



## ОГЛАВЛЕНИЕ

Авторский коллектив . . . . .	8
Список сокращений и условных обозначений . . . . .	10
Предисловие . . . . .	13
<b>ГЛАВА 1. ФИЗИОЛОГИЯ МЫШЕЧНОЙ СИСТЕМЫ . . . . .</b>	<b>16</b>
1.1. Введение . . . . .	16
1.2. Строение мышечного волокна . . . . .	17
1.3. Сокращение мышечного волокна . . . . .	18
1.4. Миозин . . . . .	25
1.5. Роль кальция в скелетных мышцах . . . . .	27
1.5.1. Кальциевые каналы L-типа . . . . .	28
1.5.2. $\text{Ca}^{2+}$ -АТФаза саркоплазматического ретикулума — SERCA . . . . .	30
1.5.3. Регуляция активности $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазы . . . . .	33
1.5.4. Физиологическая роль ионов кальция в клетке . . . . .	35
1.6. Механические характеристики мышечного волокна в поперечном направлении . . . . .	37
1.6.1. Поперечная жесткость сарколеммы мышечных волокон . . . . .	40
1.6.2. Поперечная жесткость сократительного аппарата мышечных волокон . . . . .	42
1.6.3. Структурно-функциональная роль белков внесаркомерного цитоскелета . . . . .	46
1.7. Старение мышечной ткани . . . . .	47
<b>ГЛАВА 2. НЕВЕСОМОСТЬ КАК ФАКТОР РАЗВИТИЯ   МЫШЕЧНОЙ АТРОФИИ У ЗДОРОВОГО   ЧЕЛОВЕКА . . . . .</b>	<b>51</b>
2.1. Введение . . . . .	51
2.2. Сократительные характеристики скелетных мышц в условиях реальной и симулированной невесомости . . . . .	52

2.2.1. Космический полет . . . . .	52
2.2.2. Симулированная невесомость в экспериментах с участием человека в качестве испытуемого . . . . .	56
2.2.3. Симулированная невесомость в экспериментах на животных . . . . .	61
2.3. Поперечная жесткость и внесаркомерный цитоскелет волокон скелетных мышц в условиях симулированной невесомости . . . . .	64
2.4. Состояние митохондрий и клеточное дыхание волокон скелетных мышц в условиях реальной и симулированной невесомости . . . . .	68
2.5. Изменение миозинового фенотипа в результате действия невесомости . . . . .	71
2.6. Накопление ионов кальция в мышечных волокнах как эффект гравитационной разгрузки . . . . .	73
2.7. Заключение . . . . .	79
<b>ГЛАВА 3. СОВРЕМЕННЫЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ О МИОПАТИЯХ: ЭТИОПАТОГЕНЕЗ, КЛИНИКА, ДИАГНОСТИКА, КЛАССИФИКАЦИЯ . . . . .</b>	<b>106</b>
3.1. Миопатии: общие вопросы, классификация . . . . .	106
3.2. Первичные миопатии . . . . .	110
3.2.1. Наследственные миопатии . . . . .	110
3.2.2. Врожденные миопатии . . . . .	116
3.3. Вторичные миопатии . . . . .	119
<b>ГЛАВА 4. ИНСТРУМЕНТАЛЬНЫЕ МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ ЗАБОЛЕВАНИЙ МЫШЕЧНОЙ ТКАНИ . . . . .</b>	<b>128</b>
4.1. Лучевые методы диагностики заболеваний мышечной ткани . . . . .	128
4.1.1. Методика проведения ультразвукового исследования мышц . . . . .	133
4.1.2. Ультразвуковое исследование неизменной мышечной ткани . . . . .	138
4.1.3. Патологические изменения мышечной ткани на ультразвуковом исследовании . . . . .	145

4.1.4. Применение ультразвукового исследования для диагностики миопатии, нейропатии и заболевания двигательных нейронов . . . . .	150
4.1.5. Ультразвуковое исследование диафрагмы . . . . .	167
4.1.6. Ультразвуковая навигация при ботулинотерапии . . . . .	168
4.2. Электромиографическое исследование при заболеваниях мышечной ткани . . . . .	180
<b>ГЛАВА 5. ПРИОБРЕТЕННЫЕ МИОПАТИИ . . . . .</b>	<b>191</b>
5.1. Остаточный нейромышечный блок . . . . .	191
5.2. Мышечная слабость, связанная с критическим состоянием . . . . .	207
5.2.1. Критическое состояние и мышечная ткань . . . . .	207
5.2.2. Распространенность мышечной слабости, связанной с критическим состоянием . . . . .	211
5.2.3. Факторы риска мышечной слабости, связанной с критическим состоянием . . . . .	212
5.2.4. Патогенез мышечной слабости, связанной с критическим состоянием . . . . .	216
5.2.5. Клиническая картина мышечной слабости, связанной с критическим состоянием . . . . .	220
5.2.6. Диагностика мышечной слабости, связанной с критическим состоянием . . . . .	220
5.2.7. Дифференциальный диагноз мышечной слабости, связанной с критическим состоянием . . . . .	225
5.2.8. Лечение и профилактика мышечной слабости, связанной с критическим состоянием . . . . .	230
5.3. Нарушение функции диафрагмы у больных в критических состояниях . . . . .	243
5.4. Саркопения как мультидисциплинарная проблема: взгляд анестезиолога-реаниматолога . . . . .	252
5.4.1. Введение . . . . .	252
5.4.2. Определение саркопии . . . . .	252
5.4.3. Распространенность саркопии . . . . .	253
5.4.4. Этиология саркопии . . . . .	254
5.4.5. Диагностика саркопии . . . . .	258

5.4.6. Саркопения у больных отделения реанимации и интенсивной терапии . . . . .	260
5.4.7. Методы коррекции саркопении у пациентов в критическом состоянии . . . . .	261
5.4.8. Функциональные исходы и показатели смертности у пациентов с саркопенией . . . . .	270
5.4.9. Профилактика саркопении . . . . .	271
5.5. Саркопения в практике интерниста . . . . .	278
5.5.1. Саркопения и ожирение . . . . .	281
5.5.2. Ковид-ассоциированная саркопения . . . . .	286
5.6. Саркопения, саркопеническое ожирение, миостеатоз в практике онколога . . . . .	297
5.6.1. Прогностическое значение саркопении при опухолях различных локализаций . . . . .	297
5.6.2. Саркопеническое ожирение как предиктор неблагоприятного течения онкологических заболеваний . . . . .	304
5.6.3. Миостеатоз как биомаркер в онкологии . . . . .	306
5.6.4. Влияние саркопении на переносимость и эффективность лекарственной терапии . . . . .	311
5.6.5. Лечение саркопении у онкологических пациентов . . . . .	316
5.6.6. Заключение . . . . .	320
5.7. Ковид-ассоциированная саркопения . . . . .	330
5.7.1. Введение . . . . .	330
5.7.2. Факторы риска развития ковид-ассоциированной саркопении . . . . .	331
5.7.3. Патогенез ковид-ассоциированной саркопении . . . . .	338
5.7.4. Гистологические изменения мышц . . . . .	340
5.7.5. Профилактика и лечение ковид-ассоциированной саркопении . . . . .	341
5.7.6. Заключение . . . . .	342
5.8. Рабдомиолиз . . . . .	348
5.8.1. Введение . . . . .	348
5.8.2. Эпидемиология рабдомиолиза . . . . .	351
5.8.3. Этиология рабдомиолиза . . . . .	352
5.8.4. Патогенез рабдомиолиза . . . . .	365
5.8.5. Клиническая картина рабдомиолиза . . . . .	369

5.8.6. Диагностика рабдомиолиза . . . . .	370
5.8.7. Дифференциальная диагностика рабдомиолиза . . .	373
5.8.8. Лечение рабдомиолиза . . . . .	377
5.8.9. Заключение . . . . .	385
5.9. Некротизирующий фасциит . . . . .	395
5.9.1. Введение . . . . .	395
5.9.2. Эпидемиология некротизирующего фасциита . . . .	396
5.9.3. Этиология некротизирующего фасциита . . . . .	396
5.9.4. Патогенез некротизирующего фасциита . . . . .	400
5.9.5. Морфология некротизирующего фасциита . . . . .	403
5.9.6. Клиническая картина . . . . .	403
5.9.7. Диагностика некротизирующего фасциита . . . . .	405
5.9.8. Дифференциальная диагностика некротизирующего фасциита . . . . .	408
5.9.9. Лечение некротизирующего фасциита . . . . .	409
5.9.10. Прогноз при некротизирующем фасциите . . . . .	426
5.9.11. Заключение . . . . .	426
Заключение . . . . .	441
Предметный указатель . . . . .	443

## ПРЕДИСЛОВИЕ

Частое обращение к энциклопедии развивает не только мозги, но и мышцы.

*Мелихан К.С. (советский писатель)*

Мышцы (от лат. *musculus* — «мышца») — органы, состоящие из мышечной ткани, способные сокращаться под влиянием нервных импульсов. В зависимости от особенностей строения мышцы человека делят на три типа, или группы: скелетные (поперечно-полосатые), гладкие, сердечные.

Основная масса мышечной ткани относится к поперечно-полосатым мышцам, которых у каждого человека более 600. Мышцы этого типа способны произвольно, или по желанию человека сокращаться и вместе со скелетом образуют опорно-двигательную систему. Общая масса этих мышц составляет около 40% веса тела, а у людей, активно тренирующихся, может быть еще больше.

Слабость и атрофия мышечной ткани с древних времен считаются отражением тяжести заболевания. Еще Гиппократ описывал «спонтанную вялость» и мышечное истощение у умирающих от онкологии и инфекции пациентов. Известный канадский врач Уильям Ослер в XIX в. отмечал, «...как сильно бросается в глаза потеря силы и телесной плотности у заболевших опасными для жизни инфекциями».

Скелетная мускулатура важна для поддержания двигательной активности, обеспечения поструральной функции и участия в таких жизненно важных процессах, как дыхание и глотание, однако, помимо прочего, она также является неотъемлемой частью энергетического и белкового обменов организма.

Мышечная ткань — основной резервуар глюкозы и аминокислот в организме человека. Имея запас гликогена, мышцы способны быстро получать энергию для сокращений даже при ограничении поступления глюкозы извне. Эта способность позволяет отнести мышечную ткань наряду с печенью и почками к важнейшим метаболическим органам, обеспечивающим остальным органам и системам доступ к необходимым энергетическим субстратам во время голодания. При большей потребности в энергии или ее малом запасе, например, при гиперметаболизме, вызванном стрессовой реакцией, или при длительном голодании в качестве дополнительного энергетического субстрата могут использоваться аминокислоты, хранящиеся в мышечной ткани в виде белка.

Следовательно, состояние мышечной ткани особенно важно при развитии жизнеугрожающих состояний из-за способности скелетной мускулатуры удовлетворять на начальном этапе метаболические потребности различных органных систем в энергии и аминокислотах.

Мышечная ткань обладает большой пластичностью и постоянно адаптируется в ответ на изменения метаболизма, например, на действие физических нагрузок, потребление калорий и питательных веществ. Эта способность скелетных мышц также проявляется в виде изменений, возникающих на фоне травм, болезней, а также в результате процесса старения. В случаях, когда метаболические нужды организма начинают превышать синтез белка, происходящий при приеме пищи или после физических нагрузок, наблюдается потеря мышечной массы.

Для характеристики изменений в скелетных мышцах используют термин «миопатии». Согласно наиболее распространенному определению миопатии — обобщенное название множества заболеваний мышечной системы (главным образом скелетной мускулатуры), проявляющихся нарушением сократительной способности мышечных волокон и мышечной слабостью, уменьшением объема активных движений, снижением тонуса мышц, атрофией, иногда псевдогипертрофией.

В настоящий момент не существует единой классификации миопатий, и это вполне объяснимо, так как имеется слишком много заболеваний, поражающих мышечную систему. Причем число нозологий неуклонно растет. В качестве примера необходимо привести поражение мышц при новой коронавирусной инфекции.

Принято выделять первичные и вторичные (они же приобретенные) миопатии. Первичные миопатии делятся на наследственные и врожденные. С первичными миопатиями чаще сталкиваются педиатры. Мы уделим основное внимание вторичным миопатиям, возникающим при различных заболеваниях и состояниях.

Выделение отдельных типов миопатий во многом зависит от специальности врача и актуальности для него того или иного вида мышечных нарушений. В терапевтической клинике врачи чаще всего встречаются с воспалительным генезом повреждения мышц вследствие аутоиммунных или инфекционных процессов. С лекарственными миопатиями сталкивается большинство клиницистов, связанных с фармакотерапией. Лечение во многом определяется выраженностью патологического процесса. Так, статин-индуцированные миопатии на стадии миалгий и миоцитов лечат терапевты и/или неврологи. При прогрессировании поражений мышц и развитии рабдомиолиза пациенты переводятся в отделение интенсивной терапии под наблюдение врачей анестези-



ологов-реаниматологов. В связи с изменениями клинической картины меняется и диагноз, в терапевтическом отделении акцент делается на токсический характер поражения мышц, в реанимационном отделении — на деструкцию мышечной ткани, нарастание интоксикации и острое повреждение почек.

Таким образом, диагноз при вторичных миопатиях во многом определяется состоянием пациента на момент обращения за медицинской помощью. Зачастую истинная причина миопатии остается «за кадром». Например, при остром деструктивном панкреатите причину острого повреждения почек связывают с гиповолемией, а уровни миоглобина и креатинфосфокиназы не контролируются, соответственно, диагноз «рабдомиолиз» не звучит.

Перед обсуждением диагностики, клинической картины и лечения миопатий подробно изложена физиология мышечной системы, позволяющая понять всю многогранность процессов, протекающих в этих тканях.

Особое место среди миопатий занимает состояние, которое с первого взгляда не относится к патологическим, — невесомость. Длительное пребывание человека на орбитальных станциях в условиях невесомости и отсутствия физических нагрузок приводит к гипотрофии мышц, снижению мышечного тонуса и мышечной силы. Патологические процессы, происходящие в мышцах, в условиях невесомости объединяют в понятие «гипогравитационный двигательный синдром», развитие которого снижает функциональные возможности человека и затрудняет его реабилитацию после окончания пребывания в невесомости.

Саркопения — это пандемия XXI в. Она ассоциируется с высокими экономическими затратами, инвалидностью и неблагоприятным прогнозом. До недавнего времени саркопения рассматривалась как гериатрический синдром. Однако саркопения ассоциируется не только со старением. Малоподвижный образ жизни, гиподинамия, неадекватное питание, хронические заболевания, длительное пребывание в стационаре также являются факторами, которые приводят к саркопении.

В книге представлены и другие виды вторичных миопатий: остаточный нейромышечный блок, мышечная слабость, связанная с критическим состоянием, рабдомиолиз, некротизирующий фасцит. Отдельный раздел посвящен лучевым методам диагностики заболеваний мышечной ткани. Мультидисциплинарный подход, использованный при написании работы, делает ее интересной для широкого круга врачей различных специальностей.

*Пасечник И.Н., Бернс С.А., Бояринцев В.В.*

# ГЛАВА 1

## Физиология мышечной системы

*Огнева И.В., Бояринцев В.В.*

### 1.1. ВВЕДЕНИЕ

Физиология скелетных мышц на сегодняшний день является фактически одной из ветвей клеточной и молекулярной биологии. Краеугольной проблемой являются вопросы, связанные с природой мышечного тонуса, в частности неясными остаются механизмы его поддержания, а следовательно, и управления им, что особенно востребовано в космической медицине, травматологии и ортопедии, неврологии, геронтологии, причем, несмотря на единство «объекта», его состояние во всех этих случаях принципиально различное.

Космическая медицина имеет дело с исключительно здоровыми людьми, попадающими в ситуацию отсутствия веса в рамках космического полета, которая приводит к целому ряду изменений не только в мышечной системе, но и в костной, сердечно-сосудистой, нервной и т.д. Однако в рамках исследований запуска атрофической программы в некоторых скелетных мышцах и снижения функциональных возможностей условия космического полета и моделирование его эффектов на Земле представляют уникальную возможность относительно «чистого» эксперимента, направленного на выявление различных аспектов патогенеза потери мышечного тонуса относительно молодыми здоровыми людьми.

Другой крайний случай нормальной физиологии заключается в анализе различных аспектов старения мышечной системы, связанных с возрастными изменениями целого организма, обычно к этому периоду имеющиеся сопутствующие патологии, например, инсулинорезистентность.

Большинство современных исследований различных аспектов функционирования мышечной системы в рамках целого организма направ-

лены на поиск механизмов запуска адаптационного ответа на разнообразные внешние и внутренние стимулы в структурно-функциональной единице скелетной мышцы — мышечном волокне, которое представляет собой длинную, веретенообразную клетку. На уровне мышечной клетки исследуют силу сокращения, содержание кальция и различных белков (как сократительных, так и внесаркомерных), интегральные механические характеристики, такие как жесткость, причем не только в продольном, но и в поперечном направлении.

## 1.2. СТРОЕНИЕ МЫШЕЧНОГО ВОЛОКНА

Скелетные мышцы позвоночных состоят из параллельных пучков мышечных клеток, называемых мышечными волокнами (рис. 1.1, см. цв. вклейку).

Большую часть объема мышечной клетки занимают миофибриллы, простирающиеся на всю ее длину. Они являются специализированными органеллами, обеспечивающими механическое сокращение волокна за счет энергии, высвобождающейся при гидролизе молекулы аденозинтрифосфата (АТФ). Элементарной структурной единицей миофибрилл является саркомер, длина которого *in situ* составляет 2,2–2,6 мкм. Саркомер ограничен двумя Z-линиями, которые представляют собой упорядоченную структуру, образованную целым рядом сократительных, регуляторных и цитоскелетных белков. Сократительный аппарат состоит из параллельных нитей двух типов: толстых филаментов миозина и тонких филаментов F-актина. Середины миозиновых нитей связаны между собой в области M-полосы, которая также представляет собой комплекс цитоскелетных белков.

Моторным белком миофибрилл является миозин. Молекула миозина построена из шести субъединиц, двух идентичных тяжелых цепей, каждая из которых имеет форму длинного стержня с глобулярной головкой на N-конце, и четырех легких цепей. Головка молекулы миозина массой около 130 кДа (ее также называют субфрагментом 1 миозина или S1 миозина) состоит из моторного домена и «шеи» — длинной  $\alpha$ -спирали тяжелой цепи миозина с двумя легкими цепями, присоединенными к ней нековалентно. Каталитический домен обладает АТФазной активностью и способен обратимо связываться с актином, то есть является элементарным молекулярным мотором. Две головки миозина соединены между собой в области суперспирального субфрагмента 2 или S2 миозина, длина которого составляет около 43 нм, а масса — 80 кДа. S1 и S2 субфрагменты миозина образуют тяжелый меромиозин. Продолжением

субфрагмента 2 является также суперспиральный хвостовой участок, называемый легким меромиозином. Его длина составляет примерно 90 нм, а масса — 160 кДа. При физиологической ионной силе  $<0,2$  М хвостовые участки миозина слипаются между собой и образуют ствол толстой нити диаметром около 16 нм, а головки миозина, присоединенные к стволу гибким S2, находятся в броуновском движении между толстыми и тонкими филаментами и могут присоединяться к актину.

Миозиновые нити связаны с Z-диском с помощью гигантского белка титина с молекулярным весом около 4 МДа. Шесть молекул титина лежат на поверхности миозинового филамента и тянутся от M-полосы до конца толстой нити и далее, соединяя его с Z-диском. Часть молекулы, связанная с миозиновой нитью, играет, по-видимому, роль «линейки», регулирующей сборку толстого филамента из отдельных молекул миозина, что обеспечивает постоянство длины тонких филаментов скелетных мышц. Участок молекулы титина между концом толстой нити и Z-диском играет роль пружины, препятствующей растяжению саркомера. Важную роль при этом играют легко растяжимый PEVK домен и многочисленные Ig домены, которые способны обратимо разворачиваться под действием больших растягивающих сил и сворачиваться вновь при укорочении саркомера [1].

Главным белком тонких нитей является актин. Фибриллярный F-актин образуется в результате полимеризации глобулярного G-актина, белка с молекулярной массой 42 кДа. F-актин также является важным структурным элементом цитоскелета, где он находится в динамическом равновесии с его мономерной формой. Еще один важный цитоскелетный белок — небулин. Он играет при образовании тонких филаментов примерно ту же роль, что и титин для толстых, то есть служит «линейкой», регулирующей длину нитей F-актина в саркомерах. У мышей с нокаутированным геном небулина наблюдали укороченные актиновые филаменты и утолщенные Z-диски [2].

### 1.3. СОКРАЩЕНИЕ МЫШЕЧНОГО ВОЛОКНА

Мотонейрон и иннервируемая им группа мышечных волокон называется двигательной единицей. Двигательные единицы и, соответственно, мышечные волокна можно разделить на два основных типа: медленные и быстрые. Медленные волокна характеризуются высокой выносливостью, устойчивостью к утомлению, большей длительностью как сокращения, так и расслабления, а быстрые — большей скоростью и силой сокращения. Различия в свойствах быстрых и медленных воло-

кон определяются прежде всего тем, какие изоформы миозина синтезируются в волокне. В медленном волокне синтезируется преимущественно миозин медленного типа, в быстром волокне — миозин быстрого типа. Эти изоформы существенно различаются по ряду свойств, но главным образом — по скорости и длительности цикла гидролиза АТФ, что и определяет скорость и продолжительность мышечного сокращения. Сократительные характеристики мышц определяются соотношением быстрых и медленных волокон, входящих в них. Так, волокна медленных мышц сокращаются с меньшей силой и скоростью по сравнению с волокнами быстрых мышц [3]. Распределение волокон по различным типам в одной и той же мышце у млекопитающих разных видов существенно различается. Это зависит и от среды обитания животного, и от его двигательной активности [4, 5].

Регуляция сокращения скелетных мышц ионами  $\text{Ca}^{2+}$  осуществляется комплексом регуляторных белков, тропонином и тропомиозином. Суперспиральный белок тропомиозин образован двумя скрученными друг с другом альфа-спиралями. Он расположен в канавках длинной спирали F-актина, причем соседние молекулы тропомиозина соединены друг с другом по принципу «голова к хвосту» и образуют длинные тяжи, тянущиеся вдоль всего тонкого филамента. Эти тяжи могут поворачиваться вокруг оси филамента, открывая или закрывая места возможного связывания актина с миозином. Тропоминовый комплекс, состоящий из трех субъединиц (Т, С, I), связан как с тропомиозином, так и с актином. Он также расположен по обеим сторонам поверхности тонкой нити вдоль всей ее длины с интервалами около 38,5 нм. Тропонин-С способен обратимо связывать  $\text{Ca}^{2+}$ . Тропонин-I способен прочно связывать весь тропонин-тропомиозиновый комплекс с актином, закрывая места возможного связывания с миозином и поддерживая состояние расслабления. Тропонин-T связывает тропониновый комплекс с тропомиозином в единое целое.

Электронно-микроскопические и рентгенодифракционные исследования показали, что связывание ионов кальция с тропонином-С вызывает поворот тропомиозинового тяжа на актиновом филаменте. Эти результаты легли в основу широко известной теории стерического блокирования, согласно которой в расслабленной мышце тропомиозин закрывает на актине миозин-связывающие участки, а при сокращении открывает их. Полученные позже данные не только подтвердили эту модель, но и дали дополнительную информацию [6]. В отсутствие ионов кальция тропомиозин находится преимущественно в положении, блокирующем участки связывания миозина на актине В-состояние. После

связывания с кальцием тропонин-С перемещает тропомиозин внутрь продольной борозды, образуемой актиновыми мономерами. При этом миозин-связывающие участки частично освобождаются С-состояние. Последующее присоединение миозиновых головок к актину перемещает тропомиозин в полностью открытое О-состояние [7]. Такой переход соответствует стереоспецифическому застегиванию головок на актине, предшествующему рабочему шагу миозина. Кинетический анализ АТФазы регулируемого актомиозина показывает, что эти три состояния актиновой нити находятся в быстром равновесии, а доля каждого из них определяется действиями тропонина и миозина [8, 9]. В целом актиновый тип регуляции представляет собой классическую аллостерическую систему. Связывание ионов кальция тропонином-С было исследовано методом двойных изотопов [10], а также мечением тропонина-С агентом, который изменяет флуоресценцию при связывании с ионами кальция [11]. В этих работах было показано, что сдвиг кривой кальциевой чувствительности происходит не по причинам нарушения связывания ионов кальция с тропонином-С, а устойчивая фаза образования поперечных мостиков имеет небольшое влияние на структуру тропонина-С при любом уровне активации. В работе других исследователей был проведен анализ структурных изменений тропонина-С при кальциевой активации, а также при отсутствии активности, что достигалось блокированием миозина. Авторы не обнаружили каких-либо изменений в ориентации С спирали тропонина, следовательно, конформация регуляторного сайта тропонина не изменяется в зависимости от положения миозиновых головок на актине, а зависит исключительно от свободных ионов  $Ca^{2+}$  [12].

Иными словами, связывание ионов  $Ca^{2+}$  с тропонином-С вызывает изменение его конформации, в результате чего тропонин-І тоже перестраивается и его связывание с актином ослабевает. В результате этого весь тропомиозин-тропониновый тяж поворачивается относительно оси тонкого филамента и открывает участки связывания для миозина. После этого миозиновые головки присоединяются к актину и происходит сокращение. Прочное присоединение миозиновых головок к актину вызывает дальнейшее смещение тропомиозина по поверхности актиновой нити и увеличивает доступность участков связывания для других миозиновых головок на соседних мономерах актина.

Сокращение мышечных волокон обусловлено продольным скольжением толстых миозиновых и тонких актиновых филаментов относительно друг друга — эта модель была впервые описана в 1954 г. [13]. Цикл актин-миозинового взаимодействия в сокращающемся мышечном

волокне можно описать следующим образом. В отсутствие АТФ головка молекул миозина прочно связана с актином. Такое состояние называют ригор (от латинского *rigor mortis* — трупное окоченение), а его длительность составляет в физиологических условиях менее 1 мс. Затем происходит связывание АТФ в активном центре головки, которое приводит к ослаблению ее связи с актином и отсоединению от тонкого филамента. В головке миозина АТФ гидролизуется до аденозиндифосфата и неорганического фосфата. В отсутствие актина скорость гидролиза мала из-за медленного сброса продуктов реакции из активного центра головки миозина. Этим обеспечивается малое энергопотребление расслабленной мышцы. Гидролиз АТФ приводит к структурным изменениям миозиновой головки, благодаря чему она «взводится» и приобретает способность произвести активную работу после образования нового мостика с соседней молекулой актина. Актин ускоряет сброс продуктов АТФазной реакции из активного центра. После присоединения к актину миозиновые головки изменяют конформацию, поворачиваются на некоторый угол и перемещают миозиновый филамент вдоль актинового филамента по направлению к Z-дису. При каждом цикле гидролиза АТФ головка миозина взаимодействует с новыми молекулами актина, в результате чего и происходит взаимное скольжение миозиновых и актиновых филаментов, то есть сокращение мышечного волокна.

Одним из возможных механизмов усиления активности субмаксимальных сокращений является фосфорилирование легких цепей миозина. При поступлении ионов кальция активируется киназа легких цепей миозина, которая фосфорилирует регуляторные легкие цепи. Дефосфорилирование осуществляет фосфатаза легких цепей, однако этот процесс сравнительно медленный, в результате чего легкие цепи остаются фосфорилированными в течение нескольких минут после тетанического или максимального сокращения. Было показано, что фосфорилирование легких цепей миозина приводит к увеличению кальциевой чувствительности миофибрилл [14]: оказывает влияние на работу поперечных мостиков или их сродство к актину. Постоянное соотношение между АТФазной активностью миозина и развиваемой силой, а также между силой и мгновенной жесткостью [15] свидетельствует о том, что увеличение силы при данной концентрации ионов кальция связано с увеличением числа замкнутых поперечных мостиков. Наряду с этим, методом электронной микроскопии было показано, что при фосфорилировании легких цепей изменяется спиралевидная укладка миозиновых головок на поверхности толстых филаментов [16], то есть увеличивает подвижность миозиновых головок. Такое увеличение подвижности

может означать, что актин-связывающая область миозиновой головки может находиться больше времени поблизости от актиновой нити, что увеличивает вероятность образования поперечных мостиков, а следовательно, может приводить к увеличению силы сокращения.

Сила сокращения мышечного волокна увеличивается при поступлении ионов кальция в цитоплазму. Такая зависимость получила название кальциевой чувствительности. В основном кальциевую чувствительность измеряют на препаратах одиночных мышечных волокон с частично или полностью разрушенной мембраной. Еще в середине XX в. было показано, что в присутствии АТФ способны сокращаться мышечные волокна, хранившиеся в водном растворе с 50% глицерола (Глицерина\*) [17]. Позднее была разработана методика химической и механической обработки мышечных волокон, в результате чего мембрана волокна частично разрушается, что позволяет ионам кальция и другим веществам свободно проникать из раствора в волокно. Эта процедура полной или частичной демембранизации получила название скинирования [18]. В настоящее время в качестве скинирующих агентов часто применяют неионный детергент Triton X-100 [10] или, следуя классическому методу Сент-Дьерди, глицерол (Глицерин\*) [19].

Кальциевая чувствительность определяется зависимостью силы, развиваемой волокном, от изменения концентрации ионов кальция, которую обычно выражают как отрицательный логарифм концентрации, или  $pCa$ . Параметр  $pCa_{50}$  представляет такое значение  $pCa$ , при котором развиваемая сила равна половине ее максимального значения. Зависимость между силой сокращения мышечного волокна, нормированной на ее максимальное значение, и концентрацией кальция описывается кривой кальциевой чувствительности. Когда  $pCa_{50}$  увеличивается, кривая кальциевой чувствительности сдвигается влево, сдвиг вправо указывает на уменьшение кальциевой чувствительности. При этом также важен и наклон кривой, который выражается коэффициентом Хилла, отражающим кооперативность миофибриллярных белков.

Для того, чтобы актин-миозиновое взаимодействие могло произойти, тропонин-С должен связать ионы  $Ca^{2+}$ , которые для этого должны попасть в цитоплазму волокна. Сокращением мышечного волокна управляют двигательные нейроны, выделяющие в ответ на потенциал действия нейромедиатор (ацетилхолин) в нервно-мышечные соединения (синапсы). Диффузия ацетилхолина через синаптическую щель и взаимодействие с ацетилхолиновыми холинергическими рецепторами плазматической мембраны мышечных клеток открывает трансмембранные ионные каналы и вызывает деполяризацию клеточной мембраны,



что, в свою очередь, приводит к образованию потенциала действия на мембране мышечного волокна. Потенциал действия распространяется по всем направлениям от нервно-мышечного соединения, возбуждая всю мышечную клетку.

Каждую миофибриллу как сеть окружает саркоплазматический ретикулум, внутри которого уровень ионов кальция (около  $10^{-3}$  М) значительно выше, чем в цитоплазме покоящейся клетки (менее  $10^{-7}$  М). Такая высокая концентрация ионов кальция в ретикулуме поддерживается кальциевыми АТФазами, активно переносящими  $\text{Ca}^{2+}$  из цитоплазмы в ретикулум, и белком кальсеквестрином, который прочно и обратимо связывает ионы кальция. Перенос потенциала действия к саркоплазматическому ретикулуму осуществляется через поперечные трубочки Т-системы, представляющие собой впячивания клеточной мембраны, пронизывающие весь объем клетки в области Z-дисков. В ответ на потенциал действия открываются каналы ретикулума, через которые в цитоплазму быстро вбрасываются ионы кальция до уровня  $10^{-6}$ – $10^{-4}$  М. Связывание ионов кальция с тропонином-С запускает каскад процессов, рассмотренных выше, и открывает возможность взаимодействия миозиновых головок с актином.

В отсутствие последующего стимулирования и, соответственно, выбросов  $\text{Ca}^{2+}$  в саркоплазму АТФ-зависимые кальциевые насосы мембраны саркоплазматического ретикулума быстро снижают концентрацию ионов  $\text{Ca}^{2+}$  до исходного уровня. Как следствие, комплекс кальция с тропонином-С диссоциирует, тропонин восстанавливает исходную конформацию, место связывания миозина на актине блокируется, и мышца расслабляется [20].

Таким образом, при сокращении мышечного волокна скелетных мышц позвоночных происходит следующая последовательность событий. При поступлении сигнала от двигательного нейрона мембрана мышечной клетки деполяризуется и возникает потенциал действия. Электрический сигнал передается на кальциевые каналы саркоплазматического ретикулума. Кальциевые каналы открываются, внутриклеточный уровень ионов кальция возрастает. Ионы кальция связываются с тропонином-С, вызывая конформационную перестройку в тропонине, что влечет за собой перестройку комплекса тропонин-тропомиозин-актин и дает возможность головкам миозина связываться с актином. Происходит инициация актин-миозинового цикла. По завершении сокращения уровень ионов кальция снижается за счет АТФ-зависимого активного обратного транспорта кальция в саркоплазматический ретикулум, тропонин-С отдает кальций, комплекс тропонин-тропомио-

зин занимает исходное положение на молекуле актина, блокируя актин-миозиновый цикл. Результатом является расслабление мышцы. Следовательно, терминальными регуляторами функционирования структурных белков мышечного волокна в реализации сокращения и формирования силы можно считать ионы кальция и АТФ, синтезируемой в процессе клеточного дыхания.

Клеточное дыхание представляет собой совокупность ферментативных окислительно-восстановительных реакций цикла Кребса и последующего переноса электронов по дыхательной цепи митохондрий, сопряженного с фосфорилированием, в результате чего образуется макроэргическое соединение АТФ, использующееся для жизнедеятельности клетки.

В основе сопряжения процессов окисления и синтеза АТФ лежит циркуляция протонов, пересекающих гидрофобный барьер мембраны. Данная мысль, сформулированная П. Митчеллом, легла в основу хемиосмотической теории [21]. Согласно данной теории, энергия, высвобождаемая при переносе электронов, используется для перемещения ионов  $H^+$  из матрикса митохондрии в наружную среду, что приводит к возникновению электрохимического  $H^+$ -градиента с более высокой концентрацией ионов  $H^+$  в наружной водной фазе. Этот процесс ведет к созданию трансмембранного электрического потенциала — наружная сторона внутренней мембраны становится электроположительной. Выведенные наружу ионы  $H^+$  затем вновь устремляются внутрь, то есть в митохондриальный матрикс, проходя через специальные каналы молекул  $F_0-F_1$ -АТФазы. В этом случае переход ионов осуществляется по градиенту концентрации, и во время их перехода через молекулы АТФазы выделяется свободная энергия. Эта свободная энергия служит движущей силой для синтеза АТФ из аденозиндифосфата и фосфата.

Таким образом, основной функцией клеточного дыхания является запасание полезной энергии. Большая часть кислорода поглощается клеткой для окисления субстратов дыхания, при этом образуется протонный потенциал, который используется преимущественно для синтеза АТФ из аденозиндифосфата и неорганического фосфата. Кроме того, клеточное дыхание может выполнять следующие функции: участвовать в терморегуляторном образовании тепла, в образовании или разрушении метаболитов, а также в детоксикации ксенобиотиков [22].

Скорость клеточного дыхания, о которой можно судить по интенсивности поглощения кислорода митохондриями, исследуется двумя основными методами: 1) методом выделения митохондрий из гомогенизированной ткани с помощью центрифугирования; 2) методом изучения

скорости дыхания митохондрий *in situ* [23], при котором производят скинирование мышечного волокна без изоляции митохондрий из ткани. Преимущество второго метода заключается в том, что при скинировании мышечного волокна сапонином мембрана митохондрии остается целостной. При этом в интактной митохондриальной мембране, не разрушенной центрифугированием, специфические белки порины связаны с цитоплазматическими белками, контролирующими проницаемость внешней митохондриальной мембраны для аденозиндифосфата [24].

## 1.4. МИОЗИН

Наиболее важным структурным элементом скелетной мускулатуры, ответственным за сократительные функции, является белок миозин. Его экспрессия в поперечно-полосатых мышцах составляет примерно 25% общего белкового пула. Он может экспрессироваться в виде различных изоформ, таким образом имея значение для функционального разнообразия мышц. Мышечные волокна, содержащие разные изоформы тяжелых цепей миозина, различаются скоростью сокращения, а также устойчивостью к утомлению [25]. Нативный миозин представляет собой комплексную молекулу, содержащую две тяжелых цепи и две пары легких цепей. Этот нативный белок служит как структурным, так и регуляторным белком (ферментом): он формирует основу саркомера, представляя сократительный аппарат, и через его взаимодействие с другим саркомерным белком, актином, он функционирует как «мотор» и как передатчик посредством его АТФазной активности. С другой стороны, нативный миозин создает мышечную механическую работу и напряжение. Регуляция семейства генов миозина находится под контролем ряда процессов, включающих, но не ограничивающихся активностью, гормональными и метаболическими факторами. Таким образом, этот белок служит клеточным «маркером» для изучения мышечной пластичности в ответ на различные механические изменения, в которых меняется экспрессия количества и типа изоформ миозина наряду с другими важными клеточными белками [26]. Изоформы миозина имеют разную АТФазную активность (и скорость сокращения), что влияет на функциональные свойства мышечных волокон, в которых они экспрессируются и которые обеспечивают молекулярные основы функционального разнообразия мышечных волокон [27].

Скелетные мышцы млекопитающих в общем можно разделить на две основных группы: медленные и быстрые, основываясь на их сократительных свойствах, которые частично определяются профилем экспрес-

сии тяжелых цепей миозина [27]. Важный фактор, диктующий мышечным волокнам возможность для адаптации, связан с их генетической способностью экспрессировать разные изоформы белка. По существу, изоформы белка являются молекулами с незначительными вариациями в аминокислотном составе, в связи с этим происходят изменения либо структурных, либо функциональных, либо ферментативных свойств этого белка.

Показано, что скелетные мышцы взрослых млекопитающих экспрессируют по крайней мере четыре специфичных типа тяжелых цепей миозина: медленный I тип, быстрый Pa, быстрый Pх и быстрый Pb. Медленные мышцы млекопитающих в основном экспрессируют изоформу медленного I типа, которая характеризуется низкой АТФазной активностью, с некоторой долей Pa типа, наиболее медленной изоформой среди быстрых изоформ [27–30]. Этот профиль встречается в таких мышцах, как камбаловидная и промежуточная широкая мышца бедра, которые играют важную роль в антигравитационной функции. Быстрые мышцы мелких млекопитающих животных, такие как комплекс икроножной мышцы — подошвенной мышцы, бедренная мышца, длинный разгибатель пальцев и передняя большеберцовая мышца преимущественно экспрессируют две быстрых изоформы Pх и Pb, в разной пропорции [28, 29]. Несмотря на то что ген *I**h*** тяжелых цепей миозина был идентифицирован в геноме человека [31], доказательств его экспрессии в уровне белка нет [30]. Таким образом, в мышцах человека представлены только две быстрых изоформы Pa и Pх в дополнение к медленному I типу. Анализ тяжелых цепей миозина камбаловидной мышцы человека показывает, что эта мышца экспрессирует примерно в равном отношении изоформы I и Pa типов, но не экспрессирует Pх тип [32]. И наоборот, быстрые мышцы человека, такие как латеральная широкая мышца бедра, экспрессируют все три изоформы тяжелых цепей миозина в различных пропорциях [32], влияя на физическую форму и активность субъекта. Например, у людей с умеренной физической активностью профиль тяжелых цепей миозина четырехглавой мышцы бедра состоит примерно из 50% медленного I типа, 40% типа Pa и 10% типа Pх [33]. С другой стороны, показано, что марафонцы и профессиональные атлеты имеют значительно более высокий уровень волокон I типа в их основных группах мышц (примерно 95%) [34], тогда как мышцы спринтеров и бодибилдеров преимущественно содержат волокна Pa/Pх типа [34]. Однако неясно, являются ли эти экстремальные паттерны экспрессии гена тяжелых цепей миозина результатом только генетики, специфичности тренировок или взаимодействием двух этих факторов.

В зависимости от содержания изоформ в мышечном волокне выделяют «чистые» мышечные волокна, содержащие изоформы одного типа, и «гибридные» волокна, содержащие изоформы нескольких типов. В камбаловидной мышце преобладают мышечные волокна, содержащие тяжелые цепи миозина I типа. В различных ситуациях на основе гистохимических и биохимических исследований было описано более 10 типов промежуточных волокон в мышцах конечностей и туловища животных [35–37]. В большинстве случаев подтипы или промежуточные типы волокон оказались гибридными в соответствии с теми типами миозинов, которые в них экспрессировались. В мышечных волокнах половозрелых грызунов и человека часто наблюдается коэкспрессия быстрых и медленных изоформ миозинов [38–39]. В исследовании на единичных мышечных волокнах была обнаружена коэкспрессия всех трех изоформ миозина I, IIa и IIb [39]. С возрастом у животных увеличивается количество волокон, коэкспрессирующих все три изоформы тяжелых цепей миозина [40].

## 1.5. РОЛЬ КАЛЬЦИЯ В СКЕЛЕТНЫХ МЫШЦАХ

Понимание роли  $\text{Ca}^{2+}$  как регулятора широкого спектра клеточных процессов является одним из больших достижений биологии XX в. [41]. Это было выявлено в наблюдениях Рингера, в которых он показал необходимость  $\text{Ca}^{2+}$  для сокращения сердечной мышцы [42], в последующих наблюдениях такую же роль  $\text{Ca}^{2+}$  показал в скелетных мышцах [43] и завершающее открытие  $\text{Ca}^{2+}$ -транспортной АТФазы саркоплазматического ретикулаума [44] и регуляции актомиозиновой активности кальцием через его взаимодействие с тропонином [45].

В клетке различают три состояния кальция:  $\text{Ca}^{2+}$ , локализованный внутри клеточных органелл, таких как эндоплазматический ретикулум, ядра, митохондрии, секреторные гранулы, лизосомы; хелатированный  $\text{Ca}^{2+}$ , который связан с анионом или молекулой цитоплазматического белка; свободный, или ионизированный кальций, находящийся в равновесии с хелатированным  $\text{Ca}^{2+}$ .

Именно свободный кальций является регулятором многих внутриклеточных процессов. В покоящихся клетках концентрация ионизированного кальция чрезвычайно мала —  $10^{-7}$ – $10^{-8}$  моль [46]. Во внеклеточной среде концентрация кальция достигает  $1,5$ – $2,5 \times 10^{-3}$  моль [47].

Внутриклеточный гомеостаз кальция поддерживается рядом взаимосвязанных структур. Некоторые ионы кальция выводятся из клетки специальными связывающими белками, в то время как другие выкачива-

ются различными мембранами клетки. К ним относятся поверхностная мембрана, мембрана, окутывающая эндоплазматический ретикулум, в том числе и саркоплазматический, и внутренняя мембрана, выстилающая митохондрии [48, 49].

На поверхности клеток ионы  $\text{Ca}^{2+}$  выкачиваются в обмен на ион  $\text{H}^+$ , энергию для этого процесса обеспечивает АТФ. Также на клеточной мембране есть другой механизм для обмена ионов  $\text{Ca}^{2+}$  на ионы  $\text{Na}^+$  — энергию для такого обмена обеспечивает градиент концентрации  $\text{Na}^+$ , установленный по обеим сторонам клеточной мембраны насосом  $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{АТФазой}$ . Поскольку каждый ион  $\text{Ca}^{2+}$  обменивается на три иона  $\text{Na}^+$ , происходит увеличение положительного заряда.

Во внутренней мембране митохондрий имеется другой вид обменного механизма  $\text{Na}^+-\text{Ca}^{2+}$ , который обменивает один ион  $\text{Ca}^{2+}$  на два иона  $\text{Na}^+$  и, таким образом, является электрически нейтральным.

Третий тип мембраны, выводящий  $\text{Ca}^{2+}$  из цитозоля, находится в эндоплазматическом ретикулуме, большая часть которого в мышечном волокне образована саркоплазматическим ретикулумом. Приблизительно 90% мембраны саркоплазматического ретикулума занимает  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФаза, этот фермент реагирует на увеличение внутриклеточной концентрации кальция.

Существуют различные виды кальциевых каналов: каналы Т-типа (кратковременные), L-типа (долгосрочные), N-типа (нейронные) и рианодиновые. Наиболее изученными являются каналы L-типа, плотность которых очень высока в мембранах поперечных трубочек волокон скелетной мышцы. Этот канал называют дигидропиридиновым, так как он блокируется дигидропиридином. Рианодиновый канал (RYR) открыт не так давно в волокнах скелетной мышцы, он находится в саркоплазматическом ретикулуме и, по-видимому, соединен с каналом дигидропиридиновым в поперечных трубочках.

### 1.5.1. Кальциевые каналы L-типа

Кальциевые каналы Т-трубочек мембраны скелетных мышц служили первичной биохимической и молекулярной моделью для изучения кальциевых каналов в связи с их большой численностью. Дигидропиридиновые рецепторы скелетных мышц являются медленными каналами L-типа [50]. Через них осуществляется длительный ток с медленной потенциал-зависимой инактивацией, и они специфически блокируются их антагонистами.

Дигидропиридиновые каналы выполняют важную физиологическую функцию — они служат посредниками для входа кальция в ответ на де-

поляризацию. Первичной физиологической ролью каналов  $\text{Ca}^{2+}$  в скелетных мышцах является то, что они служат сенсорами напряжения при электромеханическом сопряжении [51, 52].

Впервые  $\text{Ca}^{2+}$ -каналы были выделены и очищены из поперечных трубочек (Т-трубочек) мембран скелетных мышц [53] с помощью жидкостной колоночной хроматографии и осаждения в градиенте сахарозы. Результаты этих исследований показали, что дигидропиридиновые рецепторы волокон скелетных мышц представляют собой олигомерный комплекс, состоящий из пяти полипептидных цепочек, образующих субъединицы  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\beta$ ,  $\delta$  и  $\gamma$  [54].  $\alpha 1$ -субъединица является центральным компонентом комплекса, который образует непосредственно  $\text{Ca}^{2+}$ -канал.

В результате многочисленных исследований структуры и функций канал-образующей  $\alpha 1$ -субъединицы  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов определили ее главные функциональные домены [51, 54, 55]. Анализ аминокислотной последовательности  $\alpha 1$ -субъединицы показал, что она имеет четыре внутренние структурные области (I–IV домены). Каждый домен главной субъединицы содержит 6 трансмембранных  $\alpha$ -спиралей (S1–S6) и мембраносвязанную петлю между участками S5 и S6. Участки S1, S2, S3, S5 и S6 гидрофобные, участок S4 — позитивно-заряженный. Сегмент S4 каждого гомологичного домена выступает как сенсор электрического напряжения [56] и под воздействием электрического поля инициирует начальные конформационные изменения, которые открывают пору. Участки S5, S6 и мембраносвязанная петля между ними формируют непосредственно пору потенциал-зависимого ионного канала. Узкая внешняя часть поры ограничивается петлей, содержащей пару глутаматных остатков, в которых есть домены, селективные для  $\text{Ca}^{2+}$ . Внутренняя пора образована петлей между S6 и S1 участками, которые формируют рецепторные сайты для препаратов-антагонистов  $\text{Ca}^{2+}$ , специфичных к  $\text{Ca}^{2+}$ -каналам L-типа, которые блокируют пору. Эти структурные характеристики сходны для всех  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов [51, 55].

Предполагается, что в скелетных мышцах потенциал-зависимые кальциевые каналы L-типа в Т-трубочках мембраны физически контактируют с рианодин-чувствительными каналами кальция (RYR) мембраны саркоплазматического ретикула. Конформационные изменения в потенциал-зависимых кальциевых каналах служат для активации локальных кальциевых каналов через белок-белковое взаимодействие [57, 58]. Таким образом, кальциевый канал саркоплазматического ретикула служит исполнителем потенциал-зависимого кальциевого канала в процессе электромеханического сопряжения. Сайт взаимодействия с кальциевым каналом располагается во II и III доме-

нах  $\alpha 1$ -субъединицы [59]. Было установлено, что петля между доменами II и III является важной детерминантой скелетного или сердечного электромеханического сопряжения [59]; петля между III–IV доменами также может вносить свой вклад. Пептиды, соответствующие области петли II–III, могут передавать сигнал об активации потенциал-зависимых  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов Т-трубочек, что может активировать кальциевый канал [54]. Влияние этого взаимодействия является двунаправленным и приводит к активации кальциевого канала скелетных мышц при деполаризации, к его инактивации во время реполяризации и повышению активности  $\text{Ca}^{2+}$ -канала дигидропиридинового.

### 1.5.2. $\text{Ca}^{2+}$ -АТФаза саркоплазматического ретикулула — SERCA

Кальциевая АТФаза располагается в мембране саркоплазматического ретикулула мышц, который представляет собой высокоструктурированную систему замкнутых цистерн и трубочек, пронизывающих саркоплазму в непосредственной близости от миофибрилл (рис. 1.2, см. цв. вклейку). В области трансверсальных впячиваний сарколеммы — трубочек Т-системы — локализованы терминальные цистерны — рианодиновые рецепторы, а миофибриллы окружены продолговатыми трубочками ретикулула, где локализована  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФаза саркоплазматического ретикулула — SERCA.

Терминальные цистерны, контактирующие с Т-трубочками, образуют так называемые триады, и их фрагменты представляют собой тяжелую фракцию ретикулула, а фрагменты продолговатых трубочек — легкую фракцию [60]. Исследование процессов кальциевого обмена в ретикулуле показало, что разные отделы саркоплазматического ретикулула несут различные функции.  $\text{Ca}^{2+}$ -каналы терминальных цистерн, рианодиновые рецепторы, осуществляют выброс ионов  $\text{Ca}^{2+}$  в цитоплазму, где они соединяются с тропонином-С, что индуцирует образование актомиозинового комплекса и, как следствие, сокращение мышц [61].

При повышении концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  в цитоплазме активируется  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФаза, которая локализована в продолговатых трубочках саркоплазматического ретикулула. SERCA обеспечивает аккумуляцию кальция в его внутреннее пространство, то есть осуществляет снижение трансмембранной спиралью М4 и С-концевой, соединенной с трансмембранной спиралью М5. Эти две части Р-домена, образованные семью слоями  $\beta$ -структур и восемью короткими спиралями, формируют



Россмановскую складку. Фосфорилируемый остаток Asp351 находится в С-концевой части центральной  $\beta$ -структуры.

Нуклеотидсвязывающий домен (N-домен) — самый большой из трех цитоплазматических доменов, его молекулярная масса примерно 27 кДа. Он сформирован остатками Gln360-Arg604, находящимися между двумя областями Р-домена. Этот домен содержит семь полос антипараллельных  $\beta$ -структур и две спирали, которые объединяют эти  $\beta$ -структуры в образование, напоминающее сэндвич. Домен А — самый маленький из трех цитоплазматических доменов, его молекулярная масса около 16 кДа. Он состоит примерно из 110 аминокислотных остатков, которые формируют неупорядоченную структуру между трансмембранными спиралями М2 и М3, и 40 остатков N-концевой части фермента, которые формируют две короткие спирали. Этот домен связан с трансмембранной областью длинными петлями [62, 63].

Трансмембранная часть фермента (М-домен) состоит из 10  $\alpha$ -спиралей (М1–М10). Спирали М4, М5, М6 и М8 располагаются вокруг двух высокоплотных областей, которые были идентифицированы на основании данных рентгеноструктурного анализа как ионы кальция. Было установлено, что два участка связывания кальция находятся в мембране на одном уровне на расстоянии 5,7 А друг от друга [62]. Два участка связывания  $\text{Ca}^{2+}$ -фермента в конформации E1– $\text{Ca}^{2+}$  находятся в непосредственной близости друг от друга и образованы четырьмя спиралями (М4, М5, М6 и М8), две из которых находятся в частично деспирализованном состоянии для более эффективного связывания ионов кальция [62, 64]. Данные рентгеноструктурного анализа о длине и расположении трансмембранных спиралей молекулы  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазы несколько расходятся с данными на основе анализа первичной структуры молекулы фермента [64]. Толщина гидрофобного домена молекулы  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазы меньше толщины фосфолипидного бислоя мембраны саркоплазматического ретикулума (примерно 30–32 А) и составляет 21 А. Об этом говорит расстояние между остатками триптофана в спиралях М4, М7, М9, М10 и Lys262, локализованными на цитоплазматической поверхности мембраны ретикулума, и остатком Lys972, который экспонирован во внутреннее пространство [64]. Таким образом, некоторые трансмембранные спирали  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазы выступают из мембраны над ее цитоплазматической поверхностью. В то же время, присутствие большого количества заряженных аминокислотных радикалов в трансмембранных спиралях  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазы на границе раздела липид/вода полностью подтверждает высказываемые ранее предположения о важной роли электростатических взаимодействий полярных

групп фосфолипидов с молекулой фермента в стабилизации ее структуры [65].

Анализ молекулярного клонирования показал, что изоформы белка SERCA кодируются высококонсервативным семейством генов, SERCAI, II и III [66]. У человека ген *SERCAI* локализуется в хромосоме 16p12.1-p12.2 [67], ген *SERCAII* — в хромосоме 12q23-q24.1 [68], ген *SERCAIII* — в хромосоме 17q 13.3 [69]. Ген *SERCAI* кодирует два альтернативных сплайс-варианта *SERCAIa* и *SERCAIb*. Белки *SERCAI* экспрессируются только в быстро сокращающихся скелетных мышцах [70, 71] и различаются карбоксильными концами (*SERCAIa* содержит 8 уникальных аминокислот, тогда как *SERCAIb* имеет одну уникальную аминокислоту). *SERCAIb* преимущественно экспрессируется во время эмбрионального/неонатального периода и составляет 70% быстрой  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазы до рождения. Постепенно она заменяется изоформой *SERCAIa*, так что у взрослых *SERCAIa* является главной изоформой, представленной в быстрых мышцах. Ген *SERCAII* кодирует изоформы *SERCAIIa* и *SERCAIIb*, которые отличаются карбоксильным концом (*SERCAIIa* имеет четыре уникальные аминокислоты, *SERCAIIb* содержит 49 уникальных аминокислот). Белок *SERCAIIa* экспрессируется в артериях и желудочках сердца, и уровень его экспрессии постепенно увеличивается от эмбрионального периода ко взрослому [72, 73]. *SERCAIIa* в большом количестве экспрессируется в эмбриональных быстрых мышцах и в развивающихся медленных скелетных мышцах. Однако во взрослом состоянии в быстрых скелетных мышцах происходит постепенное замещение этой изоформы быстрой *SERCAI*, тогда как в медленных скелетных мышцах продолжает экспрессироваться *SERCAIIa* [71]. Изоформа *SERCAIIb* экспрессируется большинством типов клеток, но ее уровень выше в гладкой мускулатуре [74]. Ген *SERCAIII* также кодирует две изоформы, *SERCAIIIa* или *SERCAIIIb*, которые экспрессируются специализированными типами клеток, такими как тромбоциты, лимфоциты, эндотелиальные и эпителиальные клетки [75].

Уровень экспрессии изоформы *SERCAIa* саркоплазматического ретикулума во взрослых быстрых скелетных мышцах в 3-5 раз выше, чем уровень экспрессии *SERCAIIa* в медленной или сердечной мышцах [76]. Такое отличие в плотности насоса может частично объяснить различие объема ввода  $\text{Ca}^{2+}$  в медленных и быстрых мышцах [77]. Это показывает, что изменение физиологических условий (и, следовательно, изменения необходимости депонирования  $\text{Ca}^{2+}$ ) производит сдвиг экспрессии быстрой или медленной изоформ *SERCA* в скелетных мышцах [78, 79]. Быстрые волокна могут трансформироваться в медленно сокращающи-

еся волокна при хронической низкочастотной электрической стимуляции [78]. Мышцы, обработанные таким образом, показывают переключение экспрессии изоформ  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазы из быстрого SERCA1а типа в медленно сокращающийся/сердечный тип SERCA1а [79], что сопровождается более низким поглощением ионов кальция саркоплазматическим ретикуломом и более низкой активностью АТФазы. С другой стороны, хронически пониженная нагрузка медленных скелетных мышц вызывает экспрессию мРНК быстрой SERCA1 и белка SERCA1 до уровня вплоть до половины описанной в контрольных быстрых мышцах [80]. Эти исследования предполагают, что различия экспрессии изоформ SERCA могут сопровождаться уникальными функциональными свойствами различных мышц.

### 1.5.3. Регуляция активности $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазы

В настоящее время установлено, что активность  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазы саркоплазматического ретикула в разных тканях может регулироваться посредством ряда механизмов, основными из которых являются белок-белковые взаимодействия в мембранах ретикула и фосфорилирование фермента или регуляторных белков протеинкиназами. Так, основным регулятором  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазы саркоплазматического ретикула сердца и медленных скелетных мышц (SERCA1а) является интегральный белок мембран — фосфоламбан. Его ингибирующее действие на фермент заключается в уменьшении активности  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазы и снижении ее сродства к кальцию [81]. Фосфоламбан представляет собой небольшой олигомерный 52-аминокислотный комплекс, состоящий из пяти одинаковых полипептидных цепей, с молекулярной массой ~5 кДа каждая. Обращенный в цитоплазму N-конец каждого мономера гидрофильный и положительно заряжен, вследствие чего N-концевые домены мономеров фосфоламбана отталкиваются друг от друга, тогда как гидрофобный С-конец определяет закоривание этого белка в мембране саркоплазматического ретикула [82].

В цитоплазматической области этого белка находятся положительно заряженные аминокислотные остатки, которые электростатически взаимодействуют с отрицательно заряженным цитоплазматическим доменом  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазы, что вызывает агрегацию  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазы. Ингибирование  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазы происходит вследствие фосфорилирования фосфоламбана цАМФ-зависимой протеинкиназой по остатку серина (Ser16) и  $\text{Ca}^{2+}$ /кальмодулинзависимой ( $\text{Ca}^{2+}$ /CaM) протеинкиназой по треонину (Thr17) [83, 84]. Это связывание вызывает об-

разование пентамеров фосфоламбана, которые диссоциируют от  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазы, а сама  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФаза переходит в неагрегированное активное состояние, что приводит к увеличению скорости транспорта  $\text{Ca}^{2+}$  [81, 85]. Диссоциация фосфоламбана и  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазы наблюдается в присутствии высоких концентраций кальция, а АТФ, наоборот, усиливает взаимодействие двух белков. Таким образом, регуляция активности  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазы фосфоламбаном обеспечивается скорее всего за счет изменения характера белок-белковых взаимодействий при изменении конформации как фосфоламбана, так и  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазы [81].

Несмотря на то что фосфоламбан не экспрессируется в быстрых скелетных мышцах, в экспериментах *in vitro* по ко-экспрессии двух белков было показано, что SERCAI регулируется фосфоламбаном так же, как и  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФаза сердца и медленных скелетных мышц (SERCAIIa), что объясняется высокой степенью гомологии этих изоформ фермента [86].

*In vivo* было показано, что активность SERCAII ингибируется нефосфорилированным фосфоламбаном [87]. Однако при экспрессии в COS-1 клетках активность SERCAI, SERCAIIa и SERCAIIb зависела от фосфоламбана, тогда как SERCAIII сохраняла свою чувствительность к  $\text{Ca}^{2+}$  [88]. Наличие чувствительности SERCAI к фосфоламбану *in vivo* не является результатом различия в последовательности сайта связывания фосфоламбана, скорее, связана с наличием экспрессии гена фосфоламбана в этой ткани. Сайт связывания фосфоламбана в SERCAIII очень отличается от сайтов других  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФаз, объясняя, почему SERCAIII не ингибируется фосфоламбаном [88].

Последние исследования демонстрируют, что экспрессия SERCAII и фосфоламбана может регулироваться по-разному [89]. Например, SERCAII экспрессируется перед фосфоламбаном во время развития мышц [66]. У животных, подверженных действию тиреоидного гормона, наблюдали увеличение мРНК SERCAII и снижение мРНК фосфоламбана [90]. С другой стороны, в некоторых обстоятельствах транскрипция двух этих генов может быть скоординированной [91].

Показано, что активность  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазы гладких мышц (SERCAIIb) ингибируется  $\text{Ca}^{2+}$ -связывающим белком кальретикулином [92]. Кальретикулин локализован внутри везикул саркоплазматического ретикулума, это кислый  $\text{Ca}^{2+}$ -связывающий белок с молекулярной массой 55 кДа. Синтез его осуществляется в ответ на истощение внутриклеточной концентрации  $\text{Ca}^{2+}$ . Он имеет два участка связывания ионов кальция, обладающих разным сродством (2,5 мМ и 250 мкМ соответственно) [93]. N-концевой домен молекулы содержит участок фосфорилирования. Кальретикулин способен модулировать функции

интегринов в плазмолемме и факторы транскрипции в ядре, а также обладает функцией шаперона в эндоплазматическом ретикулуме [92]. Кальретикулин может взаимодействовать с 30 кДа мембранным белком саркоплазматического ретикулума, который, предположительно, осуществляет его заякоривание в местах выделения  $\text{Ca}^{2+}$  [94].

В быстрых скелетных мышцах обнаружен другой интегральный белок саркоплазматического ретикулума — сарколипин, регулирующий активность SERCAI [95]. Сарколипин — это 31-членный пептид с молекулярной массой 6 кДа. Он имеет сходное строение с фосфоламбаном, но эти белки взаимодействуют с разными участками  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазы и несколько по-разному влияют на ее кинетические параметры. Сарколипин при низких концентрациях  $\text{Ca}^{2+}$ , как и фосфоламбан, снижает сродство  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазы к ионам кальция и ингибирует активность фермента. Однако, в отличие от фосфоламбана, при высоких концентрациях кальция сарколипин увеличивает активность SERCAI. Предполагается, что сарколипин за счет белок-белковых взаимодействий обеспечивает постоянную стимуляцию SERCAI на фоне повышенных концентраций кальция, и ее активность регулируется уровнем его экспрессии [95].

#### 1.5.4. Физиологическая роль ионов кальция в клетке

Помимо того, что кальций выполняет функцию вторичного мессенджера, он также способен активировать протеолитические ферменты — кальпаины, что в свою очередь вызывает протеолиз — обновление белкового пула.

Деградация внутриклеточных белков может идти по двум путям: лизосомальному и нелизосомальному. Лизосомальный протеолиз (катепсины), как правило, неселективен и отвечает в клетке за деградацию белкового материала трех категорий: экзогенные белки, поступающие в клетку из окружающей среды; эндогенные белки, являющиеся частью самой клетки; белковые гранулы, синтезируемые клеткой, но предназначенные для экскреции [96]. Нелизосомальные протеолитические системы включают: АТФ-зависимую убиквитин-протеосомную и цитоплазматическую кальций-зависимую протеолитические системы. Основным действующим элементом убиквитин-протеосомной системы является мультисубъединичный белковый комплекс, называемый 26S протеосомой, состоящий из 20S протеолитической сердцевины и двух 19S «шляпок», которые регулируют связывание и деградацию убиквитинированных белков [96, 97].  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимая система представлена кальпаинами и их эндогенным ингибитором — кальпастатином [98, 99].

Кальпаины — это внутриклеточные нелизосомальные  $\text{Ca}^{2+}$ -регулируемые цистеиновые протеазы [99]. Кальпаины впервые были выделены из скелетных мышц свиньи с помощью пяти последовательных колоночных хроматографических этапов более 40 лет назад [100]. Первые термины *m*-кальпаин и *μ*-кальпаин были использованы в 1989 г. [101], такое их обозначение указывает на миллимолярную (400–800  $\mu\text{M}$  для *m*-кальпаина *in vitro*) и микромолярную (3–50  $\mu\text{M}$  для *μ*-кальпаина) концентрации кальция, необходимые для активации этих протеаз [102]. Иногда *μ*- и *m*-кальпаины называют также «повсеместными», «обычными» или «типичными» кальпаинами. Наряду с этими формами кальпаина третьим хорошо изученным представителем кальпаиновой системы является белок кальпастатин, который специфически ингибирует протеолитическую активность *μ*- и *m*-кальпаинов, но не влияет на активность других изученных протеаз. Кальпастатин, *μ*- и *m*-кальпаины локализуются исключительно внутриклеточно и преимущественно связаны с субклеточными органеллами, такими как миофибриллы скелетных мышц, элементы цитоскелета немышечных клеток, везикулы аппарата Гольджи и эндоплазматического ретикулума, плазматическая мембрана.

Семейство кальпаинов включает в себе 14 членов нелизосомальных  $\text{Ca}^{2+}$ -активируемых цистеиновых протеаз, показывающих различные модели экспрессии [99]. Мышечная ткань экспрессирует 3 различных кальпаина: повсеместные *μ*- и *m*-кальпаины, которые являются наиболее охарактеризованными кальпаинами, и кальпаин-3 (также называемый кальпаин р94).

Кальпаины служат посредниками, регулирующими расщепление специфических субстратов в большом числе процессов во время дифференциации, жизни и смерти клетки. Участие постоянных кальпаинов в начальных стадиях деградации миофибриллярных белков, происходящее при мышечной атрофии, так же, как и в некротических процессах, сопровождающихся мышечной дистрофией, хорошо исследовано [103].

В первых исследованиях по выделению *m*-кальпаина [104] было обнаружено, что экстракты мышц, в которых выявлялась активность кальпаинов, также содержат ингибитор этой активности [105]. Предполагается, что кальпастатин играет основную роль в регуляции активности кальпаинов [106]. Было установлено, что этот ингибитор является термостабильным белком при 100 °C [107], а впоследствии было показано, что он стабилен в присутствии разнообразных денатурирующих агентов, таких как мочевины, додецилсульфат натрия или трихлоруксусная кислота [108] и в широком диапазоне pH. Название «кальпастатин» было предложено в 1979 г. [109].

Для связывания кальпастина и кальпаинов необходима концентрация  $\text{Ca}^{2+}$  значительно более низкая, чем требуется для инициации их протеолитической активности [110]. Связывание фрагментов аутолитического расщепления кальпаинов с кальпастином показало, что кальпастин связывается одновременно с двумя доменами молекулы кальпаина — доменами IV и VI [111].

## **1.6. МЕХАНИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ МЫШЕЧНОГО ВОЛОКНА В ПОПЕРЕЧНОМ НАПРАВЛЕНИИ**

Мышечное волокно в целом является трехмерной механической конструкцией, в которой передача усилия осуществляется как в продольном, так и в поперечном направлении [112]. Эффективность такой передачи обусловлена структурными особенностями мышечного волокна, которое представляет собой вытянутую в продольном направлении клеточную структуру, большую часть объема которой занимает сократительный аппарат, образованный миофибриллами. В целом механические характеристики мышечного волокна определяются структурно-функциональным взаимодействием трех компартментов с принципиально различными механическими свойствами: миофибрилярный аппарат, внесаркомерный цитоскелет (костамеры) и сарколемма.

Обычно под механическими характеристиками той или иной биологической структуры подразумевают упругие или вязкоупругие свойства. Применительно к мышечному волокну чаще всего определяют жесткость (аналогичную жесткости пружины, Н/м) и модуль Юнга (Па), причем как в продольном (при деформации вдоль доминирующей оси), так и в поперечном направлении (при деформации в перпендикулярном основной оси направлении). Очевидно, что эти два параметра взаимосвязаны между собой и являются составляющими интегральной жесткости волокна.

При измерении продольной жесткости путем растяжения-сжатия свой вклад вносят и поперечные структуры, демпфируя деформацию за счет собственных упругих свойств. В активированном состоянии продольная жесткость практически полностью определяется количеством замкнутых поперечных мостиков и используется для оценки их количества [113]. В работе Н. Granzier, К. Wang [114] показано, что после удаления актиновых нитей напряжение, развиваемое волокном, и его продольная жесткость составляют менее 5% от напряжения и жесткости интактных волокон в активирующем и ригорном растворах. В рас-

слабленном состоянии продольная жесткость полностью определяется цитоскелетными белками (в основном титином), так как зависимость пассивного напряжения от длины саркомера не зависит от концентрации BDM, препарата, ингибирующего актин-миозиновое взаимодействие [115]. Более того, М.А. Vagni et al. [116] показали, что при растяжении продольная жесткость и напряжение в значительной степени меняются независимо, то есть свой вклад, который возрастает с увеличением концентрации кальция, вносит продольная жесткость цитоскелетных белков. Литературные данные [4, 115, 117] свидетельствуют о том, что в расслабленном состоянии модуль упругости клеток и миофибрилл в продольном направлении составляет  $10^5$  Па, а в активированном —  $10^7$  Па.

Аналогично, при существенной деформации в поперечном направлении вклад собственной жесткости миофибрилярного аппарата присутствует в оценке значения поперечной жесткости.

Тем не менее, поскольку сокращение-расслабление мышцы происходит вдоль продольной оси, то изучению продольной жесткости посвящено существенно большее число работ, нежели поперечной. Однако по современным представлениям изучение поперечной жесткости может быть крайне актуально в связи с сигнальной и структурной ролью в механотрансдукции различных белков, формирующих костамеры и связанных с мембраной. Кроме того, под мышечным тонусом чаще всего понимают жесткость мышцы, а следовательно, и ее волокон в поперечном направлении.

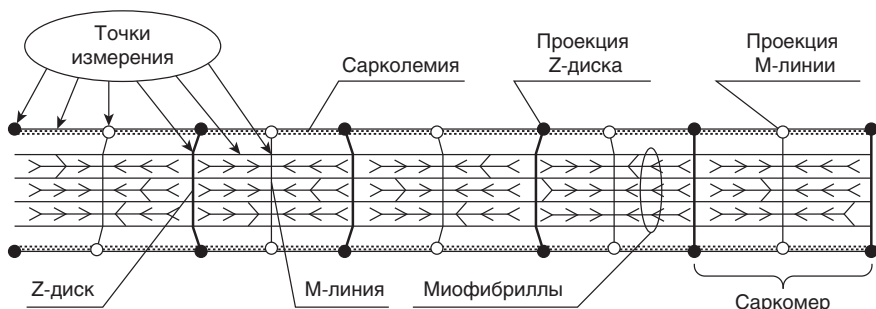
Исследований, направленных на определение поперечной жесткости и модуля Юнга как целых мышечных волокон, так и одиночных миофибрилл, в литературе представлено существенно меньше. Большинство результатов получено на интактных мышцах кроликов и мышей различных линий, а также на культурах клеток и частично дифференцированных миобластах. Кроме того, учитывая неоднородность мышечного волокна, а именно его саркомерную структуру, содержащую Z-диск, M-линию и область между ними, необходимы дифференцированные данные поперечной жесткости.

Одним из наиболее информативных методов, применяемых для получения информации о поперечной жесткости как миофибрилярного аппарата, так и сарколеммы со связанными с ней костамерами, является атомная силовая микроскопия (АСМ). Определение механических характеристик обычно проводят в контактном режиме в жидкости, снимая силовые кривые, и затем, используя решение контактной задачи Герца, вычисляют модуль Юнга и поперечную жесткость. Варьирование



глубины продавливания при снятии силовых кривых позволяет судить о жесткости как целого волокна, так и только сарколеммы. Используя этот метод, был разработан способ, позволяющий осуществить такого рода измерения (рис. 1.3) [118]. Необходимым условием реализации этого подхода является определение топографии мышечного волокна в нативных условиях, то есть в жидкости.

При анализе АСМ-изображений волокон камбаловидной мышцы крысы контрольной группы (рис. 1.4, см. цв. вклейку) были отмечены регулярные выпуклости мышечного волокна, которые соответствовали, судя по длине саркомера и расстоянию между выпуклостями, Z-дискам и М-линиям, и были обусловлены, по-видимому, наличием подмембранных цитоскелетных структур, ориентированных перпендикулярно продольной оси волокна [119]. Известно, что в районе Z-линии существует образование, называемое костамером и сформированное различными внесаркомерными белками, такими, как, например, десмин. Подобные результаты были получены и группой С. Reggiani [120], которые проводили эксперименты на мышечных волокнах скелетных мышц мышей линии CD1 как в культуре, так и высушенных на воздухе. Авторы показали, что на АСМ-изображениях присутствуют выпуклости сарколеммы, и предположили, что они были обусловлены наличием костамера в районе Z-диска. Для доказательства справедливости этого предположения с одним из белков Z-диска, альфа-актинином-2 (мышечная изоформа), они связали флуоресцентные антитела, которые представляли собой сферы диаметром 500 нм, что позволяет регистрировать их с помощью АСМ. Сопоставив оптическое и структурное изображение, авторы подтвердили правильность своей гипотезы. Были получены аналогичные профили поверхности, что дало основания



**Рис. 1.3.** Схема измерения поперечной жесткости различных участков мышечного волокна (цитировано по: Огнева И.В. и др., 2009)