

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ EXPERIMENTAL RESEARCHES

ВЗАИМОСВЯЗЬ СФИНГОЛИПИДНЫХ МЕХАНИЗМОВ С ОКИСЛИТЕЛЬНОМ СТРЕССОМ И ИЗМЕНЕНИЯМИ МИТОХОНДРИЙ ПРИ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ РАЗГРУЗКЕ ПОСТУРАЛЬНЫХ МЫШЦ

Протопопов В.А.¹,
Секунов А.В.¹,
Панов А.В.²,
Брындина И.Г.¹

¹ ФГБОУ ВО «Ижевская государственная медицинская академия»

Минздрава России (426056, г. Ижевск, ул. Коммунаров, 281, Россия)

² Университет Мерсера
(31207, Джорджия, г. Мэйкон, Mercer University Drive, 1501, США)

Автор, ответственный за переписку:
Протопопов Владимир Алексеевич,
e-mail: vladimirvst@yandex.ru

РЕЗЮМЕ

Обоснование. Длительное бездействие скелетных мышц сопровождается развитием окислительного стресса и изменениями сфинголипидного метаболизма. Взаимосвязь сфинголипидных механизмов с генерацией активных форм кислорода (АФК) при функциональной разгрузке мышц не изучена.

Цель исследования. Выявить взаимосвязь между изменениями сфингомиелиназы и церамида с продукцией активных форм кислорода в камбаловидной мышце крыс при функциональной разгрузке.

Методы. Крыс-самцов линии Wistar подвергали антиортостатическому вывешиванию (АОВ) в течение 12 часов и 14 дней на фоне применения блокатора кислой сфингомиелиназы (ASM, acid sphingomyelinase) амитриптилина (AMI, amitriptyline). На гистологических срезах камбаловидной мышцы определяли уровни ASM, церамида и АФК (флуоресцентная микроскопия). Методом вестерн-блоттинга определяли прооксидантные ферменты (НАДФН-оксидазы 2 и 4 (NOX2 и NOX4, NADPH oxidase)), цитохром-с-оксидазу (COX IV, cytochrome c oxidase subunit IV) и белок-регулятор биогенеза митохондрий PGC-1 α (peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha) в мышечном гомогенате, а также церамид и ASM в изолированной фракции митохондрий. На модели *ex vivo* исследовали влияние сфингомиелиназы и прооксидантов на уровни церамида, ASM, АФК и NOX2 путём инкубации мышцы с экзогенной сфингомиелиназой или H₂O₂.

Результаты. 12-часовое АОВ сопровождалось увеличением уровня ASM и церамида в волокнах камбаловидной мышцы. Разгрузка в течение 14 дней характеризовалась увеличением ASM, церамида, АФК, NOX2, NOX4 и снижением COX IV и PGC-1 α . Уровни ASM и церамида были увеличены также в митохондриальной фракции. Ингибитор ASM амитриптин частично или полностью нивелировал изменения, вызванные разгрузкой. В модели *ex vivo* обнаружен стимулирующий эффект воздействия экзогенной сфингомиелиназы на уровни АФК и NOX2 в мышце, тогда как H₂O₂ стимулировал продукцию ASM и церамида.

Выводы. Установлена тесная взаимосвязь сфингомиелиназного пути образования церамида и продукции АФК в скелетной мышце в условиях функциональной разгрузки.

Ключевые слова: скелетные мышцы, функциональная разгрузка, атрофия, сфингомиелиназа/церамид, окислительный стресс, митохондрии

Для цитирования: Протопопов В.А., Секунов А.В., Панов А.В., Брындина И.Г. Взаимосвязь сфинголипидных механизмов с окислительным стрессом и изменениями митохондрий при функциональной разгрузке постуральных мышц. *Acta biomedica scientifica*. 2024; 9(2): 228-242. doi: 10.29413/ABS.2024-9.2.23

Статья поступила: 31.08.2023

Статья принята: 22.04.2024

Статья опубликована: 31.05.2024

THE RELATIONSHIP OF SPHINGOLIPID MECHANISMS WITH OXIDATIVE STRESS AND CHANGES IN MITOCHONDRIA DURING FUNCTIONAL UNLOADING OF POSTURAL MUSCLES

Protopopov V.A.¹,
Sekunov A.V.¹,
Panov A.V.²,
Bryndina I.G.¹

¹ Izhevsk State Medical Academy
(Kommunarov str. 281, Izhevsk 426056,
Russian Federation)

² Mercer University (Mercer University
Drive 1501, Macon, GA 31207, USA)

Corresponding author:
Vladimir A. Protopopov,
e-mail: vladimirvst@yandex.ru

ABSTRACT

Background. Prolonged inactivity of skeletal muscles is accompanied by the development of oxidative stress and changes in sphingolipid metabolism. The relationship of sphingolipid mechanisms with generation of reactive oxygen species (ROS) in muscles subjected to functional unloading has not been studied.

The aim. To identify the relationship between changes in sphingomyelinase and ceramide abundance and ROS production in rat soleus muscle during functional unloading.

Methods. Male Wistar rats were subjected to hindlimb suspension for 12 hours or 14 days with the acid sphingomyelinase (ASM) inhibitor amitriptyline (AMI). The levels of ASM, ceramide and ROS were determined by fluorescence microscopy on histological sections. Pro-oxidant enzymes (NADPH oxidases 2 and 4 (NOX2 and NOX4)), cytochrome c oxidase (COX IV), the regulator of mitochondrial biogenesis PGC-1α (peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-α) in muscle homogenates were studied by Western blotting, which also was used for assessment of ceramide and ASM in the isolated mitochondrial fraction. The effects of sphingomyelinase and prooxidants on ceramide, ASM, ROS and NOX2 levels were studied in an ex vivo model by incubating the muscle with exogenous sphingomyelinase or H₂O₂.

Results. 12-hour hindlimb suspension was accompanied by an increase in the level of ASM and ceramide in rat soleus muscle. Unloading for 14 days was characterized by an increase in ASM, ceramide, ROS, NOX2, NOX4 and a decrease in COX IV and PGC-1α levels. ASM and ceramide were also increased in the mitochondrial fraction of muscle. The ASM inhibitor amitriptyline partially or completely prevented the changes caused by the unloading. In the ex vivo model, the stimulating effect of exogenous sphingomyelinase on the ROS and NOX2 levels in rat soleus muscle was found, whereas H₂O₂ stimulated muscle ASM and ceramide production.

Conclusion. A close relationship has been established between the sphingomyelinase pathway of ceramide formation and ROS production in skeletal muscle under conditions of functional unloading.

Key words: skeletal muscles, functional unloading, atrophy, sphingomyelinase/ceramide, oxidative stress, mitochondria

Received: 31.08.2023
Accepted: 22.04.2024
Published: 31.05.2024

For citation: Protopopov V.A., Sekunov A.V., Panov A.V., Bryndina I.G. The relationship of sphingolipid mechanisms with oxidative stress and changes in mitochondria during functional unloading of postural muscles. *Acta biomechanica scientifica*. 2024; 9(2): 228-242. doi: 10.29413/ABS.2024-9.2.23

ВВЕДЕНИЕ

Мышечная атрофия от бездействия (*disuse muscle atrophy*), развивающаяся вследствие длительного постельного режима, иммобилизации конечностей, действия гипогравитации, характеризуется значительным снижением массы мышц и уменьшением диаметра мышечных волокон. Хорошо известно, что данные процессы возникают из-за изменений скорости синтеза и деградации белка, однако точные сигнальные механизмы, приводящие к мышечной атрофии, до сих пор находятся на стадии изучения.

Роль активных форм кислорода (АФК) в развитии атрофии мышц до конца не ясна. Имеются данные о том, что в физиологических условиях, в том числе при физической нагрузке, АФК могут выступать в роли сигнальных молекул, которые способствуют усилению синтеза белка, поглощению глюкозы, активации биогенеза митохондрий и развитию гипертрофии мышц [1]. Другие авторы указывают на повышение уровня АФК в условиях бездействия скелетной мышцы и рассматривают их как фактор, способствующий развитию мышечной атрофии вследствие ингибирования синтеза и усиления деградации белков, активации перекисного окисления липидов, в том числе в мембранах митохондрий [2].

Известно, что продукция АФК в скелетных мышцах может осуществляться в дыхательной цепи митохондрий, при активации ксантиноксидаз, а также НАДФН-оксидаз (NOX, NADPH oxidase) [2]. Традиционно основным источником АФК в скелетных мышцах считались митохондрии, однако последние данные свидетельствуют о том, что мышечные НАДФН-оксидазы также могут вносить существенный вклад в развитие окислительного стресса. Известно, что для скелетных мышц характерны две изоформы ферментов: NOX2 (саркоlemma) и NOX4 (саркоплазматический ретикулум, митохондрии) [3]. Их активация с последующей продукцией АФК происходит посредством сборки мембранных и цитозольных субъединиц [3]. Роль NOX2 и NOX4 в развитии мышечных дисфункций, включая атрофию от бездействия, была описана в ряде работ [4–6].

Роль митохондриальной дисфункции в развитии окислительного стресса при атрофических процессах также не вызывает сомнений. Показано, что в камбаловидной мышце мышей тотальные уровни АФК увеличиваются уже на 3-й день функциональной разгрузки, а митохондриальные АФК – после 7 и 14 дней на фоне угнетения активности ферментных комплексов дыхательной цепи [7]. Таким образом, рост свободных кислородных радикалов может быть индуцирован уже с самых ранних сроков разгрузки и, помимо митохондриальных АФК, зависит от вклада других источников.

Взаимосвязь оксидативных процессов в мышце с метаболизмом сфинголипидов, в частности с повышением образования церамида, показана в ряде работ, свидетельствующих о его значимой роли как ингибитора синтеза белка, регулятора апоптоза и инсулинорезистентности скелетных мышц. Известно, что образование церамида может происходить в рамках трёх основных

путей, таких как синтез в эндоплазматическом ретикулуме (путь *de novo*), гидролиз сфингомиелина при участии сфингомиелиназ и реалкилирование сфингозина («salvage pathway») [8]. В ряде исследований представлены убедительные доказательства того, что повышение активности сфингомиелиназного пути с последующим накоплением церамида может опосредовать развитие как окислительного стресса, так и митохондриальной дисфункции [9–11].

Ранее нами было показано, что функциональная разгрузка скелетных мышц сопровождается повышением уровня церамида, при этом основным путём его образования является активация кислой сфингомиелиназы (ASM, acid sphingomyelinase) [12]. Имеются данные о том, что действие ASM может приводить к ремоделированию липидных рафтов плазматической мембраны и формированию обогащённых церамидом доменов (CEMD, ceramide-enriched membrane domains) с возможным изменением нисходящего сигналинга [13]. В нескольких работах мы впервые показали, что ASM-зависимая перестройка липидных рафтов с формированием CEMD и увеличением мембранного NOX2 наблюдается в камбаловидной мышце крыс при её функциональной разгрузке [14–17]. Введение кломипрамина – соединения из группы ингибиторов кислой сфингомиелиназы (FIASMA, functional inhibitors of acid sphingomyelinase) – частично предотвращало вышеуказанные последствия, а также уменьшало степень атрофии мышц [18].

Для проверки гипотезы о том, что ASM и церамид могут принимать участие в развитии окислительного стресса и модуляции митохондриальной функции в разгруженных постуральных мышцах, мы изучили тотальные и митохондриальные уровни церамида и ASM, содержание АФК и прооксидантных ферментов (NOX2 и NOX4), активность сукцинатдегидрогеназы (SDH, succinate dehydrogenase), содержание цитохром-с-оксидазы (COX IV, cytochrome c oxidase subunit IV) и фактора биогенеза митохондрий (PGC1 α , peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1- α) в остром (12 часов) и длительном (14 дней) периодах функциональной разгрузки на фоне применения функционального ингибитора ASM амитриптилина (AMI, amitriptyline). Дополнительно были проведены эксперименты *ex vivo* с обработкой камбаловидной мышцы экзогенной сфингомиелиназой или H₂O₂ для выяснения причинно-следственной связи между изменениями АФК и ASM.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Животные и экспериментальный протокол

Эксперименты были проведены на белых крысах линии Wistar массой 200–250 г. Функциональная разгрузка скелетных мышц осуществлялась с помощью модели антиортостатического вывешивания (АОВ) под углом 30° к горизонтальной поверхности по Ильину – Новикову в модификации Morey – Holton. Животные случайным образом были поделены на следующие группы ($n = 6$ в каждой группе): Cntr (виварный контроль); 12h HS (группа

АОВ в течение 12 ч); 12h HS + AMI (группа АОВ в течение 12 ч с амитриптилином); 14d HS (группа АОВ в течение 14 дней); 14d HS + AMI (группа АОВ в течение 14 дней с амитриптилином). Амитриптилин применяли в дозе 180 мг/л вместе с питьевой водой в течение 14 дней. Животных содержали в стандартных условиях вивария, где они получали корм и воду *ad libitum*. Исследование одобрено этическим комитетом ФГБОУ ВО «Ижевская государственная медицинская академия» Минздрава России (протокол № 685/1 от 10.03.2020). При выполнении экспериментов руководствовались правилами проведения работ на экспериментальных животных (Приложение к Приказу Минздрава России № 267 от 19.06.2003). После окончания сроков экспериментов у животных под общим наркозом в комбинации тилетамина и золазепама в соотношении 1:1 (Zoletil, Vibrac, Франция; в дозе 10 мг/кг, 0,1 мл) извлекали камбаловидные мышцы и замораживали их в жидком азоте, после чего хранили при -80°C .

Для экспериментов в модели *ex vivo* полученные от интактных крыс мышцы помещали в физиологический раствор следующего состава: NaCl 137 мМ; KCl 5 мМ; CaCl_2 2 мМ; MgCl_2 2 мМ; NaHCO_3 24 мМ; NaH_2PO_4 1 мМ; глюкоза 11 мМ; pH = 7,4. Раствор перфузировали газовой смесью, содержащей 95 % O_2 и 5 % CO_2 , при комнатной температуре. Камбаловидные мышцы каждого из животных инкубировались в течение 15 мин в физиологическом растворе с добавлением 0,1 ед/мл сфингомиелиназы (sphingomyelinase from *Staphylococcus aureus*; Sigma-Aldrich, США) или 100 μM перекиси водорода (H_2O_2), после чего проводили их обработку антителами для флуоресцентного исследования.

Гомогенизация и выделение митохондриальной фракции

Для получения мышечного гомогената 20 мг замороженной камбаловидной мышцы измельчали с помощью криостата HM525 NX (Thermo Fisher Scientific, США) затем помещали в охлаждённый буфер, содержащий 150 мМ NaCl; 50 мМ Трис-HCl; pH = 7,4; 1,2 мМ ЭДТА с добавлением Na_3VO_4 20 мкл/мл; DTT 4 мкл/мл; PMSF 20 мкл/мл; аprotинина 5 мкл/мл; лейпептин 5 мкл/мл; пепстатин А 5 мкл/мл; Phosphatase Inhibitor Cocktail B 40 мкл/мл из расчёта 100 мкл буфера на одну пробу. Затем проводили гомогенизацию и центрифугирование (в течение 10 мин при температуре 4°C и 12 000 g).

Для получения митохондриальной фракции 60 мг измельчённой на криотоме камбаловидной мышцы инкубировали в среде, содержащей 150 мМ KCl, 50 мМ Трис-HCl, 2 мМ ЭДТА, 0,01%-й трипсин (pH = 7,4 при 4°C), в течение 10 мин и гомогенизировали, используя гомогенизаторы Ultra-Turrax (IKA, Германия) и Potter (Wheaton, США). Постядерный супернатант выделяли из гомогената центрифугированием при 900 g в течение 10 мин при 4°C . Митохондрии осаждали центрифугированием остаточного постядерного супернатанта при 8000 g в течение 10 мин при 4°C . Осадок промывали средой

150 мМ KCl, 50 мМ Трис-HCl, 2 мМ ЭДТА, pH = 7,4 с добавлением 20 мкл/мл Na_3VO_4 , 4 мкл/мл DTT; 20 мкл/мл PMSF, 5 мкл/мл аprotинина, 5 мкл/мл лейпептин, 5 мкл/мл пепстатина А, 40 мкл/мл Phosphatase Inhibitor Cocktail B, снова центрифугировали в тех же условиях и наконец ресуспендировали в той же среде при концентрации белка приблизительно 20 мкг/мл.

В мышечных гомогенатах и митохондриальной фракции определяли концентрацию белка на спектрофотометре UV-3600 (Shimadzu, Япония) при длине волны 495 нм методом Bradford в соответствии с калибровочной кривой с использованием раствора стандартов бычьего сывороточного альбумина (BCA). Аликвоты хранили при -80°C и использовали для последующего анализа методом вестерн-блоттинга.

Вестерн-блоттинг

Белковые лизаты загружали в 4–12%-й разделяющий полиакриламидный гель и проводили электрофорез в мини-системе Bio-Rad (США) в течение часа при 100 В с последующим переносом белков на нитроцеллюлозную мембрану (Bio-Rad, США) в системе mini Trans-Blot (Bio-Rad, США) в течение 1 ч при напряжении 100 В и температуре 4°C . Далее окрашивали нитроцеллюлозную мембрану красителем Ponceau S для оценки равной загрузки белка на все дорожки, затем отмывали от красителя и блокировали в 4%-м растворе BCA в TBST (TBS (TRIS-buffered saline) + 0,1 % Tween 20) при комнатной температуре в течение часа. Затем проводили инкубацию (в течение 16 ч при 4°C) с первичными антителами против ASM (acid sphingomyelinase, 1:1000; Affinity Biosciences, США), NOX2 (NOX2, 1:1000; Affinity Biosciences, США), NOX4 (NOX4, 1:1000; Abcam, Великобритания), цитохром-с-оксидазы (COX IV, 1:1000; Abcam, Великобритания), PGC-1 α (PGC-1 α , 1:1000; Affinity Biosciences, США) и глицеральдегидфосфатдегидрогеназы (GAPDH, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, 1:2000; Abcam, Великобритания). После этого отмывали мембраны в TBST 5 раз по 5 мин. Затем мембраны инкубировали в течение 1 ч с вторичными антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена (caprine anti-rabbit, 1:5000; Affinity Biosciences, США). Далее проводили отмывку в TBST 5 раз по 5 мин. Детекцию мембранных полос проводили с помощью 3,3'-диаминобензидина (DAB, diaminobenzidine). Анализ полученных изображений проводили посредством набора инструментов ImageJ (США). Полученный от белковых полос сигнал был нормализован к референсному белку GAPDH.

Гистохимические и флуоресцентные исследования

Для исследований из замороженных мышечных препаратов изготавливались полутонкие срезы. С помощью микротомы HM525 NX Cryostat (Thermo Fisher Scientific, США) была выполнена криосекция замороженной мышечной ткани, предварительно заключённой в блоки Tissue-Tek (Thermo Fisher Scientific, США), после чего серийные поперечные срезы мышцы толщиной 14 мкм

монтировались на предметные стёкла Superfrost Plus (Thermo Fisher Scientific, США).

Для иммунофлуоресцентного исследования смонтированные на предметных стёклах срезы фиксировали раствором 4%-го параформальдегида, приготовленного на фосфатно-солевом буфере (PBS, phosphate-buffered saline: 3,2 мМ NaH_2PO_4 , 0,5 мМ K_2HPO_4 , 1,3 мМ KCl, 135 мМ NaCl, pH = 7,4). После фиксации срезы троекратно промывались PBS и с целью пермеабиллизации инкубировались во влажной камере в течение часа с раствором, в состав которого входили 1%-й Тритон-X100 и 5%-й раствор БСА. После этапа пермеабиллизации срезы инкубировались с растворами первичных антител против церамида (mouse IgG, 1:200, ALX-804-196-T050; Enzo Life Sciences, США) или ASM (rabbit IgG, 1:200; Affinity Biosciences, США) в течение 1 суток с последующей троекратной отмывкой в PBS. Затем проводилась инкубация с раствором вторичных антикроличьих Alexa Fluor 488 (goat IgG, 1:300; Abcam, Великобритания) и антимышиных Alexa Fluor 647 (goat IgG, 1:300; Abcam, Великобритания) антител в течение 1 часа при комнатной температуре без доступа к свету.

Для части срезов камбаловидной мышцы было проведено гистохимическое окрашивание с целью определения активности SDH. Реакцию SDH визуализировали путём инкубации срезов в 0,1 М фосфатном буфере (pH = 7,6), содержащем 0,9 мм NaN_3 , 0,9 мм 1-метоксифеназинметилсульфата, 1,5 мм нитросинего тетразолия, 5,6 мм динатриевой соли ЭДТА и 48 мм динатриевой соли сукцината.

Для определения уровней АФК был использован набор Cellular ROS Assay Kit (ab186027; Abcam, Великобритания). Окраска была произведена в соответствии с инструкцией набора.

Иммунофлуоресцентное исследование в экспериментах *ex vivo* проводилось с использованием первичных антител против церамида (mouse IgG, 1:200; Enzo Life Sciences, США), ASM (rabbit IgG, 1:200; Affinity Biosciences, США) и NOX2 (NOX2, 1:1000; Affinity Biosciences, США) в течение 1 часа с последующей отмывкой и окраской вторичными антителами Alexa Fluor 488 (goat IgG, 1:300; Abcam, Великобритания) и Alexa Fluor 647 (goat IgG, 1:300; Abcam, Великобритания) в течение 1 часа при комнатной температуре без доступа к свету. Исследование активных форм кислорода в данном случае проводили с использованием H_2DCFDA (2',7'-дихлородигидрофлуоресцеин ди-ацетат) в концентрации 10 μM в течение 30 мин без доступа к свету с последующей флуоресцентной микроскопией. Анализ изображений проводился с помощью приставки DS-Fi3 EF-2E, совмещённой с микроскопом Nikon Eclipse E200 (Nikon, Япония), с использованием морфометрических программ NIS-Elements D (Nikon Instruments Inc., США) и ImageJ.

Dot Blot-анализ церамида в митохондриальной фракции

С целью определения количества церамида был проведён Dot Blot-анализ. Липиды экстрагирова-

ли из митохондриальной фракции по Фолчу и хлороформенные экстракты наносили на нитроцеллюлозную мембрану. После 30-минутного высыхания блокировали в 3%-м растворе БСА и инкубировали в течение ночи с первичными антителами к церамиду (mouse IgG, 1:5000, ALX-804-196-T050; Enzo Life Sciences, США). Затем после троекратной отмывки по 5 мин в PBS инкубировали с раствором вторичных биотинилированных антител (goat IgG, 1:5000; Abcam, Великобритания) в течение 1 ч, отмывали и вновь инкубировали с раствором стрептавидина, конъюгированного с HRP (streptavidin, 1:5000; Abcam, Великобритания). Детекцию мембранных полос проводили с помощью DAB. Анализ полученных изображений проводили посредством набора инструментов ImageJ.

Статистический анализ

Статистическую обработку проводили в SPSS Statistica 22.0 (IBM Corp., США). Для оценки статистической значимости различий в группах и между отдельными группами применяли критерии Краскела – Уоллиса и Манна – Уитни; различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Оценка уровня церамида и кислой сфингомиелиназы

Для оценки роли кислой сфингомиелиназы в увеличении уровня церамида было проведено иммунофлуоресцентное исследование криосрезов камбаловидной мышцы (рис. 1). Установлено, что 12-часовое АОВ приводило к статистически значимому увеличению иммунореактивности ASM и церамида (рис. 1а–в), а при 14-дневной разгрузке (рис. 1г–е) их прирост был ещё более значительным. Применение амитриптилина на фоне вывешивания значительно ослабляло или полностью нивелировало эффекты 12-часовой и 14-дневной разгрузки.

Исследование уровня активных форм кислорода и прооксидантных ферментов NOX2 и NOX4

Уровень АФК имел тенденцию к увеличению уже после 12 ч функциональной разгрузки (рис. 2а, б). 14-дневное АОВ сопровождалось статистически значимым повышением АФК (рис. 2в, г), причём введение амитриптилина полностью предотвращало данный эффект. Интересно, что изменения иммунофлуоресценции ASM с церамидом в разные периоды разгрузки имели сходную направленность с изменениями АФК и были сопоставимы с последними по интенсивности.

Поскольку одними из основных источников АФК являются НАДФН-оксидазы, нами были проанализированы наиболее характерные для скелетных мышц изоформы – NOX2 и NOX4. Ингибирование ASM амитриптилином не влияло на результаты 12-часового эксперимента (рис. 3а, в). Вывешивание в течение 14 сут. (рис. 3б, г) характеризовалось статистически значи-

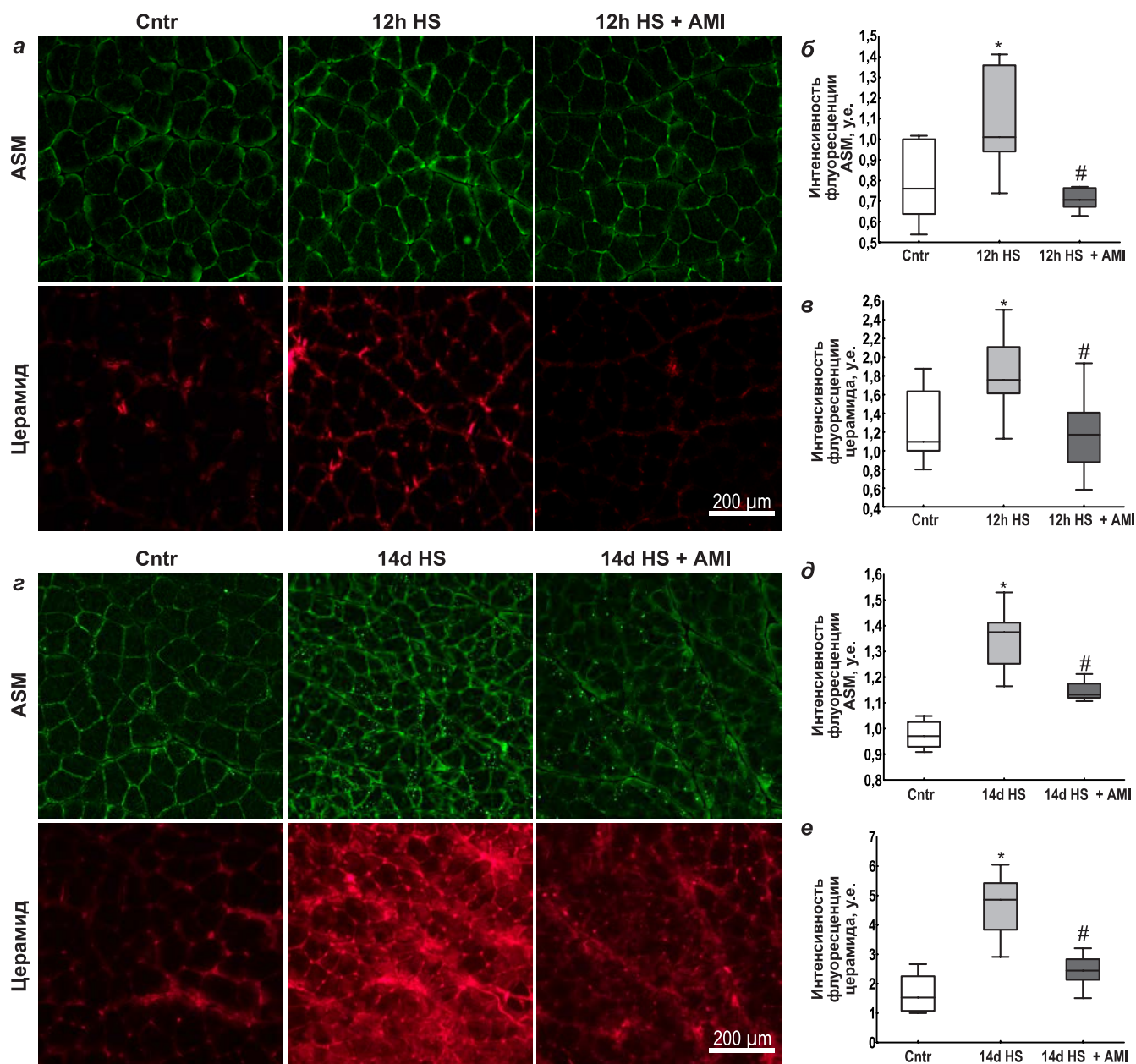


РИС. 1.

Иммунофлуоресцентное исследование церамида и ASM в камбаловидных мышцах крыс при антиортостатическом вывешивании (HS) и при АОС с применением ингибитора ASM амитриптилина (HS + AMI): длительность воздействия – 12 ч (12h; **а–в**) и 14 дней (14d; **г–д**); Cntr – контроль; * – различия статистически значимы при $p < 0,05$ в сравнении с контролем; # – различия статистически значимы при $p < 0,05$ в сравнении с вывешиванием

FIG. 1.

Immunofluorescence study of ceramide and ASM in rat soleus muscles at hindlimb suspension (HS) and at HS with ASM inhibitor amitriptyline (HS + AMI); the duration of exposure is 12 hours (12h; **a–v**) or 14 days (14d; **g–d**); Cntr – control animals; * – differences are statistically significant at $p < 0.05$ in comparison with the control rats; # – differences are statistically significant at $p < 0.05$ in comparison with HS rats

мым повышением прооксидантных ферментов NOX2 и NOX4. На фоне применения амитриптилина обе изоформы НАДФН-оксидаз были количественно сопоставимы с контролем и статистически значимо уменьшались по сравнению с группой 14-дневного АОВ без введения препарата.

Исследования COX IV, PGC-1 α и SDH

Для оценки общего уровня митохондрий были проведены исследования COX IV в гомогенате мышечной ткани методом иммуноблоттинга. Статистически незначимая, но заметная тенденция к увеличению COX IV наблюдалась в группе 12-часового вывешивания. Стати-

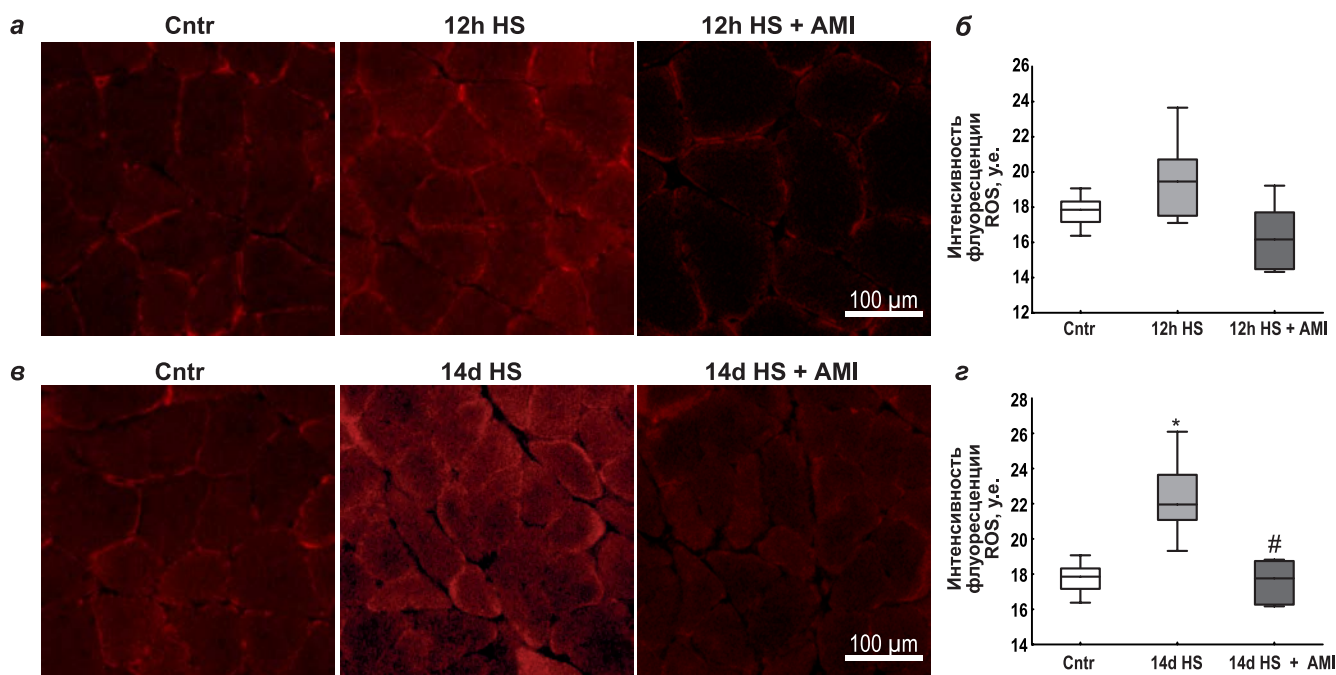


РИС. 2.

Флуоресцентное исследование АФК (ROS) в камбаловидных мышцах крыс при антиортостатическом вывешивании (HS) и при АОС с применением ингибитора ASM амитриптилина (HS + AMI); длительность воздействия – 12 ч (12h; а, б) и 14 дней (14d; в, з); Cntr – контроль; * – различия статистически значимы при $p < 0,05$ в сравнении с контролем; # – различия статистически значимы при $p < 0,05$ в сравнении с вывешиванием

FIG. 2.

Fluorescent study of ROS in rat soleus muscles at hindlimb suspension (HS) and at HS with ASM inhibitor amitriptyline (HS + AMI); the duration of exposure is 12 hours (12h; а, б) or 14 days (14d; в, з); Cntr – control animals; * – differences are statistically significant at $p < 0.05$ in comparison with the control rats; # – differences are statistically significant at $p < 0.05$ in comparison with HS rats

стически значимое повышение показателя по сравнению с контрольной группой отмечено при АОС на фоне введения амитриптилина (рис. 4а). На 14-е сутки вывешивания количество COX IV статистически значимо уменьшалось в сравнении с контролем (рис. 4б), при этом ингибитор ASM предотвращал снижение COX IV, вызванное разгрузкой.

В связи с тем, что количество митохондрий в мышечных волокнах может зависеть от процессов их биогенеза, нами было исследовано содержание фактора биогенеза митохондрий PGC-1 α . В серии экспериментов с 12-часовым вывешиванием не было найдено статистически значимых различий между группами (рис. 4в). После 14 сут. разгрузки уровень PGC-1 α статистически значимо уменьшался по сравнению с контрольной группой (рис. 4г). В группе 14-дневного вывешивания на фоне применения амитриптилина снижение PGC-1 α сохранялось, однако статистически значимых различий по сравнению с контролем не отмечалось.

Активность SDH была статистически значимо ниже в мышечных волокнах на фоне кратковременной разгрузки в сравнении с контролем. Эффекта от применения амитриптилина не наблюдалось, хотя статистически значимого отличия показателя от контроля не было отмечено (рис. 5а). После 14 суток вывешивания уровень

SDH существенно не изменялся, однако визуально было отмечено уменьшение интенсивности окраски в субсарколеммальных областях. Амитриптилин значительно увеличивал уровень SDH по отношению к контролю как на фоне двухнедельной разгрузки, так и в группе вывешивания без препарата (рис. 5б).

Исследования ASM и церамида в митохондриальной фракции

Уровни церамида и ASM в изолированной митохондриальной фракции при 12-часовом вывешивании не имели статистически значимых различий с контрольной группой (рис. 6а, в). После 14 суток разгрузки содержание церамида и ASM значительно увеличивалось. При разгрузке на фоне введения амитриптилина статистически значимых различий по отношению к контрольной группе обнаружено не было (рис. 6б, г).

Исследования влияния экзогенной сфингомиелиназы и перекиси водорода на камбаловидные мышцы в модели *ex vivo*

Инкубация камбаловидной мышцы с H₂O₂ приводила к усилению интенсивности флуоресцентного сигнала ASM (+ 68 %) и церамида (+ 312 %) по сравнению с контрольной мышцей (рис. 7а, в).

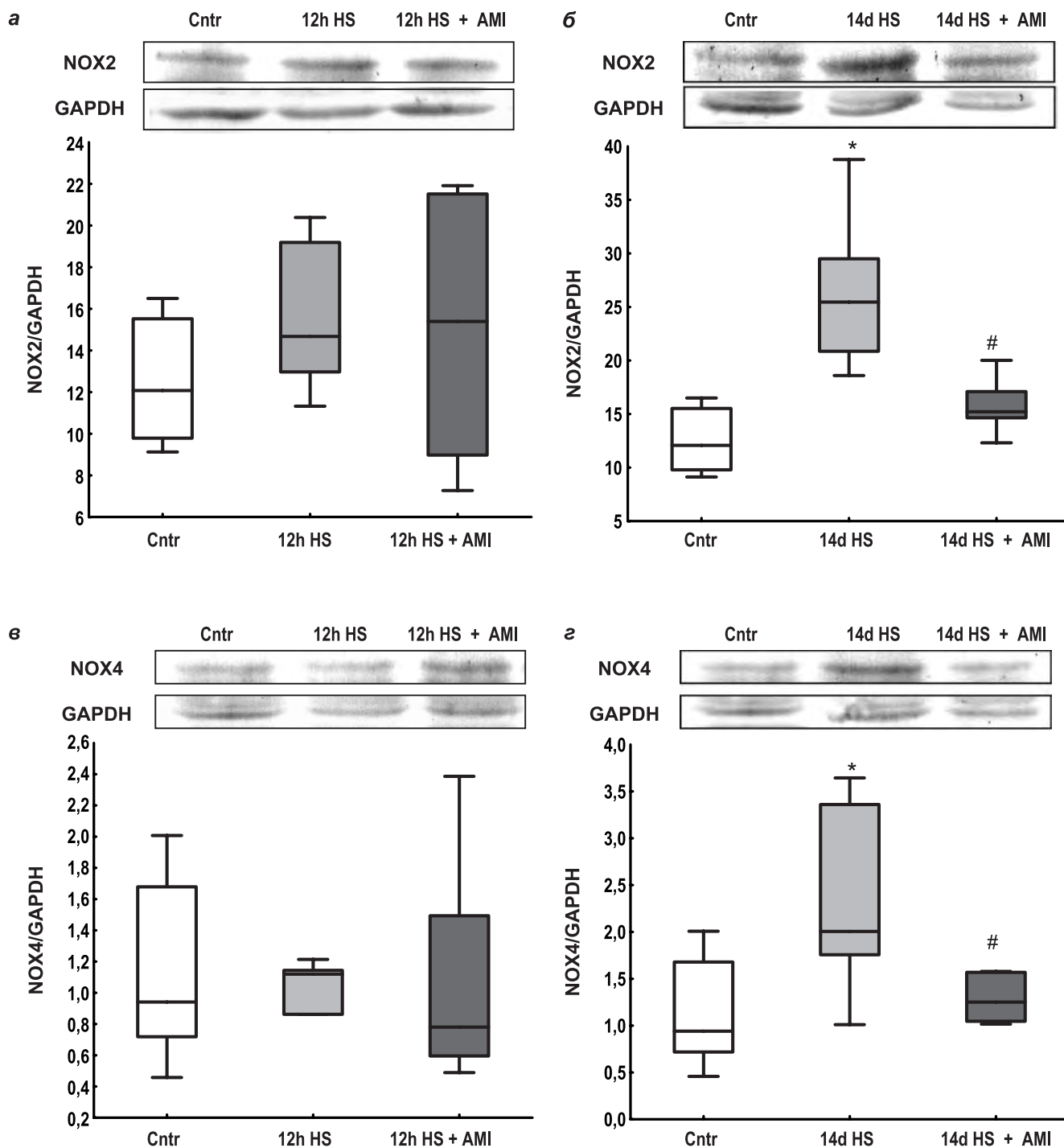


РИС. 3.

NOX2 (а, б) и NOX4 (в, г) в гомогенатах камбаловидных мышц (вестерн-блоттинг) при 12-часовой (12h HS) и 14-дневной (14d HS) разгрузке и при АОС с применением ингибитора ASM амитриптилина (HS + AMI); Cntr – контроль; * – различия статистически значимы при $p < 0,05$ в сравнении с контролем; # – различия статистически значимы при $p < 0,05$ в сравнении с вывешиванием

FIG. 3.

NOX2 (а, б) and NOX4 (в, г) in the soleus muscle homogenates (Western blotting) after 12-hour (12h HS) and 14-day (14d HS) hindlimb unloading and at HS with ASM inhibitor amitriptyline (HS + AMI); Cntr – control animals; * – differences are statistically significant at $p < 0.05$ in comparison with the control group; # – differences are statistically significant at $p < 0.05$ in comparison with HS rats

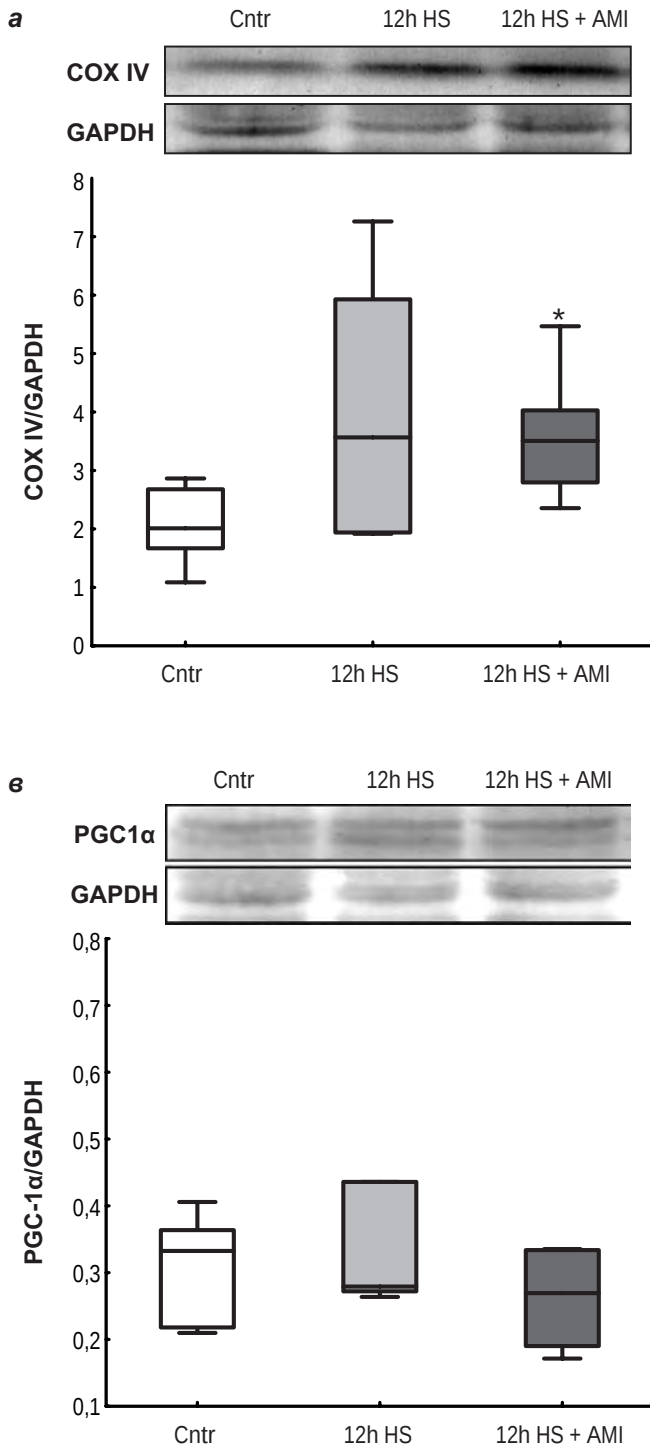


РИС. 4.
Содержание COX IV (**a, б**) и PGC-1 α (**в, г**) в гомогенате камбаловидных мышц (вестерн-блоттинг) при 12-часовом (12h HS) или 14-дневном (14d HS) антиортоstaticком вывешивании и при АОС с применением ингибитора кислой сфингомиелитазы амитриптилина (HS + AMI); Cntr – контроль; * – различия статистически значимы при $p < 0,05$ в сравнении с контролем; # – различия статистически значимы при $p < 0,05$ в сравнении с вывешиванием

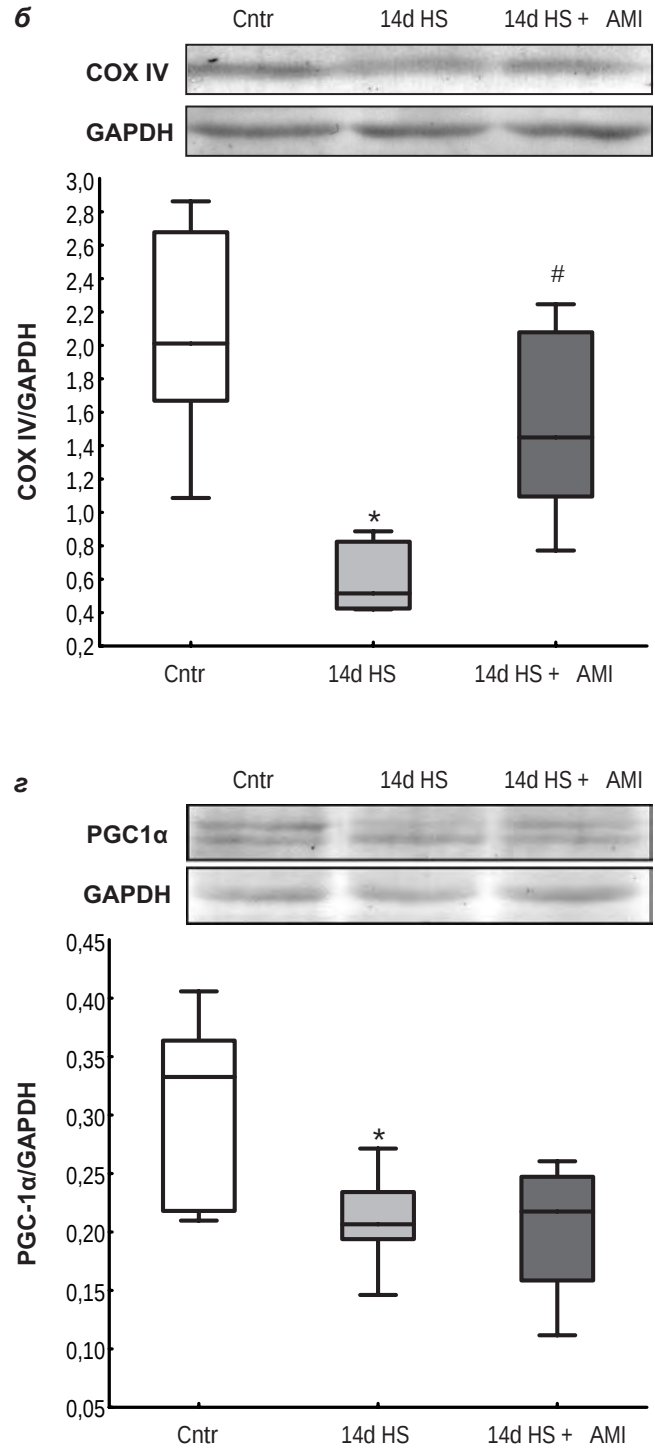


FIG. 4.
Content of COX IV (**a, б**) and PGC-1 α (**в, г**) in the soleus muscle homogenates (Western blotting) after 12-hour (12h HS) and 14-day (14d HS) hindlimb unloading and at HS with ASM inhibitor amitriptyline (HS + AMI); Cntr – control animals; * – differences are statistically significant at $p < 0.05$ in comparison with the control group; # – differences are statistically significant at $p < 0.05$ in comparison with HS rats

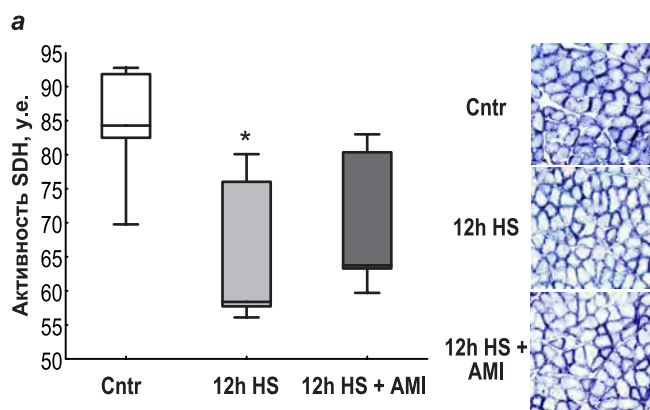


РИС. 5.

Активность сукцинатдегидрогеназы (SDH) в камбаловидных мышцах крыс при антиортостатическом вывешивании (HS) и при АОС с применением ингибитора ASM амитриптилина (HS + AMI); длительность воздействия – 12 ч (12h; **a**) и 14 дней (14d; **б**); Cntr – контроль; * – различия статистически значимы при $p < 0,05$ в сравнении с контролем; # – различия статистически значимы при $p < 0,05$ в сравнении с вывешиванием

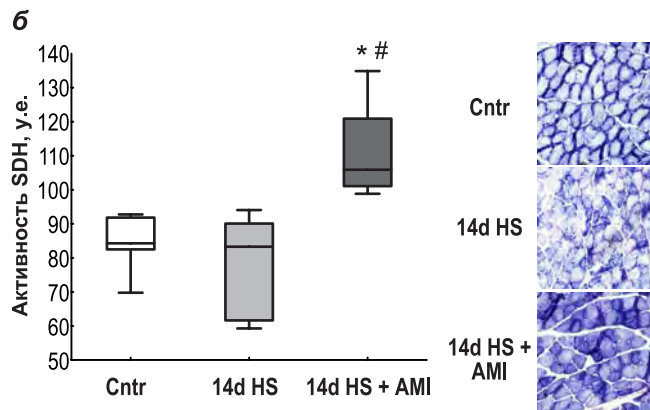


FIG. 5.

Succinate dehydrogenase activity in rat soleus muscles at hindlimb suspension (HS) and at HS with ASM inhibitor amitriptyline (HS + AMI); the duration of exposure is 12 hours (12h; **a**) or 14 days (14d; **б**); Cntr – control animals; * – differences are statistically significant at $p < 0.05$ in comparison with the control group; # – differences are statistically significant at $p < 0.05$ in comparison with HS rats

Инкубация с экзогенной сфингомиелиназой сопровождалась интенсивной продукцией АФК: прирост составил + 702 % по сравнению с контролем (рис. 7б, в). Также мы наблюдали увеличение интенсивности флуоресцентного свечения церамида (+ 62 %) и одного из возможных источников АФК – NOX2 (+ 30 %).

ОБСУЖДЕНИЕ

Механизмы развития окислительного стресса в моделях атрофии от бездействия скелетных мышц активно изучались в течение последних десятилетий. Однако роль сфинголипидов в индукции образования активных форм кислорода в мышечных волокнах при разгрузке не была исследована. Наши результаты с применением амитриптилина при разгрузке показывают, что функциональное ингибирование ASM, сопровождающееся ограничением интенсивности образования церамида в мышце, может также снижать и уровень АФК с параллельным восстановлением количества митохондриального маркера COX IV. Обнаруженный нами эффект более характерен для относительно длительных сроков функциональной разгрузки (14 дней). В исследованиях *ex vivo* мы показали, что добавление экзогенной (бактериальной) сфингомиелиназы может индуцировать резкий прирост активных форм кислорода, а также увеличивать интенсивность мечения NOX2 в мышечных волокнах. Аналогично этому добавление экзогенного H_2O_2 в качестве источника АФК также приводило к увеличению уровня ASM и церамида.

Известно, что наиболее характерные для мышц изоформы прооксидантных ферментов NOX2 и NOX4 могут вносить значительный вклад в развитие окислительного стресса при мышечных атрофиях. Показано, что се-

мидневная разгрузка так же, как и 14-дневная в нашем исследовании, сопровождалась увеличением уровня NOX2 и окислительного стресса в камбаловидной мышце крыс [4, 6]. Исследования атрофии скелетных мышц, связанной с другими причинами, также свидетельствуют о роли NOX4 [5]. Так, установлена роль ангиотензин-II-зависимого сигналинга в активации NOX2 и NOX4 и мышечной атрофии. Примечательно, что индуцированный ангиотензином-II окислительный стресс, опосредованный активацией NOX2, предотвращался ингибированием ASM на моделях эндотелиальной дисфункции [19]. По-видимому, ASM и церамид могут служить посредниками между различными стимулами и активацией НАДФН-оксидаз. Ввиду того, что сигнализация ангиотензина-II, фактора некроза опухоли α и др. могут активировать как ASM, так и НАДФН-оксидазы, можно предположить, что ASM является посредником сигнального пути ASM/церамид/NOX. Это подтверждается многочисленными работами о роли ASM в активации NOX [20, 21].

В исследованиях *ex vivo* нами установлено, что обработка мышц экзогенной сфингомиелиназой может индуцировать не только усиление образования церамида, но и резкий прирост АФК на фоне увеличения уровня NOX2 в мышечных волокнах. Это может свидетельствовать о прямом активирующем влиянии сфингомиелиназы на образование АФК, что соответствует данным, полученным другими авторами [20, 21]. Так, в экспериментах *in vitro* на изолированных волокнах *flexor digitorum brevis* мышей было показано, что источником генерации АФК при действии экзогенной сфингомиелиназы является NOX2, но не митохондрии [21].

С другой стороны, в наших экспериментах увеличение уровня ASM и церамида наблюдалось при инкубации мышцы с H_2O_2 в качестве источника АФК. Наблюдаемый нами эффект также согласуется с данными литерату-

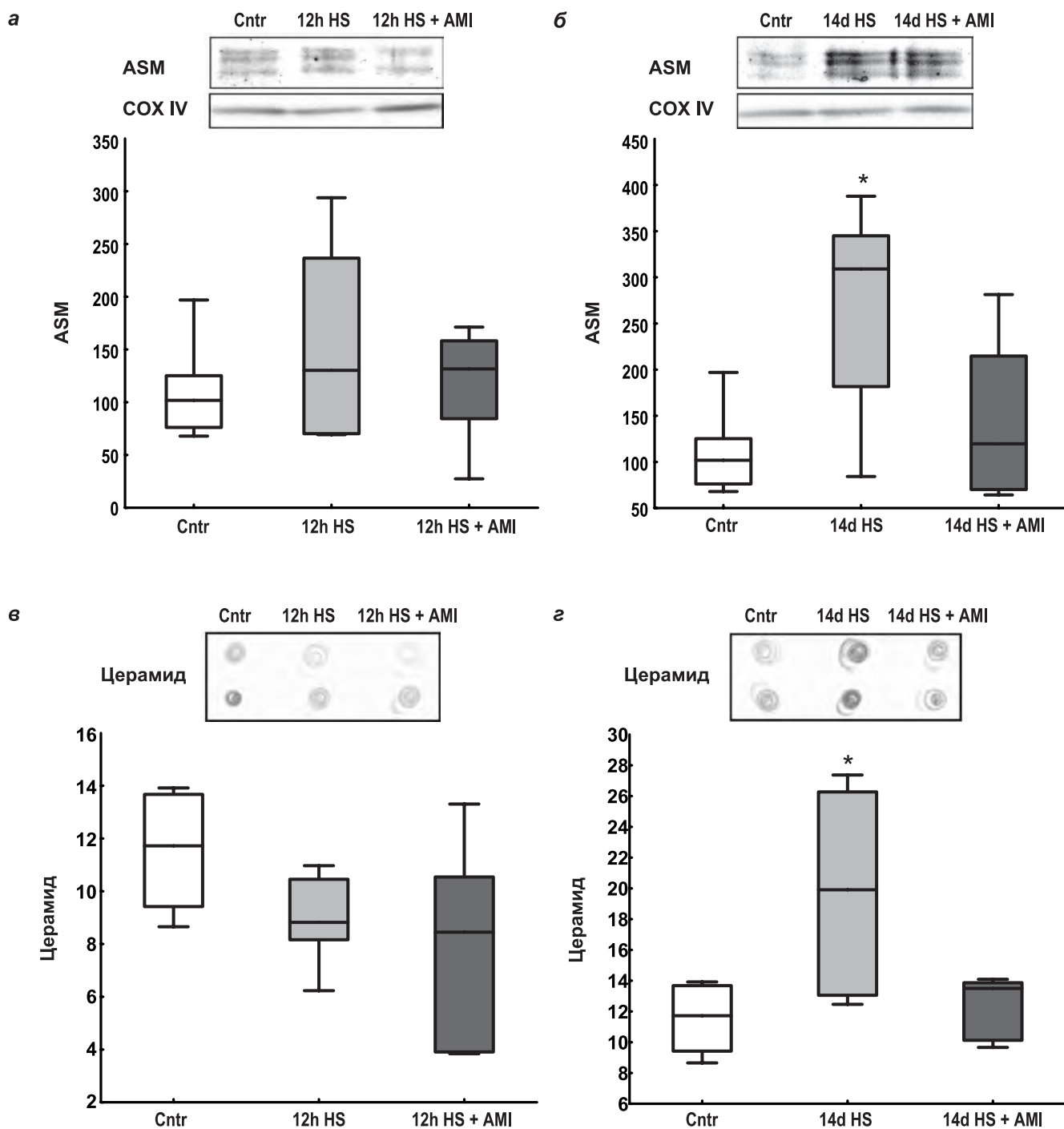


РИС. 6.

Содержание ASM (вестерн-блоттинг; **а, б**) и церамида (dot blot; **в, г**) в митохондриальной фракции камбаловидных мышц при 12-часовой (12h HS) и 14-дневной (14d HS) функциональной разгрузке и при АОС с применением ингибитора ASM амитриптилина (HS + AMI): * – различия статистически значимы при $p < 0,05$ в сравнении с контролем; # – различия статистически значимы при $p < 0,05$ в сравнении с вывешиванием

FIG. 6.

Content of ASM (Western blotting; **a, б**) and ceramide (dot blot; **в, г**) in the mitochondrial fraction of soleus muscles after 12-hour (12h HS) or 14-day (14d HS) functional unloading and at HS with ASM inhibitor amitriptyline (HS + AMI): * – differences are statistically significant at $p < 0.05$ in comparison with the control group; # – differences are statistically significant at $p < 0.05$ in comparison with HS rats

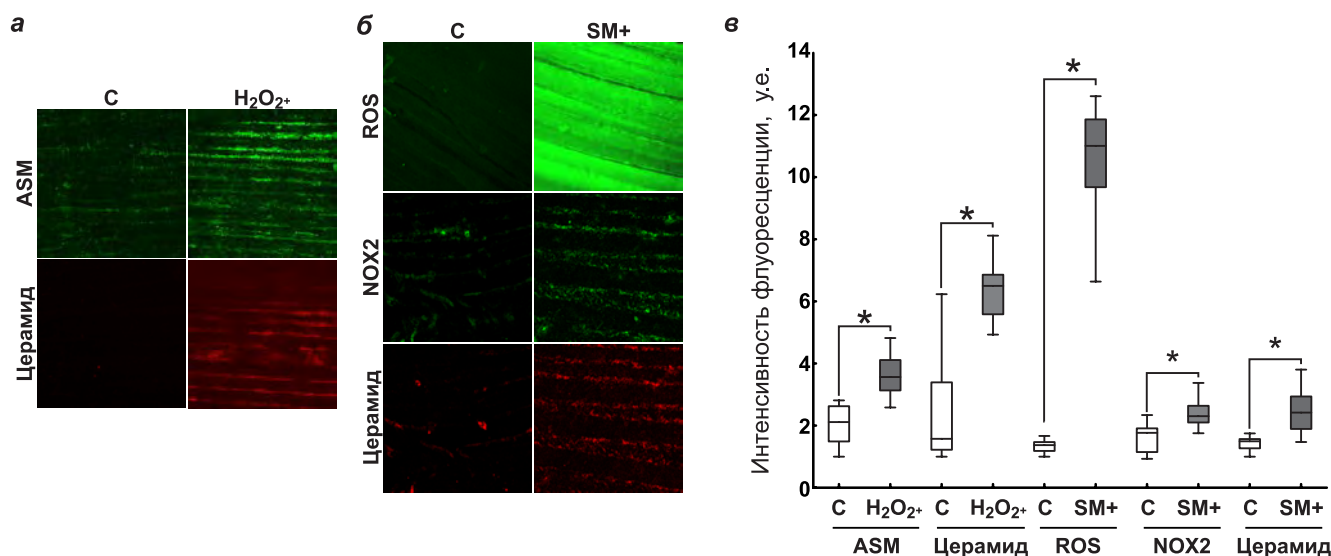


РИС. 7.

Эффект воздействия перекиси водорода и экзогенной сфингомиелиназы на камбаловидную мышцу крыс в эксперименте *ex vivo*: **а** – иммунофлуоресценция ASM и церамида при инкубации мышцы с физиологическим раствором (0,9%-й NaCl, контроль (C)) и перекисью водорода (H₂O₂+); **б** – иммунофлуоресценция АФК (ROS), NOX2 и церамида при инкубации мышцы с 0,9%-м NaCl (C) и экзогенной сфингомиелиназой (SM+); * – различия статистически значимы при $p < 0,05$ в сравнении с контролем

FIG. 7.

The effect of hydrogen peroxide and exogenous sphingomyelinase on rat soleus muscle in an *ex vivo* experiment: **а** – immunofluorescence of ASM and ceramide after incubation of muscle with saline solution (0.9% NaCl, control (C)) and hydrogen peroxide (H₂O₂+); **б** – immunofluorescence of ROS, NOX2 and ceramide after incubation of muscle with 0.9 % NaCl (C) and exogenous sphingomyelinase (SM+); * – differences are statistically significant at $p < 0.05$ in comparison with the control group

ры [22]. Было показано, что H₂O₂, первичная форма АФК в клетках млекопитающих, индуцирует очень быструю транслокацию ASM и образование CEMD в плазматической мембране Jurkat Т-клеток. Параллельно происходит запуск транспорта лизосом и слияние их с плазматической мембраной, т. е. экзоцитоз лизосом [22]. Подобный эффект в скелетных мышцах ранее не был описан, однако сравнительный анализ наших данных, полученных ранее [14] и в настоящем исследовании, позволяет предположить, что именно таким образом могут развиваться события в скелетной мышце как в условиях АОВ, так и при действии H₂O₂. В частности, при 4-дневном АОВ мы наблюдали образование церамидных кластеров в плазматической мембране мышечных волокон [14], а в опытах *ex vivo* – увеличение иммунофлуоресценции ASM преимущественно в области сарколеммы в ответ на инкубацию мышцы с H₂O₂.

Другим интересным наблюдением, полученным в ходе наших исследований, явилось увеличение церамида и ASM в изолированной митохондриальной фракции камбаловидных мышц. Образование церамида в митохондриях посредством сфингомиелиназных путей, включая активацию кислой сфингомиелиназы, ранее было описано в литературе [23]. Можно предположить, что одним из путей накопления ASM и церамида в митохондриях может являться трансфер инвагинированных везикул плазмолеммы, подобно механизму, описанному E.B. Babiychuk и соавт. [24]. Таким путём ASM, прикреплённая к внешнему листку мембраны, и вновь образо-

ванный церамид в составе инвагинированных везикул, предположительно, могут сливаться с митохондриями. С другой стороны, было показано, что церамид может накапливаться в митохондриях в результате транспорта из эндоплазматического ретикулума, который является одним из мест синтеза церамида *de novo* [25]. Тем не менее, детальный механизм изменений митохондриального церамида в условиях функциональной разгрузки ещё предстоит выяснить.

Роль церамида в регуляции митохондриальной функции и ингибировании комплексов дыхательной цепи ранее многократно обсуждалась в различных исследованиях. Например, некоторые данные указывают на то, что церамиды могут ингибировать I, III и IV комплексы дыхательной цепи с параллельным образованием АФК [9–11]. Снижение митохондриального дыхания в экспериментах с двухнедельной разгрузкой скелетных мышц O.S. Kwon и соавт. также ассоциируют с увеличением уровня церамидов [26].

Липидная среда внутренней мембраны митохондрий является важным условием стабильности и функционирования комплексов дыхательной цепи, включая образование суперкомплексов (респирасомы). Одним из важнейших липидов, выполняющих данную роль, является кардиолипин. Уменьшение кардиолипина, его окисление или модификации в процессе метаболизма могут привести к нарушению транспорта электронов между дыхательными комплексами, снижению мембранного потенциала, синтеза АТФ митохондриями

и увеличению продукции АФК. В то же время хорошо изучена корреляционная взаимосвязь между увеличением содержания церамида и снижением кардиолипина в митохондриях сердечной мышечной ткани, а ингибирование ключевых ферментов образования церамида, включая ASM, способствовало восстановлению уровней кардиолипина [27]. Авторы предполагают, что эффекты действия церамида могут способствовать дизрегуляции метаболизма кардиолипина. Изменения данного липида в процессе функциональной разгрузки камбаловидной мышцы мышей показаны М.В. Trevino и соавт. [7]. Одним из предположений о механизмах непосредственного влияния церамида на электрон-транспортную цепь является изменение гидрофильности внутренней мембраны митохондрий с последующим нарушением её биофизических свойств, белок-липидных взаимодействий и стабильности комплексов и суперкомплексов [11]. Несмотря на множество исследований роли церамида в митохондриях, глубинные механизмы его влияния всё ещё остаются недостаточно изученными.

Можно предположить следующий механизм увеличения продукции АФК митохондриями мышц в условиях появления значительного количества церамида в мембранах митохондрий. В нормальных условиях функциональная активность митохондрий скелетных мышц может меняться от почти полного покоя до очень высокой активности. При активном окислительном фосфорилировании продукции АФК практически нет, но в состоянии покоя, особенно при окислении жирных кислот в присутствии других митохондриальных субстратов, продукция АФК может значительно увеличиваться [28, 29]. Церамиды и сфингомиелины значительно снижают подвижность липидной фазы митохондрий и тем самым могут увеличивать уровень восстановленности компонентов дыхательной цепи митохондрий и, таким образом, повышать продукцию АФК.

В нашем исследовании мы впервые показали возможность присутствия ASM в митохондриях скелетных мышц. 14-дневное АОВ приводило к увеличению ASM и церамида в митохондриальной фракции мышц, а применение блокатора ASM амитриптилина нивелировало данный эффект. Параллельно в гомогенатах мышечных волокон наблюдалось восстановление уровня COX IV и активности SDH, сниженных при АОВ. Для поиска возможного объяснения изменений COX IV, которые могут предположительно свидетельствовать об изменении общего количества митохондрий, мы провели исследование фактора биогенеза митохондрий PGC-1 α и показали, что его уровень снижается при 14-дневной разгрузке. Это согласуется с результатами, полученными другими авторами в отношении PGC-1 α и митохондриального маркера COX IV [30]. Вопреки ожиданиям, мы не обнаружили влияния амитриптилина на количественное содержание PGC-1 α по сравнению с группами разгрузки без препарата.

Таким образом, в нашем исследовании было продемонстрировано, что ингибирование ASM предотвращает увеличение АФК и НАДФН-оксидаз в мышечных волокнах на фоне функциональной разгрузки. Также

впервые было продемонстрировано, что длительная разгрузка камбаловидных мышц сопровождается увеличением ASM и церамида в митохондриях, которое ингибитор ASM эффективно устраняет параллельно с восстановлением COX IV. Мы предполагаем, что механизмы окислительного стресса при атрофии скелетных мышц могут быть тесно связаны с сигналингом, опосредуемым ASM и церамидом. При этом не исключено, что ASM и АФК на фоне мышечной разгрузки могут взаимно усиливать своё действие по механизму «порочного круга».

Конфликт интересов

Авторы данной статьи сообщают об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Bouviere J, Fortunato RS, Dupuy C, Werneck-de-Castro JP, Carvalho DP, Louzada RA. Exercise-stimulated ROS sensitive signaling pathways in skeletal muscle. *Antioxidants (Basel)*. 2021; 10(4): 537. doi: 10.3390/antiox10040537
2. Gomez-Cabrera MC, Arc-Chagnaud C, Salvador-Pascual A, Brioché T, Chopard A, Olaso-Gonzalez G, et al. Redox modulation of muscle mass and function. *Redox Biology*. 2020; 35: 101531. doi: 10.1016/j.redox.2020.101531
3. Ferreira LF, Laitano O. Regulation of NADPH oxidases in skeletal muscle. *Free Radic Biol Med*. 2016; 98: 18-28. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2016.05.011
4. Hord JM, Garcia MM, Farris KR, Guzzoni V, Lee Y, Lawler MS, et al. Nox2 signaling and muscle fiber remodeling are attenuated by losartan administration during skeletal muscle unloading. *Physiol Rep*. 2021; 9(1): e14606. doi: 10.14814/phy2.14606
5. Kadoguchi T, Shimada K, Koide H, Miyazaki T, Shiozawa T, Takahashi S, et al. Possible role of NADPH oxidase 4 in angiotensin II-induced muscle wasting in mice. *Front Physiol*. 2018; 9: 340. doi: 10.3389/fphys.2018.00340
6. Lawler JM, Hord JM, Ryan P, Holly D, Janini Gomes M, Rodriguez D, et al. Nox2 inhibition regulates stress response and mitigates skeletal muscle fiber atrophy during simulated microgravity. *Int J Mol Sci*. 2021; 22(6): 3252. doi: 10.3390/ijms22063252
7. Trevino MB, Zhang X, Standley RA, Wang M, Han X, Reis FCG, et al. Loss of mitochondrial energetics is associated with poor recovery of muscle function but not mass following disuse atrophy. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2019; 317(5): E899-E910. doi: 10.1152/ajpendo.00161.2019
8. Chaurasia B, Summers SA. Ceramides in metabolism: Key lipotoxic players. *Ann Rev Physiol*. 2021; 83: 303-330. doi: 10.1146/annurev-physiol-031620-093815
9. Diaz-Vegas A, Madsen S, Cooke KC, Carroll L, Khor JXY, Turner N, et al. Mitochondrial electron transport chain, ceramide and coenzyme Q are linked in a pathway that drives insulin resistance in skeletal muscle. *eLife*. 2023; 12: RP87340. doi: 10.7554/eLife.87340.2
10. Gudiz TI, Tserng KY, Hoppel CL. Direct inhibition of mitochondrial respiratory chain complex III by cell-permeable ceramide. *J Biol Chem*. 1997; 272(39): 24154-24158. doi: 10.1074/jbc.272.39.24154

11. Kogot-Levin A, Saada A. Ceramide and the mitochondrial respiratory chain. *Biochimie*. 2014; 100: 88-94. doi: 10.1016/j.biochi.2013.07.027
12. Брындина И.Г., Шалагина М.Н., Овечкин С.В., Овчинина Н.Г. Сфинголипиды скелетных мышц у мышей C57B1/6 в условиях непродолжительной моделированной гипогравитации. *Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова*. 2014; 100(11): 1280-1286. [Bryndina IG, Shalagina MN, Ovechkin SV, Ovchinina NG. Sphingolipids in skeletal muscles of C57B1/6 mice after short-term simulated microgravity. *Russian Journal of Physiology*. 2014; 100(11): 1280-1286. (In Russ.)]. doi: 10.31857/S0869813921060170
13. Zhang Y, Li X, Becker KA, Gulbins E. Ceramide-enriched membrane domains – Structure and function. *Biochim Biophys Acta*. 2009; 1788(1): 178-183. doi: 10.1016/j.bbame.2008.07.030
14. Bryndina IG, Protopopov VA, Sergeev VG, Shalagina MN, Ovechkin SV, Yakovlev AA. Ceramide enriched membrane domains in rat skeletal muscle exposed to short-term hypogravitational unloading. *Front Physiol*. 2018; 9. doi: 10.3389/conf.fphys.2018.26.00028
15. Petrov AM, Shalagina MN, Protopopov VA, Sergeev VG, Ovechkin SV, Ovchinina NG, et al. Changes in membrane ceramide pools in rat soleus muscle in response to short-term disuse. *Int J Mol Sci*. 2019; 20(19): 4860. doi: 10.3390/ijms20194860
16. Bryndina IG, Shalagina MN, Protopopov VA, Sekunov AV, Zefirov AL, Zakirjanova GF, et al. Early lipid raft-related changes: Interplay between unilateral denervation and hindlimb suspension. *Int J Mol Sci*. 2021; 22(5): 2239. doi: 10.3390/ijms22052239
17. Шалагина М.Н., Протопопов В.А., Яковлев А.А., Овечкин С.В., Брындина И.Г. НАДФН-оксидаза и супероксиддисмутаза в камбаловидной мышце грызунов в условиях моделирования эффектов гипогравитации и коррекции обмена сфинголипидов. *Вестник Удмуртского университета. Серия Биология. Науки о Земле*. 2017; 27(4): 492-496. [Shalagina MN, Protopopov VA, Yakovlev AA, Ovechkin SV, Bryndina IG. NADPH oxidase and superoxide dismutase in rodent soleus muscle in conditions of modeling effects of microgravity and correction of sphingolipid metabolism. *Bulletin of Udmurt University. Series Biology. Earth Sciences*. 2017; 27(4): 492-496. (In Russ.)].
18. Секунов А.В., Протопопов В.А., Скурыгин В.В., Шалагина М.Н., Брындина И.Г. Мышечная пластичность в условиях функциональной разгрузки: эффекты ингибитора кислой сфингомиелиназы клонипрамина. *Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова*. 2021; 107(6-7): 911-924. [Sekunov AV, Protopopov VA, Skurygin VV, Shalagina MN, Bryndina IG. Muscle plasticity at functional unloading: Effects of the inhibitor of acid sphingomyelinase clomipramine. *Russian Journal of Physiology*. 2021; 107(6-7): 911-924. (In Russ.)]. doi: 10.31857/S0869813921060170
19. Wei J, Xu L, Du YN, Tang XF, Ye MQ, Wu YJ, et al. Membrane raft redox signalling contributes to endothelial dysfunction and vascular remodelling of thoracic aorta in angiotensin II-infused rats. *Exp Physiol*. 2019; 104(6): 946-956. doi: 10.1113/EP087335
20. Liu R, Duan T, Yu L, Tang Y, Liu S, Wang C, et al. Acid sphingomyelinase promotes diabetic cardiomyopathy via NADPH oxidase 4 mediated apoptosis. *Cardiovasc Diabetol*. 2023; 22(1): 25. doi: 10.1186/s12933-023-01747-1
21. Loehr JA, Abo-Zahrah R, Pal R, Rodney GG. Sphingomyelinase promotes oxidant production and skeletal muscle contractile dysfunction through activation of NADPH oxidase. *Front Physiol*. 2015; 5: 530. doi: 10.3389/fphys.2014.00530
22. Li X, Gulbins E, Zhang Y. Oxidative stress triggers Ca-dependent lysosome trafficking and activation of acid sphingomyelinase. *Cell Physiol Biochem*. 2012; 30(4): 815-826. doi: 10.1159/000341460
23. Levitsky Y, Hammer SS, Fisher KP, Huang C, Gentles TL, Pegouske DJ, et al. Mitochondrial ceramide effects on the retinal pigment epithelium in diabetes. *Int J Mol Sci*. 2020; 21(11): 3830. doi: 10.3390/ijms21113830
24. Babychuk EB, Atanassoff AP, Monastyrskaya K, Brandenberger C, Studer D, Allemann C, et al. The targeting of plasmalemmal ceramide to mitochondria during apoptosis. *PLoS One*. 2011; 6(8): e23706. doi: 10.1371/journal.pone.0023706
25. Stiban J, Caputo L, Colombini M. Ceramide synthesis in the endoplasmic reticulum can permeabilize mitochondria to proapoptotic proteins. *J Lipid Res*. 2008; 49(3): 625-634. doi: 10.1194/jlr.M700480-JLR200
26. Kwon OS, Nelson DS, Barrows KM, O'Connell RM, Drummond MJ. Intramyocellular ceramides and skeletal muscle mitochondrial respiration are partially regulated by Toll-like receptor 4 during hindlimb unloading. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2016; 311(5): R879-R887. doi: 10.1152/ajpregu.00253.2016
27. Бабенко Н.А., Стороженько Г.В. Роль церамида в снижении содержания кардиолипина в сердце у крыс с возрастом. *Успехи геронтологии*. 2017; 30(1): 43-48. [Babenko NA, Storozhenko GV. Role of ceramide in reduction of the cardiolipin content in the heart during aging. *Advances in Gerontology*. 2017; 30(1): 43-48. (In Russ.)].
28. Panov AV, Darenskaya MA, Dikalov SI, Kolesnikov SI. Metabolic syndrome as the first stage of eldership; the beginning of real aging. *Update in Geriatrics*. 2021; 37-67. doi: 10.5772/intechopen.95464
29. Panov A, Mayorov VI, Dikalov S. Metabolic syndrome and β -oxidation of long-chain fatty acids in the brain, heart, and kidney mitochondria. *Int J Mol Sci*. 2022; 23(7): 4047. doi: 10.3390/ijms23074047
30. Kanazashi M, Tanaka M, Nakanishi R, Maeshige N, Fujino H. Effects of astaxanthin supplementation and electrical stimulation on muscle atrophy and decreased oxidative capacity in soleus muscle during hindlimb unloading in rats. *J Physiol Sci*. 2019; 69(5): 757-767. doi: 10.1007/s12576-019-00692-7

Сведения об авторах

Протопопов Владимир Алексеевич – аспирант кафедры патологической физиологии и иммунологии, ФГБОУ ВО «Ижевская государственная медицинская академия» Минздрава России, e-mail: vladimirvst@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0003-4058-8155>

Секунов Алексей Васильевич – ассистент кафедры патологической физиологии и иммунологии, ФГБОУ ВО «Ижевская государственная медицинская академия» Минздрава России, e-mail: d1key@inbox.ru, <https://orcid.org/0000-0002-1592-2927>

Панов Александр Васильевич – кандидат медицинских наук, доктор биологических наук, эмеритус профессор, Университет Мерсер, e-mail: alexander.panov55@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0001-8198-7780>

Брындина Ирина Георгиевна – доктор медицинских наук, профессор, заведующая кафедрой патологической физиологии и иммунологии, ФГБОУ ВО «Ижевская государственная медицинская академия» Минздрава России, e-mail: i_bryndina@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-4099-4508>

Information about the authors

Vladimir A. Protopopov – Postgraduate at the Department of Pathological Physiology and Immunology, Izhevsk State Medical Academy, e-mail: vladimirvst@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0003-4058-8155>

Alexey V. Sekunov – Teaching Assistant at the Department of Pathological Physiology and Immunology, Izhevsk State Medical Academy, e-mail: d1key@inbox.ru, <https://orcid.org/0000-0002-1592-2927>

Alexander V. Panov – Cand. Sc. (Med.), Dr. Sc. (Biol.), Emeritus Professor, Mercer University, e-mail: alexander.panov55@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0001-8198-7780>

Irina G. Bryndina – Dr. Sc. (Med.), Professor, Head of the Department of Pathological Physiology and Immunology, Izhevsk State Medical Academy, e-mail: i_bryndina@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-4099-4508>