенцида активация P2X7-рецепторов вызывала статистически значимое увеличение квантового состава каждого ПКП в залпе на 30-40%. Прирост квантового состава обеспечивался за счет возрастания пула готовых к выбросу везикул, но не вероятности выброса АХ. Потенцирующий эффект VzАТР предотвращался блокатором P2X7-рецепторов А740003 (1 мкМ). Таким образом, впервые показано, что в условиях отсутствия выброса АТФ через паннексины 1 можно выявить потенцирующее секрецию АХ влияние P2X7-рецепторов. Возрастание квантового состава ПКП при активации P2X7-рецепторов в синапсах мышцей Panx<sup>-/-</sup> предотвращалось блокированием Ca<sup>2+</sup>-каналов L-типа нитрендипином (10 мкМ), а также ингибированием кальмодулина с помощью W-7 (10 мкМ) и CaMKII с помощью KN-93 (3 мкМ). Таким образом, мы установили, что срабатывание P2X7-рецепторов может потенцировать секрецию АХ не просто за счет дополнительного входа Ca<sup>2+</sup> в терминаль по каналам этих рецепторов, а за счет CaMKII-опосредованного

растормаживания  $Ca^{2+}$ -каналов L-типа. Необходимо было установить причину отсутствия у VzATP потенцирующего эффекта в синапсах мышей WT. Блокатор пресинаптических метаботропных P2Y13-рецепторов MRS2211 (10 мкМ) в синапсах мышей WT вызывал равномерный прирост амплитуды и квантового состава каждого ПКП в коротком ритмическом залпе, аналогично действию VzATP в синапсах  $Panx^{-/-}$ -мышей или у мышей WT на фоне пробенцида. Предварительное блокирование  $Ca^{2+}$ -каналов L-типа нитрендипином устраняло потенцирующий эффект MRS2211. В синапсах мышей WT на фоне блокатора P2X7-рецепторов (A740003) блокатор P2Y13-рецепторов (MRS2211) утрачивал способность увеличивать амплитуду и квантовый состав ПКП в залпе. Совокупность полученных данных позволяет сделать выводы, что в моторных синапсах  $Ca^{2+}$ -каналы L-типа являются общей мишенью доминирующей негативной регуляции со стороны P2Y13- и противодействующей ей позитивной регуляции со стороны P2X7-рецепторов. Впервые показано, что в условиях кратковременной ритмической вызванной активности синапсов может происходить активация эндогенной АТФ ионотропных P2X7-рецепторов, стремящихся растормозить  $Ca^{2+}$ -каналы L-типа, обеспечивающих вовлечение в секрецию АХ везикул в составе ранее молчавших активных зон. Потенцирующее действие на синаптическую передачу со стороны P2X7-рецепторов маскируется более мощным негативным влиянием на L-тип  $Ca^{2+}$ -каналов со стороны P2Y13-рецепторов, реагирующих на более низкую концентрацию эндогенной АТФ [5].

Работа поддержана грантом РФФИ № 18-34-00189.

#### Литература

1. Ribeiro J. et al. // Prog. Brain Res. 1996. № 109, P. 231-241.
2. Tarasova E. et al. // Biochem. (Moscow), Suppl. Ser. A. 2015. № 9. P. 318–328.
3. Guarracino J. et al. // Neuroscience. 2016. № 326, P. 31–44.
4. Miteva A. et al. // Biochem. (Moscow), Suppl. Ser. A. 2017. № 11, P. 311–320.
5. Ralevic V., Burnstock G. // Pharm. Rev. 1998. № 50, P. 413-492.

### ACTIVATION OF P2X7 RECEPTORS POTENTIATES SYNAPTIC TRANSMISSION AND FUNCTIONALLY COUNTERACTS P2Y13 RECEPTORS IN MOUSE MOTOR SYNAPSES

A.S. Miteva, A.I. Molchanova, A.E. Gaydukov, O.P. Balezina

*Lomonosov Moscow State University, Leninskie Gory 1/12, Moscow, Russia*

At presynaptic membrane of neuromuscular junctions there are several types of purinoreceptors for ATP and adenosine, which are capable of providing multidirectional effects on acetylcholine (ACh) release [1-3]. Pannexins 1 provide the appearance of these purines in the synaptic cleft, mainly inhibiting synaptic transmission mediated by activation of  $A_1$  and P2Y13 receptors [4]. The regulatory role of P2X7 receptors, despite their presynaptic localization at motor synapses, has not been poorly investigated. The aim of this research was to identify the conditions and consequences of P2X7 activation in the motor synapses of

wild type mice (WT) and mice with knock of pannexin 1 gene ( $Panx^{-/-}$ ), and also reveal a functional connection of P2X7 receptors with other types of purinoreceptors. Experiments were carried out on the neuromuscular preparations of the diaphragm of WT and  $Panx^{-/-}$  mice. Spontaneous miniature endplate potentials (MEPPs) and multiquantal endplate potentials, evoked by rhythmic train of nerve stimulation (50 Hz, 1 s) were recorded using intracellular microelectrodes.

The absence ( $Panx^{-/-}$  mice) or blocking of pannexin 1 by probenecide (500  $\mu$ M) in WT mice did not change the values of the parameters of either spontaneous or evoked ACh release compared with those in WT mice. P2X7 agonist BzATP (30  $\mu$ M) did not alter the ACh release parameters in WT mice. However, in the synapses of  $Panx^{-/-}$  mice and when probenecide was preapplied at WT synapses, activation of P2X7 receptors induced a statistically significant increase in quantal content of each EPP in a train by 30-40%. The increase in EPP quantal content was provided by increasing the size of readily releasable pool of vesicles, while the release probability did not change. The potentiating effect of BzATP was prevented by the blocker of P2X7 receptors - A740003 (1  $\mu$ M). Thus, for the first time it was shown that in the absence of ATP release via pannexin 1 channels, it is possible to reveal the P2X7-mediated potentiation of evoked ACh release in motor synapses. The increase in the EPP quantal content during the activation of P2X7 receptors in the synapses of  $Panx^{-/-}$  mice was prevented by blocking the L-type calcium channels with nitrendipine (10  $\mu$ M), as well as by inhibiting calmodulin with W-7 (10  $\mu$ M) and CaMKII with KN-93 (3  $\mu$ M). Thus, we established that the activation of P2X7 receptors can potentiate the evoked ACh release not just due to the additional calcium entry into the nerve terminal via the channels of these ionotropic receptors, but due to the CaMKII-mediated potentiation of L-type calcium channels. It was necessary to find out the reason for the lack of BzATP-induced potentiation of synaptic transmission in WT mice. At the synapses of WT mice, blocking of presynaptic metabotropic P2Y13 receptors with MRS2211 (10  $\mu$ M) caused uniform increase in amplitude and quantal content of each EPP in the short train, similar to BzATP action in the synapses of  $Panx^{-/-}$  mice or in probenecide-treated synapses of WT mice. Preliminary blockade of L-type calcium channels with nitrendipine abolished the potentiating effect of MRS2211 on synaptic transmission in WT mice. In the presence of P2X7 receptor blocker (A740003), the P2Y13 receptor blocker (MRS2211) lost the ability to increase the amplitude and quantal content of EPPs in the train. All of the obtained data allows to propose that the calcium channels of L-type in motor synapses are the common target of the predominant negative regulation by P2Y13 and the counteracting P2X7-mediated positive regulation. In summary, for the first time, we demonstrated that ionotropic P2X7 receptors may be activated by endogenous ATP during short-term evoked rhythmic activity of motor synapses, leading to upregulation of L-type calcium channels ensuring the recruiting previously silent active zones and their vesicles to ACh release. The potentiating effect of P2X7 activation on synaptic transmission seems to be masked by a more powerful inhibition of the L-type calcium channels by P2Y13

receptors, which, in turn, may be activated by lower concentrations of endogenous ATP than P2X7 [5].

This study was supported by the Russian Foundation for Basic Research grant 18-34-00189.

### References

1. Ribeiro J. et al. // Prog. Brain Res. 1996. № 109, P. 231-241.
2. Tarasova E. et al. // Biochem. (Moscow), Suppl. Ser. A. 2015. № 9. P. 318–328.
3. Guarracino J. et al. // Neuroscience. 2016. № 326, P. 31–44.
4. Miteva A. et al. // Biochem. (Moscow), Suppl. Ser. A. 2017. № 11, P. 311–320.
5. Ralevic V., Burnstock G. // Pharm. Rev. 1998. № 50, P. 413-492.

## ПЕПТИД TSKY, ВЫДЕЛЕННЫЙ ИЗ МОЗГА ЗИМОСПЯЩИХ СУСЛИКОВ *Spermophilus undulatus*, ПОЛИМЕРИЗУЕТ АКТИН В УСЛОВИЯХ *in vitro*

Г.З. Михайлова<sup>1</sup>, Л.Г. Бобылева<sup>1</sup>, С.Н. Удальцов<sup>2</sup>,  
Р.Х. Зиганшин<sup>3</sup>, Л.И. Крамарова<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН,  
Пуцзино, Московская область, 142290, Россия

<sup>2</sup>Институт науки физико-химических и биологических проблем  
почвоведения РАН, Пуцзино, Московская область, 142290, Россия

<sup>3</sup>Институт биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина  
и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва, 117997, Россия,

Ранее было установлено, что пептид Thr-Ser-Lys-Tyr (TSKY), выделенный из мозга крыс, проявляет цитолитическую активность в отношении опухолевых клеток [1]. Механизм действия пептида остается неизвестным. Учитывая, что при малигнизации клеток основу цитозоля составляет глобулярный актин, неспособный полимеризоваться и формировать прочные межклеточные контакты и цитоскелет [2–4], мы предположили, что пептид TSKY может влиять на трансформацию актина. Целью данной работы было провести электронно-микроскопический анализ взаимодействия пептида TSKY и актина *in vitro* методом негативного контрастирования. Было показано, что при инкубировании мышечного актина с молекулярным актином (в концентрациях  $5 \times 10^{-4}$  М и  $10^{-6}$  М, соответственно) в среде, содержащей 10 мМ KCl, происходило образование одиночных нитей. Они появляются через 1,5 час от начала инкубирования и сохраняются на протяжении всего срока проведения эксперимента. При этом очень малая доля актина остается в глобулярной форме. По морфологии данные нити не отличаются от нитей филаментозного актина, сформированных полимеризацией глобулярного актина в присутствии 100 мМ KCl. Таким образом, пептид TSKY способен полимеризовать актин в условиях *in vitro*. Набор соединений, выделяемых из животных и растительных объектов, специфично взаимодействующих с актином, с одной стороны, и использующихся как противоопухолевые агенты, ограничен [5–7]. Тем актуальнее расширение списка пре-

паратов, способных обратимо и нетоксично действовать на клетку. Данные по использованию пептида TSKY, выделенного из мозга зимоспящих сусликов, в экспериментах *in vitro* и *in vivo* [8,9], свидетельствуют о том, что пептид может дополнить арсенал препаратов, способных действовать на актиновый цитоскелет дендритов нейронов. Результаты настоящей работы открывают возможность использования пептида TSKY для разработки про-тивоопухолевых средств, действие которых направлено на цитоскелет.

### Литература

1. Blishchenko E.Yu., Mernenko O.A. et al.//Biochem. and Biophys. Res. Comm. 1996. V.224. No. 1090. P. 721–727.
2. Silva J.M., Ezhkova E. et al.//Cell. 2009. Vol. 137. P. 1047–1061.
3. Васильев Ю.М.//Соросовский Образовательный Журн. 1997.Т.4, С. 17–22.
4. Gamaley I., Efremova T. et al.//Cell Biol. Int. 2006. V.30. P. 319–325.
5. Bubb M. R., Spector I., et al.//J. Biol. Chem. 2000. V. 275. No. 7. P. 5163 – 5170.
6. Takeuchi H., Ara G., et al.//Cancer Chemother. Pharmacol. 1998. V. 42. No. 6. P. 491 – 496.
7. Мошков Д.А., Парнышкова Е.Ю., Романченко С.П. Средство для лечения злокачественных асцитных опухолей. Патент РФ на изобретение № 2464974 С1. 2012.
8. Ивличева Н. А., Крамарова Л. И. //Биол. Мембраны. 2012. Т.29. № 3. С. 195-199.
9. Михайлова Г.З., Безгина Е.Н. и др.//Биофизика. 2018. Т.63. №2. С. 287-293.

### PEPTIDE TSKY ISOLATED FROM THE BRAIN OF THE GROUND SQUIRREL *Spermophilus undulatus* POLYMERIZES ACTIN *in vitro* G.Z. Mikhailova<sup>1</sup>, L.G. Bobyleva<sup>1</sup>, S.N. Udaltsov<sup>2</sup>, R.H. Ziganshin<sup>3</sup>, L.I. Kramarova<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Institute of Theoretical and Experimental Biophysics RAS,  
Pushchino, Moscow Region, 142290, Russia*

<sup>2</sup>*Institute of Science for Physicochemical and Biological Problems  
of Soil Science, RAS, Pushchino, Moscow Region, 142290, Russia*

<sup>3</sup>*Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS,  
Moscow, 117997, Russia*

It was previously established that the Thr-Ser-Lys-Tyr peptide (TSKY) isolated from the rat brain exhibits cytolytic activity against tumor cells [1]. The mechanism of action of the peptide remains unknown. Considering that cytosol actin of malignant cells is unable to polymerize and form strong cell – cell contacts and cytoskeleton [2–4] we assumed that the TSKY can influence the actin dynamics and tumorigenesis. The purpose of this work was to carry out an electron microscopic analysis of the interaction of the TSKY peptide and actin *in vitro* using the negative contrast method. It was shown that the incubation of muscle actin with molecular actin (at concentrations of  $5 \times 10^{-4}$  M and  $10^{-6}$  M, respectively) in a medium containing 10 mM KCl resulted in the formation of single strands. They appear after 1.5 hours from the start of incubation and persist throughout the duration of the experiment. At the same time, a very small

proportion of actin remains in globular form. These filaments do not differ from filaments of actin filament formed by polymerization of globular actin in the presence of 100 mM KCl. Thus, the peptide is capable of polymerizing actin in vitro. The set of compounds secreted from animal and plant objects specifically interacting with actin and used as antitumor agents is limited [4-6]. The more urgent is the expansion of the list of drugs that can reversibly and non-toxicly act on a cell. Data on the use of TSKY isolated from the brain of hibernating ground squirrel in vitro and in vivo experiments [7-8] suggests that the peptide can complement the arsenal of drugs capable of acting on the actin cytoskeleton of neuronal dendrites. The results of this work open up the possibility of using the peptide for the development of antitumor agents that act on the cytoskeleton.

#### References

1. Blishchenko E.Yu., Mernenko O.A. et al.//Biochem. and Biophys. Res. Comm. 1996. V.224. No. 1090. P. 721-727.
2. Silva J.M., Ezhkova E. et al.//Cell. 2009. Vol. 137. P. 1047-1061.
3. Vasiliev, Yu.M.// Soros Educational Journal. 1997. T.4. P. 17-22.
4. Gamaley I., Efremova T. et al. // Cell Biol. Int. 2006. V.30. P. 319-325.
5. Bubb M. R., Spector I., et al. //J. Biol. Chem. 2000. V. 275. No. 7. P. 5163-5170.
6. Takeuchi H., Ara G., et al. //Cancer Chemother. Pharmacol. 1998. V. 42. No. 6. P. 491-496.
7. Moshkov D.A., Parnyshkova E.Yu., Romanchenko S.P. An agent for the treatment of malignant ascitic tumors. RF patent for invention 2464974 C1. 2012
8. Ivlicheva N.A., Kramarova L.I.//Biol. Membranes. 2012. T.29. No. 3. P. 195-199.
9. Mikhailova G.Z., Bezgina E.N. et al//Biophysics. 2018. T.63. №2. P. 287-293.

### **МОБИЛЬНОСТЬ МЕМБРАННЫХ РЕЦЕПТОРОВ – ОДИН ИЗ МЕХАНИЗМОВ ИЗМЕНЕНИЯ ХОЛИНОЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ НЕЙРОНОВ**

**Г.Б. Мурзина<sup>1</sup>, А.С. Пивоваров<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>*Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН,  
Москва, ул. Бултерова, д.5а, Россия*

<sup>2</sup>*Биологический факультет Московского государственного университета  
им. М.В. Ломоносова, Москва, Ленинские горы, д.1 с.12, Россия*

Исследования последних лет показали, что в основе депрессии холиночувствительности нейронов лежит уменьшение количества мембранных рецепторов, как полагают, вследствие их эндоцитоза, а восстановление ответа нейрона связывают с рециклированием рецепторов путем их экзоцитоза. Однако кроме эндоцитоза (ЭНР) и экзоцитоза (ЭКР) рецепторов на количество мембранных рецепторов в каждом отдельном локусе мембраны может влиять также их латеральная диффузия. Латеральная диффузия рецепторов (ЛДР) на постсинаптической мембране может являться одним из механизмов, приводящих к изменению количества рецепторов при синаптической пластичности. Этот механизм на нейронах гиппокампа показан при таких широко исследуемых в нейробиологии формах синаптической пла-

стичности, как длительная потенциация и длительная депрессия [1]. На латеральную подвижность мембранных рецепторов влияют как текучесть мембраны (зависящая от соотношения холестерол/фосфолипиды и уменьшающаяся при увеличении холестерола), так и состояние примембранного активного цитоскелета.

Проведенный с помощью математического моделирования сравнительный анализ влияния ЛДР, ЭнР и ЭкР на изменение числа мембранных рецепторов при ритмических локальных подведениях медиатора к соме нейрона выявил возможность зависимости холиночувствительности нейронов не только от ЭнР и ЭкР, но и от ЛДР на мембране [2]. Вычисления произведены с помощью математической модели, содержащей описание ЛДР на мембране, процессов ЭнР, ЭкР, протекающих при ритмической аппликации медиатора на сому нейрона, с учетом геометрических характеристик нейрона, основных внутриклеточных процессов, влияющих на изменения скоростей ЭнР и ЭкР, и зависимость коэффициента ЛДР от состояния примембранной «актиновой решетки». Сомы нейрона моделировалась в виде плоской поверхности, в центр которой апплицировали ацетилхолин (АХ). Изменения концентраций рецепторов на мембране, в примембранной области и внутриклеточного пула в зависимости от расстояния от места аппликации медиатора и от времени после подачи медиатора описывается системой дифференциальных уравнений. В модели полагалось, что скорости ЭнР и ЭкР изменяются при аппликации медиатора вследствие активации ряда протеинкиназ и протеинфосфатаз, и учитывалась возможность изменения коэффициента ЛДР.

Использование этой модели для анализа экспериментальной зависимости парного отношения вызванных ацетилхолином входящих токов командных нейронов виноградной улитки от интервала между аппликациями медиатора позволило определить временные характеристики транспортных процессов (эндоцитоза и экзоцитоза) рецепторов и коэффициент ЛДР для нейронов виноградной улитки [3].

Моделирование экспериментальных кривых, полученных при изучении влияния ряда веществ на текучесть мембраны (вследствие воздействия их на процентное содержание холестерола в мембране клетки или ингибирования его синтеза) и антител против актинсвязывающих белков (спектрина и мерлина), показало, что изменяются как коэффициент ЛДР, так и скорости ЭнР и ЭкР. Что указывает на участие ЛДР в депрессии АХ-тока на клеточном аналоге привыкания. Электрофизиологические эксперименты были выполнены на командных нейронах оборонительного поведения виноградной улитки. Регистрировали трансмембранные входящие токи, вызванные локальным ионофоретическим ритмическим подведением АХ к соме нейронов. Протокол стимуляции нейрона АХ имитировал схему выработки поведенческого привыкания [4].

Анализ экспериментальных кривых, произведенный с помощью упрощенной математической модели показал, что увеличение АХ-тока при

воздействии на нейроны виноградской улитки таких ноотропов, как ноопепт и пирацетам, может быть связано с изменениями динамики эндо- и экзоцитоза, приводящими к увеличению плотности мембранных АХ-рецепторов. Однако, если для ноопепта это может являться следствием его взаимодействия с белками примембранного транспорта, то для пирацетама – следствием его возможного взаимодействия с фосфолипидами мембраны, приводящего к изменению свойств мембраны [5].

Работа поддержана РФФИ (грант № 17-00-00052).

#### Литература

1. Collingridge G.L, Isaac J.T.R, Wang Y.T. Nat Rev Neurosci. 2004. V.5: 952–962.
2. Мурзина Г.Б. Биофизика. 2013. Т.58(3): 515-523.
3. Мурзина Г.Б., Пивоваров А.С., Махновский Д.А. Биофизика. 2016. Т.61(1): 112-119.
4. Vasilyeva N.A., Murzina G.B., Kireev I.I., Pivovarov A.S. Cell.Mol.Neurobiol. 2017. V.37: 1443-1455.
5. Разумовская М.А., Мурзина Г.Б., Островская Р.У., Пивоваров А.С. Журн.высш.нервн деят. 2018. Т.68(4): 537-548.

## MOBILITY OF MEMBRANE RECEPTORS - THE NEURON CHOLIN SENSITIVITY CHANGE MECHANISM

G.B. Murzina<sup>1</sup>, A.S. Pivovarov<sup>2</sup>

<sup>1</sup>*Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology RAS,  
ul. Butlerova 5a, Moscow, Russia*

<sup>2</sup>*Biological Department, Lomonosov Moscow State University,  
Leninskie Gory 1/12, Moscow, Russia*

Recent research showed that the decline in membrane receptors' number, caused possibly by endocytosis, underlies the depression of neurons' choline sensitivity. Consequently, restoring of the normal neuronal reaction is believed to occur due to membrane receptors' recycling by exocytosis. However, the number of receptors in a certain small part of the membrane can be affected not only by their endo- (EnR) and exocytosis (ExR) but also by their lateral diffusion. Lateral diffusion of receptors (LDR) on the postsynaptic membrane may be one of the mechanisms leading to a change in the number of receptors in synaptic plasticity. This mechanism has been observed in hippocampus in two of the most thoroughly studied neural plasticity forms –long-term potentiation and long-term depression [1]. The lateral mobility of membrane receptors is influenced by both membrane fluidity (depending on the cholesterol / phospholipid ratio and decreasing with increasing cholesterol) and the state of the under membrane actin cytoskeleton.

A comparative analysis of the effect of LDR, EnR and ExR on the change in the number of membrane receptors upon rhythmic local application of a mediator to the neuron soma, which was made by the mathematical modeling, revealed the possibility of the neuron cholinergic sensitivity dependence not only on EnR and ExR, but also on the membrane LDR [2]. The mathematical model contains a



description of the geometric characteristics of an edible snail neuron, the main intracellular processes influencing the changes in EnR and ExR rates, and the dependence of the coefficient of LDR on the state of the near\_membrane «actin grating». The neuron soma was modeled in the form of a flat surface in the center of which the acetylcholine (Ach) was applied. Changes in the membrane receptor concentrations, in the under membrane region and in the intracellular pool depending on the distance from the place of the mediator application and on the time after the mediator application are described by a system of differential equations. It was assumed that the rates of EnR and ExR change when the mediator is applied due to the activation of a number of protein kinases and protein phosphatases. The possibility of changing the coefficient of LDR was taken into account too.

Using this model to analyze the experimental dependence of the paired ratio of acetylcholine-induced inward currents of command snail neurons on the interval between mediator applications allowed us to determine the temporal characteristics of transport processes (endocytosis and exocytosis) of receptors and the coefficient of LDR for snail neurons [3].

Modeling the experimental curves obtained by studying the effect of a number of substances on membrane fluidity (due to their influence on the cholesterol percentage in the cell membrane or inhibiting its synthesis) and antibodies against actin-binding proteins (spectrin and merlin) showed change as the coefficient of LDL so EnR and ExR speed. This indicates the participation of LDR in the Ach-current depression on the cellular analogue of adaptation. Electrophysiological experiments were performed on snail command neurons. Transmembrane inward currents caused by local ionophoretic rhythmic ACh-application to neuronal soma were recorded. The Ach neuron stimulation protocol imitated the behavioral adaptation scheme [4].

An analysis of experimental curves with a simplified mathematical model showed that an increase in Ach-current may be due to changes in the dynamics of endo- and exocytosis, leading to an increase in the density of membrane Ach-receptors, when the snail neurons was expose with nootropes (noopept and piracetam). However, if for noopept this may be as the result of its interaction with proteins of under membrane transport, that for piracetam it may be as the result of its possible interaction with membrane phospholipids, leading to changes in membrane properties [5].

This work was supported by the Russian Foundation for Basic Research (grant №17-00-00052).

### References

1. Collingridge G.L, Isaac J.T.R, Wang Y.T. *Nat Rev Neurosci.* 2004. V.5: 952–962.
2. Murzina G.B. *Biophysics.* 2013. V.58(3): 515-523.
3. Murzina G.B., Pivovarov A.S., Makhnovsky D.A. *Biophysics.* 2016. V.61(1): 112-119.
4. Vasilyeva N.A., Murzina G.B., Kireev I.I., Pivovarov A.S. *Cell.Mol.Neurobiol.* 2017. V.37: 1443-1455.
5. Razumovskaya M.A, Murzina G.B., Ostrovskaya R.U., Pivovarov A.S. *Zh.Vyssh.Nerv.Deiat. Im I.P.Pavlova.* 2018. V.68(4): 537-548.

**ИССЛЕДОВАНИЕ РЕГИОНАЛЬНОЙ НЕОДНОРОДНОСТИ  
СОКРАЩЕНИЯ КАРДИОМИОЦИТОВ  
ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ 1 ТИПА**

**Т.А. Мячина<sup>1,2</sup>, К.А. Бутова<sup>1,2</sup>, К.В. Соколова<sup>1,2</sup>,  
И.Ф. Гетте<sup>1,2</sup>, А.Д. Хохлова<sup>1,2</sup>**

*<sup>1</sup>Институт иммунологии и физиологии Уральского отделения РАН,  
г. Екатеринбург, Россия*

*<sup>2</sup>Уральский федеральный университет имени первого  
Президента России Б.Н. Ельцина, г. Екатеринбург, Россия*

Миокард является электрически и механически неоднородной системой на всех уровнях его организации – от молекулярного до тканевого. Такая комплексная региональная неоднородность необходима для координации работы кардиомиоцитов и оптимизации сердечного выброса. Патологические состояния приводят к перераспределению нагрузки между регионами миокарда, поэтому можно предположить, что адаптационное ремоделирование разных регионов сердца в новых условиях функционирования будет по-разному проявляться на клеточном уровне организации миокарда. Такое социально-значимое заболевание как сахарный диабет (СД) приводит к гипергликемии и вызывает множественную органную недостаточность, в том числе поражает сердечно-сосудистую систему с развитием диабетической кардиомиопатии [1]. Однако в литературе имеются только единичные работы по оценке сократительной функции кардиомиоцитов из различных камер сердца при развитии СД.

Целью данной работы являлось исследование особенностей сокращения одиночных кардиомиоцитов левого желудочка (ЛЖ) и правого желудочка (ПЖ) сердца при СД 1 типа.

Эксперимент выполнен в соответствии с принципами, изложенными в Директиве 2010/63/EU. Индукция СД 1 типа продолжительностью 6 недель проводилась путем внутрибрюшинного введения аллоксана натощак в суммарной дозе 300 мг/кг [2] на половозрелых крысах-самцах линии Wistar, в возрасте 12 недель массой 250-350 г.

Одиночные кардиомиоциты ЛЖ и ПЖ были получены при применении стандартной методики ретроградной (по Лангендорфу) перфузии изолированного сердца крысы раствором с добавлением коллагенолитического фермента, расщепляющего внеклеточный каркас [3]. Все измерения выполнялись при температуре 36-37°C и частотах внешней электрической стимуляции 0,5, 1, 2, 3 Гц.

Исследование изменения сократительной функции (амплитуды сокращения и временного хода времени сокращения - расслабления) саркомеров изолированных кардиомиоцитов при СД проводилось с использованием конфокального микроскопа (LSM-710, Carl Zeiss, Германия), генератора стимулирующих импульсов MuoPacer, датчика температуры mTCPI (IonOptix Corporation, США) и специализированного программного обеспечения.

Было обнаружено, что амплитуда сокращения саркомеров достоверно не различалась между желудочками как у интактных животных, так и при аллоксановом СД, однако, парадоксально была выше для животных с СД.

Максимальные скорости сокращения и расслабления были выше в ПЖ по сравнению с ЛЖ и у животных интактной группы, и при СД, однако, достоверно различия были обнаружены для скорости расслабления у животных с СД.

Время достижения максимума сокращения оказалось больше для саркомеров ЛЖ по сравнению с ПЖ, но достоверно различия были выражены для животных с СД. Также было получено замедление временных характеристик расслабления для животных с аллоксановым СД, причем особенно замедление было выражено в ЛЖ.

Таким образом, мы показали, что аллоксановый СД 1 типа приводит к увеличению регионального градиента сократительной функции одиночных кардиомиоцитов ЛЖ и ПЖ.

Работа поддержана РФФ № 18-74-10059.

#### Литература

1. Bell DS. Heart failure: the frequent, forgotten, and often fatal complication of diabetes. *Diabetes care* 26, 2433-2441 (2003).
2. Данилова И.Г., Гетте И.Ф. Способ моделирования аллоксанового диабета. Патент на изобретение №2534411; 27.11.2014. Бюл. №33.
3. Khokhlova A, Iribe G, Katsnelson L, Naruse K & Solovyova O. The effects of load on transmural differences in contraction of isolated mouse ventricular cardiomyocytes. *Journal of molecular and cellular cardiology* 114, 276-287 (2018).

### AN INVESTIGATION OF REGIONAL HETEROGENEITY OF CARDIOMYOCYTE CONTRACTION IN EXPERIMENTAL TYPE 1 DIABETES MELLITUS

T.A. Myachina<sup>1,2</sup>, K.A. Butova<sup>1,2</sup>, K.V. Sokolova<sup>1,2</sup>, I.F. Gette<sup>1,2</sup>, A.D. Khokhlova<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>*Institute of Immunology and Physiology RAS, Yekaterinburg, Russia*

<sup>2</sup>*Ural Federal University, Yekaterinburg, Russia*

The myocardium is electrically and mechanically heterogeneous at all levels of its organization – from molecule to tissue. This complex regional heterogeneity is necessary to coordinate the cardiomyocyte work and to optimize cardiac output. Pathological conditions lead to a redistribution of a load between the myocardial regions, so it can be expected that the adaptive remodeling of different heart regions under new conditions manifests itself differently at the cellular level. A socially significant disease such as diabetes mellitus (DM) leads to hyperglycemia and multiple organ failure, including dysfunction of the cardiovascular system with the development of diabetic cardiomyopathy [1]. However, there are only a few studies devoted to examine the contractile function of cardiomyocytes from different heart chambers in the development of DM.

The aim of this work was to study the contractile function of single cardiomyocytes from the left ventricle (LV) and the right ventricle (RV) of the heart in type 1 DM.

The experiment was conducted in accordance the Directive 2010/63 / EU. For induction of 6 weeks of type 1 DM in male adult Wistar rats weighted 250-350 grams (12 weeks of age) alloxan was injected intraperitoneally on an empty stomach in a total dose of 300 mg / kg [2].

Single LV and RV cardiomyocytes were isolated using a standard Langendorff technique of retrograde perfusion of the isolated heart with a solution containing collagenase to degrade extracellular matrix proteins [3]. All measurements on isolated cardiomyocytes were performed at temperature of 36-37°C and at frequencies of electrical stimulation of 0.5, 1, 2, 3 Hz.

A study of changes in the contractile function (the amplitude of sarcomere shortening and the time course of sarcomere shortening and relaxation) of isolated cardiomyocytes in type 1 DM was carried out using confocal microscope (Carl Zeiss LSM-710), electrical field stimulator MyoPacer and temperature controller mTCII (IonOptix Corporation, USA) and specialized software.

We found that the amplitudes of sarcomere shortening was not significantly different between the ventricles in control animals and in DM, however it was unexpectedly greater in animals with alloxan induced type 1 DM compared with the control group.

The maximum velocities of sarcomere shortening and relaxation were higher in the RV compared with the LV as in control animals as in DM, however significant differences were found for the velocity of relaxation in animals with DM.

The time to peak of sarcomere shortening was greater for the LV as compared with the RV; however, differences were significantly different in animals with DM. We also observed the prolongation of relaxation in animals with alloxan induced type 1 DM, especially the prolongation was expressed in the LV.

Thus, we have shown that alloxan induced type 1 DM leads to an increase in regional gradient of the contractile function between the single LV and RV cardiomyocytes.

The work was supported by the Russian Science Foundation № 18-74-10059.

### References

1. Bell DS. Heart failure: the frequent, forgotten, and often fatal complication of diabetes. *Diabetes care* 26, 2433-2441 (2003).
2. Danilova I.G., Gette I.F. Bulavintseva T.S. The method of modeling alloxan diabetes. Patent for invention No. 2534411; 27.11.2014. Bulletin No. 33.
3. Khokhlova A, Iribe G, Katsnelson L, Naruse K & Solovyova O. The effects of load on transmural differences in contraction of isolated mouse ventricular cardiomyocytes. *Journal of molecular and cellular cardiology* 114, 276-287 (2018).

# РАЗРАБОТКА И ПРОГРАММНАЯ РЕАЛИЗАЦИЯ АЛГОРИТМА ОПРЕДЕЛЕНИЯ СРЕДНЕЙ ДЛИНЫ САРКОМЕРА КАРДИОМИОЦИТА

Т.А. Мячина<sup>1,2</sup>, О.Н. Лукин<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Уральский федеральный университет имени первого  
Президента России Б.Н. Ельцина, г. Екатеринбург, Россия

<sup>2</sup>Институт иммунологии и физиологии УрО РАН, г. Екатеринбург, Россия

Аккуратная оценка сократительной функции кардиомиоцита зависит от точного определения механической активности саркомеров в ходе цикла сокращения. Методы таких точных измерений/вычислений ограничены и большинство базируется на определении пространственной частоты по профилю поперечной исчерченности изолированной сердечной клетки. Мы разработали настраиваемый алгоритм определения средней длины саркомера в сокращающейся клетке, который основан на применении метода дискретного преобразования Фурье (ДПФ) и реализован нами в виде самостоятельно разработанного программного обеспечения.

Исходными данными для вычислений является серия изображений изолированного кардиомиоцита, зарегистрированных с интервалом 2-3 мсек. Каждое изображение ориентировано вдоль длинной оси миоцита, поэтому строится профиль яркости изображения клетки как функции расстояния от края изображения. Если края клетки механически фиксируются карбоновыми волокнами, алгоритм исключает из рассмотрения области профиля яркости, локализованные за пределами волокон. Непосредственно вблизи волокон может наблюдаться искажение саркомерной исчерченности, поэтому алгоритм предусматривает параметр, задающий величину отступа от края карбонового волокна в % от расстояния между волокнами.

Далее с помощью ДПФ определяется спектральная характеристика сигнала профиля яркости, т.е. строится распределение интенсивности гармоники от ее пространственной «частоты» (частоты вычисляются в единицах длины). В алгоритме в качестве параметров задаются близость к пику основной гармоники (насколько можно отклоняться от пика этой гармоники для определения диапазона длин саркомеров) и максимальное число гармоник, которые алгоритм будет определять в периодическом сигнале. Также задаются минимальное и максимальное допустимые значения «частот» (эквивалентно вычисляемому диапазону длин саркомеров).

До запуска расчета средней длины саркомера может быть применено исключение низкочастотной компоненты из профиля яркости (возникающей, например, из-за наличия некоторых структур в области регистрации изображения) с помощью глубокой фильтрации с управляемыми настройками фильтра. После запуска расчета алгоритма методом ДПФ к полученным массивам реальных и мнимых чисел для частотного спектра может быть применена раздельная фильтрация, отфильтрованные массивы реальных и мнимых чисел для частотного спектра используются для повторной

«сборки» этого спектра и вычисления средней длины саркомера уже на основе этого спектра. Затем может быть выполнена фильтрация амплитудно-частотного спектра, например, если этот спектр содержит два близко расположенных пика или имеет отклонения вблизи одного пика. Завершающим этапом является определение пикового значения амплитудно-частотного спектра и все последующие вычисления средней длины саркомера (с учетом описанных выше параметров) привязываются к этому пику. При использовании всех трех фильтров (низкочастотный компонент, фильтр массивов реальных и мнимых чисел частотного спектра, фильтр амплитудно-частотного спектра) вычисляются три различных значения средней длины саркомера, которые можно сопоставлять друг с другом и оценивать степень искажения вычисления при включении/выключении фильтра. Алгоритм реализован в виде программного модуля (IDE Borland Delphi 6, язык программирования Object Pascal).

Эффективность алгоритма и возможность его применения в зависимости от качества исходных данных продемонстрированы на ряде наборов изображений изолированных кардиомиоцитов. Качество работы алгоритма было сопоставлено с ранее опубликованными другими исследователями методами [1,2], было установлено, что для некоторых исходных наборов данных наш алгоритм дает более точную оценку средней длины саркомера. Разработанный нами настраиваемый алгоритм, базирующийся на применении метода ДПФ, валиден для оценки механики саркомера в сокращающемся кардиомиоците.

Работа выполнена в рамках госзадания ИИФ УрО РАН (регистрационный номер НИОКТР №АААА-А18-118020590031-8) и поддержана Российским Фондом Фундаментальных Исследований (грант №18-04-00572-а).

#### **Литература**

1. Peterson P, Kalda M, Vendelin M. Real-time determination of sarcomere length of a single cardiomyocyte during contraction. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2013, 304(6):C519-C531.
2. Pasqualin C, Gannier F, Yu A, Malécot CO, Bredeloux P, Maupoil V. SarcOptiM for ImageJ: high-frequency online sarcomere length computing on stimulated cardiomyocytes. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2016, 311:C277-C283.

### **THE DEVELOPMENT AND SOFTWARE IMPLEMENTATION OF ALGORITHM TO RETRIEVE MEAN SARCOMERE LENGTH OF CARDIOMYOCYTE**

**T.A. Myachina<sup>1,2</sup>, O.N. Lookin<sup>1,2</sup>**

*<sup>1</sup>Ural Federal University, Yekaterinburg, Russia*

*<sup>2</sup>Institute of Immunology and Physiology UB RAS, Yekaterinburg, Russia*

The accurate evaluation of contractile function of cardiomyocytes is based on precise determination of sarcomeric mechanics during the contractile cycle. The methods for such precise measurements/calculations are limited and

most of them are based on the retrieval of spatial frequency of sarcomeric striation pattern of isolated cardiac cell. We developed adjustable algorithm to retrieve mean sarcomere length in a contracting cell, based on the method of Discrete Fourier Transform (DFT) and implemented in our custom-made software.

The raw data for the algorithm are a series of cell images acquired every 2-3 msec. Each image is aligned along the cell so the intensity profile as function of distance from the edge of the image is obtained for all images. If cell edges are mechanically attached to carbon fibers, the algorithm excludes these regions from the sarcomeric striation pattern prior to the calculation. As sarcomeric striation can be distorted nearly to the carbon fibers, the algorithm provides a parameter which set how much it should indent from the edges of carbon fibers when constructing intensity profile (in a % of the distance between carbon fibers).

Next, DFT makes spectral signal of the intensity profile, i.e. the intensity of frequencies is plotted against spatial “frequency” (the frequencies are calculated in the units of length). The algorithm provides the parameters to define the proximity to the fundamental frequency (how much it can go away from the peak of fundamental when determining the mean sarcomere length) and to define the maximal number of frequencies which are calculated in the periodic signal. Also, minimal and maximal available values of “frequencies” are preset (equivalent of calculated range of sarcomere length).

Before the running of the algorithm, one may apply the low-frequency filter to exclude instabilities in the intensity profile (e.g. if some non-sarcomeric (sub)cellular structures exist in the profile) using deep filtering with adjustable settings. After DFT calculation of the algorithm, the arrays of real and imaginary numbers can be filtered separately and then the filtered arrays are used to reconstruct the frequency spectrum and to calculate mean sarcomere length on the basis of this new spectrum. After that, the filtering of amplitude-frequency spectrum can be run, e.g. if the spectrum has two closely packed peaks or inconsistencies around a single peak. The trailing step of the algorithm is the determination of peak of the amplitude-frequency spectrum and further retrieval of mean sarcomere length with preset parameters is related to this peak. Using three filters (low-frequency filtering, filtering of arrays of real and imaginary numbers, filtering of amplitude-frequency spectrum), one get three different values of mean sarcomere length which can be compared in terms of highest accuracy depending on using of the filter. The algorithm is implemented as software module (IDE Borland Delphi 6, Object Pascal programming language).

The effectiveness of the algorithm and its applicability depending on quality of raw data is demonstrated using several sets of cell image series. The quality of our algorithm was compared to the previously published methods [1,2] and for some raw data sets we found that our algorithm provides more accurate calculation of mean sarcomere length. The developed configurable DFT-based algorithm is valid for evaluation of sarcomere mechanics in a beating cardiomyocyte.

The study was carried out within the framework of the IIF UrB RAS theme No AAAA-A18-118020590031-8 and supported by Russian Foundation for Basic Research (#18-04-00572-a).

## References

1. Peterson P, Kalda M, Vendelin M. Real-time determination of sarcomere length of a single cardiomyocyte during contraction. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2013, 304(6):C519-C531.
2. Pasqualin C, Gannier F, Yu A, Malécot CO, Bredeloux P, Maupoil V. SarcOptiM for ImageJ: high-frequency online sarcomere length computing on stimulated cardiomyocytes. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2016, 311:C277-C283.

## МЕХАНИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ОДИНОЧНЫХ ВОЛОКОН МЕДЛЕННЫХ СКЕЛЕТНЫХ МЫШЦ

С.Р. Набиев<sup>1</sup>, Н.А. Кубасова<sup>2</sup>

<sup>1</sup>*Институт иммунологии и физиологии УрО РАН,  
Екатеринбург, ул.Первомайская, 106, Россия*

<sup>2</sup>*Институт механики МГУ им М.В. Ломоносова,  
Москва, Мичуринский проспект, 1, Россия*

Скелетные мышцы состоят из быстрых и медленных волокон, которые различаются между собой, в том числе, скоростью ответа на возбуждение и развития напряжения. Известно, что быстрые и медленные волокна имеют различный состав белков, в частности, миозин медленных мышц отличается от миозина быстрых мышц изоформами тяжелых цепей. Поэтому механика актин-миозинового взаимодействия в этих волокнах может быть иной. Большинство экспериментальных результатов, лежащих в основе современных представлений о молекулярной механике мышечного сокращения, были получены на быстрых волокнах лягушки или кролика. Целью данной работы является исследование различий механики актин-миозинового взаимодействия в разных типах мышечных волокон и изучение их связи с функциональными отличиями.

Эксперименты были выполнены на одиночных волокнах медленной мышцы *soleus* кролика. Экспериментальная методика подробно описана в работах [1, 2]. Изучали механические ответы волокон, активированных при низкой температуре 5 °С, на Джоулев скачок температуры, амплитуду скачка варьировали от 5 до 25 °С. Оказалось, что аналогично работе [3], исследованные образцы можно разделить на две группы. Медленные волокна первой группы развивали начальное напряжение ~50 кПа, которое в ответ на скачок температуры возрастало до ~130 кПа при финальных температурах выше 25 °С. Изменения динамической жесткости, измеренной по изменению напряжения в ответ на приложенные синусоидальные изменения длины с частотой около 1 кГц, были незначительные, что соответствует результатам [1], полученным на быстрых волокнах. Отличия от быстрых волокон состояли в существенно более медленной кинетике увеличения напряжения в ответ на скачок температуры. Волокна второй группы развивали более низкое начальное напряжение ~ 25 кПа. Увеличение напряжения в ответ на скачок температуры составляло не более 50% начального. По-



лупремя развития силы в ответ на большие скачки температуры не зависело от принадлежности к 1й или 2й группе и составляло от 8 мс до 30 мс, в то время как в быстрых волокнах полупремя развития силы составляло 2-2,5 мс.

Эксперименты показали, что в отличие от быстрых волокон, диапазон механических характеристик медленных волокон гораздо шире, и их исследование необходимо продолжить на большем числе образцов и дополнить измерением содержания различных изоформ тяжелых цепей миозина с помощью гель-электрофореза.

Работа выполнена при поддержке РФФИ, грант 18-04-00599.

### Литература

1. Bershtitsky S.Y., Tsaturyan A.K. 2002. The elementary force generation process probed by temperature and length perturbations in muscle fibres from the rabbit. *J.Physiol.*, 540:971-988.
2. Tsaturyan A.K., Bershtitsky S.Y., Koubassova N.A., Fernandez M., Narayanan T., Ferenczi M.A. 2011. The fraction of myosin motors that participate in isometric contraction of rabbit muscle fibers at near-physiological temperature. *Biophys J.*, 101:404-410.
3. Linari M., Bottinelli R., Pellegrino M.A., Reconditi M., Reggiani C., Lombardi V. 2004. The mechanism of the force response to stretch in human skinned muscle fibres with different myosin isoforms. *J.Physiol.* 554:335-352.

## MECHANICAL CHARACTERISTICS OF SINGLE FIBRES FROM SLOW SKELETAL MUSCLE

S.R. Nabiev<sup>1</sup>, N.A. Koubassova<sup>2</sup>

<sup>1</sup>*Institute of Immunology and Physiology of RAS,  
Yekaterinburg, Pervomayskaya ul., 91, Russia*

<sup>2</sup>*Institute of Mechanics, Lomonosov Moscow State University,  
Mitschurinsky pr., 1, Moscow, Russia*

Skeletal muscles consist of fast and slow fibres, which differ from each other by a number of characteristics, including the time course of response to excitation and of the tension development. It is known that fast and slow fibres have a different composition of proteins, in particular, slow muscle myosin differs from that of fast muscle by heavy chains isoforms. Therefore, the mechanics of the actin-myosin interaction in these fibres may be different. Most of the experimental results underlying modern concepts of the molecular mechanics of muscle contraction were obtained on the fast frog or rabbit fibres. The purpose of this work is to study the differences in the mechanics of the actin-myosin interaction in different types of muscle fibres and to study their connection with functional differences.

Experiments were performed on single fibres of *soleus* rabbit muscle. The experimental technique is described in detail in [1, 2]. The mechanical responses of fibres activated at a low temperature of 5 °C to a Joule temperature jump, the jump amplitude varied from 5 to 25 °C, were studied. It turned out that, similar to [3], the studied samples can be divided into two groups. The slow fibres of the

first group developed an initial tension of ~ 50 kPa, which, in response to a temperature jump, increased to ~ 130 kPa at final temperatures above 25 °C. Changes in dynamic stiffness, measured from tension changes in response to applied sinusoidal changes in length with a frequency of about 1 kHz, were small, which corresponds to the results of [1] obtained on fast fibres. Differences from fast fibres consisted in a significantly slower kinetics of tension increase in response to a temperature jump. The fibres of the second group developed a lower initial tension of ~ 25 kPa. The increase in tension in response to a temperature jump was no more than 50% of the initial one. The half-time of force development in response to large temperature jumps did not depend on belonging to the 1st or 2nd group and ranged from 8 ms to 30 ms, while in fast fibres the half-time of force development was 2-2.5 ms.

Experiments have shown that, unlike fast fibres, the range of mechanical characteristics of slow fibres is much wider, and their research should be continued on a larger number of samples and supplemented by measuring the content of various isoforms of myosin heavy chains using gel electrophoresis.

Supported by RFBR grant 18-04-00599.

### References

1. Bershtitsky S.Y., Tsaturyan A.K. 2002. The elementary force generation process probed by temperature and length perturbations in muscle fibres from the rabbit. *J.Physiol.*, 540:971-988.
2. Tsaturyan A.K., Bershtitsky S.Y., Koubassova N.A., Fernandez M., Narayanan T., Ferenczi M.A. 2011. The fraction of myosin motors that participate in isometric contraction of rabbit muscle fibers at near-physiological temperature. *Biophys J.*, 101:404-410.
3. Linari M., Bottinelli R., Pellegrino M.A., Reconditi M., Reggiani C., Lombardi V. 2004. The mechanism of the force response to stretch in human skinned muscle fibres with different myosin isoforms. *J.Physiol.* 554:335-352.

## ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ФОСФОРИЛИРОВАНИЯ СУЩЕСТВЕННЫХ ЛЕГКИХ ЦЕПЕЙ МИОЗИНА НА АКТИН-МИОЗИНОВОЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ С.Р. Набиев<sup>1</sup>, Д.С. Логвинова<sup>2</sup>, А.М. Матюшенко<sup>2</sup>, Л.В. Никитина<sup>1</sup>, Г.В. Копылова<sup>1</sup>, Д.В. Щепкин<sup>1</sup>, С.Ю. Бершицкий<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт иммунологии и физиологии УрО РАН,  
Екатеринбург, Первомайская, 106, Россия

<sup>2</sup>Институт биохимии им. А.Н. Баха - ФИЦ Биотехнологии РАН,  
Москва, Ленинский проспект, дом 33, строение 2, Россия

В «существенных» легких цепях (ELC) миозина имеются два сайта фосфорилирования (Arrell et al., *Circulation Research*. 2001). Не известно, как фосфорилирование ELC миозина влияет на актин-миозиновое взаимодействие. Мы исследовали эффекты фосфорилирования ELC миозина на характеристики актин-миозинового взаимодействия, используя *in vitro* подвижную систему (ИПС) и оптическую ловушку.

Миозин, актин и тропониновый комплекс были выделены из быстрых скелетных мышц кролика. Рекомбинантный человеческий  $\alpha$ -тропомиозин был экспрессирован как описано ранее (Matyushenko et al., *Biochemistry*, 2017). Рекомбинантные препараты ELC дикого типа (WT), а также с мутациями T65D, S193D и двойной мутацией S193D/T65D, которые имитирует фосфорилирование ELC миозина, были получены с помощью сайт-направленного мутагенеза, и затем нативные ELC в скелетном миозине были замещены на эти ELC. В ИПС мы измеряли скорость скольжения F-актина и регулируемого тонкого филамента по поверхности покрытой, скелетным миозином с исследуемыми ELC. В оптической ловушке используя схему трех шариков (Finer et al., *Nature*, 1994) мы измеряли размер рабочего шага одиночной молекулы миозина, содержащего исследуемые ELC, при взаимодействии с F-актином, а также длительность этого взаимодействия.

Мы обнаружили, что ELC T65D снижает скорость скольжения F-актина в ИПС в 2,5 раза и увеличивает примерно в 5 раз продолжительность одиночного взаимодействия миозина с F-актином в оптической ловушке, по сравнению с миозином, содержащим WT ELC, но не меняет средний размер рабочего шага миозина. Кроме того, ELC T65D более чем в 3 раза снижает максимальную скорость скольжения регулируемого тонкого филамента, а также снижает его кальциевую чувствительность на 0.14. ELC S193D и S193D/T65D увеличивают продолжительность взаимодействия F-актина с миозином в 1,4 раза и в 2.5 раза соответственно, тогда как другие характеристики взаимодействия не изменяются.

Фосфорилирование легких цепей миозина в двух положениях Thr65 и Ser193 оказывает разнонаправленные эффекты на характеристики актин-миозинового взаимодействия: ELC T65D ингибирует взаимодействие, а ELC S193D устраняет это ингибирование. Фосфорилирование легких цепей миозина может являться дополнительным механизмом регуляции сокращения в поперечнополосатых мышцах.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (грант №18-04-00122 и 18-34-00804) и Программы АААА-А18-118020590135-3 с использованием оборудования ЦКП ИИФ УрО РАН.

## **STUDY OF THE EFFECTS OF PHOSPHORYLATION OF ESSENTIAL LIGHT CHAIN OF MYOSIN ON THE ACTIN-MYOSIN INTERACTION**

**S.R. Nabiev<sup>1</sup>, D.S. Logvinova<sup>2</sup>, A.M. Matyushenko<sup>2</sup>, L.V. Nikitina<sup>1</sup>,  
G.V. Kopylova<sup>1</sup>, D.V. Shchepkin<sup>1</sup>, S.Y. Bershitsky<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>*Institute of Immunology and Physiology UB RAS,*

*Ekaterinburg, Pervomayskaya St., 106, Russia*

<sup>2</sup>*A.N.Bach Institute of Biochemistry RAS, Moscow, Leninskiy Av., 33, Russia*

Essential light chain (ELC) of myosin has two sites, which can be phosphorylated (Arrell DK et al *Circulation Research*. 2001). However, how the my-

osin ELC phosphorylation can affect the actin-myosin interaction at the molecular level remains almost unclear. Here, we studied the effect of the myosin ELC phosphorylation on the properties of the actin-myosin interaction in an *in vitro* motility assay and an optical trap.

Myosin, actin and troponin were obtained from fast skeletal muscles of the rabbit. Recombinant human  $\alpha$ -tropomyosin was prepared as described in the work (Matyushenko et al., Biochemistry, 2017). Recombinant myosin ELC constructs with mutations T65D, S193D, and S193D/T65D, which mimic naturally occurring ELC phosphorylation were produced using site-directed mutagenesis and these ELC mutants were then inserted into the molecule of skeletal muscle myosin. In the *in vitro* motility assay, we measured the sliding velocity of F-actin or regulated thin filaments over the flow-cell surface covered with skeletal myosin containing studied ELC constructs. In the optical trap using three-bead assay, we measured the average step size of single myosin molecules including studied ELC constructs with F-actin and the average duration of their interaction.

We found that the T65D ELC mutation decreases 2,5-fold the sliding velocity of F-actin in the motility assay and increases 5 times the duration of single actin-myosin interactions but does not change the myosin step size. Moreover, the T65D ELC mutation decreased more than 3 times the maximal sliding velocity of thin filaments and shifted its calcium sensitivity 0,14 lower. The S193D and double S193D/T65D ELC mutations increase 1,4-fold and 2,5-fold respectively the duration of myosin interaction with F-actin while the other characteristics do not change.

The phosphorylation of Thr65 and Ser193 of ELC renders differently directed effects on the actin-myosin interaction in skeletal muscle: the T65D mutation inhibits the interaction and the S193D mutation eliminates this inhibition. The myosin ELC phosphorylation might be an additional mechanism of regulation of contraction of striated muscles.

This work was supported by RFBR (№18-04-00122 and №18-34-00804) and Program AAAA-A18-118020590135-3. This work was performed using the equipment of SRC IIP UB RAS.

## **ЭКЗОФОСФОДИЭСТЕРАЗА ЦИКЛИЧЕСКИХ НУКЛЕОТИДОВ ПЛАЗМОДИЯ *PHYSARUM POLYCEPHALUM***

**А.Р. Незвецкий, О.В. Петрухин, Н.Я. Орлов**

*Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН,  
Пуццино, ул. Институтская, 3, Россия*

*Светлой памяти Софьи Ильиничны Бейлиной  
посвящается*

Показано, что физико-химические и ферментативные характеристики обнаруженной нами ранее [1-3] экстраклеточной циклонуклеотид-специфичной фосфодиэстеразы плазмодия миксомицета *Physarum poly-*

*cephalum* подобны свойствам циклонуклеотид-специфичной фосфодиэстеразы-1 дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* [4]. Предполагается, что фосфодиэстераза плазмодия *Physarum polycephalum*, как и фосфодиэстераза-1 дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, относится к малоизученному и эволюционно древнему семейству циклонуклеотид-специфичных фосфодиэстераз класса II [5]. Данные, полученные методом масс-спектропии, не исключают такой возможности.

### Литература

1. Незвецкий А.Р., Орлова Т.Г., Бейлина С.И., Орлов Н.Я. (2006) Термостабильная экстраклеточная фосфодиэстераза циклических нуклеотидов плазмодия *Physarum polycephalum*. *Биофизика*. **51** (5), 810–816.
2. Матвеева Н.Б., Морозов М.А., Незвецкий А.Р., Орлова Т.Г., Теплов В.А., Бейлина С.И. (2010) Участие экстраклеточной цАМФ-специфичной фосфодиэстеразы в регуляции двигательной активности плазмодия *Physarum polycephalum*. *Биофизика* **55**(6), 1076–1082.
3. Незвецкий А.Р., Орлова Т.Г., Бейлина С.И., Орлов Н.Я. (2011) Влияние ингибиторов и ионов магния на активность термостабильной внеклеточной сАМФ-специфичной фосфодиэстеразы плазмодия *Physarum polycephalum*. *Биол. мембраны*. **28**(6), 541–546.
4. Tian Y., Cui W., Huang M., Robinson H., Yiqian W., Yousheng W., Hengming K. (2014) Dual specificity and novel structural folding of yeast phosphodiesterase-1 for hydrolysis of second messengers cyclic adenosine and guanosine 3',5'-monophosphate. *Biochemistry*. **53**, 4938–4935.
5. Wentzinger L., Seebeck T. (2007) Protozoal phosphodiesterases. In: *Cyclic nucleotide phosphodiesterases in health and disease*. Eds Beavo J.A., Francis S.H., Houslay M.D. Boca Raton, FL: CRC Press, 277–300.

## CYCLIC NUCLEOTIDE-SPECIFIC ECTOPHOSPHOESTERASE OF *PHYSARUM POLYCEPHALUM* PLASMODIUM

A.R. Nezvetsky, O.V. Petrukhin, N.Ya. Orlov

*Institute of Theoretical and Experimental Biophysics of RAS,  
Pushchino, St. Institutskaya, 3, Russia*

*To memory of Sonya Beilina is devoted*

It is shown that physico-chemical and enzymatic characteristics of the extracellular cyclic nucleotide-specific phosphodiesterase from the *Physarum polycephalum* myxomycete plasmodium, which we described earlier [1-3], are similar to those of the cyclic nucleotide-specific phosphodiesterase-1 from yeast *Saccharomyces cerevisiae* [4]. We suppose that both phosphodiesterase of plasmodium *Physarum polycephalum* and phosphodiesterase-1 of yeast *Saccharomyces cerevisiae* do belong to the evolutionary ancient and poorly understood family of class II cyclic nucleotide-specific phosphodiesterase [5]. It was confirmed by the investigations of the enzyme by analytical mass spectrometry technique.

## References

1. Nezvetskii A. R., Orlova T. G., Beilina S. I., Orlov N. Ya. (2006) Thermostable extracellular cyclic nucleotide phosphodiesterase of the *Physarum polycephalum* plasmodium. *Biophysics* 51(5), 715-781.
2. Matveeva N. B., Morozov M. A., Nezvetsky A. R., Orlova T. G., Teplov V. A., Beylina S. I. (2010) Involvement of extracellular cAMP-specific phosphodiesterase in the control of motile activity of plasmodium *Biophysics* 55(6), 982-988.
3. Nezvetsky A. R., Orlova T. G., Beilina S. I., Orlov N. Ya. (2012) The effects of inhibitors and magnesium ions on the activity of the thermostable extracellular cAMP-Specific phosphodiesterase of *Physarum polycephalum* plasmodium. *Biomembranes (Moscow)* 6 (1), 100-104
4. Tian Y., Cui W., Huang M., Robinson H., Yiqian W., Yousheng W., Hengming K. (2014) Dual specificity and novel structural folding of yeast phosphodiesterase-1 for hydrolysis of second messengers cyclic adenosine and guanosine 3',5'-monophosphate. *Biochemistry*. 53, 4938-4935.
5. Wentzinger L., Seebeck T. (2007) Protozoal phosphodiesterases. In: *Cyclic nucleotide phosphodiesterases in health and disease*. Eds Beavo J.A., Francis S.H., Houslay M.D. Boca Raton, FL: CRC Press, 277-300.

## ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ СТРЕСС НЕ ЯВЛЯЕТСЯ ОБЯЗАТЕЛЬНЫМ АТТРИБУТОМ АПОПТОЗА У РАННЕГО ЭМБРИОНА МЫШИ

А.Г. Погорелов, А.И. Панаит, В.Н. Погорелова

*Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, ул. Институтская 3, Россия*

В процессе электролиза в катодной камере накапливается электрохимически восстановленная вода (ERW)). Эта метастабильная фракция воды характеризуется отрицательным значением окислительно-восстановительного потенциала (ОВП), что означает возможность нейтрализации активных форм кислорода. Гипотеза об антиоксидантных свойствах ERW очень привлекательная, но следует учитывать, что при приготовлении буферного раствора солевой состав может значительно модифицировать заявленные характеристики ERW. Поэтому цель данной работы состояла в том, чтобы определить, как замена обычной воды на ее фракцию изменит ОВП инкубационной среды. Антиоксидантные свойства полученного физиологического раствора изучали, используя экспериментальную модель апоптоза, индуцированного у клетки раннего эмбриона мыши посредством добавления пероксида водорода.

**Материалы и методы.** Эмбрионы и ооциты МП выделяли из яйцевода NMRI мышей. Апоптоз инициировали инкубацией (40 мин) яйцеклеток и эмбрионов в среде Дульбекко после добавления пероксида водорода (0.2 мМ). Наличие апоптотических изменений оценивали по характерным морфологическим признакам и уменьшению клеточного объема, который измеряли методом лазерной микротомографии с последующим 3D рекон-

Среда инкубации	pH	ОВП, мВ	$rH_2$
Дульбекко	7.4	300	27,8
ERW Дульбекко	7.4	60	21,2
Дульбекко + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	7.4	270	27,0
ERW Дульбекко + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	7.4	120	23,1

Обозначения: ERW - среда инкубации, приготовленная на ERW, +H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – в среде инкубации добавлен пероксид водорода (0.2 мМ), pH – кислотность среды инкубации,  $rH_2$  – индекс оксидантной активности, который вычисляют посредством выражения  $rH_2=0.026*(E_h + \Delta) + 2pH$ , где: A (0.026 мВ<sup>-1</sup>) – эмпирический коэффициент,  $\Delta$  - поправка (200 мВ) на Cl-Ag электрод сравнения в насыщенном растворе KCl при комнатной температуре (~22°C).

струкцией клетки. Чтобы сохранить прижизненное строение, форму и размер клетки использовали комплекс криогенных подходов микроскопии. Кратко, после криофиксации в жидком пропане (-188С), образец подвергали низкотемпературной (-100С) дегидратации в вакууме (~10–3 Pa). Лиофилизированные образцы заключали в заливочную среду на основе эпоксидной смолы Эрон 812.

**Результаты.** В таблице представлены данные, которые позволяют оценить изменение свойств инкубационной среды Дульбекко при замене обычной бидистиллированной воды на ее ERW фракцию. Параметр  $rH_2$  определяет как антиоксидантный статус раствора в пределах  $0 < rH_2 < 28$ , прооксидантный в пределах  $28 < rH_2 < 42$  и нейтральный при  $rH_2 \approx 28$ , например для обычной водопроводной воды (pH 7.2,  $E_h = 320$  мВ).

**Выводы.** Рассматривая все полученные данные, мы пришли к следующему заключению: (1) Среда Дульбекко, приготовленная на ERW фракции, сохраняет антиоксидантный потенциал, (2) Среда Дульбекко, приготовленная на ERW фракции, компенсирует окислительный стресс, но не предотвращает развитие апоптоза, индуцированного добавлением пероксида водорода, у клеток раннего эмбриона мыши, (3) наличие активных форм кислорода не является обязательным условием апоптоза. По-видимому, в используемой экспериментальной модели действие экзогенной молекулы H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> осуществляется через ее сигнальные функции. В этом случае мишенью пероксида водорода могут быть тиоловые группы циспептидных рецепторов, K<sub>2p</sub> каналов, VSOAC-подобных СГ транспортеров, тирозинкиназных рецепторов или тирозинфосфатаз.

Исследование поддержано Российским Научным Фондом, проект № 16-16-00020.

## PRO-OXIDATIVE CONDITIONS ARE NOT A GENERAL PREREQUISITE FOR APOPTOSIS IN EARLY MOUSE EMBRYOS

A.G. Pogorelov, A.I. Panait, V.N. Pogorelova

*Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, RAS, Pushchino, St. Institutskaya 3, Russia*

Upon water electrolysis, electrochemically reduced water (ERW) is accumulated at the cathode chamber. This metastable fraction is characterized by the nega-

Incubation medium	pH	$E_h$ , mV	$rH_2$
Dulbecco's solution	7.4	300	27,8
ERW Dulbecco's solution	7.4	60	21,2
Dulbecco's solution + $H_2O_2$	7.4	270	27,0
ERW Dulbecco's solution + $H_2O_2$	7.4	120	23,1

Comments: ERW is incubation medium prepared with ERW fraction,  $+H_2O_2$  is hydrogen peroxide (0,2 mM) in incubation medium, pH is medium acidity,  $E_h$  is redox potential (mV) measured with a platinum electrode,  $rH_2$  is the index of the oxidative activity calculated from Eqn.  $rH_2=0.026*(E_h + \Delta) + 2pH$ , where: A ( $0.026 \text{ mV}^{-1}$ ) is empirical coefficient,  $\Delta$  is a correction (200 mV) for a silver chloride reference electrode with saturated KCl at room temperature ( $\sim 22^\circ\text{C}$ ).

tive redox potential that allows the quelling of reactive oxygen species to be predicted. The proposed hypothesis about ERW antioxidant activity is very attractive but the following consideration should be taken into account. Before ERW impacts a cell, its properties can be changed in an unpredictably manner, when ERW interacts with the salts composition buffering physiological solutions. Therefore, this work was focused to explore how the replacement of ordinary water by the ERW fraction can modify the redox potential of the incubation medium. The antioxidant talent of such medium was investigated applying the experimental model of  $H_2O_2$ -induced apoptosis in early mouse embryos and eggs.

**Materials and methods.** The early embryos and oocytes MII were isolated from the oviduct of a NMRI mouse. Apoptosis was induced by the incubation (40 min) of eggs and embryos in Dulbecco's medium containing hydrogen peroxide at a concentration of 0.2 mM. The distinctive morphological characteristics and cell shrinkage were served as apoptotic criterions. The cellular volume of oocyte, zygote or two-cell embryo was measured by laser scanning micro tomography followed by quantitative 3D reconstruction. Briefly, after a cryofixation in liquid propane ( $-188^\circ\text{C}$ ), frozen oocytes and embryos were freeze-dried under vacuum ( $\sim 10\text{--}3 \text{ Pa}$ ) at low temperature ( $-100^\circ\text{C}$ ). Then, samples were immersed in embedding medium (Epon 812). The use of cryogenic approaches enables us to preserve the shape, size, and structure of cells, as close as, to *in vivo* state.

**Results.** Table represents the impact of hydrogen peroxide on Dulbecco's solution in modeling the oxidative stress. Redox potential and index of oxidative activity ( $rH_2$ ) of Dulbecco's medium prepared with the bidistilled water or its ERW fraction before and after the hydrogen peroxide addition. According to the  $rH_2$  index scale, a solution is considered as being antioxidant in the range  $0 < rH_2 < 28$  and as prooxidant in the range  $28 < rH_2 < 42$  [2]. The state with  $rH_2 \approx 28$  is considered as a redoxneutral, for instance, ordinary tap water (pH 7.2,  $E_h = 320 \text{ mV}$ ).

**Conclusions.** Taking together, we can conclude the following: (1) ERW incubation medium compensates redox potential changes induced by the addition of hydrogen peroxide (0.2 mM), (2) ERW incubation medium compensates oxidative stress but does not prevent the apoptosis induced in early mouse embryonic cells, (3) the apoptosis develops in antioxidant conditions it implies that oxidative stress is not obligator attribute of apoptosis. We suggest that the action of



exogenous  $H_2O_2$  molecules via redox-sensitive mechanism. In this case, the targets for the  $H_2O_2$  molecule are probably the thiol groups of Cys-loop receptors,  $K_{2p}$  potassium channel or VSOAC-like  $Cl^-$  transporters responsible for the compensatory cell volume decrease.

Acknowledgments. This work was supported by Russian Science Foundation, project no. 16-16-00020.

## **РОЛЬ ДИАБЕТ-АССОЦИИРОВАННЫХ ДИКАРБОНИЛОВ В ДИСФУНКЦИИ ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК *in vitro***

**Н.В. Подкуйченко, М.В. Самсонов, О.А. Казакова,  
С.С. Мичурина, Ю.С. Стафеев, Е.Е. Ефремов, Т.Н. Власик,  
В.З. Ланкин, А.В. Воротников, В.П. Ширинский**

*Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии  
Минздрава России, ул. 3-я Черепковская, 15а, Москва 121552, Россия*

Патогенез сахарного диабета 2 типа (СД2Т) тесно связан с повреждением стенки макро- и микрососудов и нарушением барьерных свойств сосудистого эндотелия. Принято считать, что в условиях диабетической гипергликемии дисфункция эндотелия развивается вследствие окислительного стресса и неферментативного гликирования эндотелиальных белков, что ведет к нарушению барьерных свойств эндотелиального монослоя, дисбалансу в синтезе вазодилатирующих и вазоконстрикторных факторов. В частности, усиливается синтез и секреция эндотелина-1, который служит мощным вазоконстриктором. В то же время подавляется активность эндотелиальной NO-синтазы, которая в норме поддерживает высокие барьерные свойства эндотелия. В результате повышается сосудистая проницаемость, развиваются тромботические осложнения, усиливается вазоконстрикция. Мы предполагаем, что при СД2Т повреждающим эндотелий фактором наряду с гипергликемией и окислительным стрессом является дислипидемия, также характерная для этой патологии.

На модели культивируемых эндотелиальных клеток из пупочной вены человека (HUVES) мы исследовали вклад гипергликемии и дислипидемии в развитие дисфункции эндотелия. С помощью иммуноблоттинга было установлено, что преинкубация HUVES в присутствии пальмитиновой кислоты индуцирует накопление в них белков, модифицированных малоновым диальдегидом (МДА) - продуктом перекисного окисления липидов. Используя два метода изучения эндотелиальной проницаемости *in vitro* (измерение электрического импеданса эндотелиального монослоя и измерение диффузии через монослой 70 кДа ФИТЦ-декстрана), мы показали, что МДА в концентрациях 100-250  $\mu M$ , вызывает гиперпроницаемость эндотелия. В то же время, конечные продукты гликирования, такие как глиоксаль и метилглиоксаль (МГО), в сравнимых с МДА концентрациях не изменяют проницаемость эндотелиального монослоя. Далее, с помощью флуоресцентного индикатора оксида азота DAF-FM мы исследовали актив-

ность NO-синтазы в HUVEC и воздействие на нее перечисленных дикарбониллов. Было продемонстрировано, что 100  $\mu$ M МДА, но не МГО, подавляет инсулин-стимулированный синтез NO в этих клетках.

Исследованные концентрации МДА соответствуют расчетному содержанию этого дикарбонила в сосудистой стенке при окислительном стрессе и значительно превышают максимальные уровни гликоальдегидов, регистрируемые *in vivo*. Таким образом, дисфункцию сосудистого эндотелия при СД2Т, вероятно, вызывают МДА и другие продукты перекисного окисления липидов нежелезные конечные продукты гликирования, и происходит это на ранних стадиях заболевания, а не на поздних, когда развивается гипергликемия, и в организме накапливаются метилглиоксаль и глиоксаль. Негативное воздействие МДА на инсулин-зависимую активность эндотелиальной NO-синтазы позволяет предположить роль этого дикарбонила в развитии инсулиновой резистентности в эндотелии и в вазоконстрикции, поскольку NO считается ключевым вазорелаксантом.

В целом, состояние дислипидемии при СД2Т и, в частности, накопление МДА в клетках сосудистой стенки представляется ведущим фактором в патогенезе диабетических васкулопатий.

Работа поддержана РФФИ мол\_а 18-315-00377 и РНФ 14-15-00245; 19-15-00361.

## **ROLE OF DIABETES-ASSOCIATED DICARBONYLS IN ENDOTHELIAL CELL DYSFUNCTION *in vitro***

**N.V. Podkuychenko, M.V. Samsonov, O.A. Kazakova,  
S.S. Michurina, I.S. Stafeev, E.E. Efremov, T.N. Vlasik,  
V.Z. Lankin, A.V. Vorotnikov, V.P. Shirinsky**

*Institute of Experimental Cardiology, National Medical Research Center  
for Cardiology, 3-rd Cherepovskaya St., 15a, Moscow, 121552, Russia*

Pathogenesis of type 2 diabetes mellitus (T2D) is tightly linked to the damage of macro- and microvascular wall and alteration of vascular endothelial barrier function. It is accepted that in conditions of diabetic hyperglycemia endothelial dysfunction develops due to oxidative stress and non-enzymatic glycation of endothelial proteins leading to alterations in endothelial monolayer barrier capacity and the dysbalance in synthesis of vasodilators and vasoconstrictors. In particular, the synthesis and secretion of the powerful vasoconstrictor endothelin-1 is increased while the activity of endothelial NO-synthase that maintains high endothelial barrier state, is suppressed. As a result, vascular permeability is increased, thrombotic complications are developed, and vasoconstriction is augmented. We hypothesize that dyslipidemia, which is also typical for T2D, contributes along with hyperglycemia and oxidative stress to endothelial dysfunction in this disease.

We utilized the model of cultured endothelial cells from human umbilical vein (HUVEC) to elucidate the contribution of hyperglycemia and dyslipidemia in the development of endothelial dysfunction. Using immunoblotting we established

that preincubation of HUVEC in the presence of palmitic acid induces accumulation of cellular proteins modified by malondialdehyde (MDA), the product of lipid peroxidation. Using two approaches to assess endothelial permeability in vitro such as measuring 1) electric impedance of endothelial monolayer and 2) diffusion of 70 kDa FITC-dextran through the monolayer, we demonstrated that 100-250  $\mu\text{M}$  MDA causes hyperpermeability of endothelium. At the same time, end glycation products such as glyoxal and methylglyoxal (MGO) do not alter endothelial permeability when used in similar concentrations. Next, we elucidated the activity of NO-synthase in HUVEC and the effects of abovementioned dicarbonyls using fluorescent NO indicator DAF-FM. We found that 100  $\mu\text{M}$  MDA but not MGO suppresses insulin-stimulated synthesis of NO in these cells.

Concentrations of MDA used in this study are in range with the estimated levels of this dicarbonyl in vascular wall during oxidative stress. Noteworthy, these MDA levels substantially exceed maximum levels of glycoaldehydes observed in vivo. Thus, endothelial dysfunction during T2D is likely caused by MDA and other lipid peroxidation products rather than by end glycation products. Conversely, endothelial dysfunction likely takes place at early stages of the disease rather than at the late stage manifested by hyperglycemia and methylglyoxal and glyoxal accumulation. Negative effect of MDA on insulin-dependent activity of endothelial NO-synthase allows suggest the role of this dicarbonyl in the development of insulin resistance in endothelium and in vasoconstriction since NO is considered a key vasorelaxant.

Overall, dyslipidemia associated with T2D and, in particular, accumulation of MDA in the vascular wall appears the leading factor in the pathogenesis of diabetic vasculopathies.

Supported by RFBR 18-315-00377 мол\_а, RSF 14-15-00245; 19-15-00361.

## **ТРАНСКРИПТОМНЫЙ ОТВЕТ НА ОДНОКРАТНУЮ И НА РЕГУЛЯРНЫЕ АЭРОБНЫЕ ФИЗИЧЕСКИЕ НАГРУЗКИ В СКЕЛЕТНОЙ МЫШЦЕ ЧЕЛОВЕКА**

**Д.В. Попов<sup>1,2</sup>, П.А. Махновский<sup>1</sup>, Е.И. Шагимарданова<sup>3</sup>,  
Г.Р. Газизова<sup>3</sup>, Е.А. Лысенко<sup>1,2</sup>, О.А. Гусев<sup>3</sup>**

*<sup>1</sup>Институт медико-биологических проблем РАН,  
Москва, Хорошевское шоссе 76А, Россия*

*<sup>2</sup>МГУ имени М.В. Ломоносова,*

*Москва, Ломоносовский проспект 27-1, Россия*

*<sup>3</sup>Казанский федеральный университет,  
Казань, Кремлевская улица 18, Россия*

Снижение уровня повседневной физической активности приводит к нарушениям в обмене веществ, тогда как регулярные аэробные физические тренировки эффективны для предотвращения этой проблемы. Целью данного исследования было выявление генов, связанных с сократительной ак-

тивностью в скелетных мышцах человека, независимо от уровня физической подготовки.

Для этого с помощью РНК-секвенирования у семи мужчин оценивали изменения транскриптома через 1 и 4 ч после однократного упражнения “разгибание ноги в коленном суставе” в работавшей *m. vastus lateralis* и в одноименной неработавшей мышце контралатеральной (контрольной) ноги. Помимо этого оценивали изменение транскриптома в базальном состоянии после двух месяцев аэробной тренировки (5 дней/нед, 1 ч/день).

После однократного упражнения изменения в транскриптоме работавшей мышцы были связаны с различными факторами, включая суточные циркадные ритмы. Чтобы выявить специфический для сократительной активности транскриптомный ответ дифференциально экспрессируемые гены определяли между работавшей и неработавшей мышцей контралатеральной ноги через 1 и 4 часа после окончания упражнения. Специфический для сократительной активности транскриптомный ответ был ассоциирован только с увеличением экспрессии генов и регулировался в основном CREB/ATF/AP1-, MYC/MAX- и E2F-связанными транскрипционными факторами. Оказалось, что изменение (увеличение и снижение) генной экспрессии в базальном состоянии после тренировочного периода было более выражено, чем изменения транскриптома после однократного упражнения. Изменения транскриптома в базальном состоянии после тренировочного периода были связаны с биологическими процессами, значительно отличающимися от биологических процессов, связанных с изменением генной экспрессии после однократного упражнения, и были ассоциированы с другими транскрипционными факторами (IRF- и STAT-родственные факторы).

В заключение следует отметить, что адаптация к регулярным физическим нагрузкам связана не только с кратковременным (в течение нескольких часов) увеличением экспрессии множества генов, специфичных для сократительной активности, но также с выраженным изменением (увеличением и уменьшением) экспрессии большого числа генов в базальном состоянии.

Исследование финансировалось за счет гранта РФФИ №17-00-00308К (17-00-00242).

## **TRANSCRIPTOME RESPONSE TO ACUTE AND REGULAR AEROBIC EXERCISE IN HUMAN SKELETAL MUSCLE**

**D.V. Popov<sup>1,2</sup>, P.A. Makhnovskii<sup>1</sup>, E.I. Shagimardanova<sup>3</sup>,  
G.R. Gazizova<sup>3</sup>, E.A. Lysenko<sup>1,2</sup>, O.A. Gusev<sup>3</sup>**

*<sup>1</sup>Institute of Biomedical problems RAS,*

*Moscow, Khoroshevskoe shosse 76A, Russia*

*<sup>2</sup>M.V. Lomonosov Moscow State University,*

*Moscow, Lomonosovsky Prospekt 27-1, Russia*

*<sup>3</sup>Institute of Fundamental Medicine and Biology,*

*Kazan Federal University, Kazan, Kremlyovskaya street 18, Russia*

Reduction in daily activity leads to dramatic metabolic disorders, while regular aerobic exercise training is effective for preventing this problem. The

purpose of this study was to identify genes that are directly related to contractile activity in human skeletal muscle, regardless of the level of fitness.

Transcriptome changes after the one-legged knee extension exercise in exercised and contralateral non-exercised vastus lateralis muscle of 7 males were evaluated by RNA-seq. Transcriptome change at baseline after 2 months of aerobic training (5/wk, 1 h/day) was evaluated as well.

Post-exercise changes in the transcriptome of exercised muscle were associated with different factors including circadian oscillations. To reveal transcriptome response specific for endurance like contractile activity, differentially expressed genes between exercised and non-exercised muscle were evaluated at 1 and 4 hours after the one-legged exercise. The contractile activity-specific transcriptome responses were associated only with an increase in gene expression and were regulated mainly by CREB/ATF/AP1-, MYC/MAX-, and E2F-related transcription factors. Endurance training-induced changes (an increase or decrease) in the transcriptome at baseline were more pronounced than transcriptome responses specific for acute contractile activity. Changes after training were associated with widely different biological processes than those after acute exercise and were regulated by different transcription factors (IRF- and STAT-related factors).

In conclusion, adaptation to regular exercise is associated not only with a transient (over several hours) increase in expression of many contractile activity-specific genes, but also with a pronounced change (an increase or decrease) in expression of a large number of genes under baseline conditions.

The study was funded by RFBR grant №17-00-00308K(17-00-00242).

## **ОБЛЕГЧЕНИЕ СПОНТАННОЙ СЕКРЕЦИИ МЕДИАТОРА В ФУНКЦИОНАЛЬНО РАЗЛИЧАЮЩИХСЯ ТИПАХ СКЕЛЕТНЫХ МЫШЦ МЫШИ ПОД ДЕЙСТВИЕМ АТФ**

**А. Прознса Гарсия, П.О. Богачева, О.П. Балежина**

*Биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова,  
Москва, Ленинские Горы, 1/12, Россия*

В холинергических моторных синапсах АТФ является медиатором ацетилхолина (АХ) и высвобождается вместе с ним при экзоцитозе синаптических везикул. Несмотря на быстрое расщепление АТФ в синаптической щели с помощью эктонуклеотидаз [1], в литературе описана ее способность воздействовать на нервно-мышечную передачу через специфические пуриновые рецепторы [2]. Наиболее известным эффектом АТФ при ее экзогенной аппликации является подавление секреции АХ в моторных синапсах [2,3]. Однако, есть данные и о возможных потенцирующих эффектах АТФ, в случае ее накопления в синаптической щели [4].

При этом уровень реализации регуляторных воздействий АТФ и возможные отличия ее эффектов в моторных синапсах разных типов мышц,

остаются не изученными. В связи с этим, целью данной работы было сопоставление изменений параметров спонтанной секреции АХ в моторных синапсах быстрой (m. EDL) и смешанной (m. diaphragma) скелетных мышц при воздействии негидролизуемого аналога АТФ и выяснение пре- или постсинаптической природы этих изменений.

Регистрацию спонтанных миниатюрных потенциалов концевой пластинки (МПКП) в изолированных нервно-мышечных препаратах осуществляли внутриклеточно с помощью стандартной микроэлектродной техники отведения биопотенциалов. Данные приведены в виде средних значений  $\pm$  стандартная ошибка среднего (n - количество исследованных синапсов).

Для создания устойчиво повышенного уровня АТФ в синаптической щели, мы использовали негидролизуемый аналог АТФ –  $\gamma$ -S-АТФ (10 мкМ).

В моторных синапсах быстрой, фазной мышцы m. EDL аппликация  $\gamma$ -S-АТФ приводила к увеличению амплитуды МПКП на 22% по сравнению с контролем (n=75,  $p<0,05$ ). Параллельно с ростом амплитуды наблюдался значительный достоверный прирост времени нарастания и полуспада МПКП на 14% и 39%, соответственно (n=75,  $p<0,05$ ). Средняя частота МПКП в контроле и под воздействием  $\gamma$ -S-АТФ составляла  $0,8\pm 0,1$  и  $0,75\pm 0,1$  Гц, соответственно. Мембранный потенциал мышечных волокон также достоверно не изменялся и составлял  $69,9\pm 1$  мВ в контроле и  $67\pm 1$  мВ после аппликации  $\gamma$ -S-АТФ. В синапсах смешанной диафрагмальной мышцы при длительном воздействии негидролизуемого аналога АТФ наблюдались сходные изменения: амплитуда МПКП возрастала на 21% по сравнению с контролем (n=84,  $p<0,05$ ), что сопровождалось также увеличением и времени нарастания, и времени полуспада МПКП на 22% (n=84,  $p<0,05$ ). Средняя частота МПКП в контроле и на фоне действия  $\gamma$ -S-АТФ составляла  $0,66\pm 0,07$  Гц. Мембранный потенциал мышечных волокон диафрагмы в контроле равнялся  $68,7\pm 1$  мВ, а после инкубации с  $\gamma$ -S-АТФ –  $67,4\pm 0,9$  мВ.

Наблюдаемый в функционально различающихся типах мышечных волокон сходный прирост амплитуды МПКП под действием негидролизуемого аналога АТФ мог реализоваться как на пресинаптическом уровне (за счет увеличения размера кванта АХ), так и на уровне постсинаптической мембраны. В пользу последнего варианта говорит зарегистрированное в обоих типах мышц увеличение временного хода МПКП. Для проверки этого предположения, перед аппликацией  $\gamma$ -S-АТФ проводили предварительную инкубацию нервно-мышечного препарата с ингибитором везикулярного транспорта АХ везамиколом (1 мкМ). Ни в препаратах m. EDL, ни в препаратах диафрагмы мышцы, везамикол не оказался способен предотвратить прирост амплитудно-временных параметров МПКП под действием  $\gamma$ -S-АТФ, что убедительно подтверждает именно постсинаптическую природу обнаруженного облегчающего спонтанную секрецию АХ эффекта негидролизуемого аналога АТФ.

Известна способность АТФ, действуя на метаболитные P2Y-рецепторы постсинаптической мембраны, пролонгировать открытое состояние каналов мышечных никотиновых холинорецепторов [5]. Это и может быть причиной обнаруженного нами увеличения амплитудно-временных параметров МПКП в функционально различающихся мышцах мыши под действием  $\gamma$ -S-АТФ. Очевидно, однако, что такой гипотетический механизм постсинаптического действия негидролизуемого аналога АТФ нуждается в дальнейшем экспериментальном подтверждении.

### Литература

1. Zimmermann H. et al. // Purinerg.Signal. (2012) 8: 437-502.
2. Giniatullin R., Sokolova E. // Br.J.Pharmacol. (1998) 124: 839-849.
3. Ribeiro J., Walker J. // Br.J.Pharmacol. (1975) 54(2): 213-8.
4. Bogacheva P., Balezina O. // Bull.Exp.Biol.Med. (2015) 159(5): 583-7.
5. Lu Z., Smith D.O. // J.Physiol. (1991) 436: 45-56.

## POTENTIATION OF SPONTANEOUS NEUROTRANSMITTER SECRETION IN FUNCTIONALLY DIFFERENT MOUSE SKELETAL MUSCLES BY ATP

A. Proensa Garsiia, P.O. Bogacheva, O.P. Balezina

*Biological Faculty, Lomonosov Moscow State University,  
Leninskie Gory 1/12, Moscow, Russia*

In cholinergic motor synapses, ATP is known to function as a cotransmitter of acetylcholine (ACh) and is released along with it during exocytosis of synaptic vesicles. Despite the rapid cleavage of ATP in the synaptic cleft by ectonucleotides [1], its ability to affect neuromuscular transmission via its specific purine receptors [2] is described in literature. The most well-known effect of exogenously applied ATP is the suppression of ACh secretion in motor synapses [2,3]. However, there are also data on possible potentiating effects of ATP, in case of its accumulation in the synaptic cleft [4]. At the same time, the level of manifestation of ATP regulatory effects and possible differences of these effects in motor synapses of functionally different muscle types remain poorly studied. The aim of this study was to compare changes in the parameters of spontaneous ACh secretion in motor synapses of rapid (m. EDL) and mixed-type (m. diaphragma) mouse skeletal muscles when exposed to a non-hydrolyzable ATP analogue and evaluate the pre- or postsynaptic nature of these changes.

We performed intracellular registration of spontaneous miniature endplate potentials (MEPPs) in isolated neuromuscular preparations using standard microelectrode techniques. The data are presented as mean  $\pm$  s.e.m (n is the number of synapses studied).

To create an elevated ATP level in the synaptic cleft, we used the non-hydrolyzable ATP analogue,  $\gamma$ -S-ATP (10  $\mu$ M).

In motor synapses of fast, phasic m. EDL application of  $\gamma$ -S-ATP led to an increase of MEPPs amplitude by 22% compared to control (n=75, p<0,05). This increase in amplitude was accompanied by a pronounced significant in-

crease in the rise and half-decay times of MEPPs by 14% and 39%, respectively ( $n=75$ ,  $p<0,05$ ). The average frequency of MEPPs in control and in presence of  $\gamma$ -S-ATP was  $0,8\pm 0,1$  and  $0,75\pm 0,1$  Hz, respectively. The membrane potential of muscle fibers also did not significantly change and was  $69,9\pm 1$  mV in control and  $67\pm 1$  mV after application of  $\gamma$ -S-ATP.

In synapses of mixed-type diaphragmal muscle, upon exposure to a non-hydrolysable ATP analogue, similar changes were observed: the amplitude of MEPPs increased by 21% compared to control ( $n=84$ ,  $p<0,05$ ), which was also accompanied by an increase in the rise and half-decay times of MEPPs by 22% ( $n=84$ ,  $p<0,05$ ). The average frequency of MEPPs in control and in presence of  $\gamma$ -S-ATP was  $0,66\pm 0,07$  Hz. The membrane potential of diaphragm muscle fibers was  $61,7\pm 1$  mV in control and  $59,4\pm 0,9$  mV after incubation with  $\gamma$ -S-ATP.

The similar increase of MEPPs amplitude observed in functionally different types of muscle fibers in presence of a non-hydrolysable ATP analogue could be realized at the presynaptic level (due to an increase of ACh quantal size) or at the level of postsynaptic membrane. Prolongation of the MEPPs time course, observed in both types of muscles, speaks in favor of the latter. To test this assumption, neuromuscular preparations were preincubated with ACh vesicular transporter inhibitor vesamicol ( $1 \mu\text{M}$ ) before the application of  $\gamma$ -S-ATP. Both in m. EDL and in diaphragm preparations, vesamicol failed to prevent the potentiation of the amplitude and time parameters of MEPPs by  $\gamma$ -S-ATP, which confirms the postsynaptic nature of the facilitating effect of non-hydrolysable ATP analogue on spontaneous ACh secretion.

ATP is known to prolong the open state of the muscle nAChR channels via its postsynaptic metabotropic P2Y receptors [5]. This may be the reason for the observed increase in the amplitude and time parameters of MEPPs under the influence of  $\gamma$ -S-ATP in functionally different mouse muscles. However, this hypothetical mechanism of postsynaptic action of non-hydrolyzable ATP analogue needs further experimental confirmation.

#### References

1. Zimmermann H. et al. // Purinerg.Signal. (2012) 8: 437-502.
2. Giniatullin R., Sokolova E. // Br.J.Pharmacol. (1998) 124: 839-849.
3. Ribeiro J., Walker J. // Br.J.Pharmacol. (1975) 54(2): 213-8.
4. Bogacheva P., Balezina O. // Bull.Exp.Biol.Med. (2015) 159(5): 583-7.
5. Lu Z., Smith D.O. // J.Physiol. (1991) 436: 45-56.

## ДУЭТ АРХЕЛЛИНОВ СТАБИЛИЗИРУЕТ СТРУКТУРУ ЖГУТИКА

**М.Г. Пятибратов, А.С. Сюткин, Т.Н. Мельник,**

**А.К. Сурин, А.В. Галева, О.В. Федоров**

*Институт белка РАН, Пушкино, ул. Институтская, 4, Россия*

Археллум (архейный жгутик) имеет лишь функциональное сходство с бактериальным аналогом. Внешняя спиральная нить архелл (филамент) построена из белкового протомера, археллина, и выполняет роль гребного



винта. У большинства эвриархей имеется несколько копий археллиновых генов, и их роль до настоящего времени остается неясной. Галофильные археи из группы *Halorubrum* характеризуются наличием единственного оперона из двух генов археллина *flaB1* и *flaB2*. Аминокислотные последовательности археллинов FlaB1 и FlaB2 существенно отличаются друг от друга и имеют только около 40% идентичных остатков (в основном в N-концевой области). Чтобы прояснить роль каждого из археллинов, мы сравнили археллы двух природных штаммов *Halorubrum lacusprofundi*: штамма DL18, имеющего гены обоих археллинов и штамма ATCC49239, геном которого содержит только ген *flaB2*. Оба природных штамма синтезируют функциональные археллы, при этом штамм DL18, где оба археллина представлены в сопоставимых количествах, более подвижен. Кроме того, с помощью гетерологической экспрессии в штамме *Haloferax volcanii* с инактивированными собственными генами археллинов, мы получили три типа рекомбинантных филаментов, состоящих только из одного или обоих археллинов *Hrr. lacusprofundi*. Все три штамма, экспрессирующие археллины, были подвижными, что указывает на функциональность рекомбинантных архелл. Электронная микроскопия нативных филаментов показала, что археллы из FlaB2 часто скручены в петли и клубки, образуя причудливые узоры, в то время как двухкомпонентные археллы менее гибки. Рекомбинантные филаменты напоминают натуральные. При этом двухкомпонентные археллы выглядят как типичные суперспиральные филаменты по сравнению с однокомпонентными археллами из FlaB1 и FlaB2, форма которых более изменчива. Как нативные, так и рекомбинантные двухкомпонентные филаменты отличаются повышенной термостабильностью и более устойчивы к воздействию пониженной солености, чем однокомпонентные филаменты. Полученные данные свидетельствуют о взаимозависимости процессов термической денатурации археллинов FlaB1 и FlaB2, что может свидетельствовать о тесном взаимодействии этих субъединиц в надмолекулярной структуре. Таким образом, функциональные археллы *Hrr. lacusprofundi* могут быть построены из единственного археллина FlaB2 или FlaB1. Таким образом, двухкомпонентный состав не нужен для спирализации филаментов *Hrr. lacusprofundi*. Присутствие двух различных субъединиц, по-видимому, требуется для дополнительной стабилизации структуры архелл и их адаптацию к более широкому диапазону внешних условий.

Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (грант № 19-04-00613 А).

## THE DUO OF ARCHAELLINS STABILIZES THE *Halorubrum* ARCHAELLAR FILAMENT STRUCTURE

M.G. Pyatibratov, A.S. Syutkin, T.N. Melnik,  
A.K. Surin, A.V. Galeva, O.V. Fedorov

*Institute of Protein Research of RAS, Pushchino, St. Institutskaya, 4, Russia*

Archaeum (archaeal flagellum) has only functional similarity to bacterial counterpart. The archaeellar outer helical filament built from the protein pro-

tomers, archaellin, and serves as a propeller. In most euryarchaea it is encoded by a multigene family and the role of multiple archaellin genes remains mysterious. The halophilic archaea from the *Halorubrum* group are characterized by the presence of single operon from two archaellin genes *flaB1* and *flaB2*. Amino acid sequences of FlaB1 and FlaB2 archaellins differ significantly from each other (about 40% identical residues, mainly in the N-terminal region). To clarify the role of each of the archaellins, we compared the archaella of two *Halorubrum lacusprofundi* natural strains: the DL18 strain having both archaellin genes and the type strain ATCC49239, that genome contains the *flaB2* gene only. Both natural strains synthesize functional archaella, while the DL18 strain, where both archaellins are represented in comparable amounts, is more motile. In addition, using heterologous expression in the *Haloferax volcanii* strain with inactivated own archaellin genes, we obtained three types of recombinant filaments consisting of only one or both *Hrr. lacusprofundi* archaellins. All three archaellin expressing strains were motile, indicating the recombinant archaella functionality. Electron microscopy of native filaments has shown that the FlaB2 archaella are quite flexible and often twisted in loops and tangles forming bizarre patterns, while the two component archaella are less flexible. Recombinant filaments resemble natural ones. FlaB1FlaB2 archaella look like typical supercoiled filaments in comparison with FlaB1 and FlaB2 archaella, whose shape is more variable. Both native and recombinant two component filaments have much greater thermal stability and are more resistant to low salinity stress than single-component filaments. The data obtained indicate the interdependence of the processes of thermal denaturation of the FlaB1 and FlaB2 archaellins, which may indicate a close interaction between these subunits in the supramolecular structure. Thus, the functional *Hrr. lacusprofundi* archaella can be built from a single archaellin FlaB2 or FlaB1. Therefore, the binary composition is not necessary for supercoiling *Hrr. lacusprofundi* filaments. Double archaellin subunits, apparently, are responsible for additional stabilization of the archaellum structure and adaptation to a wider range of external conditions.

This work was supported by the Russian Foundation for Basic Research (grant № 19-04-00613 A).

**ВЛИЯНИЕ МОДУЛЯЦИИ АКТИВНОСТИ  
АТФ-ЗАВИСИМЫХ K<sup>+</sup>-КАНАЛОВ  
НА УЛЬТРАСТРУКТУРУ ТКАНИ ПРОДОЛГОВАТОГО МОЗГА  
ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ПАРКИНСОНИЗМЕ**

**Е.В. Розова<sup>1</sup>, И.Н. Маньковская<sup>1</sup>, А.А. Мосенцов<sup>2</sup>, Г.Д. Миронова<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Институт физиологии им. А.А. Богомольца НАН, Киев, Украина

<sup>2</sup>Институт Теоретической и экспериментальной биофизики РАН,  
Пуцзино, ул. Институтская, 3, Россия

Изучение возникновения и развития болезни Паркинсона часто осуществляют в модельных исследованиях. Одной из наиболее адекватных

моделей экспериментального паркинсонизма (ЭП), при которой наблюдается нигростриальная дегенерация, схожая по патогенетическим механизмам и симптомам с этим заболеванием, является ротеноновая модель. Известно, что болезнь Паркинсона сопровождается развитием окислительного стресса и нарушением энергетического метаболизма. В связи с этим, исследования, посвященные изучению ультраструктурных перестроек в митохондриях (МХ), являются актуальными. Развитие окислительного стресса может быть обусловлено различными причинами, в том числе изменениями активности митохондриальных АТФ-зависимых  $K^+$ -каналов (мито- $K_{ATP}$ ), защитная роль которого при гипоксии изучалась ранее как в нашей лаборатории, так и за рубежом. В настоящей работе изучалось влияния модуляторов активности мито- $K_{ATP}$  на структурные перестройки ткани мозга при экспериментальном паркинсонизме. Исследования проведены на 34 половозрелых крысах-самцах линии Вистар, массой 200-220 г (в каждой группе по 7 животных): 1 группа - животным подкожно (п/к), ежедневно в течение 2-х недель вводили ротенон (Р); 2 группа – через 15 мин. после введения ротенона, животным ежедневно в течение 2-х недель внутрибрюшинно вводили активатор  $K_{ATP}$ -каналов - диазоксид (ДЗ); 3 группа – через 15 мин. после введения ротенона животным ежедневно в течение 2-х недель внутрибрюшинно вводили активатор  $K_{ATP}$ -каналов - уридин (УД); 4 группа – за 15 мин. до введения ротенона животным ежедневно в течение 2-х недель внутрибрюшинно вводили ингибитор  $K_{ATP}$ -каналов - 5-гидрокси-деканоата (5НД). Контрольная группа, включающая 6 животных, которым п/к, ежедневно в течение 2-х недель вводили ДМСО. Электронно-микроскопические препараты просматривали с помощью электронного микроскопа ПЕМ-124С (Украина). Морфометрические подсчеты выполняли с помощью компьютерной программы Image Tool (США).

Введение Р сопровождается развитием выраженной митохондриальной дисфункции (МД), а следовательно, и оксидативного стресса в тканях, поскольку Р способен аккумулироваться в МХ мозга, где ингибирует перенос электронов в дыхательной цепи, что ведет к накоплению свободных радикалов. Показано, что при этом в МХ продолговатого мозга наблюдается частичная или полная вакуоляризация, дисконкомплексация крист, повреждение МХ мембран, компартментаризация МХ. Более 40% МХ были структурно повреждены, при этом общее количество органелл оказывалось на 34,5% ниже, чем в контроле. Кроме этого выявлялись значительные участки (до 30-35% площади в поле зрения микроскопа) повреждения миелина с отеком и деструкцией миелиновых волокон, что является характерным признаком развития паркинсонизма. Выявлялись также структурные признаки эндотелиальной дисфункции (ЭД) с гипергидратацией гематоэнцефалического барьера – особенно его эндотелиального слоя (толщина слоя возрастала в среднем на 25-28%) и с выраженными элементами деструкции последнего. Активация  $K_{ATP}$  с помощью ДЗ существенно улучшала ультраструктуру тканей продолговатого мозга. При этом, существен-

но уменьшалось количество поврежденных МХ – их количество не превышало 20% от общего количества органелл. Причем выявленные изменения ультраструктуры преимущественно заключались в частичной вакуолизации без деструкции МХ мембран. Такая динамика изменений не дает основания говорить о развитии МД, а лишь о реакции митохондриального аппарата на неблагоприятное воздействие. Гипергидратация эндотелиального слоя гематоэнцефалического барьера сохранялась (увеличение толщины слоя на 15-18%), однако без проявлений его деструкции. Существенно уменьшалась выраженность и степень повреждений миелиновых структур в ткани продолговатого мозга. Введение УР устраняло проявления МД и ЭД в этой ткани и увеличивало на 12% общее количества МХ, что указывает на активацию морфогенеза МХ. Кроме того, в исследуемой ткани выявлялись признаки активации синтеза белка, о чем свидетельствует увеличение (в среднем на 15%) количества свободных рибосом. Также полностью устранялись структурные повреждения миелиновых волокон, и ультраструктура ткани не отличалась от свойственной контрольным животным. Митохондрии становились более электронно-плотными, даже по сравнению с контролем. При блокаде  $K_{ATP}$  с помощью 5НД, изменения ультраструктуры изучаемых тканей несколько отличались. Так, в продолговатом мозге сохранялись проявления ЭД и МД и при этом наблюдалось избыточное накопление жидкости в межклеточном пространстве и внутри миелиновых волокон, т.е. наблюдался отек ткани мозга. Следовательно, по нашим данным, блокада мито $K_{ATP}$  с помощью 5НД при ЭП, способствовала развитию процессов нейродегенерации в продолговатом мозгу, а также отека тканей, клеток, и клеточных структур.

Работа поддержана грантами РФФ №16-15-00157 и РФФИ № 16-04-00692А

## **THE EFFECT OF ATP-DEPENDENT $K^+$ -CHANNELS ACTIVITY MODULATION ON THE ULTRASTRUCTURE OF THE MEDULLA OBLONGATA TISSUE UNDER EXPERIMENTAL PARKINSONISM**

**E.V. Rozova<sup>1</sup>, I.N. Mankovskaya<sup>1</sup>, A. A. Mosentsov<sup>2</sup>, G.D. Mironova<sup>2</sup>**

*<sup>1</sup>Bogomoletz Institute of Physiology NAS of Ukraine, Kiev, Ukraine*

*<sup>2</sup>Institute of Theoretical and Experimental Biophysics RAS, Pushchino, ul. Institutskaya, 3, Russia*

The study of the occurrence and development of Parkinson's disease is often carried out in model studies. One of the models of experimental parkinsonism (EP), in which nigrostriatal degeneration which is similar in pathogenetic mechanisms and symptoms to this disease is observed, is the rotenone model. It is considered the most adequate, since it reproduces the main symptoms of movement disorders, as well as the histopathological features of this illness (for example, the formation of Levi bodies). It is known that Parkinson's disease is accompanied by the development of oxidative stress and impaired energy me-

tabolism. In this regard, investigations of the ultrastructural rearrangements in mitochondria (MC) are relevant. The development of oxidative stress may be due to various reasons, including changes in the activity of mitochondrial ATP-dependent  $K^+$  channels (mitoK<sub>ATP</sub>), whose protective role during hypoxia was previously studied both in our laboratory and abroad. In the present work, we studied the effects of modulators of mitoK<sub>ATP</sub> activity on the structural rearrangements of brain tissue in experimental parkinsonism. Studies were carried out on 28 mature male Wistar rats weighing 200-220 g (7 animals in each group): Group 1 — Rotenone (R) was subcutaneously administered daily for 2 weeks; Group 2 - in 15 minutes before the introduction of R, the activator of mitoK<sub>ATP</sub> - diazoxide (DZ) was intraperitoneally daily for 2 weeks injected to animals; Group 3 - in 15 minutes before the introduction of R, the activator of mitoK<sub>ATP</sub> - uridine (UD) was intraperitoneally daily for 2 weeks administered to animals; Group 4 - in 15 minutes before the administration of rotenone, an inhibitor of mitoK<sub>ATP</sub>, 5-hydroxy decanoate (5HD), was intraperitoneally daily for 2 weeks administered to animals. The control group consisted of 6 animals, which were subcutaneously daily for 2 weeks DMSO was administered (0.2 ml per animal, which corresponded to the volume used to dissolve rotenone). Electron microscopic preparations were examined using a transmission electron microscope PEM-124S (Ukraine). Morphometric calculations were performed using the computer software Image Tool (USA).

The administration of R is accompanied by the development of pronounced mitochondrial dysfunction (MD), and consequently, oxidative stress in the tissues, since R is able to accumulate in the MC of the brain, where it inhibits the transfer of electrons in the respiratory chain, which leads to the accumulation of free radicals. It has been shown that in the MC of the medulla oblongata, partial or complete vacuolization, cristae uncomplexing, disturbances of the MC membranes, compartmentalization of the MC are observed. In more than 40% of the MC were structurally damaged, while the total number of organelles was 34.5% less than in the control. In addition, significant areas (up to 30-35% of the area in the field of the microscope view) of myelin damage with oedema and destruction of myelin fibers were detected; it is a characteristic feature of the development of parkinsonism. Structural signs of endothelial dysfunction (ED) with hyperhydration of the blood-brain barrier — especially its endothelial layer (layer thickness increased on average by 25-28%) and with pronounced elements of destruction of the latter were also detected. Activation of mitoK<sub>ATP</sub> by using DZ significantly improved the ultrastructure of the medulla oblongata tissues. At the same time, the number of damaged MC was significantly reduced - their number did not exceed 20% of the total presence of organelles. Moreover, the revealed changes in the ultrastructure mainly consisted in partial vacuolization without destruction of the MC membranes. Such dynamics of changes does not give grounds to speak about the development of MD, but only about the reaction of the mitochondrial apparatus to an adverse effect. The hyperhydration of the endothelial layer of the blood-brain barrier was maintained (an increase of the

layer thickness by 15–18%), however, without manifestations of its destruction. It was shown the significantly decreased in severity and extent of damages of myelin structures of the medulla oblongata tissue. The introduction of UD eliminated the manifestations of MD and ED in this tissue and increased by 12% the total amount of MC in comparison with the control number of organelles, which indicates the activation of MC morphogenesis. In addition, signs of the activation of protein synthesis were detected in the examined tissue, as evidenced by the increase (on average by 15%) in the number of free ribosomes. Structural damage to myelin fibers was also completely eliminated, and the ultrastructure of this tissue did not differ from that of the control animals. Mitochondria became more electron-dense, even compared to control. When blocking  $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$  using 5HD, changes in the ultrastructure of the studied tissues were somewhat different. Thus, in the medulla oblongata, manifestations of ED and MD remained, and in this case there was an excessive accumulation of fluid in the intercellular space and inside the myelin fibers, i.e. swelling of the brain tissue was observed. Consequently, according to our data, the blockade of  $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$  with the help of 5HD under experimental parkinsonism, promoted the development of neurodegeneration processes in the medulla oblongata, as well as edema of tissues, cells, and cellular structures.

This work was supported by grants of the Russian Science Foundation No. 16-15-00157 and the Russian Foundation for Basic Research No. 16-04-00692A

## **ПОДВИЖНОСТЬ ПЛАНАРИЙ И МОЛЛЮСКОВ ЧУВСТВИТЕЛЬНА К ВЫДЕЛЕНИЯМ ХАРОВЫХ ВОДОРΟΣЛЕЙ, СОДЕРЖАЩИХ ХОЛИНЭСТЕРАЗУ И БИОГЕННЫЕ АМИНЫ**

**В.В. Рощина, Н.Э. Швирст**

*Институт биофизики клетки РАН, Институтская ул., 3,  
Пуццино, Московская область, 142290, Россия*

Взаимодействия организмов в биоценозе связаны с выделениями растений и животных. Нейромедиаторы ацетилхолин и биогенные амины, содержащихся в растительных выделениях (Рощина 2001; 2010), могут участвовать в контактах между живыми организмами. Подходящими модельными системами для исследования таких контактов могут быть взаимодействия водорослей и животных (Рощина; 2019; Рощина et al. 2019). Эта работа посвящена модели контактов аквариумной водоросли *Chara vulgaris* и водных животных червей планарий *Girardinia tigrina* и моллюсков *Bulimus tentaculatus*. С помощью азокрасителей FAST RED TR соли и DTPDD (красный аналог реагента Эллмана) показано присутствие холинэстеразы как маркера ацетилхолина на поверхности исследованных животных и водоросли. С помощью глиоксиловой кислоты и фталевого альдегида у них наблюдали также гистохимические флуоресцентные реакции на

дофамин и гистамин соответственно. Тестирование различных концентраций нейротрансмиттеров на моторику планарий и моллюсков показало негативное влияние высоких концентраций ( $10^{-4}$ - $10^{-3}$  М) дофамина и гистамина (животных падали на дно сосуда в течение 12-24 ч после начала экспериментов). Ацетилхолин никаких заметных эффектов не проявил, возможно, из-за активности холинэстеразы на поверхности этих животных.

### Литература

- Roshchina, V.V. 2001. *Neurotransmitters in Plant Life*. Enfield, NH: Science Publishers, 283 p.
- Roshchina, V.V. 2010. Evolutionary considerations of neurotransmitters in microbial, plant and animal cells. In *Microbial Endocrinology. Interkingdom Signaling in Infectious Disease and Health*, Lyte, M. and Freestone, P.P.E. (Eds.), pp. 17–52. New York: Springer.
- Roshchina V.V. 2019. Possible role of biogenic amines in plant-animal relations. In: *Neurotransmitters in Plants: Perspectives and Applications*. Eds. A. Ramakrishna and V.V.Roshchina. CRC Press, Boca Raton. Pp. 281-289
- Roshchina V.V. , Prizova N. K. and Khaibulaeva L.M. 2019. Allelopathy experiments with Chara algae model: Histochemical staining to study the neurotransmitter systems. *Allelopathy Journal* 46 (1): 17-24.

## MOTILITY OF PLANARIANS AND MOLLUSKS SENSITIVE TO CHARA ALGAE EXCRETIONS THAT CONTAIN CHOLINESTERASE AND BIOGENIC AMINES

V.V. Roshchina, N.E. Svirst

*Institute of Cell Biophysics RAS, Institutskaya Str., 3,  
Pushchino, Moscow Region, 142290, Russia*

Interactions of organisms in biocenosis are connected with the excretions from both plants and animals. Neurotransmitters acetylcholine and biogenic amines contained in plant excretions (Roshchina 2001; 2010) may participate in contacts between living organisms in biocenosis. Suitable model system of signaling between the aquatic inhabitant organisms appears to be in particular algae and animal (Roshchina 2019; Roshchina et al. 2019). This work devoted to the model of contacts between aquarium algae *Chara vulgaris* and water-living animals- worms planarians *Girardinia tigrina* and mollusks *Bulimus tentaculatus*. Azo dyes Fast Red TR salt and DTPDD (Red analogue of Ellman reagent) demonstrated color reactions to show a location of cholinesterase as a marker of acetylcholine in both animal and algae surfaces. DTPDD –staining has most seen coloration in muscle surface. Fluorescent reactions for the observation catecholamines and histamine *in situ* were studied using glyoxylic acid and o-phthalic aldehyde, relatively. The occurrence of dopamine and histamine on the surface of *Chara* (cell wall and plasmalemma) and in their excretions was shown, especially in high amounts of dense population of the algae. The testing of various concentrations of neurotransmitters on the motility of planarians and mollusks showed the negative influence of higher amounts ( $10^{-4}$ - $10^{-3}$  М) of dopamine and

histamine (animals fall on the bottom during 12-24 h after beginning of experiments). Acetylcholine had no effects, perhaps due to active cholinesterase activity of the animal surface.

### References

- Roshchina, V.V. 2001. *Neurotransmitters in Plant Life*. Enfield, NH: Science Publishers, 283 p.
- Roshchina, V.V. 2010. Evolutionary considerations of neurotransmitters in microbial, plant and animal cells. In *Microbial Endocrinology. Interkingdom Signaling in Infectious Disease and Health*, Lyte, M. and Freestone, P.P.E. (Eds.), pp. 17–52. New York: Springer.
- Roshchina V.V. 2019. Possible role of biogenic amines in plant-animal relations. In: *Neurotransmitters in Plants: Perspectives and Applications*. Eds. A. Ramakrishna and V.V.Roshchina. CRC Press, Boca Raton. Pp. 281-289
- Roshchina V.V. , Prizova N. K. and Khaibulaeva L.M. 2019. Allelopathy experiments with Chara algae model: Histochemical staining to study the neurotransmitter systems. *Allelopathy Journal* 46 (1): 17-24.

## **ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ СПИНАЛЬНЫХ ЦЕНТРОВ ПРИ РАЗЛИЧНЫХ ВВЕДЕНИЯХ МЕТИЛПРЕДНИЗОЛОНА У КРЫС С ТРАВМОЙ СПИННОГО МОЗГА**

**Д.Э. Сабирова, Б.Э. Балтин, Э.И. Ямалитдинова**

*Казанский Федеральный университет, ул. К.Маркса 7б, Россия*

Острая травма спинного мозга (ТСМ) является сложной биомедицинской проблемой. Актуальность проблемы спинномозговых повреждений обусловлена большой их распространенностью, инвалидизацией и высокой смертностью пострадавших. Эффективных методов лечения ТСМ на сегодняшний день не существует. Это связано с тем, что лекарственные средства при их введении сталкиваются с определенными проблемами. В настоящее время единственным официальным препаратом, с нейропротекторным действием, которое рекомендовано для применения в клинике после травмы спинного мозга, является метилпреднизолон. Метилпреднизолон является сильным синтетическим глюкокортикоидным препаратом. При системном применении оказывает противовоспалительное, противоаллергическое и противошоковое действие. Однако в последние годы были проведены исследования, которые поставили под сомнение эффективность и рациональность использования метилпреднизолона на практике. Было выявлено, что положительный эффект достигается лишь в 34% случаев. Остальные случаи были связаны с побочным воздействием метилпреднизолона. За счет нецелевого распределения и нестабильной структуры молекулы метилпреднизолона его действие приводит к угнетению гипофиза, потере калия, артериальной гипертензии, диабетогенному эффекту и т. д. Поэтому, наблюдается значительный интерес к использованию полимерных систем в качестве систем доставки лекарственных средств, в частности метилпреднизолона в спинной мозг при травме. Все эксперименты выпол-



нены с соблюдением биоэтических норм. Задачей нашего исследования было проанализировать функциональные изменения спинальных центров при травме спинного мозга используя различные способы введения метилпреднизолона максимальная амплитуда ответа камбаловидной мышцы после травмы падала и не восстанавливалась на протяжении 6 часов. У животных в группах с терапией метилпреднизолона и комплекса метилпреднизолона и полимера, а также с нанесением полимера амплитуда ответов возрастала. Однако в группе с аппликацией полимера без метилпреднизолона мы также наблюдали увеличение амплитуды ответа. Для оценки влияния полимера на нервные клетки были проведены дополнительные эксперименты на улитках, где было показано, что сам полимер может оказывать деполаризующий эффект, что возможно и приводило в наших экспериментах к облегчению ответов.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта №18-315-00267.

**FUNCTIONAL CHANGES OF SPINAL CENTRES  
WITH VARIOUS APPLICATION OF METHYLPREDNISOLONE  
IN RATS WITH SPINAL CORD INJURY**

**D.E. Sabirova, M.E. Baltin, E.I. Yamalitdinova**

*Kazan Federal University, K.Marksa str. 76, Russia*

Acute spinal cord injury (SCI) is a complex biomedical problem. The urgency of the problem of spinal injuries due to their high prevalence, disability and high mortality of victims. Effective methods of treatment of SCI today does not exist. This is due to the fact that medicines, when administered, face certain problems. Currently, the only official drug with a neuroprotective effect that is recommended for use in the clinic after spinal cord injury is methylprednisolone. Methylprednisolone is a strong synthetic glucocorticoid drug. With systemic use has anti-inflammatory, antiallergic and anti-shock effect. However, in recent years, studies have been conducted that have questioned the effectiveness and efficiency of the use of methylprednisolone in practice. It was found that a positive effect is achieved only in 34% of cases. The remaining cases were associated with side effects of methylprednisolone. Due to the inappropriate distribution and unstable structure of the methylprednisolone molecule, its action leads to inhibition of the pituitary, potassium loss, arterial hypertension, diabetic effects, etc. Therefore, there is considerable interest in using polymer systems as drug delivery systems, in particular methylprednisolone in the spinal brain injury. All experiments were performed in compliance with bioethical norms. The goal of our study was to analyze the functional changes in the spinal centers during spinal cord injury using various methods of methylprednisolone administration. The maximum amplitude of the response of the soleus muscle after injury fell and did not recover for 6 hours. In animals in groups with therapy of methylprednisolone and complex methylprednisolone and polymer, as well as with the application of

the polymer, the amplitude of the responses increased. However, in the group with the application of the polymer without methylprednisolone, we also observed an increase in the amplitude of the response. To assess the effect of the polymer on the nerve cells, additional experiments were conducted on the cochlea, where it was shown that the polymer itself can have a depolarizing effect, which is possible and in our experiments facilitated answers.

The study was performed with financial support RFBR, research project № 18-315-00267.

## **ПРИЛОЖЕНИЕ МНОГОМАСШТАБНОЙ МОДЕЛИ ЛЕВОГО ЖЕЛУДОЧКА ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ВЛИЯНИЯ КЛАПАННЫХ ПОРОКОВ И АРИТМИИ НА ПРОИЗВОДИТЕЛЬНОСТЬ СЕРДЦА В СИСТЕМЕ КРОВООБРАЩЕНИЯ**

**Ф.А. Сёмин, А.Ш. Осепян**

*Институт механики МГУ им. М.В. Ломоносова,  
Москва, Мичуринский пр-т, 1, Россия*

Для описания и анализа работы сердца в системе кровообращения широко используются многомасштабные модели сердечно-сосудистой системы, которые включают в себя описание процессов, происходящих на разных уровнях: от механохимических и электромеханических взаимодействий в клетке сердечной мышцы (миокарда) до макроскопических напряжений и деформаций сердца как органа. Несмотря на наличие большого количества различных моделей, лишь немногие из них корректно описывают механику миокарда и учитывают обратное механоэлектрическое сопряжение в мышце. Беря во внимание вычислительную сложность пространственных моделей сердца или его отдельных камер, сосудистую систему обычно описывают с помощью нульмерных моделей с сосредоточенными параметрами, в которых ее отделы рассматриваются как упругие резервуары с заданной податливостью, а течение крови между резервуарами определяется вязкими и инерционными сопротивлениями. Камеры сердца в подобных моделях могут быть представлены как трехмерными телами, состоящими из миокардиальной ткани, так и нульмерными резервуарами с активными напряжениями, определяющимися заданной функцией времени.

В докладе представлена новая модель сердечно-сосудистой системы, в которой левый желудочек сердца, аппроксимированный телом вращения, описывали с помощью многомасштабной модели. Стенку желудочка рассматривали как анизотропную несжимаемую сплошную среду, оси симметрии в которой заданы ориентацией волокон сердечной мышцы. В соответствии с экспериментальными данными волокна направляли вдоль спиралей, угол наклона которых линейно менялся по толщине стенки желудочка. Учитывали, что в мышечных волокнах развиваются как пассивные напряжения в ответ на деформации, так и активные напряжения, вызван-

ные взаимодействием сократительных и регуляторных белков на клеточном уровне. Для описания этих процессов на уровне клетки мы использовали нашу новую модель миокарда [1]. Сокращение всех клеток миокарда задавали одновременным периодическим входящим в клетку потоком ионов кальция. Детальное описание постановки и решения задачи о сокращении левого желудочка сердца с предыдущей версией нашей клеточной модели сердечной мышцы представлено в [2]. Остальные камеры сердца (правый желудочек и предсердия) рассматривали как вязкоупругие резервуары, давления в которых зависели от объема камеры и уровня активации, описываемого заданной функцией времени. В кровеносной системе выделяли аорту, крупные артерии, системные вены, легочные артерии и легочные вены. Такая модель гемодинамики описывалась системой обыкновенных дифференциальных уравнений для объема камер сердца  $V_*$ , расходов  $Q_*$  и давлений в резервуарах  $P_*$  вида

$$\frac{dV_*}{dt} = Q_i - Q_o, L_* \frac{dQ_*}{dt} + R_* Q_* = P_1 - P_2, C_1 \frac{dP_1}{dt} = Q_i - Q_o,$$

где  $L_*$  и  $R_*$  – инерционное и гидравлическое сопротивление, а  $C_*$  – податливость участков русла. Чтобы описать течение крови через не полностью открытый или закрытый клапан при клапанных пороках, в выражение для перепада давления на клапанах включали квадратичный член сопротивления, зависящий от отношения площади отверстия клапана к площади клапана в норме.

Изменяя периодичность функции входящего потока ионов кальция и функций активации предсердий и правого желудочка, мы провели расчеты сердечного цикла при некоторых типах аритмии в покое и под нагрузкой (с учащенным сердечным ритмом и уменьшенным периферическим сопротивлением). Даже не описывая электрические процессы и электромеханическое сопряжения в миокарде, мы смогли оценить влияние аритмии на гемодинамические характеристики сердечного цикла. Мы также провели моделирование стеноза и недостаточности аортального и митрального клапанов. Результаты расчетов при разных значениях площади отверстия клапана дали адекватные оценки величин, характеризующих тяжесть этих клапанных пороков: среднего и максимального перепада давлений между в левым желудочком и аортой при стенозе аортального клапана и желудочком и левым предсердием при стенозе митрального клапана, а также фракции регургитации (относительный объем крови, вернувшийся через не полностью закрытый клапан) при недостаточности клапанов.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 18-31-00065.

#### Литература

1. Syomin FA, Tsaturyan AK. *J Theor Biol.* 2017; 420:105–116.
2. Syomin FA, Tsaturyan AK. *Russ J Num Analysis Math Model.* 2017; 32(5):327–337.

**APPLICATION OF A MULTISCALE MODEL OF THE LEFT VENTRICLE TO THE EXAMINATION OF EFFECTS OF THE VALVULAR DISEASES AND ARRHYTHMIA ON THE HEART PERFORMANCE WITHIN CARDIOVASCULAR SYSTEM**

**F.A. Syomin, A.Sh. Osepyan**

*Institute of Mechanics MSU, Moscow, Mitchurinsky pr., 1, Russia*

To describe and analyze the heart function within the cardio-vascular system (CVS) multiscale models are widely used. The models contain the descriptions of processes taking place at different scales – from mechanochemical and electromechanical interactions within a cardiac muscle cell to macroscopic stress and strain of the heart as whole organ. Although there are many different models, only a few describe the myocardium mechanics accurately and take into account mechanoelectrical feedback. Considering the computational complexity of 3D models of the heart or its chambers, the CVS is commonly described by lumped parameter models, in which the parts of the CVS are supposed to be elastic reservoirs with given compliance, while the blood flow is specified by viscous and inertial resistance. The heart chambers can be approximated either by 3D bodies of myocardial tissue, or by null-dimensional reservoirs with active stress defined by a given time-function.

Here a new model of the CVS is presented. The left ventricle of the heart, approximated by a body of rotation, was described by a multiscale model. The ventricular wall was treated as anisotropic incompressible continuous medium in that the symmetry axes were specified by the orientation of cardiac muscle fibers. In accordance with experimental data, the fibers were aligned with helices with the helical angle changing through the wall linearly. We considered both the passive stress of strained tissue and the active stress generated by an interaction of contractile and regulatory proteins at the cell level. To describe these processes we applied our new model of the myocardium [1]. Cell contraction was initiated by simultaneous periodical influx of calcium ions. Detailed description of the problem with the usage of an earlier version of our cell model of cardiac muscle and the methods of its solution were presented in [2]. Other heart chambers (the atria and the right ventricle) were treated as viscoelastic reservoirs with the blood pressure depending on the chamber volume and activation level specified by a given time-function. The following sections of the CVS were described: aorta, major systemic arteries, systemic veins, pulmonary arteries, and pulmonary veins. This hemodynamics model was set by a system of ordinary differential equations for the chamber volumes  $V_*$ , flows  $Q_*$  and pressures  $P_*$

$$\frac{dV_*}{dt} = Q_i - Q_o, L_* \frac{dQ_*}{dt} + R_* Q_* = P_1 - P_2, C_1 \frac{dP_1}{dt} = Q_i - Q_o,$$

where  $L_*$  and  $R_*$  are inertial and hydraulic resistances, and  $C_*$  are compliances of bed flow parts. To define the blood flow through partially open valve in cases of valve diseases we included a quadratic term of hydraulic resistance that depended on the relation of the valve orifice area to its normal value.

Varying the period of the activation functions of the atria and ventricles, we performed simulations of heart-beats for some types of arrhythmias at rest and during exercises (accompanied by more frequent heart rate and decreased peripheral resistance). Although we did not simulate electrical processes and electromechanical coupling in myocardium, we were able to estimate the effects of arrhythmia on the hemodynamics of a heart-beat cycle. We have also simulated stenosis and insufficiency of the aortic and mitral valves. The results of the simulations for different values of the valve orifice area showed adequate values of the features of the valve diseases: mean and maximal pressure gradient between the left ventricle and aorta in case of aortic valve stenosis, and between the left atrium and the left ventricle in case of mitral valve stenosis; the values of regurgitant fraction, i. e., relative volume of blood returned through the incompletely closed valve, in case of valve regurgitation are also corresponded to medical data.

The work was supported by RFBF grant 18-31-00065.

### References

1. Syomin FA, Tsaturyan AK. *J Theor Biol.* 2017; 420:105–116.
2. Syomin FA, Tsaturyan AK. *Russ J Num Analysis Math Model.* 2017; 32(5):327–337.

## ДВИГАТЕЛЬНЫЕ ФУНКЦИИ СПОРТСМЕНОВ ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ ГИПОКСИЧЕСКОГО СТИМУЛА

**Д.И. Сечин, Р.В. Тамбовцева**

*Российский государственный университет физической культуры, спорта, молодежи и туризма, Москва, Сиреневый бульвар, 4, Россия*

Изменения газового состава окружающей среды способны вызывать ряд компенсаторных и адаптационных реакций организма человека. Эффективность функционирования человека при попадании в новые условия внешней среды находится в зависимости как от самих условий, так и фенотипических особенностей. Интерес к фенотипическим особенностям человека обусловлен возможностью выявления новых сторон, уже изученных физиологических механизмов формирования устойчивости организма к факторам внешней среды, а также механизмов повышения результативности деятельности при попадании в новые условия. При этом, гипоксические воздействия получили достаточно широкое распространение в спорте, благодаря возможности повышения физической работоспособности спортсменов, однако вопросы влияния гипоксии на двигательные функции не рассматриваются должным образом [1].

Целью настоящего исследования являлось определение влияния 30-ти минутной нормобарической гипоксии (10% содержание кислорода во вдыхаемой газовой смеси) на показатели двигательных функций спортсменов высокой квалификации.

Экспериментальное исследование проводилось с участием 16-ти спортсменов высокой квалификации, обладающих высоким уровнем при-

способности к выполнению двигательных функций в стрессовых условиях обусловленных соревновательной деятельностью. Исследование двигательных функций спортсменов осуществлялось с использованием аппаратно-программного комплекса «Спортивный психофизиолог».

Программа исследования предполагала проведение:

- предварительного психофизиологического исследования, направленного на получение показателей двигательных функций в обычных условиях;
- экспериментального воздействия нормобарической гипоксией (газовая смесь с содержанием 10% кислорода) в стандартизированных лабораторных условиях;
- повторного психофизиологического исследования, направленного на выявление изменений в двигательных функциях, спровоцированных гипоксическим стимулом.

По результатам исследования определено положительное влияние гипоксического стимула на скорость простой и сложной двигательной реакции. Отмечается снижение времени затрачиваемого на реагирование ведущей рукой на основные раздражители и выбор (снижение показателя является статистически достоверным при  $p < 0,05$ , показатель времени реакции на свет снизился на 11%, показатель времени реакции на звук снизился на 16,6%, показатель времени реакции выбора снизился на 10,5%). Помимо снижения времени, затрачиваемого на реагирование, произошло снижение времени центральной задержки при сложных реакциях (снижение показателя составляет 9,7% по сравнению с исходными показателями), выполняемых в состоянии, вызванном предварительным гипоксическим стимулом. Для не ведущей руки также отмечается положительная тенденция, заключающаяся в снижении времени, затрачиваемого на реагирование (снижение показателей: время реакции на свет 4,5%; время реакции на звук 2%; время реакции выбора 5,7%). При рассмотрении показателей нижних конечностей также отмечается идентичная тенденция для обеих конечностей.

Анализ показателей индивидуальной динамики темпа движений руками и ногами позволил выявить негативную тенденцию эффекта от гипоксического стимула, заключающуюся в снижении индивидуальной динамики темпа движений.

Показатели индивидуальной динамики темпа движений руками после гипоксического стимула снизились в 6-и 10-ти секундных интервалах в диапазоне от 0,5 до 5,5% без изменений качественных характеристик типа динамики.

Для показателей динамики темпа движений ногами после гипоксического стимула свойственна идентичная тенденция, однако снижение показателей варьируется от 0,5 до 9,1%.

### Литература

1. Problems of Ergogenous Methods and Techniques of Training in Theory and Practice of Elite Sport / Volkov N.I., Voytenko Y.A., Tambovtseva R.V., Dyshko B.A. // Theory and Practice of Physical Culture. 2013. № 8. С. 15.

## MOTOR FUNCTIONS OF ATHLETES AFTER EXPOSURE TO HYPOXIC STIMULUS

**D.I. Sechin, R.V. Tambovtseva**

*Federal State Budgetary Educational Establishment of Higher Education «Russian state university of physical education, sport, youth and tourism (SCOLIPE)»  
Moscow, Sirenevyy boulevard, 4, Russia*

Changes in the gas composition of the environment can cause a number of compensatory and adaptive reactions of the human body. The efficiency of human functioning in contact with new environmental conditions depends on both the conditions themselves and phenotypic features. The interest in the phenotypic characteristics of a person is due to the possibility of identifying new aspects, the already studied physiological mechanisms of formation of the body's resistance to environmental factors, as well as mechanisms for increasing the effectiveness of activity when it enters new conditions. At the same time, hypoxic effects are fairly widespread in sports, due to the possibility of increasing the physical performance of athletes, but the issues of the effect of hypoxia on motor function are not considered properly [1].

The purpose of this study was to determine the effect of 30-minute normobaric hypoxia (10% oxygen content) on the indices of motor functions of highly qualified athletes.

An experimental study was conducted with the participation of 16 highly qualified athletes with a high level of fitness to perform motor functions under stressful conditions caused by competitive activity. The study of the motor functions of athletes was carried out using the "Sports Psychophysiologicalist" hardware-software complex.

The research program involved:

- preliminary psychophysiological research aimed at obtaining indicators of motor functions in normal conditions;
- experimental exposure to normobaric hypoxia (gas containing 10% oxygen) under standardized laboratory conditions;
- repeated psychophysiological research aimed at identifying changes in motor functions provoked by a hypoxic stimulus.

According to the results of the study, the positive effect of the hypoxic stimulus on the speed of simple and complex motor responses was determined. There is a decrease in the time spent not responding with the leading hand to the main stimuli and choice (the decline is statistically significant at  $p < 0.05$ , the response time to light has decreased by 11%, the response time to sound has decreased by 16.6%, the time selection reactions decreased by 10.5%). In addition to reducing the time spent on response, there was a decrease in the time of the central delay in complex reactions (a decrease of 9.7% compared with baseline), performed in the state caused by prior hypoxic exposure. For the non-leading hand, there is also a positive trend, which consists in reducing the time spent on response (reduction of indicators: response time to light is 4.5%; response time

to sound is 2%; selection response time is 5.7%). When considering indicators of the lower extremities, there is also an identical trend for both legs.

An analysis of the indices of the individual dynamics of the pace of movements with arms and legs made it possible to reveal the negative tendency of the effect from the hypoxic stimulus, which consists in reducing the individual dynamics of the rate of movements.

The indices of individual dynamics of the pace of hand movements after the hypoxic stimulus decreased in six 10 second intervals in the range from 0.5 to 5.5% without changing the qualitative characteristics of the type of dynamics.

For indicators of the dynamics of the rate of movement of the legs after the hypoxic stimulus, an identical tendency is characteristic, but the decline in indicators varies from 0.5 to 9.1%.

### References

1. Problems of Ergogenous Methods and Techniques of Training in Theory and Practice of Elite Sport / Volkov N.I., Voytenko Y.A., Tambovtseva R.V., Dyshko B.A. // Theory and Practice of Physical Culture. 2013. № 8. С. 15.

## **ПРОДУКТЫ МЕТАБОЛИЗМА ПРОБИОТИЧЕСКИХ БАКТЕРИЙ, СТИМУЛИРУЮТ МЫШЕЧНОЕ СОКРАЩЕНИЕ И КАЛЬЦИЕВЫЙ ГОМЕОСТАЗ**

**К.В. Соболев**

*Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН;  
Санкт-Петербург, Тореза 44, Россия*

Исследовали эффекты, вызываемые аппликацией продуктов метаболизма пробиотических бактерий (ПП, особый метод ферментации, патент США [1]), на сокращение одиночных скелетных волокон лягушки и в культивируемых скелетных миоцитах крысы. ПП при 10% концентрации потенцировал максимум одиночного сокращения скелетного волокна на  $62 \pm 4\%$ , и скорость нарастания напряжения на  $73 \pm 4\%$ ,  $n=6$ ,  $p < 0.01$ . Особенностью являлось то, что при отмывании ПП указанные характеристики одиночного сокращения оставались увеличенными, в течение 2-х часов. В основе, по-видимому, лежит либо увеличение чувствительности сократительного аппарата к кальцию и/или увеличение высвобождаемого кальция из саркоплазматического ретикулума во время одиночного сокращения. Однако, время достижения максимума, как одиночного сокращения, так и тетануса, максимальная скорость укорочения, величина тетануса и характеристика сила-скорость при аппликации ПП оставались неизменными. В скелетных миоцитах крысы ПП вызывал увеличение внутриклеточного кальция. Причем, при отмывании ПП наблюдали значительный вход внеклеточного кальция в миоциты, который может иметь природу емкостного входа кальция. Длительная потенциация одиночного сокращения скелетно-мышечного волокна при аппликации ПП позволяет применять указанные продукты при различных скелетно-мышечных патологиях и синдроме хронической усталости, а также при нарушениях кальциевого гомеостаза в клетках.



Автор выражает благодарность Г.Б. Белостоцкой за культивирование миоцитов.

Работа выполнена в рамках государственного задания ФАНО России (тема № АААА-А18-118012290142-9).

### Литература

1. Sobol C.V. A new class of pharmabiotics with unique properties. In: A. M. Grumezescu, A.M. Holban (Eds.), *Soft Chemistry and Food Fermentation*. Elsevier. 2017. V. 3. P. 79–112.

## **SPECIAL METABOLIC PRODUCTS OF PROBIOTIC BACTERIA STIMULATE SKELETAL MUSCLE CONTRACTION AND CALCIUM HOMEOSTASIS**

**K.V. Sobol**

*Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, RAS,  
St. Petersburg, Thorez 44, Russia*

The effects caused by the application of metabolic products of probiotic bacteria (PP, a special method of fermentation, US patent [1]) on single skeletal fibers of the frog and in cultured skeletal rat myocytes were studied. The PP at 10% concentration potentiated the maximum of a single skeletal fiber contraction by  $62 \pm 4\%$ , and the rate of single contraction by  $73 \pm 4\%$ ,  $n = 6$ ,  $p < 0.01$ . The peculiarity was that during the washing out of PP, the indicated characteristics of a single contraction remained increased, for 2 hours. This affects appear to be due to an increase in the sensitivity of the contractile apparatus to calcium and/or an increase in the release of calcium from the sarcoplasmic reticulum during a single contraction. However, the time to achieve the maximum of a single contraction and tetanus, the maximum speed of unloaded shortening, the amplitude of tetanus, and the force-velocity characteristic during the application of PP remained unchanged. In rat skeletal myocytes, PP increased intracellular calcium. Moreover, during the washing out of PP, a significant entry of extracellular calcium into myocytes was observed, which may have the nature of the capacitive entry of calcium. Unusual, long-term potentiation of a single contraction of the muscle fiber after application of PP allows the use of these products in various muscle pathologies and chronic fatigue syndrome, as well as during violation of calcium homeostasis in the cells.

The author is grateful to G.B. Belostotskaya for the cultivation of myocytes.

The work was supported by the Federal Agency for Scientific Organizations of Russia (topic no. АААА-А18-118012290142-9).

### References

1. Sobol C.V. A new class of pharmabiotics with unique properties. In: A. M. Grumezescu, A.M. Holban (Eds.), *Soft Chemistry and Food Fermentation*. Elsevier. 2017. V. 3. P. 79–112.

## РЕГУЛЯЦИЯ СЕРДЕЧНЫХ СОКРАЩЕНИЙ ЧЕЛОВЕКА ПРИ ГИПОКСИЧЕСКОМ ВОЗДЕЙСТВИИ

**К.В. Соболев, В.П. Нестеров**

*Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН;  
Санкт-Петербург, Тореза 44, Россия*

Сердечнососудистые заболевания (ССЗ) остаются одной из ведущих причин смерти в большинстве развитых стран. Важную роль в их патогенезе играет повышение жесткости крупных артерий, поскольку, увеличение жесткости (ригидности) сосудов — один из главных факторов прогрессирования кардиоваскулярной патологии [1]. Увеличение жесткости сосудов оказывает все большую нагрузку на сердце, в результате начинают происходить процессы ремоделирования миокарда. Поэтому, снижение жесткости сосудов может уменьшать риски заболеваний сердечнососудистой системы (ССС).

С помощью неинвазивного пульсометрического метода [2] изучали характер вегетативной (автономной) регуляции сердечных сокращений при гипоксическом воздействии на ССС, которое создавалось натужной задержкой дыхания (НЗД) на глубоком вдохе. Обследование проводилось на одном из авторов (К.В.С.) с помощью артериального пьезопульсометра, изготовленного в ООО «ВАСА-ПУЛЬС» (Санкт-Петербург). Вначале измеряли сердечные сокращения в течение 2 мин при нормальном дыхании. Затем при НЗД в течение 30 секунд и при последующем восстановлении нормального дыхания в течение 3 минут.

Кратковременная или умеренная гипоксия вызывают включение компенсаторных адаптационных механизмов. Процедура НЗД, в нашем случае, оказывала влияние на базальный тонус сосудов. Наблюдалось некоторое уменьшение жесткости стенок сосудов с соответствующим уменьшением скорости распространения пульсовой волны (на  $6\% \pm 1\%$ ). Частота сердечных сокращений в начальной фазе НЗД уменьшалась под влиянием стимуляции вагуса. При этом аортальный клапан в период НЗД закрывался раньше на  $15\% \pm 3\%$  мс, чем при нормальном ритме дыхания. Учитывая, что основное количество крови поступает в коронарные артерии во время диастолы, а не систолы, можно предположить, что раннее закрытие аортального клапана может дополнительно увеличивать питание сердца кислородом при НЗД.

Таким образом, в данном исследовании с помощью неинвазивного пульсометрического метода показано влияние НЗД на работу ССС человека. Не исключено, что дозированная задержка дыхания может облегчать работу сердца, уменьшая нагрузку на левый желудочек сердца, посредством снижения жесткости сосудов. Помимо этого, во время НЗД увеличивается время снабжения кровью коронарных артерий, что уменьшает риски ишемической болезни сердца, возрастающие с возрастом.

Работа выполнена в рамках государственного задания ФАНО России (тема № АААА-А18-118012290142-9).

## Литература

1. Townsend RR, et al., Recommendations for Improving and Standardizing Vascular Research on Arterial Stiffness: A Scientific Statement From the American Heart Association. Hypertension. 2015 Sep;66(3):698-722.
2. Нестеров В.П., Бурдыгин А.И., Нестеров С.В. Новые возможности пульсометрического анализа функционального состояния сердечно-сосудистой системы у человека. Физиология человека. 2017, Т. 43 (4), С. 1–9.

## HEART RATE REGULATION DURING HYPOXIC EXPOSURE

**K.V. Sobol, V.P. Nesterov**

*Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, RAS,  
St. Petersburg, Thorez 44, Russia*

Cardiovascular disease (CVD) remains one of the leading causes of death in most developed countries. An important role in their pathogenesis is an increase in the stiffness of large arteries, since an increase in the stiffness (rigidity) of the vessels is one of the main factors in the progression of cardiovascular pathology [1]. An increase in the stiffness of the vessels exerts an increasing load on the heart, resulting in remodeling of myocardium. Therefore, reducing the stiffness of blood vessels can reduce the risks of diseases of the cardiovascular system (CAS).

Using a non-invasive pulsometric method [2], we studied the nature of the autonomic regulation of heart contractions during hypoxic effects on the cardiovascular system, which was created by a strained breath-hold (SBH) during a deep breath. The survey was conducted on one of the authors (C.V.S.) with the help of an arterial piezo pulsometer, made at VASA-PULS (St. Petersburg). First, heart contractions were measured for 2 minutes with normal breathing, then, with the SBH within 30 seconds and with the subsequent restoration of normal breathing for 3 minutes.

Short-term or moderate hypoxia causes the inclusion of compensatory adaptation mechanisms. The SBH procedure, in our case, had an effect on the basal vascular tone. There was a slight decrease in the stiffness of the vessel walls with a corresponding decrease in the pulse wave velocity (by 6□%). The heart rate in the initial phase of the SBH decreased under the influence of vagus nerve stimulation. At the same time, the aortic valve during SBH period was closed earlier by 15□ ms than with a normal rhythm of respiration. Given that the main amount of blood enters the coronary arteries during diastole, it can be assumed that early closure of the aortic valve may further increase myocardial oxygen supply during SBH.

Thus, in this study, using the non-invasive pulsation method, the effect of SBH on the work of human CAS is shown. It is not excluded that the dosed breath can facilitate the work of the heart, reducing the load on the left ventricle of the heart, by reducing the stiffness of the vessels. In addition, during SBH, the time of blood supply to the coronary arteries increases, which reduces the risks of ischemic heart disease, which can be increased with age.

The work was supported by the Federal Agency for Scientific Organizations of Russia (topic no. AAAA-A18-118012290142-9).

### References

1. Townsend RR, et al., Recommendations for Improving and Standardizing Vascular Research on Arterial Stiffness: A Scientific Statement From the American Heart Association. Hypertension. 2015 Sep;66(3):698-722.
2. Nesterov V.P., Burdygin A.I., Nesterov S.V. New features pulsometric analysis of the functional state of the cardiovascular system in humans. Human physiology. 2017, V. 43 (4), pp. 1–9.

## **ВЛИЯНИЕ ОСТРОЙ ГИПОКСИИ НА ПОДВИЖНОСТЬ КРЫС В «ОТКРЫТОМ ПОЛЕ»: ПОДКРЕПЛЕНИЕ БИОХИМИЧЕСКИМИ ДЕТЕРМИНАНТАМИ ГИПОКСИЧЕСКОГО ВЛИЯНИЯ В БАЗАЛЬНЫХ ЯДРАХ МОЗГА**

**И.Ю. Сопова**

*Буковинский государственный медицинский университет,  
Черновцы, Театральная площадь, 2, Украина*

Изучали подвижность крыс в условиях острой гипоксии в тесте «открытое поле». Работа выполнена на 32 ювенильных крысах-самцах. Предварительно часть животных подвергали действию острой гипоксии в модифицированной проточной барокамере путем имитации подъема крыс на высоту 12000 м. После чего в «открытом поле» в течение 3-х минут регистрировали показатели: горизонтальную активность, вертикальные двигательные реакции, норковый рефлекс. Затем проводили декапитацию животных с извлечением головного мозга. Поскольку в формировании движения активную роль играют базальные ядра, для исследования брали следующие структуры мозга: хвостатое ядро, бледный шар, прилежащее ядро перегородки, миндалину. В гомогенатах определяли такие биохимические детерминанты гипоксического влияния как уровень процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) по содержанию первичных продуктов - диеновые конъюгаты (ДК), вторичных - малоновый диальдегид (МДА), а также уровень окисленно модифицированных белков (ОМБ) по содержанию альдегид- и кетон- динитрофенилгидразонов нейтрального характера, которые регистрировали при 370 нм, и основного характера (430 нм).

Как показали наши исследования, действие острой гипоксии сопровождалось мощным угнетающим действием на компоненты двигательных реакций крыс в «открытом поле». Так, горизонтальная локомоция была ниже чем у интактных животных в 4,8 раза, вертикальная – в 9,6 раза, норковый рефлекс – в 5,7 раза, что свидетельствовало о существенном изменении функционального состояния центральной нервной системы крыс, подвергшихся действию гипоксии.

Влияние острой гипоксии на подвижность животных подкреплялось изменениями в базальных ядрах головного мозга. Так, в

базальных ядер гипоксических крыс значительно возросла концентрация МА (в среднем на 63%). Уровень ДК был больше в прилежащем ядре перегородки (55,0%), бледном шаре (31,3%), миндалине (21,7%). Также острая гипоксия сопровождалась ростом содержания ОМБ в базальных ядрах мозга: прирост альдегид- и кетон- динитрофенилгидразонов нейтрального и основного характера наблюдался в прилежащем ядре перегородки соответственно – на 20,6% и 28,5%, бледном шаре – на 30,6% и 48,2%.

Таким образом, анализ результатов исследования показал, что острое гипоксическое воздействие приводит к выраженному торможению двигательной активности крыс, сопровождающемуся существенным нарушением нейрохимических процессов в базальных ядрах головного мозга животных.

## **INFLUENCE OF ACUTE HYPOXIA ON THE MOBILITY OF RATS IN THE «OPEN FIELD»: VERIFICATION OF THE HYPOXIC DAMAGE TO BRAIN BASAL GANGLIA BY BIOCHEMICAL DETERMINANTS**

**I.Yu.Sopova**

*Bukovinian State Medical University, Chernovtsy, Teatralnaya pl., 2, Ukraine*

In the present study a mobility of rats in conditions of acute hypoxia in the «open field» test was studied. The experiments were performed on 32 juvenile male rats. Previously, part of animals was subjected to acute hypoxia in a modified flow pressure chamber by simulating the lifting of rats to an altitude of 12000 m. Then, in the «open field» test, indicators of the horizontal activity, vertical motor responses, and mink reflex were recorded for 3 minutes. After that a decapitation of animals with the extraction of the brain was performed. Since the basal ganglia play an active role in the movement control, the following brain structures were taken for the study: caudate nucleus, globus pallidus, nucleus accumbens, corpus amygdaloideum. In tissue homogenates the following biochemical determinants of the hypoxic influence were determined: the intensity of lipid peroxidation (LPO) processes by the level of primary – diene conjugates (DC), and secondary products – malone dialdehyde (MDA); the level of oxidative modification of proteins (OMB) by the level of aldehyde and ketone dinitrophenylhydrazones of neutral character, registered at 370 nm, and of basic character (430 nm).

As it was shown in our research, the effect of acute hypoxia was accompanied by a powerful inhibitory effect on the components of the motor reactions of rats in the «open field». Thus, horizontal locomotion was decreased by 4.8 times compared to intact animals, vertical – by 9.6 times, mink reflex – by 5.7 times, indicating a significant change in the functional state of central nervous system of rats subjected to hypoxia. The influence of acute hypoxia on the mobility of animals was verified by changes in the basal ganglia of brain. Thus,

MDA level in the basal ganglia of hypoxic rats significantly increased (by 63% on average). DC level was higher in the nucleus accumbens (55.0%), globus pallidus (31.3%), and corpus amygdaloideum (21.7%). Acute hypoxia was also accompanied by an increase in OMB level in the basal ganglia of brain: aldehyde and ketone dinitrophenylhydrazones of a neutral and basic character increased in the nucleus accumbens by 20.6% and 28.5%, respectively, in the globus pallidus – by 30.6% and 48.2%.

Thus, the analysis of research results has shown that acute hypoxia leads to marked inhibition of the motor activity of living beings, accompanied by a significant disruption of neurochemical processes in the basal ganglia of brain.

## **ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДЕТЕРМИНАЦИЯ МЫШЕЧНЫХ ВОЛОКОН I ТИПА И СПОРТИВНЫЙ РЕЗУЛЬТАТ У СПОРТСМЕНОВ-ЛЕГКОАТЛЕТОВ**

**Р.В. Тамбовцева**

*Российский государственный университет физической культуры спорта, молодежи и туризма, г. Москва, Сиреневый бульвар 4, Россия*

В настоящее время достаточно актуальным является вопрос о генетической предрасположенности к мышечной работе у спортсменов различных специализаций [1]. Состав мышечных волокон предопределяет функциональное состояние и «границы нормы» [2,4,5]. Следует ожидать, что соотношение различных типов мышечных волокон будет определять способность выполнения физической работы различной мощности и продолжительности. Целью настоящего исследования явилось изучение взаимосвязи соотношения различных типов мышечных волокон со спортивным результатом у спортсменов легкоатлетов. В эксперименте принимали участие высококвалифицированные спортсмены-легкоатлеты (n=12) в возрасте от 18 до 25 лет. Методом пункционной биопсии у испытуемых получали биоптаты латеральной головки четырехглавой мышцы бедра. С помощью кальций-кобальтового метода на криостатных срезах толщиной 12 мкм определяли активность АТФазы миозина при рН=4,6 [3].

В таблице 1 представлены показатели коэффициента корреляции - r, со спортивными результатами спортсменов-легкоатлетов.

Таблица 1. Корреляционные взаимосвязи волокон окислительного типа (I) спортсменов-легкоатлетов и их спортивных результатов

Дистанции	% МВИ	t (мин.сек)	r (% МВИ – t)
Легкоатлеты (средние дистанции)			
100	58,42±3,21	11,8	0,64***
200	15,37±11,03	24,2	0,65***
400	52,42±8,93	51,6	0,30
800	57,34±6,27	1.55,2	0,12
1500	58,42±6,32	3.34,1	-0,11

Примечание: \*\*\* - p < 0,001.

Было выявлено, что результаты спортсменов, не коррелируют достоверно с процентным содержанием мышечных волокон I типа. Между тем, на тех дистанциях, которые не являются для спортсменов соревновательными (например, короткие дистанции для всех бегунов) между содержанием мышечных волокон I типа и временем прохождения дистанции получены положительные корреляционные зависимости. Чем больше в мышечной ткани спортсменов бегунов мышечных волокон I типа, тем медленнее они бегут на дистанциях 100 и 200 м.

Таким образом, полученные результаты показывают, что содержание мышечных волокон окислительного типа I предопределяет их генетическую предрасположенность к физической работе определенной продолжительности и мощности.

### Литература

1. Сонькин В.Д., Тамбовцева Р.В. Развитие мышечной энергетики и работоспособности в онтогенезе. М.: Книжный дом «ЛИБРОКОМ», 2018. 368 с.
2. Тамбовцева Р.В. Биохимические особенности онтогенетического развития энергообеспечения мышечной деятельности // Новые исследования. 2014. №1. С.68-75
3. Padukula H.A., Herman E. Factors affecting the activity of adenosine triphosphate and other phosphatases as measured by histochemical techniques // J. Histochem., Cytochem. 1955. V.3. P. 161.
4. Sonkin V.D., Gutnik B.J., Tambovtseva R.V., Nash D. Ergometric Investigation of Work Capacity Ontogeny: Influence of Exogenic and Endogenic Factors // Advances in Medicine and Biology. 2010. V.1. P. 129-165.
5. Sonkin V.D., Tambovtseva R.V. Energy metabolism in children and adolescents Energetics. Chorvatia, 2011. P.1-30.

## GENETIC DETERMINATION OF MUSCULAR FIBER I TYPE AND SPORTS RESULT OF ATHLETES SPORTSMEN

**R.V. Tambovtseva**

*Russian State University of Physical Culture, Sport, Youth and Tourism,  
Moscow, Sirenevyy Boulevard 4, Russia*

Currently, the issue of genetic predisposition to muscular work in athletes of various specializations is quite relevant [1]. The composition of muscle fibers predetermines the functional state and the "boundaries of the norm" [2,4,5]. It should be expected that the ratio of different types of muscle fibers will determine the ability to perform physical work of different power and duration. The purpose of this study was to study the relationship of the ratio of various types of muscle fibers with a sports result in athletes run. The experiment involved highly skilled athletes run (n = 12) aged 18 to 25 years. Using the method of puncture biopsy, the subjects received biopsies of the lateral head of the quadriceps femoris. Using the calcium-cobalt method on cryostat sections of 12  $\mu\text{m}$  thickness, the activity of myosin ATPase was determined at pH = 4.6 [3]. Table 1 presents the indicators of the correlation coefficient - r, with sports results of athletes run.

Table 1. Correlation interrelations of the oxidative type fibers (I) of athletes and their athletic results

Distances	% MBI	<i>t</i> (min.sec)	<i>r</i> (% MBI – <i>t</i> )
Athletes (middle distance)			
100	58,42±3,21	11,8	0,64***
200	15,37±11,03	24,2	0,65***
400	52,42±8,93	51,6	0,30
800	57,34±6,27	1.55,2	0,12
1500	58,42±6,32	3.34,1	-0,11

Note: \*\*\* -  $p < 0.001$

It was found, that the results of athletes do not correlate significantly with the percentage of type I muscle fibers. Meanwhile, at those distances that are not competitive for athletes (for example, short distances for all runners) between the content of type I muscle fibers and the time taken to complete the distance, positive correlation dependences are obtained. The more muscle tissue runners I have in muscle tissue of type I, the slower they run at distances of 100 and 200 m.

Thus, the obtained results show that the content of muscle fibers of oxidative type I predetermines their genetic predisposition to physical work of a certain duration and power.

#### References

1. Sonkin V.D., Tambovtseva R.V. The development of muscle energy and efficiency in ontogenesis. М.: Book house "LIBROCOM", 2018. 368 p.
2. Tambovtseva R.V. Biochemical features of the ontogenetic development of energy supply of muscle activity // New Studies. 2014. №1. P.68-75
3. Padukula H.A., Herman E. Factors affecting the activity of adenosine triphosphatase and other phosphatases as measured by histochemical techniques // J. Histochem., Cytochem. 1955. V.3. P. 161.
4. Sonkin V.D., Gutnik B.J., Tambovtseva R.V., Nash D. Ergometric Investigation of Workability Ontogeny: Influence of Exogenic and Endogenic Factors // Advances in Medicine and Biology. 2010. V.1. P. 129-165.
5. Sonkin V.D., Tambovtseva R.V. Energy metabolism in children and adolescents Energetics. Chorvatia, 2011. P.1-30.

### ИССЛЕДОВАНИЕ МОРФОЛОГИЧЕСКИХ НАРУШЕНИЙ ЦИТОСКЕЛЕТНЫХ СТРУКТУР, ПРИВОДЯЩИХ К ИЗМЕНЕНИЮ КЛЕТОЧНОЙ ПОДВИЖНОСТИ ФИБРОБЛАСТОВ, ПОЛУЧЕННЫХ ИЗ КОЖИ ПАЦИЕНТОВ С БОЛЕЗНЬЮ ГЕНТИНГТОНА

А.С. Таран<sup>1</sup>, О.А. Зубкова<sup>2</sup>, А.Е. Харитонов<sup>2</sup>,  
М.А. Лагарькова<sup>2</sup>, И.Б. Алиева<sup>3</sup>

<sup>1</sup> МГУ им. Ломоносова, биологический факультет,  
Москва, 119992, Ленинские горы, д. 1, стр. 12.

<sup>2</sup> Федеральный научный клинический центр физико-химической медицины,  
Москва, 119435, М. Пироговская, 1А.

<sup>3</sup> НИИ ФХБ им. А.Н. Белозерского, МГУ им. Ломоносова,  
Москва, 119992, Ленинские горы, дом 1, стр 40.



Нейродегенеративные заболевания объединяют обширный перечень патологий, связанных с постепенной деградацией и гибелью определенных типов нейронов. Одна из групп таких патологий, полиглутаминовые болезни, включает болезнь Гентингтона (хорея Гентингтона или Хантингтона) – тяжелое и на настоящий момент неизлечимое наследственное аутосомно-доминантное нейродегенеративное заболевание, приводящее к смерти спустя 8-15 лет от момента манифестации клинических симптомов. Клиническая картина болезни Гентингтона складывается из комплекса двигательных (хореические гиперкинезы), эмоционально-волевых и когнитивных расстройств, неизбежно приводящих к тяжелой физической и психической инвалидизации пациентов. Причина развития болезни Гентингтона - экспансия CAG-повторов в гене белка хантингтина (НТТ, huntingtin, гентингтин). Чаще всего болезнь Гентингтона проявляется в среднем возрасте, однако показано, что возраст дебюта зависит от количества повторов и может приходиться на детский или юношеский период жизни человека. На морфологическом уровне болезнь Гентингтона проявляется прогрессирующей гибелью срединных шипиковых нейронов стриатума. Несмотря на то, что наибольшее влияние эта мутация оказывает на нервные клетки, показано, что НТТ экспрессируется во всех клетках и тканях млекопитающих. Функция НТТ у человека не ясна; не известно, какие нарушения происходят в клетках и тканях больных на клеточном и субклеточном уровне. Однако показано, что НТТ взаимодействует с белками, участвующими в (1) транскрипции, (2) передаче сигналов в клетке и (3) внутриклеточном транспорте.

В настоящей работе исследовали морфофункциональные нарушения, происходящие на клеточном уровне и затрагивающие субклеточные цитоскелетные структуры (микротрубочки и актиновые компоненты) в клетках, полученных от пациентов с болезнью Гентингтона. В качестве объекта исследования была использована первичная культура фибробластов, полученная из биоптата кожи пациентов. Для получения культивируемых фибробластов использовался материал от больных с разным количеством CAG-повторов в гене НТТ (42, 44 и 76). В качестве контроля были взяты фибробласты из биоптатов кожи здоровых доноров, соответствующих больным по полу и возрасту. Изменения внутриклеточной архитектуры компонентов цитоскелета в клетках, полученных от больных болезнью Гентингтона, исследовали методами иммунофлуоресцентного анализа, с помощью флуоресцентной конфокальной микроскопии и микроскопии сверхвысокого разрешения (SIM, Structural Illuminational Microscopy). Для оценки пролиферативного потенциала и количества клеток в G<sub>0</sub>-фазе клеточного цикла был использован маркер Ki-67. Сравнение соотношения изоформ актина в клетках проводили при помощи метода вестерн-блоттинга. Для изучения функциональных нарушений клеточной подвижности, характерных для болезни Гентингтона, использовали стандартные клеточно-физиологические тесты (распластывание, движение

по субстрату, выползание в экспериментальную рану).

Оказалось, что в цитоплазме фибробластов, полученных от пациентов с болезнью Гентингтона, структура сети микротрубочек критически не изменяется, однако изменяется архитектура актиновой сети и нарушается взаимное расположение  $\gamma$ - и  $\beta$ -актиновых структур. При этом общее количество белков  $\gamma$ - и  $\beta$ -актина не отличается от такового в фибробластах здоровых доноров. В клетках больных нарушается процесс формирования первичных ресничек: количество ресничек было ниже, а их средняя длина меньше, чем в фибробластах здоровых доноров. Физиологические тесты, выполненные в ходе коротких и длительных прижизненных наблюдений, показали, что фибробласты пациентов с болезнью Гентингтона имеют иные характеристики распластывания и движения по сравнению с фибробластами от здоровых доноров – они имеют более короткую стадию распластывания, способны к поляризации до достижения полного распластывания и начинают двигаться до завершения стадии поляризации. В процессе прикрепления и распластывания на субстрате фибробласты больных на стадии поляризации не формируют выраженный ведущий край и хвост, их ламелла образует многочисленные тонкие выросты на переднем крае. При выползании в экспериментальную рану фибробласты пациентов с болезнью Гентингтона двигались быстрее, чем контрольные клетки, однако их движение было менее упорядоченным и более хаотичным – они часто меняли направление движения по сравнению с нормальными клетками.

Таким образом, полученные результаты впервые демонстрируют, что при болезни Гентингтона морфологические нарушения, вызванные мутацией в *гене HTT*, затрагивают структуры, составляющие цитоскелет клеток, что приводит к функциональным нарушениям – изменению характеристик распластывания и клеточной подвижности по сравнению с фибробластами от здоровых доноров.

Поддержано РФФ (грант №19-15-00425) и Программой развития Московского государственного университета (Moscow State University Development Program PNR 5.13.).

## **CYTOSKELETAL MORPHOLOGICAL DISORDERS LEADING TO THE CELL MOTILITY CHANGES IN SKIN FIBROBLASTS DERIVED FROM PATIENTS WITH HUNTINGTON'S DISEASE**

**A. Taran<sup>1</sup>, O. Zubkova<sup>2</sup>, A. Kharitonov<sup>2</sup>, M. Lagarkova<sup>2</sup>, I. Alieva<sup>3</sup>**

<sup>1</sup> *Biology Faculty, Moscow State University, Moscow, Russia*

<sup>2</sup> *Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine of Federal Medical Biological Agency, Russia, 119435, Moscow, Russia*

<sup>3</sup> *A. N. Belozersky Institute, Moscow State University, Moscow, Russia*

Neurodegenerative diseases combine an extensive list of pathologies associated with the gradual degradation and death of certain types of neurons. One of the groups of such pathologies, polyglutamine diseases, includes

Huntington's disease (Huntington's chorea) – a severe and currently untreatable hereditary autosomal dominant neurodegenerative disease, leading to death after 8-15 years since the manifestation. The clinical picture of Huntington's disease consists of a complex of motor (choreic hyperkinesia), emotional-volitional and cognitive disorders, inevitably leading to severe physical and mental disability of patients. The reason of Huntington's disease development is an expansion of CAG repeats in the *gene* of huntingtin protein (HTT). Most often, manifestation of this ailment occurs in middle age, but it is shown that it depends on the number of repeats and can occur on the child or adolescent period of human life. At the morphological level, Huntington's disease is effected by the progressive death of the median spined neurons of the striatum. Despite the fact that this mutation has the greatest impact on nerve cells, it is shown that HTT is expressed in all cells and tissues of mammals. The function of HTT in humans is not clear and it is not known what disorders occur in the cells and tissues of patients at the cellular and subcellular level. However, it is revealed that HTT interacts with proteins involved in (1) transcription, (2) signal transmission in the cell and (3) intracellular transport.

In this research we investigated morphofunctional disorders occurring at the cellular level and affecting subcellular cytoskeletal structures (microtubules and actin components). The primary culture of fibroblasts obtained from the skin biopsy of patients was used as the object of the study. Material was taken from patients with different amounts of CAG repeats in the *HTT gene* (42, 44 and 76). Fibroblasts from skin biopsies of healthy donors corresponding to patients by sex and age have been applied as control. Changes in the intracellular architecture of cytoskeleton components in cells were investigated by immunofluorescence analysis using fluorescent confocal microscopy and super resolution microscopy (SIM, Structural Illuminational Microscopy). To estimate the proliferative potential and the cell cycle (percentage of cells in G<sub>0</sub>-phase) we used Ki-67 marker. Comparison of the ratio of actin isoforms in cells was performed using the Western-blotting method. To study the functional disorders of cellular motility characteristic of Huntington's disease, standard cell-physiological tests (spreading, movement on the substrate, experimental wound-healing) were used.

It turned out that in the cytoplasm of fibroblasts obtained from patients with Huntington's disease, the structure of the microtubule network does not change critically. But the architecture of cytoplasmic actin network changes and the mutual arrangement of  $\gamma$  - and  $\beta$ -actin structures is disturbed. Herewith the total amount of  $\gamma$  - and  $\beta$ -actin proteins does not differ from that in fibroblasts of healthy donors. In the cells of patients the process of formation of primary cilia is violated: the number of cilia was lower, and their average length was less than in fibroblasts of healthy donors. Physiological tests carried out during short and long-term *in vivo* observations showed that fibroblasts of patients with Huntington's disease have different characteristics of spreading and movement compared to fibroblasts from healthy donors – they have a shorter stage of spreading, are capable to polarized before complete cell spreading and start the

movement before then polarization stage is fully completed. In the process of attachment and spreading on the substrate fibroblasts of patients do not form a pronounced leading edge and tail at the stage of polarization, their lamella forms numerous thin outgrowths on the leading edge. During the healing of the experimental wound fibroblasts of patients with Huntington's disease moved faster than control cells, but their movement was less directed and more chaotic – they often changed direction of movement compared to normal cells.

Thus, our results had shown for the first time that in Huntington's disease morphological disorders caused by mutations in the *HTT gene* affect the cell cytoskeleton structures, which leads to functional disorders – cell spreading and motility characteristics are changed compared to healthy donors fibroblasts.

Supported by RSF grant (#19-15-00425) and MSU Development Program PNR 5.13.

## **МНОЖЕСТВЕННЫЕ МЕХАНИЗМЫ УСИЛЕНИЯ СИНАПТИЧЕСКОЙ ПЕРЕДАЧИ ПОД ДЕЙСТВИЕМ BDNF В МОТОРНЫХ СИНАПСАХ МЫШИ**

**Е.О. Тарасова, А.И. Молчанова, А.С. Митева,  
А.Е. Гайдуков, О.П. Балезина**

*Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,  
Москва, Ленинские горы 1/12, Россия*

BDNF (нейротрофический фактор мозга) хорошо известен как нейротрофин, регулирующий роста и дифференцировку нейронов и синапсов, в том числе моторных, в раннем онтогенезе. В последние годы BDNF рассматривается в качестве возможного ретроградного фактора, регулирующего синаптическую пластичность. BDNF экспрессируется в скелетной мышце и может оттуда секретироваться при электрической и/или сократительной активности мышечных волокон [1]. В моторных нервных терминалах описаны TrkB-рецепторы BDNF [2], способные запускать сигнальные каскады с участием различных вторичных посредников и мишеней. Ранее в моторных синапсах эффекты экзогенного BDNF описывались в виде потенцирования частоты миниатюрных потенциалов концевой пластинки (МПКП) или возрастания амплитуды мультиквантовых потенциалов концевой пластинки (ПКП) [2], однако квантовый анализ при этом не проводился и до сих пор не был установлен механизм, лежащий в основе этих эффектов. Мы впервые обнаружили ранее не известный способ индуцировать высвобождение миогенного BDNF – за счет активации постсинаптических рецепторов тромбина PAR1 [3]. В данной работе на нервно-мышечных препаратах диафрагмы мышей BALB/c с использованием внутриклеточного микроэлектродного отведения МПКП и ПКП исследовали механизмы регуляции спонтанной и вызванной секреции АХ под действием экзогенного BDNF (1 нМ). BDNF вызывал потенцирование вызванной секреции АХ за счет возрастания амплитуд всех ПКП в коротком залпе (50

Гц, 1 с) на 30-32% ( $p < 0.05$ ). На фоне BDNF параллельно возрастала и амплитуда МПКП. При этом значение квантового состава ПКП на фоне BDNF статистически значимо не отличалось от контрольных. Эффект BDNF в отношении амплитуды постсинаптических потенциалов был устойчив к отмывке. Регистрация на нерассеченных нервно-мышечных препаратах только МПКП выявила увеличение средней амплитуды МПКП на 25-30% и частоты МПКП на 25-40% на фоне BDNF, причем значение частоты МПКП, в отличие от амплитуды, возвращалось при отмывке к контрольному. Возрастание амплитуды, но не частоты МПКП под действием BDNF полностью предотвращалось ингибированием везикулярного транспортера АХ везамиколом (1 мкМ), что свидетельствует в пользу того, что увеличение амплитуды постсинаптических потенциалов связано с возрастанием размера квантов АХ на пресинаптическом уровне. Мы установили, что прирост амплитуды МПКП под действием BDNF не связан с TrkB-опосредованной активацией фосфолипазы С (PLC) в моторных терминалях, поскольку блокатор PLC U73122 (5 мкМ) не предотвращал увеличение амплитуд МПКП под действием BDNF, при этом на фоне U73122 BDNF полностью утратил способность увеличивать частоту МПКП. Исследование других TrkB-опосредованных сигнальных путей, обеспечивающих прирост размера квантов АХ, выявило, что экзогенный BDNF терял способность увеличивать амплитуду, но не частоту МПКП при ингибировании PKA с помощью H-89 (1 мкМ), или при блокировании MEK1/2-Erk сигнального пути с помощью U0126 (20 мкМ). В присутствии антагониста пресинаптических аденозиновых A2A-рецепторов ZM241385 (10 нМ) BDNF в значительной степени утрачивал способность увеличивать амплитуду МПКП. Это может свидетельствовать о сопряженности сигнальных путей – PKA-опосредуемого (запускаемого при активации A2A-рецептров), и MEK1/2-опосредуемого, запускаемого при активации TrkB экзогенным BDNF, и обеспечивающих, в конечном итоге прирост размера кванта АХ. Таким образом, мы впервые показали, что в моторных синапсах BDNF на пресинаптическом уровне запускает несколько сигнальных путей, увеличивающих как частоту МПКП (с участием PLC), так и амплитуду МПКП (с участием MEK1/2). Для проявления BDNF-индуцированного возрастания размера квантов АХ оказалась необходима тоническая (то есть имеющаяся даже в покое, при отсутствии вызванной секреции АХ) активность аденозиновых A2A-рецепторов, стимулирующих PKA, которая наряду с транслокацией и кластрированием TrkB-рецепторов для BDNF, может обеспечивать дополнительную активацию MEK1/2. Такое сопряжение двух сигнальных путей рассматривается как один из способов модуляции синаптической передачи в нейронах ЦНС [4].

Работа поддержана грантом РФФИ № 19-04-00616А.

#### Литература

1. *Hurtado E. et al.* // Front. Mol. Neurosci. 2017. 10. 147
2. *Garcia N. et al.* // J. Neurosci. 2010. № 30. P. 16514-16552.

3. Gaydukov A.E. et al. // Biochem. Moscow Suppl. Ser. A. 2018. № 12 P. 33-42.  
4. Sebastiao A. et al. // Biochem. Biophys. Acta 2011. № 1808. P. 1340-1349.

## **MULTIPLE MECHANISMS OF SYNAPTIC TRANSMISSION UPREGULATION BY BDNF IN MOUSE NEUROMUSCULAR JUNCTIONS**

**E.O. Tarasova, A.I. Molchanova, A.S Miteva,  
A.E. Gaydukov, O.P. Balezina**

*Lomonosov Moscow State University, Moscow, Lenin Hills 1/12, Russia*

BDNF (brain-derived neurotrophic factor) is widely known as a factor involved in growth and differentiation of neurons and synapses, including neuromuscular junctions, during early ontogenesis. Lately, BDNF has been studied as a possible retrograde signaling factor in synaptic plasticity regulation. BDNF is expressed in skeletal muscles and can be secreted from there during electrical and/or contractile activity of the muscle fibers [1]. TrkB-receptors for BDNF are described in motor nerve terminals [2], and their activation triggers various signaling cascades with diverse targets and second messengers. Previously it was shown that exogenous BDNF causes miniature end plate potential (MEPP) frequency upregulation or multiquantal end plate potential (EPP) amplitude increase in motor synapses. Nevertheless, quantal analysis has not been conducted yet and the mechanism underlying those effects still remains unknown. In our previous research we discovered a new way of BDNF release induction - by activating postsynaptic thrombin receptors PAR1 [3]. This work was conducted on BALB/c mice diaphragm preparations using intracellular microelectrode techniques of MEPP and EPP registration. The focus of this study was the mechanism of spontaneous and evoked acetylcholine (ACh) release regulation by exogenous BDNF (1 nanoM). BDNF lead to a potentiation of evoked ACh release in form of an about 30-32% increase ( $p < 0.05$ ) in amplitude of each EPP in train during short rhythmic synaptic activity (50 Hz, 1 sec). At the same time BDNF caused an increase in MEPP amplitude. Therefore, EPP quantal content remained at control levels. Those BDNF-mediated effects on EPP amplitude were maintained during washout. Recording of only spontaneous synaptic activity from untreated mice diaphragm preparations revealed an increase in MEPP amplitude by 25-30% and an increase in frequency by 25-40% following BDNF application. While this rise in amplitude persisted during washout, MEPP frequency returned back to control levels. The increase in MEPP amplitude but not frequency increase caused by BDNF was completely abolished by blocking the vesicular ACh transporter with vesamicol (1  $\mu\text{M}$ ), which is fully consistent with the idea that the upregulation of postsynaptic potential amplitude is due to the increased size of single quanta on presynaptic level. We found that BDNF-mediated increase in MEPP amplitude is not linked to TrkB-mediated phospholipase C (PLC) activation in motor terminals, since PLC inhibitor U73122 (5  $\mu\text{M}$ ) did not prevent MEPP amplitude upregulation by BDNF. At the same time BDNF lost its ability to increase MEPP frequency in the presence of U73122.

Research of different TrkB-mediated pathways involved in upregulation of the size of ACh quanta showed that exogenous BDNF lost its ability to increase MEPP amplitude but not MEPP frequency when PKA was inhibited by H-89 (1  $\mu\text{M}$ ) or when the MEK1/2-Erk signaling pathway was blocked by U0126 (20  $\mu\text{M}$ ). In the presence of presynaptic A2A-type adenosine receptor antagonist ZM241385 (10 nanoM) BDNF pronouncedly lost its potentiating effect on MEPP amplitude. This can be due to an intercross of two signaling pathways – the PKA-mediated (during A2A-receptor activation) and MEK1/2-mediated pathway, which is triggered by TrkB-receptor activation by exogenous BDNF. Both of those pathways lead ultimately to an increase in the size of ACh quanta.

Thus, we were the first to show that in motor synapses BDNF induces multiple signaling pathways on presynaptic level, resulting in both MEPP frequency (PLC-dependent) and amplitude (MEK1/2-dependent) upregulation. The increase in the size of ACh quanta caused by BDNF requires a tonic (present even in resting conditions, without evoked ACh release) activity of adenosinic A2A-receptors, which stimulates PKA activity. This PKA activity can involve both TrkB-receptor translocation and clustering and an additional activation of MEK1/2. Such a crosstalk between two signaling pathways is regarded as one of the ways of synaptic transmission modulation in central neurons [4].

This work was supported by RFBR grant № 19-04-00616A.

#### References

1. *Hurtado E. et al.* // Front. Mol. Neurosci. 2017. 10. 147
2. *Garcia N. et al.* // J. Neurosci. 2010. № 30. P. 16514-16552.
3. *Gaydukov A.E. et al.* // Biochem. Moscow Suppl. Ser. A. 2018. № 12 P. 33-42.
4. *Sebastiao A. et al.* // Biochem. Biophys. Acta 2011. № 1808. P. 1340-1349.

## ВЛИЯНИЕ СЕРОТОНИНА НА ДВИГАТЕЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ ЛИЧИНОК ПЛОСКИХ ЧЕРВЕЙ

О.О. Толстенков<sup>1</sup>, Н.Д. Крещенко<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Центр паразитологии Института проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН, Москва

<sup>2</sup>Институт биофизики клетки ФИЦ ПНЦБИ РАН, Пушкино, [nkreshch@rambler.ru](mailto:nkreshch@rambler.ru)

У паразитических плоских червей - трематод, цестод и моногеней мускулатура тела служит для заражения промежуточного или основного хозяина, прикрепления к тканям хозяина, закрепления там, а также для локомоции, в том числе плавания. Физиологические механизмы двигательной активности личинок паразитических червей недостаточно изучены. В настоящей работе исследовали действие серотонина на подвижность личинок *Cryptocotyle lingua* (Trematoda, Platyhelminthes) разных стадий онтогенетического развития. Показано, что паттерн дискретного плавания личинок *C. lingua* состоит из кратких периодов быстрого движения – бросков и более длительных периодов – парения в толще воды. Для оценки эффекта

серотонина на локомоторную активность личинок трематод использовали несколько показателей: длину пути, среднюю скорость плавания, число бросков, и их длительность.

**Метод.** Личинки *C. lingua* были выделены из зараженных моллюсков *Littorina littorea*. Личинки разного возраста - 1, 6, 12, 20 и 24 ч после эмиссии были использованы для экспериментов. На каждую временную точку брали не менее 10-ти особей. Каждую особь помещали в аквариум диаметром 3 мм и глубиной 2 мм, наполненный фильтрованной морской водой. Температура воды была в пределах 18–20°C. Двигательную активность церкарий регистрировали с помощью цифровой видеокамеры VEC-535 прикрепленной к микроскопу. Во время видеозаписи использовали освещение белого света в 70 Ватт. У контрольных личинок движения записывались в течение 2 мин в чистой морской воде. Затем воду замещали на свежий 1µM раствор серотонина и наблюдение проводили в течение следующих 2 мин. двигательную активность личинок исследовали при помощи программы Ethovision XT (Нидерланды). Элементы поведения, такие как число активных и пассивных фаз плавания учитывали, просматривая видеозапись и анализируя (среднее перемещение в мм между кадрами умноженное на 30 кадров/сек). Статистический анализ применяли для верификации возможного влияния серотонина на различные параметры локомоторного поведения личинок. Учитывали количество эпизодов плавания, их продолжительность в течение 2х минут (N=10, в каждой точке), скорость, повороты, количество активных и пассивных фаз плавания.

**Результаты.** Анализ локомоторной активности в контрольной группе особей показал, что длина пройденного за 2 мин пути существенно уменьшалась у личинок *C. lingua* с увеличением их возраста (Рис. 1а-с), с возрастом также уменьшалось и количество «бросков» (Рис. 1d,  $p < 0.0001$ ), а также средняя скорость движения личинок.

У экспериментальных животных, находящихся под воздействием серотонина, детальный анализ подвижности личинок в каждой возрастной группе особей показал заметное изменение их двигательной активности. Статистический анализ (ANOVA) выявил существенное увеличение числа бросков при движении личинок в возрасте 1 ч, 6 ч и 20 ч ( $p < 0.05$ ), (Рис. 1d). При этом длительность самих бросков не отличалась у подопытных и контрольных особей ( $p > 0.05$ ), а также у личинок разных возрастов ( $p > 0.05$ ).

Таким образом, наши данные показали, что присутствие серотонина в среде ведет к изменению локомоторного поведения личинок *C. lingua*, индуцируя увеличение частоты активных фаз плавания (бросков) без существенного изменения длительности бросков, а также средней скорости плавания. Этот эффект был наиболее выражен у молодых особей и уменьшался с увеличением возраста личинки. По нашему мнению, характер серотонин-индуцируемых изменений локомоции у дискретно плавающих *C. lingua* указывает скорее на опосредованное влияние серотонина на командные нейроны центральной нервной системы, которые организуют всю локомо-



торную активность личинок, чем на его прямое действие на мотонейроны или мускулатуру.

Работа поддержана грантами РФФИ №18-04-00349 и №19-04-01154а.

## EFFECT OF SEROTONIN ON MOTILITY OF FLATWORMS LARVAE

O.O. Tolstenkov<sup>1</sup>, N.D. Kreshchenko<sup>2</sup>

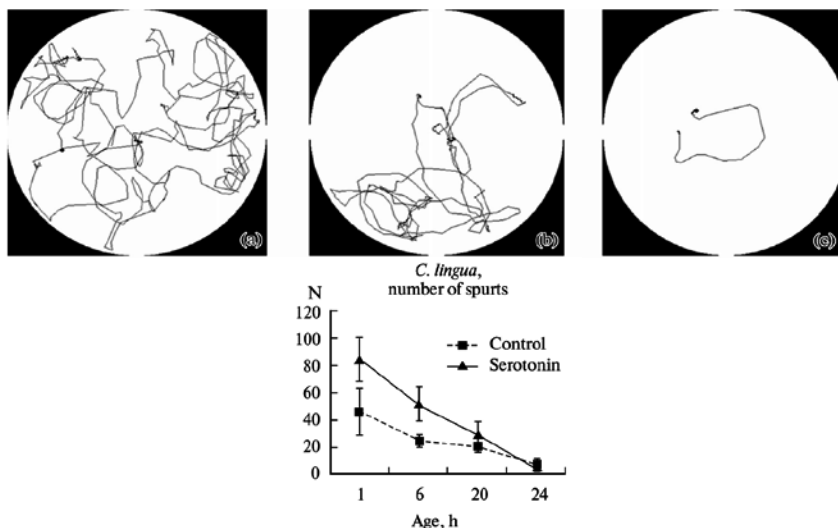
<sup>1</sup>A.N. Severtsov Institute of Ecology and Evolution RAS, Moscow,

<sup>2</sup>Institute of Cell Biophysics RAS, Pushchino, Moscow region

In parasitic flatworms – trematodes, cestodes and monogeneans musculature of its body wall provides their locomotion, swimming, the ability to infect definitive and intermediate hosts and to attach to the host tissue. Physiological mechanism of larval locomotion activity is practically unstudied. In present work the effect of serotonin on motility of larval developmental stages of *Cryptocotyle lingua* (Trematoda, Platyhelminthes) has been investigated. The pattern of discreet swimming of *C. lingua* larvae is consisted of short phase of fast swimming – the spurts and the more prolonged period of relaxation. To evaluate the serotonin effects on larvae locomotion several characteristics have been used: the total track length, the average swimming velocity, the number of spurts, and its duration.

**Methods.** *C. lingua* larvae were obtained from the mollusks *Littorina littorea*. Trematoda larvae of different age (1, 6, 12, 20 and 24 h from emission) were studied. At least 10 animals were used in each experiment for each time point. Individual was placed into aquarium with a diameter of 3 mm and depth of 2 mm filled with filtered seawater. The water temperature was 18–20°C. Video recording of larvae motility was carried out using digital video camera VEC-535 attached to a stereomicroscope. During video recording a 70W white light source was used as an illuminator. For investigation of control pattern of locomotion the larvae's movements were recorded for 2 min in pure seawater. Then water was replaced by fresh 1µM seawater solution of serotonin and observations were resumed for the next 2 min. Larval locomotor activities were analyzed using software Ethovision XT (The Netherlands). The behavior elements - the number of active and passive phases were calculated frame by frame (average dislocation in mm between frames multiplied by 30 frames/s), viewing of video records. Statistical tests were applied to investigate the effect of serotonin on different parameters of locomotion.

**Results.** Analysis of the locomotion of *C. lingua* larvae in control group showed that the length of track per 2 min decreased appreciably with the age of the larva (Fig. 1a-c) and a decrease in the number of spurts with age (Fig. 1d,  $p < 0.0001$ ). The average swimming velocity has also decreases with the larvae's age. In experimental group of animals the detailed analysis of motor activity in each age time points showed a pronounced alteration in larva's locomotion pattern under the serotonin treatment. Two-way ANOVA analysis revealed a significant ( $p < 0.05$ ) serotonin-induced increase in the number of spurts for the larval



**Fig. 1.** (a-c) Locomotion tracks of larvae of different ages (1, 12 and 20 h) during 2 min of experiment; (d) Changes in behavioral pattern of *C. lingua* larvae depending on age and the presence of serotonin in the medium, number of spurts for 2 min.

stages of 1h, 6h, and 20h of age (Fig. 1d). The duration of spurt was indistinguishable between experimental and control series ( $p>0.05$ ), remaining unaffected with age ( $p>0.05$ ).

Thus, our data indicate that the presence of serotonin in the medium leads to changes in the locomotion pattern. In *C. lingua* larvae serotonin induced an increase of the frequency of active swimming phases (spurts) without significant changes in the spurt's duration and larvae velocity. This effect is most apparent in young individuals and quickly decreases with its age. The character of serotonin-induced changes in locomotion of intermittently swimming *C. lingua* larvae indicates rather an influence of serotonin on command neurons, which organize the locomotor activity, than its direct effect on muscles or motoneurons. Additional researches are required.

Supported by RFBR grants No.18-04-00349a to N.K. and No.19-04-01154a to O.T.

## ОТВЕТ КАМБАЛОВИДНОЙ МЫШЦЫ КРЫСЫ НА ТЕНОТОМИЮ

О.В. Туртикова<sup>1</sup>, Н.А. Вильчинская<sup>1</sup>, И.И. Парамонова<sup>1</sup>,  
К.А. Шарло<sup>1</sup>, И.Д. Львова<sup>2</sup>, Б.С. Шенкман<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ГНЦ РФ – Институт медико-биологических проблем РАН,  
Москва, Хорошевское шоссе 76-а;

<sup>2</sup>Казанский (Приволжский) федеральный университет,  
Казань, ул. Кремлевская, 18

Тенотомия мышц (нарушение целостности сухожилия) имеет значение как посттравматическое и послеоперационное состояние. В то же время, изучению механизмов поддержания белкового гомеостаза, а также пусковых механизмов атрофических процессов при тенотомии мышц не уделяется достаточно внимания.

Целью работы было оценить изменение основных параметров синтеза и распада белка в камбаловидной мышце крыс после 14-суточной тенотомии. Мы исследовали экспрессию мРНК нейротрофических факторов и рецепторов к ним, активность основного энергетического сенсора клетки АМФ-зависимой протеинкиназы (АМПК) и ее мишени АСС, содержание ключевых маркеров синтеза белка (p70S6k, p-p70S6k), протеолиза (FOXO3a, Muf2, Atrogen) и аутофагии (ULK-1) в камбаловидной мышце крыс после 14 суточной тенотомии. Были сформированы группы ложнооперированных и тенотомированных крыс. Оперировали правую конечность, оставляя левую интактной.

Экспрессия мРНК альфа-1 субъединицы АМПК увеличилась в 2,03 раза, ( $p < 0,01$ ), а альфа-2 субъединицы – не изменилась. Экспрессия мрнк нейротрофина BDNF в камбаловидной мышце крыс не изменилась, а рецепторов к BDNF - TrkB в результате тенотомии повысилась в 1,5 раза по сравнению с контролем. Содержание фосфорилированной АМПК в *m. soleus* при тенотомии увеличилось в 3,12 раза по сравнению с контрольной группой ( $p < 0,001$ ), при этом содержание тотальной АМПК достоверно не изменилось. Содержание фосфорилированной киназы p70S6K увеличилось в 1,94 раза по сравнению с контролем ( $p < 0,01$ ). Содержание фосфорилированного FOXO3a повысилось в 3,09 раза при тенотомии по сравнению с контрольной группой ( $p < 0,01$ ), при этом тотальное содержание FOXO3a изменилось незначительно. Содержание ULK-1 увеличилось в 1,77 раза по сравнению с контролем ( $p < 0,05$ ), а фосфорилированного ULK-1 – в 2,59 раза по сравнению с контролем ( $p < 0,05$ ).

Мы обнаружили повышение экспрессии мРНК TrkB в *m. soleus* после 14 суточной тенотомии; вероятно связь TrkB и его лиганда BDNF с атрофией. Обращает на себя внимание активация анаболического каскада (рост фосфорилирования p70S6K) на фоне снижения мышечной массы, повышения активности АМПК, активации протеолиза и аутофагии. Известно, что BDNF (reviewed in Sakuma, Yamaguchi, 2011) через TrkB рецептор может активировать m-TOR-p70s6k, тем самым, стимулируя синтез белка. В то же время, BDNF увеличивает фосфорилирование АМПК и АССβ *in vitro* and *ex vivo*, а АМПК подавляет mTOR и синтез белка (reviewed in Thomson D.M., 2018). Атрофия от бездействия скелетных мышц грызунов после 1-4 недель вывешивания по разным данным увеличивает, сокращает или не изменяет фосфорилирование АМПК (rewieved in David M. Thomson, 2018). Таким образом, необходимо дальнейшее изучение механизмов атрофии при тенотомии, прояснения роли BDNF и АМПК в этом процессе.

Поддержано грантом РФФИ№17-04-01970

## Литература

1. Sakuma K., Yamaguchi A. The recent understanding of the neurotrophin's role in skeletal muscle adaptation. *Biomed Biotechnol.* 2011; 2011:201696. doi: 10.1155/2011/201696.
2. Thomson D.M. The Role of AMPK in the Regulation of Skeletal Muscle Size, Hypertrophy, and Regeneration. *Int J Mol Sci.* 2018 Oct 11; 19(10). pii: E3125. doi: 10.3390/ijms19103125. Review.

### RAT SOLEUS RESPONSE TO TENOTOMY

O.V. Turtikova<sup>1</sup>, N.A. Vilchinskaya<sup>1</sup>, I.I. Paramonova<sup>1</sup>,  
K.A. Sharlo<sup>1</sup>, I.D. Lvova<sup>2</sup>, B.S. Shenkman<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Institute for Bio-Medical Problems of Russian Academy of Science,  
Khoroshevskoe hwy, 76A, Moscow, Russia;*

<sup>2</sup>*Kazan (Volga region) Federal University, Kazan University,  
Kremlevskaya st., 18, Kazan, Russia*

Muscle tenotomy is important post-traumatic and postoperative condition. At the same time, insufficient attention is paid to the mechanisms of maintaining protein homeostasis, as well as triggering atrophic processes during muscle tenotomy. The goal of this study was to evaluate changes in the basic parameters of protein synthesis and breakdown in rat soleus muscle after 14-day tenotomy. We investigated the expression of mRNA neurotrophic factors and their receptors, the activity of cell energy sensor AMP-dependent protein kinase (AMPK) and its target ACC, the content of key markers of protein synthesis (p70S6k, p-p70S6k), proteolysis (FOXO3a, Murf2, Atrogen) and autophagy (ULK-1) in rat soleus muscle after 14 day tenotomy. Control (sham-operated) and Tenotomized group were formed. Right limb was operated, leaving the left intact.

The mRNA expression of AMPK alpha-1 subunit increased 2.03 times ( $p < 0.01$ ), and the alpha-2 subunit did not change. The BDNF mRNA expression in rat soleus muscle did not change, and TrkB (BDNF receptor) mRNA expression increased 1.5 times as a result of tenotomy as compared with control group. The content of phosphorylated AMPK in tenotomized soleus muscle increased 3.12 times as compared with the control group ( $p < 0.001$ ), while the content of total AMPK did not change significantly. The content of phosphorylated kinase p70S6K increased 1.94 times compared with control group ( $p < 0.01$ ). The content of phosphorylated FOXO3a increased 3.09 times in tenotomy compared with control group ( $p < 0.01$ ), while the total content of FOXO3a changed slightly. The content of ULK-1 increased 1.77 times as compared with control group ( $p < 0.05$ ), and that of phosphorylated ULK-1 increased 2.59 times as compared with control group ( $p < 0.05$ ).

We found an increase in TrkB mRNA expression in m. soleus after 14 day tenotomy; TrkB and its BDNF ligand are likely to be associated with atrophy. Attracts attention the activation of the anabolic cascade (increased phosphorylation of p70S6K) on the background of reduced muscle mass, increased

AMPK activity, activation of proteolysis and autophagy. It is known that BDNF (reviewed in Sakuma, Yamaguchi, 2011) via the TrkB receptor can activate mTOR-p70s6k, thereby stimulating protein synthesis. At the same time, BDNF increases AMPK and ACC $\beta$  phosphorylation in vitro and ex vivo, while AMPK inhibits mTOR and protein synthesis (reviewed in Thomson D.M., 2018). Atrophy from inactivity of rodent skeletal muscles after 1-4 weeks of hindlimb suspension according to various sources increases, reduces or does not alter AMPK phosphorylation (reviewed by David M. Thomson, 2018). Thus the mechanisms of skeletal muscle atrophy during tenotomy, the role of BDNF and AMPK in this process requires clarification.

Поддержано грантом РФФИ №17-04-01970

### References

3. Sakuma K., Yamaguchi A. The recent understanding of the neurotrophin's role in skeletal muscle adaptation. *Biomed Biotechnol.* 2011; 2011:201696. doi: 10.1155/2011/201696.
4. Thomson D.M. The Role of AMPK in the Regulation of Skeletal Muscle Size, Hypertrophy, and Regeneration. *Int J Mol Sci.* 2018 Oct 11; 19(10). pii: E3125. doi: 10.3390/ijms19103125. Review.

## **ВЛИЯНИЕ ВЫСОКОИНТЕНСИВНЫХ СОКРАЩЕНИЙ НА АНАБОЛИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ В ИЗОЛИРОВАННОЙ M. SOLEUS НА ФОНЕ ГРАВИТАЦИОННОЙ РАЗГРУЗКИ**

**С.А. Тыганов, С.В. Рожков, Т.М. Мирзоев, Б.С. Шенкман**

*ИМБП РАН, Москва, Хорошевское шоссе 76а*

На данный момент, в литературе обсуждаются несколько потенциальных молекул, которые могут являться механосенсором скелетной мышцы или участвовать в передаче механического сигнала. Использование блокаторов стретч-активируемых каналов (хлорида гадолиния и стрептомицина) показало, что эти каналы в условиях эксцентрического сокращения, активируют Akt/mTOR сигнальный путь (Spangenburg and McBride 2006). В связи с чем, целью данного исследования являлось изучение механизмов влияния стретч-чувствительных каналов на систему регуляции синтеза белка в скелетной мышце млекопитающих на фоне 7-дневной гравитационной разгрузки. Моделируемая гравитационная разгрузка задних лап крысы проводилась с помощью антигортостатического вывешивания (Morey-Holton, Globus; 2002). После чего, изолированная m. soleus помещалась в аэрируемую карбогеном емкость, содержащую раствор Кребса-Ханзеляйта, для проведения серии высокоинтенсивных сокращений. Вторая мышца содержалась в аналогичных условиях, для последующего сопоставления результатов. Для ингибирования стретч-активируемых каналов в раствор Кребса-Ханзеляйта добавляли хлорид гадолиния в концентрации 20  $\mu$ M (Sonobe et al., 2008). По завершению серии сокращений мышца замораживалась для последующего анализа анаболических маркеров и уровня синте-

за белка. Параметры сокращения изолированной мышцы фиксировались с помощью датчика напряжения Aurora Scientific Dual Mode Lever System 305-C. К седьмым суткам вывешивания достоверно ( $p < 0,05$ ) снизились масса камбаловидной мышцы на 28% и сила изометрического сокращения изолированной мышцы на 18%. После серии высокоинтенсивных сокращений мы наблюдали достоверный прирост уровня синтеза белка, измеренного методом SUnSET, во всех экспериментальных группах. При этом, ингибитор стретч-чувствительных каналов не снижал достоверно этот прирост в мышцах крыс, после 7-суточного вывешивания. Схожий эффект наблюдался для фосфорилирования маркеров работы Akt/mTOR сигнального пути: p70S6k и RPS6. Исходя из результатов исследования, можно сделать вывод, что стретч-чувствительные каналы функционально инактивированы в условиях моделируемой гравитационной разгрузки, поскольку их ингибирование не привело к дальнейшему снижению уровня синтеза белка и фосфорилирования p70S6k и RPS6.

Работа поддержана грантом РФФИ № 16-34-60055.

## **AN INFLUENCE OF HIGH-INTENSITY MUSCLE CONTRACTIONS ON ANABOLIC RESPONSE IN SOLEUS MUSCLE AFTER 7-DAY GRAVITATIONAL UNLOADING**

**S.A. Tyganov, S.V. Rozhkov, T.M. Mirzoev, B.S. Shenkman**  
*IBMP RAS, Moscow, Khoroshevskoe Highway 76a, 123007 Moscow, Russia*

It is widely recognized that mechanical tension plays a key role in the regulation of skeletal muscle mass. To date, there are several potential mechanosensitive molecules transducing mechanical signal in skeletal muscle. It was shown that stretch-activated channels (SACs) are activated during stretch-induced contraction and induce muscle hypertrophy via Akt/mTOR pathway (Spangenburg, McBride; 2006). Therefore, the aim of the present study was to assess a possible role of SAC in the propagation of a mechanical signal to mTORC1 in the soleus muscle following hindlimb unloading (HU). Gravitational unloading was simulated using hindlimb suspension model (Morey-Holton, Globus; 2002). To perform high-intensity muscle contractions (HIMC), rat soleus muscles were isolated from the hindlimbs and mounted between a lever arm of a position feedback servomotor and an immovable pin in a thermo-regulated organ bath contained Krebs–Henseleit buffer. 20  $\mu\text{M}$  (Sonobe et al., 2008) of  $\text{GdCl}_3$  was added to the medium to inhibit SAC function. After HIMC, muscles were subjected to Western blot analysis in order to determine the content of phosphorylated forms of the key anabolic markers and the rate of protein synthesis. Contracted muscle was compared to resting muscle that was treated the same way, but without contractions. Maximal isometric force and muscle stiffness were measured using Aurora Scientific Dual Mode Lever System 305-C. After 7-day HU m.soleus mass was significantly decreased by 28%, as well as maxi-

mal muscle isometric force and stiffness. Also, the rate of the protein synthesis (PS) in the resting muscles of the unloaded rats significantly declined ( $-40\%$ ,  $p < 0.05$ ) compared to the control values. HIMC caused a significant increment in PS in all stimulated muscles compared to the resting muscles. More importantly, SAC blocker attenuated this increment. Similar effect was observed for the phosphorylation of the key Akt/mTOR pathway targets - p70S6k and RPS6. The results of the study suggest that attenuation of mTORC1-signaling and PS in response to HIMC in the unloaded soleus muscle may be associated with functional inactivation of SAC.

The study was supported by RFBR grant #16-34-60055.

**ВЛИЯНИЕ ИНГИБИРОВАНИЯ ГИСТОНДЕАЦЕТИЛАЗЫ 1  
НА СОДЕРЖАНИЕ ТИТИНА, УРОВЕНЬ ЕГО  
ФОСФОРИЛИРОВАНИЯ И ЭКСПРЕССИЮ ГЕНА *TTN*  
В М. SOLEUS КРЫСЫ ПОСЛЕ ТРЕХСУТОЧНОЙ  
ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ РАЗГРУЗКИ**

**А.Д. Уланова<sup>1</sup>, Ю.В. Грицына<sup>1</sup>, А.Г. Бобылёв<sup>1</sup>, Э.И. Якупова<sup>1</sup>,  
В.К. Жалимов<sup>2</sup>, С.П. Белова<sup>3</sup>, Е.П. Мочалова<sup>3</sup>,  
Т.Л. Немировская<sup>3</sup>, Б.С. Шенкман<sup>3</sup>, И.М. Вихлянецв<sup>1,4</sup>**

<sup>1</sup>*Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, 142290  
Пуцино Московской области, Россия; e-mail: ivanvikhlyantsev@gmail.com*

<sup>2</sup>*Институт биофизики клетки РАН – обособленное подразделение ФИЦ  
ПНЦБИ РАН, 142290 Пуцино Московской области, Россия*

<sup>3</sup>*ГНЦ РФ – Институт медико-биологических проблем РАН,  
123007, Москва, Россия*

<sup>4</sup>*Пуцинский государственный естественно-научный институт,  
142290 Пуцино Московской области, Россия*

Исследовано влияние ингибирования гистондеацетилазы 1 (HDAC1) на содержание титина, уровень его фосфорилирования, экспрессию и альтернативный сплайсинг гена *TTN* в m. soleus крысы после 3-х суточной функциональной разгрузки. Животные были разделены на 3 группы: контрольная группа (С, n=7); группа 3-х суточного вывешивания (HS, n=7); группа 3-х суточного вывешивания с введением ингибитора HDACs класса I CI-994 в концентрации 1 мг/кг/сутки (HS+CI, n=7). В группе HS обнаружено уменьшение на 13.8% ( $p < 0,05$ ) индекса «масса m. soleus/масса тела животного», по сравнению с группой С, что свидетельствует о развитии атрофических изменений в мышце. При этом наблюдалось снижение на 28.5% ( $p < 0,05$ ) содержания самой высокомолекулярной изоформы интактного титина-1 (NT) и увеличение в 1,81 раза ( $p < 0,05$ ) экспрессии гена *TTN*. Эти изменения сопровождались увеличением на 42.9% ( $p < 0,05$ ) содержания кальпаина-1 – кальций-активируемой протеазы, субстратом которой является титин. Статистически значимых различий в уровне фосфорилирования титина между группами С и HS не обнаружено. Также не выявлено изме-

нений альтернативного сплайсинга пре-мРНК титина (в диапазоне экзонов от 50-го до 111-го) в *m. soleus* животных этих групп.

Ингибирование HDAC1 при функциональной разгрузке предотвращало развитие атрофии *m. soleus* и снижение содержания титина. При этом наблюдалось снижение на 10.3% ( $p = 0.132$ ) уровня фосфорилирования NT-титина. Статистически значимых различий в экспрессии и альтернативном сплайсинге гена *TTN* между группами C и HS+CI не зарегистрировано.

Выводы: Трехсуточная функциональная разгрузка сопровождается снижением содержания титина в *m. soleus* крысы. Снижение содержания титина происходит из-за повышенного его протеолиза, и увеличение экспрессии гена *TTN* не компенсирует это снижение. Ингибирование HDAC1 предотвращает индуцируемый разгрузкой повышенный протеолиз титина. Трехсуточная функциональная разгрузка и ингибирование HDAC1 на фоне разгрузки не сопровождается изменением альтернативного сплайсинга гена титина (в диапазоне экзонов от 50-го до 111-го) в *m. soleus* крыс.

Работа выполнена в рамках Государственного задания Института теоретической и экспериментальной биофизики (ИТЭБ) РАН при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда (№ 18-15-00062) с использованием оборудования коллективного пользования ИТЭБ РАН, ИБК РАН и ГНЦ РФ – ИМБП РАН).

**THE EFFECT OF INHIBITION OF HISTONE DEACETYLASE 1  
ON THE CONTENT OF TITIN, THE LEVEL OF ITS  
PHOSPHORYLATION AND EXPRESSION OF THE *TTN* GENE  
IN RAT SOLEUS AFTER 3 DAYS OF FUNCTIONAL UNLOADING**  
A.D. Ulanova<sup>1</sup>, Yu.V. Gritsyna<sup>1</sup>, A.G. Bobylev<sup>1</sup>, E.I. Yakupova<sup>1</sup>, V.K. Zhalimov<sup>2</sup>, S.P. Belova<sup>3</sup>, E.P. Mochalova<sup>3</sup>, T.L. Nemirovskaya<sup>3</sup>, B.S. Shenkman<sup>3</sup>,  
I.M. Vikhlyantsev<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup>*Institute of Theoretical and Experimental Biophysics RAS, 142290 Pushchino, Moscow region, Russia; e-mail: ivanvikhlyantsev@gmail.com*

<sup>2</sup>*Institute of Cell Biophysics RAS, 142290 Pushchino, Moscow region, Russia;*

<sup>3</sup>*Institute of Biomedical Problems RAS, 123007 Moscow, Russia;*

<sup>4</sup>*Pushchino State Institute of Natural Science, 142290 Pushchino, Moscow Region, Russia*

The effect of inhibition of histone deacetylase 1 (HDAC1) on the titin content, phosphorylation level of the protein and expression and alternative splicing of the *TTN* gene in rat soleus muscle after 3 days of functional unloading was studied. Animals were divided into 3 groups: control group (C,  $n = 7$ ); a group of 3 days of hindlimb suspension (HS,  $n = 7$ ); a group of 3 days of hindlimb suspension with the injection of inhibitor of HDACs class I CI-994 at a concentration of 1 mg/kg/day (HS + CI,  $n = 7$ ). Reduction by 13.8% ( $p < 0.05$ ) of the ratio “mass *m. soleus*/animal body mass was found in the HS group compared with group C, which indicates the development of atrophic changes in the



muscle. At the same time, a decrease by 28.5% ( $p < 0,05$ ) in the content of the highest molecular weight isoform of intact titin-1 (NT) and an increase in 1.81 times ( $p < 0,05$ ) of *TTN* gene expression were observed. These changes were accompanied by an increase (by 42.9%,  $p < 0,05$ ) in the content of calpain-1, a calcium-activated protease, of which titin is a substrate. No statistically significant differences in titin phosphorylation level between C and HS groups were found. There are also no changes in alternative splicing of titin gene (from 50<sup>th</sup> to 111<sup>th</sup> exon) in rat m. soleus of these groups. Inhibition of HDAC1 during functional unloading prevented the development of atrophy and decrease of titin content in soleus muscle. At the same time, a decrease by 10.3% ( $p = 0.132$ ) in level of phosphorylation of NT-titin was observed. No statistically significant differences in the *TTN* gene expression and alternative splicing between C and HS + CI groups were found. 3-day functional unloading and inhibition of HDAC1 against the background of unloading is not accompanied by a change in alternative splicing of titin gene (from 50<sup>th</sup> to 111<sup>th</sup> exon) in rat m. soleus.

Conclusions: Three-day functional unloading is accompanied by a decrease in the content of titin in rat soleus muscle. The decrease in the titin content is due to its increased proteolysis, and an increase in the expression of the *TTN* gene does not compensate for this decrease. Inhibition of HDAC1 prevented the increased proteolysis of titin induced by disuse.

The work was performed as a State assignment of the Institute of Theoretical and Experimental Biophysics (ITEB) of the Russian Academy of Sciences with the financial support of grant of the Russian Science Foundation (No. 18-15-00062) using the collective equipment of ITEB RAS, IBC RAS and State Scientific Center – Institute of Biomedical Problems RAS).

## **ИЗМЕНЕНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ МАЛОЙ ГТФазы ARL4C/ARL7 В КУЛЬТУРАХ КЛЕТОК HELA И VERO ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ ЛИГАНДАМИ ТРАНСКРИПЦИОННОГО ФАКТОРА LXR/RXR**

**Е.В. Улас<sup>1</sup>, Е.С. Надеждина<sup>2</sup>, А.В. Бураков<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>*Биотехнологический факультет МГУ им. М. В. Ломоносова, Москва, Ленинские горы 1 стр. 51, Россия*

<sup>2</sup>*Институт белка РАН, Пущино, ул. Институтская, 4, Россия*

<sup>3</sup>*НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ, Москва, Ленинские горы, 1 стр. 40, Россия*

Сеть микротрубочек (MT) представляет собой один из компонентов цитоскелета эукариотических клеток. В клетках животных в качестве основного центра организации MT (ЦОМТ) выступает центросома. В интерфазе альтернативными ЦОМТ также могут становиться плазматическая мембрана и мембраны аппарата Гольджи (АГ). Молекулярные механизмы организации MT на АГ изучены фрагментарно, не все вовлеченные в данный процесс белки идентифицированы. Фокиным с соавторами (2017)

был проведён сравнительный анализ транскриптомов культур клеток эпителия почки зеленой мартышки Vero и BS-C-1, существенно различающихся активностью АГ в качестве ЦОМТ. Было определено несколько новых белков-кандидатов на участие в организации МТ на АГ, в том числе – малая ГТФ-аза Arl4c/Arl7, экспрессия гена которой в клетках BS-C-1 оказалась выше в 4,6 раза по сравнению с клетками Vero. Ранее было обнаружено, что Arl4c/Arl7 взаимодействует с тубулином МТ (Wei et al., 2009).

Мы показали, что содержание белка Arl4c/Arl7 в BS-C-1 приблизительно в 4 раза превышает его уровень в Vero, что соответствует данным транскриптомного анализа. Согласно ранее опубликованным данным, инкубация с лигандами X-рецептора печени (LXR) и ретиноидного X-рецептора (RXR) позволяет добиться повышения концентрации Arl4c/Arl7 в культуре клеток HeLa (Engel et al., 2004). Мы попытались воспроизвести описанный эффект в HeLa, а затем применить данный тип воздействия на уровень Arl4c/Arl7 в культуре клеток Vero и проследить за возможными изменениями в организации цитоскелета. Клетки инкубировали с бексаротеном и T0901317 – лигандами RXR и LXR соответственно. Было установлено, что при воздействии на HeLa лигандами LXR/RXR в течение 2 суток степень повышения уровня белка ARL4C/ARL7 не зависит от концентрации лигандов в диапазоне 0,1–10 мкМ для T0901317 и 0,5–2,5 мкМ для бексаротена. Однако наблюдалось более выраженное увеличение концентрации ARL4C/ARL7 при продлении времени воздействия до 7 суток, а также при совместном воздействии лигандами LXR/RXR по сравнению с их раздельным применением. Совместная обработка клеток HeLa T0901317 и бексаротеном в течение 7 суток приводила к приблизительно трехкратному повышению концентрации белка ARL4C/ARL7. Однако в клетках Vero при условиях воздействия, идентичных воздействию на HeLa, увеличения концентрации белка Arl4c/Arl7 не наблюдалось. При этом происходила активация LXR/RXR, о чем можно было судить на основании повышения в клетках уровня белка ABCA1, ген которого находится под непосредственной регуляцией LXR/RXR (Wagner et al., 2003). В Vero эффект увеличения концентрации белка Arl4c/Arl7 при инкубации клеток с T0901317 и бексаротеном отсутствовал даже при продлении времени воздействия до 10 суток. Для проверки гипотезы об участии малой ГТФ-азы Arl4c/Arl7 в процессах организации МТ на АГ мы проводим дальнейшие исследования в клеточных линиях HeLa и Vero с использованием подобранных оптимальных условий инкубации клеток с лигандами LXR/RXR.

Работа поддержана грантом РФФИ 18-04-00742.

#### Литература

1. Фокин А.И., Бродский И.Б., Чудинова Е.М., Надеждина Е.С., Бураков А.В. Организация микротрубочек на аппарате Гольджи: идентификация новых участников. *Цитология* 2017; 59 (11): 800.
2. Engel T, Lueken A, Bode G, Hobohm U, Lorkowski S, Schlueter B, Rust S, Cullen P, Pech M, Assmann G, Seedorf U. ADP-ribosylation factor (ARF)-like 7 (ARL7)

- is induced by cholesterol loading and participates in apolipoprotein AI-dependent cholesterol export. *FEBS Lett.* 2004; 566:241–246.
3. Wagner BL, Valledor AF, Shao G, Daige CL, Bischoff ED, Petrowski M, Jepsen K, Baek SH, Heyman RA, Rosenfeld MG, Schulman IG, Glass CK. Promoter-specific roles for liver X receptor/corepressor complexes in the regulation of ABCA1 and SREBP1 gene expression. *Molecular and cellular biology* 2003; 16:5780–9.
  4. Wei SM, Xie CG, Abe Y, Cai JT. ADP-ribosylation factor like 7 (ARL7) interacts with alpha-tubulin and modulates intracellular vesicular transport. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009; 384:352–356.

## **THE INFLUENCE OF TRANSCRIPTION FACTOR LXR/RXR LIGANDS TO SMALL GTPASE ARL4C/ARL7 CONCENTRATION IN HELA AND VERO CELL CULTURES**

**E.W. Ulas<sup>1</sup>, E.S. Nadezhdina<sup>2</sup>, A.V. Burakov<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>*Biotechnology Faculty of Lomonosov Moscow State University, Leninskie Gory, 1 bld. 51, Moscow, Russia*

<sup>2</sup>*Institute of Protein Research of RAS, St. Institutskaya, 4, Pushchino, Russia*

<sup>3</sup>*A.N. Belozersky Research Institute of Physico-Chemical Biology MSU, Leninskie Gory, 1 bld. 40, Moscow, Russia*

The microtubule (MT) network is one of the most important component of the eukaryotic cell cytoskeleton. In animal cells centrosome acts as the major microtubule-organizing center (MTOC). In interphase the nuclear membrane and the membranes of Golgi apparatus (GA) can also act as alternative MTOCs. The molecular mechanisms of MT organization on the GA are not well studied yet and not all proteins involved in this process are identified. Fokin et al (2017) performed a comparative analysis of Vero and BS-C-1 cell cultures transcriptomes, which are both obtained from the epithelium of the green monkey kidney, but significantly differ in activity of the GA as a MTOC. Several new proteins were identified as the candidates for participation in the organization of MTs on the GA, including the small GTPase Arl4c/Arl7, which expression is 4.6-fold increased in BS-C-1 cells compared to Vero cells.

As the part of our study, it was shown that the protein concentration of Arl4c/Arl7 in BS-C-1 is approximately 4 times higher than its level in Vero, which approximately corresponds to the data of these cell cultures transcriptome analysis. According to previously published data, treatment with activators of liver X-receptor (LXR) and retinoid X-receptor (RXR) leads to increasing of the Arl4c / Arl7 concentration in HeLa cell culture (Engel et al., 2004). We tried to reproduce the described effect in HeLa and then to apply this type of influence at the level of Arl4c/Arl7 in Vero cell culture and to identify possible changes of the cytoskeleton organization. Cells were incubated with T0901317 and bexarotene, which are activators of nuclear receptors LXR and RXR respectively. After treatment of HeLa cells with LXR/RXR ligands for 2 days, there was no dependence of the increase in the ARL4C/ARL7 protein level on the ligand concentration in the range of 0.1–10  $\mu\text{M}$  for T0901317 and 0.5– 2.5  $\mu\text{M}$  for bexarotene. However, there was a more pronounced increase in the concentration of

ARL4C/ARL7 when extending the exposure time to 7 days. The severity of ARL4C/ARL7 concentration rice also was more expressed when combining LXR/RXR ligands compared to the effect of their separate use. The cooperative treatment of HeLa cells with T0901317 and bexaroten for 7 days resulted in the approximately threefold increase in the ARL4C/ARL7 protein concentration. However, under conditions identical to HeLa, in Vero cells the increase in Arl4c/Arl7 protein concentration was not observed, in despite of the LXR/RXR activation detected by the increase in ABCA1 protein, which gene is known to be under direct regulation of LXR/RXR (Wagner et al., 2003). The effect of the Arl4c/Arl7 protein level increasing after cell treatment with T0901317 and bexaroten was absent even with an extension of the exposure time to 10 days.

To test the hypothesis of the involvement of the small GTPase Arl4c/Arl7 in microtubule organization processes in the Golgi apparatus and in the actin cytoskeleton rearrangements, we perform further research in HeLa and Vero cell lines using selected optimal conditions for incubating cells with LXR/RXR ligands. It is also planned to conduct research using alternative variants of exposure to cells, which also lead to an increase in the level of Arl4c/Arl7 protein in them.

This work was supported by a grant from the Russian Foundation for Basic Research 18-04-00742.

### References

1. Фокин А.И., Бродский И.Б., Чудинова Е.М., Надеждина Е.С., Бураков А.В. Организация микротрубочек на аппарате Гольджи: идентификация новых участников. *Цитология* 2017; 59 (11): 800
2. Engel T, Lueken A, Bode G, Hobohm U, Lorkowski S, Schlueter B, Rust S, Cullen P, Pech M, Assmann G, Seedorf U. ADP-ribosylation factor (ARF)-like 7 (ARL7) is induced by cholesterol loading and participates in apolipoprotein AI-dependent cholesterol export. *FEBS Lett.* 2004; 566:241–246
3. Wagner BL, Valledor AF, Shao G, Daige CL, Bischoff ED, Petrowski M, Jepsen K, Baek SH, Heyman RA, Rosenfeld MG, Schulman IG, Glass CK. Promoter-specific roles for liver X receptor/corepressor complexes in the regulation of ABCA1 and SREBP1 gene expression. *Molecular and cellular biology* 2003; 16:5780–9
4. Wei SM, Xie CG, Abe Y, Cai JT. ADP-ribosylation factor like 7 (ARL7) interacts with alpha-tubulin and modulates intracellular vesicular transport. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009; 384:352–356.

## ПАРАМЕТРЫ ПОДВИЖНОСТИ СПЕРМАТОЗОИДОВ МЫШЕЙ ПОСЛЕ ГРАВИТАЦИОННОЙ РАЗГРУЗКИ И РАННЕГО ПЕРИОДА РЕАДАПТАЦИИ

**М.А. Усик, И.В. Огнева**

*ГНЦ РФ – Институт медико-биологических проблем РАН,  
Москва, Хорошевское шоссе, 76а, Россия*

*Первый Московский государственный медицинский университет  
им. И. М. Сеченова, Москва, ул. Трубецкая, д.8, стр. 2, Россия*

Освоению человеком дальнего космоса, помимо технических трудностей, препятствует целый ряд медицинских проблем, связанных, в частности, с негативным действием невесомости, в том числе и на клеточном уровне.

Изменение внешнего механического поля приводит к реорганизации цитоскелета и формированию его адапционного паттерна в различных типах клеток, как соматических, так и половых [1-4]. Однако, данных об изменениях в мужских половых клетках в условиях гравитационной разгрузки в литературе представлено мало. Поэтому целью данной работы было исследование содержания цитоскелетных белков и мРНК кодирующих их генов, а также оценка параметров спермограммы мышей линии C57Black6, находившихся в условиях 30-суточного антиортостатического вывешивания и последующего 12-часового восстановления, и получавших эссенциальные фосфолипиды в дозировке 500 мг/кг/сутки (группы 30HSE и 30HSE+12h) или аналогичную дозу плацебо (группы 30HS и 30HS+12h). Соответственно, были сформированы контрольные группы (группа СЕ и группа С).

Количество сперматозоидов в группе 30HS и в группе 30HS+12h существенно снижалось по сравнению с группой контроля. Более того, доля подвижных сперматозоидов в этих группах снижалась более чем в 5 раз по сравнению с контролем. Применение эссенциальных фосфолипидов приводило к тому, что в группе СЕ число зрелых форм было увеличено на 34% по сравнению с группой С ( $p < 0.05$ ). Следует отметить, что в группе 30HSE снижение доли подвижных сперматозоидов было аналогичным группе 30HS. Тем не менее, параметры спермограммы в группе 30HSE+12h не отличались от таковых в контрольной группе. Во всех исследованных группах значения доли жизнеспособных сперматозоидов и сперматозоидов с нормальной морфологией коррелировали с числом подвижных сперматозоидов. Таким образом, исследованная спермограмма и содержание сперматозоид-специфичных белков, также как и мРНК кодирующих их генов, свидетельствовали о снижении числа зрелых форм сперматозоидов после вывешивания, которое было предотвращено применением эссенциальных фосфолипидов.

Относительное содержание изоформ актина (бета-, гамма-) и альфа-актининов (1 и 4) оставалось на одном уровне во всех группах исследования, кроме группы 30HS+12h, где уровень альфа-актина-4 на 13% ( $p < 0.1$ ) превышал контроль. Относительное содержание изоформ актина было на одном уровне. Во всех экспериментальных группах относительное содержание бета-тубулина снижалось относительно контроля. При этом относительное содержание мРНК генов, кодирующих исследованные цитоскелетные белки, менялось более выражено, что может свидетельствовать о регуляции содержания белков преимущественно на уровне трансляции [5].

Работа поддержана программой фундаментальных исследований ГНЦ РФ – ИМБП РАН, программой Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология», Проектом повышения конкурентоспособности ведущих российских университетов среди ведущих мировых научно-образовательных центров.

### Литература

1. Uva B.M., Masini M.A., Sturla M., Prato P., Passalacqua M., Giuliani M., Tagliaferrero G., Strollo F. Clinorotation-induced weightlessness influences the cytoskeleton of glial cells in culture. *Brain Res.* 2002; 934: 132–139.

2. Gaboyard S., Blachard M.P., Travo B.T., Viso M., Sans A., Lehouelleur J. Weightlessness affects cytoskeleton of rat utricular hair cells during maturation in vitro. *NeuroReport*. 2002; 13(16): 2139–2142.
3. Kacena M.A., Todd P., Landis W.J. Osteoblasts subjected to spaceflight and simulated space shuttle launch conditions. *In Vitro Cell Dev Biol – Animal*. 2004; 39(10): 454–459.
4. Crawford-Young S.J. Effects of microgravity on cell cytoskeleton and embryogenesis. *Int J Dev Biol*. 2006; 50(2–3): 183–191.
5. Usik M.A., Ogneva I.V. Cytoskeleton structure in mouse sperm and testes after 30 days of hindlimb unloading and 12 hours of recovery. *Cell Physiol Biochem* 2018;51:375-392.

## **PARAMETERS OF MOBILITY SPERMATOSIS OF THE MICE AFTER GRAVITATIONAL UNLOADING AND EARLY PERIOD OF READAPTATION**

**M.A. Usik, I.V. Ogneva**

*SSC RF - Institute for Biomedical Problems RAS,  
Moscow, sh. Khoroshevskoe, 76a, Russia  
First Moscow State Medical University. IM Sechenov,  
Moscow, st. Trubetskaya, 8, bldg. 2, Russia*

In addition to technical difficulties, the development of deep space by a human is hampered by a number of medical problems associated, in particular, with the negative effects of weightlessness, including at the cellular level. A change of the external mechanical field leads to a reorganization of the cytoskeleton and the formation of its adaptation pattern in various cell types, both somatic and germ [1–4]. However, data about changes of male germ cells under microgravity conditions are presented in the literature a little. Therefore, the purpose of this work was to study the content of cytoskeletal proteins and mRNA of their encoding genes, as well as to estimate the parameters of spermogram of C57Black6 mice under conditions of a 30-day antiorostatic suspension and subsequent 12-hour recovery, and receiving essential phospholipids at 500 mg/kg/day (groups 30HSE and 30HSE + 12h) or a similar dose of placebo (groups 30HS and 30HS + 12h). Accordingly, control groups (group CE and group C) were formed.

The sperm count of the 30HS group and of the 30HS + 12h group was significantly reduced compared with the control group. Moreover, the proportion of motile spermatozoa in these groups decreased by more than 5 times compared with the control. The use of essential phospholipids led to the fact that in the CE group the number of mature forms was increased by 34% compared with group C ( $p < 0.05$ ). It should be noted that in the 30HSE group, the decrease of the proportion of motile spermatozoa was similar to the group of 30HS. However, sperm parameters in the 30HSE+12h group did not differ from those in the control group. In all the studied groups, the values of the proportion of viable spermatozoa and spermatozoa with normal morphology correlated with the number

of motile spermatozoa. Thus, the investigated spermogram and the content of sperm-specific proteins [5], as well as the mRNA of the genes encoding them, indicated a decrease in the number of mature spermatozoa after suspension, which was prevented by the use of essential phospholipids.

The relative content of actin isoforms (beta, gamma-) and alpha-actinins (1 and 4) remained at the same level in all study groups, except group 30HS + 12h, where alpha-actinin-4 level was 13% ( $p < 0.1$ ) exceeded control. The relative content of actin isoforms was at the same level. In all experimental groups, the relative content of beta-tubulin was reduced relative to the control. At the same time, the relative mRNA content of the genes encoding the studied cytoskeletal proteins was more pronounced, which may indicate that the protein content is regulated mainly at the level of translation [5].

The work was supported by the basic research program of the State Research Center of the Russian Federation - IMBP RAS, the program of the Presidium of the Russian Academy of Sciences "Molecular and Cell Biology", Russian Academic Excellence Project 5-100.

### References

1. Uva B.M., Masini M.A., Sturla M., Prato P., Passalacqua M., Giuliani M., Tagliafierro G., Strollo F. Clonoration-induced weightlessness influences the cytoskeleton of glial cells in culture. *Brain Res.* 2002; 934: 132–139.
2. Gaboyard S., Blachard M.P., Travo B.T., Viso M., Sans A., Lehouelleur J. Weightlessness affects cytoskeleton of rat utricular hair cells during maturation in vitro. *NeuroReport.* 2002; 13(16): 2139–2142.
3. Kacena M.A., Todd P., Landis W.J. Osteoblasts subjected to spaceflight and simulated space shuttle launch conditions. *In Vitro Cell Dev Biol – Animal.* 2004; 39(10): 454–459.
4. Crawford-Young S.J. Effects of microgravity on cell cytoskeleton and embryogenesis. *Int J Dev Biol.* 2006; 50(2–3): 183–191.
5. Usik M.A., Ogneva I.V. Cytoskeleton structure in mouse sperm and testes after 30 days of hindlimb unloading and 12 hours of recovery. *Cell Physiol Biochem* 2018;51:375-392.

### **ЭФФЕКТЫ ТЯЖЕЛОЙ ГИПОБАРИЧЕСКОЙ ГИПОКСИИ И ИНГИБИРОВАНИЯ ИНДУЦИРУЕМОГО ГИПОКСИЕЙ ФАКТОРА HIF-1 НА СЕРДЕЧНУЮ И СКЕЛЕТНЫЕ МЫШЦЫ**

**Д.А. Федоров, М.Ю. Фролова, И.Е. Красовская, Н.В. Кулева**

*Санкт-Петербургский государственный университет,*

*Санкт-Петербург, Университетская наб., 7/9, Россия*

Хорошо известно, что нарушение снабжения ткани кислородом оказывает повреждающее воздействие прежде всего на нервные клетки, затем на сердце, а при длительном воздействии и на скелетные мышцы. Подобного рода нарушения наблюдаются также при подъеме на высоту, то есть при гипобарической гипоксии. Модель гипобарической гипоксии широко используется при изучении молекулярных механизмов повреждения нейро-

нов ЦНС ( Rybnikova et al., 2012 ). Индуцируемый гипоксией транскрипционный фактор HIF-1 может вносить свой вклад в формирование постгипоксических патологий (Vetrovov et al., 2015).

В представленной работе использована модель тяжелой гипобарической гипоксии (ТГ) – трехчасовой сеанс пребывания крыс-самцов линии Wistar массой 200–250 г при 180 мм рт. ст. (5% O<sub>2</sub>) (Rybnikova et al., 2006). Для оценки роли HIF-1 использовали ингибитор трансляции HIF-1 – топотекан (Van et al., 2011), который в смеси ДМСО – 0,09% NaCl и вводили внутривенно (5 мг / кг веса ) за 10 мин до каждого гипоксического сеанса. В качестве инъекционного контроля вводили смесь ДМСО – 0,09% NaCl. После сеанса ТГ у крыс были взяты образцы крови для измерения биомаркеров сердечных (тропонин I, креатинкиназа МВ ), скелетномышечных (креатинкиназа суммарная, миоглобин) и суммарной концентрации белка в плазме крови. Плазму крови замораживали при -80 градусов Цельсия до момента определения значений биомаркеров с помощью приборов: анализатора иммунохемилюминесценции DXI фирмы «Beckman Coulter» (миоглобин, тропонин I) и биохимического анализатора DXC Unicell фирмы «Beckman Coulter» (общий белок, а также ферментативная активность креатинкиназы общей и креатинкиназы МВ ). Значения биомаркеров относили к концентрации общего белка. Данные по биомаркерам получали в двух независимых сериях исследований, как правило, от 6 животных в каждой серии. Данные обрабатывали методами дисперсионного анализа.

Согласно полученным результатам, было получено достоверное повышение уровня сердечного белка тропонина I примерно в 5 раз после ТГ, что свидетельствует о повреждении миокарда после ТГ; в то же время креатинкиназа МВ достоверно не изменялась. Достоверно значимых изменений скелетно-мышечных биомаркеров обнаружено не было.

Эксперимент с использованием ингибитора HIF-1 топотекана показал, что количество миоглобина в плазме крови после ТГ из опыта с блокированием HIF-1 было примерно в 2,5 раза меньше, чем в отсутствие ингибитора. Таким образом, можно полагать, что ТГ оказывает повреждающее влияние на сердце, а блокирование транскрипционного фактора HIF-1 во время ТГ уменьшает повреждение скелетных мышц. Эти результаты стоит рассматривать как предварительные и следует подтвердить другими методами.

Известно, что в мышечных тканях имеются компоненты, защищающие их в условиях недостатка кислорода. К таким компонентам прежде всего относится миоглобин (Кулева, Красовская, 2015), а также ряд других белков, которые в условиях гипоксии проявляют нитрит-редуктазную активность и превращают неорганический нитрит в монооксид азота. Монооксид азота, в свою очередь, служит вазодилататором сосудов мышц и увеличивает снабжение тканей кислородом. В организме нитрит может образовываться при окислении монооксида азота, который синтезируется в условиях нормоксии различными NO-синтазами при потреблении пищи, богатой нитратами, и использовании лекарств, например, нитроглицерина.



Нитритредуктазная активность присуща также гемоглобину и ксантиноксидоредуктазе, также локализованной в эритроцитах. Полагают также, что нитритредуктазной активностью обладает цитоглобин и электрон-транспортная цепь митохондрий. В свете полученных данных об увеличении выхода в кровь сердечного тропонина I при ТГ было бы интересно узнать, повреждается ли какая-либо из нитритредуктазных активностей при ТГ. Что касается данных о защитном действии блокирования HIF-1 во время ТГ, то недавно было показано (Ветровой, 2018), что такое блокирование приводит в гиппокампе к предотвращению процессов развития состояния окислительного стресса и процессов клеточной гибели. Возможно, аналогичная ситуация имеет место и в мышечной ткани.

Выражаем благодарность О.В. Ветровому за организацию экспериментов с животными по тяжелой гипобарической гипоксии.

### **Литература**

- Ветровой О. В. Роль HIF1-зависимой регуляции пентозофосфатного пути в обеспечении реакций мозга на гипоксию. Канд дисс., СПб, 2018.
- Кулева Н. В., Красовская И. В. Роль гемосодержащих глобинов в NO-сигнализации в клетках позвоночных при гипоксии. Цитология. 57(8): 563-570.

## **THE EFFECTS OF SEVERE HYPOBARIC HYPOXIA AND THE INHIBITION OF HYPOXIA INDUCIBLE FACTOR HIF-1 IN CARDIAC AND SKELETAL MUSCLE**

**D.A. Fedorov, M. U. Frolova, I. E. Krasovskaya, N. V. Kuleva**  
*St Petersburg University, St Petersburg, Universitetskaya Emb., 7/9, Russia*

It is well known that the disruption of oxygen supply to tissues has a damaging effect primarily on nerve cells, then on the heart, and with prolonged exposure to skeletal muscles. Such violations are also observed when climbing to a height, that is hypobaric hypoxia. The model of hypobaric hypoxia is widely used in the study of molecular mechanisms of neuronal damage in the central nervous system (Rybnikova et al., 2012). Hypoxia-inducible factor HIF-1 transcription factor HIF-1 may contribute to the formation of posthypoxic pathologies (Vetrovoy et al., 2015).

In the present work the model of severe hypobaric hypoxia (SHH) – a three-hour session of male Wistar rats (weighting 200 – 250 grams) at 180 mm Hg was used (5% O<sub>2</sub>) (Rybnikova et al., 2006). To assess the role of HIF-1, topoisomerase I inhibitor topotecan was used, which in a mixture of DMSO – 0.09% NaCl was injected intraperitoneally ( 5 mg / kg weight ) for 10 minutes before each hypoxic session (Vetrovoy, 2018). As an injection control, a mixture of DMSO – 0.09% NaCl was injected. After the SHH session, blood samples were taken from rats to measure cardiac biomarkers ( troponin I, creatine kinase MB ) and skeletal muscle biomarkers ( total creatine kinase, myoglobin), as well as the total protein concentration in blood plasma. The blood plasma was freezed at -80<sup>0</sup> C until de-

termining values of the biomarkers with the help of instruments: Beckmann Coulter UniCel DxI immunochemiluminescent analyzer (myoglobin, troponin I) and biochemical analyzer DxC UniCell of firm "Beckman Coulter" (total protein, enzymatic activity of total creatine kinase and creatine kinase MB). Biomarker values were related to total protein concentration. Data on biomarkers were obtained in two independent series of studies, usually from 6 animals in each series. The data were processed by the methods of dispersion analysis.

According to the results, there was a significant increase in the level of cardiac protein troponin I (about 11 times) after SHH, indicating damage to the myocardium after SHH. At the same time, creatine kinase MB did not change significantly. No significant changes in skeletal muscle biomarkers were found.

Experiment with the use an inhibitor HIF-1 topotecan has showed that the amount of myoglobin in the blood plasma after the SHH from the samples with the blocking of HIF-1 was about 2.5 times less than in the absence of the inhibitor. Thus, it can be assumed that SHH has a damaging effect on the heart, and blocking the transcription factor HIF-1 during SHH reduces damage to skeletal muscles. These results should be considered as preliminary and should be confirmed by other methods.

It is known that in muscle tissues there are components that protect them in conditions of hypoxia. These components primarily include myoglobin (Kuleva, Krasovskaya, 2015), as well as a number of other proteins that exhibit nitrite-reductase activity in hypoxia and convert inorganic nitrite into nitric oxide. Nitric oxide, in turn, serves as a vasodilator of muscle blood vessels and increases the supply of oxygen to tissues.

In the body, nitrite can be formed by the oxidation of nitric oxide, which is synthesized under normoxia by various NO-synthases or by consuming foods rich in nitrates, and the use of drugs, such as nitroglycerin. Nitrite reductase activity is also characteristic of the hemoglobin and xanthine oxidase as well as hemoglobin located in the erythrocytes. Nitrite reductase activity was also revealed in cytoglobin and electron-transport chain of mitochondria.

In the light of the data obtained on the increase in the blood output of cardiac troponin I in SHH, it would be interesting to know whether any of the nitrite-reductase activities in SHH are damaged.

As for the data on the protective effect of HIF-1 blocking during SHH, it was recently shown (Vetrovoy, 2018). that such blocking leads in the hippocampus to prevention of the development of oxidative stress and cell death processes. Perhaps a similar situation occurs in muscle tissue.

We express our gratitude to Oleg Vasilyevich Vetrovoy for the organization of experiments with animals on severe hypobaric hypoxia.

#### **References**

- Vetrovoy O. V. The role of HIF 1-dependent regulation of the pentose phosphate pathway in ensuring brain reactions to hypoxia. PhD Diss., SPb, 2018.
- Kuleva N. V., Krasovskaya I. V. The Role of hematopoietic globins in NO-signaling in vertebrate cells in hypoxia. *Cytology*. 57 (8): 563-570.

# СОСТОЯНИЕ НЕЙРО-МОТОРНОГО АППАРАТА КАМБАЛОВИДНОЙ МЫШЦЫ КРЫСЫ ПРИ ГРАВИТАЦИОННОЙ РАЗГРУЗКЕ: ЭФФЕКТЫ СТИМУЛЯЦИИ СПИННОГО МОЗГА

А.О. Федянин, Н.В. Галиуллина, М.А. Зайцев,  
Т.В. Балтина, А.А. Еремеев

*Казанский (Приволжский) федеральный университет, Институт фундаментальной медицины и биологии, Казань, ул. К. Маркса, 76, Россия*

Понимание принципов организации и управления двигательной функцией в условиях, меняющих естественную моторику, а также поиск новых эффективных методов реабилитации являются важными и актуальными проблемами современной нейробиологии и медицины. Многочисленными экспериментами оценивается эффективность различных способов стимуляции спинальных нейронных сетей при посттравматической реорганизации двигательной функции (Gorodnichev R.M. et al., 2010; Gerasimenko Y.P. et al., 2017 и др.). Показано, что магнитная (Щербакова Н.А. с соавт., 2012) и электрическая (Lavrov et. al., 2008) стимуляция спинного мозга активирует нейроны ответственные за локомоторную активность и может использоваться для нейрореабилитации.

Целью работы являлась оценка влияния различных способов стимуляции спинного мозга при гравитационной разгрузке на функциональное состояние нейро-моторного аппарата камбаловидной мышцы (КМ) крысы.

Исследование проводили на лабораторных крысах массой 200–220 г, (n=24). Все процедуры строго соответствовали биоэтическим нормам Хельсинкской декларации 1975 г и были одобрены комиссией по биоэтике КФУ. Случайным образом животные были разделены на следующие экспериментальные группы: интактные животные (ИНТ, n=5); животные, находившиеся в условиях 7 суточного антиортостатического вывешивания (АОВ, n=7), животные, находившиеся в условиях 7 суточного антиортостатического вывешивания, сочетанного с ежедневной магнитной стимуляцией спинного мозга (АОВ+МС, n=6); животные, находившиеся в условиях 7 суточного антиортостатического вывешивания, сочетанного с ежедневной электрической стимуляцией спинного мозга (АОВ+ЭС, n=6). Магнитную стимуляцию осуществляли с помощью стимулятора «Нейро-МВП-4» (Нейрософт, Россия), через койл ежедневно в течение 1,5 часа 10 мин сериями с интервалом 10 мин; амплитуда стимулов – пороговая для появления сократительного ответа мышц голени; частота – 3 Гц. Электрическую стимуляцию проводили с помощью стимулятора «А-М systems» (США) через электроды, предварительно имплантированные к эпидуральной оболочке на уровень сегмента L1, параметры электростимуляции соответствовали параметрам магнитной стимуляции. Через 7 суток воздействия экспериментальных условий регистрировали моторный (М-) и рефлекторный (Н-) ответы КМ, вызванные раздражением седалищного нерва. Контролем служили данные, полученные при исследовании интактных животных.

При оценке параметров М-ответа обнаружено уменьшение латентности в группе АОВ+МС и уменьшение длительности в группах АОВ+МС и АОВ+ЭС. Регистрируемые преобразования могут быть связаны с повышением возбудимости пресинаптических терминалей аксонов, иннервирующих КМ и увеличением синхронности разряда двигательных единиц. При оценке параметров Н-ответа КМ в группе АОВ зарегистрировано увеличение амплитуды рефлекторного потенциала и значения отношения максимальных амплитуд  $H_{max}/M_{max}$ , что указывает на повышение рефлекторной возбудимости соответствующих мотонейронов. В группах АОВ+МС и АОВ+ЭС обнаружено уменьшение латентности Н-ответа, что, вероятно, связано с увеличением скорости проведения возбуждения по рефлекторной дуге.

Таким образом, гравитационная разгрузка приводит к увеличению рефлекторной возбудимости мотонейронов двигательного центра КМ. Стимуляция спинного мозга при микрогравитации предотвращает преобразования функционального состояния мотонейронов, однако, в этих условиях повышается синхронность разряда двигательных единиц КМ, увеличивается скорость проведения возбуждения по рефлекторной дуге.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 19-04-01067.

#### Литература

- Gorodnichev R.M., Machueva E.N., Pivovarova E.A., Semenov D.V., Ivanov S.M., Edgerton V.R., Savokhin A.A., Gerasimenko Y.P. A new method for the activation of the locomotor circuitry in humans // *Human Physiology*.- 2010.- V.36(6).- P. 700-707.
- Gerasimenko Y.P., McKinney Z.B., Sayenko D.G., Gad P., Gorodnichev R.M., Grundfest W., Edgerton V.R., Kozlovskaya I.B. Spinal and sensory neuromodulation of spinal neuronal networks in humans // *Human Physiology*.- 2017.- V.43(5).- P. 492-500.
- Scherbakova N.A., Bogacheva I.N., Zelenkova N.M., Savohin A.A., Moshonkina T.R., Gerasimenko Yu.P. Investigation of effects of the electromagnetic spinal cord stimulation on the hindlimbs muscles reflexes in narcotized rats // *Herald of TVGU. Series: Biology and Ecology*.- 2012.- V. 26(16). P. 15-22.
- Lavrov I.A., Dy C.J., Fong A.J., Gerasimenko Y.P., Courtine G., Zhong H., Roy R.R., Edgerton V.R. Epidural stimulation induced modulation of spinal locomotor networks in adult spinal rats // *J. Neurosci*.- 2008.- V28(23). P. 6022-6029.

### CONDITION OF NEURO-MOTOR APPARATUS OF THE RAT SOLEUS MUSCLE DURING GRAVITATIONAL UNLOADING: EFFECTS OF SPINAL CORD STIMULATION

**A.O. Fedianin, N.V. Galiullina, M.A. Zaytsev, T.V. Baltin, A.A. Eremeev**  
*Kazan Federal University, Institute of Fundamental Medicine and Biology,  
Kazan, K.Marksa str. 76, Russia*

Understanding the principles of organization and control of motor function in conditions that change natural motor skills, as well as the search for new effective methods of rehabilitation are important and topical issues of modern

neurobiology and medicine. Numerous experiments evaluate the effectiveness of various methods of stimulating spinal neural networks in the posttraumatic reorganization of motor function (Gorodnichev R.M. et al., 2010; Gerasimenko Y.P. et al., 2017, etc.). It has been shown that the magnetic (Scherbakova N.A. et al., 2012) and electrical stimulation of the spinal cord activates neurons responsible for locomotor activity (Lavrov I.A. et. al., 2008).

The aim of the work was to assess the influence of various methods of spinal cord stimulation during gravitational unloading on the functional state of the neuro-motor apparatus of the soleus muscle of the rat.

The study was performed on laboratory rats weighing 200–220 g, (n=24). All procedures strictly complied with the bioethical norms of the 1975 Helsinki Declaration and were approved by the KFU bioethics commission. Randomly, animals were divided into the following experimental groups: intact animals (INT, n=5); animals that were under conditions of 7 daily antiorthostatic hanging (HU, n=7), animals that were under conditions of 7 daily antiorthostatic hanging, combined with daily magnetic stimulation of the spinal cord (HU+MS, n=6); animals that were under conditions of 7 daily antiorthostatic hanging, combined with daily electrical stimulation of the spinal cord (HU+ES, n=6). Magnetic stimulation was performed using the Neuro-MEP-4 stimulator (Neurosoft, Russia), through the coil daily for 1.5 hours and 10 minutes in series with an interval of 10 minutes; the amplitude of the stimuli is the threshold for the appearance of the contractile response of the muscles of the leg; frequency - 3 Hz. Electrical stimulation was performed using an A-M systems (USA) stimulator through electrodes preliminarily implanted to the epidural membrane at the level of the L1 segment, the electrostimulation parameters corresponded to the parameters of magnetic stimulation. After 7 days of exposure to the experimental conditions, motor (M-) and reflex (H-) soleus muscle responses were recorded, caused by irritation of the sciatic nerve. Control served as data obtained in the study of intact animals.

When estimating the parameters of the M-response, a decrease in latency was found in the HU+MS group and a decrease in the duration in the HU+MS and HU+ES groups. The registered transformations can be associated with an increase in the excitability of the presynaptic terminals of the axons innervating the soleus muscle and an increase in the synchronism of the discharge of motor units. When estimating the parameters of the H-response of the soleus muscle in the HU group, an increase in the amplitude of the reflex potential and the value of the ratio of maximum amplitudes  $H_{max}/M_{max}$  is registered, which indicates an increase in the reflex excitability of the corresponding motoneurons. In the groups HU+MS and HU+ES, a decrease in the latency of the H-response was found, which is probably due to an increase in the rate of excitation along the reflex arc.

Thus, gravitational unloading leads to an increase in the reflex excitability of the motor neurons of the motor center of soleus muscle. Stimulation of the spinal cord during microgravity prevents the transformation of the functional state of motoneurons, however, in these conditions, the synchronism of the discharge of motor units of the soleus muscle increases, the speed of excitation along the reflex arc increases.

The reported study was funded by RFBR according to the research project No. 19-04-01067.

### References

- Gorodnichev R.M., Machueva E.N., Pivovarova E.A., Semenov D.V., Ivanov S.M., Edgerton V.R., Savokhin A.A., Gerasimenko Y.P. A new method for the activation of the locomotor circuitry in humans // *Human Physiology*.- 2010.- V.36(6).- P. 700-707.
- Gerasimenko Y.P., McKinney Z.B., Sayenko D.G., Gad P., Gorodnichev R.M., Grundfest W., Edgerton V.R., Kozlovskaya I.B. Spinal and sensory neuromodulation of spinal neuronal networks in humans // *Human Physiology*.- 2017.- V.43(5).- P. 492-500.
- Scherbakova N.A., Bogacheva I.N., Zelenkova N.M., Savohin A.A., Moshonkina T.R., Gerasimenko Yu.P. Investigation of effects of the electromagnetic spinal cord stimulation on the hindlimbs muscles reflexes in narcotized rats // *Herald of TVGU. Series: Biology and Ecology*.- 2012.- V. 26(16). P. 15-22.
- Lavrov I.A., Dy C.J., Fong A.J., Gerasimenko Y.P., Courtine G., Zhong H., Roy R.R., Edgerton V.R. Epidural stimulation induced modulation of spinal locomotor networks in adult spinal rats // *J. Neurosci*.- 2008.- V28(23). P. 6022–6029.

### **КИНАЗА SLK/LOSK УЧАСТВУЕТ В ОБРАЗОВАНИИ ПЕРВИЧНОЙ РЕСНИЧКИ, РЕГУЛИРУЯ ЦЕНТРОСОМНЫЙ ПУЛ РСМ-1 ПОСРЕДСТВОМ РАДИАЛЬНОЙ СИСТЕМЫ МИКРОТРУБОЧЕК**

**А.И. Фокин<sup>1</sup>, О.Н. Жаппарова<sup>1</sup>, А.В. Бураков<sup>1</sup>, Е.С. Надеждина<sup>1,2</sup>**

1 – НИИ Физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, МГУ,

*119992, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр 40*

2 – Институт Белка РАН, *117334, Москва, ул. Вавилова, д.34*

Первичная ресничка – небольшая органелла, возникающая у большинства клеток млекопитающих при аресте клеточного цикла. Этот компонент тубулинового цитоскелета отходит от centrosомы и состоит из девяти дублетов микротрубочек. Первичная ресничка является ключевым координатором многих путей передачи сигнала, её дефекты являются причиной цилиопатий, вызывающих серьёзные нарушения развития и ряд тяжёлых заболеваний, включающий болезни почек и диабет II типа. Многие аспекты образования и функционирования первичных ресничек остаются неизученными.

Наша работа проведена на клетках Vero, выделенных из почки зелёной марьшанки и отличающихся радиальной системой интерфазных микротрубочек. Основные результаты были воспроизведены на эмбриональных фибробластах крысы (REF) и клетках инсулиномы MIN6 – модельного объекта для изучения первичных ресничек.

Мы нарушали радиальность микротрубочек в клетках путём специфического ингибирования серин/треониновой протеинкиназы SLK/LOSK, субстратом которой является субъединица динактина p150Glued. Мы обнаружили, что хаотизация микротрубочек сопровождается распылением по цитоплазме белка перичентриолярного материала РСМ-1 и исчезновением пер-

вичных ресничек. Известно, что РСМ-1 доставляется к centrosome при помощи динеина, поэтому мы изучили динеин-опосредованный везикулярный транспорт по микротрубочкам в клетках после ингибирования SLK/LOSK и показали, что он не затронут ингибированием данной киназы. Затем методом коиммунопреципитации мы показали, что фосфорилирование SLK/LOSK не влияет на взаимодействие РСМ-1 и динактина. После этого мы провели эксперимент по спасению (восстановлению centrosomal локализации p150Glued после ингибирования SLK/LOSK) путём экспрессии таргетирующего конструкта PACT-GFP-p150; кроме того, мы таргетировали динактин на мембраны Гольджи путём экспрессии конструкта p150-GRIP. В обоих случаях белок РСМ-1 не следовал за искусственно посаженным на соответствующие органеллы динактином. В заключительных сериях экспериментов мы экспрессировали в клетках с ингибированной киназой белок p150Glued и его мутанты. Экспрессия фрагмента p150Glued CC1, ингибирующего работу динеина, ожидаемо приводила к полной хаотизации микротрубочек и отсутствию РСМ-1 на centrosome. Таргетированный на centrosome мутант динактина p150-3TE улучшал радиальность микротрубочек и повышал концентрацию РСМ-1 на centrosome, в отличие от мутанта p150-3TA. Таким образом, была выявлена строгая корреляция между радиальностью микротрубочек и centrosomal локализацией РСМ-1.

В предыдущих работах нашей лаборатории было показано, что ингибирование SLK/LOSK, нарушая радиальность микротрубочек, никак не влияет на содержание в centrosome таких важных для её функционирования белков, как гамма-тубулин, перицентрин и найнеин. Известно, что многие линии клеток, как культивируемых *in vitro*, так и в составе живых тканей, в интерфазе содержат неупорядоченную систему микротрубочек, что никак не влияет на их жизнеспособность и прогрессию клеточного цикла. Поэтому оставалось неясным, какие фундаментальные биологические процессы затрагиваются при хаотизации микротрубочек, вызванной ингибированием SLK/LOSK. В результате проделанной работы стало понятно, что сигнальный каскад с участием этой киназы является новым, неизвестным ранее путём передачи сигнала, обеспечивающим образование первичной реснички.

## SLK/LOSK KINASE IS INVOLVED IN FORMATION OF PRIMARY CILIUM BY REGULATING THE CENTROSOMAL POOL OF PCM-1 THROUGH THE RADIAL MICROTUBULE SYSTEM

A.I. Fokin<sup>1</sup>, O.N. Zhapparova<sup>1</sup>, A.V. Burakov<sup>1</sup>, E.S. Nadezhdina<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> A.N.Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, MSU,  
119992, Moscow, Leninskie gory, 1, b. 40

<sup>2</sup> Institute of Protein Research, RAS, 117334, Moscow, Vavilova str, 34

The primary cilium is a small organelle that occurs in most mammalian cells during cell cycle arrest. This component of tubulin cytoskeleton originates

from the centrosome and consists of nine doublets of microtubules. The primary cilium is the key coordinator of many signal transduction pathways and its defects caused ciliopathies, causing serious developmental disorders and a number of serious diseases, including kidney diseases and type II diabetes. Many aspects of the formation and functioning of primary cilia remain unexplored.

Our work was carried out on Vero cells isolated from a green monkey kidney, which have perfect radial system of interphase microtubules. The main results were also reproduced using rat embryonic fibroblasts (REF) and MIN6 insulinoma cells, a model object for the study of primary cilia.

We violated the radiality of microtubules in cells by specific inhibition of serine/threonine protein kinase SLK/LOS3, which phosphorylates the dynein subunit p150Glued. We found that microtubule chaotization is accompanied by spraying of PCM-1 protein throughout the cytoplasm and also the disappearance of the primary cilia. It is known that PCM-1 is delivered to the centrosome using dynein, so we studied dynein-mediated vesicular transport through microtubules in cells after SLK/LOS3 inhibition and showed that it is not affected by inhibition of this kinase. Then, using the co-immunoprecipitation method, we demonstrated that phosphorylation by SLK/LOS3 does not affect the interaction of PCM-1 and dynein. After that, we conducted a rescue experiment (restoring the centrosomal localization of p150Glued after SLK/LOS3 inhibition) by expressing the PACT-GFP-p150 targeting construct. In addition, we targeted dynein to Golgi membranes by expressing the p150-GRIP construct. In both cases, PCM-1 protein did not follow the artificially targeted dynein on the corresponding organelles. In the final series of experiments we expressed the p150Glued and its mutants in cells with inhibited kinase. Expression of the CC1 fragment, which inhibits dynein, lead to complete randomization of microtubules as expected. A centrosome-targeted mutant of the dynein, p150-3TE, severely improved the microtubule radiality and increased the concentration of PCM-1 on the centrosome, unlike the mutant p150-3TA. Thus, a strong correlation between the radiality of microtubules and the centrosomal localization of PCM was revealed.

In previous works in our laboratory it was shown that inhibition of SLK/LOS3 disrupts the radiality of microtubules but does not affect the content of such important centrosomal proteins as gamma-tubulin, pericentrin and ninein. It is known that many cell lines, both cultured *in vitro* and from the living tissues, contains an unordered microtubule system in the interphase that does not affect their viability and cell cycle progression. Therefore, it remained unclear, which fundamental biological processes could be affected by microtubule randomization caused by SLK/LOS3 inhibition. As a result of this study, it became clear that this kinase participates in a new, previously unknown signal transduction pathway that ensures the formation of the primary cilia.



## **ВЕЩЕСТВА, ОСВОБОЖДАЮЩИЕСЯ ИЗ СКЕЛЕТНОЙ МЫШЦЫ В ПРОЦЕССЕ СОКРАЩЕНИЯ, СТИМУЛИРУЮТ ЕЕ РОСТ**

**В.А. Фуралёв, И.В. Кравченко, Т.В. Бояринцева, В.О. Попов**

*ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН,  
119071 Москва, Ленинский проспект, 33, стр.2, Россия*

Механизмы развития функциональной гипертрофии скелетной мышцы после интенсивных упражнений до сих пор остаются исследованными не до конца. В нашей лаборатории интенсивно изучается роль соединений, освобождающихся из самой скелетной мышцы в процессе интенсивного сокращения, в запуске процессов регенерации и развития функциональной гипертрофии. Ранее нами было показано, что миофибрилярные белки титин и миомезин, освобождающиеся из поврежденных мышечных клеток при интенсивной нагрузке, стимулируют экспрессию инсулино-подобного фактора роста 1 (ИФР-1) и механо-ростового фактора (МРФ) [1]. Однако осталась неизученной способность этих белков и их доменов стимулировать пролиферацию миобластов. Также не было изучено участие макрофагов в регенеративных процессах, запускаемых миофибриллами. Наконец, осталось неисследованным возможное участие других веществ, освобождающихся из мышечных клеток в ходе интенсивной работы – таких, как ион  $K^+$ , концентрация которого в межклеточной жидкости может достигать 10-12 мМ [2]. Решению вышеперечисленных задач посвящена данная работа.

Было показано, что титин и миомезин, а также определенные их домены стимулируют пролиферацию миобластов, причем возрастала и скорость восстановления МТТ, и интенсивность включения  $^3[H]$ -тимидина в ДНК. Оказалось, что пролиферацию миобластов стимулируют те самые Fn type III и Ig-like домены в структуре титина и миомезина, которые активируют экспрессию МРФ и ИФР-1. Более того, митогенные эффекты различных доменов продемонстрировали ту же картину чувствительности к ингибиторам сигнальных путей, что и стимуляция экспрессии ростовых факторов. Fn type III домены активировали пролиферацию через сигнальный путь  $Ca^{2+}$  - кальмодулин -  $Ca^{2+}$ /кальмодулин-зависимая протеинкиназа II, а Ig-like домены - через сигнальный путь аденилатциклаза – цАМФ – протеинкиназа А. Митогенные эффекты доменов обоих типов частично, но не полностью, подавлялись при ингибировании аутокринного сигналинга ИФР-1. На следующем этапе работы было изучено влияние миофибрилл на пролиферацию миобластов в условиях совместного культивирования с макрофагами. Было показано, что в условиях совместного культивирования макрофаги значительно стимулировали пролиферацию миобластов, в присутствии миофибрилл стимулирующий эффект был выражен еще сильнее, а в присутствии ЛПС активация пролиферации отсутствовала. Культуральная среда, кондиционированная макрофагами, сама по себе стимулирует пролиферацию миобластов, инкубация макрофагов с миофибриллами повышает митогенное действие кондиционированной среды, а инкубация их с

ЛПС приводила к исчезновению митогенных эффектов. При этом кондиционированная необработанными макрофагами культуральная среда содержит иной спектр активирующих пролиферацию белков, чем среда после обработки макрофагов миофибриллами.

На последнем этапе была исследована способность ионов  $K^+$ , освобождающихся в процессе интенсивного мышечного сокращения, стимулировать развитие функциональной гипертрофии мышцы. Двухчасовая инкубация мышечных клеток в среде, содержащей 12 мМ KCl, активировала экспрессию мРНК ИФР-1 и МРФ. Максимальная экспрессия мРНК обоих ростовых факторов наблюдалась спустя 2 часа после обработки в случае миобластов, и спустя 4 часа – в случае миотуб. В миобластах экспрессия мРНК ростовых факторов активировалась уже при инкубации с 8 мМ KCl, тогда как в миотубах – 9 мМ. Схожие результаты показали эксперименты по измерению концентрации белков МРФ и ИФР-1, при этом пик экспрессии наблюдался через 24 часа после двухчасовой инкубации с KCl. При исследовании влияния блокаторов кальциевых каналов было выявлено, что  $CdCl_2$  полностью подавлял индуцированную KCl стимуляцию экспрессии обоих ростовых факторов. Блокатор  $Ca^{2+}$ -каналов L-типа нифедипин и блокатор  $Ca_v3.2$  каналов  $NiCl_2$  не оказывали влияния на эффекты хлорида калия. В то же время блокатор HCN каналов ZD7288 значительно угнетал эти эффекты. При исследовании влияния хлорида калия на пролиферацию миобластов было обнаружено, что двухчасовая инкубация стимулирует восстановление МТТ культурами миобластов. Статистически достоверный эффект наблюдался уже при 8 мМ KCl. Блокатор HCN каналов ZD7288 угнетал эту активацию. Также статистически достоверное понижение стимулирующего эффекта наблюдалось в присутствии антител к ИФР-1.

#### Литература

1. Kravchenko IV, Furalyov VA, Chatziefthimiou S, Wilmanns M, Popov VO. Mol Cell Endocrinol. 2015. v. 399, p. 69–77.
2. Mohr M., Nordsborg N., Nielsen J.J., Pedersen L.D., Fischer C., Krstrup P., Bangsbo J. Pflugers Arch. 2004. v. 448, p. 452-456.

### **SUBSTANCES RELEASED FROM SKELETAL MUSCLE DURING CONTRACTION STIMULATE ITS GROWTH**

**V.A. Furalyov, I.V. Kravchenko, T.V. Boyarintseva, V.O. Popov**

*Federal Research Centre «Fundamentals of Biotechnology» RAS, Moscow, Leninsky prospect, 33, build. 2, Russia*

The mechanisms of development of functional hypertrophy of skeletal muscle after intense exercise are still not fully explored. The role of compounds released from the skeletal muscle itself in the process of intensive contraction, in the launch of regeneration processes and in the development of functional hypertrophy, is intensively studied in our laboratory. We have previously shown that myofibrillar proteins titin and myomesin released from damaged muscle cells

under intense load stimulate the expression of insulin-like growth factor 1 (IGF-1) and mechano-growth factor (MGF) [1]. However, the ability of these proteins and their domains to stimulate the proliferation of myoblasts has not been studied. The participation of macrophages in regenerative processes triggered by myofibrils was also not studied. Finally, the possible involvement of other substances released from muscle cells during intensive work, such as the  $K^+$  ion, whose concentration in the extracellular fluid can reach 10-12 mM [2], remains unexplored. This work is devoted to the solution of the above tasks.

It has been shown that titin and myomesin, as well as their certain domains, stimulate the proliferation of myoblasts with both the rate of MTT reduction and the intensity of  $^3[H]$ -thymidine incorporation in DNA increased. It turned out that the proliferation of myoblasts was stimulated by the very Fn type III and Ig-like domains in the structure of titin and myomesin, which activate the expression of MGF and IGF-1. Moreover, the mitogenic effects of different domains showed the same sensitivity pattern to signaling inhibitors as stimulation of the expression of growth factors. Fn type III domains stimulate proliferation via  $Ca^{2+}$  - calmodulin -  $Ca^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinase II signal pathway, and Ig-like domains act via adenylyl cyclase - cAMP - protein kinase A signal pathway. The mitogenic effects of both types of domains were partially, but not completely, suppressed when IGF-1 autocrine signaling was inhibited.

At the next stage of work, the effect of myofibrils on the proliferation of myoblasts under conditions of co-cultivation with macrophages was studied. It was shown that under co-cultivation conditions, macrophages significantly stimulated myoblast proliferation, in the presence of myofibrils the stimulation effect was even stronger, and in the presence of LPS activation of proliferation was absent. The macrophage-conditioned culture medium itself stimulates the proliferation of myoblasts, the incubation of macrophages with myofibrils increases the mitogenic effect of the conditioned medium, and their incubation with LPS leads to the disappearance of mitogenic effects. At the same time, the culture medium conditioned by untreated macrophages contains a different spectrum of activating proliferation proteins than the medium after macrophages treated with myofibrils.

At the last stage, the ability of  $K^+$  ions, released in the process of intense muscle contraction, to stimulate the development of functional muscle hypertrophy was investigated. Two-hour incubation of muscle cells in a medium containing 12 mM KCl activated the expression of IGF-1 and MGF mRNA. Maximum mRNA expression of both growth factors was observed 2 hours after treatment in the case of myoblasts, and 4 hours after treatment in the case of myotubes. In myoblasts, mRNA expression of growth factors was activated already by incubation at 8 mM KCl, whereas in myotubes - at 9 mM. Similar results were obtained in experiments with measurement of the concentration of MGF and IGF-1 proteins, with the peak of expression being observed 24 hours after the two-hour incubation with KCl. When the effects of calcium channel blockers were studying, it was found that  $CdCl_2$  completely suppressed KCl-induced stimulation of

the expression of both growth factors. The L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channel blocker nifedipine and the  $\text{Ca}_v3.2$  channel blocker  $\text{NiCl}_2$  did not affect the effects of potassium chloride. At the same time, the HCN channel blocker ZD7288 significantly depressed these effects. When studying the effect of potassium chloride on the proliferation of myoblasts, it was found that two-hour incubation stimulates the reduction of MTT in myoblast cultures. A statistically significant effect was observed with 8 mM KCl already. The HCN channel blocker ZD7288 depressed this activation. Also, a statistically significant decrease in the stimulating effect was observed in the presence of antibodies to IGF-1.

### References

1. Kravchenko IV, Furalyov VA, Chatziefthimiou S, Wilmanns M, Popov VO. Mol Cell Endocrinol. 2015. v. 399, p. 69–77.
2. Mohr M., Nordsborg N., Nielsen J.J., Pedersen L.D., Fischer C., Krstrup P., Bangsbo J. Pflugers Arch. 2004. v. 448, p. 452–456.

## ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИ МОДИФИЦИРОВАННЫЙ АКТИН КАК МОДЕЛЬ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ НЕОЖИДАННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

**С.Ю. Хайтлина, О.А. Цаплина**

*Институт цитологии РАН, 194064 г. Санкт-Петербург, Тухорецкий пр., 4, Россия*

Многие клеточные процессы тесно связаны с динамикой актинового цитоскелета, которая, в свою очередь, критически зависит от сборки и разборки актиновых филаментов. Эта динамика определяется динамическими свойствами самого актина и его взаимодействием с многочисленными актин-связывающими белками. Чтобы исследовать механизмы, лежащие в основе этих процессов, мы использовали актин, протеолитически модифицированный путем расщепления между Gly42 и Val43 в ДНКазной петле молекулы актина. Ранее мы показали, что актин, расщепленный между Gly42 и Val43 актин-специфической бактериальной протеазой ECP32 / гримелизин, не полимеризуется, если он содержит  $\text{Ca}^{2+}$  как прочно связанный катион. При этом Mg-связанная форма расщепленного актина сохраняет способность к полимеризации, но отличается от нерасщепленного актина высокой критической концентрацией полимеризации, низкой скоростью полимеризации и резким увеличением АТФазной активности филаментов актина [1-3]. Такие же свойства характерны для актина, расщепленного между Gly42 и Val43 с помощью сходной бактериальной протеазы протеализин [4]. Цель данного сообщения состоит в том, чтобы показать, как нестабильность расщепленных филаментов Mg-содержащего актина может быть преодолена тропомиозином (Трм) или присутствием фторида натрия.

Данные о прямом влиянии Трм на динамику F-actin часто неоднозначны, возможно, из-за того, что актиновые филаменты скелетных мышц относительно стабильны, и дополнительный стабилизирующий эффект Трм может быть небольшим. Используя F-актин, протеолитически модифициро-

ванный в ДНКазной петле (ЕСР-actin), мы показали, что связывание Трм почти полностью подавляет повышенную АТФазную... активность, отражающую усиленный обмен субъединиц, характерный для этого F-актина. Этот эффект кооперативен и зависит от концентрации Трм, с 50% ингибированием, наблюдаемым при соотношении Трм: актин = 1: 50. Используя алиquotы растворов ЕСР-актина и ЕСР актин/Трм в качестве зародышей полимеризации для сравнения их влияния на полимеризацию Pyrenyl-меченого G-актина, мы также показали, что Трм снижает не только концентрацию филаментов ЕСР-актина, но и скорость обмена субъединиц в F-актине. Наши данные указывают на то, что Трм регулирует динамику актиновых филаментов, стабилизируя контакты между субъединицами нити аллостерически, и этот механизм может участвовать в модуляции динамики цитоскелета.

Динамическая нестабильность актиновых филаментов также может быть ингибирована аналогами Рi - фторидом бериллия и фторидом алюминия, которые имитируют промежуточное состояние ADP-Рi и стабилизируют актиновые филаменты. С другой стороны, в отсутствие алюминия ферменты переноса фосфатов могут активироваться фторидом магния, если в растворе присутствуют ионы магния и фторид натрия (NaF) [5]. Способствует ли фторид магния функциональной активности актина, неизвестно. Мы впервые показали, что фторид натрия значительно ускоряет полимеризацию Mg-актина, расщепленного в ДНКазной петле между Gly42 и Val43 актин-специфической протеазой протеализин (Pln-actin), по-видимому, из-за стабилизации олигомеров, образующихся на начальном этапе полимеризации актина. При этом NaF не ингибирует АТФазную активность (обмен субъединиц) в Pln-F-актине, не увеличивает количество Pln-F-актина, осажденного ультрацентрифугированием, и не стабилизирует межнитевые поперечные контакты в Pln-F-актине. С другой стороны, NaF уменьшал доступность нуклеотидной щели Mg-G-актина к трипсину, что указывает на закрытие щели, и дополнительно защищал в Mg-F-актине ДНКазную петлю от расщепления протеализином, что указывает на стабилизацию продольных контактов. Мы также показали, что в культивируемых клетках NaF может непосредственно стимулировать сборку актиновых структур в условиях, когда заингибирована соответствующая активность ROCK киназного пути. Эти данные позволяют предположить, что сборка актиновых филаментов, стимулированная фтористым натрием, связана с образованием фторида магния из фтористого натрия и ионов магния, прочно связанных в нуклеотидной щели молекулы актина.

Полученные результаты указывают на то, что присущие F-актину динамические свойства, усиленные расщеплением между Gly42 и Val43, могут быть использованы для выявления новых факторов, стабилизирующих актиновые филаментные структуры.

#### Литература

- 1.S.Yu. Khaitlina, J.H. Collins, I.M. Kuznetsova, V.P. Pershina, I.G. Synakevich, K.K. Turoverov, A.M. Usmanova. 1991. Physicochemical properties of actin cleaved with bacterial protease from *E. coli* A2 strain, FEBS Lett. 279, 49-51.

2. O. Tsaplina, T. Efremova, I. Demidyuk, S. Khaitlina. 2012. F-actin is a substrate for protealysin, a metalloprotease of invasive *Serratia proteamaculans*, FEBS J. 279, 264-274.
3. S. Yu. Khaitlina, J. Moraczewska, H. Strzelecka-Golaszewska. 1993. The actin/actin interactions involving the N-terminus of the DNase-I binding loop are crucial for stabilization of the actin filament, Eur. J. Biochem. 218, 911-920.
4. S. Yu. Khaitlina, H. Strzelecka-Golaszewska. 2002. Role of the DNase-I-binding loop in dynamic properties of actin filament, Biophys. J. 82 () 321-334.
5. N. J. Baxter, M. W. Bowler, T. Alizadeh, M. J. Cliff, A. M. Hounslow, B. Wu, D. B. Berkowitz, N. H. Williams, G. Blackburn, J. P. Waltho, 2010. Atomic details of near-transition state conformers for enzyme phosphoryl transfer revealed by MgF<sub>3</sub> rather than by phosphoranes, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 107, 4555-4560.

## **PROTEOLYTICALLY MODIFIED ACTIN AS A MODEL TO OBTAIN UNEXPECTED RESULTS**

**S. Yu. Khaitlina, O. A. Tsaplina**

*Institute of Cytology RAS, 194064 Sankt-Petersburg, Tykhoretsky av., 4, Russia*

Many cellular processes are closely connected with dynamics of actin cytoskeleton, which, in turn, critically depends on assembly and disassembly of actin filaments. This dynamics is determined by the dynamic properties of actin itself and can be modulated by numerous actin binding proteins. To investigate the mechanisms underlying these processes we have used actin proteolytically modified by a cleavage between Gly42 and Val43 within the DNase-I-binding loop of the actin molecule. Previously we have shown that actin cleaved between Gly42 and Val43 with actin-specific bacterial protease ECP32/grimelysin does not polymerize if it contains Ca<sup>2+</sup> as a highly bound cation, whereas its Mg-bound form – while retaining the ability to polymerize into filaments – has the high critical concentration for polymerization, slow polymerization rate and a dramatic increase in the steady-state ATPase activity inherent to F-actin [1-3]. The same properties are characteristic for actin cleaved between Gly42 and Val43 with a similar bacterial protease protealysin [4]. Here we show how instability of the cleaved Mg-actin filaments can be overcome by tropomyosin (Tpm) or by the presence of sodium fluoride.

Data on the direct influence of Tpm on F-actin dynamics are often ambiguous possibly due to the fact that skeletal muscle actin filaments are relatively stable, and the additional stabilizing effect of Tpm may be small. Using F-actin proteolytically modified within the DNase-binding loop (ECP-actin), we have shown that Tpm binding almost completely suppresses the increased ATPase activity corresponding to the enhanced subunit exchange intrinsic for this F-actin. The effect is both concentration-dependent and cooperative, with half-maximal inhibition observed at about a 1 : 50 Tpm : actin ratio. Using aliquots of ECP-actin and ECP actin/Tpm solutions as the nuclei to compare their effect on polymerization of pyrenyl-labelled G-actin we also show that Tpm decreases not

only the number concentration of ECP-actin filaments, but also the rate of the filament subunit exchange. Our data suggest that Tpm regulates the dynamics of actin filaments by an allosteric strengthening of intermonomer contacts in the actin filament, and that this mechanism may be involved in the modulation of cytoskeletal dynamics.

Dynamic instability of actin filaments can also be inhibited by Pi analogs beryllium fluoride and aluminium fluoride that mimic the intermediate ADP-Pi state and stabilize actin filaments. On the other hand, the phosphoryl transfer enzymes can be activated in the absence of aluminium by magnesium fluoride if magnesium ions and sodium fluoride (NaF) were present in the solution [5]. Whether magnesium fluoride promotes functional activities of actin is not known. Here we show, for the first time, that sodium fluoride strongly accelerates polymerization of Mg-actin proteolytically cleaved between Gly42 and Val43 within the DNase-I-binding loop with actin-specific protease protealysin (Pln-actin), apparently due to stabilization of nuclei formed at the initial step of actin polymerization. Thereby, NaF did not inhibit the ATPase activity (subunit exchange) on Pln-F-actin, did not increase the amount of Pln-F-actin sedimented by ultracentrifugation, and did not stabilize the interstrand contacts of Pln-F-actin. On the other hand, NaF diminished accessibility of the nucleotide binding cleft of DNase-I-binding loop from the protealysin cleavage in Mg-F-actin, thus indicating that the longitudinal contacts are stabilized. We also demonstrate that in cultured cells NaF can directly promote assembly of F-actin structures under conditions when the corresponding activity of the ROCK kinase pathway is inhibited. These data suggest that the NaF-induced assembly of actin filaments is promoted by magnesium fluoride that can be formed by the NaF-originating fluoride and the actin tightly bound magnesium.

Taken together, our results demonstrate that the inherent instability of F-actin enhanced by the cleavage between Gly42 and Val43 within the DNase-I-binding loop can be successfully used to reveal new factors stabilizing actin filamentous structures.

## References

- 1.S.Yu. Khaitlina, J.H. Collins, I.M. Kuznetsova, V.P. Pershina, I.G. Synakevich, K.K. Turoverov, A.M. Usmanova.1991.Physicochemical properties of actin cleaved with bacterial protease from *E. coli* A2 strain, *FEBS Lett.* 279, 49-51.
- 2.O.Tsaplina, T. Efremova, I. Demidyuk, S. Khaitlina. 2012. F-actin is a substrate for protealysin, a metalloprotease of invasive *Serratia proteamaculans*, *FEBS J.* 279, 264-274.
- 3.S.Yu.Khaitlina, J. Moraczewska, H. Strzelecka-Gołaszewska.1993. The actin/actin interactions involving the N-terminus of the DNase-I-binding loop are crucial for stabilization of the actin filament, *Eur. J. Biochem.* 218, 911-920.
- 4.S.Yu.Khaitlina, H. Strzelecka-Goaszewska. 2002. Role of the DNase-I-binding loop in dynamic properties of actin filament, *Biophys. J.* 82 () 321-334.
- 5.N.J.Baxter, M.W. Bowler, T. Alizadeh, M.J. Cliff, A.M. Hounslow, B. Wu, D.B. Berkowitzc, N.H. Williams, G. Blackburn, J.P. Waltho, 2010. Atomic details of near-transition state conformers for enzyme phosphoryl transfer revealed by MgF3 rather than by phosphoranes, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 4555-4560.

# ФОСФОРИЛИРОВАНИЕ В АКТИН-СВЯЗЫВАЮЩИХ ДОМЕНАХ РЕГУЛИРУЕТ ЛОКАЛИЗАЦИЮ КИНАЗЫ ЛЕГКИХ ЦЕПЕЙ МИОЗИНА НА МИКРОФИЛАМЕНТАХ И ПОВЫШАЕТ АКТИВНОСТЬ ФЕРМЕНТА В КЛЕТКАХ

А.Ю. Хапчаев, В.П. Ширинский

*Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии МЗ РФ,  
Москва, ул. 3-я Черепковская, 15а, Россия*

Киназа легких цепей миозина (MLCK) –  $Ca^{2+}$ -кальмодулин-зависимый активатор миозина II типа в немышечных и гладкомышечных клетках, обеспечивающий миозин-зависимые процессы в клетках. В гладкой мышце и большинстве немышечных клеток экспрессируется низкомолекулярная изоформа (S-MLCK, 120 кДа), а в клетках эндотелия, эпителия и лимфоцитах преобладает высокомолекулярная L-MLCK (220 кДа). Миозин-связывающий, регуляторный и каталитический домены располагаются в С-концевой области обеих изоформ. Посттрансляционные модификации (ПТМ) в регуляторном домене (фосфорилирование Ser<sup>1759</sup>/Ser<sup>1760</sup>) или по удаленным от каталитического центра остаткам (фосфорилирование Tyr<sup>464</sup>/Tyr<sup>471</sup> или ацетилирование Lys<sup>608</sup>) могут оказывать регуляторное влияние на активность фермента. В то же время, для целого ряда ПТМ функциональные эффекты остаются неописанными, например, неизвестны остатки, ответственные за регуляцию активности MLCK митоген-активируемыми MAP-киназами.

Обе изоформы MLCK связываются с актином. В N-концевой области S-MLCK три DFRxxL мотива обеспечивают прочное связывание с актином, однако для S-MLCK показана возможность миграции вдоль актинового филамента, по-видимому, за счет поочередной диссоциации/ассоциации отдельных DFRxxL мотивов. Актин-связывающие свойства L-MLCK усиливаются благодаря наличию двух дополнительных DFRxxL-мотивов и другого актин-связывающего участка(ов) в N-конце L-MLCK.

Мы предположили, что связывание MLCK с актином может регулироваться фосфорилированием актин-связывающих доменов и исследовали влияние описанных *in vivo* ПТМ. Мы обнаружили, что в DFRxxL-домене фосфорилирование Ser<sup>25</sup> и/или Thr<sup>56</sup> (нумерация дана по S-MLCK) MAP-киназами ослабляет взаимодействие рекомбинантного DFRxxL-домена MLCK человека с филаментарным актином *in vitro*. Замена Ser<sup>25</sup> и/или Thr<sup>56</sup> на Asp оказывала аналогичный эффект, валидируя использование фосфоимитирующих зам. В фибробластах NIH3T3 и гладкомышечных клетках A10 экзогенная полноразмерная S-MLCK с зам. Ser<sup>25</sup>>Asp и Thr<sup>56</sup>>Asp (2D-SMLCK) значимо слабее удерживалась в нерастворимой в детергенте цитоскелетной фракции при сравнении с 2A-SMLCK, несущей замены Ser<sup>25</sup>>Ala и Thr<sup>56</sup>>Ala. В клетках A10, экспрессирующих 2D-SMLCK,  $Ca^{2+}$ -ионофор вызывал значимое фосфорилирование миозина II в отличие от клеток, экспрессирующих. Эти эксперименты проводили в присутствии ингибитора Rho-



киназы Y27632 с целью вычленить вклад S-MLCK и частично компенсировать эффекты сверхэкспрессии S-MLCK, поскольку Rho-киназа является альтернативной киназой миозина II, а также ингибирует фосфатазу миозина. Полученные нами данные позволяют предположить, что фосфорилирование S-MLCK по Ser<sup>25</sup> и/или Thr<sup>56</sup> в актин-связывающем домене может приводить к кажущейся активации S-MLCK, возможно, вследствие повышения мобильности фермента в цитоскелетных структурах. Выяснение молекулярных механизмов, ответственных за кажущееся повышение активности S-MLCK требует дополнительных исследований.

Для исследования роли ПТМ в N-концевом актин-связывающем участке L-MLCK мы выбрали остатки Thr<sup>109</sup>, Thr<sup>118</sup> и Ser<sup>154</sup> и использовали линейные клетки CV-1 и эндотелиальные клетки пупочной вены человека (HUVEC), в которых L-MLCK является основной изоформой. Удаление N-концевого актин-связывающего участка ( $\Delta$ N245) нарушало связывание L-MLCK с микрофиламентами в трансфицированных/инфицированных клетках и повышало относительное накопление экзогенного EGFP-меченого белка в кортикальной цитоплазме и подосомах. L-MLCK с фосфоимитирующими заменами по Thr<sup>109</sup>, Thr<sup>118</sup> и Ser<sup>154</sup> (3D-LMLCK) демонстрировала ослабленное связывание с актином при сравнении с L-MLCK дикого типа, но сохраняла способность транслоцироваться в кортикальную цитоплазму и подосомы. Клетки HUVECs, экспрессирующие 3D-LMLCK, демонстрировали 5-кратное усиление скорости хемотаксиса при сравнении с клетками, экспрессирующими L-MLCK дикого типа или  $\Delta$ N245-LMLCK. Следует отметить, что в клетках, экспрессирующих  $\Delta$ N245-LMLCK, возрастала ламеллиподиальная активность, однако клетки, по-видимому, не имели поляризации и не перемещались. В функциональном отношении, ослабленное связывание L-MLCK с микрофиламентами вследствие удаления N-концевого участка или введения фосфоимитирующих замен ослабляло сократительный ответ клеток HUVEC на стимуляцию тромбином и повышало трансэндотелиальное сопротивление клеточного монослоя *in vitro*. Таким образом, мы показали, что 1) N-концевой актин-связывающий участок играет ведущую роль в локализации L-MLCK на актиновых филаментах в эндотелиальных клетках; 2) модификация Thr<sup>109</sup>, Thr<sup>118</sup> и Ser<sup>154</sup> может представлять собой механизм перераспределения L-MLCK с актиновых филаментов для регуляции сократительной/миграционной активности клеток.

Поддержано грантом РФФИ №16-04-01742.

**PHOSPHORYLATION WITHIN ACTIN-BINDING DOMAINS  
MODULATES MYOSIN LIGHT CHAIN KINASE RESIDENCE  
ON THIN FILAMENTS AND CONTRIBUTES TO APPARENT  
ACTIVATION OF THE ENZYME IN CELLS**

**A.Y. Khapchaev, V.P. Shirinsky**

*National Medical Research Center for Cardiology,  
Moscow, 3<sup>rd</sup> Cherepkovskaya, 15a, Russia*

Myosin light chain kinase (MLCK) is a ubiquitous  $\text{Ca}^{2+}$ -calmodulin-dependent actin-binding activator of non-muscle and smooth muscle myosin II to initiate myosin-dependent contractile events. While smooth muscle and most of non-muscle cells express the short MLCK isoform (S-MLCK, 120 kDa), in endothelial, epithelial cells, and lymphocytes, the long isoform (L-MLCK, 220 kDa) is prevailing. The myosin-binding, regulatory, and catalytic domains are located in the C-terminal moiety of both isoforms. MLCK isoforms are negatively regulated by phosphorylation at Ser<sup>1759</sup>/Ser<sup>1760</sup> in the regulatory domain. Post-translational modifications (PTMs) at individual sites far outside the catalytic core, e.g. Tyr<sup>464</sup>/Tyr<sup>471</sup> phosphorylation or Lys<sup>608</sup> acetylation, have been also implicated in modulation of MLCK activity, however there is a handful of in-vivo PTMs with largely unknown function. There has been reported an apparent modulation of MLCK activity by mitogen-activated protein (MAP) kinases, however the effect has not been juxtaposed with the responsible residues.

Both MLCK isoforms are actin-binding enzymes. Though three DFRxxL motifs at the N-terminus of S-MLCK provide for high affinity binding to actin, S-MLCK has been shown to migrate along actin filaments probably via turn-based interaction of individual DFRxxL motifs with actin monomers. Actin-binding properties of L-MLCK are strengthened due to expanded DFRxxL-domain (five DFRxxL motifs) and another remote actin-binding sequence(s) at the N-terminus of the molecule. Disturbance of L-MLCK residence on actin was shown to correlate with Tyr<sup>464</sup>/Tyr<sup>471</sup> phosphorylation however the mechanism is poorly understood.

We hypothesized that actin-binding of MLCK isoforms might be a subject for phosphorylation-dependent regulation at actin-binding sites. In this study, we tested the effects of the in-vivo-verified PTMs, which locate in the actin-binding domains. We found that within the DFRxxL-domain, phosphorylation at Ser<sup>25</sup> and/or Thr<sup>56</sup> (numbering is for S-MLCK) by MAP-kinases exerts a negative effect on human S-MLCK recombinant DFRxxL-domain interaction with filamentous actin in vitro. Substitution of Ser<sup>25</sup> and/or Thr<sup>56</sup> by Asp residues demonstrated the same effects and validated the use of phosphorylation-imitating Ser<sup>25</sup>>Asp and Thr<sup>56</sup>>Asp (2D-SMLCK) or non-phosphorylatable Ser<sup>25</sup>>Ala and Thr<sup>56</sup>>Ala (2A-SMLCK) mutants in cell-based experiments. In NIH3T3 fibroblasts and smooth muscle A10 cells, which expressed exogenous full-length S-MLCK mutants, significantly less amount of 2D-SMLCK was retained in the detergent-insoluble cytoskeletal cell fraction as compared to 2A-SMLCK. In functional aspect, we analyzed  $\text{Ca}^{2+}$ -ionophore-induced myosin II activation in infected A10 cells in the presence of Rho-kinase inhibitor Y27632 in order to partially compensate for S-MLCK over-expression and disarticulate the contribution of S-MLCK to myosin II phosphorylation because Rho-kinase is another major myosin II activator and myosin phosphatase inhibitor. Interestingly, under these experimental conditions, in 2D-SMLCK-expressing A10 cells, the level of myosin II phosphorylation was significantly higher as compared to 2A-SMLCK-expressing cells. Collectively, based on our findings, it is tempting to assume

that phosphorylation of S-MLCK at Ser<sup>25</sup> and/or Thr<sup>56</sup> within the actin-binding domain results in apparent S-MLCK activation probably via an increase in S-MLCK mobility within the cytoskeletal structures. Elucidation of the precise molecular mechanism(s) responsible for an apparent increase in S-MLCK catalytic activity should be investigated further.

In similar way, we investigated the effects of phosphorylation-imitating mutations in the L-MLCK N-terminal actin-binding domain. We chose Thr<sup>109</sup>, Thr<sup>118</sup>, and Ser<sup>154</sup> as potential regulatory sites and used CV-1 cell line and human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) as models because both these cell types express L-MLCK as a major isoform. Truncation of N-terminal actin-binding site (DeltaN245) abrogated L-MLCK residence on stress fibers in transfected/infected cells and increased the relative accumulation of the exogenous EGFP-tagged protein in submembrane compartments and podosomes. L-MLCK with phosphorylation-imitating mutations at Thr<sup>109</sup>, Thr<sup>118</sup>, and Ser<sup>154</sup> (3D-LMLCK) demonstrated reduced actin-decorating properties as compared to the wild-type L-MLCK but retained its ability to concentrate on the cell leading edge and in podosomes. Interestingly, HUVECs, which were infected to express 3D-LMLCK demonstrated a 5-fold enhanced chemokinesis velocity as compared to HUVECs expressing either wild-type L-MLCK or DeltaN245-LMLCK. Notably, in DeltaN245-LMLCK-expressing cells, lamellipodial activity was increased but the cells were apparently not polarized and did not shift their positions. In functional aspect, decreased binding of L-MLCK to microfilaments due to either N-terminus truncation or phosphorylation-imitating mutations attenuated HUVEC contractility in response to thrombin and increased the transendothelial resistance of endothelial monolayer in vitro. Collectively, we demonstrate that (i) the N-terminal actin-binding site plays a major role in L-MLCK targeting to stress fibers in cells; (ii) modification of Thr<sup>109</sup>, Thr<sup>118</sup>, and Ser<sup>154</sup> may represent a mechanism to relocate L-MLCK from stress fibers to regulate the contractile/migratory cell responses.

Supported by RFBR grant 16-04-01742 to AYK.

## **ОСОБЕННОСТИ ВНУТРИМЫШЕЧНОГО ВЕТВЛЕНИЯ АРТЕРИЙ В МЫШЦАХ МЕДИАЛЬНОЙ ГРУППЫ БЕДРА У ПЛОДОВ ЧЕЛОВЕКА**

**Т.В. Хмара, П.В. Григорьева, С.Д. Новиченко**

*Буковинский государственный медицинский университет,  
Черновцы, Театральная площадь, 2, Украина*

Целью работы было исследование внутримышечного распределения артерий в мышцах медиальной группы бедра у плодов человека 4-10 месяцев. Методами макромикроскопического препарирования, поверхностной окраски отпрепарированных сосудов и нервов и морфометрии изучены препараты нижних конечностей 42 плодов человека 81,0-375,0 мм теменно-копчиковой длины [1].

Установлено, что у плодов человека со стороны задней поверхности и латерального края тонкой мышцы в нее вступают от 3 до 6 артериальных стволиков. У большинства плодов сосуды и нервы следуют совместно, изредка, как правило на уровне нижней 1/3 тонкой мышцы, раздельно. В кровоснабжении верхней 1/3 тонкой мышцы принимают участие поверхностная и восходящая ветви медиальной артерии, огибающей бедренную кость, передняя ветвь запирающей артерии, а в кровоснабжении средней 1/3 мышечного брюшка – 2-3 мышечные ветви бедренной артерии. Нижняя 1/3 тонкой мышцы кровоснабжается двумя-тремя мышечными ветвями бедренной артерии, нисходящей коленной артерией. По отношению к продольной оси тонкой мышцы артериальные стволики располагаются поперечно, артерии 2-го и 3-го порядков следуют параллельно одни другим. Артерии в тонкой мышце разветвляются по смешанному типу. При этом во внутримышечном распределении артерий в тонкой мышце сохраняется сегментарность. Между внутримышечными артериями в тонкой мышце анастомозы нами не выявлены. В кровоснабжении верхней 1/3 длинной приводящей мышцы принимают участие мышечные ветви от запирающей артерии и медиальной артерии, огибающей бедренную кость, средней и нижней трети мышцы – 1-3 мышечные ветви от бедренной артерии и (или) глубокой артерии бедра. При этом внутримышечные артериальные анастомозы наблюдались в единичных случаях. Артерии подходят к длинной приводящей мышце с задней (преимущественно ветви запирающей артерии) и передней (указанные ветви системы бедренной артерии) поверхностей, места их вхождения расположены на всем протяжении мышцы. При этом преобладает сегментарный тип кровоснабжения. В длинной приводящей мышце более интенсивно снабжается артериями средняя треть мышцы. Направление крупного диаметра внутримышечных артерий не совпадает с направлением мышечных пучков длинной приводящей мышцы. Кровоснабжение короткой приводящей мышцы осуществляется ветвями запирающей и прободающих артерий, которые следуют к мышце со стороны ее передней поверхности, а также мышечными ветвями бедренной артерии. При этом более интенсивно снабжается артериями средняя треть короткой приводящей мышцы. В распределении артериальных ветвей в толще короткой приводящей мышцы преобладает рассыпной тип, артериальная сеть бедна анастомозами. Кровоснабжение верхней 1/3 большой приводящей мышцы осуществляется задней ветвью запирающей артерии, глубокой ветвью медиальной артерии, огибающей бедренную кость, мышечными ветвями бедренной артерии; средняя и нижняя трети мышцы – прободающими артериями. В 6 случаях в кровоснабжении нижней трети большой приводящей мышцы принимала участие медиальная верхняя коленная артерия. Вышеуказанные артерии вступают в толщу большой приводящей мышцы с передней и задней поверхности, при этом в ветвлении артерий выражена сегментарность. Самые крупные по своему диаметру артерии вступают в мышцу с передней поверхности, как правило, в области

средней трети мышечного брюшка. Основные артериальные стволы по отношению к направлению мышечных пучков расположены поперечно, а конечные разветвления артерий расположены в толще большой приводящей мышцы параллельно по направлению ее мышечных пучков. При этом ворота вхождения нервов и артерий располагаются на двух противоположных поверхностях большой приводящей мышцы. Места вхождения артерий в малой приводящей мышце располагаются со стороны передней поверхности мышечного брюшка. Места вхождения нервов в большую и малую приводящие мышцы не совпадают с местами вхождения артерий. Источниками кровоснабжения малой приводящей мышцы являются запирательная и прободающие артерии. Более крупные артериальные ветви входят в среднюю треть мышечного брюшка и разветвляются в поверхностном слое мышцы, а в глубоком слое ветвятся артериальные стволы 2-го и 3-го порядков. Направление внутримышечных артерий совпадает с направлением мышечных пучков малой приводящей мышцы. Артерии ветвятся в толще малой приводящей мышцы, как правило, по рассыпному типу. Источниками кровоснабжения гребенчатой мышцы являются запирательная и глубокая наружная половая артерии, а также ветви глубокой артерии бедра, как правило, поверхностная и восходящая ветви медиальной артерии, огибающей бедренную кость. Характерным является то, что направление артерий в толще гребенчатой мышцы совпадает с направлением нервов.

#### **Литература**

1. Khmara TV, Okrim II, Ryznychuk MO, Zamorskii II, Rak OM. Morphometric study of the skeleton of the thorax in human fetuses aged 7-10 months. Arch Balk Med Union. 2018, 53(4):497-505. doi: 10.31688/ABMU.2018.53.4.02

### **PECULIARITIES OF INTRAMUSCULAR BRANCHING OF ARTERIES IN THE THIGH MUSCLES OF MEDIAL GROUP IN HUMAN FETUSES**

**T.V. Khmara, P.V. Grygorieva, S.D. Novychenko**

*Bukovinian State Medical University,  
Chernovtsy, Teatral'naya Sq. 2, Ukraine*

The aim of the research was to study the intramuscular distribution of arteries in the muscles of the medial thigh in 4-10-month-old human fetuses. Specimens of the lower extremities of 42 human fetuses of 81.0-375.0 mm of crown-rump length were studied using macromicroscopic preparation, superficial staining of dissected vessels and nerves and morphometry [1].

It has been established that in human fetuses from 3 to 6 arterial trunks enter into the gracilis muscle from its posterior surface and lateral edge. In most fetuses, vessels and nerves go together, occasionally, they go separately usually at the level of the lower third of the gracilis muscle. The superficial and ascending branches of the medial artery, circumflexing the femur bone, the anterior branch of the obturator artery supply blood to the upper third of the gracilis muscle; and 2-3 muscular branches of the femoral artery participate in the blood sup-

ply to the middle third of the myogaster. The lower third of the gracilis muscle is supplied with blood by two or three muscular branches of the femoral artery, the descending genicular artery. In relation to the longitudinal axis of the gracilis muscle, the arterial trunks are located transversely; the arteries of the 2<sup>nd</sup> and 3<sup>rd</sup> orders are parallel to each other. The arteries in the gracilis muscle are branched by a mixed type. At the same time, segmentation is preserved in case of the intramuscular distribution of arteries in the gracilis muscle. There were no anastomoses detected between the intramuscular arteries in the gracilis muscle. The upper third of the adductor longus muscle is supplied with blood by the muscular branches from the obturator artery and the medial artery, circumflexing the femur; 1-3 muscular branches from the femoral artery and (or) the deep femoral artery take part in the blood supply to the middle and lower third of the muscle. In this case, intramuscular arterial anastomoses were observed in rare cases. The arteries approach the adductor longus muscle from the posterior (mainly branches of the obturator artery) and the anterior (indicated branches of the femoral artery system) surfaces, their entry points are located along the entire length of the muscle. The segmental type of blood supply prevails in this case. The middle third of the muscle is more intensively supplied with arteries in the adductor longus muscle. The direction of the large diameter of the intramuscular arteries does not coincide with the direction of the muscle bundles of the adductor longus muscle. The blood supply of the adductor brevis muscle is provided by the branches of the obturator and perforating arteries, which go to the muscle from its anterior surface, as well as by the muscular branches of the femoral artery. At the same time, the middle third of the adductor brevis muscle is supplied with arteries more intensively. The loose type prevails in the distribution of the arterial branches in the strata of the adductor brevis, the arterial network is poor in anastomoses. The blood is supplied to the upper third of the adductor magnus muscle by the posterior branch of the obturator artery, the deep branch of the medial artery, circumflexing the femur, the muscular branches of the femoral artery; to the middle and lower thirds of the muscle – by the perforating arteries. The medial superior genicular artery participated in the blood supply to the lower third of the adductor magnus muscle in 6 cases. The above arteries enter the strata of the adductor magnus muscle from the anterior and posterior surface, while branching of the arteries is characterized by segmentation. The largest in diameter arteries enter the muscle from the anterior surface, usually in the region of the middle third of the myogaster. The main arterial trunks are located transversely in relation to the direction of the muscle bundles, and the terminal branching of the arteries are located in the strata of the adductor magnus muscle parallel to the direction of its muscle bundles. At the same time, the hilum of entry of nerves and arteries is located on two opposite surfaces of the adductor magnus muscle. The entry points of the arteries in the adductor minimus muscle are located from the side of the anterior surface of the myogaster. The places where the nerves enter the adductors magnus and minimus do not coincide with the places where the arteries enter. Sources of blood supply to the adductor minimus muscle are

the obturator and perforating arteries. Larger arterial branches enter the middle third of the myogaster and branch out in the superficial layer of the muscle, and arterial trunks of the 2<sup>nd</sup> and 3<sup>rd</sup> orders branch out in the deep layer. The direction of the intramuscular arteries coincides with the direction of the muscle bundles of the adductor minimus muscle. The arteries branch out in the strata of the adductor minimus muscle, as a rule, according to the loose type. Sources of blood supply to the pectineus muscle are the obturator and deep external pudendal artery, as well as the branches of the deep femoral artery, as a rule, the superficial and ascending branches of the medial artery, circumflexing the femur bone. The coincidence of the direction of the arteries and nerves in the strata of the pectineus muscle is a characteristic feature.

#### References

- 2.Khmara TV, Okrim II, Ryznychuk MO, Zamorskii II, Rak OM. Morphometric study of the skeleton of the thorax in human fetuses aged 7-10 months. Arch Balk Med Union. 2018, 53(4):497-505. doi: 10.31688/ABMU.2018.53.4.02

## ОСОБЕННОСТИ ВНУТРИМЫШЕЧНОГО ВЕТВЛЕНИЯ НЕРВОВ В МЫШЦАХ ЗАДНЕЙ ГРУППЫ ГОЛЕНИ У ПЛОДОВ ЧЕЛОВЕКА

**Т.В. Хмара, Т.В. Комар, И.И. Заморский**

*Буковинский государственный медицинский университет,  
Черновцы, Театральная площадь, 2, Украина*

Поражения седалищного нерва и его ветвей обычно сопровождаются выраженными парезами или параличами мышц задней поверхности нижней конечности. Поэтому знание общих закономерностей внутримышечного распределения нервов в каждой мышце бедра и голени в различные периоды онтогенеза человека необходимо для проведения диагностических манипуляций и выполнения оперативных вмешательств.

Целью исследования было установление особенностей внутримышечного распределения нервов в мышцах задней группы голени у плодов 4-8 месяцев.

Изучение топографо-анатомических особенностей иннервации мышц задней группы голени проведено на препаратах нижних конечностей 38 плодов человека 81,0-310,0 мм теменно-копчиковой длины с помощью методов тонкого препарирования, инъекции сосудов и морфометрии [1].

В результате проведенного исследования установлено, что у плодов человека большеберцовый нерв в области подколенной ямки располагается поверхностно и латерально от подколенной вены, которая, в свою очередь, проходит латерально и кзади от подколенной артерии. Большеберцовый нерв под острым углом к подколенной мышце отдает четыре короткие, длиной от 1,5 мм до 4,2 мм, мышечные ветви. Места вхождения последних располагаются на границе перехода средней трети в нижнюю треть мышечного брюшка, при этом три ветви направляются к средней трети брюшка подколенной мышцы. На уровне нижнего угла подколенной ямки боль-

шеберцовый нерв делится на две ветви: переднюю и заднюю. Передняя ветвь большеберцового нерва распределяется в толще латеральной и медиальной частей камбаловидной мышцы, а в толщу задней поверхности мышцы погружается задняя ветвь большеберцового нерва.

Ворота внедрения мышечных ветвей от большеберцового нерва в медиальной головке икроножной мышцы располагаются на 2,5-4,0 мм выше ворот вхождения нервов латеральной головки. Направление внутримышечных нервных стволиков не совпадает с направлением мышечных пучков. При этом необходимо отметить, что по рассыпному типу делятся основные нервные стволики, а по магистральному – ветви, отошедшие от этих стволиков. Следует подчеркнуть, что в латеральной головке икроножной мышцы внутримышечных нервных связей значительно больше, чем в медиальной головке мышцы.

Из подколенной ямки большеберцовый нерв направляется в голеноподколенный канал, отверстие которого спереди ограничено подколенной мышцей, а сзади – слабо выраженной сухожильной дугой камбаловидной мышцы. В голеноподколенном канале большеберцовый нерв сопровождают задние большеберцовые артерия и вены. Мышечные ветви (1-4) от большеберцового нерва вступают в толщу задней большеберцовой мышцы со стороны ее дорсальной поверхности в области верхней трети мышечного брюшка. Направление внутримышечных нервных стволиков не совпадает с направлением внутримышечных артерий. От большеберцового нерва к длинному сгибателю большого пальца под острым углом подходят, как правило, две ветви со стороны задней поверхности мышечного брюшка. Ворота вхождения ветвей, которые следуют от большеберцового нерва к длинному сгибателю пальцев стопы, располагаются в области верхней трети мышечного брюшка. При этом, в толще мышечного брюшка направление внутримышечных нервов не совпадает с направлением внутримышечных артерий. Далее большеберцовый нерв направляется между латеральным краем длинного сгибателя пальцев и медиальным краем длинного сгибателя большого пальца стопы, достигает задней поверхности медиальной лодыжки, где разделяется на две конечные ветви: медиальный и латеральный подошвенные нервы.

Таким образом, нервы вступают в толщу большинства мышц задней группы голени под острым углом по отношению к длинной оси мышцы. Ворота вхождения нервов залегают чаще в области верхней трети мышечного брюшка, реже в области средней трети и, как исключение (подколенная мышца), в нижней трети. Ворота вхождения нервов могут располагаться как на передней, так и на задней поверхности мышечного брюшка. В камбаловидной мышце ворота вхождения нервов располагаются на двух противоположных поверхностях мышцы.

В толще мышц задней группы голени нервы располагаются неравномерно. В картине внутримышечного распределения нервов можно выделить рассыпную, магистральную и смешанную формы ветвления. Направ-



ление внутримышечных нервов, а также тип их ветвления в одной и той же мышце может быть различным.

### **Литература**

1. Khmara TV, Okrim II, Ryznychuk MO, Zamorskii II, Rak OM. Morphometric study of the skeleton of the thorax in human fetuses aged 7-10 months. Arch Balk Med Union. 2018, 53(4):497-505. doi: 10.31688/ABMU.2018.53.4.02

## **PECULIARITIES OF INTRAMUSCULAR BRANCHING OF NERVES IN THE LOWER LEG MUSCLES OF THE POSTERIOR GROUP IN HUMAN FETUSES**

**T.V. Khmara, T.V. Komar, I.I. Zamorskii**

*Bukovinian State Medical University,  
Chernovtsy, Teatral'naya Sq. 2, Ukraine*

Lesions of the sciatic nerve and its branches are usually accompanied by severe paresis or paralysis of the muscles of the posterior surface of the lower limb. Therefore, knowledge of the general patterns of intramuscular distribution of nerves in each muscle of the thigh and tibia at different periods of human ontogenesis is necessary for diagnostic manipulations and surgical interventions.

The study aimed at establishing the peculiarities of the intramuscular distribution of nerves in the muscles of the posterior group of the lower leg in fetuses aged 4-8 months.

The study of topographic and anatomical peculiarities of the innervation of the muscles of the posterior group of the lower leg was carried out on specimens of the lower extremities of 38 human fetuses of 81.0-310.0 mm of crown-rump length using methods of fine dissection, vascular injection and morphometry [1].

The study resulted in the following: in human fetuses the tibial nerve in the popliteal fossa region is located superficially and laterally from the popliteal vein, which, in its turn, passes laterally and posteriorly from the popliteal artery. The tibial nerve at an acute angle to the popliteal muscle gives off four short muscular branches 1.5-4.2 mm in length. The places of entrance of the latter are located on the border of the transition of the middle third to the lower third of the myogaster, while the three branches go to the middle third of the myogaster of the popliteal muscle. At the level of the inferior angle of the popliteal fossa, the tibial nerve is divided into two branches: the anterior and posterior. The anterior branch of the tibial nerve is distributed in the strata of the lateral and medial parts of the soleus muscle, and the posterior branch of the tibial nerve buries into the strata of the posterior surface of the muscle.

The entrance places of the muscular branches from the tibial nerve in the medial head of the gastrocnemius muscle are located 2.5-4.0 mm above the entrance hilum of the nerves of the lateral head. The direction of the intramuscular nerve trunks does not coincide with the direction of the muscle bundles. It should be noted that the main nerve trunks are divided according to the loose type, and the branches arising from these trunks are divided according to the main one. It should be emphasized that in the lateral head of the gastrocnemius muscle there are much more intramuscular neural connections than in the medial head of the muscle.

From the popliteal fossa, the tibial nerve proceeds to the cruropopliteal canal, the opening of which is limited by the popliteal muscle from the front, and by weakly pronounced tendinous arch of the soleus muscle from behind. The tibial nerve is accompanied by posterior tibial arteries and veins in the cruropopliteal canal. Muscular branches (1-4) from the tibial nerve enter the strata of the posterior tibial muscle from its dorsal surface in the upper third of the myogaster. The direction of intramuscular nerve trunks does not coincide with the direction of intramuscular arteries. From the tibial nerve to the long flexor of the big toe at an acute angle, two branches usually arise from the posterior surface of the myogaster. The hilum of the entry of the branches passing from the tibial nerve to the long flexor of the toes is located in the upper third of the myogaster. At the same time, in the strata of the myogaster the direction of the intramuscular nerves does not coincide with the direction of the intramuscular arteries. Further on, the tibial nerve goes between the lateral edge of the long flexor of the toes and the medial edge of the long flexor of the big toe, reaching the posterior surface of the medial ankle, where it is divided into two terminal branches: the medial and lateral plantar nerves.

Therefore, the nerves enter the strata of most of the muscles of the posterior group of the lower leg at an acute angle relative to the long axis of the muscle. Places of entry of nerves occur more often in the upper third of the myogaster, less often in the region of the middle third and, as an exception (popliteal muscle), in the lower third. Hilum of nerve entrance can be located both on the anterior and posterior surfaces of the myogaster. In the soleus muscle, the nerve entry hilum is located on two opposite muscle surfaces.

In the strata of the muscles of the posterior group of the lower leg, the nerves are unevenly distributed. Loose, trunk and mixed forms of branching can be singled out in the picture of the intramuscular distribution of nerves. The direction of the intramuscular nerves, as well as the type of their branching in the same muscle can be different.

### References

- 2.Khmara TV, Okrim II, Ryznychuk MO, Zamorskii II, Rak OM. Morphometric study of the skeleton of the thorax in human fetuses aged 7-10 months. Arch Balk Med Union. 2018, 53(4):497-505. doi: 10.31688/ABMU.2018.53.4.02

## **ОСОБЕННОСТИ КРОВΟΣНАБЖЕНИЯ И ИННЕРВАЦИИ МЫШЦ ПЛЕЧЕВОГО ПОЯСА У ПЛОДОВ ЧЕЛОВЕКА**

**Т.В. Хмара, К.З. Шевчук**

*Буковинский государственный медицинский университет,  
Черновцы, Театральная площадь, 2, Украина*

Развитие фетальной хирургии требует от анатомов всесторонних исследований закономерностей строения и становления кровоснабжения и иннервации органов и структур различных систем, в том числе мышц верхней конечности, в плодном периоде онтогенеза человека. Расширение показаний к хирургическим вмешательствам на мышцах плечевого пояса обу-

славливает необходимость целенаправленного изучения топографо-анатомических особенностей их кровоснабжения и иннервации у плодов человека.

Макроскопическое исследование проведено на препаратах 17 плодов человека 81,0-230,0 мм теменно-копчиковой длины с помощью методов тонкого препарирования, инъекции сосудов и морфометрии [1].

В результате проведенного исследования установлено, что основным источником кровоснабжения надостной мышцы является надлопаточная артерия, которая разветвляется в пределах верхней трети реберной и задней поверхностей лопатки. Следует отметить, что в области медиального края лопатки 1-2 ветви надлопаточной артерии анастомозируют с ветвями поперечной артерии шеи. В 6 наблюдениях ствол надлопаточной артерии достигал подостной ямки, а в 4 случаях ствол артерии заканчивался в пределах надостной ямки, а в подостную ямку следовала тонкая соединительная ветвь, которая анастомозировала с артерией, огибающей лопатку. Надлопаточный нерв проходит через вырезку лопатки в надостную ямку и располагается под надостной мышцей, перпендикулярно ходу ее пучков. Далее надлопаточный нерв проходит под нижней поперечной связкой лопатки и достигает подостной ямки, разветвляясь в подостной мышце. Последняя преимущественно кровоснабжается ветвями артерии, огибающей лопатку, которые анастомозируют с ветвями надлопаточной артерии, поперечной артерии шеи и задней артерией, огибающей плечевую кость. В 7 наблюдениях мы обнаружили рассыпной тип ветвления артерии, огибающей лопатку. При этом, как правило, 3-4 ветви от артерии, огибающей лопатку направляются к реберной поверхности лопатки и 1-2 ветви – к ее задней поверхности. Дельтовидная мышца кровоснабжается грудноакромиальной артерией и задней артерией, огибающей плечевую кость. В пределах четырехстороннего отверстия от задней артерии, огибающей плечевую кость отходят 1-3 ветви, которые следуют к задним отделам дельтовидной мышцы. Подмышечный нерв выходит через четырехстороннее отверстие под дельтовидной мышцей вместе с задней артерией, огибающей плечевую кость. В области четырехстороннего отверстия от подмышечного нерва отходят 1-3 мышечные ветви, которые следуют к задним отделам дельтовидной мышцы, параллельно ходу ее мышечных волокон. Следует отметить, что основной ствол подмышечного нерва на передней поверхности хирургической шейки плечевой кости делится на 2-4 конечные ветви, из которых 1-3 являются мышечными и одна ветвь – суставной. Мышечные (1-2) ветви подмышечного нерва также обеспечивают иннервацию малой круглой мышцы. В кровоснабжении малой круглой мышцы принимают участие, как правило, одна, реже 2 ветви от артерии, огибающей лопатку, задней и передней артерий, огибающих плечевую кость, поперечной артерии шеи, которые также анастомозируют между собой.

К передней поверхности подлопаточной мышцы следуют 4-7 ветвей от артерии, огибающей лопатку. С последней и поперечной артерией шеи

анастомозируют 2-3 ветви надлопаточной артерии. От подлопаточной артерии к одноименной мышце преимущественно отходят 1-2 ветви, которые анастомозируют с ветвями надлопаточной артерии, артерии, огибающей лопатку и поперечной артерии шеи. Следует подчеркнуть, что 1-3 ветви грудноакромиальной артерии анастомозируют с поперечной артерией шеи и артерии, огибающей лопатку. 1-2 ветви от передней и задней артерий, огибающих плечевую кость анастомозируют между собой, а также с надлопаточной и подлопаточной артериями. Задняя поверхность подлопаточной мышцы кровоснабжается 2-4 ветвями артерии, огибающей лопатку, которые анастомозируют с ветвями надлопаточной артерии, что следуют каудально от надостной ямки в подлопаточную ямку по задней поверхности шейки лопатки. В 6 случаях обнаружен анастомоз в области над- и подостных ямок. Подлопаточный нерв в области латерального угла лопатки проникает в подлопаточную ямку, 2-3 ветвями спускается по передней поверхности одноименной мышцы, иннервируя ее и большую круглую мышцу. Последняя преимущественно кровоснабжается подлопаточной артерией. Также в кровоснабжении большой круглой мышцы принимают участие ветви задней и передней артерий, огибающих плечевую кость, грудноакромиальной артерии, поперечной артерии шеи, артерии, огибающей лопатку, которые анастомозируют между собой.

#### **Литература**

1. Khmara TV, Okrim II, Ryznychuk MO, Zamorskii II, Rak OM. Morphometric study of the skeleton of the thorax in human fetuses aged 7-10 months. Arch Balk Med Union. 2018, 53(4):497-505. doi: 10.31688/ABMU.2018.53.4.02

## **PECULIARITIES OF BLOOD SUPPLY AND INNERVATION OF THE MUSCLES OF THE SHOULDER GIRDLE IN HUMAN FETUSES**

**T.V. Khmara, K.Z. Shevchuk**

*Bukovinian State Medical University,  
Chernovtsy, Teatral'naya Sq. 2, Ukraine*

The development of fetal surgery requires from anatomists comprehensive research of structure patterns and development of blood supply and innervation of organs and structures of various systems, including the muscles of the upper extremity, in the fetal period of human ontogenesis. The expansion of indications for surgical interventions on the muscles of the shoulder girdle necessitates a targeted study of topographic and anatomical features of their blood supply and innervation in human fetuses.

Macroscopic examination was carried out on the specimens of 17 human fetuses of 81,0-230,0 mm of crown-rump length using the methods of thin preparation, vascular injection and morphometry [1].

As a result of the study, it was found that the main source of blood supply to the supraspinatus muscle is the suprascapular artery, which branches within the upper third of the costal and posterior surfaces of the scapula. It should be noted that in the region of the medial edge of the scapula 1-2 branches of the

suprascapular artery are anastomosed with branches of the transverse cervical artery. The trunk of suprascapular artery reached the infraspinatus fossa in 6 cases, in 4 observations the arterial trunk terminated within the suprascapular fossa and the thin connective branch, anastomosing with the artery which circumflexed scapula, entered the infraspinatus fossa. Suprascapular nerve passes through the scapula incisure to the suprascapular fossa and is located under the suprascapular muscle, perpendicular to the direction of its bundles. After that the suprascapular nerve passes under the inferior transverse ligament of the scapula and reaches the infraspinatus fossa, branching in the infraspinatus muscle. The latter is supplied with blood mainly by the branches of the artery, circumflexing the scapula, which anastomose with the branches of the suprascapular artery, transverse cervical artery and the posterior artery, circumflexing the humerus. In 7 cases, a loose type of branching of the artery, circumflexing the scapula, was revealed. In this case, as a rule, 3-4 branches from the artery circumflexing the scapula are directed to the costal surface of the scapula and 1-2 branches — to its posterior surface. The deltoid muscle is supplied with blood by the thoracoacromial artery and the posterior artery, circumflexing the humerus. 1-3 branches, travelling to the posterior regions of the deltoid muscle, arise within a four-sided opening from the posterior artery, circumflexing the humerus. Axillary nerve arises through the four-sided opening under the deltoid muscle together with the posterior artery, circumflexing the humerus. In the region of the four-sided opening from the axillary nerve there arise 1-3 muscular branches, which go to the posterior portions of the deltoid muscle, parallel to the direction of its muscle fibers. It should be noted that on the anterior surface of the surgical neck of the humerus the main trunk of the axillary nerve is divided into 2-4 terminal branches, 1-3 of which are muscular and one branch is articular. The muscular (1-2) branches of the axillary nerve also provide innervation of the teres minor muscle. Teres minor muscle is usually supplied with blood by one, rarely 2 branches from the artery circumflexing the scapula, the posterior and anterior arteries circumflexing the humerus, the transverse cervical artery, which also anastomose with each other.

4-7 branches from the artery circumflexing the scapula go to the anterior surface of the subscapularis muscle. The latter and the transverse cervical artery anastomose with 2-3 branches of the suprascapular artery. From the subscapular artery to the muscle of the same name, 1-2 branches mainly arise, which anastomose with the branches of the suprascapular artery, the artery circumflexing the scapula and the transverse cervical artery. It should be emphasized that 1-3 branches of the thoracoacromial artery anastomose with the transverse cervical artery and the artery circumflexing scapula. 1-2 branches from the anterior and posterior arteries, circumflexing the humerus anastomose between them and with the suprascapular and subscapular arteries. The posterior surface of the subscapularis muscle is supplied with blood by 2-4 branches of the artery, circumflexing the scapula, which anastomose with branches of the suprascapular artery, passing caudally from the suprascapular fossa to the subscapular fossa along the

posterior surface of the neck of the scapula. In 6 cases, anastomosis was found in the region of supra- and infraspinatus fossa. The subscapular nerve in the lateral angle of the scapula enters the subscapular fossa, 2-3 branches of it descend along the anterior surface of the muscle of the same name, innervating it and the teres major muscle. The latter is mainly supplied with blood by the subscapular artery. The teres major muscle is also supplied with blood by the branches of the anterior and posterior arteries, circumflexing the humerus, thoracoacromial artery, transverse cervical artery, artery circumflexing the scapula, that anastomose between them.

### References

2. Khmara TV, Okrim II, Ryznychuk MO, Zamorskii II, Rak OM. Morphometric study of the skeleton of the thorax in human fetuses aged 7-10 months. Arch Balk Med Union. 2018, 53(4):497-505. doi: 10.31688/ABMU.2018.53.4.02

## ОБ ОБЩНОСТИ МЕХАНИЗМОВ ПЕРЕХОДА В СОСТОЯНИЕ ХОЛОДОВОГО АНАБИОЗА В БИООБЪЕКТАХ РАЗЛИЧНОГО УРОВНЯ ОРГАНИЗАЦИИ

**А.Т. Ходько**

*Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков, ул. Переяславская, 23, Украина*

Состояние холодового анабиоза, очевидным образом, приводит к обратимой остановке всех видов биологической подвижности. Физико-химические процессы, происходящие при этом, в зародышевой растительной ткани – меристеме описаны в работе [Khodko]. Ведущим фактором, приводящим к обратимой остановке жизнедеятельности признан критический фазовый переход типа жидкость–жидкость (PTL-L). Критическое состояние вещества характеризуется проявлением ряда необычных для других состояний феноменов называемых – критические явления. К ним, в частности, относится резкое увеличение светорассеяния, устремление теплоемкости и теплопроводности к бесконечно большому значению, резкое замедление взаимной диффузии компонентов и др. В результате такого фазового превращения в цитоплазме самопроизвольно формируется дисперсная система – высококонцентрированная эмульсия, резко повышающая ее вязкость. Это приводит к скачкообразной остановке внутриклеточного движения веществ, что несовместимо с жизнедействующим состоянием биосистемы. При охлаждении до криогенных температур цитоплазма переходит в стеклообразное состояние, и клетка приобретает свойства твердого тела. Фазовый переход носит обратимый характер, и после нагревания цитоплазма вновь приобретает однофазную структуру.

Ранее наличие PTL-L в почках тополя, находящихся в состоянии зимнего покоя, было показано методом электронной микроскопии [Hirsh].

Заключение о типе фазового перехода в биологических объектах при охлаждении делалось на основе наблюдения критической опалесценции,

приводящей к резкому их затемнению, и дополнялось наблюдением в поляризованном свете при помощи микроскопа МИН-8. При скрещенном положении поляризатора и анализатора наблюдается свечение кристаллических структур, обладающих свойством оптической анизотропии и вращающих плоскость поляризации. В отличие от них аморфные тела оптически изотропны и в аналогичных условиях не дают свечения.

В работе изучалось фазовое поведение при охлаждении в струе паров жидкого азота следующих биообъектов:

1 - тихоходок в 20%-ном водном растворе сахарозы;

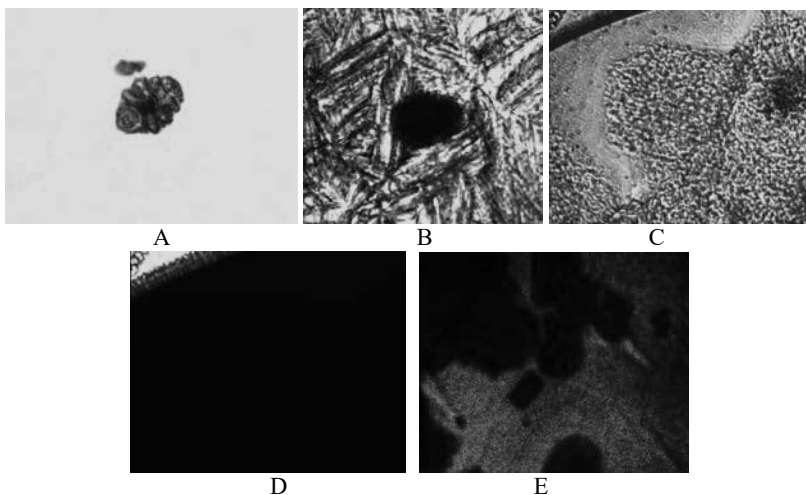
2 - меристемы чеснока;

3 - эритроцитов донорской крови, с глицеринсодержащим криоконсервантом ЦНИИГПК-11<sub>5</sub>,

На рис. 1 показан внешний вид биообъектов при комнатной температуре и при охлаждении парами жидкого азота.

При наблюдении в скрещенном положении поляридов все перечисленные биообъекты в охлажденном состоянии не давали свечения, что указывало на отсутствие процесса кристаллизации внутри них.

После их отогрева от температуры жидкого азота наблюдалось возобновление процессов жизнедеятельности, подтверждавших наличие состояния анабиоза. Функциональная полноценность эритроцитов, криоконсервируемых данным методом, подтверждается многолетним опытом их клинического использования.



**Рис. 1.** Внешний вид биологических объектов. Увеличение  $\times 80$ . А – тихоходка при комнатной температуре. В – критическая опалесценция в теле тихоходки при охлаждении. С – меристема чеснока при комнатной температуре. Д – критическая опалесценция в ткани меристемы при охлаждении. Е – начальный этап критической опалесценции в эритромеристе.

Полученные в работе данные указывают на общность механизмов перехода в состояние холодового анабиоза живых систем различного уровня организации – клеточной взвеси, плотной зародышевой ткани растения и целостного организма – тихоходки.

### **Литература**

Khodko AT, Lysak YuS. Physicochemical processes in embryonic plant tissue during the transition to the state of cold anabiosis and storage at liquid nitrogen temperature. *Low Temperature Physics*. 2017; 43: 1196-2000. DOI: 10.1063/1.5008412.

Hirsh A., Bent T., Erbe E. . Localization and characterization of intracellular liquid-liquid phase separations in deeply frozen *populus* using electron microscopy, dynamic mechanical analysis and differential scanning calorimetry // *Thermochemica Acta*, 155(1989) 163-186.

## **ABOUT SIMILARITY OF THE MECHANISMS OF TRANSITION TO THE CONDITION OF COLD ANABIOSIS IN BIOOBJECTS OF DIFFERENT LEVEL OF ORGANIZATION**

**A.T. Khodko**

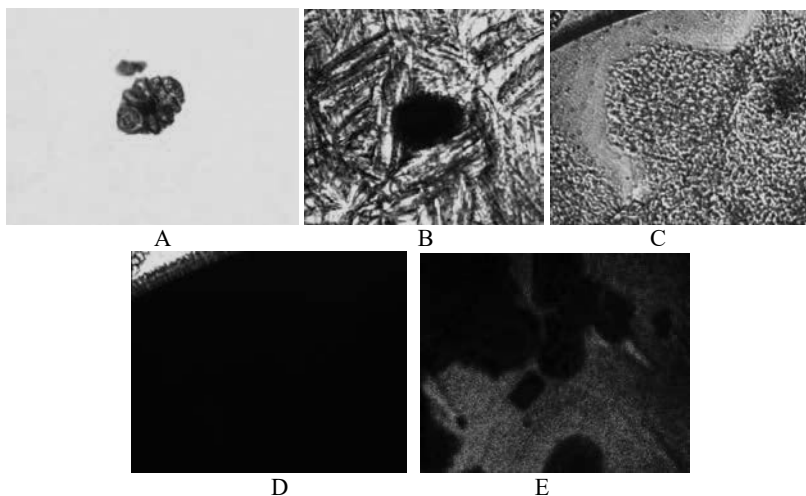
*Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine, of the National Academy of Sciens of Ukraine 23, Pereyaslavskaya str., 61015 Kharkiv, Ukraine*

The state of cold anabiosis, obviously, leads to a reversible arrest of all types of biological motility. The physicochemical processes taking place in this case in the germinal plant tissue, the meristem, were described [Khodko]. The critical liquid-liquid phase transition (PTL-L) was recognized as a leading factor in a reversible arrest of life activity. The critical state of matter is characterized by the manifestation of the number of phenomena, unusual for other states, called critical phenomena [Anisimov]. These include, in particular, a sharp increase in light scattering, the aspiration of heat capacity and thermal conductivity to an infinitely large value, a sharp slowdown in the mutual diffusion of components, etc. As a result of this phase transformation, a dispersion system spontaneously forms in the cytoplasm, i.e. a highly concentrated emulsion that dramatically increases its viscosity. This leads to an abrupt stopping of the intracellular movement of substances, which is incompatible with the vital state of the biosystem. When cooled down to cryogenic temperatures, the cytoplasm goes into a glassy state, and the cell acquires the properties of a solid. The phase transition is reversible, and after heating, the cytoplasm again acquires a single-phase structure.

Previously, the presence of PTL-L in the poplar buds, in a state of winter dormancy, was shown by electron microscopy [Hirsh].

The conclusion about the type of phase transition in biological objects during cooling was made on the basis of observation of critical opalescence, leading to their abrupt darkening, and was complemented by observation in polarized light using a MIN-8 microscope. When the position of the polarizer and analyzer is crossed, the luminescence of crystalline structures with the pro-





**Fig. 1.** The appearance of biological objects. Magnification  $\times 80$ . A – water bear (Tardigrada) at a room temperature. B – critical opalescence in the body of the slow moving during cooling. C – the garlic meristem at a room temperature. D – critical opalescence in the tissue of the meristem during cooling. E – the initial stage of critical opalescence in the erythromass.

perty of optical anisotropy and rotating the polarization plane is observed. In contrast, amorphous bodies are optically isotropic and in similar conditions do not produce luminescence.

In the work, the phase behavior was studied when cooling in a stream of liquid nitrogen vapor of the following biological objects:

- 1 – water bear (Tardigrada) in a 20% aqueous solution of sucrose;
- 2 – garlic meristem;
- 3 – erythrocytes of donor blood, with glycerol-containing preservative TsNIIGPK-115.

The fig. 1 shows the appearance of biological objects at room temperature and when cooled with vapor of liquid nitrogen.

When observed in the crossed position of polaroids, all the listed biological objects in a cooled showed no a luminescence, thereby indicating the absence of a crystallization process inside them.

After their warming up from the temperature of liquid nitrogen, the recovery of vital processes was observed, confirming the presence of anabiosis. The functional integrity of the erythrocytes cryopreserved by this method is confirmed by many years of experience with their clinical use.

Our findings indicate the commonality of the mechanisms of transition to the state of cold anabiosis of living systems of various levels of organization, i.e. cell suspension, dense germinal tissue of a plant, and the whole organism — water bear (Tardigrada).

## References

- Khodko AT, Lysak YuS. Physicochemical processes in embryonic plant tissue during the transition to the state of cold anabiosis and storadge at liquid nitrogen temperature. *Low Temperature Physics*. 2017; 43: 1196-2000. DOI: 10.1063/1.5008412.
- Anisimov MA. Critical phenomenons in liquids and liquid cristals. Gordon & Breach Science Publishers; 1991. 431 p. USA.
- Hirsh A., Bent T., Erbe E. Localization and characterization of intracellular liquid-liquid phase separations in deeply frozen populus using electron microscopy, dynamic mechanical analysis and differential scanning calorimetry // *Thermochemica Acta*, 155(1989) 163-186.

### **NFAT-ЗАВИСИМАЯ РЕГУЛЯЦИЯ ЭКСПРЕССИИ МИОЗИНОВ ПРИ МЕХАНИЧЕСКОЙ ОПОРНОЙ СТИМУЛЯЦИИ НА РАННИХ СРОКАХ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ РАЗГРУЗКИ**

**К. А. Шарло, И. И. Парамонова, С. А. Тыганов,  
О.В. Туртикова, Б.С. Шенкман**

*Государственный научный центр российской федерации Институт  
медико-биологических проблем РАН, Москва, Россия*

Широко известно, что функциональная разгрузка приводит к трансформации мышечных волокон медленного типа в «быстрые» волокна и соответствующему изменению относительных уровней экспрессии различных изоформ тяжелых цепей миозина (ТЦМ) [1]. Также при моделировании гравитационной разгрузки в земных условиях (модели «сухой» иммерсии и вывешивания) было обнаружено практически полное отсутствие нервно-мышечной активности (ЭМГ) в камбаловидных мышцах [2] Было показано, что восстановление опорной афферентации путем механической стимуляции опорных зон стопы (МСО) на протяжении космического полета у человека и при моделировании гравитационной разгрузки в земных условиях ведет к увеличению уровня нервно-мышечной активности мышц нижних конечностей [3,4].

Поскольку функционирование сигнального пути кальцинейрин/NFATc1, регулирующего экспрессию медленной изоформы ТЦМ (ТЦМ $\beta$ ), зависит от уровня активности скелетной мышцы, мы предположили, что механическая опорная стимуляция может привести к активации сигнального пути кальцинейрин/NFATc1 за счет увеличения уровня нервно-мышечной активности камбаловидной мышцы, что может предотвратить сдвиг миозинового фенотипа в «быструю» сторону. Таким образом, целью нашей работы стало исследование механизмов, регулирующих экспрессию ТЦМ $\beta$ , при механической опорной стимуляции в условиях моделируемой гравитационной разгрузки.

Самцы крыс Вистар были разделены на шесть групп по 8 животных в каждой: две группы виварного контроля (С), группы, подвергнутые раз-

грузке задних конечностей на протяжении 1 дня (1HS) и 3 дней (3HS), и группы разгрузки, сопровождавшейся опорной стимуляцией 1HS+МСО; 3HS+МСО. Животные из групп опорной стимуляции в течение 4-х часов в день на протяжении эксперимента получали опорную стимуляцию стоп по схеме, симулирующей нормальную ходьбу животного (давление на стопу величиной 104 мм рт. ст. с частотой 2 Гц и продолжительностью 250 мс в течение 10 минут с последующим 20-минутным периодом отдыха).

Данные, полученные в ходе выполнения работы, хорошо согласуются с последними исследованиями, показывающими быстрое падение экспрессии мРНК ТЦМ I( $\beta$ ) уже после первых суток моделируемой гравитационной разгрузки, сохранявшееся также и после третьих суток [5-7]. Снижение уровня экспрессии мРНК ТЦМ I( $\beta$ ) сопровождалось снижением содержания NFATc1 в ядерной фракции камбаловидных мышц после первых суток вывешивания и активацией сигнальных молекул, суппрессирующих сигнальный каскад кальцинейрин/NFATc1. В ходе исследования мы обнаружили поддержание и даже увеличение уровня экспрессии мРНК ТЦМ I( $\beta$ ) в камбаловидных мышцах крыс, подвергнутых опорной стимуляции наряду с разгрузкой, при этом данный эффект сопровождался предотвращением выхода NFATc1 из ядра, предотвращением роста экспрессии мРНК кальсарцина-2 и предотвращением дефосфорилирования GSK-3 $\beta$ .

Таким образом, нервно-мышечная активность, связанная с опорной афферентацией, подавляет механизмы, приводящие к выходу NFATc1 из ядра, и обеспечивает экспрессию ТЦМ I( $\beta$ ) в камбаловидной мышце.

### Литература

1. Templeton, G.H.; Sweeney, H.L.; Timson, B.F.; Padalino, M.; Dudenhoefter, G.A. Changes in fiber composition of soleus muscle during rat hindlimb suspension. *J Appl Physiol* (1985) **1988**, 65, 1191-1195, doi:10.1152/jappl.1988.65.3.1191.
2. Kozlovskaya, B.S.S.I.B. Cellular Responses of Human Postural Muscle to Dry Immersion. *Front. Physiol.* **2019**, doi: 10.3389/fphys.2019.00187, doi:doi: 10.3389/fphys.2019.00187.
3. Grigor'ev, A.I.; Kozlovskaya, I.B.; Shenkman, B.S. [The role of support afferents in organisation of the tonic muscle system]. *Russ Fiziol Zh Im I M Sechenova* **2004**, 90, 508-521.
4. Gazonko, O.G.; Grigoriev, A.I.; Kozlovskaya, I.B. Mechanisms of acute and chronic effects of microgravity. *Physiologist* **1987**, 30, S1-5.
5. Lomonosova, Y.N.; Turtikova, O.V.; Shenkman, B.S. Reduced expression of MyHC slow isoform in rat soleus during unloading is accompanied by alterations of endogenous inhibitors of calcineurin/NFAT signaling pathway. *J Muscle Res Cell Motil* **2016**, 37, 7-16, doi:10.1007/s10974-015-9428-y.
6. Giger, J.M.; Bodell, P.W.; Zeng, M.; Baldwin, K.M.; Haddad, F. Rapid muscle atrophy response to unloading: pretranslational processes involving MHC and actin. *J Appl Physiol* (1985) **2009**, 107, 1204-1212, doi:10.1152/japplphysiol.00344.2009.
7. Vilchinskaya, N.A.; Mochalova, E.P.; Nemirovskaya, T.L.; Mirzoev, T.M.; Turtikova, O.V.; Shenkman, B.S. Rapid decline in MyHC I(beta) mRNA expression in rat soleus during hindlimb unloading is associated with AMPK dephosphorylation. *J Physiol* **2017**, 595, 7123-7134, doi:10.1113/JP275184.

# NFAT-DEPENDENT REGULATION OF SLOW MYOSIN EXPRESSION DURING PLANTAR MECHANICAL STIMULATION ON EARLY STAGES OF FUNCTIONAL UNLOADING

K. A. Sharlo, I. I. Paramonova, S. A. Tyganov,  
O.V. Turtikova, B.S. Shenkman

*Institute of Biomedical Problems, RAS, Moscow, Russia*

It is widely known that functional unloading leads to slow-to-fast fiber-type transformation and correspondent changes in relative expression of different myosin heavy chain isoforms (MyHCs) [1]. It was observed that gravitational unloading during simulated microgravity in ground-based studies (“dry” immersion and hindlimb suspension) lead to are accompanied with the almost complete disappearance of the neuromuscular (EMG) activity of the anti-gravitational soleus muscle [2]. It was demonstrated that increasing sensory input by performing plantar mechanical stimulation (PMS) to the soles of the feet during space missions in humans and in ground-based experiments leads to an increase of neuromuscular activation of the lower limb muscles [3,4].

Calcineurin/NFATc1 is the central signaling pathway regulating slow MyHC expression and its functioning depends on muscle activity. We hypothesized that PMS may affect the calcineurin/NFATc1 signaling cascade by increasing m soleus neuromuscular activation, which may partially prevent unloading-induced MyHC I( $\beta$ ) decrease and slow-to-fast myosin shift. Thus, our study aimed to analyze the states of the calcineurin/NFATc1 pathway under the conditions of plantar mechanical stimulation while rat hindlimb unloading.

Male Wistar rats were randomly assigned to vivarium control groups (C), 1 day unloading (1HS), 3 days unloading (3HS), 1 day unloading with PMS (1HS+PMS) and 3 days unloading with PMS (3HS+PMS). The pressure stimulation protocol mimicked the normal animal walking (104 mmHg pressure, 4 Hz frequency and 250 ms signal duration) for a total of 20 min followed by a 10-min rest interval for 4 hours.

We found that both 1 day and 3 days of unloading caused the decrease of MyHC I( $\beta$ ) mRNA expression, that correspond to the earlier data [5-7]. MyHC I( $\beta$ ) mRNA decrease after the 1 day of unloading was accompanied by NFATc1 decrease in soleus nuclear fraction, and the activation of endogenous NFATc1 inhibitors. these effects of unloading were prevented by PMS. The 3 days of unloading also caused the increase of calsarcin-2 (myozenin I) expression, which was found to be the endogenous calcineurin inhibitor. The level of calsarcin-2 expression in 3HS+PMS group did not differ from the control group.

We found out that PMS supports and even increases MyHC I( $\beta$ ) expression in rat soleus muscles, and this effect was accompanied by prevention of NFATc1 nuclear export, prevention of calsarcin-2 expression increase and prevention of GSK-3 $\beta$  dephosphorylation.

Therefore, we found that plantar mechanical stimulation upregulates calcineurin/NFATc1 signaling pathway and prevents unloading-induced MyHC I( $\beta$ ) decrease.

## References

1. Templeton, G.H.; Sweeney, H.L.; Timson, B.F.; Padalino, M.; Dudenhoefter, G.A. Changes in fiber composition of soleus muscle during rat hindlimb suspension. *J Appl Physiol* (1985) **1988**, 65, 1191-1195, doi:10.1152/jappl.1988.65.3.1191.
2. Kozlovskaya, B.S.S.I.B. Cellular Responses of Human Postural Muscle to Dry Immersion. *Front. Physiol.* **2019**, doi: 10.3389/fphys.2019.00187, doi:doi: 10.3389/fphys.2019.00187.
3. Grigor'ev, A.I.; Kozlovskaya, I.B.; Shenkman, B.S. [The role of support afferents in organisation of the tonic muscle system]. *Ross Fiziol Zh Im I M Sechenova* **2004**, 90, 508-521.
4. Gzenko, O.G.; Grigoriev, A.I.; Kozlovskaya, I.B. Mechanisms of acute and chronic effects of microgravity. *Physiologist* **1987**, 30, S1-5.
5. Lomonosova, Y.N.; Turtikova, O.V.; Shenkman, B.S. Reduced expression of MyHC slow isoform in rat soleus during unloading is accompanied by alterations of endogenous inhibitors of calcineurin/NFAT signaling pathway. *J Muscle Res Cell Motil* **2016**, 37, 7-16, doi:10.1007/s10974-015-9428-y.
6. Giger, J.M.; Bodell, P.W.; Zeng, M.; Baldwin, K.M.; Haddad, F. Rapid muscle atrophy response to unloading: pretranslational processes involving MHC and actin. *J Appl Physiol* (1985) **2009**, 107, 1204-1212, doi:10.1152/jappphysiol.00344.2009.
7. Vilchinskaya, N.A.; Mochalova, E.P.; Nemirovskaya, T.L.; Mirzoev, T.M.; Turtikova, O.V.; Shenkman, B.S. Rapid decline in MyHC I(beta) mRNA expression in rat soleus during hindlimb unloading is associated with AMPK dephosphorylation. *J Physiol* **2017**, 595, 7123-7134, doi:10.1113/JP275184.

## ХАРАКТЕРИСТИКИ ТОЧНОСТНОГО УПРАВЛЕНИЯ ДВИЖЕНИЯМИ В УСЛОВИЯХ МЕНЯЮЩЕЙСЯ ГРАВИТАЦИОННОЙ СРЕДЫ

**Т.А. Шигуева, В.В. Китов, Е.С. Томиловская, И.Б. Козловская**  
*Государственный научный центр Российской Федерации – Институт  
медико-биологических проблем РАН, Хорошевское ш., 76А, Москва,  
123007, Россия*

Исследования в условиях «сухой» иммерсии (СИ) показали, что опорная разгрузка сопровождается развитием гипогравитационного двигательного синдрома, проявляющегося в атонии и атрофии постуральной мускулатуры, гиперрефлексии спинальных рефлексов, дискоординации произвольных движений, нарушениях позы и локомоций (Kozlovskaya et al., 1987-2008; Miller et al., 2004; Shenkman et al., 2003; Saenko et al., 2007, Shigueva et al., 2015).

Цель настоящей работы составляло исследование влияний микрогравитации характеристики точностных произвольных движений.

Исследование выполнено с участием 12-ти испытуемых добровольцев, подвергавшихся 5-ти и 7-ми суточному воздействию СИ, являющейся наиболее адекватной наземной моделью физиологических эффектов микрогравитации. Для исследования точностных произвольных движений использовали задачу градации усилий при выполнении односу-

ставных изометрических движений плантарной флексии. Двигательной задачей испытуемых служило различение мышечных усилий при выполнении последовательно нарастающих усилий от минимального до максимального с минимальным различием в интенсивности соседних движений. При выполнении испытуемым следующей задачи поддержания слабого мышечного напряжения (до 7% от максимальной произвольной силы) также стерильными концентрическими игольчатыми электродами регистрировали активность двигательных единиц (ДЕ).

Результаты исследований показали, что пребывание в условиях «сухой» иммерсии, не нарушая координационной структуры и возможности выполнения двигательной задачи, достоверно снижает точность произвольных движений и сопровождается изменением порядка рекрутирования мотонейронов мышц разгибателей голени при выполнении произвольных двигательных задач поддержания небольшого усилия.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18-315-00287 мол\_а.

## **CHARACTERISTICS OF PRECISE MOVEMENT CONTROL UNDER CONDITIONS OF ALTERED GRAVITATIONAL ENVIRONMENT**

**T.A. Shigueva, V.V. Kitov, E.S. Tomilovskaya, I.B. Kozlovskaya**

*State Scientific Center of the Russian Federation – Institute of Biomedical Problems RAS, Khoroshevskoe sh., 76A, Moscow, 123007, Russia*

Studies performed under conditions of Dry Immersion (DI) have shown that support unloading is accompanied with development of hypogravitational motor syndrome expressed in atony and atrophy of postural muscles, hyperreflexia of spinal reflexes, discoordination of voluntary movements, disturbances in posture and locomotion (Kozlovskaya et al., 1987-2008; Miller et al., 2004; Shenkman et al., 2003; Saenko et al., 2007, Shigueva et al., 2015).

The purpose of this work was to study the microgravity affects on the characteristics of precise voluntary movements.

The studies were carried out with participation of 12 healthy volunteers exposed to 5-days and 7-days microgravity simulation by the means of DI, which is the most adequate onground model of physiological effects of microgravity. To study the accuracy of precise voluntary movements a force gradation task with single-joint isometric plantar flexions has been used. During the task a subject was instructed to produce a number of increasing efforts (from the minimal effort to the maximal one) with the minimal difference between neighboring movements. During the second task where a subject maintained a small muscle effort (up to 7% from maximal voluntary contraction force) motor units (MU) activity of the leg extensors were recorded using sterile needle concentric electrodes.

Results of the study showed that exposure to DI does not alter movements coordination or subjects' ability to perform the task but significantly decreases

precision of voluntary movements which is accompanied with alterations in shin extensors' MUs recruitment order in a task of sustaining a minor voluntary effort.

The reported study was funded by RFBR according to the research project № 18-315-00287 mol\_a.

## **ВЛИЯНИЕ АЦИДОЗА НА СОКРАТИТЕЛЬНЫЕ ОТВЕТЫ АРТЕРИЙ В РАННЕМ ПОСТНАТАЛЬНОМ ОНТОГЕНЕЗЕ**

**Л. Д. Шилова, Д. С. Костюнина, Д. К. Гайнуллина, О. С. Тарасова**

*Кафедра физиологии человека и животных биологического факультета  
МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, Ленинские горы, 1/12, Россия*

pH влияет на все основные функции клеток, так как определяет степень протонирования аминокислот и, следовательно, распределение заряда, конформацию и функцию белков. Внеклеточный pH (pHo) может изменяться как в физиологических условиях (при работе мышц), так и при развитии патологий (при различных нарушениях метаболизма). Особенно чувствительны к изменению pH белки, модулирующие работу клетки при закислении или защелачивании среды, например, транспортеры NBCN1, NHE1, регулирующие внутриклеточный pH (pHi). NBCN1 осуществляет контранспорт ионов  $\text{Na}^+$  и  $\text{HCO}_3^-$ , NHE1 – антипорт  $\text{Na}^+$  и  $\text{H}^+$ . Эти два переносчика противодействуют внутриклеточному ацидозу.

В артериях взрослого организма понижение pHо вызывает ослабление сократительных ответов резистивных артерий, что главным образом обусловлено ингибированием работы потенциал-зависимых кальциевых каналов гладкомышечных клеток (Voedtjker 2018). Однако имеющиеся данные не позволяют судить о функционировании артерий при ацидозе в раннем онтогенезе. Между тем известно, что до 2% новорожденных детей страдают от такого заболевания как ацидемия, которая может существенно влиять на работу сердечно-сосудистой системы (Morgan et al. 2017). Принимая во внимание, что функционирование гладкой мышцы артерий претерпевает существенные изменения в ходе раннего постнатального развития, мы предположили, что влияние ацидоза на сократительные ответы артерий в период раннего онтогенеза будет отличаться от его влияния на взрослый организм. В связи с этим целью данной работы было определить влияние ацидоза на сокращение артерий в раннем постнатальном онтогенезе у крыс.

Работу проводили на подкожной артерии (a. saphena) с удаленным эндотелием молодых (10-15 дней) и взрослых (2-3 месяца) самцов крыс линии «Вистар». С помощью проволочного миографа (DMT A / S, Дания) измеряли силу сокращения артерий в изометрическом режиме. Изучали сократительные ответы артерий на метоксамин (агонист  $\alpha 1$ -адренорецепторов) в диапазоне концентраций  $10^{-8}$ - $10^{-4}$  М. Кумулятивно повышая его концентрацию, получали зависимость «концентрация-эффект». Таких зависимостей проводили 2, первую – в контрольных усло-

виях. Для моделирования метаболического ацидоза перед второй зависимостью «концентрация-эффект» заменяли раствор с рН 7.4 на растворы с рН 7.4 (контрольные условия), 7.1, 6.8 и 6.5. Непосредственно перед второй зависимостью «концентрация-эффект» измеряли рНо в камере миографа с помощью портативного рН-метра MettlerToledo F20. Относительное содержание мРНК генов, кодирующих транспортеры NHE1 и NBCN1, определяли с помощью метода ПЦР в реальном времени в подкожной артерии с удаленным эндотелием.

Понижение рНо до 7.1 не вызывало значимого изменения сократительных ответов артерий в обеих возрастных группах. Однако замена раствора на раствор с рН 6.5 и 6.8 приводила к существенному ослаблению сократительных ответов. У взрослых крыс сократительные ответы были снижены на  $23.5 \pm 3.9\%$  ( $p < 0.05$ ) и  $33.4 \pm 4.4\%$  ( $p < 0.05$ ) в растворах с рН 6.8 и 6.5, соответственно. У крысят уменьшение сократительных ответов составило  $41.3 \pm 6.2\%$  ( $p < 0.05$ ) и  $49.9 \pm 6.6\%$  ( $p < 0.05$ ) в растворах с рН 6.8 и 6.5, соответственно. Важно, что уменьшение сократительных ответов артерий при рНо 6.8 и 6.5 было сильнее у молодых крыс по сравнению со взрослыми ( $p < 0.05$ ), что свидетельствует о более выраженном влиянии рНо на сокращение артерий в раннем онтогенезе.

Кроме того, у крысят уровень экспрессии переносчика NHE1 в подкожной артерии был на  $65.3 \pm 8.7\%$  выше, а уровень NBCN1 на  $39.4 \pm 5.8\%$  ниже, чем у взрослых ( $p < 0.05$ ).

Таким образом, в данной работе впервые было показано, что закисление внеклеточного рН в большей степени ослабляет сократительные ответы артерий в раннем постнатальном периоде по сравнению со взрослыми животными. Это может быть связано с возрастными различиями в уровне экспрессии переносчиков, регулирующих внутриклеточный рН, в частности, с повышением экспрессии NHE1.

### Литература

1. E. Boedtker. 2018. "Acid–base Regulation and Sensing: Accelerators and Brakes in Metabolic Regulation of Cerebrovascular Tone." *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 38(4): 588–602.
2. J. Morgan, D. Nelson, B. Casey, S. Bloom, D. McIntire, K. Leveno. 2017. "Impact of Metabolic Acidemia at Birth on Neonatal Outcomes in Infants Born before 34 Weeks Gestation." *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine* ISSN: 7058(8).

## INFLUENCE OF ACIDOSIS ON THE CONTRACTIVE RESPONSES OF ARTERIES IN EARLY POSTNATAL ONTOGENESIS

L.D. Shilova, D.S. Kostyunina, D.K. Gaynullina, O.S. Tarasova

*Human and Animal Physiology department. Faculty of Biology, M.V. Lomonosov Moscow State University, Moscow, Leninskie gory 1/12, Russia*

pH affects all the main functions of cells, as it determines the protonation of amino acids and, therefore, charge distribution, conformation and function of



proteins. The extracellular pH (pHo) can change both under physiological conditions (for example, as a result of muscle contraction) and under pathological conditions (various metabolic disorders). Proteins that modulate cell activity during acidification or alkalization are especially sensitive to pHo changes. For example, the NBCN1 and NHE1 transporters, which regulate intracellular pH (pHi). NBCN1 is the cotransporter of  $\text{Na}^+$  and  $\text{HCO}_3^-$ , NHE1 is the antiporter of  $\text{Na}^+$  and  $\text{H}^+$ . These two proteins counteract intracellular acidosis.

In the arteries of an adult organism, a decrease in pHo causes a weakening of the contractile responses of resistance arteries, which is mainly due to the inhibition of the work of voltage sensitive calcium channels of smooth muscle cells (Boedtkjer 2018). However, there are no available data about the functioning of the arteries during acidosis in early ontogenesis. Meanwhile, it is known that up to 2% of newborn children suffer from such diseases as acidemia, which can significantly affect the functioning of the cardiovascular system (Morgan et al. 2017). Considering that the functioning of arterial smooth muscle undergoes significant changes in the early postnatal development, we assumed that the effect of acidosis on the contractile responses of arteries in the period of early ontogenesis may differ from its effect on the adult organism. In this regard, the purpose of this work was to determine the effect of acidosis on the arterial contraction in early postnatal ontogenesis in rats.

Experiments were performed on endothelium-denuded saphenous arteries from young (10- to 15-day-old) and adult (2- to 3-month-old) male Wistar rats. The isometric force was measured using a wire myograph (DMT A / S, Denmark). We studied the contractile responses of arteries to methoxamine ( $\alpha$ 1-adrenoreceptor agonist) in the concentration range  $10^{-8}$ - $10^{-4}$  M. Cumulatively increasing its concentration, we investigated the concentration-response relationship. Such relationships were performed twice, the first - in control conditions. In order to simulate metabolic acidosis, before the second concentration-response relationship, we replaced the solution with pH 7.4 with solutions with pH 7.4 (control conditions), 7.1, 6.8 and 6.5. Immediately before the second concentration-response relationship, the pHo in the myograph chamber was measured using a MettlerToledo F20 portable pH-meter.

In addition, mRNA contents of NHE1 and NBCn1 transporters were measured by qPCR in endothelium-denuded saphenous arteries.

Solution with pH 7.1 didn't change the contractile responses to methoxamine in both age groups. Solutions with pH 6.8 and 6.5 reduced contractile responses in both adult and young rats. In adult rats, contractile responses were reduced by  $23.5 \pm 3.9\%$  ( $p < 0.05$ ) and  $33.4 \pm 4.4\%$  ( $p < 0.05$ ) in solutions with a pH of 6.8 and 6.5, respectively. In newborn rats, the decrease in contractile responses was  $41.3 \pm 6.2\%$  ( $p < 0.05$ ) and  $49.9 \pm 6.6\%$  ( $p < 0.05$ ) in solutions with pH 6.8 and 6.5, respectively. Importantly, the decrease in the contractile responses in solutions with pH 6.8 and 6.5 was stronger in young rats compared to adults ( $p < 0.05$ ).

Moreover, in rat pups, the expression level of the NHE1 in endothelium-denuded saphenous arteries was  $65.3 \pm 8.7\%$  higher, and the level of NBCN1 was  $39.4 \pm 5.8\%$  lower than in adults ( $p < 0.05$ ).

Thus, in this work, it was shown for the first time that the acidification of the extracellular pH weakens the arterial contractile responses in the early postnatal period more than in adult animals. This may be due to age-related differences in the expression level of transporters regulating intracellular pH, in particular due to increased expression of NHE1.

#### References

1. E. Boedtker. 2018. "Acid–base Regulation and Sensing: Accelerators and Brakes in Metabolic Regulation of Cerebrovascular Tone." *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 38(4): 588–602.
2. J. Morgan, D. Nelson, B. Casey, S. Bloom, D. McIntire, K. Leveno. 2017. "Impact of Metabolic Acidemia at Birth on Neonatal Outcomes in Infants Born before 34 Weeks Gestation." *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine ISSN: 7058*(8).

### ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ СТРЕСС И ПРОНИЦАЕМОСТЬ ЭНДОТЕЛИЯ

**В.П. Ширинский, М.В. Самсонов, А.В. Воротников, А.Ю. Хапчаев,  
А.В. Никашин, В.З. Ланкин, Т.Н. Власик, Е.Е. Ефремов**

*Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии Минздрава России, ул. 3-я Черепковская, 15а, Москва 121552, Россия*

Окислительный стресс характерен для различных заболеваний и патологических состояний, таких как атеросклероз, диабет, ишемическое и реперфузионное повреждение тканей, радиационное поражение, отравление токсинами и химическими соединениями, инфекционные заболевания и т.д. Свободные радикалы из внешних источников или образованные в избыточном количестве специализированными клеточными ферментами запускают множество разветвляющихся химических реакций, которые генерируют еще больше активных форм кислорода (АФК) и усиливают нитрозильный и карбонильный стресс. При несостоятельности антиоксидантных систем клеток эти реактогенные соединения случайным образом модифицируют белки и нуклеиновые кислоты, приводя к повреждению клеток и их гибели.

Сосудистый эндотелий повсеместно присутствует в организме и уже за счет этого имеет высокую вероятность повреждения АФК. Одной из критических функций эндотелия, нарушаемых АФК, является его проницаемость. Микрососудистый эндотелий служит «воротами», через которые осуществляется массообмен между кровью и тканями. Полупроницаемый эндотелиальный монослой строго контролирует перенос через себя высокомолекулярных соединений, таких как белки, но не препятствует прохождению малых молекул, таких как глюкоза, вода, газы, мочевины и др. Соединения-окислители, например,  $H_2O_2$  ослабляют эндотелиальный барьер и вызывают его гиперпроницаемость. Барьер также нарушается и в эндотелии крупных сосудов, что отмечается по накоплению красителя Эванса голубого в зонах формирования атеросклеротических бляшек.

Мы сфокусировали исследования на клинически валидированном маркере окислительного стресса малоновом диальдегиде (МДА) с целью выяснить, оказывает ли он негативное воздействие на проницаемость эндотелия. Было установлено, что 100-250  $\mu\text{M}$  МДА, добавленный к различным эндотелиальным клеткам, необратимо повышает проницаемость их монослоев *in vitro*. МДА воздействует на цитоскелет и межклеточные контакты и химически модифицирует эндотелиальные белки. В то же время, аналогичные концентрации метилглиоксаля (МГО) и глиоксаля (ГО), реактогенных карбонильных соединений, генерируемых из глюкозы при диабете, не вызывали изменений эндотелиальной проницаемости, что позволяет предположить зависимость сосудистой реакции от химической природы окислителя. По нашему мнению, МДА более эффективно сшивает и инактивирует клеточные белки, чем МГО и ГО, за счет большей длины его бифункциональной молекулы.

С позиций патофизиологии васкулопатий при диабете, эти исследования указывают на первичную роль дислипидемии / перекисного окисления липидов / образования МДА в дисфункции эндотелиальной проницаемости, нежели на повреждающее действие гликокарбониллов, типичных для более поздних стадий этого заболевания. В дополнение к этим результатам, мы обнаружили, что нагрузка эндотелиального монослоя свободной жирной кислотой (СЖК) в виде пальмитата усиливает стресс-индуцированную гиперпроницаемость. И, хотя молекулярные механизмы действия СЖК на проницаемость эндотелия, вероятно, множественные, с помощью оригинальных моноклональных антител мы выявили в обработанных СЖК клетках МДА-модифицированные белки и полагаем, что между такими модификациями и нарушениями проницаемости имеется причинная связь.

Помимо этого мы обнаружили, что как МДА, так и СЖК подавляют синтез оксида азота эндотелиальными клетками. Это предполагает альтернативный механизм гиперпроницаемости под действием данных соединений. Хорошо известно, что сбалансированная продукция NO эндотелиальной NO-синтазой важна для нормального функционирования эндотелиального барьера, в то время как недостаток NO или его избыток оказывают негативное воздействие на барьер. Избыток NO связывают с нерегулируемым нитрозилированием белков.

Наконец, мы установили, что инкубация с СЖК существенно изменяет морфологию эндотелиальных клеток из пупочной вены человека, делая их вытянутыми вместо округлых, похожих на булыжную мостовую. Такое изменение формы связывают с т.н. сократительным фенотипом эндотелиальных клеток, что может объяснять наблюдаемые изменения проницаемости. Мы инициировали новые исследования, нацеленные на понимание молекулярных механизмов, лежащих в основе повышенной сократимости сосудистого эндотелия в присутствии СЖК.

Таким образом, эндотелиальный барьер очень чувствителен к окислительному стрессу и реагирует на него повышением проницаемости. В

случае широко распространенных заболеваний человека, таких как атеросклероз и диабет, дислипидемия, перекисное окисление липидов и образование соединений типа МДА представляются одними из ранних событий, вносящих вклад в развитие дисфункции сосудистого эндотелия. Разрабатываемые стратегии защиты эндотелиального барьера у таких пациентов должны включать нейтрализацию АФК и МДА, в частности.

Поддержано РФФ 14-15-00245; 19-15-00361, РФФИ 18-315-00377  
МОЛ\_а.

## **OXIDATIVE STRESS AND ENDOTHELIAL PERMEABILITY**

**V.P. Shirinsky, M.V. Samsonov, A.V. Vorotnikov, A.Y. Khapchaev,  
A.V. Nikashin, V.Z. Lankin, T.N. Vlasik, E.E. Efremov**

*Institute of Experimental Cardiology, National Medical Research Center  
for Cardiology, 3-rd Cherepkovskaya St., 15a, Moscow, 121552, Russia*

Oxidative stress is the hallmark of various diseases and pathological conditions such as atherosclerosis, diabetes, ischemic and reperfusion injury, radiation damage, chemical / toxin poisoning, infections, etc. Free radicals from exogenous sources or those generated in excess by specialized cellular enzymes set up the plethora of branching reactions producing more reactive oxygen species (ROS) and boosting nitrosyl and carbonyl stress. In the case of failure of cellular antioxidant systems, these reactive compounds randomly modify proteins and nucleic acids leading to cell damage and eventual death.

Vascular endothelium by virtue of its ubiquitous presence throughout the body has high probability of damage by ROS. One of the critical functions affected by ROS in endothelium is permeability. Microvascular endothelium serves as a gate where mass transfer between blood and tissue occurs. The semi-permeable endothelial monolayer tightly controls the passage of high molecular weight substances such as proteins but does not impede the traffic of small molecules like glucose, water, gases, urea, etc. Oxidants like  $H_2O_2$  weaken endothelial barrier and cause hyperpermeability. Barrier capacity is also compromised in macrovascular endothelium as evidenced by the accumulation of Evans Blue dye in the zones of atherosclerotic plaque formation.

We focused on clinically validated marker of oxidative stress, malondialdehyde (MDA), and investigated whether it can adversely affect endothelial permeability. We found that 100-250  $\mu M$  exogenous MDA irreversibly increases the leakiness of the monolayer assembled from various types of endothelial cells in vitro. MDA affects endothelial cytoskeleton and intercellular interactions and chemically modifies endothelial proteins. On the other hand, similar concentrations of methylglyoxal (MGO) and glyoxal (GO), reactive dicarbonyl species generated from glucose during diabetes, produce no alteration in monolayer permeability, suggesting that chemical nature of the oxidant matters for vascular reactivity. We speculate that being a longer bifunctional molecule, MDA more effectively crosslinks and inactivates cellular proteins than MGO and GO do.

From the standpoint of diabetic vasculopathy development, these studies suggested the primary role of dyslipidemia / lipoperoxidation / MDA generation in endothelial permeability dysfunction rather than the damaging action of glyco-carbonyls typical for the advanced stages of this disease. Complementary to these findings, we observed that loading of endothelial monolayer with palmitic free fatty acid (FFA) augments stress-induced endothelial hyperpermeability. Although the molecular mechanisms of FFA action on endothelial permeability are likely multiple, we do observe the accumulation of MDA-modified proteins in FFA-treated cells using original monoclonal antibody and favor the causative relationship between these modifications and altered permeability.

Additionally, we found that both MDA and FFA suppress NO generation by endothelial cells providing alternative mechanism for the increased permeability exerted by these substances. It is well known that balanced NO production by eNOS is essential for endothelial barrier function whereas the lack of NO or the excessive NO generation is detrimental for it. The latter condition is apparently due to uncontrolled protein nitrosylation.

Finally, we observed that incubation with FFA markedly changed the morphology of human umbilical vein endothelial cells making them elongated rather than cobblestone-like. Such a shape transition is attributed to a so-called contractile phenotype of endothelial cells, which explains endothelial behavior observed in permeability tests. Further studies are under way to reveal molecular mechanisms underlying augmented contractility of vascular endothelium in the presence of FFA.

In conclusion, endothelial barrier is highly sensitive to oxidative stress and responds by acute increase in permeability. In the widespread human pathologies such as atherosclerosis and diabetes dyslipidemia, lipoperoxidation and generation of substances like MDA appear the early events that contribute to vascular endothelial dysfunction. The strategies to protect endothelial barrier function in such patients should consider neutralizing ROS and MDA, in particular.

Supported by RSF 14-15-00245; 19-15-00361, RFBR 18-315-00377

мол\_а.

## **ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ НИЗКОЧАСТОТНОЙ ЭЛЕКТРОМИОСТИМУЛЯЦИИ, ПРОВОДИМОЙ В ХОДЕ «СУХОЙ» ИММЕРСИИ, НА ХАРАКТЕРИСТИКИ ВЕРТИКАЛЬНОЙ СТОЙКИ**

**Н.В. Шишкин, Л.Е. Амирова, Е.С. Томиловская**

*Институт медико-биологических проблем РАН,  
Москва, Хорошевское шоссе, 76А*

Метод электромиостимуляции мышц нижних конечностей (ЭМС) используется достаточно широко: в космической медицине – для поддержания мышечных качеств человека, в клинике – для реабилитации больных с хронической сердечной недостаточностью. В то же время воздействие ЭМС на систему позных регуляций изучено недостаточно. Параметры вер-

тикальной стойки претерпевают изменения даже во время кратковременного воздействия микрогравитации в космическом полете (КП) (Kozlovskaya, 1981). Одной из лучших методик, воспроизводящих эффекты КП, является модель «сухой» иммерсии (СИ), по условиям которой испытуемый находится в толще воды, непосредственно с ней не контактируя (Шульженко, Виль-Вильямс 1975).

В данном исследовании мы изучали влияния ЭМС, проводимой в ходе 5-суточной СИ, на характеристики вертикальной стойки.

В ходе иммерсионного воздействия мы проводили электростимуляцию мышц ног с использованием низкочастотного электромиостимулятора «Стимул 01-НЧ». Частота стимуляции составляла  $25 \pm 1$  Гц; стимуляцию (1 сек. стимул, 2 сек. отдых) проводили ежедневно по 4 часа. Испытуемые произвольно выбирали амплитуду стимуляции так, чтобы обеспечить максимальное сокращение мышц, не сопровождающееся болевыми ощущениями.

Для регистрации постуральных характеристик использовали стабилметрическую платформу Стабилан-02 фирмы «ОКБ Ритм». Анализировали скорость перемещения центра давления (ЦД) и средний разброс ЦД во фронтальной и сагиттальной плоскостях.

Испытуемые находились в 2-х экспериментальных условиях:

1. Стойка на твердой опоре с закрытыми глазами;
2. Стойка на мягкой опоре с закрытыми глазами (на поверхность платформы помещалась поролоновая подушка толщиной 20 см).

Испытуемый последовательно находился в каждом из условий по 40 секунд. Исследование проводили 2 раза: до погружения в иммерсию (фон) и в день завершения СИ.

В качестве контрольной группы использовали данные предыдущих экспериментов в условиях 5-суточной СИ без каких-либо воздействий.

Результаты исследования показывают, что во всех условиях в обеих группах испытуемые на мягкой опоре стоят хуже, чем на твердой, что говорит о важности опорной афферентации в поддержании вертикальной стойки. При этом в СИ с ЭМС, в отличие от контрольной СИ, было найдено статистически значимое ( $p=0,034$  для ЦД и  $p=0,039$  для разброса) отличие фоновых результатов от результатов исследований после иммерсионного воздействия. ЭМС делает вертикальную стойку более зависимой от опорного контроля, который и оценивается при стойке на мягкой опоре.

Анализ отобранных испытуемыми величин ЭМС показал, что группа неоднородна и разделяется на 3 подгруппы: (1<sup>я</sup> – не выше 32мА и 26 мА, 2<sup>я</sup> – не выше 20мА и 15мА, 3<sup>я</sup> – не выше 17мА и 15мА, для мышц бедра и голени соответственно).

Выявлена значимая корреляция между амплитудой стимуляции и изменениями стабилметрических параметров после завершения эксперимента ( $p=0.0028$  для мышц бедра и  $p=0.0418$  для мышц голени).

Группа контрольной СИ значительно отличается от группы с высокой амплитудой стимуляции по изменению скорости ЦД после иммерсионного

воздействия (высоко-, среднеамплитудная группы) и по изменению разброса (только высокоамплитудная). Таким образом, можно предположить, что применение в ходе СИ ЭМС высокой интенсивности приводит к "расшатыванию" стойки.

Отношение постурологических параметров на мягкой и твердой платформе отражает вовлеченность опорной афферентации в поддержание равновесия. Изменение этого отношения после СИ может говорить об изменении роли опорной афферентации в постуральном контроле. Была найдена значимая зависимость этого отношения от амплитуды стимуляции ( $p=0.045$  для бедра, для голени изменения незначимы). Это, вероятно, говорит о том, что ЭМС повышает роль опорной афферентации вследствие интенсивной тренировки мышечной силы без тренировки координации.

Полученные результаты показали, что амплитуда ЭМС, не влияющая на стабилеографические параметры в условиях сухой иммерсии, колеблется между 7 мА и 17 мА для мышц бедра и между 7 мА и 15 мА – для мышц голени.

Работа проводилась в рамках соглашения о предоставлении субсидии от 23 октября 2017 г. № 14.613.21.0074.

## **STUDY OF THE INFLUENCE OF LOW-FREQUENCY ELECTRICAL MYOSTIMULATION DURING A "DRY" IMMERSION ON THE CHARACTERISTICS OF THE UPRIGHT**

**N.V. Shishkin, L.E. Amirova, E.S. Tomilovskaya**

*Institute of biomedical problems of RAS, Moscow, Khoroshevskoe shosse, 76A*

The method of electromyostimulation of the muscles of the lower extremities (EMS) is widely used: in space medicine – to maintain the muscular qualities of a person, in the clinic – for the rehabilitation of patients with chronic cardiac failure. At the same time, the impact of EMS on the system of postural regulations has not been sufficiently studied. The parameters of the vertical stance undergo changes even during short-term exposure to microgravity in space flight (SF) (Kozlovskaya, 1981). One of the best techniques, reproducing the effects of SF, is a model of "dry" immersion (DI), under which the research man locate in the water column, without direct contact with it (Shulzhenko, Wil-Williams 1975).

In this study, we studied the effects of EMS conducted during the 5-day DI on the characteristics of the vertical stance.

During immersion, we performed electrical stimulation of the leg muscles using low-frequency electromyostimulation "Stimul 01-NCH". The frequency of stimulation was  $25 \pm 1$  Hz; stimulation (1 sec. stimulus, 2 sec. rest) carried out daily for 4 hours. Subjects voluntary chose the amplitude of stimulation so as to provide maximum muscle contraction, not accompanied by pain.

To register postural characteristics used stabilometric platform "Stabilan-02" company "OKB RITM". The center of pressure velocity of displacement

(CP) and the average deviation of CD in the frontal and sagittal planes were analyzed.

The subjects were in 2 experimental conditions:

1. Stand on solid support with eyes closed;
2. Stand on a soft support with closed eyes (foam pad 20 cm thick was placed on the surface of the platform).

The research man was consistently in each of the conditions for 40 seconds. The study was performed 2 times: before immersion (baseline) and on the day of completion of DI.

In the control group used data from previous experiments in terms of the 5-day DI without any influences.

The results of the study show that in all conditions in both groups, the research men stand on the soft support worse than on the hard one, which indicates the importance of the support afferentation in maintaining the vertical support. At the same time in the DI with EMS, in contrast to the control DI, were found statistically significant ( $p=0,034$  for CP, ( $p=0,039$  for deviation) difference between the baseline results and the results of the studies after immersion. EMS makes the vertical stance more dependent on the support control, which is evaluated at the stance on a soft support.

The analysis of the EMS values selected by research men showed that the group is heterogeneous and is divided into 3 subgroups: (1<sup>st</sup> – no higher than 32mA and 26 mA, 2<sup>nd</sup> – no higher than 20mA and 15mA, 3<sup>rd</sup> – no higher than 17mA and 15mA, for femur and tibia muscles, respectively).

There was a significant correlation between the amplitude of stimulation and changes in stabilographic parameters after experiment completing ( $p=0.0028$  for femur muscles and  $p=0.0418$  for tibia muscles).

The control DI group significantly differs from the group with a high amplitude of stimulation by changes in the CP after immersion impact (high-, medium-amplitude group) and by changes of average deviation (only high-amplitude). Thus, it can be assumed that the use of high-intensity EMS during DI leads to "loosening" of the stance.

Relation between posturologist parameters for soft and solid platform reflects the involvement of support afferentation in maintaining equilibrium. The change in this relation after DI may indicate a change in the role of support afferentation in postural control. A significant dependence of this ratio on the stimulation amplitude was found ( $p=0.045$  for the femur, for the tibia the changes are insignificant). This probably suggests that EMS increases the role of support afferentation due to intense muscle strength training without coordination training.

The results showed that the amplitude of EMS, which does not affect the stabilographic parameters in dry immersion, varies between 7 mA and 17 mA for the femur muscles and between 7 mA and 15 mA for the tibia muscles.

The work was carried out within the framework of the agreement on the grant of "23" October 2017 № 14.613.21.0074.



## АМИЛОИДНЫЕ АГРЕГАТЫ ГЛАДКОМЫШЕЧНОГО ТИТИНА НЕ АКТИВИРУЮТ СИСТЕМУ КОМПЛЕМЕНТА *in vitro*

С.А. Шумейко<sup>1</sup>, Л.Г. Бобылёва<sup>1</sup>, И.М. Вихлянец<sup>1,2</sup>,  
А.Г. Бобылёв<sup>1,2</sup>, Э.И. Якупова<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пуццино

<sup>2</sup>Пуцинский государственный естественно-научный институт, Пуццино,

e-mail: yakupova.mira@mail.ru

Активация любого из трех путей системы комплемента (классического, лектинового или альтернативного) в организме человека происходит при развитии нормальных воспалительных реакций, при травмах или микробных инфекциях. Системе комплемента отнесена важная роль в удалении апоптотических клеток, тканей и макромолекулярных агрегатов. Однако действие системы комплемента может также привести к гибели клеток и развитию патологических процессов в тканях при ее неадекватной активации. Действительно, неконтролируемая активация системы комплемента была признана в качестве патогенетического фактора при многих сердечно-сосудистых, иммунных, почечных и неврологических заболеваниях [1].

Воспалительные процессы и развитие нейродегенеративных заболеваний у человека опосредованы активацией системы комплемента. Активация этого компонента иммунной системы происходит за счет связывания компонентов системы комплемента C1q и C3b с амилоидными агрегатами, обнаруживаемыми при болезни Альцгеймера и Паркинсона, относящимися к болезням, называемым амилоидозами [2]. Амилоидозы считаются неизлечимыми заболеваниями человека и животных, а хроническое воспаление сопутствует этим заболеваниям. Ранее нами были получены данные, свидетельствующие о том, что мышечный белок титин способен формировать *in vitro* амилоидные агрегаты, обладающие цитотоксичностью [3]. Нельзя исключить, что титин может входить в состав амилоидных отложений, обнаруженных в поперечно-полосатых мышцах и меди сосудов при развитии системных амилоидозов или амилоидозов мышц [4]. Поскольку титин является третьим по количеству белком в мышце, то, необходима быстрая система реагирования в организме для предупреждения развития амилоидоза при попадании этого белка или его фрагментов в интерстициальное пространство, например, при травмах. Такой системой может быть система комплемента.

Целью нашего исследования заключалась в проверке предположения, что амилоидные агрегаты титина способны активировать систему комплемента. Агрегаты титина гладких мышц были сформированы в двух буферных растворах: 0,15 М глицина, рН 7,0-7,5 и 200 мМ KCl, 10 мМ имидазола, рН 7,2-7,4. Амилоидная природа агрегатов была подтверждена методами X-гау дифракции [5].

С помощью ELISA не было обнаружено связывания амилоидных агрегатов гладкомышечного титина с C1q и C3b компонентами системы ком-

племента. Аналогичные данные были получены и при использовании человеческой сыворотки крови: связывания C1q и C3 из сыворотки с агрегатами титина не наблюдалось. Таким образом, наши результаты показывают, что гладкомышечный титин может быть не вовлечен в процесс активации системы комплемента при развитии мышечных амилоидозов.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ №18-315-00012.

### Литература

1. Janeway C.A. Jr, Travers P., Walport M. et al. (2001) Immunobiology: The Immune System in Health and Disease. 5th edition. The complement system and innate immunity. New York: Garland Science.
2. Akiyama H., Barger S., Barnum S., et al. (2000) Inflammation and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 21(3): 383–421.
3. Bobylev A.G., Galzitskaya O.V., Fadeev R.S. et al. (2016) Smooth muscle titin forms *in vitro* amyloid aggregates. *Biosci. Rep.* 36(3):e00334.
4. Uversky V.N., Fink A.L. (2004) Conformational constraints for amyloid fibrillation: the importance of being unfolded. *Biochim. Biophys. Acta* 1698(2):131-53.
5. Yakupova E.I., Vikhlyantsev I.M., Bobyleva L.G. (2018) Different amyloid aggregation of smooth muscles titin *in vitro*. *J. Biomol. Struct. Dyn.* 36(9):2237-2248.

## AMYLOID AGGREGATES OF SMOOTH MUSCLE TITIN CANNOT ACTIVATE THE COMPLEMENT SYSTEM *in vitro*

S.A. Shumeyko<sup>1</sup>, L.G. Bobyleva<sup>1</sup>, I.M. Vikhlyantsev<sup>1,2</sup>,  
A.G. Bobylev<sup>1</sup>, E.I. Yakupova<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *Institute of Theoretical and Experimental Biophysics RAS, Pushchino, Moscow Region, 142290, Russia;*

<sup>2</sup> *Pushchino State Institute of Natural Sciences, Pushchino, Moscow Region, 142290, Russia; e-mail: yakupova.mira@mail.ru*

Activation of any of the three complementary pathways (classical, lectin or alternative) in the human body occurs with the development of normal inflammatory reactions in trauma or microbial infections. The complement system plays an important role in the removal of apoptotic cells, tissues and macromolecular aggregates. However, as a result of inadequate complement activation the effector function of the system may result in cell death and the development of pathological processes in tissues. In fact, uncontrolled complement activation has been considered as a pathogenic effect for diverse ~~many~~ cardiovascular, immune, renal and neurological diseases [1].

Inflammatory processes and the development of neurodegenerative diseases in humans are mediated by complement activation. Activation of this component of the immune system occurs due to the binding of the components of the complement system C1q and C3b to the amyloid aggregates found in Alzheimer's disease and Parkinson's disease (called amyloidosis) [2]. Amyloidosis is an incurable disease that affects humans and animals and chronic inflammation coexists with it [2]. Based on our previously obtained evidence muscle protein titin is able to form *in vitro* amyloid aggregates which have a cytotoxic effect [3]. We suggest that this

protein is present in amyloid deposits found in case of amyloidosis with amyloid deposition detected in muscle [4]. Titin is the third most abundant protein in muscle, and the rapid response system in the body is needed to preventing the development of amyloidosis when this protein or its fragments enter the interstitial space, both in trauma and in the development of specific amyloid myopathy. The complement system is supposed to be used. The goal of our study was to test the assumption that amyloid titin aggregates can activate the complement system. Aggregates of smooth muscle titin were formed in two solutions: 0.15 M glycine-KOH, pH 7.2–7.4 and 0.2 M KCl, 10 mM imidazole, pH 7.2–7.4. Amyloid nature of the aggregates was revealed by X-ray diffraction [5].

ELISA for C1q and C3b binding showed that both amyloid aggregates of titin do not bind directly to the complement components. Data of ELISA using normal human serum for complement activation are similar: there are no indications of C1q and C3 binding by the aggregates. Thus, our results suggest that SMT cannot be involved in the complement activation during amyloidoses in muscle.

This work was supported by the Russian Foundation for Basic Research [grant number 18-315-00012].

### References

1. Janeway C.A. Jr, Travers P., Walport M. et al. (2001) Immunobiology: The Immune System in Health and Disease. 5th edition. The complement system and innate immunity. New York: Garland Science.
2. Akiyama H., Barger S., Barnum S., et al. (2000) Inflammation and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 21(3): 383–421.
3. Bobylev A.G., Galzitskaya O.V., Fadeev R.S. et al. (2016) Smooth muscle titin forms in vitro amyloid aggregates. *Biosci. Rep.* 36(3):e00334.
4. Uversky V.N., Fink A.L. (2004) Conformational constraints for amyloid fibrillation: the importance of being unfolded. *Biochim. Biophys. Acta* 1698(2):131-53.
5. Yakupova E.I., Vikhlyantsev I.M., Bobyleva L.G. (2018) Different amyloid aggregation of smooth muscles titin in vitro. *J. Biomol. Struct. Dyn.* 36(9):2237-2248.

### СФИНГОЛИПИДНЫЕ МЕХАНИЗМЫ АТРОФИИ МЫШЦ ПРИ ГИПОГРАВИТАЦИОННОЙ РАЗГРУЗКЕ

**А.А. Яковлев, В.А. Протопопов, М.Н. Шалагина, А.В. Секунов,  
С.В. Овечкин, Н.А. Иванов, И.Г. Брындина**

*Ижевская государственная медицинская академия,  
Ижевск, ул. Коммунаров, 281, Россия*

Известно, что в развитии атрофии мышц, вызванной функциональной разгрузкой, ведущую роль играет дисбаланс между процессами анаболизма и катаболизма белков (снижение синтеза и усиление деградации). Механизмы, приводящие к этому дисбалансу, до конца не изучены. В настоящее время обсуждается возможность участия сфинголипидов (в частности, церамида) в реализации эффектов разгрузки (И.Г.Брындина и соавт., 2014, 2018, Kwon, 2015, Salaun, 2015). Известны три основных пути образования церамида: синтез de novo, сфингомиелиназный гидролиз и

рециклизация. В опытах Salaun (2015) попытка ограничения синтеза церামида введением мириоцина (ингибитора серинпальмитоилтрансферазы) не привела к устранению атрофических изменений в *m. soleus* крыс при 7-дневном вывешивании задних конечностей, несмотря на восстановление повышенного при АОВ уровня церамидов.

Целью нашей работы явилось исследование возможности коррекции вызванных вывешиванием атрофических изменений в мышцах с помощью ингибитора кислой сфингомиелиназы кломипрамина. Ранее мы продемонстрировали повышение уровня этого фермента при мышечной разгрузке (И.Г.Брындина, 2014). Эксперименты проведены на крысах-самцах Вистар массой 200- 250 г. Работа выполнена с соблюдением требований, предъявляемых к работе с экспериментальными животными (Приказ Минздрава от 23.08.2010 г. № 708). Гипогравитационную разгрузку (14 дней) мышц задней конечности моделировали путем антиортостатического вывешивания (АОВ) по Ильину - Новикову. Часть вывешенных животных получала кломипрамин (Анафранил, Novartis Pharma, в/м, в дозе 0,25 мг в течение 5 дней до АОВ и через день во время АОВ), остальным вывешенным крысам вводили 0,9% раствор NaCl. Контролем служили интактные животные. После окончания воздействий животных выводили из эксперимента путем декапитации под наркозом. Проводили гистологическое исследование камбаловидной мышцы (окраска гематоксилином-эозином, световая микроскопия с использованием графического редактора Image J) с целью оценки степени атрофии. Для определения экспрессии ряда молекул, вовлеченных в регуляцию анаболического пути (IRS1, p-Akt, mTOR, p-mTOR, p-p70S6K), а также для оценки уровней кислой и нейтральной сфингомиелиназ (aSMase, nSMase) применяли Вестерн-блоттинг по Laemmli. Церамид определяли в продольных и поперечных срезах мышц, обработанных антицерамидными антителами, с помощью иммунофлуоресцентного метода. Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием программ Microsoft Excel и SPSS Statistica 6,0. В зависимости от распределения (критерии Колмогорова-Смирнова и Шапиро-Уилка) достоверность определяли по Стьюденту или Манну-Уитни, различия считали достоверными при  $p < 0,05$ .

В результате исследования установлено, что кломипрамин ослабляет атрофические изменения в камбаловидной мышце вывешенных животных. Количество aSMase (но не nSMase) и церамидов в рафтах, повышенное при АОВ, становилось ниже на фоне введения кломипрамина. Одновременно обнаружен нормализующий эффект данного препарата на компоненты сигнального пути IRS/ Akt/ mTOR: кломипрамин предотвращал снижение уровней IRS1, p-Akt, p-mTOR и p-p70S6K, тогда как mTOR не изменялся ни при АОВ, ни при сочетанном воздействии.

Таким образом, ингибирование сфингомиелиназного гидролиза оказывает превентивное воздействие на развитие атрофии мышц при 14-дневной функциональной разгрузке. Вероятным механизмом является

ограничение ингибирующего влияния церамида на систему IRS/ Akt/ mTOR/ p70S6K.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ (грант № 16-15-10220).

### Литература

1. Bryndina IG, Shalagina MN, Ovechkin SV, Ovchinina NG (2014) Sphingolipids in skeletal muscles of C57B1/6 mice after short-term simulated microgravity. *Russ. Fiziol. Zh. Im. I.M. Sechenova.* 100(11):1280-1286.
2. Bryndina IG, Shalagina MN, Sekunov AV, Zefirov AL, Petrov AM (2018) Clomipramine counteracts lipid raft disturbance due to short-term muscle disuse. *Neurosci Lett.* 664:1-6. doi: [10.1016/j.neulet.2017.11.009](https://doi.org/10.1016/j.neulet.2017.11.009)
3. Kwon, O.S., Tanner, R.E., Barrows, K.M., Runtsch, M., Symons, J.D., Jalili, T., Bikman, B.T., McClain, D.A., O'Connell, R.M., and Drummond, M.J. (2015) MyD88 regulates physical inactivity-induced skeletal muscle inflammation, ceramide biosynthesis signaling, and glucose intolerance, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, **309**, E11-21.
4. Salaun, E., Lefevre-Orfila, L., Cavey, T., Martin, B., Turlin, B., Ropert, M., Loreal, O., and Derbré, F. (2016) Myriocin prevents muscle ceramide accumulation but not muscle fiber atrophy during short-term mechanical unloading. *J. Appl. Physiol.* **120**, 178-187.

## SPHINGOLIPID MECHANISMS OF MUSCLE ATROPHY IN HYPOGRAVITATIONAL UNLOADING

**A.A. Yakovlev, V.A. Protopopov, M.N. Shalagina, A.V. Sekunov,  
S.V. Ovechkin, N.A. Ivanov, I.G. Bryndina**

*Izhevsk State Medical Academy, Izhevsk, Kommunarov St., 281, Russia*

It is known, that an imbalance between the processes of protein anabolism and catabolism (reduced synthesis and increased degradation) plays essential role in the development of muscle atrophy caused by functional unloading. The mechanisms leading to this imbalance are not fully understood. The possibility of sphingolipid involvement (in particular, ceramide) in the realization of disuse effects in muscle is currently under discussion (Bryndina et al., 2014, 2018, Kwon et al., 2015, Salaun et al., 2015). There are three main pathways of ceramide formation: de novo synthesis, sphingomyelinase hydrolysis and recycling. In the experiments of Salaun with co-authors (2015), an attempt to decrease ceramide biosynthesis by treatment with myriocin (an inhibitor of serine palmitoyltransferase) did not eliminate atrophic changes in rat m. soleus subjected to 7-day hindlimb unloading (HU), despite the restoration of ceramide level elevated in HU. The aim of our work was to investigate the possibility of correcting the atrophic changes in unloaded muscle using the acid sphingomyelinase inhibitor, clomipramine. Earlier, we demonstrated an increase in the level of this enzyme during muscle unloading (Bryndina et al., 2014). The experiments were carried out on Wistar male rats weighing 200-250 g. The work was performed in compliance with the requirements for working with experimental animals (Ministry of Health and Social De-

velopment Order No. 708 of August 23, 2010). Hypogravitational unloading (14 days) of the hindlimb muscles was simulated by antiorthostatic suspension according to Ilyin-Novikov. Some of suspended animals were pretreated with clomipramine (Anafranil, Novartis Pharma, i/m, at a dose of 0.25 mg for 5 days before HU and every other day during HU), and the rest were administered with 0.9% NaCl solution. Intact animals served as a vivarium control. After the end of unloading the animals were removed from the experiment by decapitation under the general anesthesia. A histological examination of the soleus muscle (hematoxylin-eosin staining, light microscopy using Image J graphic editor) was carried out to assess the degree of atrophy. To determine the expression of a number of molecules involved in the regulation of the anabolic pathway (IRS1, p-Akt, mTOR, p-mTOR, p-p70S6K), as well as to assess the levels of acid and neutral sphingomyelinases (aSMase, nSMase), Western blot analysis according to Laemmli was used. Ceramide was determined by immunofluorescent method in longitudinal and transverse sections of muscle treated with anti-ceramide antibodies. Statistical analysis of the obtained results was performed using Microsoft Excel and SPSS Statistica 6.0. Depending on the distribution (Kolmogorov-Smirnov and Shapiro-Wilk criteria), the significance of changes was determined by Student's or Mann-Whitney tests, the differences were considered significant at  $p < 0.05$ .

It was found that clomipramine weakens atrophic changes in the soleus muscle of suspended animals. The amount of aSMase (but not nSMase) and ceramide in lipid rafts, increased in HU, became lower with clomipramine treatment. At the same time, the normalizing effect of this drug on the components of the IRS / p-Akt / mTOR signaling pathway was revealed: clomipramine prevented a decrease in the levels of IRS1, p-Akt, p-mTOR and p-p70S6K, while mTOR did not change either in HU or in a combined experiment.

Thus, inhibition of sphingomyelinase hydrolysis exerts a preventive effect on the development of muscle atrophy during 14-day functional unloading. The possible mechanism of this is the suppression of the inhibitory effect of ceramide on the IRS / Akt / mTOR / p70S6K pathway.

This work was supported by RSF (grant #16-15-10220)

### References

1. Bryndina IG, Shalagina MN, Ovechkin SV, Ovchinina NG (2014) Sphingolipids in skeletal muscles of C57B1/6 mice after short-term simulated microgravity. *Russ. Fiziol. Zh. Im. I.M. Sechenova.* 100(11):1280-1286.
2. Bryndina IG, Shalagina MN, Sekunov AV, Zefirov AL, Petrov AM (2018) Clomipramine counteracts lipid raft disturbance due to short-term muscle disuse. *Neurosci Lett.* 664:1-6. doi: 10.1016/j.neulet.2017.11.009
3. Kwon, O.S., Tanner, R.E., Barrows, K.M., Runtsch, M., Symons, J.D., Jalili, T., Bikman, B.T., McClain, D.A., O'Connell, R.M., and Drummond, M.J. (2015) MyD88 regulates physical inactivity-induced skeletal muscle inflammation, ceramide biosynthesis signaling, and glucose intolerance, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, **309**, E11-21.
4. Salaun, E., Lefevre-Orfila, L., Cavey, T., Martin, B., Turlin, B., Ropert, M., Loreal, O., and Derbré, F. (2016) Myriocin prevents muscle ceramide accumulation but not muscle fiber atrophy during short-term mechanical unloading, *J. Appl. Physiol.* **120**, 178-187.

**SMALL-MOLECULES DIRECTED TO THE TITIN FILAMENT  
AS A POTENTIAL NOVEL STRATEGY TO ATTENUATE  
MUSCLE STRESS RESPONSE PATHWAYS  
AND MODULATE STRAIN RESPONSES**

**Volker Adams<sup>1</sup>, T. Scott Bowen<sup>2</sup>, Peter Sehr<sup>3</sup>, Joe Lewis<sup>3</sup>, Siegfried Labeit<sup>4,5</sup>**

*<sup>1</sup>Experimental and Molecular Cardiology, TU Dresden, Heart Center Dresden,  
Germany*

*<sup>2</sup>School of Biomedical Sciences, University of Leeds, Leeds, United Kingdom*

*<sup>3</sup>Dept for Chemical Biology, EMBL Heidelberg, Germany*

*<sup>4</sup>IPM, Dept. for Integrative Pathophysiology, Universitätsklinikum Mannheim  
University of Heidelberg, Germany*

*<sup>5</sup>Myomedix GmbH, Neckargemünd, Germany*

Background: MuRF1 is a muscle-specific ubiquitin E3 ligase that is activated during clinical conditions associated with skeletal muscle wasting, like cardiac cachexia, heart failure or cancer. Yet there remains a paucity of therapeutic interventions that directly inhibit MuRF1 function, particularly in vivo. Recently, we have developed a novel compound that targets the MuRF1 protein in order to inhibit muscle wasting in cardiac cachexia (Bowen et al., 2017, JCSM): A compound isolated from the EMBL inhouse selection, EMBL ID#704946, could protect diaphragm and T. anterior muscles from cachexia stress induced myopathy. In this Pushchino meeting, we will present C2C12 data in an attempt to understand the myocyte based signaling pathways that are modulated by treating stressed myocytes compound with the compound. In addition, we will discuss the titin filament and its associated ligands in the context of its targeting by biochemical stress pathways during physiological responses: Possibly, small molecules might serve as as novel strategy to modulate pathophysiological titin-based responses. Therefore, we will discuss with our colleagues at this workshop which approaches could be most suitable to treat atrophy and muscle dysfunction in a variety of chronic disease states where we assume that titin provides a central signaling scaffold.

## АВТОРСКИЙ УКАЗАТЕЛЬ

- Абрамов А.А., 148  
 Аверин А.С., 113  
 Аврова С.В., 118  
 Акатов В.С., 90, 109, 123, 1780  
 Алексеева О.М., 11  
 Алиева И.Б., 240  
 Амирова Л.Е., 309  
 Андрианов В.В., 14, 75  
 Антонов В.Г., 172, 175
- Балезина О.П., 17, 56, 185, 213 244  
 Балтин Б.Э., 224  
 Балтин М.Э., 20  
 Балтина Т.В., 20, 267  
 Белова С.П., 22, 255  
 Белослудцев К.Н., 24, 28, 85  
 Белослудцева Н.В., 24, 28, 31, 181  
 Белоусова Е.С., 34  
 Берг В.Ю., 37, 41  
 Бершицкий С.Ю., 37, 43, 146, 151, 165, 202  
 Бильдюг Н.Б., 45  
 Бирулина Ю.Г., 125  
 Бобылёв А.Г., 47, 51, 69, 255, 313  
 Бобылёва Л.Г., 47, 51, 78, 112, 188, 313  
 Богачева П.О., 56, 213  
 Богодвид Т.Х., 14, 75  
 Божок Г.А., 82  
 Боков Р.О., 59  
 Бондаренко Т.П., 82  
 Боровиков Ю.С., 118  
 Бояринцева Т.В., 273  
 Бродский И.Б., 61  
 Брындина И.Г., 315  
 Бураков А.В., 257, 270  
 Бутова К.А., 63, 194
- Вдовкин П.П., 143  
 Венедиктова Н.И., 31  
 Вильчинская Н.А., 66, 250  
 Виноградова О.Л., 158  
 Вихлянцев И.М., 47, 51, 69, 78, 148, 169, 255, 313  
 Вишневская З.И., 5  
 Власик Т.Н., 116, 209, 306  
 Воробьев И.А., 106, 128  
 Воротников А.В., 116, 209, 306
- Газизова Г.Р., 59, 158, 168, 211  
 Гайдуков А.Е., 56, 185, 244  
 Гайнуллина Д.К., 72, 303  
 Гайнутдинов Х.Л., 14, 75  
 Галева А.В., 216  
 Галзитская О.В., 78  
 Галиуллина Н.В., 267  
 Гетте И.Ф., 194  
 Гиршберг К., 61  
 Глоба В.Ю., 82  
 Глушанкова Н.А., 156  
 Глякина А.В., 78  
 Горошко А.М., 96  
 Григорьева П.В., 283  
 Грицына Ю.В., 69, 255  
 Гусакова С.В., 125  
 Гусев О.А., 59, 158, 168, 211
- Даял А., 88  
 Дерябина И.Б., 14, 75  
 Добрецов М.Г., 143  
 Драчук В.М., 96  
 Дубинин М.В., 24, 85  
 Дубров В.Э., 153  
 Дудка Е.А., 102  
 Духалин С., 88
- Евстратова Я.В., 90, 123  
 Еремеев А.А., 20, 267  
 Ефремов Е.Е., 116, 209, 306
- Жалимов В.К., 255  
 Жаппарова О.Н., 270  
 Жигачева И.В., 93  
 Житняк И.Ю., 156
- Зайцев М.А., 20, 267  
 Зайцева Т.Н., 125  
 Заморский И.И., 96, 99, 102, 287  
 Захарова Н.М., 69  
 Зворыкина Е.И., 106  
 Звягина А.И., 109  
 Згода В.Г., 61, 168  
 Зиганшин Р.Х., 188  
 Зиновьева О.Е., 112  
 Зубкова О.А., 240



- Иванов Н.А., 315  
Игнатьев Д.А., 113
- Казакова О.А., 116, 209  
Капелько В.И., 148  
Карпичева О.Е., 118  
Касумов Р.Э., 121  
Касумов Э.А., 121  
Касумова И.В., 121  
Кирсанова П.О., 109, 178  
Китов В.В., 301  
Клейменов С.Ю., 151  
Кобякова М.И., 90, 123  
Ковалев И.В., 125  
Ковалева А.В., 128  
Козловская И.Б., 301  
Комар Т.В., 287  
Копылова Г.В., 37, 41, 43, 131, 146, 151, 165, 202  
Коротков С.М., 135  
Коряк Ю.А., 137  
Косарский Л.С., 113  
Костюнина Д. С., 303  
Костюнина Д.С., 72  
Кощева О.И., 37  
Кравцова В.В., 141  
Кравченко И.В., 153, 273  
Крамарова Л.И., 188  
Краснов К.С., 123  
Красовская И.Е., 263  
Крещенко Н.Д., 247  
Кривой И.И., 141, 162  
Крутецкая З.И., 172, 175  
Крутецкая Н.И., 172, 175  
Кубасов И.В., 143  
Кубасова Н.А., 43, 146, 200  
Кулева Н.В., 263
- Лагарькова М.А., 240  
Лакомкин В.Л., 148  
Ланкин В.З., 116, 209, 306  
Лебедева Е.В., 28  
Левицкий Д.И., 43, 146, 151, 165  
Легач Е.И., 82  
Леднев Е.М., 153  
Литовка Н.И., 156  
Логвинова Д.С., 165, 202  
Ломовский А.И., 90
- Лосева Т.Д., 34  
Лукин О.Н., 63, 197  
Лукошкова Е.В., 148  
Лысенко Е.А., 59, 153, 158, 168, 211  
Львова И.Д., 250
- Мажугин В.Ю., 34  
Макаров М.С., 160  
Маньковская И.Н., 218  
Марков А.Г., 162  
Матюшенко А.М., 43, 146, 151, 165, 202  
Махновский П.А., 59, 158, 168, 211  
Мачков В., 72  
Медведев М.А., 125  
Медведева Н., 88  
Мельник Т.Н., 216  
Мельников И.Ю., 169  
Мельницкая А.В., 172  
Меньших К.А., 178  
Микашинович З.И., 34  
Миленина Л.С., 175  
Минайчев В.В., 178  
Минин А., 88  
Мирзоев Т.М., 253  
Миронова Г.Д., 31, 181, 218  
Митева А.С., 56, 185, 244  
Михайлова Г.З., 69, 112, 188  
Михеева И.Б., 28  
Мичурина С.С., 116, 209  
Молчанова А.И., 185, 244  
Моренков О.С., 69  
Мосенцов А.А., 218  
Мочалова Е.П., 22, 255  
Муранова Л.Н., 14, 75  
Мурзина Г.Б., 190  
Мячина Т.А., 194, 197
- Набиев С.Р., 37, 43, 131, 146, 200, 202  
Надеждина Е.С., 61, 257, 270  
Накипова О.В., 113  
Незвецкий А.Р., 204  
Некрасова Т., 88  
Немировская Т.Л., 22, 255  
Нестеров В.П., 135, 234  
Никашин А.В., 306  
Никитина Л.В., 37, 43, 146, 202  
Новиченко С.Д., 283  
Носарев А.В., 125

- Овечкин С.В., 315  
 Огнева И.В., 260  
 Одинцова О.А., 109  
 Орлов Н.Я., 204  
 Осепян А.Ш., 226
- Павлик Л.Л., 31  
 Панаит А.И., 206  
 Панов А.А., 143  
 Парамонова И.И., 66, 250, 298  
 Петрова И.В., 125  
 Петрухин О.В., 204  
 Пивоваров А.С., 190  
 Погорелов А.Г., 206  
 Погорелова В.Н., 206  
 Подкуйченко Н.В., 116, 209  
 Попов В.О., 273  
 Попов Д.В., 59, 153, 158, 168, 211  
 Попова С.С., 71, 112  
 Правдивцева Е.С., 56  
 Просвирнин А.В., 148  
 Протопопов В.А., 315  
 Проэнса Гарсия А., 213  
 Пятибратов М.Г., 216
- Редвуд Ч.С., 118  
 Рогачевский В.В., 69  
 Рогозовец Е.А., 118  
 Рожков Д.О., 112  
 Рожков С.В., 253  
 Розова Е.В., 218  
 Рощина В.В., 222  
 Рубцова С.Н., 156  
 Русина И.Ф., 93  
 Рыдченко В.С., 125
- Сабирова Д.Э., 224  
 Сабурова Е.А., 141  
 Саидова А.А., 128  
 Салмов Н.Н., 51, 69  
 Самсонов М.В., 116, 209, 306  
 Саркисян О.Г., 34  
 Саченков О.А., 20  
 Секунов А.В., 315  
 Селиванова О.М., 78  
 Сёмин Ф.А., 226  
 Сенотов А.С., 90, 109, 123, 178  
 Сечин Д.И., 229  
 Силантьева Д.И., 75
- Симонян А.О., 118  
 Сиренко В.В., 118  
 Смаглий Л.В., 125  
 Соболев К.В., 135, 232, 234  
 Соколова К.В., 194  
 Сопова И.Ю., 236  
 Старинец В.С., 24, 85  
 Стафеев Ю.С., 116, 209  
 Суворина М.Ю., 78  
 Сурин А.К., 78, 216  
 Сюткин А.С., 216
- Таланов Е.Ю., 24, 31, 85  
 Тамбовцева Р.В., 229, 238  
 Таран А.С., 240  
 Тарасова Е.О., 56, 244  
 Тарасова О.С., 303  
 Тарасова О.С., 72  
 Творогова А.В., 106, 128  
 Теньков К.С., 24, 85  
 Толстенков О.О., 247  
 Томиловская Е.С., 301, 309  
 Туртикова О.В., 250, 298  
 Тыганов С.А., 169, 253, 298
- Удальцов С.Н., 5, 188  
 Уланова А.Д., 51, 69, 148, 255  
 Улас Е.В., 257  
 Унгуриян Т.М., 99  
 Усик М.А., 260
- Фадеев Р.С., 90, 123  
 Фадеева И.С., 109, 178  
 Федоров Д.А., 263  
 Федоров О.В., 216  
 Федянин А.О., 20, 267  
 Фокин А.И., 270  
 Фролова М.Ю., 263  
 Фуралев В.А., 153, 273
- Хайтлина С.Ю., 276  
 Хапчаев А.Ю., 280, 306  
 Харитонов А.Е., 240  
 Хмара Т.В., 283, 287, 290  
 Хмиль Н.В., 31, 181  
 Ходько А.Т., 294  
 Хохлова А.Д., 41, 194
- Цаплина О.А., 276

Цатурян А.К., 43, 146

Шагимарданова Е.И., 59, 158, 168, 211

Шалагина М.Н., 315

Шарло К.А., 169, 250, 298

Шаронова М.А., 37

Швецова А.А., 72

Швирст Н.Э., 222

Шевчук К.З., 290

Шенкман Б.С., 22, 66, 169, 250, 253, 255, 298

Шигуева Т.А., 301

Шилова Л. Д., 303

Ширинский В.П., 116, 209, 280, 306

Шишкин Н.В., 309

Шомрон О., 61

Шоно Я.А., 47

Шумейко С.А., 51, 313

Щепкин Д.В., 37, 41, 43, 131, 146, 151, 165, 202

Щудрова Т.С., 96, 102

Юцкевич Я.А., 69

Яковлев А.А., 315

Якупова Э.И., 47, 51, 255, 313

Ямалитдинова Э.И., 224

Яшин В.А., 112

Adams V., 319

Bowen T. S., 319

Labeit S., 319

Lewis J., 319

Sehr P., 319

## INDEX OF AUTHORS

- Abramov A.A., 149  
 Adams V., 319  
 Akatov V.S., 91, 110, 124, 180  
 Alekseeva O.M., 12  
 Alieva I., 242  
 Amirova L.E., 311  
 Andrianov V.V., 15, 77  
 Antonov V.G., 174, 177  
 Averin A.S., 115  
 Avrova S.V., 119  
  
 Balezina O.P., 18, 58, 186, 215, 246  
 Baltin M.E., 21, 225  
 Baltin T.V., 269  
 Baltina T.V., 21  
 Belosludtsev K.N., 26, 29, 86  
 Belosludtseva N.V., 26, 29, 33, 183  
 Belousova E.S., 36  
 Belova S.P., 23, 256  
 Berg V.Y., 39, 42  
 Bershitsky S.Y., 39, 44, 147, 167, 152, 203  
 Bildyug N., 46  
 Birulina Yu.G., 126  
 Bobilev A.G., 49, 54, 71, 256, 314  
 Bobileva L.G., 49, 54, 80, 113, 189, 314  
 Bogacheva P.O., 58, 215  
 Bogodvid T.Kh., 15, 77  
 Bokov R.O., 60  
 Bondarenko T.P., 83  
 Borovikov Y.S., 119  
 Bowen T.S., 319  
 Boyarintseva T.V., 274  
 Bozhok G.A., 83  
 Brodsky I.B., 62  
 Bryndina I.G., 317  
 Burakov A.V., 259, 271  
 Butova K.A., 65, 195  
  
 Dayal A., 89  
 Deryabina I.B., 15, 77  
 Dobretsov M.G., 145  
 Drachuk V.M., 98  
 Dubinin M.V., 26, 86  
 Dubrov V.E., 154  
 Dudka Ye.A., 104  
 Dukhalin S., 89  
  
 Efremov E.E., 117, 210, 308  
 Eremeev A.A., 21, 268  
 Evstratova Y.V., 91, 124  
  
 Fadeev R.S., 91, 124  
 Fadeeva I.S., 110, 180  
 Fedianin A.O., 21, 268  
 Fedorov D.A., 265  
 Fedorov O.V., 217  
 Fokin A.I., 271  
 Frolova M.U., 265  
 Furalyov V.A., 154, 274  
  
 Gainutdinov Kh.L., 15, 77  
 Galeva A.V., 217  
 Galiullina N.V., 268  
 Galzitskaya O.V., 80  
 Gaydukov A.E., 58, 186, 246  
 Gaynullina D.K., 76, 304  
 Gazizova G.R., 60, 159, 169, 212  
 Gette I.F., 195  
 Globa V.Yu., 83  
 Gloushankova N.A., 157  
 Glyakina A.V., 80  
 Goroshko O.M., 98  
 Gritsyna Yu.V., 71, 256  
 Grygorieva P.V., 285  
 Gusakova S.V., 126  
 Gusev O.A., 60, 159, 169, 212  
  
 Hirschberg K., 62  
  
 Ignat'ev D.A., 115  
 Ivanov N.A., 317  
  
 Kapelko V.I., 149  
 Karpicheva O.E., 119  
 Kasumov E.A., 122  
 Kasumov R.E., 122  
 Kasumova I.V., 122  
 Kazakova O.A., 117, 210  
 Khaitlina S.Yu., 278  
 Khapchaev A.Y., 281, 308  
 Kharitonov A., 242  
 Khmara T.V., 285, 289, 292  
 Khmil N.V., 33, 183  
 Khodko A.T., 296

- Khokhlova A.D., 42, 195  
 Kirsanova P.O., 110, 180  
 Kitov V.V., 302  
 Kleymenov S.Y., 152  
 Kobyakova M.I., 91, 124  
 Komar T.V., 289  
 Kopylova G.V., 39, 42, 44, 133, 147, 152, 167, 203  
 Korotkov S.M., 136  
 Koryak Yu., 139  
 Kosarski L.S., 115  
 Koshcheeva O.I., 39  
 Kostyunina D.S., 74, 304  
 Koubassova N.A., 44, 147, 201  
 Kovalev I.V., 126  
 Kovaleva A.V., 130  
 Kozlovskaya I.B., 302  
 Kramarova L.I., 189  
 Krasnov K.S., 124  
 Krasovskaya I.E., 265  
 Kravchenko I.V., 154, 274  
 Kravtsova V.V., 142  
 Kreshchenko N.D., 249  
 Krivoi I.I., 142, 164  
 Krutetskaya N.I., 174, 175  
 Krutetskaya Z.I., 174, 175  
 Kubasov I.V., 145  
 Kuleva N.V., 265
- Labeit S., 319  
 Lagarkova M., 242  
 Lakomkin V.L., 149  
 Lankin V.Z., 117, 210, 308  
 Lebedeva E.V., 29  
 Lednev E.M., 154  
 Lehach E.I., 83  
 Levitsky D.I., 44, 147, 152, 167  
 Lewis J., 319  
 Litovka N.I., 157  
 Logvinova D.S., 167, 203  
 Lomovsky A.I., 91  
 Lookin O.N., 65, 198  
 Loseva T.D., 36  
 Lukoshkova E.V., 149  
 Lvova I.D., 252  
 Lysenko E.A., 60, 154, 159, 169, 212
- Makarov M.S., 161  
 Makhnovsky P.A., 60, 159, 169, 212
- Mankovskaya I.N., 220  
 Markov A.G., 164  
 Matchkov V., 74  
 Matyushenko A.M., 44, 147, 152, 167, 203  
 Mazhugin V.Y., 36  
 Medvedev M.A., 126  
 Medvedeva N., 89  
 Melnik T.N., 217  
 Melnikov I.Y., 171  
 Melnitskaya A.V., 174  
 Menshikh K.A., 180  
 Michurina S.S., 117, 210  
 Mikashinovich Z.I., 36  
 Mikhailova G.Z., 71, 113, 189  
 Mikheeva I.B., 29  
 Milenina L.S., 177  
 Minaychev V.V., 180  
 Minin A., 89  
 Mironov G.D., 33, 183, 220  
 Mirzoev T.M., 254  
 Miteva A.S., 58, 186, 246  
 Mochalova E.P., 23, 256  
 Molchanova A.I., 186, 246  
 Morenkov O.S., 71  
 Mosentsov A.A., 220  
 Muranova L.N., 15, 77  
 Murzina G.B., 192  
 Myachina T.A., 195, 198
- Nabiev S.R., 39, 44, 133, 147, 201, 203  
 Nadezhdina E.S., 62, 259, 271  
 Nakipova O.V., 115  
 Nekrasova T., 89  
 Nemirovskaya T.L., 23, 256  
 Nesterov V.P., 136, 235  
 Nezvetsky A.R., 205  
 Nikashin A.V., 308  
 Nikitina L.V., 39, 44, 147, 203  
 Nosarev A.V., 126  
 Novychenko S.D., 285
- Odintsova O.A., 110  
 Ogneva I.V., 262  
 Orlov N.Ya., 205  
 Osepyan A.Sh., 228  
 Ovechkin S.V., 317
- Panait A.I., 207  
 Panov A.A., 145

Paramonova I.I., 68, 252, 300  
 Pavlik L.L., 33  
 Petrova I.V., 126  
 Petrukhin O.V., 205  
 Pivovarov A.S., 192  
 Podkuychenko N.V., 117, 210  
 Pogorelov A.G., 207  
 Pogorelova V.N., 207  
 Popov D.V., 60, 154, 159, 169, 212  
 Popov V.O., 274  
 Popova S.S., 71, 113  
 Pravdivceva E.S., 58  
 Proensa Garsiia A., 215  
 Prosvirnin A.V., 149  
 Protopopov V.A., 317  
 Pyatibratov M.G., 217  
  
 Redwood C.S., 119  
 Rogachevsky V.V., 71  
 Rogozovets E.A., 119  
 Roshchina V.V., 216  
 Rozhkov D.O., 113  
 Rozhkov S.V., 254  
 Rozova E.V., 220  
 Rubtsova S.N., 157  
 Rusina I.F., 94  
 Rydchenko V.S., 126  
  
 Sabirova D.E., 225  
 Saburova E.A., 142  
 Sachenkov O.A., 21  
 Saidova A.A., 130  
 Salmov N.N., 54, 71  
 Samsonov M.V., 117, 210, 308  
 Sarkisjan O.G., 36  
 Sechin D.I., 231  
 Sehr P., 319  
 Sekunov A.V., 317  
 Selivanova O.M., 80  
 Senotov A.S., 93, 110, 124, 180  
 Shagimardanova E.I., 60, 159, 69 212  
 Shalagina M.N., 317  
 Sharlo K.A., 171, 252, 300  
 Sharonova M.A., 39  
 Shchepkin D.V., 39, 42, 44, 133, 147, 152, 167, 203  
 Shchudrova T.S., 98, 104  
 Shenkman B.S., 23, 68, 171, 252, 254, 256, 300  
  
 Shevchuk K.Z., 292  
 Shigueva T.A., 302  
 Shilova L.D., 304  
 Shirinsky V.P., 117, 210, 281, 308  
 Shishkin N.V., 311  
 Shomron O., 62  
 Shono Ya.A., 49  
 Shumeyko S.A., 54, 314  
 Shvetsova A.A., 74  
 Silantyeva D.I., 77  
 Simonyan A.O., 119  
 Sirenko V.V., 119  
 Smagliy L.V., 126  
 Sobol K.V., 136, 233, 235  
 Sokolova K.V., 195  
 Sopova I.Yu., 237  
 Stafeev I.S., 117, 210  
 Starinets V.S., 26, 86  
 Surin A.K., 80, 217  
 Suvorina M.Yu., 80  
 Svirst N.E., 216  
 Syomin F.A., 228  
 Syutkin A.S., 217  
  
 Talanov E.Yu., 26, 33, 86  
 Tambovtseva R.V., 231, 239  
 Taran A., 242  
 Tarasova E.O., 58, 246  
 Tarasova O.S., 74, 304  
 Tenkov K.S., 26, 86  
 Tolstenkov O.O., 249  
 Tomilovskaya E.S., 302, 311  
 Tsaplina O.A., 278  
 Tsureyan A.K., 44, 147  
 Turtikova O.V., 252, 300  
 Tvorogova A.V., 107, 130  
 Tyganov S.A., 171, 254, 300  
  
 Udaltsov S.N., 8, 189  
 Ulanova A.D., 54, 71, 149, 256  
 Ulas E.W., 259  
 Unguryan T.M., 101  
 Usik M.A., 262  
  
 Vdovkin P.P., 145  
 Venediktova N.I., 33  
 Vikhlyantsev I.M., 49, 54, 71, 80, 149, 171, 256, 314  
 Vilchinskaya N.A., 68, 252

Vinogradova O.L., 159, 169  
Vishnevskaya Z.I., 8  
Vlasik T.N., 117, 210, 308  
Vorobjev I.A., 107, 130  
Vorotnikov A.V., 117, 210, 308  
  
Yakovlev A.A., 317  
Yakupova E.I., 49, 54, 256, 314  
Yamalitdinova E.I., 225  
Yashin V.A., 113  
Yutskevich Y.A., 71  
  
Zakyarova N.M., 71  
Zamorskii I.I., 98, 101, 104, 289  
  
Zaytsev M.A., 21, 268  
Zaytseva T.N., 126  
Zgoda V.G., 60, 169  
Zhalimov V.K., 256  
Zhapparova O.N., 271  
Zhigacheva I.V., 94  
Zhitnyak I.Y., 157  
Ziganshin R.H., 189  
Zinovieva O.E., 113  
Zubkova O., 242  
Zvorykina E.I., 107  
Zvyagina A.I., 110

## СО Д Е Р Ж А Н И Е

Зоя Александровна Подлубная – талантливый ученый и организатор науки	5
<i>З.И. Вишневецкая, С.Н. Удальцов</i>	
Сочетанное действие кофеина и ионов магния на кальциевые депо скелетных мышц	11
<i>О.М. Алексеева</i>	
Эффекты донора оксида азота и блокатора NO-синтазы на электрические характеристики нейронов виноградной улитки	14
<i>В.В. Андрианов, Т.Х. Богодвид, Л.Н. Муранова, И.Б. Дерябина, Х.Л. Гайнутдинов</i>	
Роль ретроградно действующих миокинов в регуляции моторных синапсов	17
<i>О.П. Балезина</i>	
Роль нейронных и механических воздействий в поддержании функциональных свойств мышц задней конечности у крысы	20
<i>М.Э. Балтин, А.О. Федянин, М.А. Зайцев, О.А. Саченков, А.А. Еремеев, Т.В. Балтина</i>	
Влияние ингибитора гистондеацетилазы I на экспрессию ключевых E3-убиквитинлигаз при функциональной разгрузке m. soleus крыс	22
<i>С.П. Белова, Е.П. Мочалова, Б.С. Шенкман, Т.Л. Немировская</i>	
Особенности структуры и функции белкового комплекса Ca <sup>2+</sup> -унипортера в митохондриях печени крыс с разной устойчивостью к гипоксии	24
<i>К.Н. Белослудцев, Н.В. Белослудцева, К.С. Теньков, Е.Ю. Таланов, В.С. Старинец, М.В. Дубинин</i>	
Особенности функционирования митохондриальных систем транспорта ионов кальция у крыс при развитии сахарного диабета I типа	28
<i>К.Н. Белослудцев, Е.В. Лебедева, И.Б. Михеева, Н.В. Белослудцева</i>	
Структурно-функциональные изменения митохондрий печени крыс при гипертиреозе	31
<i>Н.В. Белослудцева, Л.Л. Павлик, Н.И. Венедиктова, Н.В. Хмель, Е.Ю. Таланов, Г.Д. Миронова</i>	
Морфо-биохимические изменения в мышечной ткани крыс после длительного введения симвастатина	34
<i>Е.С. Белоусова, З.И. Микашинович, О.Г. Саркисян, Т.Д. Лосева, В.Ю. Мажугин</i>	
Сравнение влияния omecamtiv mecarbil на взаимодействие сердечного и скелетного миозина с тонким филаментом	37
<i>В.Ю. Берг, С.Р. Набиев, О.И. Коцеева, М.А. Шаронова, Л.В. Никитина, С.Ю. Бершицкий, Д.В. Щепкин, Г.В. Копылова</i>	
Влияние экспериментального диабета I типа на функцию миозина из левого и правого желудочков крыс	41
<i>В.Ю. Берг, Д.В. Щепкин, А.Д. Хохлова, Г.В. Копылова</i>	
Влияние дисульфидной сшивки цепей тропомиозина на его структурные и функциональные свойства	43
<i>С.Ю. Бершицкий, Г.В. Копылова, Н.А. Кубасова, Д.И. Левицкий, А.М. Матюшенко, С.Р. Набиев, Л.В. Никитина, Д.В. Щепкин, А.К. Цатурян</i>	



Саркомерные белки миозин и $\alpha$ -актинин выходят из актин-содержащих структур при перестройке сократительного аппарата кардиомиоцитов <i>Н.Б. Бильдюг</i>	45
Возможная физиологическая роль обратимой амилоидной агрегации титина <i>А.Г. Бобылёв, Э.И. Якупова, Я.А. Шоно, Л.Г. Бобылёва, И.М. Вихлянец</i>	47
Миозин-связывающий белок С формирует амилоидоподобные агрегаты <i>in vitro</i> <i>Л.Г. Бобылёва, С.А. Шумейко, Э.И. Якупова, А.Д. Уланова, Н.Н. Салмов, И.М. Вихлянец, А.Г. Бобылёв</i>	51
Тромбин потенцирует синаптическую передачу в моторных синапсах мышцы с разным функциональным статусом <i>П.О. Богачева, Е.О. Тарасова, А.С. Митева, Е.С. Правдивцева, А.Е. Гайдуков, О.П. Балезина</i>	56
Влияние аэробной тренировки на регуляцию экспрессии митохондриальных белков в скелетной мышце человека <i>Р.О. Боков, Е.И. Шагимарданова, Г.Р. Газизова, В.Г. Згода, П.А. Махновский, Е.А. Лысенко, О.А. Гусев, Д.В. Попов</i>	59
Подвижность ERES в цитоплазме увеличивается при отходе от них транспортных везикул <i>И.Б. Бродский, О. Шомрон, К. Гиришберг, Е.С. Надеждина</i>	61
Влияние механических условий деформации на сократительный ответ миокарда <i>К.А. Бутова, О.Н. Лукин</i>	63
Влияние соотношения АТФ/АМФ на экспрессию медленного миозина во время гравитационной разгрузки <i>Н.А. Вильчинская, И.И. Парамонова, Б.С. Шенкман</i>	66
Преобладающий синтез гигантских белков саркомерного цитоскелета в поперечно-полосатых мышцах длиннохвостого суслика ( <i>Spermophilus undulatus</i> ) в периоды зимней активности <i>И.М. Вихлянец, С.С. Попова, А.Д. Уланова, Ю.В. Грицына, Н.Н. Салмов, В.В. Рогачевский, Г.З. Михайлова, А.Г. Бобылёв, Я.А. Юцкевич, О.С. Моренков, Н.М. Захарова</i>	69
Особенности гомеостаза ионов хлора в раннем постнатальном онтогенезе: сходство клеток сосудистой системы и ЦНС <i>Д.К. Гайнуллина, Д.С. Костюнина, А.А. Швецова, В. Мачков, О.С. Тарасова</i>	72
Выработка условного оборонительного рефлекса на обстановку у виноградной улитки вызывает увеличение возбудимости как командных нейронов, так и серотонинсодержащих нейронов педального ганглия <i>Х.Л. Гайнутдинов, В.В. Андрианов, Т.Х. Богодвид, И.Б. Дерябина, Л.Н. Муранова, Д.И. Силантьева</i>	75
Существует ли двойная спираль актина? Новая модель укладки мономеров актина в фибрилле <i>О.В. Галзитская, А.В. Глякина, А.К. Сурин, О.М. Селиванова, Л.Г. Бобылёва, М.Ю. Суворина, И.М. Вихлянец</i>	78
Биологическая подвижность мочевого пузыря крыс с инфравезикальной обструкцией <i>В.Ю. Глоба, Г.А. Божок, Т.П. Бондаренко, Е.И. Легач</i>	82

Особенности транспорта кальция и индукции кальций-зависимой поры в митохондриях скелетных мышц дистрофин-дефицитных мышечей MDX <i>М.В. Дубинин, К.С. Теньков, В.С. Старинец, Е.Ю. Таланов, К.Н. Белослудцев</i>	85
Исследование взаимодействия десмина с митохондриями <i>in vitro</i> <i>С. Духалин, Н. Медведева, Т. Некрасова, А. Даял, А. Минин</i>	88
Резистентность клеток острого миелоидного лейкоза к trail-индуцированному апоптозу, опосредованная адгезией к внеклеточному матриксу <i>Я.В. Евстратова, М.И. Кобякова А.С. Сенотов, А.И. Ломовский, В.С. Акатов, Р.С. Фадеев</i>	90
N-ацетилцистеинат-2-этил-6-метил-3-гидроксипиридин предотвращает дисфункцию митохондрий в условиях стресса <i>И.В. Жигачева, И.Ф. Русина</i>	93
Нефропротекторные эффекты адеметионина при рабдомиолитическом остром повреждении почек <i>И.И. Заморский, В.М. Драчук, Т.С. Щудрова, А.М. Горошко</i>	96
Усиление активности антиоксидантной системы церулоплазмином в условиях рабдомиолиза <i>И.И. Заморский, Т.М. Унгуриян</i>	99
Защитное действие мелатонина при рабдомиолиз-индуцированном повреждении почек <i>И.И. Заморский, Т.С. Щудрова, Е.А. Дудка</i>	102
Пространственная организация роста микротрубочек в клетках с мезенхимальным типом подвижности <i>Е.И. Зворыкина, А.В. Творогова, И.А. Воробьев</i>	106
Интенсивность репопуляции биоматериалов на основе серозных оболочек зависит от полярного индуцирующего эффекта их внеклеточного матрикса <i>А.И. Звягина, А.С. Сенотов, П.О. Кирсанова, О.А. Одицова, В.С. Акатов, И.С. Фадеева</i>	109
Трансформация миозинового фенотипа в мышце, выпрямляющей позвоночник, при хронических неспецифических болях в спине <i>О.Е. Зиновьева, Д.О. Рожков, Л.Г. Бобылева, С.С. Попова, В.А. Яшин, Г.З. Михайлова</i>	112
Сравнительный анализ ритмоинотропных характеристик в папиллярной мышце сердца суслика и частоты сердечных сокращений интактных животных <i>Д.А. Игнатьев, А.С. Аверин, Л.С. Косарский, О.В. Накипова</i>	113
Пальмитиновая кислота вызывает карбонильный стресс и изменяет барьерные свойства эндотелиальных клеток HUVEC <i>О.А. Казакова, М.В. Самсонов, Н.В. Подкуйченко, С.С. Мичурина, Ю.С. Стафеев, Е.Е. Ефремов, Т.Н. Власик, В.З. Ланкин, А.В. Воротников, В.П. Ширинский</i>	116
Механизмы мышечной дисфункции при точечных мутациях в тропомиозине <i>О.Е. Карпичева, В.В. Сиренко, А.О. Симонян, Е.А. Рогозовец, С.В. Аврова, Ч.С. Редвуд, Ю.С. Боровиков</i>	118
Новая модель функционирования АТФазного молекулярного мотора <i>Э.А. Касумов, Р.Э. Касумов, И.В. Касумова</i>	121

Повышение устойчивости клеток острого миелоидного лейкоза к действию антрациклинов при активации гомотипической межклеточной адгезии <i>М.И. Кобякова, А.С. Сенотов, Я.В. Евстратова, К.С. Краснов, В.С. Акатов, Р.С. Фадеев</i>	123
Изучение механизмов влияния газотрансмиттеров и гипоксии на гладкие мышцы <i>И.В. Ковалев, Ю.Г. Бирзулина, С.В. Гусакова, Л.В. Смаглий, А.В. Носарев, И.В. Петрова, В.С. Рыдченко, Т.Н. Зайцева, М.А. Медведев</i>	125
Роль микротрубочек в динамике фокальных контактов при распластывании фибробластов <i>А.В. Ковалева, А.В. Творогова, А.А. Саидова, И.А. Воробьев</i>	128
Влияние сердечного миозина связывающего белка С на кальциевую регуляцию взаимодействия миозина медленной скелетной мышцы (m. soleus) с актином <i>Г.В. Копылова, С.Р. Набиев, Д.В. Щепкин</i>	131
Влияние $Ca^{2+}$ на спонтанное сокращение сердечной мышцы и на энергетические процессы в митохондриях кардиомиоцитов <i>С.М. Коротков, В.П. Нестеров, К.В. Соболев</i>	135
Электростимуляция мышц в условиях сниженной активности и ее влияние на архитектуру и функцию <i>Ю.А. Коряк</i>	137
Структурно-функциональные характеристики концевых пластинок при различных формах нарушения двигательной активности <i>В.В. Кравцова, Е.А. Сабурова, И.И. Кривой</i>	141
Микроэлектродное картирование изолированного сердца крысы после перенесенного экспериментального инфаркта миокарда <i>И.В. Кубасов, М.Г. Добрецов, П.П. Вдовкин, А.А. Панов</i>	143
Влияние точечных аминокислотных замен в C- и N-концевых фрагментах молекулы тропомиозина на ее свойства <i>Н.А. Кубасова, Г.В. Копылова, А.М. Матюшенко, С.Р. Набиев, Л.В. Никитина, Д.В. Щепкин, С.Ю. Берещицкий, А.К. Цатурия, Д.И. Левицкий</i>	146
Изменение изоформного состава титина в ранней стадии хронической сердечной недостаточности <i>В.Л. Лакомкин, А.А. Абрамов, А.Д. Уланова, И.М. Вихлянцева, А.В. Просвирнин, Е.В. Лукошкова, В.И. Капелько</i>	148
Сравнительные исследования структурных и функциональных свойств различных изоформ тропомиозина скелетных мышц человека <i>Д.И. Левицкий, А.М. Матюшенко, Д.В. Щепкин, Г.В. Копылова, С.Ю. Клейменов, С.Ю. Берещицкий</i>	151
Влияние аминокислот на экспрессию гена <i>IGF1</i> в миотубах и скелетной мышце человека <i>Е.М. Леднев, И.В. Кравченко, В.А. Фуралев, Е.А. Лысенко, В.Э. Дубров, Д.В. Попов</i>	153
Анализ ранних этапов эпителиально-мезенхимального перехода: механизмы формирования миграционного фенотипа у эпителиальных клеток <i>Н.И. Литовка, С.Н. Рубцова, И.Ю. Житняк, Н.А. Глушанкова</i>	156

Сравнение базального транскриптома в нетренированной и в адаптированной к силовым нагрузкам скелетной мышце человека <i>Е.А. Лысенко, П.А. Махновский, Е.И. Шагимарданова,</i>	158
<i>Г.Р. Газизова, О.А. Гусев, Д.В. Попов, О.Л. Виноградова</i>	
Факторы, инициирующие образование ламеллы у тромбоцитов человека <i>М.С. Макаров</i>	160
Функциональное взаимодействие Na,K-АТФазы и клаудинов <i>А.Г. Марков, И.И. Кривой</i>	162
Влияние β-цепи тропомиозина на свойства тонкой нити и характеристики актин-миозинового взаимодействия в мышце <i>А.М. Матюшенко, Д.С. Логвинова, Д.В. Щепкин, Г.В. Копылова,</i>	165
<i>Д.И. Левицкий, С.Ю. Берещицкий</i>	
Роль транскрипции в регуляции содержания высокопредставленных белков в скелетной мышце человека <i>П.А. Махновский, В.Г. Згода, Г.Р. Газизова, Е.И. Шагимарданова,</i>	168
<i>Е.А. Лысенко, О.А. Гусев, Д.В. Попов</i>	
Влияние L-аргинина на кальпаин-зависимую деградацию белков цитоскелета и жесткость m. soleus в условиях моделируемой невесомости <i>И.Ю. Мельников, К.А. Шарло, И.М. Вихлянцев, С.А. Тыганов,</i>	169
<i>Б.С. Шенкман</i>	
Галоперидол модулирует влияние глутоксима на транспорт Na <sup>+</sup> в коже лягушки <i>А.В. Мельницкая, З.И. Крутецкая, Н.И. Крутецкая, В.Г. Антонов</i>	172
Трициклический антидепрессант амитриптилин модулирует Са <sup>2+</sup> -ответы, индуцируемые глутоксином и моликсаном в макрофагах <i>Л.С. Миленина, З.И. Крутецкая, Н.И. Крутецкая, В.Г. Антонов</i>	175
Агрегация частиц наноразмерного гидроксиапатита как основной фактор ограничения биоинтеграции остеопластических материалов на его основе <i>В.В. Минайчев, И.С. Фадеева, П.О. Кирсанова, К.А. Меньших,</i>	178
<i>А.С. Сенотов, В.С. Акатов</i>	
Механизмы адаптации организма к гипоксии, роль митохондриального АТФ-зависимого калиевого канала <i>Г.Д. Миронова, Н.В. Хмель, Н.В. Белослудцева</i>	181
Активация P2X7-рецепторов потенцирует синаптическую передачу и функционально противодействует P2Y13-рецепторам в моторных синапсах мыши <i>А.С. Митева, А.И. Молчанова, А.Е. Гайдуков, О.П. Базелина</i>	185
Пептид TSKY, выделенный из мозга зимоспящих сусликов <i>Spermophilus undulatus</i> , полимеризует актин в условиях <i>in vitro</i> <i>Г.З. Михайлова, Л.Г. Бобылева, С.Н. Удальцов, Р.Х. Зиганшин,</i>	188
<i>Л.И. Крамарова</i>	
Мобильность мембранных рецепторов – один из механизмов изменения холиночувствительности нейронов <i>Г.Б. Мурзина, А.С. Пивоваров</i>	190
Исследование региональной неоднородности сокращения кардиомиоцитов при экспериментальном сахарном диабете 1 типа <i>Т.А. Мячина, К.А. Бутова, К.В. Соколова, И.Ф. Гетте, А.Д. Хохлова</i>	194

Разработка и программная реализация алгоритма определения средней длины саркомера кардиомиоцита <i>Т.А. Мячина, О.Н. Лукин</i>	197
Механические характеристики одиночных волокон медленных скелетных мышц <i>С.Р. Набиев, Н.А. Кубасова</i>	200
Исследование влияния фосфорилирования существенных легких цепей миозина на актин-миозиновое взаимодействие <i>С.Р. Набиев, Д.С. Логвинова, А.М. Матюшенко, Л.В. Никитина, Г.В. Копьлова, Д.В. Щепкин, С.Ю. Бершицкий</i>	202
Экзофосфодиэстераза циклических нуклеотидов плазмодия <i>Physarum polycephalum</i> <i>А.Р. Незвецкий, О.В. Петрухин, Н.Я. Орлов</i>	204
Окислительный стресс не является обязательным атрибутом апоптоза у раннего эмбриона мышцы <i>А.Г. Погорелов, А.И. Панаит, В.Н. Погорелова</i>	206
Роль диабет-ассоциированных дикарбониллов в дисфункции эндотелиальных клеток <i>in vitro</i> <i>Н.В. Подкуйченко, М.В. Самсонов, О.А. Казакова, С.С. Мичурина, Ю.С. Стафеев, Е.Е. Ефремов, Т.Н. Власик, В.З. Ланкин, А.В. Воротников, В.П. Ширинский</i>	209
Транскриптомный ответ на однократную и на регулярные аэробные физические нагрузки в скелетной мышце человека <i>Д.В. Попов, П.А. Махновский, Е.И. Шагимарданова, Г.Р. Газизова, Е.А. Лысенко, О.А. Гусев</i>	211
Облегчение спонтанной секреции медиатора в функционально различающихся типах скелетных мышц мышши под действием АТФ <i>А. Проэнса Гарсия, П.О. Богачева, О.П. Балезина</i>	213
Дуэт археллинов стабилизирует структуру жгутика <i>М.Г. Пятибратов, А.С. Сюткин, Т.Н. Мельник, А.К. Сурин, А.В. Галева, О.В. Федоров</i>	216
Влияние модуляции активности АТФ-зависимых $K^+$ -каналов на ультраструктуру ткани продолговатого мозга при экспериментальном паркинсонизме <i>Е.В. Розова, И.Н. Маньковская, А.А. Мосенцов, Г.Д. Миронова</i>	218
Подвижность планарий и моллюсков чувствительна к выделениям харовых водорослей, содержащих холинэстеразу и биогенные амины <i>В.В. Рощина, Н.Э. Швирст</i>	222
Функциональные изменения спинальных центров при различных введениях метилпреднизолона у крыс с травмой спинного мозга <i>Д.Э. Сабирова, Б.Э. Балтин, Э.И. Ямалтдинова</i>	224
Приложение многомасштабной модели левого желудочка для изучения влияния клапанных пороков и аритмии на производительность сердца в системе кровообращения <i>Ф.А. Сёмин, А.Ш. Осепян</i>	226
Двигательные функции спортсменов под воздействием гипоксического стимула <i>Д.И. Сечин, Р.В. Тамбовцева</i>	229
Продукты метаболизма пробиотических бактерий, стимулируют мышечное сокращение и кальциевый гомеостаз <i>К.В. Соболев</i>	232

Регуляция сердечных сокращений человека при гипоксическом воздействии <i>К.В. Соболев, В.П. Нестеров</i>	234
Влияние острой гипоксии на подвижность крыс в «открытом поле»: подкрепление биохимическими детерминантами гипоксического влияния в базальных ядрах мозга <i>И.Ю. Сопова</i>	236
Генетическая детерминация мышечных волокон I типа и спортивный результат у спортсменов-легкоатлетов <i>Р.В. Тамбовцева</i>	238
Исследование морфологических нарушений цитоскелетных структур, приводящих к изменению клеточной подвижности фибробластов, полученных из кожи пациентов с болезнью Гентингтона <i>А.С. Таран, О.А. Зубкова, А.Е. Харитонов, М.А. Лагарькова, И.Б. Алиева</i>	240
Множественные механизмы усиления синаптической передачи под действием BDNF в моторных синапсах мыши <i>Е.О. Тарасова, А.И. Молчанова, А.С. Митева, А.Е. Гайдуков, О.П. Балезина</i>	244
Влияние серотонина на двигательную активность личинок плоских червей <i>О.О. Толстенков, Н.Д. Крещенко</i>	247
Ответ камбаловидной мышцы крысы на тенотомию <i>О.В. Туртикова, Н.А. Вильчинская, И.И. Парамонова, К.А. Шарло, И.Д. Львова, Б.С. Шенкман</i>	250
Влияние высокоинтенсивных сокращений на анаболические процессы в изолированной <i>m. soleus</i> на фоне гравитационной разгрузки <i>С.А. Тыганов, С.В. Рожков, Т.М. Мирзоев, Б.С. Шенкман</i>	253
Влияние ингибирования гистондеацетилазы 1 на содержание титина, уровень его фосфорилирования и экспрессию гена <i>TTN</i> в <i>m. soleus</i> крысы после трехсуточной функциональной разгрузки <i>А.Д. Уланова, Ю.В. Грицына, А.Г. Бобылёв, Э.И. Якупова, В.К. Жалимов, С.П. Белова, Е.П. Мочалова, Т.Л. Немировская, Б.С. Шенкман, И.М. Вихлянцев</i>	255
Изменение концентрации малой ГТФ-азы ARL4C/ARL7 в культурах клеток HELA и VERO при воздействии лигандами транскрипционного фактора LXR/RXR <i>Е.В. Улас, Е.С. Надеждина, А.В. Бураков</i>	257
Параметры подвижности сперматозоидов мышей после гравитационной разгрузки и раннего периода реадaptации <i>М.А. Усик, И.В. Огнева</i>	260
Эффекты тяжелой гипобарической гипоксии и ингибирования индуцируемого гипоксией фактора HIF-1 на сердечную и скелетные мышцы <i>Д.А. Федоров, М.Ю. Фролова, И.Е. Красовская, Н.В. Кулева</i>	263
Состояние нейро-моторного аппарата камбаловидной мышцы крысы при гравитационной разгрузке: эффекты стимуляции спинного мозга <i>А.О. Федянин, Н.В. Галиуллина, М.А. Зайцев, Т.В. Балтина, А.А. Еремеев</i>	267
Киназа SLK/LOSK участвует в образовании первичной реснички, регулируя centrosомный пул PCM-1 посредством радиальной системы микротрубочек <i>А.И. Фокин, О.Н. Жаппарова, А.В. Бураков, Е.С. Надеждина</i>	270

Вещества, освобождающиеся из скелетной мышцы в процессе сокращения, стимулируют ее рост <i>В.А. Фуралёв, И.В. Кравченко, Т.В. Бояринцева, В.О. Попов</i>	273
Протеолитически модифицированный актин как модель для получения неожиданных результатов <i>С.Ю. Хайтлина, О.А. Цаплина</i>	276
Фосфорилирование в актин-связывающих доменах регулирует локализацию киназы легких цепей миозина на микрофиламентах и повышает активность фермента в клетках <i>А.Ю. Хапчаев, В.П. Ширинский</i>	280
Особенности внутримышечного ветвления артерий в мышцах медиальной группы бедра у плодов человека <i>Т.В. Хмара, П.В. Григорьева, С.Д. Новиченко</i>	283
Особенности внутримышечного ветвления нервов в мышцах задней группы голени у плодов человека <i>Т.В. Хмара, Т.В. Комар, И.И. Заморский</i>	287
Особенности кровоснабжения и иннервации мышц плечевого пояса у плодов человека <i>Т.В. Хмара, К.З. Шевчук</i>	290
Об общности механизмов перехода в состояние холодового анабиоза в биообъектах различного уровня организации <i>А.Т. Ходько</i>	294
NFAT-зависимая регуляция экспрессии миозинов при механической опорной стимуляции на ранних сроках функциональной разгрузки <i>К.А. Шарло, И.И. Парамонова, С.А. Тыганов, О.В. Туртикова, Б.С. Шенкман</i>	298
Характеристики точностного управления движениями в условиях меняющейся гравитационной среды <i>Т.А. Шигуева, В.В. Китов, Е.С. Томиловская, И.Б. Козловская</i>	301
Влияние ацидоза на сократительные ответы артерий в раннем постнатальном онтогенезе <i>Л. Д. Шилова, Д. С. Костюнина, Д. К. Гайнуллина, О. С. Тарасова</i>	303
Окислительный стресс и проницаемость эндотелия <i>В.П. Ширинский, М.В. Самсонов, А.В. Воротников, А.Ю. Хапчаев, А.В. Никашин, В.З. Ланкин, Т.Н. Власик, Е.Е. Ефремов</i>	306
Исследование влияния низкочастотной электростимуляции, проводимой в ходе «сухой» иммерсии, на характеристики вертикальной стойки <i>Н.В. Шишкин, Л.Е. Амирова, Е.С. Томиловская</i>	309
Амилоидные агрегаты гладкомышечного титина не активируют систему комплемента <i>in vitro</i> <i>С.А. Шумейко, Л.Г. Бобылёва, И.М. Вихлянец, А.Г. Бобылёв, Э.И. Якупова</i>	313
Сфинголипидные механизмы атрофии мышц при гипогравитационной разгрузке <i>А.А. Яковлев, В.А. Протопопов, М.Н. Шалагина, А.В. Секунов, С.В. Овечкин, Н.А. Иванов, И.Г. Брындина</i>	315
Small-molecules directed to the titin filament as a potential novel strategy to attenuate muscle stress response pathways and modulate strain responses V. <i>Adams, T. S. Bowen, P. Sehr, J. Lewis, S. Labeit</i>	319
АВТОРСКИЙ УКАЗАТЕЛЬ	320

## CONTENTS

Zoya Aleksandrovna Podlubnaya – talented scientist and organizer of science <i>Z.I. Vishnevskaya, S.N. Udaltsov</i>	8
Complex actions of caffeine and magnesium ions to the calcium depo of skeletal musces <i>O.M. Alekseeva</i>	12
The effects of a donor of nitric oxide and inhibitor of NO-synthase on the electrical characteristics of neurons of terrestrial snail <i>V.V. Andrianov, T.Kh. Bogodvid, L.N. Muranova, I.B. Deryabina, Kh.L. Gainutdinov</i>	15
Role of retrograde acting myokines in regulation of motor synapses <i>O.P. Balezina</i>	18
The role of neural and mechanical impacts in maintaining the functional properties of the muscle of the back limb in the rat <i>M.E. Baltin, A.O. Fedianin, M.A. Zaytsev, O.A. Sachenkov, A.A. Ereemeev, T.V. Baltina</i>	21
Influence of HDAC1 inhibitor on the E3 ligases expression in rat soleus during hindlimb unloading <i>S.P. Belova, E.P. Mochalova, B.S. Shenkman, T.L. Nemirovskaya</i>	23
Features of the structure and function of the Ca <sup>2+</sup> uniporter complex of liver mitochondria of rats with different resistance to hypoxia <i>K.N. Belosludtsev, N.V. Belosludtseva, K.S. Tenkov, E.Y. Talanov, V.S. Starinets, M.V. Dubinin</i>	26
Features of functioning of mitochondrial calcium ion transport systems in rats with type I diabetes mellitus <i>K.N. Belosludtsev, E.V. Lebedeva, I.B. Mikheeva, N.V. Belosludtseva</i>	29
Ultrastructural and functional changes in rat liver mitochondria of rats with hyperthyroidism <i>N.V. Belosludtseva, L.L. Pavlik, N.I. Venediktova, N.V. Khmil, E.Yu. Talanov, G.D. Mironova</i>	33
Morpho-biochemicals changes at rats muscle tissue after prolonged simvastatin intake <i>E.S. Belousova, Z.I. Mikashinowich, O.G. Sarkisjan, T.D. Loseva, V.Y. Mazhugin</i>	36
Comparison of the effect of omecamtiv mecarbil on the interaction of cardiac and skeletal myosin with the thin filament <i>V.Y. Berg, S.R. Nabiev, O.I. Koshcheeva, M.A. Sharonova, L.V. Nikitina, S.Y. Bershitsky, D.V. Shchepkin, G.V. Kopylova</i>	39
The effects of experimental diabetes type 1 on the function of myosin from the left and right ventricles <i>V.Y. Berg, D.V. Shchepkin, A.D. Khokhlova, G.V. Kopylova</i>	42
Effects of disulfide cross-linking of $\alpha$ -tropomyosin on its structure and function <i>S.Y. Bershitsky, G.V. Kopylova, N.A. Koubassova, D.I. Levitsky, A.M. Matyushenko, S.R. Nabiev, L.V. Nikitina, D.V. Shchepkin, A.K. Tsaturyan</i>	44
Sarcomeric myosin and $\alpha$ -actinin release from the actin structures during the rearrangement of contractile apparatus in cardiomyocytes <i>N. Bilydug</i>	46



A possible physiological role of reversible amyloid aggregation of titin	
<i>A.G. Bobylev, E.I. Yakupova, Ya.A. Shono, L.G. Bobyleva, I.M. Vikhlyantsev</i>	49
Myosin binding protein-C forms amyloid-like aggregates <i>in vitro</i>	
<i>L.G. Bobyleva, S.A. Shumeyko, E.I. Yakupova, A.D. Ulanova,</i>	54
<i>N.N. Salmov, I.M. Vikhlyantsev, A.G. Bobylev</i>	
Thrombin potentiates synaptic transmission in mouse motor synapses with different functional status	
<i>P.O. Bogacheva, E.O. Tarasova, A.S. Miteva, E.S. Pravdivceva,</i>	
<i>A.E. Gaydukov, O.P. Balezina</i>	58
Effect of aerobic training on the regulation of the expression of mitochondrial proteins in human skeletal muscle	
<i>R.O. Bokov, E.I. Shagimardanova, G.R. Gazizova, V.G. Zgoda,</i>	60
<i>P.A. Makhnovsky, E.A. Lysenko, O.A. Gusev, D.V. Popov</i>	
Cargo loading increases ERES motility in cytoplasm	
<i>I.B. Brodsky, O. Shomron, K. Hirschberg, E.S. Nadezhkina</i>	62
The effects of mechanical conditions of deformation on myocardial contractile response	
<i>K.A. Butova, O.N. Lookin</i>	65
The influence of the ATP/AMP ratio on the expression of slow myosin during gravitational unloading	
<i>N.A. Vilchinskaya, I.I. Paramonova, B.S. Shenkman</i>	68
The predominant synthesis of giant myofibrillar proteins in striated muscles of long-tailed ground squirrel ( <i>Spermophilus undulatus</i> ) during interbout arousal	
<i>I.M. Vikhlyantsev, S.S. Popova, A.D. Ulanova, Yu.V. Gritsyna,</i>	71
<i>N.N. Salmov, V.V. Rogachevsky, G.Z. Mikhailova, A.G. Bobylev,</i>	
<i>Y.A. Yutskevich, O.S. Morenkov, N.M. Zakyarova</i>	
Homeostasis of chloride ions in early postnatal ontogenesis: the similarity of vascular system and CNS	
<i>D.K. Gaynullina, D.S. Kostyunina, A.A. Shvetsova, V. Matchkov, O.S. Tarasova</i>	74
Elaboration of conditioned defensive reflex to the environment in the terrestrial snail causes an increase in excitability as of command neurons and serotonergic neurons of the pedal ganglion	
<i>Kh.L. Gainutdinov, V.V. Andrianov, T.Kh. Bogodvid, I.B. Deryabina,</i>	77
<i>L.N. Muranova, D.I. Silantyeva</i>	
Is there actin double helix? New model of stacking actin monomers in fibrils	
<i>O.V. Galziiskaya, A.V. Glyakina, A.K. Surin, O.M. Selivanova,</i>	80
<i>L.G. Bobyleva, M.Yu. Suvorina, I.M. Vikhlyantsev</i>	
Biological motility of the urinary bladder of rats with bladder outlet obstruction	
<i>V.Yu. Globa, G.A. Bozhokl, T.P. Bondarenko, E.I. Lehach</i>	83
Features of calcium transport and induction of calcium-dependent pore in skeletal muscle mitochondria of the dystrophin-deficient MDX mouse	
<i>M.V. Dubinin, K.S. Tenkov, V.S. Starinets, E.Yu. Talanov, K.N. Belosludtsev</i>	86
Analysis of desmin interaction with mitochondria <i>in vitro</i>	
<i>S. Dukhalin, N. Medvedeva, T. Nekrasova, A. Dayal, A. Minin</i>	89
Resistance of acute myeloid leukemia cells to trail-induced apoptosis mediated by adhesion to extracellular matrix	
<i>Y.V. Evstratova, M.I. Kobyakova, A.S. Senotov, A.I. Lomovsky,</i>	91
<i>V.S. Akatov, R.S. Fadeev</i>	

N-acetylcysteinate-2-ethyl-6-methyl-3-hydroxypyridine prevents mitochondrial dysfunction in stress conditions <i>I.V. Zhigacheva, I.F. Rusina</i>	94
Nephroprotective effects of ademetionine in acute kidney injury induced by rhabdomyolysis <i>I.I. Zamorskii, V.M. Drachuk, T.S. Shchudrova, O.M. Goroshko</i>	98
The strengthening of the activity of antioxidant system by ceruloplasmin in the conditions of rabdomioliz <i>I.I. Zamorskii, T.M. Unguryan</i>	101
Protective effect of melatonin against rhabdomyolysis-induced acute kidney injury in rats <i>I.I. Zamorskii, T.S. Shchudrova, Ye.A. Dudka</i>	104
Spatial organisation of microtubules in cells with the mesencymal type of motility <i>E.I. Zvorykina, A.V. Tvorogova, I.A. Vorobjev</i>	107
The intensity of repopulation of biomaterials based on serous membranes depends on the polar inducing effect of their extracellular matrix <i>A.I. Zvyagina, A.S. Senotov, P.O. Kirsanova, O.A. Odintsova, V.S. Akatov, I.S. Fadeeva</i>	110
Transformation of the myosin phenotype in the muscle straightening the spine with chronic nonspecific back pain <i>O.E. Zinovieva, D.O. Rozhkov, L.G. Bobyleva, S.S. Popova, V.A. Yashin, G.Z. Mikhailova</i>	113
Comparative analysis of the rhythmoinotropic characteristics in the papillary muscle of the ground squirrels heart and heart rate of intact animals <i>D.A. Ignat'ev, A.S. Averin, L.S. Kosarski, O.V. Nakipova</i>	115
Palmitate induces carbonyl stress and alters barrier properties of HUVECS <i>O.A. Kazakova, M.V. Samsonov, N.V. Podkuychenko, S.S. Michurina, I.S. Stafeev, E.E. Efremov, T.N. Vlasik, V.Z. Lankin, A.V. Vorotnikov, V.P. Shirinsky</i>	117
Mechanisms of muscle dysfunction in the presence of point mutations in tropomyosin <i>O.E. Karpicheva, V.V. Sirenko, A.O. Simonyan, E.A. Rogozovets, S.V. Avrova, C.S. Redwood, Y.S. Borovikov</i>	119
A new model of functioning of the ATPase molecular motor <i>E.A. Kasumov, R.E. Kasumov, I.V. Kasumova</i>	122
Increase resistance of acute myeloid leukemia cells to anthracyclines treatment upon activation of homotypic intercellular adhesion <i>M.I. Kobyakova, A.S. Senotov, Y.V. Evstratova, K.S. Krasnov, V.S. Akatov, R.S. Fadeev</i>	124
Mechanisms of the action of gasotransmitters and hypoxia on smooth muscles <i>I.V. Kovalev, Yu.G. Birulina, S.V. Guskova, L.V. Smagliy, A.V. Nosarev, I.V. Petrova, V.S. Rydchenko, T.N. Zaytseva, M.A. Medvedev</i>	126
Role of MT's in focal adhesion dynamics during fibroblasts spreading <i>A.V. Kovaleva, A.V. Tvorogova, A.A. Saidova, I.A. Vorobjev</i>	130
Effect of the cardiac myosin binding protein C on the calcium regulation of the interaction of myosin from slow skeleton muscle (m. soleus) with actin <i>G.V. Kopylova, S.R. Nabiev, D.V. Shchepkin</i>	133

Effect of $Tl^{+}$ on spontaneous contraction of the heart muscle and on the energy processes in the heart myocyte mitochondria <i>S.M. Korotkov, V.P. Nesterov, K.V. Sobol</i>	136
Electrostimulation in conditions of microgravitation and its influence on architecture and function of human muscle <i>Yu. Koryak</i>	139
The structural and functional characteristics of the endplates under different forms of motor activity disorder <i>V.V. Kravtsova, E.A. Saburova, I.I. Krivoi</i>	142
Extracellular microelectrode mapping of the rat myocytes in normal and post-infarctial hearts <i>I.V. Kubasov, M.G. Dobretsov, P.P. Vdovkin, A.A. Panov</i>	145
Effects of point substitutions in the head-to-tail overlap junction of tropomyosin <i>N.A. Koubassova, G.V. Kopylova, A.M. Matyushenko, S.R. Nabiev, L.V. Nikitina, D.V. Shchepkin, S.Y. Bershitsky, A.K. Tsaturyan, D.I. Levitsky</i>	147
Alterations in isoform titin composition in the early stage of chronic heart failure <i>V.L. Lakomkin, A.A. Abramov, A.D. Ulanova, I.M. Vikhlyantsev, A.V. Prosvirnin, E.V. Lukoshkova, V.I. Kapelko</i>	149
Comparative structural and functional studies on different isoforms of human skeletal muscle tropomyosin <i>D.I. Levitsky, A.M. Matyushenko, D.V. Shchepkin, G.V. Kopylova, S.Y. Kleymenov, S.Y. Bershitsky</i>	152
Effect of amino acids on <i>IGF1</i> gene expression in human myotubes and skeletal muscle <i>E.M. Lednev, I.V. Kravchenko, V.A. Furalyov, E.A. Lysenko, V.E. Dubrov, D.V. Popov</i>	154
Study of the early stages of epithelial-mesenchymal transition: mechanisms of acquisition of the migratory phenotype by epithelial cells <i>N.I. Litovka, S.N. Rubtsova, I.Y. Zhitnyak, N.A. Gloushankova</i>	157
Comparison of the basal transcriptome in untrained and strength trained human skeletal muscle <i>E.A. Lysenko, P.A. Makhnovskii, E.I. Shagimardanova, G.R. Gazizova, O.A. Gusev, D.V. Popov, O.L. Vinogradova</i>	159
Factors, initiating lamella forming in human platelets <i>M.S. Makarov</i>	161
Functional interaction between Na,K-ATPase and claudins <i>A.G. Markov, I.I. Krivoi</i>	164
The effect of the tropomyosin $\beta$ -chain on the properties of a thin filament and the characteristics of the actin-myosin interaction in muscle <i>A.M. Matyushenko, D.S. Logvinova, D.V. Shchepkin, G.V. Kopylova, D.I. Levitsky, S.Y. Bershitkiy</i>	167
The role of transcription in regulation of highly abundant protein content in human skeletal muscle <i>P.A. Makhnovskii, V.G. Zgoda, G.R. Gazizova, E.I. Shagimardanova, E.A. Lysenko, O.A. Gusev, D.V. Popov, O.L. Vinogradova</i>	169
An effect of L-arginine on calpaine-dependent degradation of cytoskeletal proteins and a stiffness of m. soleus under gravitational unloading conditions <i>I.Y. Melnikov, K.A. Sharlo, I.M. Vikhlyantsev, S.A. Tyganov, B.S. Shenkman</i>	171

Haloperidol modulates the effect of glutoxim on Na <sup>+</sup> transport in frog skin <i>A.V. Melnitskaya, Z.I. Krutetskaya, N.I. Krutetskaya, V.G. Antonov</i>	174
Tricyclic antidepressant amitriptyline modulates Ca <sup>2+</sup> responses induced by glutoxim and molixin in macrophages <i>L.S. Milenina, Z.I. Krutetskaya, N.I. Krutetskaya, V.G. Antonov</i>	177
Aggregation of nanosized hydroxyapatite particles as the main limiting factor of nanosized hydroxyapatite based osteoplastic materials biointegration <i>V.V. Minaychev, I.S. Fadeeva, P.O. Kirsanova, K.A. Menshikh, A.S. Senotov, V.S. Akatov</i>	180
Mechanisms of animal adaptation to hypoxia, the role of mitochondrial ATP-dependent potassium channel <i>G.D. Mironova, N.V. Khmil, N.V. Belosludtseva</i>	183
Activation of P2X7 receptors potentiates synaptic transmission and functionally counteracts P2Y13 receptors in mouse motor synapses <i>A.S. Miteva, A.I. Molchanova, A.E. Gaydukov, O.P. Balezina</i>	186
Peptide TSKY isolated from the brain of the ground squirrel <i>Spermophilus undulatus</i> polymerizes actin <i>in vitro</i> <i>G.Z. Mikhailova, L.G. Bobyleva, S.N. Udaltsov, R.H. Ziganshin, L.I. Kramarova</i>	189
Mobility of membrane receptors - the neuron cholin sensitivity change mechanism <i>G.B. Murzina, A.S. Pivovarov</i>	192
An investigation of regional heterogeneity of cardiomyocyte contraction in experimental type 1 diabetes mellitus <i>T.A. Myachina, K.A. Butova, K.V. Sokolova, I.F. Gette, A.D. Khokhlova</i>	195
The development and software implementation of algorithm to retrieve mean sarcomere length of cardiomyocyte <i>T.A. Myachina, O.N. Lookin</i>	198
Mechanical characteristics of single fibres from slow skeletal muscle <i>S.R. Nabiev, N.A. Koubassova</i>	201
Study of the effects of phosphorylation of essential light chain of myosin on the actin-myosin interaction <i>S.R. Nabiev, D.S. Logvinova, A.M. Matyushenko, L.V. Nikitina, G.V. Kopylova, D.V. Shchepkin, S.Y. Bershitsky</i>	203
Cyclic nucleotide-specific ectophosphoesterase of <i>Physarum polycephalum</i> plasmodium <i>A.R. Nezvetsky, O.V. Petrukhin, N.Ya. Orlov</i>	205
Pro-oxidative conditions are not a general prerequisite for apoptosis in early mouse embryos <i>A.G. Pogorelov, A.I. Panait, V.N. Pogorelova</i>	207
Role of diabetes-associated dicarbonyls in endothelial cell dysfunction <i>in vitro</i> <i>N.V. Podkuychenko, M.V. Samsonov, O.A. Kazakova, S.S. Michurina, I.S. Stafeev, E.E. Efremov, T.N. Vlasik, V.Z. Lankin, A.V. Vorotnikov, V.P. Shirinsky</i>	210
Transcriptome response to acute and regular aerobic exercise in human skeletal muscle <i>D.V. Popov, P.A. Makhnovskii, E.I. Shagimardanova, G.R. Gazizova, E.A. Lysenko, O.A. Gusev</i>	212
Potentiation of spontaneous neurotransmitter secretion in functionally different mouse skeletal muscles by ATP <i>A. Proensa Garsiia, P.O. Bogacheva, O.P. Balezina</i>	215

The duo of archaeellins stabilizes the <i>Halorubrum</i> archaeellar filament structure <i>M.G. Pyatibratov, A.S. Syutkin, T.N. Melnik, A.K. Surin, A.V. Galeva, O.V. Fedorov</i>	217
The effect of ATP-dependent K <sup>+</sup> -channels activity modulation on the ultrastructure of the medulla oblongata tissue under experimental parkinsonism <i>E.V. Rozova, I.N. Mankovskaya, A. A. Mosentsov, G.D. Mironova</i>	220
Motility of planarians and mollusks sensitive to chara algae excretions that contain cholinesterase and biogenic amines <i>V.V. Roshchina, N.E. Svirst</i>	223
Functional changes of spinal centres with various application of methylprednisolone in rats with spinal cord injury <i>D.E. Sabirova, M.E. Baltin, E.I. Yamalitinova</i>	225
Application of a multiscale model of the left ventricle to the examination of effects of the valvular diseases and arrhythmia on the heart performance within cardiovascular system <i>F.A. Syomin, A.Sh. Osepyan</i>	228
Motor functions of athletes after exposure to hypoxic stimulus <i>D.I. Sechin, R.V. Tambovtseva</i>	231
Special metabolic products of probiotic bacteria stimulate skeletal muscle contraction and calcium homeostasis <i>K.V. Sobol</i>	233
Heart rate regulation during hypoxic exposure <i>K.V. Sobol, V.P. Nesterov</i>	235
Influence of acute hypoxia on the mobility of rats in the «open field»: verification of the hypoxic damage to brain basal ganglia by biochemical determinants <i>I.Yu. Sopova</i>	237
Genetic determination of muscular fiber I type and sports result of athletes sportsmen <i>R.V. Tambovtseva</i>	239
Cytoskeletal morphological disorders leading to the cell motility changes in skin fibroblasts derived from patients with Huntington's disease <i>A. Taran, O. Zubkova, A. Kharitonov, M. Lagarkova, I. Alieva</i>	242
Multiple mechanisms of synaptic transmission upregulation by BDNF in mouse neuromuscular junctions <i>E.O. Tarasova, A.I. Molchanova, A.S. Miteva, A.E. Gaydukov, O.P. Balezina</i>	246
Effect of serotonin on motility of flatworms larvae <i>O.O. Tolstenkov, N.D. Kreshchenko</i>	249
Rat soleus response to tenotomy <i>O.V. Turtikova, N.A. Vilchinskaya, I.I. Paramonova, K.A. Sharlo, I.D. Lvova, B.S. Shenkman</i>	252
An influence of high-intensity muscle contractions on anabolic response in soleus muscle after 7-day gravitational unloading <i>S.A. Tyganov, S.V. Rozhkov, T.M. Mirzoev, B.S. Shenkman</i>	254
The effect of inhibition of histone deacetylase 1 on the content of titin, the level of its phosphorylation and expression of the <i>TTN</i> gene in rat soleus after 3 days of functional unloading <i>A.D. Ulanova, Yu.V. Gritsyna, A.G. Bobylev, E.I. Yakupova, V.K. Zhalimov, S.P. Belova, E.P. Mochalova, T.L. Nemirovskaya, B.S. Shenkman, I.M. Vikhlyantsev</i>	256

The influence of transcription factor LXR/RXR ligands to small GTPase ARL4C/ARL7 concentration in HELA and VERO cell cultures <i>E.W. Ulas, E.S. Nadezhdina, A.V. Burakov</i>	259
Parameters of mobility spermatosis of the mice after gravitational unloading and early period of readaptation <i>M.A. Usik, I.V. Ogneva</i>	262
The effects of severe hypobaric hypoxia and the inhibition of hypoxia inducible factor HIF-1 in cardiac and skeletal muscle <i>D.A. Fedorov, M.U. Frolova, I.E. Krasovskaya, N.V. Kuleva</i>	265
Condition of neuro-motor apparatus of the rat soleus muscle during gravitational unloading: effects of spinal cord stimulation <i>A.O. Fedianin, N.V. Galiullina, M.A. Zaytsev, T.V. Baltin., A.A. Ereemeev</i>	268
SLK/LOSK kinase is involved in formation of primary cilium by regulating the centrosomal pool of PCM-1 through the radial microtubule system <i>A.I. Fokin, O.N. Zhapparova, A.V. Burakov, E.S. Nadezhdina</i>	271
Substances released from skeletal muscle during contraction stimulate its growth <i>V.A. Furalyov, I.V. Kravchenko, T.V. Boyarintseva, V.O. Popov</i>	274
Proteolytically modified actin as a model to obtain unexpected results <i>S.Yu. Khaitlina, O.A. Tsaplina</i>	278
Phosphorylation within actin-binding domains modulates myosin light chain kinase residence on thin filaments and contributes to apparent activation of the enzyme in cells <i>A.Y. Khapchaev, V.P. Shirinsky</i>	281
Peculiarities of intramuscular branching of arteries in the thigh muscles of medial group in human fetuses <i>T.V. Khmara, P.V. Grygorieva, S.D. Novychenko</i>	285
Peculiarities of intramuscular branching of nerves in the lower leg muscles of the posterior group in human fetuses <i>T.V. Khmara, T.V. Komar, I.I. Zamorskii</i>	289
Peculiarities of blood supply and innervation of the muscles of the shoulder girdle in human fetuses <i>T.V. Khmara, K.Z. Shevchuk</i>	292
About similarity of the mechanisms of transition to the condition of cold anabiosis in biobjects of different level of organization <i>A.T. Khodko</i>	296
NFAT-dependent regulation of slow myosin expression during plantar mechanical stimulation on early stages of functional unloading <i>K.A. Sharlo, I.I. Paramonova, S.A. Tyganov, O.V. Turtikova, B.S. Shenkman</i>	300
Characteristics of precise movement control under conditions of altered gravitational environment <i>T.A. Shigueva, V.V. Kitov, E.S. Tomilovskaya, I.B. Kozlovskaya</i>	302
Influence of acidosis on the contractive responses of arteries in early postnatal ontogenesis <i>L.D. Shilova, D.S. Kostyunina, D.K. Gaynullina, O.S. Tarasova</i>	304
Oxidative stress and endothelial permeability <i>V.P. Shirinsky, M.V. Samsonov, A.V. Vorotnikov, A.Y. Khapchaev, A.V. Nikashin, V.Z. Lankin, T.N. Vlasik, E.E. Efremov</i>	308

Study of the influence of low-frequency electrical myostimulation during a "dry" immersion on the characteristics of the upright	
<i>N.V. Shishkin, L.E. Amirova, E.S. Tomilovskaya</i>	311
Amyloid aggregates of smooth muscle titin cannot activate the complement system <i>in vitro</i>	
<i>S.A. Shumeyko, L.G. Bobyleva, I.M. Vikhlyantsev, A.G. Bobylev, E.I. Yakupova</i>	314
Sphingolipid mechanisms of muscle atrophy in hypogravitational unloading	
<i>A.A. Yakovlev, V.A. Protopopov, M.N. Shalagina, A.V. Sekunov, S.V. Ovechkin, N.A. Ivanov, I.G. Bryndina</i>	317
Small-molecules directed to the titin filament as a potential novel strategy to attenuate muscle stress response pathways and modulate strain responses	
<i>V. Adams, T. S. Bowen, P. Sehr, J. Lewis, S. Labeit</i>	319
INDEX OF AUTHORS	324

*Научное издание*

Материалы

ХII Всероссийского симпозиума с международным участием  
**«БИОЛОГИЧЕСКАЯ ПОДВИЖНОСТЬ»**,  
посвященного памяти выдающегося ученого,  
заслуженного деятеля науки РФ профессора З.А. Подлубной

Москва: Товарищество научных изданий КМК, 343 с.

Отпечатано в ООО «Галлея-принт»  
Москва, 5-ая Кабельная-2б

Подписано в печать 26.04.2019.  
Печать цифровая. Формат 60x84 / 16  
Усл. печ. л. 21,5 Заказ № 234