

ВЛИЯНИЕ ИНГИБИТОРА КИСЛОЙ СФИНГОМИЕЛИНАЗЫ НА ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ СТРЕСС, КОНЕЧНЫЕ ПРОДУКТЫ ГЛИКИРОВАНИЯ И МИОЗИНОВЫЙ ФЕНОТИП КАМБАЛОВИДНОЙ МЫШЦЫ КРЫС В УСЛОВИЯХ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ РАЗГРУЗКИ

РЕЗЮМЕ

Протопопов В.А.,
Секунов А.В.,
Мугизов А.М.,
Свидерский И.В.,
Брындина И.Г.

ФГБОУ ВО «Ижевская государственная медицинская академия»
Минздрава России (426056, г. Ижевск,
ул. Коммунаров, 281, Россия)

Автор, ответственный за переписку:
Секунов Алексей Васильевич,
e-mail: alexeisekunov@yandex.ru

Обоснование. Функциональная разгрузка постуральных мышц сопровождается трансформацией мышечного фенотипа в сторону экспрессии «быстрых» изоформ тяжёлых цепей миозина (*MyHC, myosin heavy chains*), а также увеличением активности кислой сфингомиелиназы (*ASM, acid sphingomyelinase*), содержания церамидов, активных форм кислорода (*AФK*) и конечных продуктов гликирования (*KПГ*). Однако взаимосвязь сфинголипидных механизмов с регуляцией КПГ-ассоциированных процессов и пластичностью мышц до настоящего времени остаётся неизученной.

Цель исследования. Определить взаимосвязь кислой сфингомиелиназы и церамид-ассоциированного увеличения активных форм кислорода с зависимым от конечных продуктов гликирования путём регуляции экспрессии различных изоформ тяжёлых цепей миозина при 7-дневной функциональной разгрузке *m. soleus* крыс, а также оценить эффективность препарата группы FIASMA в предотвращении изменения мышечного фенотипа.

Методы. Белых крыс-самцов подвергали 7-дневному антиортостатическому вывешиванию (AOB) с предварительным введением амитриптилина. В полученных *m. soleus* посредством флуоресцентной микроскопии исследовали уровни *ASM*, церамида, изоформ *MyHC*, *AФK*, *NADPH-оксидазы 2 (NOX2, NADPH oxidase 2)*, *MyoD1 (myoblast determination protein 1)*, *KПГ* и рецепторов *KПГ (RAGE, receptor for advanced glycation end-products)*. Вестерн-блоттинг использовали для определения *NOX2, RAGE* и *KПГ*-модифицированных белков в гомогенатах тканей. В модели *ex vivo* посредством инкубации мышцы с экзогенным *KПГ* изучали изменения *MyoD1* в миоядрах.

Результаты. Функциональная разгрузка привела к уменьшению массы и диаметра *m. soleus*, трансформации миозинового фенотипа, росту уровня *ASM*, церамида, *AФK*, *NOX2*, *KПГ*, *RAGE* и ядерного *MyoD*. При этом уровни *NOX2* и *KПГ*-модифицированных белков остались без изменений. Применение амитриптилина частично нивелировало потерю массы мышц и уменьшение диаметра мышечных волокон, снижая при этом соотношение «быстрых» волокон к «медленным». Также применение амитриптилина уменьшало уровни *ASM*, церамида, *AФK*, *RAGE* и *MyoD1*. Инкубация мышц с экзогенным *KПГ* приводила к увеличению *MyoD1* в области миоядер.

Выводы. Активация *ASM* на фоне разгрузки может способствовать *MyoD1*-ассоциированной трансформации изоформ *MyHC* посредством увеличения *AФK*, способствующих стимуляции сигнальных путей *RAGE*.

Ключевые слова: функциональная разгрузка, кислая сфингомиелиназа, конечные продукты гликирования, окислительный стресс, мышечный фенотип, *MyoD*, амитриптилин

Для цитирования: Протопопов В.А., Секунов А.В., Мугизов А.М., Свидерский И.В., Брындина И.Г. Влияние ингибитора кислой сфингомиелиназы на окислительный стресс, конечные продукты гликирования и миозиновый фенотип камбаловидной мышцы крыс в условиях функциональной разгрузки. *Acta biomedica scientifica*. 2025; 10(1): 123-135. doi: 10.29413/ABS.2025-10.1.13

Статья поступила: 24.07.2024

Статья принята: 29.01.2025

Статья опубликована: 13.03.2025

THE EFFECT OF ACID SPHINGOMYELINASE INHIBITOR ON OXIDATIVE STRESS, ADVANCE GLYCATION END PRODUCTS AND MYOSIN PHENOTYPE OF RAT SOLEUS MUSCLE UNDER CONDITIONS OF FUNCTIONAL UNLOADING

ABSTRACT

Protopopov V.A.,
Sekunov A.V.,
Mugizov A.M.,
Svidersky I.V.,
Bryndina I.G.

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

Corresponding author:
Alexey A. Sekunov,
e-mail: alexeisekunov@yandex.ru

Introduction. Functional unloading of muscles is accompanied by slow-to-fast transformation of muscle myosin phenotype, an increase in acid sphingomyelinase (ASM) activity, ceramide, reactive oxygen species (ROS), and advanced glycation end products (AGEs). The association of sphingolipids, AGEs-associated processes and muscle plasticity has not been studied.

The aim. To assess the relationship of ASM and ceramide-associated increase in ROS to the AGEs-dependent pathway regulating the expression of various myosin heavy chains (MyHC) isoforms during 7-day functional unloading of rat *m. soleus*, and to evaluate the efficacy of the FIASMA drug in preventing muscle phenotype change.

Methods. White male rats were subjected to 7-day hindlimb suspension (HS) combined with administration of the acid sphingomyelinase inhibitor amitriptyline. Fluorescence microscopy was used to detect the levels of ASM, ceramide, MyHC isoforms, ROS, NADPH oxidase 2 (NOX2), MyoD1 (myoblast determination protein 1), AGEs and their receptors (RAGE, receptor for advanced glycation end-products) in the soleus muscle. Western blotting was used for detection of NOX2, RAGE and AGEs-modified proteins in muscle homogenates. The changes in MyoD1 level in myonuclei were studied ex vivo by incubating the muscle with exogenous AGEs.

Results. Unloading led to a decrease in the muscle mass and fiber diameter, transformation of myosin phenotype, an increase in ASM, ceramide, ROS, NOX2, AGEs, RAGE and nuclear MyoD1 content. NOX2 and AGEs-modified proteins did not change. Amitriptyline mitigated the loss of muscle mass and fiber diameter reduction, decreased fast to slow shift. It also decreased ASM, ceramide, ROS, RAGE, and mionuclear MyoD1. Muscle incubation with exogenous AGEs increased in MyoD1 in myonuclei.

Conclusion. ASM activation during soleus muscle unloading contributes to the MyoD1-related slow-to-fast myosin transformation associated with ROS overproduction and RAGE signaling.

Keywords: functional unloading, acid sphingomyelinase, advanced glycation end products, oxidative stress, muscle phenotype, MyoD, amitriptyline

Received: 24.07.2024
Accepted: 29.01.2025
Published: 13.03.2025

For citation: Protopopov V.A., Sekunov A.V., Mugizov A.M., Svidersky I.V., Bryndina I.G. The effect of acid sphingomyelinase inhibitor on oxidative stress, advance glycation end products and myosin phenotype of rat soleus muscle under conditions of functional unloading. *Acta biomedica scientifica*. 2025; 10(1): 123-135. doi: 10.29413/ABS.2025-10.1.13

ВВЕДЕНИЕ

Функциональная разгрузка постуральных мышц – одно из базовых состояний в патологии гравитационно-зависимых систем организма [1]. Данное состояние непосредственно связано с неиспользованием (disuse) скелетной мускулатуры и наиболее часто встречается при воздействии на организм космической микрогравитации и условий длительного нахождения на постельном режиме по причине травм, соматических или неврологических заболеваний [2].

Известно, что при функциональной разгрузке молекулярные изменения в мышечном волокне могут затрагивать анаболические и катаболические сигнальные пути, а также за счёт различных механизмов реализовать сдвиги мышечного фенотипа [3]. Ранее мы показали, что сфинголипидный сигналинг может играть значительную роль в изменении мышечного фенотипа при функциональной разгрузке [4]. В частности, было установлено, что использование препарата из группы функциональных ингибиторов кислой сфингомиелиназы (FIASMA) эффективно предотвращает избыточное накопление церамида в *m. soleus* и частично уменьшает перестройку регуляции экспрессии тяжёлых цепей миозина (MyHC, myosin heavy chains) в сторону «быстрых» изоформ. Кислая сфингомиелиназа (ASM, acid sphingomyelinase) и продукты её активации также способны влиять и на ряд других процессов в мышечном волокне, характерных для функциональной разгрузки [5]. Также ранее мы показали, что сфингомиелиназа может индуцировать быстрый прирост активных форм кислорода (АФК) в скелетных мышцах, а её ингибитор амитриптин предотвращает прирост АФК и их прооксидантного источника НАДФН-оксидазы 2 (NOX2, NADPH oxidase 2) на фоне функциональной разгрузки камбалоидных мышц в течение двух недель. В свою очередь, связанный с АФК окислительный стресс способен индуцировать в мышечном волокне изменения, ассоциированные с энергетическим обменом, повреждением биомембран и клеточной гибелью [6].

С другой стороны, установлено, что механизмы развития окислительного стресса, а также экспрессии MyHC в скелетных мышцах и миобластах могут контролироваться посредством сигнальных путей конечных продуктов гликирования (КПГ) и их рецепторов (RAGE, receptor for advanced glycation end-products) [7]. КПГ представляют собой гетерогенную группу соединений – белков, липидов или ДНК, неферментативным путём связанных с глюкозой или другими сахарами и их производными (метилглиоксаль, ацетальдегид и др.) [8]. Существует несколько путей образования КПГ: реакции Майяра, полиоловый путь и перекисное окисление липидов. Роль КПГ и их рецепторов неоднократно обсуждалась в аспекте патогенеза дисфункций скелетных мышц, в частности при сахарном диабете [9]. Ещё одной мишенью сигналинга КПГ/RAGE являются провоспалительные механизмы, ассоциированные с активацией ядерного фактора каппа B (NF- κ B, nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells), а также экспрессии некоторых цитокинов. В од-

ной из недавних работ было показано, что последствия разгрузки скелетных мышц мышей в течение 14 дней могут быть частично предотвращены посредством применения ингибитора рецепторов RAGE [10]. Работа авторов была посвящена в основном исследованию механизмов, связанных с воспалительными процессами, в то же время механизмы развития окислительного стресса, который может способствовать как образованию КПГ, так и увеличению экспрессии RAGE, при этом не изучались.

В контексте мышечной пластичности особенно интересен RAGE-активируемый путь p38 MAPK (mitogen-activated protein kinase) через Cdc42/Rac1/MKK6. Данный сигнальный путь непосредственно влияет на экспрессию миогенного транскрипционного фактора MyoD (myoblast determination protein), связанного с регуляцией MyHC в процессе дифференцировки мышечного волокна [11].

Учитывая ранее полученные нами данные о предотвращении генерации АФК посредством ингибирования ASM [12], а также роль АФК в стимуляции образования КПГ и усиении экспрессии RAGE, мы предположили, что данные процессы могут быть взаимосвязаны и в условиях бездействия скелетных мышц включаться в патогенез атрофии и изменений мышечного фенотипа.

Результаты исследования могут быть полезны для разработки эффективных методов профилактики и терапии атрофии и дисфункции мышц у пациентов с травмами и другими заболеваниями, находящимися на длительном постельном режиме, а также у космонавтов при продолжительных космических полётах.

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Определить взаимосвязь кислой сфингомиелиназы и церамид-ассоциированного увеличения активных форм кислорода с зависимым от конечных продуктов гликирования путём регуляции экспрессии различных изоформ тяжёлых цепей миозина при 7-дневной функциональной разгрузке *m. soleus* крыс, а также оценить эффективность препарата группы FIASMA в предотвращении изменения мышечного фенотипа.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Животные и экспериментальный протокол

Эксперименты проводились на самцах крыс линии Wistar массой 200–250 г. Мышечная разгрузка моделировалась по модели разгрузки задних конечностей (HS, hindlimb suspension) Новикова – Ильина в модификации Morey – Holton. Животные подвергались антиортостатическому вывешиванию (AOB) под углом 30° в течение 7 дней со свободным доступом к воде и пище, а также со свободным передвижением по клетке. Исследование было одобрено этическим комитетом ФГБОУ ВО «Ижевская государственная медицинская академия» Минздрава России (протокол № 685/1 от 10.03.2020). Эксперименты проводились в соответствии с правилами работы с экспериментальными животными (Приложение к Приказу Минздрава

РФ № 267 от 19.06.2003). Для воздействия на ASM использовался препарат группы FIASMA амитриптилин (ФГУП «Московский эндокринный завод», Россия), который вводили животным с питьём в растворе (250 мг/л) в течение 7 дней до начала HS и на протяжении всего эксперимента.

Все животные были разделены на четыре группы: 1) виварный контроль (Cntr; $n = 6$); 2) HS в течение 7 дней (7d HS; $n = 6$); 3) HS на фоне применения амитриптилина (7d HS + AMI; $n = 6$); 4) группа, в которой исследования проводили *ex vivo* на *m. soleus*, полученных от интактных крыс ($n = 4$). После окончания эксперимента всех животных наркотизировали внутрибрюшинно ти-летамином и золазепамом (Золетил, Вирбак, Франция, 10 мг/кг 0,1 мл), извлекали *m. soleus*, после чего сразу декапитировали. Для иммуногистохимического исследования мышечный биоматериал подвергали шоковой заморозке через мультипоровый криовиал в атмосфере жидкого азота [13]. Для иммуноблоттинга биоматериал сортировали в отдельные эпендорфы и замораживали. Все приготовленные образцы ткани хранили при -80°C .

Для оценки атрофии фиксировали отношение массы *m. soleus* к массе тела животного, а также проводили измерения диаметра мышечных волокон на поперечных срезах, меченных антителами к мембранным маркеру кавеолину-3.

Флуоресцентные исследования

Для оценки иммунофлуоресценции изготавливали серийные срезы *m. soleus* толщиной 14 мкм на микротоме HM525 NX Cryostat (Thermo Fisher Scientific, США). Срезы фиксировали 4%-м параформальдегидом в течение 15 мин и пермеабилизовали с 1%-м Тритоном-X100 и 5%-м бычьим сывороточным альбумином (BSA, bovine serum albumin). Срезы инкубировали в течение ночи при 4°C , используя первичные антитела к церамиду (mouse IgG, 1:300; Enzo Life Sciences Inc., США), антитела к кислой сфингомиелиназе (rabbit IgG, 1:200\$ Affinity Biosciences, США), антитела к «быстрым» (rabbit IgG, 1:200; Abcam, Великобритания) и «медленным» (mouse IgG, 1:200; Abcam, Великобритания) изоформам MyHC, антитела к КПГ (mouse IgG; Cloud-Clone Corp., США), RAGE (rabbit IgG, 1:200; Affinity Biosciences, США), кавеолину-3 (rabbit IgG, 1:200; Affinity Biosciences, США) и MyoD1 (rabbit IgG, 1:200; Affinity Biosciences, США). После инкубации срезы промывали и наносили соответствующие вторичные антитела Alexa Fluor 647 (goat anti-mouse IgG, 1:300; Abcam, Великобритания) или Alexa Fluor 488 (goat anti-rabbit IgG, 1:300; Abcam, Великобритания) на 45 мин при 37°C .

Исследование АФК проводили с использованием H2DCFDA (2',7'-дихлородигидрофлуоресцеин диацетат; Lumiprobe, Россия), как было показано ранее [12]. Реактив наносили на криосекции мышечной ткани в концентрации 10 μM и инкубировали в течение 30 минут без доступа к свету с последующей флуоресцентной микроскопией.

Для исследования *ex vivo* *m. soleus* одной из конечностей каждой из крыс инкубировали с экзогенным AGE-BSA, *m. soleus* второй конечности служила контролем и инкубировалась в буферном растворе без добавления AGE-BSA. AGE-BSA изготавливали заранее путём

инкубации BSA (50 мг/мл) с 0,5 М глюкозой в 0,2 М фосфатном буфере в течение 4 дней при 50°C в стерильных условиях. Извлечённые мышцы одной из конечностей каждой из крыс помещали в камеру с буфером (NaCl 137 mM; KCl 5 mM; CaCl₂ 2 mM; MgCl₂ 2 mM; NaHCO₃ 24 mM; NaH₂PO₄ 1 mM; глюкоза 11 mM; pH = 7,4) с добавлением AGE-BSA (16 мкг/мл); мышцу другой конечности инкубировали в том же буфере без добавления AGE-BSA в течение 2 ч. После инкубации мышцы фиксировали в растворе 4%-го параформальдегида в течение 1 ч, отмывали в физиологическом растворе и инкубировали с первичными поликлональными антителами к MyoD1 (rabbit IgG, 1:1000; Affinity Biosciences, США) в течение ночи при 4°C . Вторичные антитела Fluor 647 (goat anti-rabbit IgG, 1:300; Affinity Biosciences, США) наносили на 60 мин при 37°C . Ядра окрашивали с помощью красителя DAPI.

Флуоресцентный сигнал детектировали с помощью микроскопа Nikon Eclipse E200 (Nikon Corporation, Япония), оснащённого EF-2E эпифлуоресцентной насадкой и цифровой RGB-камерой высокого разрешения Nikon серии DS-Fi3 (Nikon Corporation, Япония). Результаты оценки и обработки флуоресцентного сигнала представлены в условных единицах (у. е.), формируемый программным обеспечением Fiji на основании преобразования показателей количества и яркости пикселей в изображении.

Вестерн-блоттинг

Количественную оценку компонентов окислительного стресса и сигналинга КПГ производили методом иммуноблоттинга. В пробах белок выравнивали относительно его концентраций, рассчитанных по общепринятому методу Бредфорда. Разделение белков проводили с использованием электрофореза в градиентном (4–12 %) SDS-полиакриламидном геле (SDS-PAGE, sodium dodecyl-sulfate polyacrylamide gel electrophoresis). Перенос на нитроцеллюлозные мембранны оценивали посредством окраски Ponceau S. Полученные мембранны инкубировали с первичными антителами к NOX2 (rabbit IgG, 1:1000; Affinity Biosciences, США), КПГ и RAGE (rabbit IgG, 1:1000; Affinity Biosciences, США) в течение ночи при 4°C . Вторичные антивидовые антитела с пероксидазной меткой (goat anti-rabbit IgG, 1:500; Abcam, Великобритания) наносили на нитроцеллюлозные мембранны и инкубировали в течение 1 ч при 37°C . Проявляли полосы с помощью диаминбензидиновой реакции. Цифровые изображения анализировали в программе ImageLab Software (Bio-Rad, США), и представляли результаты в виде условных единиц, преобразованных программным обеспечением на основании градиента серого цвета.

Статистическая обработка

Статистическая обработка результатов производилась методом вариационной статистики на языке программирования Python (v. 3.12). Оценка статистической значимости различий между группами проводилась посредством непараметрических методов. Для сравнения данных, полученных от трёх групп, применялся критерий Краскела – Уоллиса, для уточнения парных межгрупповых различий применялся метод парной оценки

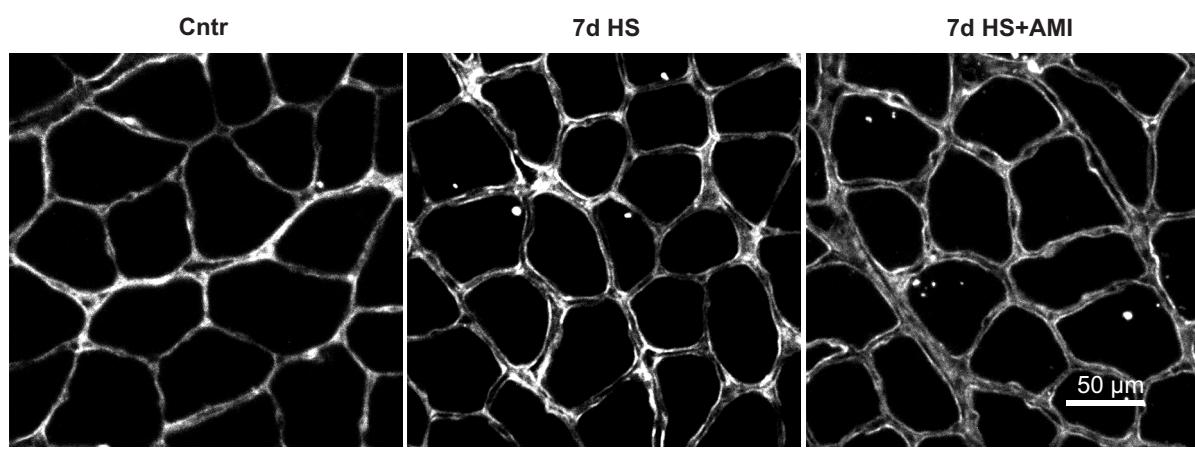
Манна – Уитни. Различия между группами считались статистически значимыми при $p < 0,05$. Данные иммунофлуоресценции и иммуноблоттинга были представлены в виде медианы и значений 1-го и 3-го квартилей (Q1; Q3).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

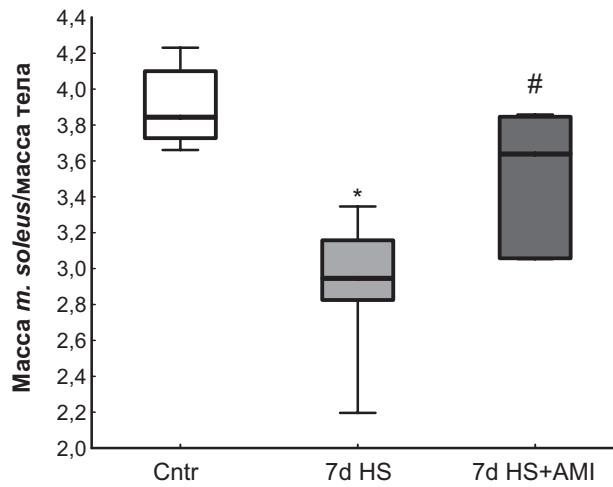
Оценка массы камбаловидных мышц и диаметра мышечных волокон при 7-дневной функциональной разгрузке

Анализ диаметра Ферета мышечных волокон, а также измерение относительной массы мышц проводились нами для оценки степени атрофии мышц при 7-дневной функциональной разгрузке и эффектов влияния блокатора кислой сфингомиелиназы.

В группе 7-дневной разгрузки как относительная масса мышц, так и диаметр мышечных волокон имели более низкие значения по сравнению с группой контроля ($p = 0,002$). На фоне применения амитриптилина, напротив, масса мышц увеличивалась в сравнении с группой разгрузки без препарата ($p = 0,026$). Подобная тенденция к увеличению также была обнаружена нами при исследовании диаметра мышечных волокон, который уменьшался при АОВ ($p = 0,008$), однако в данном случае статистически значимых изменений в группе разгрузки на фоне введения амитриптилина по сравнению с группой разгрузки без препарата обнаружено не было. В то же время статистически значимых различий в группе применения амитриптилина на фоне вышивания также не наблюдалось и при сравнении с контрольными животными (рис. 1).



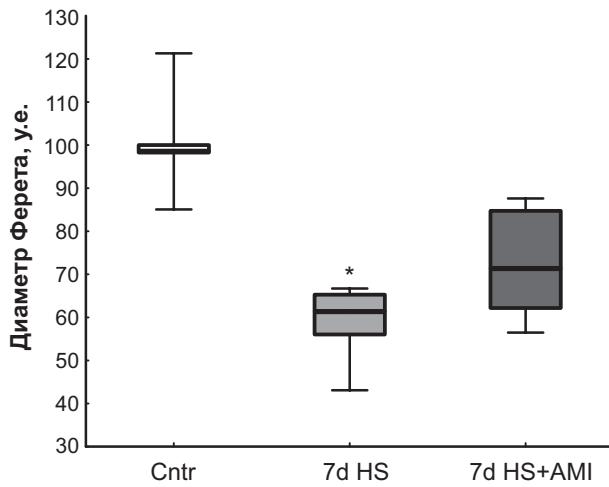
а



б

РИС 1.

Относительная масса *m. soleus* крыс и диаметр Ферета мышечных волокон при 7-дневной функциональной разгрузке без введения амитриптилина (7d HS) и на фоне его применения (7d 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 вышиванием



в

FIG. 1.

Relative mass of rat soleus muscles and Feret diameter of muscle fibers during 7-day hindlimb suspension (7d HS) and 7-day hindlimb suspension with amitriptyline administration (7d HS + AMI): 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

Оценка мышечного фенотипа и уровней кислой сфингомиелиназы и церамида в *m. soleus* крыс при 7-дневной функциональной разгрузке

Для того чтобы охарактеризовать компоненты сфинголипидного сигналинга и мышечный фенотип при 7-дневной функциональной разгрузке, нами был проведён анализ иммунофлуоресценции церамида, ASM, «быстрой» и «медленной» изоформ MyHC на по-

перечных криосекциях *m. soleus* крыс (рис. 2). Функциональная разгрузка к 7-му дню АОВ характеризовалась существенным приростом интенсивности, детектируемой от комплексов антител, иммунореактивных к церамиду и ASM ($p = 0,001$ и $p = 0,001$ соответственно). Применение амитриптилина частично нивелировало данный прирост: показатели иммунофлуоресценции церамида и ASM стали статистически значимо ниже, чем в групп-

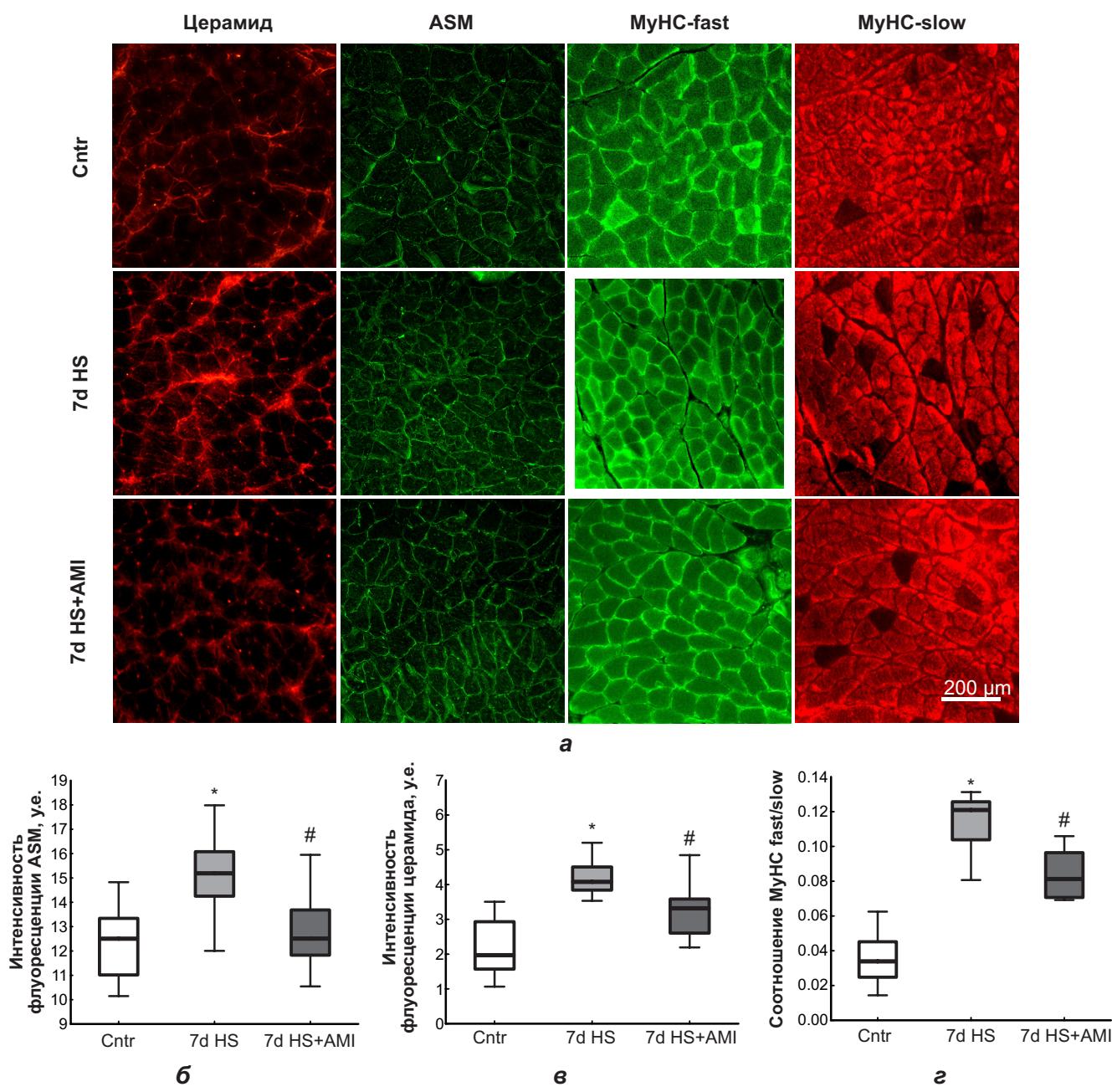


FIG. 2.
Immunofluorescence study of ceramide, ASM, “fast” and “slow” MyHC isoforms in rat soleus muscles at 7-day hindlimb suspension (7d HS) and 7-day hindlimb suspension with amitriptyline administration (7d HS + AMI): Cntr – control animals; * – differences are statistically significant at $p < 0.05$ in comparison with the control rats; # – differences are statistically significant at $p < 0.05$ in comparison with HS rats

пе вывешивания без применения ингибитора ($p = 0,001$ и $p = 0,005$ соответственно) (рис. 2а–в).

Для оценки изменения мышечного фенотипа мы проанализировали количественное отношение волокон, экспрессирующих «быстрые» и «медленные» изоформы МуНС (рис. 2а, г). Закономерно, что 7-дневная функциональная разгрузка сопровождалась сдвигом данного отношения в сторону значительного увеличения количества волокон, экспрессирующих «быстрые» изоформы МуНС ($p < 0,001$). Применение амитриптилина способствовало частичному предотвращению изменения фенотипа *m. soleus*, на что указывала более низкая величина соотношения «быстрых» и «медленных» волокон ($p = 0,029$).

Влияние ингибитора кислой сфингомиелиназы амитриптилина на изменения NADPH-оксидазы 2 и активных форм кислорода в *m. soleus* крыс при 7-дневной функциональной разгрузке

Исследование АФК было проведено нами на поперечных криосекциях мышечной ткани (рис. 3а, б). В группе животных, подвергнутых функциональной разгрузке, мы наблюдали статистически значимый прирост детектируемого флуоресцентного сигнала, вызванного взаимодействием H2DCFDA с АФК ($p < 0,001$). Более низкие показатели яркости флуоресценции демонстрировала группа животных, получавших амитриптилин до и в течение функциональной разгрузки ($p < 0,001$).

Иммунофлуоресцентный анализ NOX2 показал статистически значимый прирост прооксидантного маркера в группе разгрузки; применение амитриптилина характеризовалось тенденцией к снижению NOX2 по сравнению с группой разгрузки (рис. 3а, в). Анализ тотального содержания NOX2, согласно результатам вестерн-блоттинга, несмотря на наличие тенденции к росту в группе вывешивания без препарата, не показал статистически значимых различий в сравнении с контролем (рис. 3г).

Оценка конечных продуктов гликовирования и их рецепторов в *m. soleus* крыс при 7-дневной функциональной разгрузке

Исследование было проведено нами посредством анализа иммунофлуоресценции КПГ на поперечных криосекциях мышечной ткани, а также посредством оценки их уровня в гомогенатах мышечной ткани с помощью вестерн-блоттинга (рис. 4). Полученные данные продемонстрировали статистически значимый прирост КПГ по сравнению с контрольной группой ($p = 0,001$) в иммунофлуоресцентных исследованиях. Использование амитриптилина характеризовалось незначительной тенденцией к снижению иммунофлуоресценции КПГ по сравнению с функциональной разгрузкой, однако наблюдался более высокий уровень КПГ по сравнению с контрольной группой. Иммуноэкспрессия КПГ в гомогенатах мышечной ткани показала, что белки с молекулярной массой 75–100 кДа имеют некоторую преиущественную подверженность гликозилированию (рис. 4в).

Иммунофлуоресценция и тотальное содержание RAGE в *m. soleus* в значительной степени увеличивались на фоне 7-дневной функциональной разгрузки ($p = 0,002$). Применение амитриптилина значительно снижало интенсивность иммунофлуоресценции RAGE в области сарколеммы, согласно данным иммунофлуоресцентного анализа, а также показало тенденцию к снижению тотального содержания, согласно результатам вестерн-блоттинга (рис. 5). В то же время уровни иммунофлуоресценции и тотального содержания RAGE оставались увеличенными по сравнению с группой контроля (рис. 5).

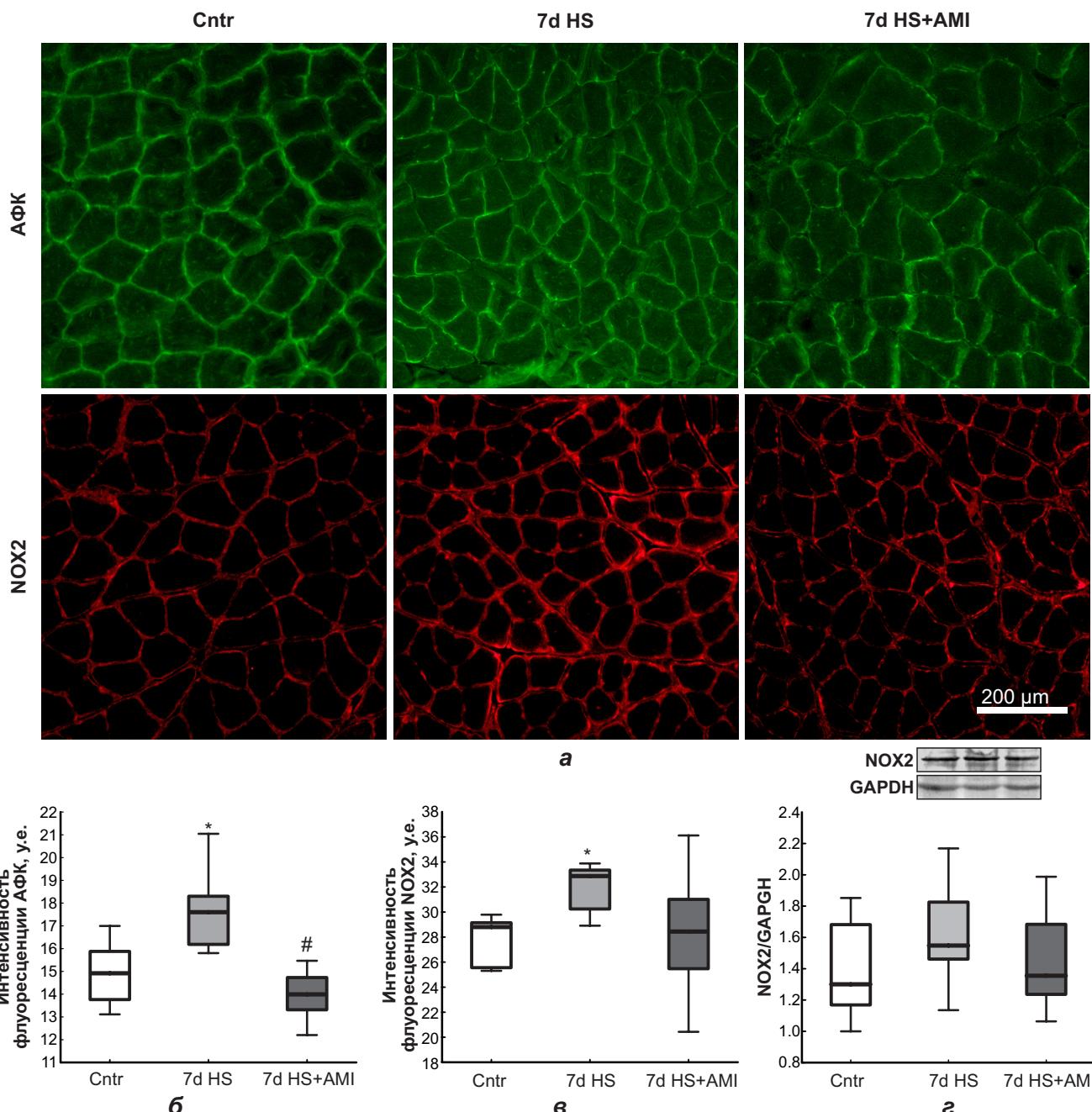
Анализ индуцированной конечными продуктами гликовирования ядерной иммунофлуоресценции MyoD1 в *m. soleus* крыс

На поперечных криосекциях мышечной ткани мы проанализировали иммунофлуоресценцию MyoD1, а именно её изменение в областях ядерного DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) окрашивания (рис. 6а, б). Функциональная разгрузка в течение 7 дней продемонстрировала статистически значимый прирост уровня ядерно-локализованного MyoD1 ($p = 0,041$). При этом мы не обнаружили разницы по уровню интенсивности иммунофлуоресцентного сигнала от MyoD1 в группе, получавшей амитриптилин до и во время вывешивания по сравнению с контролем.

В *ex vivo* исследовании иммунофлуоресценции MyoD1 (рис. 6в, г) на фоне предварительной инкубации препарата *m. soleus* с AGE-BSA было обнаружено значительное повышение иммунофлуоресцентного сигнала, ко-локализованного с областями DAPI-окрашивания миоядер ($p < 0,001$).

ОБСУЖДЕНИЕ

В данной работе мы исследовали роль активации ASM и церамид-ассоциированного увеличения АФК с КПГ/RAGE/MyoD1-зависимым путём регуляции экспрессии быстрых и медленных изоформ МуНС при 7-дневной функциональной разгрузке *m. soleus* крыс. Применение препарата группы FIASMA амитриптилина при функциональной разгрузке в качестве способа воздействия на сфингомиелиназный гидролиз показало, что уменьшение ASM-зависимых генераций сарколеммального церамида в мышце частично предотвращает сдвиг миозинового фенотипа и ядерную транслокацию MyoD1, снижает уровень АФК и RAGE, частично предотвращает потерю массы мышц и диаметра мышечных волокон, но не влияет на КПГ. В исследованиях *ex vivo* мы показали, что добавление AGE-BSA в качестве экзогенного КПГ способно приводить к значительному увеличению ядерной иммунофлуоресценции MyoD1 – предположительно, вследствие индукции ядерной транслокации данного транскрипционного фактора в результате активации пути КПГ/RAGE/MyoD1.

**РИС. 3.**

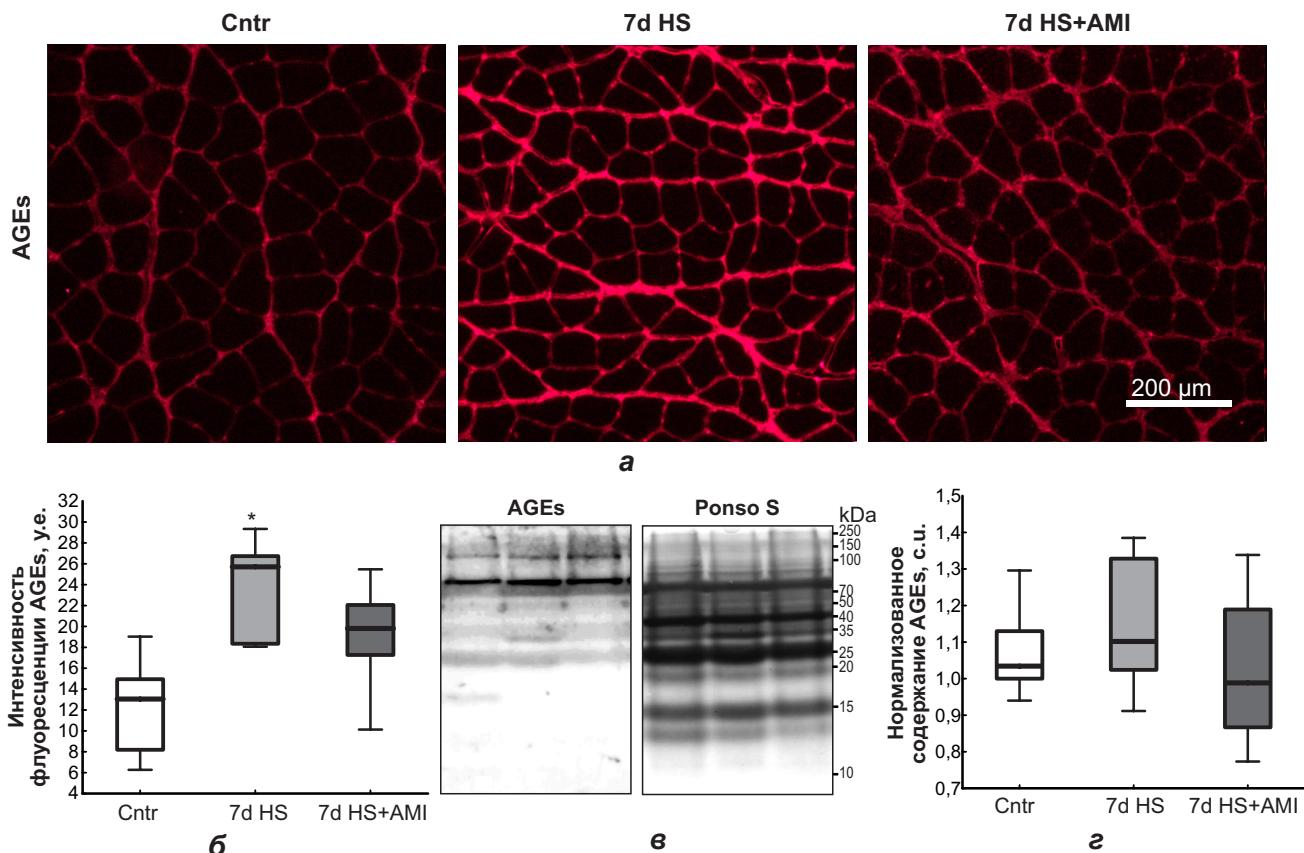
Иммунофлуоресценция АФК и уровень протеина NOX2 (вэстерьн-блоттинг) в камбаловидных мышцах крыс при 7-дневном антиортостатическом вывешивании без ингибитора ASM (7d HS) и при применении амитриптилина (7d HS + AMI): Cntr – контроль; * – различия статистически значимы при $p < 0,05$ в сравнении с контролем; # – $p < 0,05$ в сравнении с вывешиванием

FIG. 3.

Immunofluorescence study of ROS and NOX2 level in rat soleus muscles at 7-day hindlimb suspension (7d HS) and 7-day hindlimb suspension with amitriptyline administration (7d HS + AMI): 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

Известно, что функциональная разгрузка сопровождается различными изменениями структуры и функции скелетных мышц. В наших предшествующих исследованиях мы показали, что ингибиторы кислой сфингомиелиназы кломипрамин и амитриптилин способны эффективно уменьшать уровень церамида, АФК и прооксидантных ферментов; частично нивелировать сдвиг

изоформ МуНС в сторону «быстрых»; частично предотвращать снижение массы мышц и диаметра мышечных волокон на фоне 14-дневной функциональной разгрузки [4, 12]. В данном исследовании на сроке 7 дней после разгрузки мы также подтверждаем, что ингибитор FIASMA амитриптилин статистически значимо предотвращает рост уровня церамида, ASM, АФК, а также ча-

**РИС. 4.**

Исследование иммунофлуоресценции (**а, б**) и уровня КПГ (**в, г**; вестерн-блоттинг) в камбаловидных мышцах крыс при 7-дневном антиортостатическом вывешивании (7d HS) и 7-дневном антиортостатическом вывешивании с применением амитриптилина (7d HS + AMI) в течение 7 дней: Cntr – контроль; * – различия статистически значимы при $p < 0,05$ в сравнении с контролем; # – $p < 0,05$ в сравнении с вывешиванием

FIG. 4.

Immuno-fluorescence (**a, б**) and immunoexpression study of AGEs (**в, г**) in rat soleus muscles at 7-day hindlimb suspension (7d HS) and 7-day hindlimb suspension with amitriptyline administration (7d HS + AMI): Cntr – control animals; * – differences are statistically significant at $p < 0,05$ in comparison with the control rats; # – $p < 0,05$ in comparison with HS rats

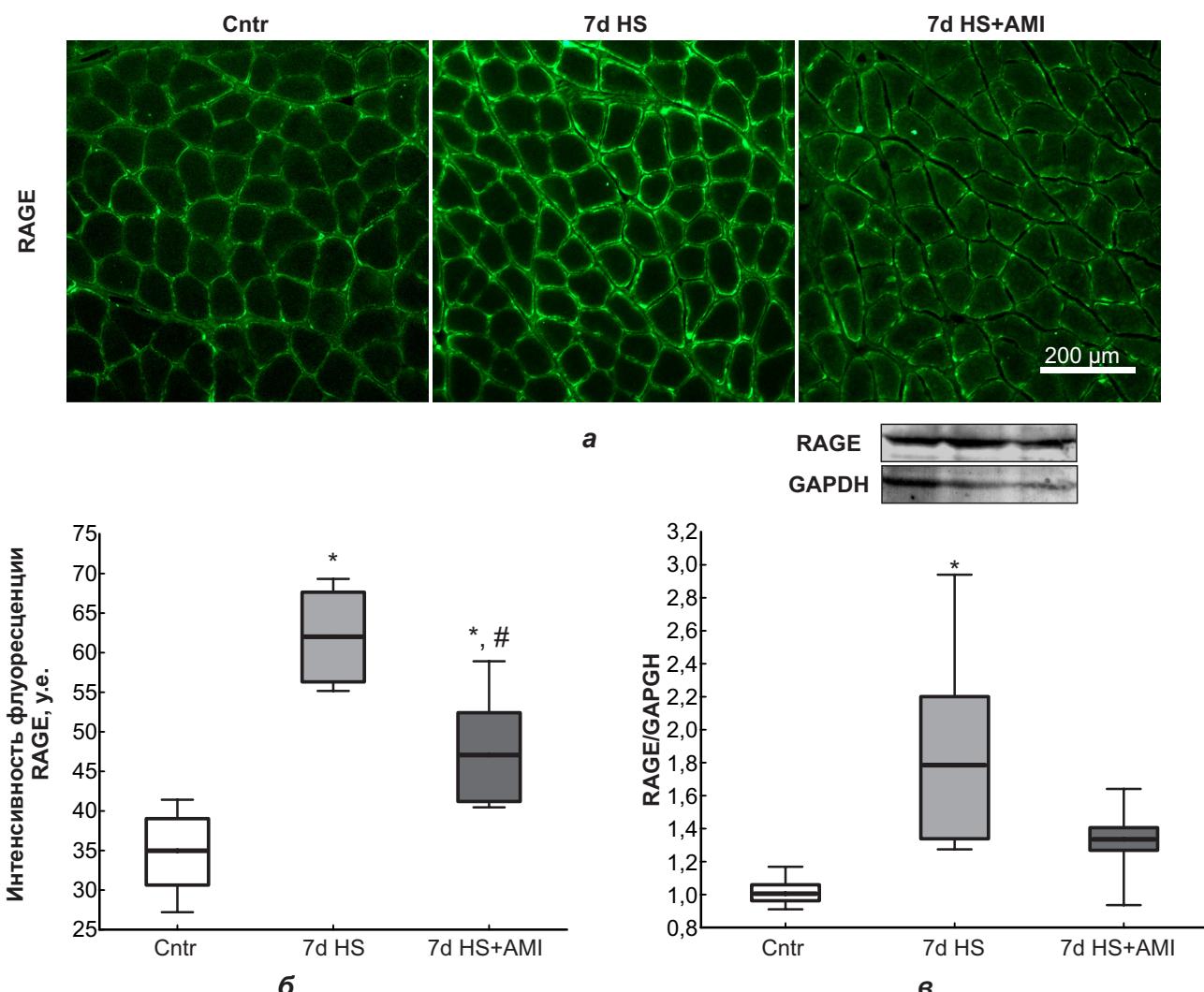
стично предотвращает увеличение RAGE, трансформацию мышечного фенотипа от «медленного» к «быстро- му», потерю относительной массы мышц и уменьшение диаметра мышечных волокон.

Как утверждалось ранее, сигнальные пути КПГ по-средством взаимодействия со своими рецепторами RAGE способны приводить к развитию окислительного стресса и воспаления [7]. С другой стороны, сигнальный путь RAGE может опосредованно стимулировать транскрипционный фактор MyoD1 и быть связанным с активацией транскрипции быстрых изоформ миозина [11, 14]. В работе T. Egawa и соавт. впервые было показано, что функциональная разгрузка на фоне 14 дней сопровождается увеличением КПГ и их рецепторов RAGE в камбаловидных мышцах мышей. Авторы данной работы также показали, что ингибирование RAGE сопровождается уменьшением изменений, ассоциированных с воспалением, а также ограничивает снижение мышечной массы, уменьшение размеров мышечных волокон и количество волокон медленного типа [10]. В данной работе не изучались изменения, ассоцииро-

ванные с другими мишениями сигналинга RAGE, а именно NOX2 и MyoD1.

В нашем исследовании на фоне 7-дневной разгрузки мы также обнаружили увеличение RAGE и КПГ в камбаловидных мышцах (иммунофлуоресцентная микроскопия), однако результаты КПГ-модифицированных белков, по данным вестерн-блоттинга, не характеризовались значительными изменениями во всех исследуемых группах. Учитывая, что КПГ могут быть образованы не только из белковых молекул, но также из липидов и ДНК, можно предположить, что данные, полученные нами посредством иммунофлуоресцентного метода, характеризуют наиболее полную картину изменений. В то же время нельзя исключить, что 7-дневный срок разгрузки не приводит к выраженным модификациям белков, опосредованным процессом гликации, по сравнению с более длительным сроком 14-дневной разгрузки, исследованным в работе T. Egawa и соавт.

Примечательно, что применение амитриптилина на фоне разгрузки приводило к статистически значимому уменьшению уровней RAGE по сравнению с группой

**РИС. 5.**

Исследование иммунофлуоресценции и уровня белка RAGE методом иммуноблоттинга в камбаловидных мышцах крыс при антиортостатическом вывешивании в течение 7 дней (7d HS) и вывешивании с применением амитриптилина (7d HS + AMI) (а-в); Cntr – контроль; * – различия статистически значимы при $p < 0,05$ в сравнении с контролем; # – $p < 0,05$ в сравнении с вывешиванием

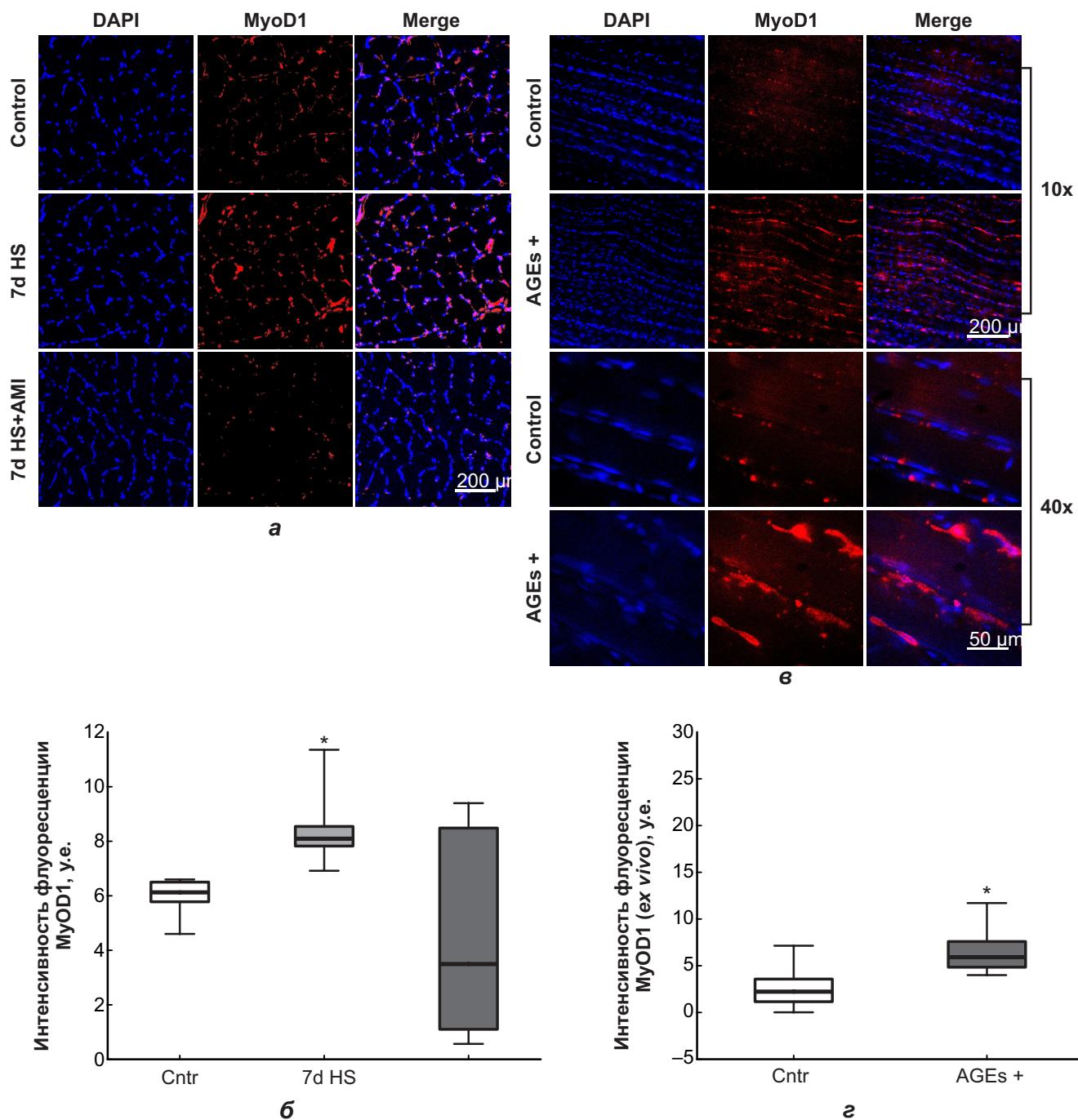
пой разгрузки без препарата, однако препарат практически не повлиял на повышенный уровень КПГ. Уменьшение уровня RAGE на фоне ингибитора ASM амитриптилина можно объяснить снижением генерации церамида. ASM предположительно предотвращает процесс, при котором повышение уровня церамида способствует увеличению продукции АФК и дальнейшему стимуляции экспрессии RAGE. Известно, что между активными формами кислорода и RAGE также существует перекрестная взаимосвязь. Так, с одной стороны, активация RAGE способствует образованию АФК, а с другой – АФК могут стимулировать экспрессию RAGE [15]. Ранее нами было показано, что добавление экзогенной сфингомиелиназы к камбаловидной мышце в модели *ex vivo* может приводить к более чем 6-кратному увеличению продук-

FIG. 5.

Immunofluorescence study and immunoblot analysis of RAGE protein in rat soleus muscles at 7-day hindlimb suspension (HS) and 7-day hindlimb suspension with amitriptyline administration (7d HS + AMI) (a-b): 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

ции АФК [12]. Мы предполагаем, что предотвращение образования АФК посредством уменьшения церамида и сфингомиелиназы при разгрузке на фоне применения амитриптилина способствует уменьшению образования АФК и, как следствие, к уменьшению экспрессии и активации сигнальных путей, ассоциированных с рецепторами RAGE.

Для оценки механизмов, связанных с изменением фенотипа волокон камбаловидных мышц на фоне разгрузки мы изучили одну из мишений сигнального пути RAGE – транскрипционный фактор MyoD1. Известно, что уровни MyoD1 в большей степени экспрессируются в «быстрых» мышцах по сравнению с «медленными», а сам фактор играет роль в активации транскрипции быстрых цепей миозина и, как следствие, в трансформа-

**РИС. 6.**

а, б – исследование иммунофлуоресценции MyoD1 в поперечных срезах камбаловидных мышцах крыс при 7-дневном антиортостатическом вывешивании (7d HS) и -дневном антиортостатическом вывешивании с применением амитриптилина (7d HS + AMI); в, г – ex vivo исследование иммунофлуоресценции MyoD1 в препаратах камбаловидных мышц, инкубированных с AGE-BSA (AGEs+): Cntr – контроль; 10x, 40x – степени увеличения при микроскопии; * – различия статистически значимы при $p < 0,05$ в сравнении с контролем; # – различия статистически значимы при $p < 0,05$ в сравнении с вывешиванием

FIG. 6.

а, б – study of MyoD1 immunofluorescence in transverse sections of rat soleus muscles at 7-day hindlimb suspension (7d HS) and 7-day hindlimb suspension with amitriptyline administration (7d HS + AMI); в, г – ex vivo study of MyoD1 immunofluorescence in preparations of m. soleus incubated with AGE-BSA (AGEs+); Cntr – control animals; 10x, 40x – microscopy zoom; * – 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

ции фенотипа от медленного к быстрому посредством дефосфорилирования и перемещения фактора в ядро [16]. Состояния, связанные с атрофией от бездействия, а также с денервацией и регенерацией, сопровождаются увеличением экспрессии MyoD1 [17, 18].

В нашем исследовании мы также показали, что уровень MyoD1 в ядрах камбаловидных мышц увеличивается на фоне 7-дневной разгрузки. Примечательно, что на фоне применения ингибитора ASM наблюдалась заметная тенденция к уменьшению уровня MyoD1 в области миоядер. Исследования о взаимосвязи КПГ, RAGE и MyoD1 немногочисленны и проводились только на отдельных мышечных клетках (миобластах), но не на цельной мышечной ткани [11], поэтому в данном контексте нами были проведены эксперименты в модели *ex vivo*, в которых мы показали, что 2-часовой инкубации с экзогенными КПГ оказалось достаточно для достижения значимых изменений, которые характеризовались статистически значимым увеличением уровня MyoD1 в ядрах мышечных волокон. Это подтверждает гипотезу о возможности влияния КПГ на активацию MyoD1 в скелетных мышцах.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в настоящем исследовании были изучены механизмы взаимосвязи сфинголипидного сигналинга (а именно роль церамида, образующегося в катализитическом сфингомиелиназном пути) с образованием конечных продуктов гликации и изменениями регуляции сдвига фенотипа мышечных волокон в условиях 7-дневной разгрузки *m. soleus*. Согласно результатам исследования, мы предполагаем, что активация ASM на фоне разгрузки может способствовать MyoD1-ассоциированной трансформации «медленного» фенотипа волокон камбаловидной мышцы в «быстрый» посредством увеличения продукции АФК, способствующих стимуляции сигнальных путей RAGE.

Финансирование

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект № 23-25-00420).

Конфликт интересов

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией данной статьи.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Lee PHU, Chung M, Ren Z, Mair DB, Kim DH. Factors mediating spaceflight-induced skeletal muscle atrophy. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2022; 322(3): 567-580. doi: 10.1152/ajpcell.00203.2021
- Ohira T, Kawano F, Goto K, Kaji H, Ohira Y. Responses of neuromuscular properties to unloading and potential countermeasures during space exploration missions. *Neurosci Biobehav Rev.* 2022; 136: 104617. doi: 10.1016/j.neubiorev.2022.104617
- Shenkman BS. From slow to fast: Hypogravity-induced remodeling of muscle fiber myosin phenotype. *Acta Naturae.* 2016; 8(4): 47-59.
- Sekunov AV, Protopopov VA, Skurygin VV, Shalagina MN, Bryndina IG. Muscle plasticity under functional unloading: Effects of an acid sphingomyelinase inhibitor clomipramine. *J Evol Biochem Physiol.* 2021; 57(4): 925-935. doi: 10.1186/s13395-018-0177-7
- 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
- He Z, Xu Q, Newland B, Foley R, Lara-Sáez I, Curtin JF, et al. Reactive oxygen species (ROS): Utilizing injectable antioxidative hydrogels and ROS-producing therapies to manage the double-edged sword. *J Mater Chem B.* 2021; 9(32): 6326-6346. doi: 10.3390/ijms20194860
- Nowotny K, Jung T, Höhn A, Weber D, Grune T. Advanced glycation end products and oxidative stress in type 2 diabetes mellitus. *Biomolecules.* 2015; 5(1): 194-222. doi: 10.3390/biom5010194
- Kuzan A. Toxicity of advanced glycation end products (Review). *Biomed Rep.* 2021; 14(5): 46. doi: 10.3892/br.2021.1422
- Riuuzzi F, Sorci G, Sagheddu R, Chiappalupi S, Salvadori L, Donato R. RAGE in the pathophysiology of skeletal muscle. *J Cachexia Sarcopenia Muscle.* 2018; 9(7): 1213-1234. doi: 10.1002/jcsm.12350
- Egawa T, Kido K, Yokokawa T, Fujibayashi M, Goto K, Hayashi T. Involvement of receptor for advanced glycation end products in microgravity-induced skeletal muscle atrophy in mice. *Acta Astronaut.* 2020; 176: 332-340. doi: 10.1016/j.actaastro.2020.07.002
- Sorci G, Riuzzi F, Arcuri C, Giambanco I, Donato R. Amphotericin stimulates myogenesis and counteracts the antimyogenic factors basic fibroblast growth factor and S100B via RAGE binding. *Mol Cell Biol.* 2004; 24(11): 4880-4894. doi: 10.1128/MCB.24.11.4880-4894.2004
- 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. [Protopopov VA, Sekunov AV, Panov AV, Bryndina IG. The relationship of sphingolipid mechanisms with oxidative stress and changes in mitochondria during functional unloading of postural muscles. *Acta biomedica scientifica.* 2024; 9(2): 228-242. (In Russ.)]. doi: 10.29413/ABS.2024-9.2.23
- Huang Y, He M, Zeng Q, Li L, Zhang Z, Ma J, et al. A multi-hole cryovial eliminates freezing artifacts when muscle tissues are directly immersed in liquid nitrogen. *J Vis Exp JoVE.* 2017; (122): 55616. doi: 10.3791/55616
- Chiappalupi S, Sorci G, Vukasinovic A, Salvadori L, Sagheddu R, Coletti D, et al. Targeting RAGE prevents muscle wasting and prolongs survival in cancer cachexia. *J Cachexia Sarcopenia Muscle.* 2020; 11(4): 929-946. doi: 10.1002/jcsm.12561
- Yao D, Brownlee M. Hyperglycemia-induced reactive oxygen species increase expression of the receptor for advanced

- glycation end products (RAGE) and RAGE ligands. *Diabetes*. 2010; 59(1): 249-255. doi: 10.2337/db09-0801
16. Ekmark M, Rana ZA, Stewart G, Hardie DG, Gundersen K. De-phosphorylation of MyoD is linking nerve-evoked activity to fast myosin heavy chain expression in rodent adult skeletal muscle. *J Physiol.* 2007; 584(2): 637-650. doi: 10.1113/jphysiol.2007.141457
17. Legerlotz K, Smith HK. Role of MyoD in denervated, disused, and exercised muscle. *Muscle Nerve*. 2008; 38(3): 1087-1100. doi: 10.1002/mus.21087
18. Zammit PS. Function of the myogenic regulatory factors Myf5, MyoD, myogenin and MRF4 in skeletal muscle, satellite cells and regenerative myogenesis. *Semin Cell Dev Biol.* 2017; 72: 19-32. doi: 10.1016/j.semcd.2017.11.011

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: alexeisekunov@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-1592-2927>

Мугизов Айдар Маратович – студент, ФГБОУ ВО «Ижевская государственная медицинская академия» Минздрава России, e-mail: aidar5246@gmail.com, <https://orcid.org/0009-0004-9031-1781>

Свидерский Илья Викторович – студент, ФГБОУ ВО «Ижевская государственная медицинская академия» Минздрава России, e-mail: g.cbugr@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0001-9175-2475>

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: alexeisekunov@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-1592-2927>

Aidar M. Mugizov – Student, Izhevsk State Medical Academy, e-mail: aidar5246@gmail.com, <https://orcid.org/0009-0004-9031-1781>

Ilya V. Svidersky – Student, Izhevsk State Medical Academy, e-mail: g.cbugr@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0001-9175-2475>

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>