

На правах рукописи



Бирюков Николай Сергеевич

**Динамика биофизических параметров мембраны и кортикального
цитоскелета мышечных клеток на ранних этапах гравитационной
разгрузки**

03.01.02 - Биофизика

Автореферат диссертации
на соискание ученой степени
кандидата физико-математических наук

Санкт-Петербург – 2017

Работа выполнена на кафедре Молекулярной и трансляционной медицины факультета Биологической и медицинской физики Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Московский физико-технический институт (государственный университет)» на базе Федерального государственного учреждения науки Федерального научно-клинического центра Физико-химической медицины Федерального медико-биологического агентства России, г.Москва.

Научный руководитель: **Огнева Ирина Владимировна**
доктор физико-математических наук, доцент

Официальные оппоненты: **Вихлянцев Иван Милентьевич**
доктор биологических наук,
ФГБУН Институт теоретической и
экспериментальной биофизики РАН,
заведующий лабораторией

Лебедев Дмитрий Витальевич
кандидат физико-математических наук,
ФГБУ Петербургский институт ядерной физики
им. Б.П. Константинова НИЦ «Курчатовский
институт»,
ведущий научный сотрудник

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Казанский институт биохимии и биофизики Казанского научного центра Российской академии наук, 420111, г.Казань, ул.Лобачевского д.2/31, а/я 30.

Защита состоится «11» апреля 2017 г. в 16.00 часов на заседании диссертационного совета Д 212.229.25 при ФГАОУ ВО «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого» (ФГАОУ ВО «СПбПУ») по адресу: 194021, г.Санкт-Петербург, ул. Хлопина, д.11, ауд. 208.

С диссертацией можно ознакомиться в фундаментальной библиотеке ФГАОУ ВО «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого» по адресу: 195251, г.Санкт-Петербург, ул. Политехническая, д.29, а также на сайте ФГАОУ ВО «СПбПУ»: <http://www.spbstu.ru>.

Автореферат разослан «___» _____ 201_г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
доктор биологических наук:

Линькова Наталья Сергеевна

Актуальность. Изучение механотрансдукции и выявление механосенсоров мышечных клеток необходимо для сохранения работоспособности опорно-двигательного аппарата и сердечной мышцы в экстремальных условиях: во время космического полёта или при подводном погружении. Нарушения в организме, возникающие в результате его пребывания в космическом пространстве, – один из основных лимитирующих факторов, препятствующих осуществлению длительных, в том числе межпланетных, перелётов. Одновременно изучение механозависимых реакций в клетке может внести вклад в исследования патогенеза миопатий различного вида.

Проблема механочувствительности клеток широко исследуется в современной биофизике. Результаты длительных наблюдений показали, что механические силы играют, возможно, одну из самых главных ролей в биологии, особенно в процессе морфогенеза (Belaadi N. et al., 2016; Wolff J., 2010). Тем не менее, лишь относительно недавно стали появляться работы, объясняющие молекулярные механизмы, чувствительные к механическим напряжениям. Исследования в этой области стали возможны, благодаря появлению технологий и методов, таких как оптические пинцеты или атомно-силовая микроскопия (Chaudhuri O. et al., 2009; Hoffman B.D., Crocker J.C., 2009), позволяющих измерять механическое напряжение на молекулярном уровне. Кроме того, появились новые поверхности с изменяемыми механическими и геометрическими параметрами, что позволило выращивать культуры клеток в контролируемых условиях и расширило возможности изучения их механических характеристик (Boudou T. et al., 2012; Tee S.-Y. et al., 2011). За последние 20 лет эти устройства и подходы обеспечили множество открытий, демонстрирующих глубокое влияние внешних механических условий на функционирование клеток (Pelham R.J., Wang Y., 1997; Sun Y. et al., 2012). Механическое напряжение, создаваемое клеткой или внешнее, способно оказывать влияние на процессы клеточного деления или регулировать

транскрипцию и запускать дифференцировку (Pelham R.J., Wang Y., 1997; Engler A.J. et al., 2006).

Механические силы начинают действовать немедленно после их приложения, несмотря на это, нам не удалось найти в литературе данных о развитии клеточного ответа в течение первых суток воздействия. Среди возможных механосенсоров можно, прежде всего, назвать белки клеточной мембраны, которые непосредственно испытывают напряжение, приложенное к поверхности клетки, в частности, белки механочувствительных ионных каналов, меняющих свою пропускную способность в зависимости от внешних механических условий. С точки зрения механочувствительности также стоит отметить белковые комплексы, обеспечивающие контакт с интерстицием или соседними клетками (Geiger B., Sartz J.P., 2009; Lecuit T., Yap A.S., 2015).

Не меньший интерес может представлять кортикальный цитоскелет, как один из компартментов, универсальных для всех типов клеток, выполняющий структурную функцию (Ogneva I.V., 2013). В работе цитоскелета задействовано большое количество различных белков, часть из которых образует жёсткую пространственную структуру (β - и γ - актины, тубулин), часть обеспечивает связь филаментов этой структуры между собой и с другими клеточными компартментами (изоформы альфа-актининов, ARP2/3, тубулин-связывающие белки SCAR5, TSP1 и др.) (Ogneva I.V., 2013). В литературе также присутствуют данные о способности молекул, образующих цитоскелет, в частности одного из актин-связывающих белков, альфа-актина-4, мигрировать в клеточное ядро и оказывать влияние на экспрессию генов (Goffart S., et al 2006). Однако, несмотря на потенциальную значимость, изучение собственных механических характеристик кортикального цитоскелета затруднено, особенно в мышечных клетках, где его вклад в продольном направлении мал по сравнению с жёсткостью сократительного аппарата. В то же время, существует возможность определить жесткость мембраны и кортикального цитоскелета при поперечном нагружении, чего недостаточно для его полной характеристики как механической системы (Ogneva I.V.,

Biryukov N.S., 2013). В связи с этим возникает необходимость построения математической модели кортикального цитоскелета для оценки величины воздействия внешней силы на мышечное волокно при опорной разгрузке и предложения способов компенсации этого воздействия.

В связи с вышеизложенным, **целью работы** являлось определение динамики биофизических параметров и математическое моделирование механических характеристик мембраны и кортикального цитоскелета мышечных клеток на ранних этапах гравитационной разгрузки.

Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие **задачи**:

- исследовать динамику поперечной жёсткости мышечных волокон камбаловидной мышцы и кардиомиоцитов крыс при сверхкоротких сроках антиортостатического вывешивания;
- определить динамику содержания цитоскелетных белков (альфа-актинина-1 и альфа-актинина-4, а также немускульных изоформ актина) в мембранной и цитоплазматической фракциях мышечных волокон камбаловидной мышцы и кардиомиоцитах крыс при сверхкоротких сроках антиортостатического вывешивания;
- построить математическую модель, количественно описывающую деформации, возникающие вследствие восприятия мембраной и подмембранным цитоскелетом нагрузки, вызванной изменением внешних механических условий;
- на основании связи, устанавливаемой моделью, предложить способ предотвращения запуска или снижения интенсивности клеточного ответа на изменение внешних механических условий на ранних этапах антиортостатического вывешивания.

Научная новизна. Впервые исследуется динамика развития клеточного ответа в мышечных волокнах камбаловидной мышцы на изменение внешних механических условий при сверхкоротких сроках воздействия. Данная проблема ранее освещалась в литературе, тем не менее, авторы уделяют

основное внимание эффектам, имеющим место в ходе воздействия в течение 3-х и более суток, мы же регистрировали значения исследуемых параметров уже в первые часы воздействия.

Получены данные об изменении в течение первых суток таких биофизических параметров мышечных волокон камбаловидной мышцы и кардиомиоцитов левого желудочка, как поперечная жесткость и скорость клеточного дыхания, характеризующих структурно-функциональную целостность клетки.

Впервые исследована динамика содержания основных цитоскелетных белков в мембранной и цитоплазматической фракциях, а также уровень экспрессии соответствующих генов, что позволяет судить о направлении и интенсивности миграции молекул от кортикального цитоскелета.

Построена математическая модель мембраны и подмембранного цитоскелета мышечного волокна, позволяющая количественно предсказывать его механические характеристики в зависимости от внешних механических условий, а также результат изменения того или иного параметра волокна.

На основании результатов, полученных из модели, сделано и проверено предположение о влиянии внутримышечных инъекций смеси фосфатидилхолинов на механические характеристики мышечных волокон, в частности на их поперечную жесткость, а также на содержание цитоскелетных белков в мембранной и цитоплазматической фракциях.

Теоретическая и практическая значимость. Результаты данной работы являются важным шагом на пути к изучению процессов механотрансдукции в живых клетках. Полученные данные подтверждают гипотезу о запуске механочувствительных сигнальных каскадов уже в течение нескольких часов воздействия, что позволяет рассматривать кортикальный цитоскелет в целом и его составляющие в качестве механосенсоров и сигнальных молекул. Кроме того, показано различие клеточного ответа при разном характере внешней нагрузки, что может свидетельствовать о существовании нескольких механизмов регуляции синтеза цитоскелетных белков. Показана диссоциация

актин-связывающих белков от актиновых филаментов в результате действия опорной разгрузки уже в первые часы воздействия. Построенная математическая модель может быть использована для количественной оценки воздействия на клетку, а также для поиска оптимального параметра для управления восприимчивостью клетки к механическим нагрузкам. Предложен способ защиты мышечного волокна от эффектов действия гравитационной разгрузки в течение первых суток антиортостатического вывешивания.

Положения, выносимые на защиту:

- запуск клеточного ответа происходит в течение первых суток гравитационной разгрузки, причём изменения в волокнах камбаловидной мышцы и в кардиомиоцитах левого желудочка имеют различный характер;
- в результате изменения внешних механических условий уже в течение первых суток происходит изменение структуры кортикального цитоскелета, а именно миграция некоторых цитоскелетных белков (альфа-актина-1 и 4) в цитоплазму;
- мышечное волокно можно рассматривать как тонкостенный упругий стержень, а его переориентация в поле силы тяжести и избыточные объёмные нагрузки приводят к его деформации;
- увеличение поперечной жёсткости мышечных волокон уменьшает величину деформации при действии опорной разгрузки и снижает интенсивность диссоциации альфа-актина-1 и альфа-актина-4 от актинового цитоскелета.

Личный вклад автора. Автор выражает благодарность соавторам публикаций за техническую помощь в проведении экспериментов и подготовке публикаций. Основные результаты диссертационной работы получены лично автором. Автор принимал непосредственное участие в подготовке и проведении всех представленных в работе экспериментов. Обработка данных и подготовка результатов к публикации в рецензируемых журналах проводилась лично автором, тогда как тексты публикаций были подготовлены совместно с соавторами.

Апробация работы. Основные результаты диссертационной работы докладывались на российских и международных конференциях и съездах, в том числе: XXXVIII European Muscle Conference (2011, Берлин, Германия), Biological motility: Fundamental and Applied Science (2012, Пушино, Россия), 33rd Annual International Gravitational Meeting (2012, Абердин, Великобритания), 34th Annual International Gravitational Meeting (2013, Тойохаси, Япония), XXI съезд Физиологического общества им. И.П. Павлова (2013, Волгоград, Россия), 64th International Astronautical Congress (2013, Пекин, Китай), XL Академические чтения по космонавтике, посвященные памяти академика С.П. Королева и других выдающихся отечественных ученых – пионеров освоения космического пространства (2016, Москва, Россия), Biological motility (2016, Пушино, Россия), 67th International Astronautical Congress (2016, Гвадалахара, Мексика).

Результаты диссертации опубликованы в 20 работах, в числе которых 10 статей в российских и международных рецензируемых журналах, включенных в систему цитирования Scopus, а также 10 тезисов научных конференций.

Структура и объём диссертации. Диссертация изложена на 113 страницах и состоит из введения, перечня используемых обозначений, обзора литературы, глав с изложением экспериментальных материалов и методов, математической модели, обсуждения, выводов и списка цитируемой литературы (179 наименований). Диссертационная работа содержит 13 рисунков и 10 таблиц.

Содержание работы

Во **введении** обоснована актуальность работы, сформулирована цель, предложены задачи, решение которых необходимо для достижения поставленной цели. Аргументирована научная новизна, выделена теоретическая и практическая значимость исследования, представлены положения, выносимые на защиту.

Обзор литературы посвящен изучению механических свойств клеток, механотрансдукции и построению математических моделей. Отмечен

возросший в недавнее время интерес исследователей к механическим свойствам клеток, а также их влияние на процессы жизнедеятельности. Подробно описаны компартменты, способные принимать участие в восприятии и передаче механического напряжения. Рассмотрены некоторые пути механотрансдукции, а также математические модели, используемые при исследованиях механических свойств клеток. Особое внимание уделено подмембранному цитоскелету, как наиболее универсальной структуре, присутствующей во всех типах клеток. Он образует жёсткую трёхмерную структуру, способную воспринимать механические нагрузки, с одной стороны, и связан с рядом механочувствительных комплексов, с другой. В частности, отмечено его взаимодействие с механочувствительными ионными каналами.

Проведён обзор литературных данных, касающихся собственных механических свойств клеток, и проанализированы количественные значения жёсткости различных типов клеток, полученные различными авторами. Рассмотрена применимость математического моделирования в биологии. Описаны наиболее популярные подходы и объекты моделирования. Подчёркнута проблема в установлении баланса между адекватностью математических моделей и их описательной способностью, а также пути её решения.

На примере скелетных мышц рассмотрено влияние внешних механических условий на биофизические параметры клетки. Подробно разобран случай переориентации клетки в поле силы тяжести в результате антиортостатического вывешивания грызунов. Данный подход широко применяется при моделировании эффектов, наблюдаемых у космонавтов и астронавтов во время и после космического полёта. Проанализированы поперечная жёсткость и параметры клеточного дыхания клеток мышц задних конечностей и кардиомиоцитов левого желудочка в нормальном и переориентированном состояниях.

Проведённый анализ существующих данных о динамике содержания белков, ответственных за формирование рассматриваемых параметров мышечных

клеток, привёл к выводу о необходимости дополнения и более подробного изучения процесса восприятия мышечными клетками дополнительной механической нагрузки, возникающей вследствие переориентации их в поле силы тяжести, и динамики содержания цитоскелетных белков в различных фракциях мышечных клеток задних конечностей грызунов при сверхкоротких сроках антиортостатического вывешивания.

Для этого был проведён эксперимент, организация которого, **материалы и методы** описаны в соответствующей главе квалификационной работы. Объектом исследования были крысы породы Вистар. Все эксперименты были одобрены комиссией по биомедицинской этике ФГУ ФНКЦ ФХМ ФМБА. Статистическая достоверность определялась при помощи двухпроходного теста ANOVA, с выбранной величиной критерия значимости Манна-Уитни p равным 0,05. Животные были случайным образом разбиты на несколько экспериментальных групп: 6HS (6 часов антиортостатического вывешивания), 12HS, 18HS, 24HS, 72HS и контрольную группу. Исследовали волокна камбаловидной мышцы и кардиомиоциты левого желудочка. В эксперименте анализировали:

- поперечную жёсткость методом атомно-силовой микроскопии в жидкости в контактном режиме;
- параметры клеточного дыхания (скорость поглощения кислорода образцами на эндогенных и экзогенных субстратах, а также дыхательный контроль) методом полярографии;
- динамику содержания γ - и β -актина, а также альфа-актинина-1 и альфа-актинина-4 в мембранной и цитоплазматической фракциях методом геле-электрофореза с последующим иммуноблоттингом;
- содержание мРНК генов цитоскелетных белков методами количественной обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции.

Так как в литературе не нашлось данных об экспериментах в течение столь коротких сроков, у животных брали кровь для оценки уровня стресса

путём измерения содержания кортикостерона методом иммуноферментного анализа.

Результаты показали незначительное увеличение кортикостерона в сыворотке крови, что свидетельствовало о почти полном отсутствии стресса в результате вывешивания.

Относительное содержание β -актина в мембранной фракции кардиомиоцитов левого желудочка достоверно снижалось на 17,2% ($p < 0,05$) и увеличивалось в цитоплазматической фракции на 23,8% ($p < 0,05$) после 12 часов вывешивания. Содержание β -актина в мембранной фракции восстановилось до контрольного уровня после 18 часов вывешивания и продолжило расти после 24 и 72 часов гравитационной разгрузки. В цитоплазматической фракции содержание β -актина через 18 часов также достигло уровня контроля и сохранялось неизменным до конца эксперимента.

Относительное содержание β -актина в мембранной фракции волокон камбаловидной мышцы снижалось на 48,6% ($p < 0,05$) и увеличивалось на 31,3% ($p < 0,05$) в цитоплазматической фракции после 12 часов антиортостатического вывешивания. Через 18 часов содержание β -актина в мембранной фракции превысило уровень 12 часов на 11,7% ($p < 0,1$), однако в дальнейшем продолжило снижение вплоть до 72 часов и достигло значения в 41,3% ($p < 0,05$) от уровня контроля.

Динамика содержания γ -актина в обеих фракциях обоих исследуемых типов клеток повторяла динамику β -актина.

Таким образом, на начальном этапе гравитационной разгрузки (6-12 часов) имело место снижение содержания обеих изоформ актина в мембранной фракции и увеличение в цитоплазматической, что приводило к снижению поперечной жёсткости (рис. 1).

Далее в ходе разгрузки жесткость кардиомиоцитов увеличивалась по сравнению с контролем, так же как и содержание бета- и гамма-актина в мембранной фракции. Напротив, жесткость волокон камбаловидной мышцы снижалась, так же как и содержание немышечных изоформ актина в мембранной

фракции. Таким образом, полученные данные могут свидетельствовать о перестройке актиновой сети кортикального цитоскелета.

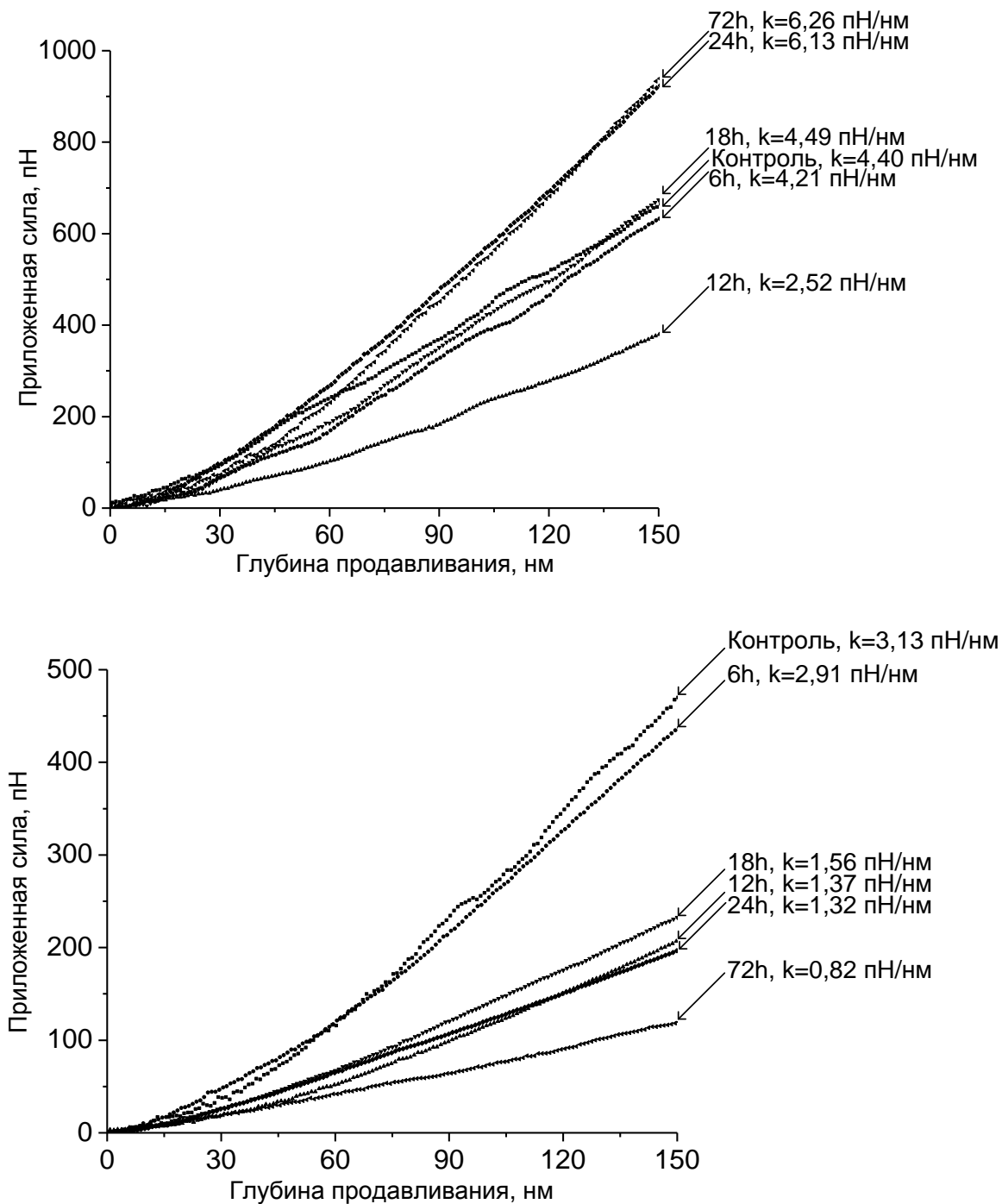


Рисунок 1. Типичные силовые кривые, полученные при измерении поперечной жесткости кардиомиоцитов левого желудочка (вверху) и волокон камбаловидной мышцы (внизу) крысы в динамике кратковременного антиортостатического вывешивания.

Следует отметить, что в случае волокон камбаловидной мышцы эта перестройка направлена на ослабление структуры цитоскелета, а в случае кардиомиоцитов на усиление. Подтверждением последнего предположения

являются данные о параметрах клеточного дыхания, свидетельствующие о снижении уровня метаболизма в волокнах камбаловидной мышцы через 18 часов и его увеличении в кардиомиоцитах.

В кардиомиоцитах имело место достоверное снижение содержания альфа-актинина-1 в мембранной фракции (на 49,6%, $p < 0,05$) и симметричное повышение его содержания в цитоплазматической фракции (на 56,4%, $p < 0,05$) уже через 6 часов антиортостатического вывешивания. При этом содержание альфа-актинина-4 в мембранной и цитоплазматической фракциях кардиомиоцитов изменилось только через 24 часа вывешивания. Через 72 часа содержание альфа-актинина-1 и альфа-актинина-4 в мембранной фракции было повышено по сравнению с контролем, наряду с увеличением содержания немышечного актина, что может быть связано с формированием «усиленной» структуры кортикального цитоскелета в кардиомиоцитах на ранних этапах вывешивания. В то же время, в волокнах камбаловидной мышцы крысы через 6 часов регистрировалось снижение альфа-актинина-4 в мембранной фракции на 27,4% ($p < 0,05$) и его повышение в цитоплазматической фракции на 28,2% ($p < 0,05$). Содержание альфа-актинина-1 менялось через 24 часа гравитационной разгрузки.

Таким образом, динамика содержания альфа-актинина-1 в кардиомиоцитах левого желудочка крысы соответствовала динамике содержания альфа-актинина-4 в волокнах камбаловидной мышцы, но обладала большей амплитудой (49,6% в кардиомиоцитах против 27,6% в волокнах *m. Soleus*). В то же время, динамика белков одного типа в клетках разных мышц оказалась разнонаправленной (Рис. 2).

Полученные в ходе данного эксперимента результаты позволили заключить, что запуск клеточного ответа на изменение внешних механических условий происходит в течение первых суток воздействия. Причём если немышечные изоформы актина отвечают, по-видимому, только за жёсткость клетки, образуя филаменты цитоскелета, то альфа-актинины не только

связывают эти филаменты, но могут также выполнять роль сигнальных молекул в механочувствительном сигнальном каскаде.

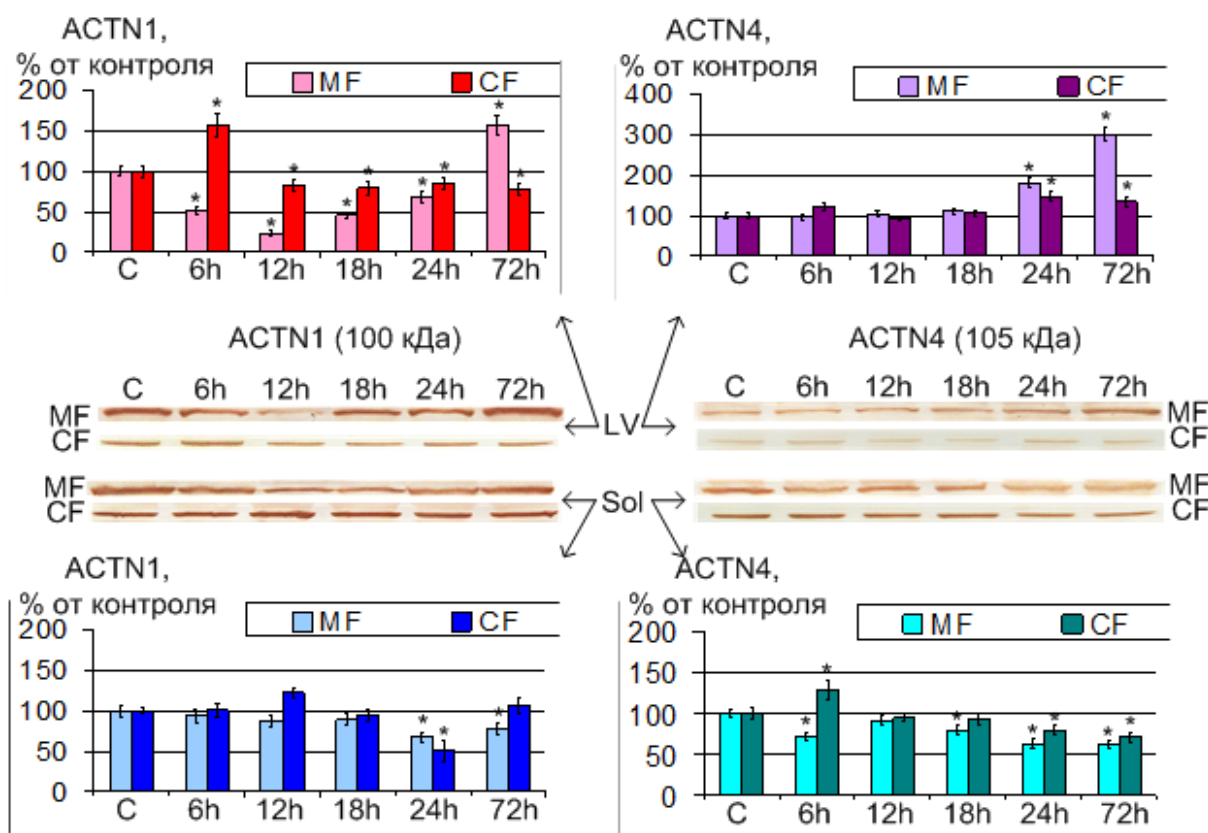


Рисунок 2. Относительное содержание белка в мембранной белковой фракции (MF) и цитоплазматической белковой фракции (CF) кардиомиоцитов левого желудочка (LV) и волокон камбаловидной мышцы (Sol) крысы после кратковременной гравитационной разгрузки и типичные картины вестерн-блота; * – $p < 0,05$ по сравнению с группой «Control», обозначенной как «C» на этом рисунке, & – $p < 0.1$ по сравнению с группой «12h».

В связи с этим появилась гипотеза, согласно которой диссоциация актин-связывающих белков от актиновых филаментов может быть связана с деформацией кортикального цитоскелета, возникающей в результате переориентации клетки в гравитационном поле. При известном внешнем воздействии для вычисления величины деформации необходимо знать жёсткость цитоскелета, что в мышечных волокнах затруднено в связи с незначительностью вклада кортикального цитоскелета в продольную жёсткость на фоне вклада сократительного аппарата. В то же время, определение жёсткости цитоскелета при поперечном нагружении не вызывает трудностей. В такой ситуации необходимо построить математическую модель мышечного

волокна. Наиболее адекватным является подход с точки зрения теории упругих стержней, позволяющий считать мембрану с кортикальным цитоскелетом мышечных волокон, в силу их геометрических особенностей, длинными цилиндрическими оболочками, называемыми тонкостенными стержнями. Геометрическими особенностями мы посчитали форму клеток, соответствующую соотношениям:

$$\frac{\delta}{d} \leq 0,1$$

$$\frac{d}{l} \leq 0,1$$

где δ – толщина мембраны с кортикальным цитоскелетом, d – диаметр волокна, l – длина волокна. Помимо геометрических параметров внесём ещё ряд существенных поправок.

Для тонкостенных стержней характерно искривление изначально плоских поперечных сечений по некоторой поверхности $W(x,z)$ – депланации сечения. Для стержней закрытого профиля, к которым отнесем мышечное волокно, характерна равномерная по длине стержня депланация поперечных сечений, то есть: $W(x,z)=W(x)$.

В задаче Сен-Венана: $\nabla W(\underline{x}) = (\nabla\Phi + \underline{x}) \times \underline{k}$, где Φ – «функция Прандтля», нижнее подчеркивание обозначает вектор. Для тонкого сечения в роли W может рассматриваться секториальная площадь. Тогда для рассмотрения участка мембраны между Z -диском и M -линией воспользуемся постановками теории тонкостенных стержней. Будем рассматривать цилиндрический стержень с тонким односвязным сечением F и объемной нагрузкой \underline{f} . Для простоты рассмотрения будем считать, что один конец стержня $z=z_0$ закреплен, а на другом $z=z_1$ задана поверхностная нагрузка $\underline{p}(\underline{x})$, представляющая собой результирующую между Z - и M -дисками, которую найдем позднее.

Для описания данного трехмерного случая воспользуемся вариационным подходом (Елисеев В.В., 1999):

$$\int_{z_0}^{z_1} dz \int_F (\underline{f} \delta \underline{u} - \delta \Pi_3) dF + \int_F \underline{p} \delta \underline{u}(\underline{x}, z_1) dF = 0,$$

$$\underline{u}(\underline{x}, z_0) = 0, \quad \Pi_3 \equiv \mu \left(\underline{\underline{\varepsilon}} \cdot \underline{\underline{\varepsilon}} + \frac{\nu}{1-2\nu} (tr \underline{\underline{\varepsilon}})^2 \right),$$

где \underline{u} – вектор перемещения, Π_3 – объемная энергия, μ – постоянная Ламэ, ν – коэффициент Пуассона, $\underline{\underline{\varepsilon}}$ – тензор деформации, $tr \underline{\underline{\varepsilon}}$ – след тензора деформации (первый главный инвариант), двойное нижнее подчеркивание обозначает тензор.

Для вывода уравнений из вариационной постановки введем аппроксимацию для перемещения:

$$\underline{u}(\underline{x}, z) \equiv u_z \underline{k} + \underline{u}_\perp = \underline{U}(z) + \underline{\theta}(z) \times \underline{x} + \alpha(z) W(\underline{x}) \underline{k},$$

где $\underline{U}(z)$ – трансляционное перемещение, $\underline{\theta}(z)$ – вектор поворота, $\alpha(z)$ – угол закручивания на единицу длины, $W(\underline{x})$ – функция депланации:

$$\Delta W = 0, \quad \underline{l} \times \underline{k} \cdot \nabla W|_{\partial F} = \underline{l} \cdot \underline{x},$$

где \underline{l} – орт материальной (лагранжевой) координаты.

Положим, что поперечные сдвиги отсутствуют, тогда: $\underline{U}'_\perp = \underline{\theta}_\perp \times \underline{k}$, $\alpha(z) = \theta'_z$.

При совмещении всех граничных условий и наложенных нами ограничений, а также в допущении, что внешние моменты отсутствуют, система в явном виде приобретает вид:

$$\hat{E} F U_z'' + q_z = 0$$

$$z = z_1: \hat{E} F U_z' = Q_{1z}$$

$$\hat{E} \underline{\underline{J}} (\underline{U}_\perp^{(4)} - \underline{\eta} \theta_z^{(4)}) - \underline{q}_\perp = 0$$

$$z = z_1: \hat{E} \underline{\underline{J}} (\underline{U}_\perp'' - \underline{\eta} \theta_z'') = \underline{Q}_{1\perp}, \quad \hat{E} \underline{k} \times \underline{\underline{J}} (\underline{U}_\perp'' - \underline{\eta} \theta_z'') = 0$$

$$\hat{E} \underline{U}_\perp^{(4)} \underline{\underline{J}} \underline{\eta} - \hat{E} I \theta_z^{(4)} + \mu C \theta_z'' - b' = 0$$

$$z = z_1: \mu C \theta_z' - \hat{E} (I \theta_z''' - \underline{U}_\perp''' \underline{\underline{J}} \underline{\eta}) - b = 0, \quad \hat{E} (I \theta_z'' - \underline{U}_\perp'' \underline{\underline{J}} \underline{\eta}) = B_1$$

$$z = 0: \underline{u}(\underline{x}, z = 0) = 0.$$

Эта система делится на две: для нахождения U_z и для нахождения \underline{U}_\perp и θ_z . Она оказывается разрешимой аналитически и её решение выглядит как:

$$U_z = \frac{1}{\hat{E}F} \left[- \iint \int_F f_z dF dz + \iint \int_F f_z dF dz \Big|_{z=0} + z \left(\iint \int_F f_z dF dz + \int_F p_z dF \right) \Big|_{z=z_1} \right],$$

где f_z – объемная нагрузка, p_z – поверхностная нагрузка, F – площадь сечения,

$\hat{E} = E \frac{1-\nu}{(1+\nu)(1-2\nu)}$, E – модуль Юнга, ν – коэффициент Пуассона, а ось z

направлена вдоль оси волокна. В случае антиортостатического вывешивания нагрузки, приводящие к деформации, формализуются так:

- $f_{ca} = f_0 n \sin\left(\frac{2\pi}{T} z\right)$, где f_0 – сила, создаваемая одним мостиком, равная 3-5 пН, n описывает количество мостиков, которое можно найти как отношение длины волокна l к расстоянию между соседними мостиками T , равное 43 нм, $0 \leq z \leq l$;
- $f_{gr} = \rho g \cos \varphi \cdot \frac{z}{z_1}$, сила тяжести где φ – угол между направлением вектора силы тяжести и продольной осью волокна, g – ускорение свободного падения, ρ – плотность физиологической жидкости;
- $p_z = \rho d g \sin \varphi + p_{hy}$, (d – диаметр волокна) – гидростатическое давление, действующее равномерно на всю поверхность мышечной клетки.

Тогда внешние воздействия преобразуются к следующему виду:

$$f_z = f_{ca} + f_{gr} = f_0 \frac{l}{T} \sin\left(\frac{2\pi}{T} z\right) + \rho g \cos \varphi \cdot \frac{z}{z_1}, \quad p_z = \rho d g \sin \varphi + p_{hy}.$$

При этом продольная компонента деформации U_z приобретает вид:

$$U_z = \frac{1}{\hat{E}} \left[- \rho g \cos \varphi \cdot \frac{z^3}{6z_1} + z \left(\rho g \left(\cos \varphi \cdot \frac{z_1}{2} + d \sin \varphi \right) - f_0 \frac{l}{T} \cos\left(\frac{2\pi}{T} z_1\right) + p_{hy} \right) + f_0 \frac{lT}{4\pi^2} \sin\left(\frac{2\pi}{T} z\right) \right].$$

Основываясь на данной модели можно утверждать, что переориентация мышечного волокна в поле силы тяжести приводит к возникновению деформаций в кортикальном цитоскелете. Для определения достаточности этих деформаций для диссоциации молекул актин-связывающих белков необходимо провести численный эксперимент. Результаты эксперимента представлены в таблице 1.

Полученные результаты согласуются с данными присутствующим в литературе относительно диссоциации белков друг от друга (Ferrer J.M. et al, 2008). Кроме того, из построенной модели следует, что увеличение жёсткости оболочки, мембраны с кортикальным цитоскелетом, приведёт к снижению величины деформации при антиортостатическом вывешивании. Основываясь на литературных данных о влиянии изменения липидного состава мембраны на перестройку актиновой сети кортикального цитоскелета (Morachevskaya E.A. et al, 2007), мы предположили, что инъекции смеси фосфатидилхолинов в мышцу смогут изменить её жёсткость, уменьшив тем самым величину деформации и, как следствие, интенсивность диссоциации актин-связывающих белков от цитоскелета. Данную гипотезу проверили экспериментально в условиях шестичасового антиортостатического вывешивания, так как уже на этом этапе можно наблюдать диссоциацию альфа-актина-4 в волокнах камбаловидной мышцы. Результаты исследования показали, что инъекции смеси фосфатидилхолинов увеличивают поперечную жёсткость мышечных волокон. В то же время, в цитоплазматической фракции наблюдалось отсутствие изменений в содержании альфа-актина-4.

Таблица 1.

Механические параметры мышечных волокон и величины продольной деформации, возникающие в них, при антиортостатическом вывешивании.

Объект	Жёсткость, пН/нм	Деформация, мкм
Волокно m. Soleus	1,38	4,29
Кардиомиоцит	2,53	9,5

Результаты получены при следующих исходных данных: $\delta = 30$ нм, $\rho = 10^3$ кг/м³, $g = 9,8$ м/с², $\varphi = 30^\circ$, $f_0 = 4 \cdot 10^{-12}$ Н, $T = 43 \cdot 10^{-9}$ м, $z = 2,4 \cdot 10^{-6}$ м, $z_1 = 1,8 \cdot 10^{-6}$ м, $l = 2 \cdot 10^{-2}$ м (для камбаловидной мышцы), $l = 1,5 \cdot 10^{-4}$ м, $p_{ny} = 50$ Па (для кардиомиоцитов).

Полученные результаты согласуются с данными, присутствующими в литературе, относительно диссоциации белков друг от друга (Ferrer J.M. et al., 2008). Кроме того, из построенной модели следует, что увеличение жёсткости оболочки, мембраны с кортикальным цитоскелетом, приведёт к снижению величины деформации при антиортостатическом вывешивании. Основываясь

на литературных данных о влиянии изменения липидного состава мембраны на перестройку актиновой сети кортикального цитоскелета (Morachevskaya E.A. et al., 2007), мы предположили, что инъекции смеси фосфатидилхолинов в мышцу смогут изменить её жёсткость, уменьшив тем самым величину деформации и, как следствие, интенсивность диссоциации актин-связывающих белков от цитоскелета. Данную гипотезу проверили экспериментально в условиях шестичасового антиортостатического вывешивания, так как уже на этом этапе можно наблюдать диссоциацию альфа-актинина-4 в волокнах камбаловидной мышцы. Результаты исследования показали, что инъекции смеси фосфатидилхолинов увеличивают поперечную жёсткость мышечных волокон. В то же время, в цитоплазматической фракции наблюдалось отсутствие изменений в содержании альфа-актинина-4.

Таким образом, нам удалось предотвратить диссоциацию альфа-актинина-4 от кортикального цитоскелета. Однако при введении лецитина нами было также замечено значительное снижение содержания цитохрома с в цитоплазматической фракции в результате 6-часового вывешивания, что косвенно свидетельствует об уменьшении скорости апоптоза.

Выводы.

- Ответ клетки на изменение внешних механических условий проявляется в течение первых суток воздействия, причём характер ответа в волокнах камбаловидной мышцы и в кардиомиоцитах левого желудочка различен. Поперечная жёсткость волокон камбаловидной мышцы и кардиомиоцитов левого желудочка достоверно снижалась на 56% и 42% ($p < 0,05$) соответственно уже через 12 часов вывешивания. Однако дальнейшая динамика имела разнонаправленный характер у разных типов клеток.
- Через 6 часов содержание альфа-актинина-1 в мембранной фракции белков левого желудочка крысы снижалось на 49,6% ($p < 0,05$), при этом в цитоплазматической фракции возрастало на 56,4% ($p < 0,05$). В волокнах камбаловидной мышцы через 6 часов отмечалось снижение содержания

альфа-актинина-4 в мембранной фракции белков на 27,4% ($p < 0,05$) и увеличение на 28,2% ($p < 0,05$) в цитоплазматической фракции. Актин-связывающие белки диссоциируют от кортикального цитоскелета через 6 часов действия механической нагрузки. В волокнах камбаловидной мышцы в первые сутки от кортикального цитоскелета диссоциирует альфа-актинин-4, в кардиомиоцитах левого желудочка - альфа-актинин-1.

- Экспериментальные результаты согласуются с предложенной математической моделью мышечного волокна. Величина деформации для разных клеток достигает 4-9 мкм. Кроме того, модель даёт возможность предсказать эффект от манипуляций с механическими характеристиками живых клеток: увеличение поперечной жёсткости и толщины мембраны и кортикального цитоскелета приведут к пропорциональному уменьшению возникающей деформации.
- Внутримышечные инъекции смеси фосфатидилхолинов увеличивают жесткость мышечных волокон и толщину мембраны с кортикальным цитоскелетом (на 11% и 31% соответственно ($p < 0,05$)), снижая, согласно модели, величину деформации, предотвращая диссоциацию актин связывающих белков от кортикального цитоскелета и компенсируя таким образом эффект действия опорной разгрузки, что подтверждено экспериментально.

Публикации по теме диссертации

Публикации в рецензируемых журналах

1. Ogneva I.V., Biryukov N.S. Lecithin prevents cortical cytoskeleton reorganization in rat soleus muscle fibers under short-term gravitational disuse // PLoS ONE. 2016. Vol. 11. Issue 4:e0153650. doi:10.1371/journal.pone.0153650.
2. Огнева И.В., Бирюков Н.С., Веселова О.М., Ларина И.М. Содержание цитохрома с и функциональная активность митохондрий в клетках сердечной и скелетной мышцы крысы в течение 3-х суток гравитационной разгрузки // Авиакосмическая и экологическая медицина. 2014. Т. 48. №. 6. С. 23 – 29.
3. Ogneva I.V., Biryukov N.S., Veselova O.M., Larina I.M. Cell respiration of rat cardiomyocytes and soleus muscle fibers under ultra-short-term antiorthostatic suspension // International Journal Biomedicine. 2014. Vol. 4. Issue 3. P. 162 – 168.
4. Огнева И.В., Бирюков Н.С., Лейнсоо Т.А., Ларина И.М. Структура кортикального цитоскелета кардиомиоцитов левого желудочка и волокон камбаловидной мышцы

- крысы после ультра-короткого антиортостатического вывешивания // *Авиакосмическая и экологическая медицина*. 2014. Т. 48. №. 4. С. 37 – 45.
5. Ogneva I.V., Biryukov N.S., Leinsoo T.A., Larina I.M. Possible role of non-muscle alpha-actinins in muscle cell mechanosensitivity // *PLoS ONE*. 2014. Vol. 9. Issue 4:e96395.
 6. Ogneva I.V., Biryukov N.S. Mathematical modeling cardiomyocyte's and skeletal muscle fiber's membrane: interaction with external mechanical field // *Applied mathematics*. 2013. Vol. 4. № 8A. P. 1 – 6.
 7. Бирюков Н.С., Огнева И.В. Взаимодействие мышечной клетки и внешнего механического поля: математическое моделирование // *Биофизика*. 2013. Т. 58. Вып. 3. С. 531 – 539.
 8. Ogneva I.V., Mirzoev T.M., Biryukov N.S., Veselova O.M., Larina I.M. Structure and functional characteristics of rat's left ventricle cardiomyocytes under antiorthostatic suspension of various duration and subsequent reloading // *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 2012. Vol. 2012, Article ID 659869, 11 pages.
 9. Мирзоев Т.М., Бирюков Н.С., Веселова О.М., Ларина И.М., Шенкман Б.С., Огнева И.В. Параметры клеточного дыхания волокон и содержание десмина в камбаловидной мышце крысы на ранних этапах гравитационной разгрузки // *Биофизика*. 2012. Т. 57. Вып. 3. С. 509 – 514.
 10. Мирзоев Т.М., Бирюков Н.С., Веселова О.М., Ларина И.М., Шенкман Б.С., Огнева И.В. Содержание десмина и клеточное дыхание волокон камбаловидной мышцы крысы в условиях 3- и 7-суточного восстановления после 14-суточного антиортостатического вывешивания // *Авиакосмическая и экологическая медицина*. 2012. Т. 46. № 1. С. 41 – 45.

Публикации в материалах научных мероприятий

1. Biryukov N.S., Maximova M.V., Ogneva I.V. The impact of the phosphatidylcholine mixture injection on cortical cytoskeleton of rats soleus muscle fibers during short-term disuse // 67th International Astronautical Congress. 26-30 September. 2016. Guadalajara, Mexico. Paper ID: 35067.
2. Biryukov N.S., Maximova M.V., Ogneva I.V. Impact of the phosphatidylcholine' mixture injection on cortical cytoskeleton of rats soleus muscle fibers // *Biological motility*. 12-14 May 2016. Puschino, Russia. P. 31 – 33.
3. Бирюков Н.С., Максимова М.С., Огнева И.В. Влияние введения фосфатидилхолинов на состояние кортикального цитоскелета мышечных волокон у крыс при моделировании гравитационной разгрузки // *XL Академические чтения по космонавтике, посвященные памяти академика С.П. Королева и других выдающихся отечественных ученых – пионеров освоения космического пространства*. 26 – 29 января. 2016. Москва, Россия. С. 440.
4. Ogneva I.V., Biryukov N.S. Influence of simulated microgravity on cortical (submembrane) cytoskeleton's structure of the skeletal muscle fibers and cardiomyocytes of rodents // 64th International Astronautical Congress. 23-27 September. 2013. Beijing, China. Paper ID: 16782.
5. Бирюков Н.С., Веселова О.М., Ларина И.М., Огнева И.В. Изменения клеточного дыхания и поперечной жесткости волокон камбаловидной мышцы и кардиомиоцитов крысы в течение первых суток антиортостатического вывешивания // *XXI съезд Физиологического общества им. И.П. Павлова*. 16-20 сентября 2013. Волгоград, Россия. С. 64.
6. Ogneva I.V., Biryukov N.S., Veselova O.M., Larina I.M. Biophysical characteristics of rat's cardiomyocytes under ultra-short-term antiorthostatic suspension // 34th Annual International Gravitational Meeting. 23-28 June. 2013. Toyohashi, Japan. P. 74.

7. Biryukov N.S., Ogneva I.V. Mechanical deformations of rat's soleus muscle fibers under antiorthostatic suspension // 34th Annual International Gravitational Meeting. 23-28 June. 2013. Toyohashi, Japan. P. 46.
8. Ogneva I.V., Mirzoev T.M., Biryukov N.S., Veselova O.M., Larina I.M. Structure and functional characteristics of rat's cardiomyocytes under simulated microgravity and subsequent recovery // 33rd Annual International Gravitational Meeting. 18-22 June. 2012. Aberdeen, UK. P. 77.
9. Ogneva I.V., Mirzoev T.M., Biryukov N.S., Veselova O.M., Larina I.M. Transversal stiffness and some cytoskeletal proteins content in rat's left ventricle cardiomyocytes under antiorthostatic suspension of various duration // Biological motility: Fundamental and Applied Science. 10-15 May 2012. Puschino, Russia. P. 149 – 151.
10. Biryukov N.S., Mirzoev T.M., Ogneva I.V. Transversal stiffness of Z-disk and alpha-actinin-2 content in the rat soleus muscle after 3- and 7-day reloading after 14-day hindlimbs suspension // J. Muscle Res. Cell Motil. XXXVIII European Muscle Conference. 14-18 September. 2011. Berlin, Germany. P. 59.