

УДК 612.744.24:612.123:612.014.462.1

*М.Н. Шалагина, В.А. Протопопов, А.А. Яковлев, С.В. Овечкин, И.Г. Брындина***НАДФН-ОКСИДАЗА И СУПЕРОКСИДИСМУТАЗА В КАМБАЛОВИДНОЙ МЫШЦЕ ГРЫЗУНОВ В УСЛОВИЯХ МОДЕЛИРОВАНИЯ ЭФФЕКТОВ ГИПОГРАВИТАЦИИ И КОРРЕКЦИИ ОБМЕНА СФИНГОЛИПИДОВ¹**

К настоящему времени механизмы дисфункции и атрофии скелетных мышц в условиях гипогравитационной разгрузки окончательно не выяснены. В данной работе, выполненной на самцах мышей и крыс, подвергнутых четырехдневному антиортостатическому вывешиванию (АОВ), исследовали роль церамида в регуляции редокс-системы мышц при функциональной разгрузке. Оценивали следующие показатели: уровень церамида (ВЭТСХ) и ферментов, участвующих в метаболизме сфинголипидов – кислой сфингомиелиназы и серинпальмитоил-трансферазы (ELISA), экспрессию одного из компонентов прооксидантного комплекса – НАДФН-оксидазы (NOX2, иммуногистохимия) и активность супероксиддисмутазы (СОД) как антиоксидантного фактора (колориметрия). В разгруженной *m. soleus* было обнаружено увеличение количества церамида и кислой сфингомиелиназы, а также повышение экспрессии NOX2. При этом активность СОД достоверно не изменялась. Введение блокатора кислой сфингомиелиназы кломипрамина предотвращало как аккумуляцию церамида, так и усиление NOX2-иммунореактивности в разгруженной мышце. Отмечена также более высокая активность СОД по сравнению с АОВ без введения препарата. Полученные результаты свидетельствуют о сопряженности процессов сфингомиелиназного гидролиза и образования церамида с активацией компонентов редокс-системы мышц в условиях непродолжительной гипогравитационной разгрузки.

Ключевые слова: скелетные мышцы, моделированная гипогравитация, церамид, кломипрамин, НАДФН-оксидаза, супероксиддисмутазы.

Атрофия скелетных мышц, связанная с отсутствием нагрузки (*disuse*), является одной из ключевых проблем космической физиологии и клинической медицины [1]. Однако молекулярные механизмы развития атрофии и мышечной дисфункции в ответ на функциональную разгрузку до настоящего времени окончательно не выяснены. Роль сфинголипидов в развитии мышечной атрофии заслуживает пристального внимания, поскольку некоторые эффекты, индуцируемые представителями данного класса липидов (церамид, сфингозин) во многих аспектах совпадают с эффектами разгрузки мышц. Исследования последнего десятилетия выявили ключевую роль церамида в процессах внутриклеточного сигналинга. Обнаружено повышение уровня церамида в клетках в ответ на провоспалительные цитокины, индукторы апоптоза, оксидативный стресс и др. [2]. Образование церамида в мышцах усиливается в условиях функциональной разгрузки [3-6]. Имеются данные о том, что процессы генерации церамида и активных форм кислорода (АФК) находятся в тесной взаимосвязи [2]. Полагают, что избыточное накопление церамида стимулирует продукцию АФК, которые, в свою очередь, оказывают негативное влияние на свойства мышц, снижая силу сокращения и повышая утомляемость [7]. Учитывая вышеизложенное, актуальной проблемой является разработка контрмер, которые позволят уменьшить негативные последствия *disuse* как в условиях космического полета, так и в других ситуациях (иммобилизация, длительный постельный режим и т.п.). В связи с этим целью данной работы явилось исследование обмена сфинголипидов и активности оксидативных / антиоксидантных механизмов в разгруженных мышцах в условиях блокады образования церамида.

Материалы и методы исследования

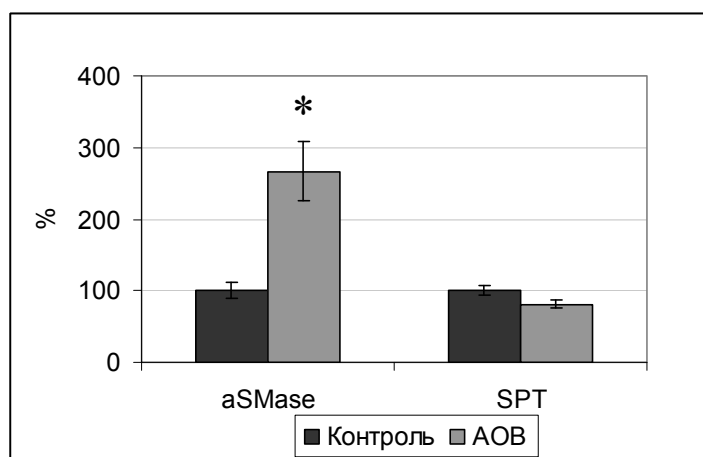
Эксперименты проведены на самцах мышей C57Bl/6 массой 22-27 г и крыс Вистар массой 200-250 г. Для устранения влияния сезонной и циркадной зависимости на исследуемые показатели исследования осуществляли в осенне-зимний период, с соблюдением требований, предъявляемых к работе с экспериментальными животными, изложенных в Приказе Минздравсоцразвития от 23.08.2010 г. № 708 «Об утверждении Правил лабораторной практики». Функциональную разгрузку мышц моделировали путем антиортостатического вывешивания (АОВ) под углом 30–45° к поверхности по Ильину-Новикову [8], в модификации Morey-Holton [9], в течение 4 дней. На крысах проведены 3 серии экс-

¹ Исследование выполнено при частичной финансовой поддержке РФФИ в рамках научных проектов № 14-04-01680-а и 16-04-01370.

периментов: на интактных животных (контроль, $n=6$), при АОВ ($n=6$), при АОВ в сочетании с введением блокатора кислой сфингомиелиназы кломипрамина ($n=6$). Кломипрамина гидрохлорид (Анафранил, Novartis Pharma, Швейцария) вводили внутримышечно в дозе 0,25 мг в течение 5 дней до начала эксперимента (ежедневно) и через день во время функциональной разгрузки. После окончания воздействий животных выводили из эксперимента путем декапитации под наркозом (хлоралгидрат в дозе 0,1 г/кг массы животного). В гомогенатах мышечной ткани, полученных из мышц разгруженных задних конечностей (*m. soleus*), определяли уровень сфингомиелина и церамида методом высокоэффективной тонкослойной хроматографии (ВЭТСХ) на пластинах силикагеля «Merck» с денситометрическим анализом проб и компьютерной обработкой денситограмм (программа Sorbfil Videodensitometer, Россия). Экспрессию и распределение НАДФН-оксидазы (NOX2) изучали у крыс с помощью иммуногистохимического метода. Для этого использовали мышинные антитела против NOX2 (Abcam, 1:300), антимышинные биотилированные антитела (goat IgG, Sigma, 1:200). Активность супероксиддисмутазы (СОД) в мышцах крыс оценивали колориметрически согласно инструкции, прилагаемой к набору (Superoxide dismutase activity colorimetric assay kit, Abcam). В мышцах интактных и вывешенных в течение 4 дней мышей ($n = 11$) определяли уровень ферментов кислой сфингомиелиназы (aSMase) и серинпальмитоилтрансферазы (SPT) с использованием наборов для ИФА (ELISA, Cusabio) согласно описанному протоколу. Статистический анализ проводили в компьютерной программе Statistica 6.0. Достоверность определяли по Манну-Уитни, различия считали достоверными при $p < 0,05$. Результаты исследований представлены как $M \pm m$.

Результаты и их обсуждение

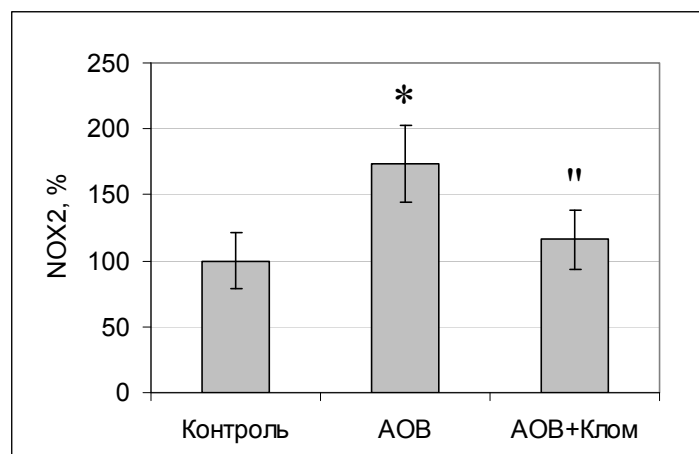
При 4-дневном АОВ в камбаловидной мышце мышей было выявлено достоверное увеличение количества церамида (в 3 раза, $p < 0,05$) и уменьшение сфингомиелина (в 7 раз, $p < 0,05$) по сравнению с контрольными значениями. Уровень aSMase возрастал в 2,7 раза ($p < 0,05$), а SPT имела недостоверную тенденцию к снижению (рис. 1).



* $p < 0,05$ по сравнению с контролем.

Рис. 1. Уровни кислой сфингомиелиназы и серинпальмитоилтрансферазы в мышцах задних конечностей у мышей C57Bl/6 после 4-дневного антиортостатического вывешивания (АОВ)

Полученные данные могут свидетельствовать о том, что основным механизмом генерации церамида в *m. soleus* при 4-дневной разгрузке является усиление сфингомиелиназного гидролиза, а не его синтез. В недавних исследованиях показана взаимосвязь сфинголипидов с активацией прооксидантных процессов в мышцах [10; 11], а данные о роли такой взаимосвязи в развитии мышечных дисфункций при гипогравитационной разгрузке отсутствуют. Экспериментальное моделирование 4-дневной гипогравитации приводило к усилению интенсивности свечения NOX2 в области саркоплазматической мембраны. При этом в серии экспериментов с введением кломипрамина наблюдалось восстановление NOX2 до контрольного уровня, тем самым была показана эффективность ингибитора сфингомиелиназы как фактора, угнетающего усиление экспрессии NOX2 (рис. 2).



$p < 0,05$ по сравнению с АОВ.

Рис.2. Интенсивность флуоресценции комплекса NOX2 (%) после 4-дневного антиортостатического вывешивания (АОВ) и АОВ на фоне введения кломипрамина. * $p < 0,05$ по сравнению с контролем, **

Наши данные согласуются с результатами, полученными J.A. Loehr [11] с соавторами, которые обнаружили, что в *m. flexor digitorum brevis* у мышей аппликация сфингомиелиназы повышает образование АФК в результате активации мембранного прооксидантного комплекса NOX2, а ингибиторы NOX2 восстанавливают силу мышц, сниженную под действием сфингомиелиназы.

Параллельно, в целях изучения антиоксидантной системы в мышцах, подвергнутых разгрузке, мы определяли активность СОД колориметрическим методом. Показано, что вывешивание не сопровождается изменением активности СОД, а введение кломипрамина достоверно повышает ее по сравнению с АОВ (с $81,7 \pm 6,1$ до $99,6 \pm 2,1$ %, $p < 0,01$).

Заключение

Результаты проведенного исследования свидетельствуют об усилении генерации церамида в скелетных мышцах в условиях моделированной гипогравитации. Изучение роли церамида, учитывая его основные эффекты в мышцах, включая влияние на синтез белков и оксидативные процессы [7; 12; 13], является перспективным направлением в исследованиях механизмов атрофии скелетных мышц в условиях невесомости. Большой интерес представляет применение блокаторов образования церамида для профилактической медицины с целью уменьшения эффектов disuse.

Выражаем благодарность за помощь в проведении иммуногистохимического исследования доктору биологических наук, профессору В.Г. Сергееву.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bodine S.C. Disuse-induced muscle wasting // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2013. Vol. 45, № 10. P. 2200-2208.
2. Ferreira L.F., Moylan J.S., Gilliam L.A.A., Smith J.D., Nikolova-Karakashian M., Reid M.B. Sphingomyelinase stimulates oxidant signaling to weaken skeletal muscle and promote fatigue // *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2010. Vol. 299, № 3. P. 552-560.
3. Брындина И.Г., Багаутдинов М.Р., Васильева Н.Н., Кривоногова Ю.А., Шалагина М.Н. Церамиды скелетных мышц, печени и легких грызунов при хроническом эмоциональном стрессе и моделированной невесомости // *Вест. Урал. мед. акад. науки.* 2012. Т.2, № 39. С. 108-109.
4. Брындина И.Г., Шалагина М.Н., Овечкин С.В., Овчинина Н.Г. Сфинголипиды скелетных мышц у мышей C57B1/6 в условиях непродолжительной моделированной гипогравитации // *Рос. физиологический журн. им. И.М. Сеченова.* 2014. Т. 100, № 11. С. 1280-1286.
5. Salaun E., Gratas-Delamarche A., Derbré F. De novo ceramides synthesis is not involved in skeletal muscle atrophy induced by short-term mechanical unloading // *Free Radic. Biol. Med.* 2014. Vol.75, Suppl. 1. P. 28.
6. Kwon O.S., Tanner R.E., Barrows K.M., Runtsch M., Symons J.D., Jalili T., Bikman B.T., McClain D.A., O'Connell R.M., Drummond M.J. MyD88 regulates physical inactivity-induced skeletal muscle inflammation, ceramide biosynthesis signaling, and glucose intolerance // *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2015. Vol. 309, № 1. P. 11-21.
7. Nikolova-Karakashian M.N., Reid M.B. Sphingolipid metabolism, oxidant signaling, and contractile function of skeletal muscle // *Antioxid. Redox Signal.* 2011. Vol.15, №1. P. 2501-2517.

8. Ильин Е.А., Новиков В.Е. Стенд для моделирования физиологических эффектов невесомости в лабораторных условиях // *Косм. биол. и авиакосм. мед.* 1980. Т. 14, № 3. С. 79-80.
9. Morey-Holton E. R., Globus R. K. Hindlimb unloading rodent model: technical aspects // *J. Appl. Physiol.* 2002. Vol. 92, № 4. P. 367-377.
10. Powers S.K., Kavazis A., McClung J.M. Oxidative stress and disuse muscle atrophy // *J. Appl. Physiol.* 2007. Vol. 102, № 6. P. 2389-2397.
11. Loehr J.A., Abo-Zahrah R., Pa R., Rodney G.G. Sphingomyelinase promotes oxidant production and skeletal muscle contractile dysfunction through activation of NADPH oxidase // *Front. Physiol.* 2015 Published online. doi: 10.3389/fphys.2014.00530.
12. Hyde R., Hajdуч E., Powell D.J., Taylor P.M., and Hundal H.S. Ceramide down-regulates System A amino acid transport and protein synthesis in rat skeletal muscle cells // *FASEB J.* 2005. Vol. 19, № 3. P. 461-463.
13. Jackman R.W., Kandarian S.C. The molecular basis of skeletal muscle atrophy // *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2004. Vol. 287, № 4. P. 834-843.

Поступила в редакцию 21.09.17

M.N. Shalagina, V.A. Protopopov, A.A. Yakovlev, S.V. Ovechkin, I.G. Bryndina

NADPH OXIDASE AND SUPEROXIDE DISMUTASE IN RODENT SOLEUS MUSCLE IN CONDITIONS OF MODELING EFFECTS OF MICROGRAVITY AND CORRECTION OF SPHINGOLIPID METABOLISM

To date, the mechanisms of skeletal muscle dysfunction and atrophy caused by hypogravitational unloading are not fully understood. In the present study conducted on male mice and rats subjected to four-days hindlimb suspension (HS) the role of ceramide in regulation of muscle redox system during functional unloading was studied. The following parameters were assessed: the amount of ceramide (HPTLC) and enzymes involved in sphingolipid metabolism namely acid sphingomyelinase and serine palmitoyltransferase (ELISA), NADPH oxidase expression as the component of prooxidant complex (NOX2, immunohistochemistry) and superoxide dismutase (SOD) activity as an antioxidant factor (colorimetry). The increase of ceramide and acid sphingomyelinase as well as the enhancement of NOX2 expression in unloaded m. soleus was found. At the same time, the activity of SOD did not change significantly. Pretreatment with clomipramine as an inhibitor of acid sphingomyelinase prevented both ceramide accumulation and amplification of NOX2 immunoreactivity in unloaded muscle. A higher activity of SOD in comparison with HS without clomipramine administration was also detected. The obtained results evidence the association of sphingomyelinase hydrolysis and ceramide formation with the activation of some components in muscle redox system during short-term hypogravitational unloading.

Keywords: skeletal muscle, microgravity, ceramide, clomipramine, NADPH oxidase, superoxide dismutase.

REFERENCE

1. Bodine S.C. Disuse-induced muscle wasting, in *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 2013, vol. 45, no. 10, pp. 2200-2208.
2. Ferreira L.F., Moylan J.S., Gilliam L.A.A., Smith J.D., Nikolova-Karakashian M. and Reid M.B. Sphingomyelinase stimulates oxidant signaling to weaken skeletal muscle and promote fatigue, in *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 2010, vol. 299, no. 3, pp. 552-560.
3. Bryndina I.G., Bagautdinov M.R., Vasil'eva N.N., Krivonogova Iu.A. and Shalagina M.N. [Ceramide in skeletal muscle, liver and lung of rodents in long-term emotional stress and simulated microgravity], in *Vestnik Ural. Med. Acad. Nauki*, 2012, vol. 2, no. 39, pp. 108-109 (in Russ.).
4. Bryndina I.G., Shalagina M.N., Ovechkin S.V. and Ovchinina N.G. [Sphingolipids in skeletal muscles of C57B1/6 mice after short-term simulated microgravity], in *Ross. Fiziol. Zh. Im. I.M. Sechenova*, 2014, vol. 11, pp. 1280-1286 (in Russ.).
5. Salaun E., Gratas-Delamarche A. and Derbré F. De novo ceramides synthesis is not involved in skeletal muscle atrophy induced by short-term mechanical unloading, in *Free Radic. Biol. Med.*, 2014, vol. 75, Suppl. 1, p. 28.
6. Kwon O.S., Tanner R.E., Barrows K.M., Runtsch M., Symons J.D., Jalili T., Bikman B.T., McClain D.A., O'Connell R.M. and Drummond M.J. MyD88 regulates physical inactivity-induced skeletal muscle inflammation, ceramide biosynthesis signaling, and glucose intolerance, in *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 2015, vol. 309, no. 1, pp. 11-21.
7. Nikolova-Karakashian M.N. and Reid M.B. Sphingolipid metabolism, oxidant signaling, and contractile function of skeletal muscle, in *Antioxid. Redox Signal*, 2011, vol. 15, no. 1, pp. 2501-2517.
8. Il'in E.A. and Novikov V.E. [Stand for modelling the physiological effects of weightlessness in laboratory experiments with rats], in *Kosm. Biol. Aviakosm. Med.*, 1980, vol. 14, no. 3, pp. 79-80 (in Russ.).
9. Morey-Holton E.R. and Globus R.K. Hindlimb unloading rodent model: technical aspects, in *J. Appl. Physiol.*, 2002, vol. 92, no. 4, pp. 367-377.
10. Powers S.K., Kavazis A. and McClung J.M. Oxidative stress and disuse muscle atrophy, in *J. Appl. Physiol.*, 2007, vol. 102, no. 6, pp. 2389-2397.

11. Loehr J.A., Abo-Zahrah R., Pa R. and Rodney G.G. Sphingomyelinase promotes oxidant production and skeletal muscle contractile dysfunction through activation of NADPH oxidase, in *Front. Physiol.*, 2015, Published online. doi: 10.3389/fphys.2014.00530
12. Hyde R., Hajduch E., Powell D.J., Taylor P.M. and Hundal H.S. Ceramide down-regulates System A amino acid transport and protein synthesis in rat skeletal muscle cells, in *FASEB J.*, 2005, vol. 19, no. 3, pp. 461-463.
13. Jackman R.W. and Kandarian S.C. The molecular basis of skeletal muscle atrophy, in *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 2004, vol. 287, no. 4, pp. 834-843.

Шалагина Мария Николаевна,
аспирант кафедры патологической физиологии
и иммунологии

E-mail: uvula@mail.ru

Протопопов Владимир Алексеевич, студент

E-mail: vladimirvst@yandex.ru

Яковлев Алексей Анатольевич, студент

E-mail: al-an.iakowlew@yandex.ru

Овечкин Сергей Владимирович,
старший преподаватель кафедры
патологической физиологии и иммунологии

E-mail: svovich@mail.ru

Брындина Ирина Георгиевна,
доктор медицинских наук, профессор,
заведующая кафедрой патологической физиологии
и иммунологии

E-mail: i_bryndina@mail.ru

ФГБОУ ВО «Ижевская государственная медицинская
академия»

426034, Россия, г. Ижевск, ул. Коммунаров, 281

Shalagina M.N.,
postgraduate student at Department
of Pathophysiology and Immunology

E-mail: uvula@mail.ru

Protopopov V.A., student

E-mail: vladimirvst@yandex.ru

Yakovlev A.A., student

E-mail: al-an.iakowlew@yandex.ru

Ovechkin S.V.,
Senior lecturer of the Department
of Pathophysiology and Immunology

E-mail: svovich@mail.ru

Bryndina I.G.,
Doctor of Medicine, Professor,
Head of the Department of Pathophysiology
and Immunology

E-mail: i_bryndina@mail.ru

Izhevsk State Medical Academy
Kommunarov st., 281, Izhevsk, Russia, 426034