

На правах рукописи

ОГНЕВА Ирина Владимировна

**БИОФИЗИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ ИЗМЕНЕНИЯ МЕХАНИЧЕСКИХ  
СВОЙСТВ ВОЛОКОН СКЕЛЕТНЫХ МЫШЦ ПРИ ОПОРНОЙ  
РАЗГРУЗКЕ**

03.01.02 – Биофизика

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
доктора физико-математических наук

Санкт-Петербург – 2011

Работа выполнена в Учреждении Российской академии наук Государственном научном центре Российской Федерации – Институте медико-биологических проблем Российской академии наук

Научный консультант: доктор физико-математических наук

Цатурян Андрей Кимович

Официальные оппоненты: доктор технических наук, доцент

Тимофеев Андрей Николаевич

доктор физико-математических наук, профессор

Смолянинов Владимир Владимирович

доктор физико-математических наук

Юдин Владимир Евгеньевич

Ведущая организация: Учреждение Российской академии наук Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН.

Защита состоится «06» октября 2011 г. в 14<sup>00</sup> часов на заседании диссертационного совета Д 212.229.25 при ГОУ ВПО «Санкт-Петербургский государственный политехнический университет» по адресу: 195251, Санкт-Петербург, ул. Политехническая, д. 29, в 305 ауд. ФМедФ (ул. Хлопина, д. 5).

С диссертацией можно ознакомиться в фундаментальной библиотеке ГОУ ВПО «Санкт-Петербургский государственный политехнический университет».

Автореферат разослан «    » сентября 2011 г.

Ученый секретарь диссертационного совета

кандидат физико-математических наук, доцент

Власова О.Л.

## **Актуальность проблемы**

Снижение функциональных возможностей мышечной системы в условиях невесомости (Kozlovskaya I. et al., 1988; McDonald K.S., Fitts R.H., 1995; Toursel Th. et al., 2002; Григорьев А.И. и др., 2004) до сих пор является одной из основных медицинских проблем, препятствующих длительному космическому полету. Кроме того, эта же проблема является крайне актуальной и при восстановлении травматологических и неврологических больных. До недавних пор принято было считать, что атрофические изменения, возникающие в мышечной ткани, связаны лишь с ее функциональной разгрузкой как органа (Booth F.W., Kelso J.R., 1973; Desplanches D. et al. 1990; Caiozzo V.J. et al. 1996). Поэтому поиск путей предотвращения негативных последствий микрогравитации для мышц шел в направлении активации сократительной активности. Тем не менее, большинство предложенных методов профилактики атрофических изменений являются паллиативными, поскольку их основная задача заключается не в предотвращении запуска атрофических изменений, а в их компенсации.

В целом, механизм первичного восприятия внешнего механического, в том числе и гравитационного, стимула клетками скелетных мышц (мышечными волокнами) до сих пор остается неясным. Накопленные в мировой литературе данные свидетельствуют о том, что изменения величины и направления вектора силы тяжести оказывают прямое влияние не только на мышечные волокна, но и на клетки других типов, например, на мезенхимальные стволовые клетки и на клетки эндотелия аорты (Rijken P.J. et al., 1992; Infanger M. et al., 2007; Buravkova L.B. et al., 2010), несмотря на малость их размеров. Возможно, механизм, обуславливающий запуск изменений в клетке в ответ на изменение внешних механических условий, может быть универсальным для клеток любого типа и обеспечивается подмембранным цитоскелетом. Однако процессы, обеспечивающие клеточный ответ на внешний механический стимул, изучены недостаточно. Это связано как с экспериментальными трудностями, так и с отсутствием интегративных подходов к исследованию этой проблемы клеточной биофизики.

Особый интерес в связи с этим представляют мышечные клетки, которые специализированы к генерации механического напряжения и противодействию гравитационному полю при поддержании позы. В условиях функциональной нагрузки мышечные клетки находятся в напряженном состоянии, которое отсутствует при опорной разгрузке, частным случаем которой является и гравитационная разгрузка. При этом имеет место и изменение уровня нервной активации. По-видимому, суперпозицией этих двух факторов (изменение механического напряжения и нервно-мышечной активности) в условиях отсутствия функциональной нагрузки определяется адаптационный ответ мышечных клеток, но их вклад, вероятно, различен.

Закономерным следствием изменения внешних механических условий будет изменение механических характеристик клеток, таких как прочность, устойчивость, жесткость. Однако прочность и устойчивость в большей степени характеризуют целостность клетки как физического объекта. Поэтому в биофизических исследованиях механических характеристик клеток принято исследовать именно жесткость. Поскольку мышечные клетки имеют особое строение и доминирующую ось, их обычно называют мышечными волокнами и исследуют продольную жесткость. Но проблема восприятия внешнего механического стимула мышечными волокнами при таком подходе не нашла своего решения, что может быть связано с невозможностью оценить состояние мембраны с кортикальным цитоскелетом (сарколеммы) при продольном нагружении вследствие их малого, по сравнению с сократительным аппаратом, вклада в значение модуля упругости в продольном направлении.

В целом механическое волокно представляет собой трехмерную конструкцию, что дает возможность исследовать его свойства не только в продольном, но и в поперечном направлении, используя для этого атомную силовую микроскопию – АСМ (Nyland L.R., Maughan D.W., 2000; Mathur A.B. et al., 2001; Collinsworth A.M. et al., 2002; Defranchi E. et al., 2005; Akiyama N. et al., 2006). Однако сложная организация мышечного волокна (структурно-функциональное взаимодействие сократительного аппарата, состоящего из саркомеров, и клеточной мембраны вместе с подмембранным кортикальным цитоскелетом – сарколеммы) позволяет предположить, что поперечная жесткость различных участков сарколеммы и сократительного аппарата, а именно, в области Z-диска, M-линии и участка между ними отличаются друг от друга. Более того, в литературе не представлено каких-либо сведений о динамике изменения упругих характеристик мышечных волокон при поперечном нагружении в условиях опорной разгрузки.

Существующие методы анализа результатов измерений поперечной жесткости мышечных волокон с использованием атомной силовой микроскопии сводятся обычно к вычислению обобщенного модуля упругости с применением решения различных модификаций контактной задачи Герца для изотропных тел (Weisenhorn A.L. et al., 1993; Radmacher M. et al., 1996; Shin D., Athanasiou K., 1999; Mathur A.B. et al., 2001; Collinsworth A.M. et al., 2002). Однако подобный подход не дает информации о вкладе модулей упругости различных участков волокна в интегральные механические характеристики. Разработка адекватной математической методики анализа результатов экспериментов по определению поперечной жесткости различных участков сократительного аппарата может помочь в выявлении механизмов изменения механических характеристик мышечных волокон в условиях опорной разгрузки.

Сократительный аппарат связан с сарколеммой через целый ряд белков, доминирующим из которых является десмин, относящийся к семейству белков, формирующих промежуточные филаменты (Ervasti J.M., 2003; Capetanaki Y. et al., 2007).

Однако роль десмина в изменениях свойств мышечных волокон в условиях гравитационной разгрузки практически не изучена. Кроме того, поскольку в сарколемме отсутствуют активные сократительные элементы, ее поперечная жесткость в расслабленном волокне отражает состояние структуры кортикального цитоскелета, что особенно интересно в условиях опорной разгрузки. Одним из ключевых белков, обеспечивающих структурную целостность подмембранного цитоскелета, является альфа-актинин-1. Исследование динамики изменения содержания этого белка в мышечных волокнах в условиях отсутствия опоры представляет интерес в связи с имеющимися в литературе данными об увеличении базального содержания  $Ca^{2+}$  в волокнах камбаловидной мышцы в условиях функциональной разгрузки (Ingalls C.P. et al., 1999, 2001; Пономарева Е.В. и др., 2008). Более того, ничего не известно о динамике базального содержания  $Ca^{2+}$  в других мышцах, чей уровень нервной активации при отсутствии опоры либо не меняется, либо даже увеличивается.

Таким образом, проведение эксперимента, направленного на определение поперечной жесткости волокна различных мышц, разработка методики математического анализа, позволяющего вычислить модуль Юнга различных участков, оценка вклада внесаркомерных цитоскелетных белков в состояние структуры и анализ содержания ионов кальция как одного из вторичных посредников могли бы помочь в поиске универсальных механизмов механорецепции.

**Целью** данной работы являлось определение биофизических механизмов изменения механических свойств волокон скелетных мышц при опорной разгрузке.

Для достижения этой цели был поставлен ряд следующих конкретных **задач**:

1. Разработать методику экспериментального определения локальной поперечной жесткости различных участков мышечного волокна.
2. Разработать методику математического анализа, позволяющую определить вклад упругих характеристик различных участков мышечного волокна в измеренную локальную поперечную жесткость.
3. Экспериментально определить динамику изменения поперечной жесткости волокон различных мышц в ходе опорной разгрузки.
4. Определить динамику изменения содержания десмина в волокнах различных мышц в ходе опорной разгрузки.
5. Определить динамику изменения содержания немышечной изоформы альфа-актинина-1 в волокнах различных мышц в ходе опорной разгрузки.
6. Определить динамику изменения базального содержания ионов кальция в волокнах различных мышц в ходе опорной разгрузки.

#### **Положения, выносимые на защиту**

1. На основе атомной силовой микроскопии осуществлено дифференциальное определение локальной поперечной жесткости различных участков сарколеммы и сократительного

аппарата мышечных волокон в расслабленном, активированном кальцием и ригорном состояниях.

2. Разработанная методика математического анализа результатов измерений локальной поперечной жесткости дает возможность оценить, какие именно изменения послужили причиной изменения поперечной жесткости сократительного аппарата в тех или иных условиях (деградация цитоскелетных белков, снижение вероятности образования поперечных мостиков).
3. Существуют структуры, связывающие М-линию с сарколеммой и формирующие выпуклости поверхности, аналогичные костамерам Z-диска.
4. Снижение сократительной активности в условиях функциональной разгрузки приводит к снижению содержания десмина и уменьшению поперечной жесткости сократительного аппарата, в то время как увеличение сократительной активности приводит к поддержанию его структуры.
5. В условиях опорной разгрузки поперечная жесткость сарколеммы снижается вне зависимости от типа мышцы и ее сократительной активности; при этом содержание альфа-актинина-1 и базальный уровень ионов кальция в цитоплазме волокон различных мышц увеличиваются.

#### **Научная новизна исследования**

Впервые получены следующие результаты.

1. На основании атомной силовой микроскопии разработан способ определения локальной поперечной жесткости мышечных волокон, защищенный патентом РФ. Экспериментально определена поперечная жесткость различных участков сарколеммы и сократительного аппарата мышечных волокон в расслабленном, активированном кальцием и ригорном состояниях в контрольных условиях и в динамике опорной разгрузки у крысы, монгольской песчанки и человека.
2. Разработана методика математического анализа данных атомной силовой микроскопии, позволяющая оценить, изменение каких именно свойств мышечного волокна приводит к изменению локальной поперечной жесткости различных участков сократительного аппарата.
3. Экспериментально определена динамика изменения содержания десмина в камбаловидной, медиальной головке икроножной и передней большеберцовой мышцах на различных сроках опорной разгрузки у крысы, монгольской песчанки и человека.
4. Показано, что имеет место изменение содержания альфа-актинина-1 в камбаловидной, медиальной головке икроножной и передней большеберцовой мышцах на различных сроках опорной разгрузки у крысы, монгольской песчанки и человека.
5. Показано увеличение базального содержания кальция через сутки опорной разгрузки, причем вне зависимости от типа мышцы и ее активности.

## **Научная и практическая значимость исследования**

Полученные в работе результаты имеют принципиальное значение для понимания механизмов восприятия внешнего механического стимула клетками скелетных мышц.

Новые экспериментальные данные о механических характеристиках мышечных волокон в условиях опорной разгрузки, содержании цитоскелетных белков и ионов кальция дают возможность сформировать новый подход к фундаментальной проблеме механочувствительности мышечных клеток.

Разработанный интегративный подход, включающий в себя экспериментальный способ оценки механических характеристик мышечного волокна и методику математического анализа результатов измерений, позволяет получать информацию о состоянии разных внутриклеточных структур при экстремальных и патологических состояниях.

Результаты исследования могут помочь в раскрытии механизмов патогенеза различных нервно-мышечных заболеваний. Кроме того, они могут способствовать поиску путей предотвращения развития гипогравитационного синдрома, сохранению работоспособности мышц после длительных космических полетов.

## **Апробация работы**

Основные материалы диссертационной работы были представлены на I Международной конференции «Математическая биология и биоинформатика» (Пушино, Россия, 2006), на международном симпозиуме «Biological motility: achievements and perspectives» (Пушино, Россия, 2008), на 37-й Европейской мышечной конференции (Оксфорд, Великобритания, 2008), на конференции «Научное наследие академика Л.А. Орбели. Структурные и функциональные основы эволюции функций, физиология экстремальных состояний», (Санкт-Петербург, Россия, 2008), на V, VI Всероссийской с международным участием школе-конференции по физиологии мышц и мышечной деятельности «Системные и клеточные механизмы в физиологии двигательной системы», (Москва, Россия, 2009, 2011), на рабочих совещаниях «Биомеханика 2009», «Биомеханика 2011» (Санкт-Петербург, Россия, 2009, 2011), на международном симпозиуме «30<sup>th</sup> Annual International Gravitational Meeting» (Сиань, Китай, 2009), на международном симпозиуме «17<sup>th</sup> IAA Humans in Space Symposium» (Москва, Россия, 2009), на 38-й Европейской мышечной конференции (Лилль, Франция, 2009), на международном симпозиуме «Biological motility: from fundamental achievements to nanotechnologies» (Пушино, Россия, 2010), на международном симпозиуме «31<sup>th</sup> Annual International Gravitational Meeting» (Триест, Италия, 2010), на 39-й Европейской мышечной конференции (Падуя, Италия, 2010), на XXI съезде Физиологического общества им. И.П. Павлова (Калуга, Россия, 2010).

## **Публикации**

По теме диссертации опубликовано 45 работ, среди которых 1 патент, получивший бронзовую медаль на 37-ом Международном салоне изобретений, новой техники и

технологий (Женева, Швейцария, 2009), 18 статей в отечественных и международных рецензируемых журналах (в том числе 12 публикаций в отечественных журналах из «Перечня ведущих рецензируемых научных журналов и изданий» ВАК и 5 публикаций в международных журналах из Перечня ВАК), а также тезисы докладов в материалах отечественных и международных конференций.

Исследования, проведенные в рамках диссертационной работы, поддержаны программой фундаментальных исследований ГНЦ РФ – ИМБП РАН, рядом грантов РФФИ, в том числе грантом 10-04-00106-а, грантами Отделения биологических наук РАН, Целевой программой фундаментальных исследований Президиума РАН «Фундаментальная наука – медицине», государственными контрактами с Роскосмосом и ЦСКБ «Прогресс».

**Благодарности.** Автор выражает огромную благодарность научному консультанту д.ф.-м.н. Андрею Кимовичу Цатуряну; сотрудникам лаборатории миологии ГНЦ РФ – ИМБП РАН и особенно Э.Г. Алтаевой, Е.В. Пономаревой, В.А. Курушину; сотрудникам ОМРБ ПИЯФ и особенно В.В. Исаеву-Иванову, Д.В. Лебедеву.

#### **Объем и структура диссертации**

Диссертационная работа изложена на 274 страницах машинописного текста; состоит из введения, пяти глав, обсуждения полученных результатов, заключения, выводов, списка цитируемой литературы. Работа содержит 42 таблицы, 65 рисунков. Список литературы включает 157 наименований. Личный вклад автора являлся определяющим на всех этапах работы и заключался в постановке задач исследования, проведении экспериментов, обработке данных, анализе, обобщении и изложении результатов.

#### **Объект, методы исследования и экспериментальные подходы**

**Объектом исследования** служили мышцы голени человека и грызунов, крыс и монгольских песчанок. У животных эксперименты проводили на камбаловидной (*M. soleus*), медиальной головке икроножной (*M. gastrocnemius caput mediale*) и передней большеберцовой (*M. tibialis anterior*) мышцах, у человека – только на камбаловидной мышце.

#### **Методы исследования**

Для определения поперечной жесткости различных структур мышечного волокна использовали **атомную силовую микроскопию**.

**Приготовление проб.** Мышцу вырезали от сухожилия до сухожилия и, с целью частичного разрушения клеточной мембраны, обрабатывали согласно методике химического скинирования (Stevens L. et al., 1993). До момента проведения экспериментов пробы хранили при температуре  $-20^{\circ}\text{C}$  в буфере, содержащем в равных долях по объему расслабляющего раствора R (20 mM MOPS, 170 mM пропионат калия, 2,5 mM ацетата магния, 5 mM  $\text{K}_2\text{EGTA}$ , 2,5 mM АТФ) и глицерина.



В день эксперимента пробы переносили в раствор R, в котором выделяли одиночные глицеринизированные мышечные волокна, то есть волокна с проницаемой сарколеммой.

Для получения демембранизированных волокон, одиночные глицеринизированные мышечные волокна, находящиеся в растворе R, инкубировали с детергентом Triton X-100, конечная концентрация которого составляла 2% по объему, в течение 12 часов при температуре +4°C. После обработки детергентом полученные демембранизированные волокна отмывали в растворе R.

Для измерения поперечной жесткости выделенные волокна прикрепляли к дну жидкостной ячейки атомно-силового микроскопа, фиксируя их кончики с помощью специального клея Fluka shellac wax-free (Sigma, Германия). В зависимости от серии экспериментов ячейку заполняли либо расслабляющим раствором R, либо активирующим раствором A (20 mM MOPS, 172 mM пропионат калия, 2,38 mM ацетат магния, 5 mM CaEGTA, 2,5 mM АТФ), либо ригор-раствором Rg (20 mM MOPS, 170 mM пропионат калия, 2,5 mM ацетат магния, 5 mM K<sub>2</sub>EGTA).

Все эксперименты проводили при температуре +16°C.

*Методика атомной силовой микроскопии.* Измерения поперечной жесткости волокон проводили, используя платформу Solver-P47-Pro<sup>TM</sup> или инвертированный микроскоп Olympus XI, соединенный с атомной силовой головкой SMENA<sup>TM</sup> (NT-MDT, Россия).

Жесткость (в Н/м) для каждого кантилевера корректировали по положению резонанса. Для работы в жидкости использовали мягкие кантилеверы с коэффициентом жесткости на уровне 0,01 – 0,08 Н/м. Применяли контактный режим как для получения изображения, так и для измерения поперечной жесткости. Радиус  $r_c$  кривизны кончика всех использованных кантилеверов считали равным 10 нм.

Для оценки длины саркомеров и идентификации Z-диска и M-линии использовали АСМ-изображение. Под длиной саркомера понимали расстояние между двумя соседними выпуклостями рельефа, которые принимали за Z-диск. Измерения проводили в следующих точках: Z-диск, M-линия, середина полусаркомера при работе с демембранизированными волокнами; в проекции Z-диска, в проекции M-линии, между ними при работе с глицеринизированными волокнами (рис. 1).

Определение механических характеристик мышечных волокон начинали с получения калибровочной силовой кривой на стекле с целью вычисления коэффициента перевода отклонения кантилевера, измеряемого в единицах силы тока, в единицы измерения расстояния –  $a$  (м/А). Затем снимали силовые кривые в интересующих точках волокна, получая зависимость  $y(x)$ , где  $y$  – измеряемое отклонение кантилевера (в А),  $x$  – вертикальное перемещение держателя кантилевера от точки касания поверхности (в м). Далее определяли реальную глубину продавливания волокна и приложенную к нему силу по формулам:

$\lambda = x - y \cdot a$ ,  $F = y \cdot a \cdot k_c$ , где  $\lambda$  – реальная глубина продавливания (в м),  $F$  – реальная приложенная к волокну сила (в Н),  $k_c$  – коэффициент жесткости кантилевера (в Н/м).

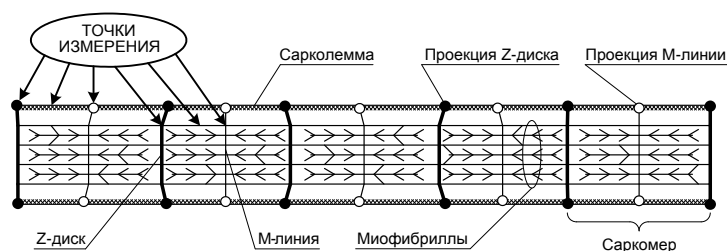


Рисунок 1. Схематическое изображение мышечного волокна и точки измерения поперечной жесткости.

Далее на глубине продавливания 150 нм определяли изменение приложенной силы и по

формуле  $k_{\perp} = \frac{F}{\lambda}$  находили поперечную жесткость образца (рис. 2).

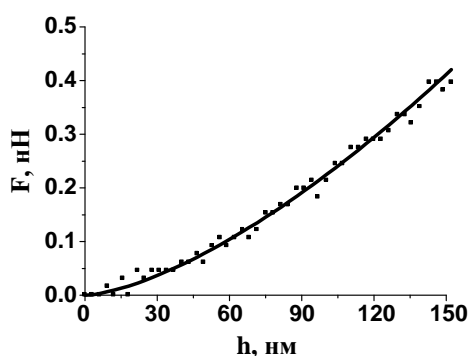


Рисунок 2. Кривая зависимости глубины продавливания волокна от приложенной силы. Проекция Z-диска (костамер), расслабленное состояние, жесткость  $k_{\perp} = 2,72$  пН/нм при  $\lambda = 150$  нм.  $\square$  - экспериментальные точки, — - кривая аппроксимации.

Вышеописанную обработку результатов проводили в специально разработанной программе в среде MatLab 6.5. Полученные в ходе эксперимента результаты статистически обрабатывали с помощью стандартных методов, реализованных в Microsoft Origin. Данные представляли в виде  $M \pm m$ , где  $M$  – среднее значение оцениваемой величины,  $m$  – стандартная ошибка среднего значения.

Для определения базального содержания ионов кальция в мышечном волокне использовали *флуоресцентную микроскопию* со специфическим зондом Fluo4-AM.

Выделенную, непременно от сухожилия до сухожилия, мышцу помещали в раствор Рингера для теплокровных с АТФ (126,0 мМ NaCl, 5,0 мМ KCl, 2,0 мМ CaCl<sub>2</sub>, 1,0 мМ MgCl<sub>2</sub>, 12,0 мМ NaHCO<sub>3</sub>, 1,0 мМ NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 11,0 мМ глюкозы, 2,5 мМ АТФ, pH 7,4) на 40 минут, затем на 40 минут в расслабляющий раствор, содержащий Mg-АТФ и 4% формалин, в термостат при 37<sup>0</sup>С. Затем проводили выделение единичных волокон камбаловидной, икроножной и передней большеберцовой мышцы.

Выделенные волокна окрашивали флуоресцентным агентом Fluo4-AM в соответствии с методикой Molecular probes (США). Волокна помещали на 15 минут в холодильник при +4<sup>0</sup>С, затем их трижды отмывали в фосфатном буфере с pH 7,0 (PBS – phosphate-borate buffer solution) по 1 минуте и далее окрашивали раствором Fluo4-AM при комнатной температуре в темноте, в течение 15 мин. После этого волокна снова трижды отмывали PBS по 5 минут в темноте, затем заключали в PBS и сразу же фотографировали флуоресцентной камерой Leica Digital. Анализ изображений проводили с помощью программного обеспечения Leica.

Статистическую обработку проводили с помощью Sigma Plot. Данные представляли в виде  $M \pm m$ , где  $M$  – среднее значение оцениваемой величины,  $m$  – стандартная ошибка среднего значения.

Для определения содержания цитоскелетных белков использовали **гель-электрофорез с последующим иммуоблоттингом** на нитроцеллюлозной мембране.

Выделение тотального белка проводили из замороженных образцов мышцы по стандартной методике (Остерман Л.А., 1981). Денатурирующий электрофорез в полиакриламидном геле проводили по методу Лэмли на системе Bio-Rad (США). Перенос на нитроцеллюлозную мембрану проводили по методу Н. Towbin et al. (1970). Для определения десмина и альфа-актина-1 в качестве первичных антител использовали специфические моноклональные антитела на основе иммуноглобулинов мыши (Sigma, Германия), в разведении 1:200 и 1:125 соответственно. В качестве вторичных антител использовали биотинилированные козы антитела против иммуноглобулинов мыши (Sigma, Германия) в разведении 1:6000. Далее мембраны обрабатывали раствором стрептавидина, конъюгированного с пероксидазой хрена (Sigma, Германия) в разведении 1:10000. Белковые полосы выявляли с помощью 3,3'-диаминобензида (Merck, США).

#### Экспериментальные подходы

С целью моделирования условий опорной разгрузки у грызунов проводилось **антиортостатическое вывешивание** их задних конечностей (рис. 3) по методу Ильина-Новикова в модификации Морей-Холтон (Morey-Holton E. et al., 2005). Длительность гравитационной разгрузки у крысы (масса животных 190 – 210 г) и монгольской песчанки (масса животных 40 – 50 г) составляла 1, 3, 7, 12 суток. В каждой группе было по 8 животных. Средние массы в группе животных каждого вида достоверно не отличались между собой.

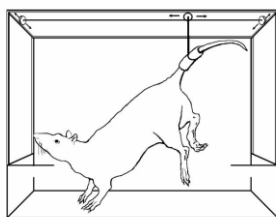


Рисунок 3. Модель антиортостатического вывешивания по методу Ильина-Новикова в модификации Морей-Холтон (Morey-Holton E. et al., 2005).

В качестве **специфического ингибитора кальциевых каналов L-типа** использовали производное 1,4-дигидропиридина – нифедипин в виде препарата «Коринфар». Препарат давали с водой в дозировке 10 мг в сутки на 1 кг веса животного. Введение препарата начинали за десять дней до эксперимента. Далее животные были разделены на три группы: «Контроль+нифедипин», вывешивание на фоне нифедипина «1-НС+нифедипин» и «3-НС+нифедипин». В каждой группе было по 8 животных, средние массы животных в группах достоверно не отличались между собой.

Все процедуры с животными были одобрены комиссией по биомедицинской этике Государственного научного центра Российской Федерации Института медико-биологических

проблем РАН. Процедуры экстирпации осуществляли под действием нембутала (в дозировке 10 мг/кг веса тела животного), а также усыпление животных путем его передозировки (100 мг/кг веса тела животного).

**Эксперимент «7-суточная «сухая» иммерсия» человека.** Эксперимент проводился в ГНЦ РФ – ИМБП РАН в 2008 году под руководством члена-корреспондента РАН И.Б. Козловской.

Исследования проводили с участием здоровых добровольцев-мужчин в возрасте 20 – 30 лет с массой тела 60 – 80 кг (12 человек). Испытуемый в течение 7 суток находился в условиях «сухой» иммерсии. Температуру водной среды поддерживали постоянной на уровне 33<sup>0</sup>С. Испытуемый был отделен от воды водонепроницаемой пленкой.

Испытуемые были разделены на 3 группы.

1). «7-НС (иммерсия)» – группа, находящаяся в условиях «чистой» иммерсии.

2). «7-НС+КОР» – группа иммерсионного воздействия вместе с применением компенсатора опорной разгрузки (КОР) (совместная разработка ГНЦ РФ – ИМБП РАН и ООО «Звезда»), который использовали для стимуляции опорных зон стоп. Действующим фактором КОР являются импульсы давления на тело, равные  $0,20 \pm 0,15$  кг/см<sup>2</sup>, в зонах скопления телец Фатер-Пачини. В комплект КОР входили пневмостельки, размещенные в фиксирующей обуви, которые и передают импульсы давления на тело. В иммерсии стимуляцию производили 6 раз по 20 мин в начале каждого часа в режимах: 10 мин стимуляции в режиме медленной ходьбы (75 шаг/мин) и 10 мин стимуляции в режиме быстрой ходьбы (120 шаг/мин) в течение 6 часов в дневное время суток.

3). «7-НС+ЭС» – группа иммерсионного воздействия с применением высокочастотной электромиостимуляции. Тренировочная программа состоит из изотонических сокращений четырехглавой мышцы бедра, трехглавой мышцы голени и передней большеберцовой мышцы в ответ на прямое электрическое раздражение. Макет стимулятора представляет собой источник переменного синусоидального тока звуковой (несущей) частоты 2000 Гц, заполняющего прямоугольные импульсы с частотой 50 Гц (полная амплитуда модуляции) длительностью 10 мс. Угол в коленном суставе составлял 180<sup>0</sup>, в голеностопном – около 130<sup>0</sup>. Тренировочная процедура состояла из 10 повторных стимуляций, каждая в режиме 10 секундной стимуляции и 50 секундного отдыха.

Для анализа состояния мышечной ткани m. soleus проводили пункционную биопсию по Бергстрему. Все испытуемые были предупреждены об условиях эксперимента и дали письменное информированное согласие на участие в нем в соответствии с Хельсинкской Декларацией и нормами российского и международного права. Методика проведения «сухой» иммерсии и все медицинские процедуры были одобрены комиссией по биомедицинской этике Государственного научного центра Российской Федерации – Института медико-биологических проблем РАН.

## Результаты экспериментов

### Анализ структуры поверхности

Сканирование поверхности мышечного волокна в норме с использованием атомной силовой микроскопии показало, что в районе Z-диска и M-линии имели место утолщения поверхности волокна, связанные, по-видимому, с формированием подмембранных структур между сарколеммой и сократительным аппаратом, однако в районе Z-линии оно более выражено (рис. 4). Такой вид поверхности мышечного волокна в районе Z-линии обусловлен наличием подмембранной структуры – костамера, который связывает между собой мембрану мышечного волокна и сократительный аппарат. Аналогично, можно полагать, что в районе M-линии также существует некая структура, связанная с мембраной и формирующая выпуклость, подобно костамеру в районе Z-линии.

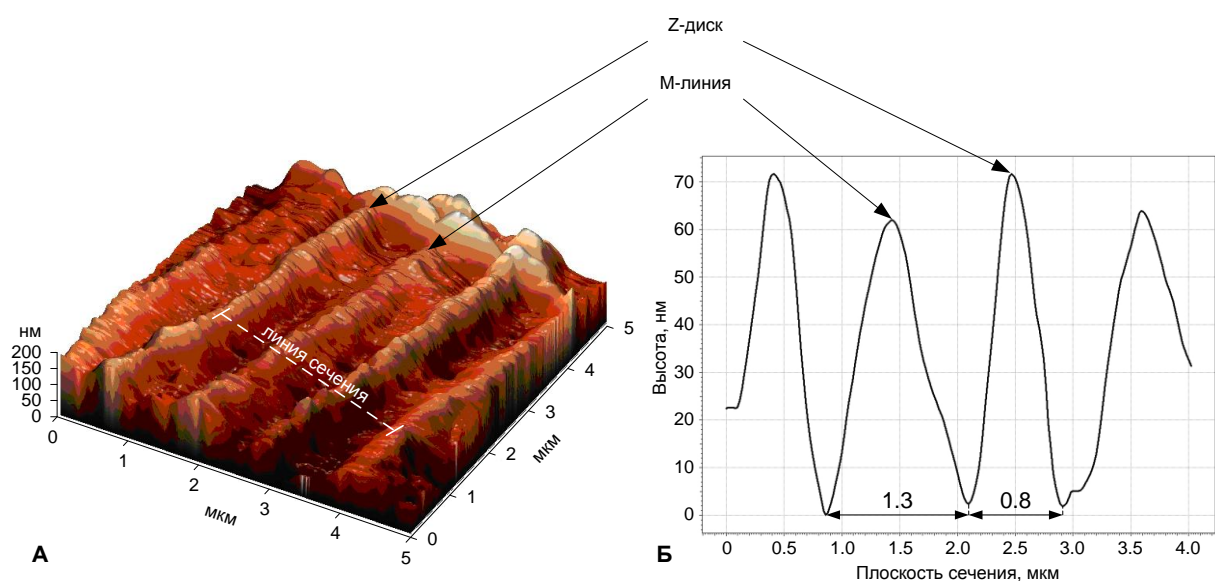


Рисунок 4. Поверхность глицеринизированного волокна камбаловидной мышцы крысы в расслабленном состоянии в норме. А – АСМ-изображение; Б – профиль высоты вдоль линии сечения. Наблюдались два пика, один из которых соответствовал А-полосе (1,3 мкм длиной) с M-линией посередине, а другой – I-полосе (0,8 мкм длиной) с Z-диском посередине.

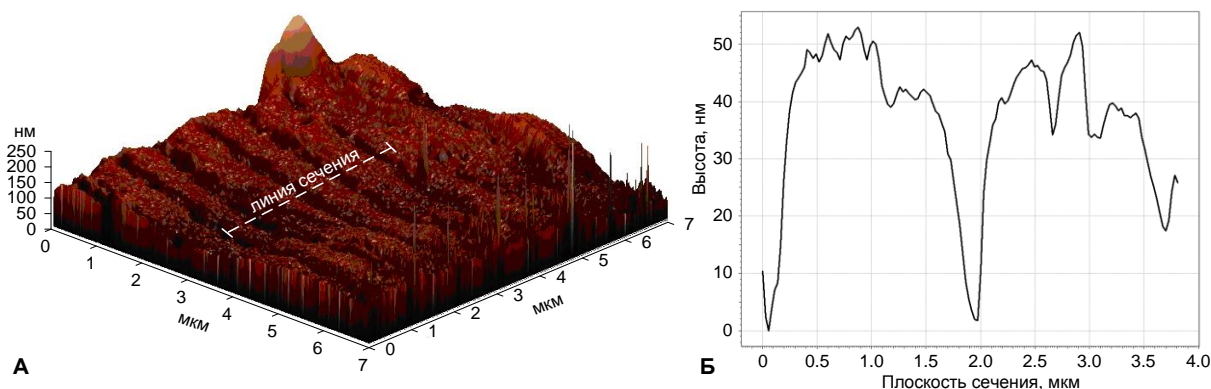


Рисунок 5. Поверхность демембранизированного волокна камбаловидной мышцы крысы в расслабленном состоянии в норме. А – АСМ-изображение; Б – профиль высоты вдоль линии сечения.

Подтверждением этого предположения служат данные, полученные на демембранизированном волокне, где Z-, M-линия и поверхность полусаркомера практически не отличимы друг от друга по высоте (рис. 5).

АСМ-изображения мышечных волокон в активированном состоянии значительно отличаются от таковых в стадии расслабления. Так, сечение профиля высоты (рис. 6) показывает большую относительную исчерченность поверхности, что может свидетельствовать о происходящих перестройках не только сократительного аппарата, но и внесаркомерного цитоскелета.

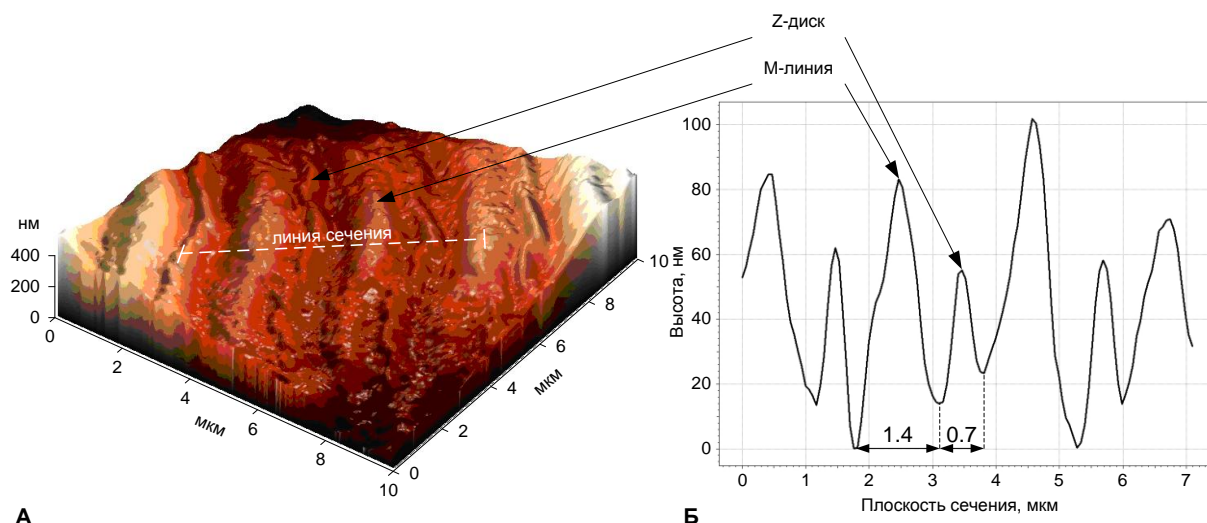


Рисунок 6. Поверхность глицеринизированного волокна камбаловидной мышцы крысы в активированном ( $pCa=4,2$ ) состоянии в норме. А – АСМ-изображение; Б – профиль высоты вдоль линии сечения.

### Поперечная жесткость

Поперечная жесткость была измерена в жидкости для различных участков волокон с проницаемой сарколеммой (рис. 7, А) и демембранизированных волокон (рис. 7, Б) в расслабленном, активированном кальцием ( $pCa\ 4,2$ ) и ригорном состояниях. Для всех исследованных мышц имело место увеличение поперечной жесткости демембранизированных волокон в ряду: середина полусаркомера – M-линия – Z-диск, а также в ряду: расслабленное состояние – активированное состояние – ригорное состояние.

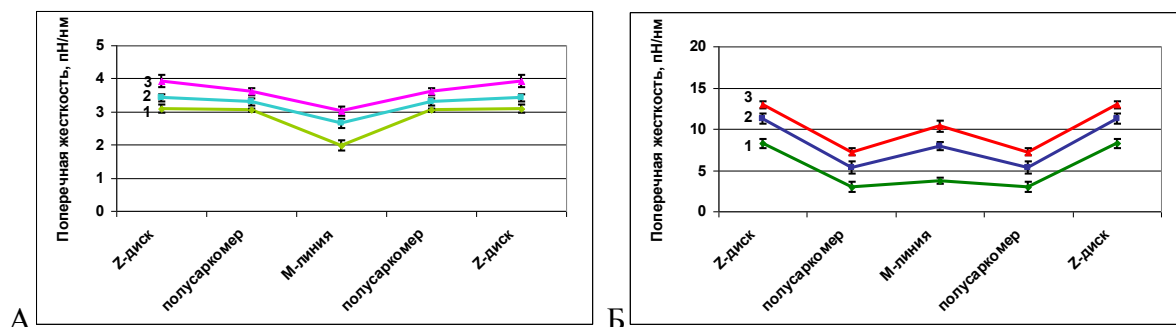


Рисунок 7. Поперечная жесткость различных участков волокон с проницаемой сарколеммой (А) и демембранизированных волокон (Б) камбаловидной мышцы крысы группы «Контроль», обработанных Triton-X100. Волокна находились в расслабленном (1), активированном кальцием ( $pCa=4,2$ , 2) или ригорном (3) состояниях.

### Демембранизированные волокна

Снижение поперечной жесткости середины полусаркомера демембранизированных расслабленных волокон камбаловидной мышцы крысы (рис. 8, А) отмечалось через 3 суток разгрузки, а в волокнах камбаловидной мышцы песчанки – через 7 суток. Имело место достоверное снижение жесткости во всех исследуемых состояниях относительно контроля. Аналогичные изменения жесткости наблюдали и в районе М-линии, и в области Z-диска, хотя изменения в Z-диске были наиболее выражены. Эти данные могли свидетельствовать о разрушении структуры сократительного аппарата и/или о снижении вероятности образования актин-миозиновых мостиков.

При этом иная динамика была характерна для волокон икроножной (рис. 8, Б) и передней большеберцовой (рис. 8, В) мышц. К первым суткам разгрузки поперечная жесткость расслабленных волокон этих мышц возрастала, а далее снижалась, хотя уровня контроля в передней большеберцовой мышце не достигала.

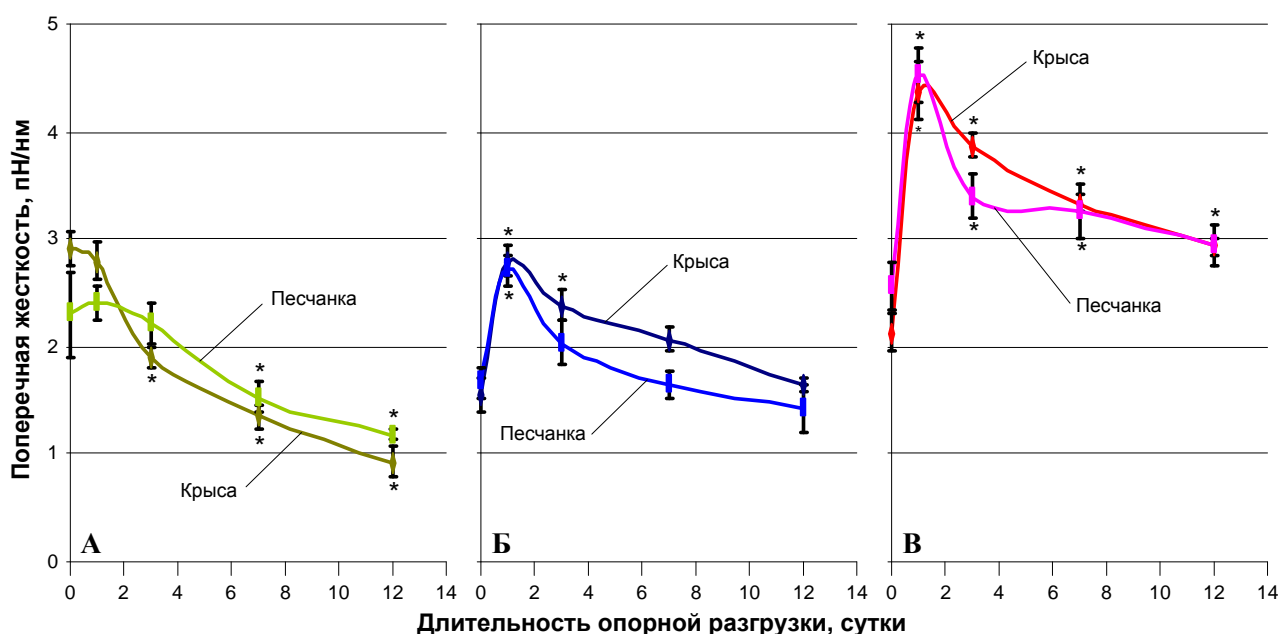


Рисунок 8. Изменения поперечной жесткости в области середины полусаркомера демембранизированных волокон в расслабленном состоянии различных мышц крысы и песчанки в условиях антиортостатического вывешивания различной длительности. А – камбаловидная мышца, Б – медиальная головка икроножной мышцы, В – передняя большеберцовая мышца. Здесь и далее: вертикальными отрезками показана ошибка среднего значения, \*  $p < 0,05$  по сравнению со значением в группе «Контроль».

### Волокна с проницаемой сарколеммой

Поперечная жесткость волокон с проницаемой сарколеммой камбаловидной, икроножной и передней большеберцовой мышц крысы и песчанки в области между проекциями Z-диска и М-линии снижалась уже через сутки опорной разгрузки (рис. 9). При этом при активации сокращения увеличения поперечной жесткости различных участков волокна камбаловидной мышцы в условиях 1-3-7 суточной разгрузки не наблюдали. К 12 суткам разгрузки увеличение жесткости волокна камбаловидной мышцы при его активации

или переходе в состояние ригора восстанавливалось до контрольных значений, хотя абсолютные значения жесткости в аналогичных состояниях в группе «Контроль» были достоверно выше. Для икроножной и передней большеберцовой мышц увеличение жесткости волокон с проницаемой мембраной при активации сокращения и переходе в ригорное состояние на протяжении всего периода антиортостатического вывешивания сохранялось таким же, как и в контрольной группе. Поскольку в сарколемме отсутствуют активные сократительные элементы, динамика изменения ее поперечной жесткости при активации сокращения и ригоризации могла быть связана с динамикой изменения белков, связывающих сарколемму и сократительный аппарат и, в первую очередь, с динамикой содержания десмина.

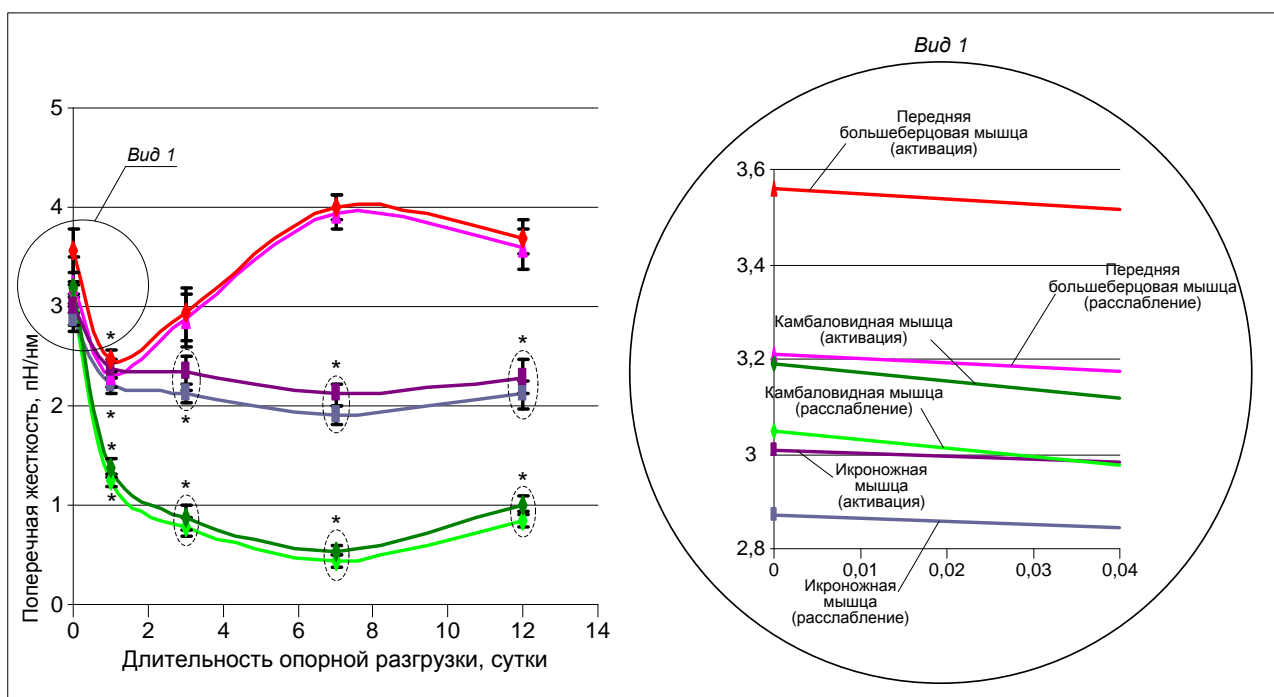


Рисунок 9. Динамика увеличения поперечной жесткости проекции середины полусаркомера при активации сокращения по сравнению с расслаблением волокон с проницаемой сарколеммой различных мышц крысы в условиях антиортостатического вывешивания различной длительности.

Поперечная жесткость проницаемых и демембранизированных волокон камбаловидной мышцы человека после 7-суточной «сухой» иммерсии в группе без применения контрмер изменялась аналогично изменениям, наблюдавшимся в мышце крысы и монгольской песчанки. Применение электростимуляции и компенсатора опорной разгрузки способствовало сохранению поперечной жесткости демембранизированных волокон на преиммерсионном уровне, в то время как жесткость проницаемых волокон снижалась.

Применение нифедипина в виде препарата «Коринфар» у крыс контрольной группы приводило к увеличению поперечной жесткости различных участков проницаемых и демембранизированных волокон. Динамика изменения жесткости во всех мышцах в ходе опорной разгрузки была аналогична таковой у крыс, которым не давали нифедипин. Однако



абсолютные значения жесткости после гравитационной разгрузки не отличались от значений у крыс контрольной группы, не получавших препарат.

Таким образом, в ходе проведенных экспериментов было показано, что поперечная жесткость сократительного аппарата волокон камбаловидной мышцы крысы, песчанки и человека снижалась в ходе опорной разгрузки, причем в области Z-диска это уменьшение было наиболее заметным. В то же время, жесткость сократительного аппарата икроножной мышцы грызунов практически не менялась, а передней большеберцовой даже росла с увеличением длительности вывешивания. Поперечная жесткость сарколеммы расслабленных волокон уменьшалась на ранних сроках гравитационной разгрузки вне зависимости от типа мышцы и объекта исследования. В то же время, динамика увеличения жесткости сарколеммы при активации была разной для камбаловидной и икроножной, а также передней большеберцовой мышц.

Вместе с тем, полученные данные, хотя и отражали количественные изменения структуры различных участков мышечного волокна (как саркомерного, так и внесаркомерного цитоскелета), не могли служить основой для выводов о деградации и/или усилении структуры в связи со сложностью объекта измерения и выбранного подхода на основе данных, полученных в расслабленном, активированном и ригор-состояниях. В связи с этим построение математической модели, позволяющей определить не поперечную жесткость, а модули упругости различных структур волокна, помогло сделать выводы об ее изменении в условиях опорной разгрузки.

### **Математическое моделирование экспериментов по измерению жесткости мышечных волокон**

Мышечное волокно представляет собой трехмерную механическую конструкцию. Основным объем волокна занимает сократительный аппарат, состоящий, в первую очередь, из вытянутых вдоль продольной оси актиновых и миозиновых нитей, взаимодействующих между собой. Кроме того, помимо поперечных мостиков, формирующихся между этими нитями в области полусаркомера при активации сокращения и ригоризации волокна, имеют место поперечные структуры, такие как Z-диск, разделяющие саркомеры. Иными словами, сократительный аппарат мышечного волокна можно представить в виде волокнистого композита с квазипериодической структурой, причем модули упругости компонентов этого композита в перпендикулярных направлениях существенно различны.

Определение модулей упругости по результатам, полученным при снятии силовых кривых с помощью атомного силового микроскопа, представляет собой нетривиальную задачу. Обычно их вычисляют по экспериментальным данным, используя различные модификации решения контактной задачи Герца. Задача Герца определяет зависимость силы, возникающей при сближении двух упругих тел, от величины их относительного

перемещения при вдавливании друг в друга. При этом предполагают, что форма недеформированного тела вблизи точки контакта хорошо аппроксимируется эллипсом. Задача о вдавливании эллипсоида в полупространство является частным случаем этой задачи, в котором радиус кривизны одного из тел намного больше, чем другого. Поскольку острие щупа атомного силового микроскопа имеет радиус кривизны порядка 10 нм, а характерный радиус мышечного волокна составляет 30–50 мкм, т.е. на три порядка больше, то такое приближение выполняется и для наших экспериментов.

При исследовании упругости мышечных волокон оценка модулей упругости волокна усложняется тем, что механические свойства его структур анизотропны, т.е. зависят от того, в каком направлении приложены нагрузки. Но наличие доминирующей оси в строении мышечного волокна позволяет считать его трансверсально изотропным, а также несжимаемым, поскольку коэффициент Пуассона для него обычно принимают равным 0.5 (Weisenhorn A.L. et al., 1993; Radmacher M. et al., 1996; Shin D., Athanasiou K., 1999; Mathur A.V. et al., 2001; Collinsworth A.M. et al., 2002).

**Точное решение задачи Герца для шарового жесткого штампа и трансверсально изотропного несжимаемого полупространства.** Точное решение задачи Герца для трансверсально-изотропного несжимаемого полупространства (Ватульян А.О., 1983; Ciavarella M. et al., 2002) выражает измеряемую жесткость волокна в виде эллиптических функций (функции Грина  $h(\theta)$ ), содержащих в качестве параметра отношение искомых модулей упругости:

$$\lambda = \left(\frac{3}{4}F\right)^{\frac{2}{3}} \left[ \left(1-e^2\right) \frac{\alpha^3}{\beta} \right]^{\frac{1}{3}} \left(\frac{1}{2R}\right)^{\frac{1}{3}}, \quad (1)$$

где  $\lambda$  – глубина продавливания,  $F$  – сжимающая сила,  $e$  – эксцентриситет контактного

эллипса,  $\alpha = \int_0^{\pi} \frac{h(\theta)}{\left(1-e^2 \cos^2(\theta)\right)^{\frac{1}{2}}} d\theta$ ,  $\beta = \left(1-e^2\right) \int_0^{\pi} \frac{h(\theta)}{\left(1-e^2 \cos^2(\theta)\right)^{\frac{3}{2}}} \sin^2 \theta d\theta$ ,  $h(\theta)$  –

функция Грина,  $\theta$  – угол, отсчитываемый от выбранного направления в плоскости контакта,  $R$  – радиус кантилевера.

Функция Грина задается следующим образом. Пусть  $\underline{t}$  – единичный вектор, перпендикулярный плоскости, ограничивающей анизотропное полупространство,  $\underline{m}$  и  $\underline{n}$  – два ортогональных единичных вектора, перпендикулярных  $\underline{t}$ . Таким образом,  $(\underline{m}, \underline{n}, \underline{t})$  образуют правую прямоугольную координатную систему (рис. 10, А). Пусть  $\psi$  – угол между  $\underline{m}$  и некоторым выбранным направлением  $\underline{y}$  в плоскости  $(\underline{m}, \underline{n})$ , перпендикулярной вектору  $\underline{t}$ .

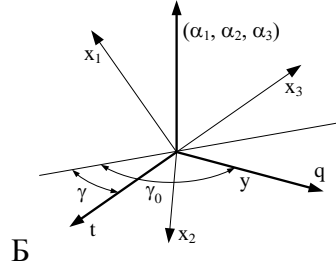
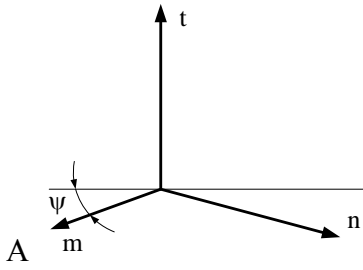


Рисунок 10. А – прямоугольная система координат  $(\underline{m}, \underline{n}, \underline{t})$  для упругого анизотропного полупространства; Б – схематическое представление векторов, определяющих функцию Грина анизотропного полупространства (Ciavarella M. et al., 2002).

Тогда, согласно Vlassak J.J., Nix W.D. (1994):

$$\frac{h(\theta)}{r} = \frac{1}{8\pi^2 |\underline{y}|} \left[ \alpha_k \underline{\underline{B}}_{km}^{-1} \left( \frac{\underline{y}}{|\underline{y}|} \right) \alpha_m \right], \quad (2)$$

где  $(\alpha_1, \alpha_2, \alpha_3)$  – направляющие косинусы между выбранным направлением  $\underline{y}$  в плоскости поверхности и нормалью к этой поверхности (рис. 10, Б), а матрица  $\underline{\underline{B}}$  может быть найдена из следующего выражения:

$$\underline{\underline{B}}_{js}(t) = \underline{\underline{B}}_{sj}(t) = \frac{1}{8\pi^2} \int_0^{2\pi} \left\{ (\underline{mm})_{js} - (\underline{mn})_{jk} (\underline{nn})_{kr}^{-1} (\underline{nm})_{rs} \right\} d\psi, \quad (3)$$

где  $(ab)_{js} = a_k A^{kjsl} b_l$  (как обычно, подразумевается суммирование по повторяющимся индексам),  $A^{kjsl}$  – модули упругости.

Несмотря на существование точного решения подобной задачи Герца (формулы (1-3)), для анализа результатов наших экспериментов его применение оказывается непрактичным. Поскольку перед нами стоит обратная задача, а именно, оценка модулей упругости по измерениям жесткости, намного удобнее получить пусть приближенное, но явное выражение жесткости волокна при АСМ-измерениях через модули упругости.

Для этого сначала определим, какие именно модули упругости характеризуют сократительный аппарат мышечного волокна.

**Строение саркомера и модель его упругих свойств в различных состояниях.** При образовании актин-миозиновых поперечных мостиков, в частности, при активном сокращении, иницированном ионами кальция, или в состоянии ригора, то есть в отсутствие АТФ, упругие характеристики саркомеров меняются, что связано с изменением структуры сократительного аппарата.

Введем систему декартовых координат,  $(x_1, x_2, x_3)$ , где ось  $x_3$  направлена вдоль осей толстых и тонких филаментов саркомера, а ось  $x_1$  – перпендикулярна поверхности волокна (рис. 11). Именно вдоль этой оси происходит вдавливание кантилевера АСМ в волокно.

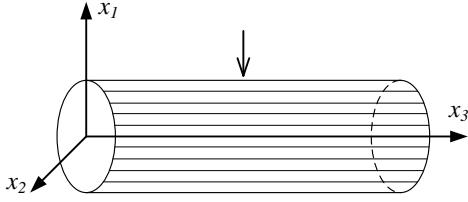


Рисунок 11. Прямоугольная система координат для мышечного волокна

В общем случае закон Гука имеет следующий вид:

$$\underline{\underline{A}} = \frac{\partial^2 \Pi}{\partial \underline{\underline{\varepsilon}}^2} = A^{ijkl} \underline{r}_i \underline{r}_j \underline{r}_k \underline{r}_l, \quad (4)$$

где  $\underline{\underline{A}}$  – тензор упругости четвертого ранга,  $\Pi$  – потенциальная энергия,  $\underline{\underline{\varepsilon}}$  – вектор деформации,  $\underline{r}_i \underline{r}_j \underline{r}_k \underline{r}_l$  – орты базиса.

Симметрия тензора модулей упругости  $A^{ijkl}$  снижает число независимых компонент с 81 до 21. Во введенной декартовой системе  $(x_1, x_2, x_3)$  имеем следующее представление энергии, расписывая формулу (4) в компонентах:

$$\begin{aligned} 2\Pi = & A_{1111}\varepsilon_{11}^2 + A_{2222}\varepsilon_{22}^2 + A_{3333}\varepsilon_{33}^2 + A_{1212}\varepsilon_{12}^2 + A_{1313}\varepsilon_{13}^2 + A_{2323}\varepsilon_{23}^2 + \\ & + 2(A_{1122}\varepsilon_{11}\varepsilon_{22} + A_{1133}\varepsilon_{11}\varepsilon_{33} + A_{1112}\varepsilon_{11}\varepsilon_{12} + A_{1113}\varepsilon_{11}\varepsilon_{13} + A_{1123}\varepsilon_{11}\varepsilon_{23}) + \\ & + 2(A_{2233}\varepsilon_{22}\varepsilon_{33} + A_{2212}\varepsilon_{22}\varepsilon_{12} + A_{2213}\varepsilon_{22}\varepsilon_{13} + A_{2223}\varepsilon_{22}\varepsilon_{23}) + \\ & + 2(A_{3312}\varepsilon_{33}\varepsilon_{12} + A_{3313}\varepsilon_{33}\varepsilon_{13} + A_{3323}\varepsilon_{33}\varepsilon_{23}) + \\ & + 2(A_{1213}\varepsilon_{12}\varepsilon_{13} + A_{1223}\varepsilon_{12}\varepsilon_{23}) + \\ & + 2A_{1323}\varepsilon_{13}\varepsilon_{23} \end{aligned} \quad (5)$$

Трансверсально-изотропный материал имеет 2 плоскости симметрии упругих свойств. Во-первых,  $x_3 = const$  и при этом  $\Pi$  не должна меняться при замене знаков сдвиговых деформаций  $\varepsilon_{31}$  и  $\varepsilon_{32}$  на противоположные. Тогда:

$$A_{1113} = A_{1123} = A_{2213} = A_{2223} = A_{3313} = A_{3323} = A_{1213} = A_{1223} = 0. \quad (6)$$

Во-вторых,  $x_2 = const$  и при этом  $\Pi$  не должна быть чувствительна к знаку  $\varepsilon_{21}$  и  $\varepsilon_{23}$ . Следовательно:

$$A_{1112} = A_{2212} = A_{3312} = A_{1323} = 0. \quad (7)$$

Учитывая (6) и (7), получаем, что потенциальная энергия зависит от 9 независимых констант:

$$\begin{aligned} 2\Pi = & A_{1111}\varepsilon_{11}^2 + A_{2222}\varepsilon_{22}^2 + A_{3333}\varepsilon_{33}^2 + A_{1212}\varepsilon_{12}^2 + A_{1313}\varepsilon_{13}^2 + A_{2323}\varepsilon_{23}^2 + \\ & + 2A_{1122}\varepsilon_{11}\varepsilon_{22} + 2A_{1133}\varepsilon_{11}\varepsilon_{33} + 2A_{2233}\varepsilon_{22}\varepsilon_{33} \end{aligned} \quad (8)$$

Однако, помимо указанных плоскостей симметрии, трансверсально-изотропный материал характеризуется осью анизотропии. В рассматриваемом случае – это ось  $x_3$ . Тогда  $\Pi$  не меняется при любом повороте  $\underline{\underline{\varepsilon}}$  вокруг оси  $x_3$ . При малом повороте с вектором  $\underline{\underline{\delta\omega}}$ , направленным по оси  $x_3$ , вариация  $\delta\underline{\underline{\varepsilon}}$  имеет вид:

$$\underline{\delta \varepsilon} = \underline{\delta \omega} \times \underline{\varepsilon} - \underline{\varepsilon} \times \underline{\delta \omega} = \underline{k} \times \underline{\varepsilon} - \underline{\varepsilon} \times \underline{k}. \quad (9)$$

Тогда, учитывая (9):

$$\frac{\partial \Pi}{\partial \underline{\varepsilon}} \cdot \underline{\delta \varepsilon} = 0 \Rightarrow \frac{\partial \Pi}{\partial \underline{\varepsilon}} \cdot (\underline{k} \times \underline{\varepsilon} - \underline{\varepsilon} \times \underline{k}) = 0. \quad (10)$$

Распишем равенство (10) в компонентах и учтем, что оно должно выполняться при любых деформациях:

$$\begin{aligned} \frac{\partial \Pi}{\partial \varepsilon_{11}} (-2\varepsilon_{12}) + \frac{\partial \Pi}{\partial \varepsilon_{22}} (2\varepsilon_{12}) + \frac{\partial \Pi}{\partial \varepsilon_{12}} (-\varepsilon_{22} + \varepsilon_{11}) + \frac{\partial \Pi}{\partial \varepsilon_{13}} (-\varepsilon_{23}) + \frac{\partial \Pi}{\partial \varepsilon_{23}} (\varepsilon_{13}) &= 0, \\ \Downarrow \\ (A_{1111}\varepsilon_{11} + A_{1122}\varepsilon_{22} + A_{1133}\varepsilon_{33})(-2\varepsilon_{12}) + (A_{1122}\varepsilon_{11} + A_{2222}\varepsilon_{22} + A_{2233}\varepsilon_{33})(2\varepsilon_{12}) + \\ + A_{1212}\varepsilon_{12}(-\varepsilon_{22} + \varepsilon_{11}) + A_{1313}(-\varepsilon_{23}) + A_{2323}(\varepsilon_{13}) &= 0, \\ \Downarrow \\ A_{1313} = A_{2323}, A_{2233} = A_{1133}, A_{2222} = A_{1111}, A_{1122} = A_{1111} - \frac{1}{2}A_{1212}. \end{aligned} \quad (11)$$

Таким образом, подставляя соотношения (11) в (8), получим, что в общем случае трансверсально-изотропный материал характеризуется 5 упругими константами, а энергия имеет вид:

$$\begin{aligned} \Pi = \frac{1}{2}A_{1111}(\varepsilon_{11}^2 + \varepsilon_{22}^2) + \frac{1}{2}A_{3333}\varepsilon_{33}^2 + \frac{1}{2}A_{1212}\varepsilon_{12}^2 + \frac{1}{2}A_{2323}(\varepsilon_{13}^2 + \varepsilon_{23}^2) + \\ + \left(A_{1111} - \frac{1}{2}A_{1212}\right)\varepsilon_{11}\varepsilon_{22} + A_{1133}(\varepsilon_{11} + \varepsilon_{22})\varepsilon_{33} \end{aligned} \quad (12)$$

Компоненты тензора напряжения имеют вид:

$$\begin{aligned} \sigma_{11} &= A_{1111}\varepsilon_{11} + \left(A_{1111} - \frac{1}{2}A_{1212}\right)\varepsilon_{22} + A_{1133}\varepsilon_{33}, \\ \sigma_{22} &= \left(A_{1111} - \frac{1}{2}A_{1212}\right)\varepsilon_{11} + A_{1111}\varepsilon_{22} + A_{1133}\varepsilon_{33}, \\ \sigma_{33} &= A_{1133}\varepsilon_{11} + A_{1133}\varepsilon_{22} + A_{3333}\varepsilon_{33}, \\ \tau_{12} &= A_{1212}\varepsilon_{12}, \quad \tau_{13} = A_{2323}\varepsilon_{13}, \quad \tau_{23} = A_{2323}\varepsilon_{23}. \end{aligned} \quad (13)$$

Для несжимаемого материала остаются только 3 независимые константы:

$$A_{1133} = \frac{1}{2}A_{1212} - 2A_{1111}, \quad A_{3333} = -2A_{1133} \quad \text{или} \quad A_{1111} = \frac{1}{4}(A_{3333} + A_{1212}). \quad (14)$$

Введем следующие обозначения:

$$\begin{aligned} A_{3333} &= \mu_E - \text{модуль растяжения сжатия в плоскости Z-диска,} \\ A_{1212} &= \mu_L - \text{модуль сдвига в плоскости Z-диска,} \\ A_{2323} &= \mu_M - \text{модуль сдвига по оси анизотропии волокна.} \end{aligned} \quad (15)$$

Учитывая (15), из (14) получим:

$$A_{1111} = \frac{1}{4}(\mu_E + \mu_L), \quad A_{1133} = -\frac{1}{2}\mu_E.$$

Необходимо ввести условие положительной определенности упругой энергии  $\sigma^{ij}\varepsilon_{ij} > 0$  для обеспечения положительности модулей сдвига  $A_{1212}$  и т.д., то есть  $\mu_E, \mu_M, \mu_L > 0$ . В каждой точке измерения имеем 3 модуля упругости в 3 различных состояниях, всего 27 (таблица 1).

Таблица 1. Модули упругости, характеризующие механические свойства саркомера.

Область \ Состояние	Расслабление			Активация			Ригор		
	$\mu_{E1}^1$	$\mu_{M1}^1$	$\mu_{L1}^1$	$\mu_{E1}^2$	$\mu_{M1}^2$	$\mu_{L1}^2$	$\mu_{E1}^3$	$\mu_{M1}^3$	$\mu_{L1}^3$
Полусаркомер	$\mu_{E1}^1$	$\mu_{M1}^1$	$\mu_{L1}^1$	$\mu_{E1}^2$	$\mu_{M1}^2$	$\mu_{L1}^2$	$\mu_{E1}^3$	$\mu_{M1}^3$	$\mu_{L1}^3$
М-линия	$\mu_{E2}^1$	$\mu_{M2}^1$	$\mu_{L2}^1$	$\mu_{E2}^2$	$\mu_{M2}^2$	$\mu_{L2}^2$	$\mu_{E2}^3$	$\mu_{M2}^3$	$\mu_{L2}^3$
Z-диск	$\mu_{E3}^1$	$\mu_{M3}^1$	$\mu_{L3}^1$	$\mu_{E3}^2$	$\mu_{M3}^2$	$\mu_{L3}^2$	$\mu_{E3}^3$	$\mu_{M3}^3$	$\mu_{L3}^3$

С другой стороны, строение саркомера и свойства белковых структур, определяющих его механические свойства, позволяют ввести дополнительные упрощающие предположения, которые уменьшают число независимых упругих постоянных, подлежащих определению из экспериментальных данных.

Растяжимость толстых (миозиновых) нитей очень мала и не превосходит 0,2% под действием максимального изометрического растягивающего напряжения (Huxley H. et al., 2006; Linari M. et al., 1998, 2007). Таким образом, можно предполагать, что в области Z-линии и между нею и М-полосой модуль упругости  $A_{3333} \equiv \mu_E$ , и, во-первых, совпадает  $\mu_{E3} = \mu_{E1} = \mu_E$ , а во-вторых, намного больше других упругих постоянных  $\mu_E \gg \mu_{L1}, \mu_{L3}, \mu_{M1}, \mu_{M3}$ . Это означает, что в этих участках мышечного волокна упругая реакция на внедрение кантилевера АСМ определяется лишь двумя упругими константами,  $\mu_L$  и  $\mu_M$ , каждая из которых, однако, меняется в зависимости от функционального состояния: расслабление, изометрическое сокращение, ригор.

Сравнивая упругие свойства мышечных волокон в области М-полосы и в середине полусаркомера в состояниях расслабления, активного сокращения и ригора, можно оценить относительный вклад белков М-полосы и миозиновых мостиков в сопротивление сдвиговым деформациям  $\varepsilon_{12}$ ,  $\varepsilon_{13}$  и поперечному сжатию  $\varepsilon_{11}$ . Вклад свойств белков М-полосы будет более значительным в ее проекции, чем в середине полусаркомера, особенно в расслабленной мышце. Иначе говоря,  $\mu_{M1} = \mu_{M2} = \mu_M$ .

С другой стороны, тонкие актиновые нити намного более гибкие, чем толстые. Их среднеквадратичный радиус кривизны при изгибании в результате теплового движения порядка 1 мкм (Isambert H. et al., 1995). Поэтому можно считать, что в области Z-линии или, точнее, I-полосы, где они не взаимодействуют с миозиновыми мостиками, эти нити не оказывают сопротивления деформациям в плоскости  $(x_1, x_2)$ . Это означает, что в области Z-диска одна из трех упругих констант,  $\mu_L$ , полностью определяется свойствами самой Z-линии и поэтому не зависит от состояния волокна, то есть  $\mu_{L3}^1 = \mu_{L3}^2 = \mu_{L3}^3 = \mu_{L3}$ .

В состоянии ригора все миозиновые головки в области перекрытия тонких и толстых нитей в саркомерах прочно присоединены к актину, а актиновые нити натянуты. Поскольку растяжимость актиновых нитей, так же как и миозиновых, под действием растягивающей силы мала (Linari M. et al., 1998, 2007), то можно считать, что в этом состоянии модуль сдвига  $\mu_L$  одинаков во всех трех исследованных участках волокна: в проекциях Z- и M-линий и середине полусаркомера  $\mu_{L1}^3 = \mu_{L2}^3 = \mu_{L3}^3 = \mu_L^3$ . Учитывая, что для Z-диска  $\mu_{L3}^1 = \mu_{L3}^2 = \mu_{L3}^3 = \mu_{L3}$ , получим, что  $\mu_{L3} = \mu_L^3 = \mu_L$ .

**Приближенное решение задачи Герца для кантилевера АСМ и мышечного волокна.** Определив количество модулей упругости, характеризующих саркомер, можно их выразить через измеряемую локальную поперечную жесткость, используя приближенное решение задачи Герца для жесткого шарового штампа и трансверсально-изотропного несжимаемого полупространства.

В работе Ciavarella M. et al. (2002) было показано, что замена функции Грина  $h(\theta)$  в точном решении задачи Герца (1–3) о внедрении жесткого шарового штампа в анизотропное полупространство на ее среднее, «квазиизотропное» значение  $h_0$  приводит к менее чем 4% ошибкам вычисления жесткости, даже если модули упругости, характеризующие растяжимость нитей в двух перпендикулярных направлениях, различаются более чем на порядок.

В работе Delafargue A., Ulm F.-J. (2004) были получены значения функции Грина для двух значений угла  $\theta$ , отсчитываемого от направления оси  $x_3$ :

$$h_2 = h(\theta = 0) = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{A_{3333}}{A_{1111}A_{3333} - A_{1133}^2} \left( \frac{1}{A_{2323}} + \frac{2}{\sqrt{A_{1111}A_{3333} + A_{1133}}} \right)}; \quad (16)$$

$$h_3 = h\left(\theta = \frac{\pi}{2}\right) = \frac{1}{\pi} \frac{A_{1111}}{A_{1111}^2 - A_{1122}^2}. \quad (17)$$

Поскольку, согласно тем же авторам (Delafargue A., Ulm F.-J., 2004), одно из этих значений соответствует максимуму, а другое – минимуму функции  $h(\theta)$ , то хорошим приближением для среднего, независящего от угла значения будет выражение:

$$h_0 = \frac{h_2 + h_3}{2}. \quad (18)$$

Поскольку функция Грина имеет период  $\pi$  и является четной, то такое приближение соответствует первому приближению при разложении функции  $h(\theta)$  в ряд Фурье:  $h(\theta) = h_0 + h_c \cos 2\theta + \dots$

В сделанных нами обозначениях (15), получим, что (16–17) имеют вид:

$$h_2 = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{4}{\mu_L} \left( \frac{1}{\mu_M} + \frac{4}{\mu_E \left( \sqrt{1 + \frac{\mu_L}{\mu_E}} - 1 \right)} \right)}; \quad h_3 = \frac{1}{\pi} \frac{\mu_E + \mu_L}{\mu_E \mu_L}. \quad (19)$$

Следовательно, учитывая (19), получим, что (18) имеет вид:

$$h_0 = \frac{1}{4\pi} \left[ \sqrt{\frac{4}{\mu_L} \left( \frac{1}{\mu_M} + \frac{4}{\mu_E \left( \sqrt{1 + \frac{\mu_L}{\mu_E}} - 1 \right)} \right)} + 2 \frac{1 + \frac{\mu_L}{\mu_E}}{\mu_L} \right]. \quad (20)$$

Связь сжимающей силы  $F$  и глубины продавливания  $\lambda$  шарового штампа (в данном случае – кантилевера АСМ) радиуса  $R$ , отсчитываемой от точки касания, связаны соотношением (Ciavarella M. et al., 2002):

$$16\lambda^3 R = 9\pi^2 F^2 h_0^2 \Rightarrow h_0 = \frac{4\sqrt{\lambda R}}{3\pi k_{\perp}}, \quad (21)$$

где  $h_0$  – первый член разложения функции  $h(\theta)$  в ряд Фурье,  $k_{\perp}$  – поперечная жесткость.

Сравнивая (20) и (21), имеем:

$$\sqrt{\frac{1}{\mu_L} \left( \frac{1}{\mu_M} + \frac{4}{\mu_E \left( \sqrt{1 + \frac{\mu_L}{\mu_E}} - 1 \right)} \right)} + \frac{1 + \frac{\mu_L}{\mu_E}}{\mu_L} = \frac{8\sqrt{\lambda R}}{3k_{\perp}}. \quad (22)$$

Именно это выражение было использовано для анализа наших экспериментальных данных.

Отметим, что в области Z-линии и середины саркомера, где  $A_{3333}$  значительно превосходит остальные упругие постоянные ( $\mu_E \gg \mu_L, \mu_M$  в каждом состоянии), будет выполняться приближенное соотношение:

$$\sqrt{\frac{1}{\mu_L} \left( \frac{1}{\mu_M} + \frac{4}{\mu_L} \right)} + \frac{1}{\mu_L} = \frac{8\sqrt{\lambda R}}{3k_{\perp}} \quad \text{или} \quad \frac{1}{\mu_L} \left( 1 + \sqrt{4 + \frac{\mu_L}{\mu_M}} \right) = \frac{8\sqrt{\lambda R}}{3k_{\perp}}. \quad (23)$$



Имеем следующую систему уравнений для определения упругих констант в области полусаркомера (24–26), М-линии (27–29) и Z-диска (30–32):

$$\frac{1}{\mu_{L1}} \left( 1 + \sqrt{4 + \frac{\mu_{L1}^1}{\mu_M^1}} \right) = \frac{8\sqrt{\lambda R}}{3k_{\perp 1}^1}; \quad \frac{1}{\mu_{L1}^2} \left( 1 + \sqrt{4 + \frac{\mu_{L1}^2}{\mu_M^2}} \right) = \frac{8\sqrt{\lambda R}}{3k_{\perp 1}^2}; \quad \frac{1}{\mu_L} \left( 1 + \sqrt{4 + \frac{\mu_L}{\mu_M^3}} \right) = \frac{8\sqrt{\lambda R}}{3k_{\perp 1}^3} \quad (24-26)$$

$$\sqrt{\frac{1}{\mu_{L2}} \left( \frac{1}{\mu_M^1} + \frac{4}{\mu_{E2}^1 \left( \sqrt{1 + \frac{\mu_{L2}^1}{\mu_{E2}^1}} - 1 \right)} \right)} + \frac{1 + \frac{\mu_{L2}^1}{\mu_{E2}^1}}{\mu_{L2}^1} = \frac{8\sqrt{\lambda R}}{3k_{\perp 2}^1}; \quad (27)$$

$$\sqrt{\frac{1}{\mu_{L2}^2} \left( \frac{1}{\mu_M^2} + \frac{4}{\mu_{E2}^2 \left( \sqrt{1 + \frac{\mu_{L2}^2}{\mu_{E2}^2}} - 1 \right)} \right)} + \frac{1 + \frac{\mu_{L2}^2}{\mu_{E2}^2}}{\mu_{L2}^2} = \frac{8\sqrt{\lambda R}}{3k_{\perp 2}^2}; \quad (28)$$

$$\sqrt{\frac{1}{\mu_L} \left( \frac{1}{\mu_M^3} + \frac{4}{\mu_{E2}^3 \left( \sqrt{1 + \frac{\mu_L}{\mu_{E2}^3}} - 1 \right)} \right)} + \frac{1 + \frac{\mu_L}{\mu_{E2}^3}}{\mu_L} = \frac{8\sqrt{\lambda R}}{3k_{\perp 2}^3}; \quad (29)$$

$$\frac{1}{\mu_L} \left( 1 + \sqrt{4 + \frac{\mu_L}{\mu_{M3}^1}} \right) = \frac{8\sqrt{\lambda R}}{3k_{\perp 3}^1}; \quad \frac{1}{\mu_L} \left( 1 + \sqrt{4 + \frac{\mu_L}{\mu_{M3}^2}} \right) = \frac{8\sqrt{\lambda R}}{3k_{\perp 3}^2}; \quad \frac{1}{\mu_L} \left( 1 + \sqrt{4 + \frac{\mu_L}{\mu_{M3}^3}} \right) = \frac{8\sqrt{\lambda R}}{3k_{\perp 3}^3}. \quad (30-32)$$

Полученные соотношения (24–32) дают возможность определить, в результате изменения каких именно модулей упругости изменилась поперечная жесткость, измеряемая с помощью атомной силовой микроскопии. Определение этих модулей упругости дает возможность судить об изменениях в различных условиях в структуре сократительного аппарата мышечного волокна (рис. 12).

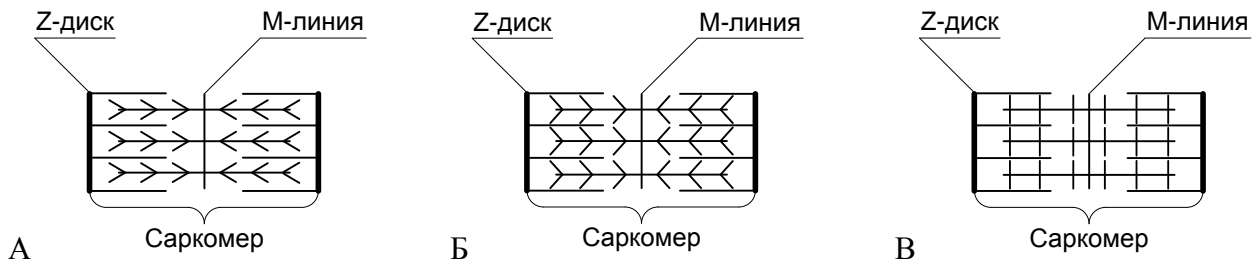


Рисунок 12. Схематическое строение саркомера в расслабленном (А), активированном кальцием (Б) и ригорном (В) состояниях.

Поперечная жесткость Z-диска в расслабленном состоянии  $k_{\perp 3}^1$ , согласно (30), определяется модулем сдвига в поперечной плоскости  $\mu_L$  и модулем сдвига по оси анизотропии волокна  $\mu_{M3}^1$ . При активации сокращения и ригоризации волокна модуль упругости  $\mu_L$  Z-диска не меняется, поэтому, согласно (31) и (32), изменение поперечной жесткости связано только с изменением модуля сдвига по оси волокна  $\mu_{M3}$ . В свою очередь, изменение модуля сдвига  $\mu_{M3}$  Z-диска, по-видимому, является вторичным процессом, обусловленным увеличением в области полусаркомера числа замкнутых мостиков при сокращении и ригоризации, а также изменением их структуры при переходе в ригор по сравнению с сокращением. Такое представление (формулы (30–32)) о вкладе различных модулей упругости в измеряемую жесткость Z-диска свидетельствует о том, что измерения в этом участке характеризуют качество конструкции, и позволяет заключить, что снижение поперечной жесткости Z-диска в условиях опорной разгрузки, например, отмечавшееся для волокон камбаловидной мышцы, не зависело от изменения вероятности замыкания поперечных мостиков в области полусаркомера, а было обусловлено разрушением его структуры и снижением модулей сдвига в расслабленном состоянии, согласно (30).

В области полусаркомера (между Z-диском и M-линией) модуль сдвига в поперечной плоскости  $\mu_{L1}$  и модуль сдвига по оси волокна  $\mu_{M1}$  сопоставимы и зависят от количества замкнутых мостиков. Поэтому измерения поперечной жесткости этого участка саркомера  $k_{\perp 1}$  в различных состояниях механического напряжения (расслабление, активация и ригор) позволяют разделить вклад целостности структуры и количества замкнутых мостиков. В расслабленном состоянии поперечная жесткость  $k_{\perp 1}^1$ , согласно (24), определяется значениями  $\mu_{L1}^1$  и  $\mu_{M1}^1$ , которые в этом случае отражают целостность белковых структур, формирующих полусаркомер. В активированном состоянии поперечная жесткость  $k_{\perp 1}^2$ , согласно (25), зависит от тех же модулей упругости, но их значения в этом случае определяются числом замкнутых поперечных мостиков. В состоянии ригора замкнуты практически все поперечные мостики, в отличие от активированного состояния. Таким образом, в результате проведенного анализа влияния различных модулей упругости на измеряемую поперечную жесткость в области полусаркомера, можно заключить, что, в частности, для камбаловидной мышцы на ранних этапах опорной разгрузки в области полусаркомера имевшее место снижение поперечной жесткости было обусловлено, согласно (25), уменьшением модулей сдвига  $\mu_{M1}^2$  и  $\mu_{L1}^2$  в активированном состоянии по сравнению с контролем, что свидетельствовало о снижении вероятности образования поперечных

мостиков. Далее в ходе опорной разгрузки отмечавшееся снижение поперечной жесткости произошло, согласно (24), в результате снижения модулей сдвига и в расслабленном состоянии вследствие разрушения белковых структур, формирующих полусаркомер.

В середине саркомера, то есть в области М-линии, поперечная жесткость в расслабленном состоянии зависит не только от модулей сдвига  $\mu_{M2}$  и  $\mu_{L2}$ , но и от модуля растяжения-сжатия в поперечной плоскости  $\mu_{E2}$ , согласно (27–29). Так же как и для области полусаркомера, поперечная жесткость в расслабленном состоянии отражает целостность белковых структур, формирующих М-линию. При изменении механического напряжения волокна при активации сокращения и ригоризации, согласно (28) и (29) соответственно, меняется и  $\mu_{E2}$ , что так же, как и для Z-диска, обусловлено вторичным влиянием изменения структуры в области полусаркомера.

### Сравнение изменений содержания десмина, альфа-актинина-1 и ионов кальция в различных мышцах различных животных и человека в условиях опорной разгрузки

В камбаловидной мышце как крысы, так и монгольской песчанки содержание десмина (рис. 13, А) повторяло динамику изменения поперечной жесткости сарколеммы при активации сокращения и ригоризации волокна: начинало снижаться уже через сутки опорной разгрузки и возвращалось к уровню контроля к 7 суткам вывешивания у песчанки и к 12 суткам разгрузки – у крысы.

В то же время содержание альфа-актинина-1 в камбаловидной мышце через сутки разгрузки достоверно увеличивалось (рис. 13, А), наряду с базальным содержанием ионов кальция (рис. 13, Б).

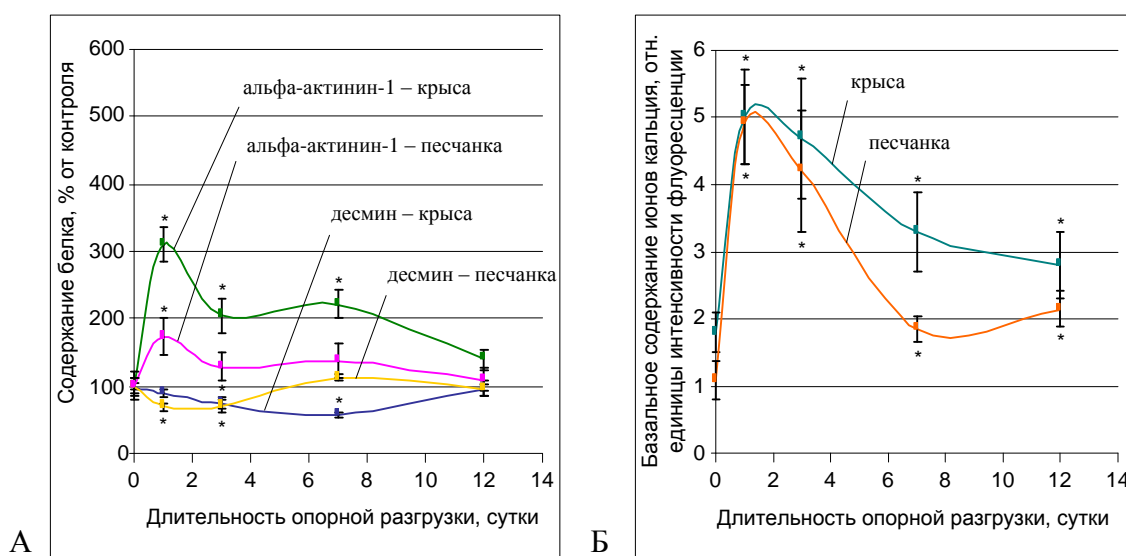


Рисунок 13. Содержание белков (А) и базальное содержание ионов кальция (Б) в камбаловидной мышце крысы и монгольской песчанки на разных сроках опорной разгрузки.

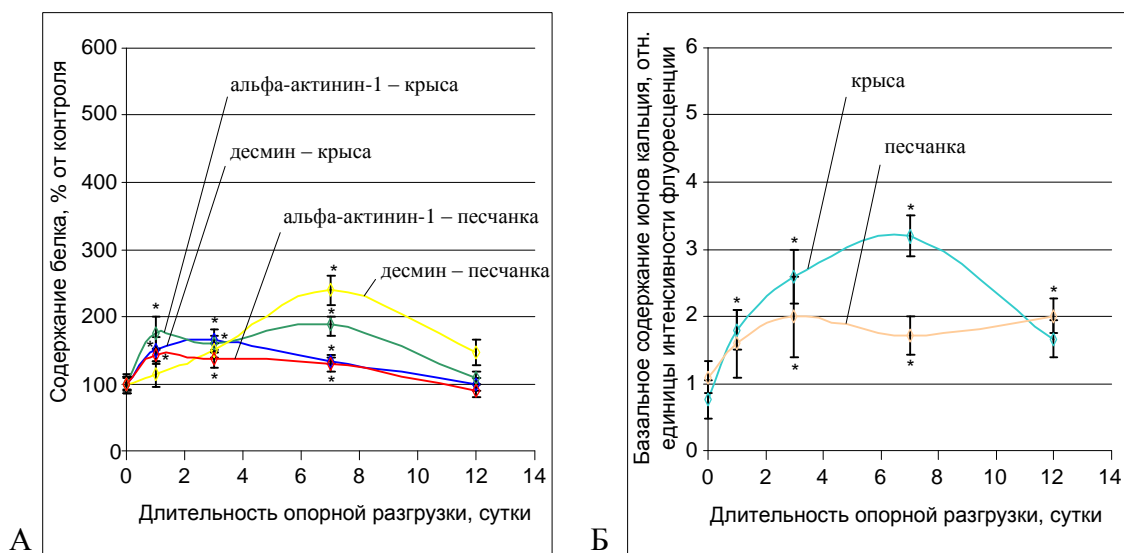


Рисунок 14. Содержание десмина и альфа-актинаина-1 (А) и базальное содержание ионов кальция (Б) в медиальной головке икроножной мышцы крысы и монгольской песчанки на разных сроках опорной разгрузки.

Содержание десмина в икроножной мышце крысы и монгольской песчанки несколько увеличивалось на ранних этапах опорной разгрузки (рис. 14, А). Содержание альфа-актинаина-1 возрастало, достигая своего максимума у крысы к 7 суткам вывешивания (рис. 14, А), так же как и базальное содержание ионов кальция (рис. 14, Б). У монгольской песчанки максимум накопления ионов кальция достигался к 3 суткам разгрузки (рис. 14, Б), однако был не столь значительным, как в мышце крысы.

Динамика изменения содержания цитоскелетных белков и ионов кальция в передней большеберцовой мышце крысы и монгольской песчанки была схожа с таковой для медиальной головки икроножной мышцы, но изменения были более выраженными. Однако к 7 суткам разгрузки у монгольской песчанки и к 12 суткам – у крысы базальное содержание ионов кальция достоверно не отличалось от контроля.

В камбаловидной мышце человека в эксперименте «7-суточная «сухая» иммерсия» содержание десмина в группе без применения протекторных воздействий снижалось и было близким к его значению в той же мышце крысы после 7-суточного антиортостатического вывешивания. При этом в группах с применением либо электростимуляции, либо компенсатора опорной разгрузки содержание десмина не отличалось от преиммерсионных значений и даже несколько увеличивалось, аналогично наблюдавшемуся увеличению в икроножной и передней большеберцовой мышцах грызунов.

Применение нифедипина привело к тому, что накопление альфа-актинаина-1 (рис. 15, А) и ионов кальция (рис. 15, Б) в волокнах камбаловидной мышцы крысы на ранних сроках опорной разгрузки было значительно менее выраженным, чем в той же мышце без применения препарата. Однако следует отметить, что на фоне нифедипина увеличивалось содержание ионов кальция в волокнах камбаловидной мышцы еще до антиортостатического

вывешивания. В то же время, применение нифедипина не влияло на динамику изменения содержания десмина (рис. 15, А). Изменения содержания цитоскелетных белков в икроножной и передней большеберцовой мышцах, а также накопление ионов кальция в волокнах этих мышц крысы на фоне получения нифедипина были выражены существенно слабее, чем в отсутствие приема препарата.

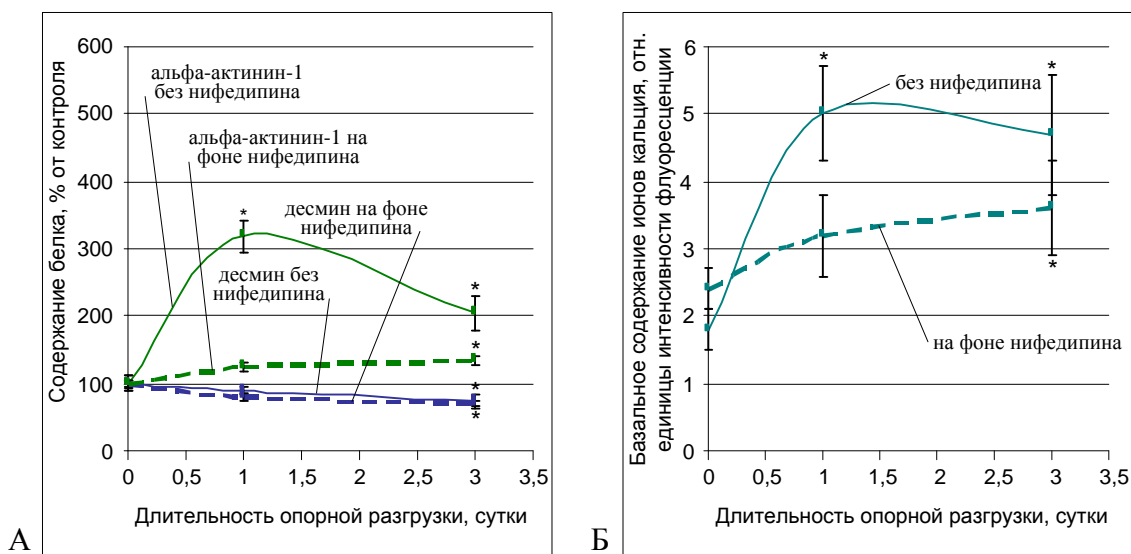


Рисунок 15. Содержание десмина и альфа-актинаина-1 (А) и базальное содержание ионов кальция (Б) в камбаловидной мышце крысы без/с применением нифедипина на ранних сроках опорной разгрузки.

Таким образом, в камбаловидной мышце содержание десмина на ранних этапах разгрузки снижалось, а затем восстанавливалось до уровня контроля. В икроножной и передней большеберцовой мышцах содержание десмина на начальных этапах вывешивания увеличивалось; при этом в икроножной мышце оно затем уменьшалось до контрольного уровня, а в передней большеберцовой мышце – оставалось достоверно выше контроля. Применение электростимуляции и компенсатора опорной разгрузки у человека приводило к тому, что содержание десмина было аналогичным его содержанию в икроножной и передней большеберцовой мышцах. Содержание альфа-актинаина-1 в цитоплазматической фракции увеличивалось во всех исследованных мышцах, также как и базальное содержание ионов кальция. Однако в камбаловидной мышце эти изменения наступали раньше и были более выраженными, нежели в икроножной и передней большеберцовой мышцах, где максимум изменений наблюдался чаще к 7 суткам вывешивания. Применение нифедипина привело к тому, что через сутки опорной разгрузки изменений в содержании белков и ионов кальция в волокнах различных мышц крысы практически не наблюдалось; изменения, которые появились к 3 суткам вывешивания, были очень небольшими по сравнению с отмечавшимися к этому сроку у крыс, не получавших препарат.

В целом, изменения содержания десмина аналогичны изменениям поперечной жесткости сократительного аппарата и коррелируют с увеличением поперечной жесткости сарколеммы при активации сокращения волокна. При этом содержание альфа-актинина-1 и базальный уровень ионов кальция возрастают во всех случаях на фоне снижения поперечной жесткости сарколеммы.

### **Заключение**

Мышечные волокна являются специализированными клетками, основной функцией которых является генерация механического напряжения, обеспечивающего двигательную активность и позволяющего поддерживать позу в условиях действия земной гравитации. Реализация гравитационного стимула в этом случае осуществляется через афферентно-эфферентную связь проприоцепторов (мышечных веретен) и мышечных волокон. Однако существующие литературные данные (Rijken P.J. et al., 1992; Infanger M. et al., 2007; Buravkova L.V. et al., 2010) свидетельствуют о том, что гравитационный стимул оказывает существенное влияние и непосредственно на клетки различных типов, хотя первичные акты этого восприятия до сих пор остаются малоизученными.

Поэтому мы предположили, что гравитационный стимул определяет поведение мышечных волокон не только путем стимуляции их нервной или механической активности, но и может восприниматься ими как внешний механический стимул.

Чтобы разделить роль нервной активации и непосредственно внешней механической силы, мы исследовали мышцы, у которых уровни активации в условиях гравитационной разгрузки значительно различаются, а также сравнили мышцы млекопитающих различных видов, для которых значение гравитационного стимула различно в силу различия размеров. Полученные в ходе экспериментов результаты дали возможность сделать следующие заключения.

Опорная разгрузка приводит к накоплению ионов кальция в мышечных волокнах как камбаловидной мышцы, причем уже через сутки антиортостатического вывешивания (рис. 13, Б), так и медиальной головки икроножной мышцы (рис. 14, Б) и передней большеберцовой мышцы (раздел 5.3 данного исследования). Это, с одной стороны, приводит к увеличению содержания кальций-зависимых протеаз – кальпаинов (Goll D. et al., 2003; Алтаева Э.Г. и др., 2010), а с другой, – может повышать активность кальций-зависимой кальмодулин-киназы (Pires E. et al., 1974). Кальпаины разрушают целый ряд цитоскелетных и саркомерных белков (Enns D.L. et al., 2006), способствуя снижению сократительных способностей мышечных волокон. В то же время, кальмодулин-киназа фосфорилирует легкие цепи миозина (Stewart M. et al., 2009), что, по некоторым данным, ведет к увеличению напряжения при фиксированном уровне  $pCa$  в активированных волокнах с проницаемой сарколеммой (Persechini A. et al., 1985) и, таким образом, может способствовать сохранению

функциональных возможностей мышечного волокна. По-видимому, регуляция, которую может опосредовать уровень сократительной активности, этих двух процессов в быстрых и медленных мышцах различна. Кроме того, интенсивность сократительной активности может регулировать скорость синтеза белковых компонентов цитоскелета мышечных волокон, например, десмина, поскольку наблюдается прямо пропорциональная зависимость между уровнем активации мышцы и содержанием десмина у животных различных видов (рис. 13 – 14, А, раздел 5.1 данного исследования).

Итак, сократительная активность камбаловидной мышцы в условиях опорной разгрузки снижена (Юганов Е.М. и др., 1963; Alford E.K. et al., 1987) и в ней преобладают атрофические процессы, что также проявляется в виде снижения поперечной жесткости различных участков волокна (рис. 8, А). Кальций элиминируется медленнее, по-видимому, в силу работы медленной изоформы кальциевого насоса саркоплазматического ретикула SERCA II (Brandl C.J. et al., 1986, 1987) и его содержание остается достаточно высоким на протяжении всего срока разгрузки (рис. 13, Б). Стимуляция сократительной активности камбаловидной мышцы в условиях функциональной разгрузки приводит к нивелированию негативных эффектов опорной разгрузки на сократительный аппарат у человека при применении электростимуляции и компенсатора опорной разгрузки. Причем полученные в данном исследовании результаты на клеточном уровне хорошо согласуются с результатами, полученными И.Б. Козловской с сотрудниками на уровне целого организма (Миллер Т.Ф., 2010).

Сократительная активность икроножной мышцы остается при функциональной разгрузке на уровне контроля вплоть до четырех недель антиортостатического вывешивания у крысы (Alford E.K. et al., 1987). Наблюдаемое на ранних сроках разгрузки накопление ионов кальция (рис. 14, Б) может нивелироваться, вероятно, работой более быстрой изоформы SERCA I, характерной для волокон этой мышцы (Brandl C.J. et al., 1986, 1987). Тем не менее, некоторые деградационные процессы в структуре мышечных волокон имеют место, что находит свое отражение в результатах измерения поперечной жесткости сократительного аппарата (рис. 8, Б).

Сократительная активность передней большеберцовой мышцы повышается (Alford E.K. et al., 1987). Поэтому преобладают процессы активации белкового синтеза с целью обеспечения растущих потребностей и разгрузка оказывает на волокна этой мышцы эффект, аналогичный действию тренировки. При этом поперечная жесткость сократительного аппарата возрастает (рис. 8, В).

Замедленная динамика описанных выше процессов и/или их меньшая выраженность у монгольской песчанки может быть связана с большим порогом активации внутриклеточных сигнальных систем на изменяющиеся внешние условия. Более высокий порог восприятия

различных стимулов, возможно, обусловлен эволюционными аспектами выживания данного вида в экстремальных условиях окружающей среды.

Рассматриваемые механические характеристики глицеринизированных волокон не зависят от уровня активности и проявляются одинаково во всех исследованных мышцах у различных видов животных (рис. 9).

Таким образом, изменения уровня нервной активации в условиях опорной разгрузки приводят к изменениям структурно-функциональных характеристик сократительного аппарата мышечных волокон, что отражают изменения поперечной жесткости сократительного аппарата (рис. 8). Более того, содержание десмина, одного из основных белков, обеспечивающих связь сократительного аппарата и сарколеммы (Ervasti J.M., 2003; Capetanaki Y. et al., 2007), по-видимому, также регулируется сократительной активностью, поскольку его содержание коррелирует с уровнем активности (рис. 13–14, А). Основной вклад в жесткость мышечного волокна вносит, конечно же, миофибриллярный аппарат как специализированный компартмент мышечных клеток, обеспечивающий развитие активных механических напряжений величиной до нескольких атмосфер, и регуляция его механических характеристик обеспечивается уровнем «потребностей», то есть нервной активацией.

В то же время, к деструкции подмембранного цитоскелета и раннему падению жесткости волокон с проницаемой сарколеммой (рис. 9) приводит, вероятно, снижение механического напряжения. Несмотря на незначительность вклада жесткости сарколеммы в поперечную жесткость волокна и мышцы в целом, именно в этом компартменте могут протекать первичные процессы реакции на переход в микрогравитационные условия.

Мы предположили ведущую роль в этом процессе подмембранного цитоскелета, хотя нельзя исключать и роль белков-интегринов, различного рода G-белков (Huang H. et al., 2004). Кроме того, существует теория D.E. Ingber (1998, 2006, 2008), который полагает, что все процессы механочувствительности клеток опосредуются через цитоскелет как единую трехмерную сеть.

Можно полагать, что биофизические механизмы изменения механических свойств волокон скелетных мышц таковы. В результате перехода в условия меньшего механического напряжения (опорная разгрузка, микрогравитация) меняется натяжение сарколеммы (мембраны с подмембранным цитоскелетом) и происходит деформация кортикального цитоскелета. Это приводит к диссоциации альфа-актинина-1 и, со временем, к деструктуризации кортикального цитоскелета и уменьшению жесткости мембраны. Снижение жесткости мембраны может повышать вероятность открывания кальциевых каналов, например, механочувствительных или каналов семейства TRPC, приводя к первичному накоплению ионов кальция. Накопление кальция и G-актина в результате деградации кортикального цитоскелета приведут к запуску ряда сигнальных путей, в первую



очередь, протеолитических, и формированию адаптационного ответа в условиях отсутствия опорного стимула.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что триггерную роль в формировании адаптационного ответа на изменение внешних механических условий для волокон скелетных мышц играет изменение состояния мембраны с кортикальным цитоскелетом, при этом интенсивность изменений зависит от уровня нервной активации в условиях функциональной разгрузки.

Результаты исследования дают широкие возможности предотвращения негативных эффектов микрогравитации и коррекции нежелательных изменений, обусловленных гипогравитационным синдромом. Например, использование генно-инженерных конструкций, обеспечивающих стабилизацию подмембранного цитоскелета, может позволить предотвратить нежелательные последствия пребывания в условиях невесомости. Стимуляция сократительной активности вкупе с введением хелаторов кальция будет способствовать скорейшему восстановлению функциональных возможностей мышечной ткани после длительной экспозиции микрогравитации.

В представленной работе было проведено всестороннее исследование биофизических механизмов механочувствительности волокон скелетных мышц, которое позволило предложить теорию первичных актов механорецепции мышечными клетками и формирования адаптационных изменений их механических характеристик.

### **Выводы**

1. Разработан метод, позволяющий дифференцированно определять локальную поперечную жесткость различных участков глицеринизированных и демембранизированных мышечных волокон в расслабленном, активированном кальцием и ригорном состояниях.
2. Разработана методика математического анализа и интерпретации экспериментальных данных, основанная на приближенном решении контактной задачи Герца для несжимаемых анизотропных тел и учете структурной организации саркомера, которая дает возможность выявить вклад изменения механических свойств различных участков саркомера в интегральную жесткость.
3. Путем сканирования поверхности глицеринизированных и демембранизированных волокон скелетной мышцы с помощью атомного силового микроскопа показано, что в районе M-линии существуют структуры, связывающие ее с сарколеммой.
4. При активации сокращения ионами  $Ca^{2+}$  и при переходе в ригорное состояние жесткость сократительного аппарата в области середины полусаркомера и M-линии увеличиваются более интенсивно, чем жесткость Z-диска. Жесткость различных участков волокон с проницаемой сарколеммой при активации сокращения и переходе в ригор увеличивается не так интенсивно, как жесткость демембранизированных волокон.

5. В условиях опорной разгрузки происходит снижение поперечной жесткости различных участков сократительного аппарата волокон камбаловидной мышцы. При этом в волокнах медиальной головки икроножной мышцы поперечная жесткость сократительного аппарата не меняется, а в волокнах передней большеберцовой мышцы – возрастает.
6. Динамика изменения содержания десмина при опорной разгрузке связана с изменением уровня сократительной активности мышцы.
7. Снижение функциональной нагрузки приводит к уменьшению поперечной жесткости волокон с проницаемой сарколеммой, накоплению в цитоплазме внесаркомерного альфа-актина-1 и ионов кальция вне зависимости от сократительной активности мышцы.
8. На клеточном уровне установлено, что применение компенсатора опорной разгрузки у человека позволяет предотвратить снижение поперечной жесткости сократительного аппарата и содержания десмина в камбаловидной мышце в условиях функциональной разгрузки.

### **Список публикаций по теме диссертации**

#### *Публикации в рецензируемых журналах*

1. Огнева И.В., Лебедев Д.В., Шенкман Б.С. Поперечная жесткость мышечных волокон. Методы измерения и физиологические основы // Авиакосмическая и экологическая медицина. 2008. Т. 42. № 3. С. 69 – 74.
2. Огнева И.В., Лебедев Д.В., Исаев-Иванов В.В., Шенкман Б.С. Региональное распределение поперечной жесткости расслабленных и активированных волокон камбаловидной мышцы крысы // Биофизика. 2008. Т. 53. Вып. 6. С. 1073 – 1078.
3. Lipets E.N., Ponomareva E.V., Ogneva I.V., Vikhliantsev I.M., Karaduleva E.V., Kartashkina N.L., Kuznetsov S.L., Podlubnaia Z.A., Shenkman B.S. The fiber contractility and cytoskeleton losses in space are less pronounced in Mongolian Gerbils // Journal of Gravitational Physiology. 2008. Vol. 15. № 1. P. 99 – 101.
4. Курушин В.А., Пономарева Е.В., Огнева И.В., Липец Е.Н., Шенкман Б.С. Количественная оценка зависимости кальциевой чувствительности от длины саркомера камбаловидной мышцы крысы после 14-суточного вывешивания // Доклады Академии Наук. 2009. Т. 424. № 6. С. 832 – 835.
5. Огнева И.В., Лебедев Д.В., Шенкман Б.С. Латеральная механика мышечных волокон и ее сигнальное значение // Биофизика. 2009. Т. 54. Вып. 3. С. 522 – 528.
6. Липец Е.Н., Пономарева Е.В., Огнева И.В., Вихлянцев И.М., Карадулева Е.В., Карташкина Н.Л., Кузнецов С.Л., Подлубная З.А., Шенкман Б.С. Сократительные характеристики волокон и цитоскелетные белки мышц задних конечностей

- монгольских песчанок после космического полета // *Авиакосмическая и экологическая медицина*. 2009. Т. 43. № 3. С. 34 – 39.
7. Ogneva I., Eliseev V. Nonlinear dynamic model of kinetocilia motion. 2D case // *Reviews on Advanced Materials Science*. 2009. Vol. 20. № 2. P. 158 – 165.
  8. Ogneva I.V., Kurushin V.A., Altaeva E.G., Ponomareva E.V., Shenkman B.S. Effect of short-time gravitational unloading on rat and Mongolian gerbil muscles // *Journal of Muscle research and cell motility*. 2009. Vol. 30. P. 261 – 265. doi: 10.1007/s10974-010-9202-0.
  9. Ogneva I.V., Lebedev D.V., Shenkman B.S. Transversal stiffness and Young's modulus of single fibers from rat soleus muscle probed by atomic force microscopy // *Biophysical Journal*. 2010. Vol. 98. Issue 3. P. 418 – 424. doi: 10.1016/j.bpj.2009.10.028.
  10. Кравцова В.В., Огнева И.В., Алтаева Э.Г., Разговорова И.А., Тяпкина О.В., Никольский Е.Е., Шенкман Б.С., Кривой И.И. Электрогенная активность Na-K-АТФазы и содержания ионов кальция в волокнах m. Soleus крысы и монгольской песчанки при моделировании гравитационной разгрузки // *Авиакосмическая и экологическая медицина*. 2010. Т. 44. № 2. С. 35 – 44.
  11. Алтаева Э.Г., Огнева И.В., Шенкман Б.С. Динамика накопления ионов кальция и изменения изоформ Са-АТФ-азы саркоэндоплазматического ретикулума (SERCA) в волокнах камбаловидной мышцы крысы и монгольской песчанки в ходе моделирования гравитационной разгрузки различной длительности // *Цитология*. 2010. Т. 52. № 9. С. 770 – 775.
  12. Огнева И.В., Алтаева Э.Г. Влияние нифедипина на механические свойства сарколеммы и модуляция динамики накопления ионов кальция в волокнах камбаловидной мышцы крысы в условиях кратковременной гравитационной разгрузки // *Биофизика*. 2010. Т. 55. Вып. 5. С. 918 – 925.
  13. Огнева И.В., Курушин В.А., Глашев М.М., Михайлова Е.В., Пономарева Е.В., Алтаева Э.Г., Кривой И.И., Шенкман Б.С. Сравнительный анализ структурно-функциональных характеристик камбаловидной мышцы крысы и монгольской песчанки в условиях гравитационной разгрузки различной длительности // *Биофизика*. 2010. Т. 55. Вып. 6. С. 1117 – 1123.
  14. Ogneva I.V. The transversal stiffness of fibers and the desmin content in the leg muscles of rats under gravitational unloading of various duration // *Journal of Applied Physiology*. 2010. Vol. 109. Issue 6. P. 1702 – 1709. doi:10.1152/jappphysiol.00793.2010.
  15. Огнева И.В., Шенкман Б.С., Козловская И.Б. Содержание десмина и альфа-актина-1 в камбаловидной мышце человека после 7-суточной «сухой» иммерсии // *Доклады Академии Наук*. 2011. Т. 436. № 5. С. 709 – 711.

16. Огнева И.В., Веселова О.М., Ларина И.М. Изменения клеточного дыхания волокон постуральных мышц крысы в условиях длительной гравитационной разгрузки при добавлении в рацион сукцината // Биофизика. 2011. Т. 56. Вып. 1. С. 122 – 128.
17. Веселова О.М., Огнева И.В., Ларина И.М. Влияние длительной гравитационной разгрузки на клеточное дыхание волокон камбаловидной мышцы крысы // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2011. Т. 151. № 3. С. 292 – 294.
18. Ogneva I.V., Ponomareva E.V., Altaeva E.G., Fokina N.M., Kurushin V.A., Kozlovskaya I.B., Shenkman B.S. Decrease of contractile properties and transversal stiffness of single fibers in human soleus after 7-day “dry” immersion // Acta Astronautica. 2011. Vol. 68. P. 1478 – 1485.

#### *Патент*

Огнева И.В., Лебедев Д.В., Липец Е.Н., Шенкман Б.С. Способ определения жесткости костамера мышечных волокон // № 2369332 зарегистрировано в Государственном реестре изобретений РФ от 10 октября 2009 года.

#### *Публикации в материалах научных мероприятий*

1. Огнева И.В. Латеральные механические характеристики одиночных мышечных волокон крыс // Сборник тезисов VII Конференции молодых ученых, специалистов и студентов, посвященной дню Космонавтики и приуроченной к 45-летию ГИЦ РФ-ИМБП РАН. 2008. С. 44 – 45.
2. Ogneva I.V., Lebedev D.V., Isaev-Ivanov V.V., Shenkman B.S. Transverse stiffness of intact and demembranized rat soleus myofibers // Biological motility: achievements and perspectives. 2008. Vol. 1. P. 9 – 10.
3. Shenkman B., Ponomareva E., Lipets E., Ogneva I., Vikhlyantsev I., Koroduleva E., Podlubnaya Z. The muscle fiber contractility and cytoskeleton losses in space are less pronounced in Mongolian Gerbils // 29<sup>th</sup> Annual International Gravitational Meeting. 22-27 June 2008. Angers, France. P. 126.
4. Липец Е.Н., Пономарева Е.В., Огнева И.В., Вихлянцев И.М., Карадулева Е.В., Подлубная З.А. Сократительные характеристики волокон и цитоскелетные белки m. soleus у монгольских песчанок после космического полета // Материалы XLIII научных чтений памяти К.Э. Циолковского. 2008. Калуга. С. 161 – 162.
5. Ogneva I., Lebedev D., Isaev-Ivanov V., Shenkman B. Elastic properties of myofibres in relaxed, activated and rigor states // J. Muscle Res. Cell Motil. XXXVII European Muscle Conference. 13-16 September. 2008. Oxford, UK. P. 46.

6. Kurushin V., Ponomareva E., Ogneva I. Ca-sensitivity dependence on sarcomere length after 14 days hindlimb unloading // J. Muscle Res. Cell Motil. XXXVII European Muscle Conference. 13-16 September. 2008. Oxford, UK. P. 132.
7. Огнева И.В., Пономарева Е.В. Поперечная жесткость одиночных мышечных волокон после кратковременной гравитационной разгрузки // «Научное наследие академика Л.А. Орбели. Структурные и функциональные основы эволюции функций, физиология экстремальных состояний». 19 – 20 ноября. 2008. Санкт-Петербург. С. 120 – 121.
8. Шенкман Б.С., Кривой И.И., Огнева И.В., Липец Е.Н., Вихлянцев И.М., Подлубная З.А. Необычный путь адаптации скелетных мышц к условиям невесомости. Монгольские песчанки на биоспутнике «ФОТОН-МЗ» // «Научное наследие академика Л.А. Орбели. Структурные и функциональные основы эволюции функций, физиология экстремальных состояний». 19 – 20 ноября. 2008. Санкт-Петербург. С. 186 – 187.
9. Курушин В.А., Липец Е.Н., Огнева И.В. Некоторые аспекты воздействия моделированной гравитационной разгрузки на постуральные мышцы монгольских песчанок // V Международная конференция по физиологии мышечной деятельности. 2 – 5 февраля. 2009. Москва. С. 66.
10. Пономарева Е.В., Огнева И.В. Кратковременная гравитационная разгрузка приводит к структурным изменениям в мышечном волокне и последующему снижению его сократительных способностей // V Международная конференция по физиологии мышечной деятельности. 2 – 5 февраля. 2009. Москва. С. 71.
11. Ogneva I.V., Kurushin V.A., Ponomareva E.V., Altaeva E.G., Shenkman B.S. Changes of transverse stiffness, contractile properties and resting calcium level in myofibres of postural muscles in Mongolian gerbils after 12-day simulated gravitational unloading // 30<sup>th</sup> Annual International Gravitational Meeting. 24-29 May 2009. Xian, China. P. 105.
12. Krivoi I.I., Kravtsova V.V., Razgovorova I.A., Mikhailova E.V., Glashev M.M., Altaeva E.G., Ogneva I.V., Shenkman B.S. Electrophysiological and contractile characteristics of rat and Mongolian gerbil after hindlimb unloading // 17 Международный симпозиум «Human in Space». 7 – 11 June 2009. Moscow. P. 73 – 74.
13. Ogneva I.V., Ponomareva E.V., Altaeva E.G., Fokina N.M., Kozlovskaya I.B., Shenkman B.S. Decrease of contractile properties and transversal stiffness of single fibers in human soleus after 7-day dry immersion // 17 Международный симпозиум «Human in Space». 7 – 11 June 2009. Moscow. P. 97.
14. Kurushin V.A., Ponomareva E.V., Ogneva I.V. 12-day simulated gravitational unloading leads to structural and functional changes in single fibers of postural muscles in Mongolian gerbils // 17 Международный симпозиум «Human in Space». 7 – 11 June 2009. Moscow. P. 75.

15. Ogneva I.V., Kurushin V.A., Altaeva E.G., Ponomareva E.V., Shenkman B.S. Effect of short-time gravitational unloading on rat and Mongolian gerbil muscles // J. Muscle Res. Cell Motil. XXXVIII European Muscle Conference. 12-16 September. 2009. Lille, France. P. 58.
16. Kurushin V.A., Ogneva I.V., Katushkina E.A., Zinovieva O.E., Shenkman B.S. Mechanical aspects of poststroke spasticity in human muscles // J. Muscle Res. Cell Motil. XXXVIII European Muscle Conference. 12-16 September. 2009. Lille, France. P. 31.
17. Ogneva I.V., Kurushin V.A. Dynamics of transversal stiffness changes and desmin content in fibers of rat soleus muscle under hypogravity conditions // Biological motility: from fundamental achievements to nanotechnologies. 10-15 May 2010. Puschino, Russia. P. 196 – 198.
18. Altaeva E.G., Ogneva I.V. Alteration of myosin phenotype in rat and Mongolian gerbil soleus under gravitational unloading // Biological motility: from fundamental achievements to nanotechnologies. 10-15 May 2010. Puschino, Russia. P. 14 – 15.
19. Ogneva I.V., Kurushin V.A. Reduction of sarcolemma stiffness in limb muscle fibers at early stages of gravitational unloading is independent from muscle type // 31<sup>th</sup> Annual International Gravitational Meeting. 13-18 June 2010. Trieste, Italy. P. 107.
20. Altaeva E.G., Ogneva I.V. Dynamics of changes in resting calcium level and SERCA isoforms in myoplasm of soleus muscle in rats and Mongolian gerbils under gravitational unloading // 31<sup>th</sup> Annual International Gravitational Meeting. 13-18 June 2010. Trieste, Italy. P. 83.
21. Kurushin V.A., Ogneva I.V. Effects of short-term hypogravity on M-line transversal stiffness and one possible way to interpret stiffness data // J. Muscle Res. Cell Motil. XXXVIII European Muscle Conference. 11-16 September. 2010. Padova, Italy. P. 59.
22. Ogneva I.V. Desmin content in the rat and Mongolian gerbils limb muscles at different stages of gravitational unloading // J. Muscle Res. Cell Motil. XXXVIII European Muscle Conference. 11-16 September. 2010. Padova, Italy. P. 60.
23. Огнева И.В., Курушин В.А. Поперечная жесткость одиночных волокон мышц голени крысы в условиях гравитационной разгрузки различной длительности // XXI съезд Физиологического общества им. И.П. Павлова. 19 – 25 сентября 2010. Калуга, Россия. С. 448 – 449.
24. Огнева И.В. Снижение поперечной жесткости волокон камбаловидной мышцы крысы после гравитационной разгрузки и последующего восстановления // VI Всероссийская с международным участием школа-конференция по физиологии мышц и мышечной деятельности «Системные и клеточные механизмы в физиологии двигательной системы и мышечной деятельности». 1 – 4 февраля 2011. Москва, Россия. С. 33.
25. Мирзоев Т.М., Огнева И.В. Содержание энергетических субстратов в волокнах камбаловидной мышцы молодых крыс после 14-суточного антиортостатического

вывешивания и 3-суточного восстановления // VI Всероссийская с международным участием школа-конференция по физиологии мышц и мышечной деятельности «Системные и клеточные механизмы в физиологии двигательной системы и мышечной деятельности». 1 – 4 февраля 2011. Москва, Россия. С. 29.

26. Мирзоев Т.М., Огнева И.В. Влияние функциональной разгрузки на содержание десмина и альфа-актинина-2 в волокнах камбаловидной мышцы крысы // Школа-конференция «Биология – наука XXI века». 18 – 22 апреля 2011. Пушкино, Россия С. 140 – 141.

### Список цитируемой литературы

- Akiyama N., Ohnuki Y., Kunioka Y., Saeki Y., Yamada T. J. *Physiol. Sci.* 2006. Vol. 56. P. 145 – 151. Alford E.K., Roy R.R., Hodgson J.A., Edgerton V.R. *Experimental Neurology*. 1987. Vol. 96. P. 635 – 649. Booth F.W., Kelso J.R. *Pflugers Arch.* 1973. Vol. 342. P. 231 – 238. Brandl C.J., deLeon S., Martin D.R., MacLennan D.H. *J. Biol. Chem.* 1987. Vol. 262. № 8. P. 3768 – 3774. Brandl C.J., Green N.M., Korczak B., MacLennan D.H. *Cell*. 1986. Vol. 44. № 4. P. 597 – 607. Buravkova L.B., Gershovich Y.G., Grigorev A.I. *Dokl. Biol. Sci.* 2010. Vol. 432. № 1. P. 237 – 240. Caiozzo V.J., Haddad F., Baker M.J., Herrick R.E., Prietto N., Baldwin K.M. *J Appl Physiol*. 1996. Vol. 81. P. 123 – 132. Capetanaki Y., Bloch R.J., Kouloumenta A., Mavroidis M., Psarras S. *Exp. Cell Res.* 2007. Vol. 313. P. 2063 – 2076. Ciavarella M., Demelio G., Schino M., Vlassak, J.J. *Experimental Techniques and Design in Composite Materials*. 2002. Vol. 5. P. 281 – 292. Collinsworth A.M., Zhang S., Kraus W.E., Truskey G.A. *Am J. Physiol Cell Physiology*. 2002. Vol. 283. P. 1219 – 1227. Defranchi E., Bonaccorso E., Tedesco M., Canato M., Pavan E., Raiteri R., Reggiani C. *Microscopy Research and Technique*. 2005. Vol. 67. P. 27 – 35. Delafargue A., Ulm F.-J. *International journal of solids and structures*. 2004. Vol. 41. P. 7351 – 7360. Desplanches D., Mayet M.H., Ilyina-Kakueva E.I., Sempore B., Flandrois R. *J.Appl. Physiol.* 1990. Vol. 68. P. 48 – 52. Enns D.L., Belcastro A.N. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 2006. Vol. 84. P. 601 – 609. Ervasti J.M. *Journal of Biological Chemistry*. 2003. Vol. 278. P. 13591 – 13594. Goll D., Thompson V., Li H., Wei W., Cong J. *Physiol.Rev.* 2003. Vol. 83. P. 731 – 801. Huxley H., Reconditi M., Stewart A., Irving T. *J. Mol. Biol.* 2006. Vol. 363. № 4. P. 743 – 761. Infanger M., Ulbrich C., Baatout S., Wehland M., Kreutz R., Bauer J., Grosse J., Vadrucci S., Cogoli A., Derradji H., Neefs M., Kusters S., Spain M., Paul M., Grimm D. *J. Cell Biochem.* 2007. Vol. 101. №6. P. 1439 – 1455. Ingalls C.P., Warren G.L., Armstrong R.B. *J. Appl. Physiol.* 1999. Vol. 87. №1. P. 386 – 390. Ingalls C.P., Wenke J.C., Armstrong R.B. *Aviat. Space Environ. Med.* 2001. Vol. 72. №5. P. 471 – 476. Isambert H., Venier P., Maggs A.C., Fattoum A., Kassab R., Pantaloni D., Carlier M.-F. *The Journal of Biological Chemistry*. 1995. Vol. 270. № 19. P. 11437 – 11444. Kozlovskaya I., Dmitrieva I., Grigorieva L., Kirenskaya A., Kreidich Yu. In «Stance and Motion» Eds. V.S. Gurfinkel, M.Ye. Ioffe, J. Massion Plenum, New York. 1988. P. 37 – 48. Linari M., Caremani M., Piperio C., Brandt Ph., Lombardi V. *Biophys. J.* 2007. Vol. 92. P. 2476 – 2490. Linari M., Dobbie I., Reconditi M., Koubassova N., Irving M., Piazzesi G., Lombardi V. *Biophys J.* 1998. Vol. 74. P. 2459 – 2473. Mathur A.B., Collinsworth A.M., Reichert W.M., Kraus W.E., Truskey G.A. *Journal of Biomechanics*. 2001. Vol. 34. P. 1545 – 1553. McDonald K.S., Fitts R.H. *J. Appl. Physiol.* 1995. Vol. 79. P. 1796 – 1802. Morey-Holton E., Globus R.K., Kaplansky A., Durnova G. *Adv. Space Biol. Med.* 2005. Vol. 10. P. 7–40. Nyland L.R., Maughan D.W. *Biophys J.* 2000. Vol. 78. P. 1490 – 1497. Persechini A., Stull J.T., Cooke R. 1985. Vol. 260. P. 7951 – 7954. Pires E., Perry S.V., Thomas M.A. *FEBS Lett.* 1974. Vol. 41. P. 292 – 296. Radmacher M., Fritz M., Kacher C.M., Cleveland J.P., Hansma P.K. *Biophys J.* 1996. Vol. 70. P. 556 – 557. Rijken P.J., de Groot R.P., Kruijer W., de Laat S.W., Verkleij A.J., Boonstra J. *Adv. Space. Res.* 1992. Vol. 12. №1. P. 145 – 152. Shin D., Athanasiou K. *Journal of Orthopaedic Research*. 1999. Vol. 17. P. 880 – 890. Stevens L., Holy X., Mounier Y. *Am. J. Physiol.* 1993. Vol. 264(4 Pt 2). P. 770 – 776. Stewart M., Franks-Skiba K., Cooke R. *Muscle Res. Cell Motil.* 2009. Vol. 30. № 1-2. P. 17 – 27. Tournel Th., Stevens L., Granzier H., Mounier Y. *J. Appl. Physiol.* 2002. Vol. 92. P. 1465 – 1472. Towbin H., Staehlin T., Gordon J. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1970. Vol. 76. P. 4350 – 4354. Vlassak J.J., Nix W.D. *J. Mech. Phys. Solids*. 1994. Vol. 42. № 8. P. 1223 – 1245. Weisenhorn A.L., Khorsandi M., Kasas S., Gotzos V., Butt H.J. *Nanotechnology*. 1993. Vol. 4. P. 106 – 113. Алтаева Э.Г., Лысенко Л.А., Канцерова Н.П., Немова Н.Н., Шенкман Б.С. *ДАН. Серия биохимия и биофизика*. 2010. Т. 433. № 1. С. 138 – 141. Ватульян А.О. *Известия Академии Наук Армянской ССР. Серия Механика*. 1978. Том XXXI. № 4. С. 31 – 41. Григорьев А.И., Козловская И.Б., Шенкман Б.С. *Российский Физиологический журнал им. И.М. Сеченова*. 2004. Том 90. №5. С. 508 – 521. Миллер Т.Ф. *Автореферат канд. дисс., Москва, 2010 – 24 с.* Остерман Л.А. *Москва, Наука, 1981. – 288 с.* Пономарева Е.В., Кравцова В.В., Качаева Е.В., Алтаева Э.Г., Вихлянцев И.М., Подлубная З.А., Кривой И.И., Шенкман Б.С. *Биофизика*. 2008. Т.53. № 6. С. 1087–1094. Усик П.И. *Прикладная математика и механика*. 1973. Т. 37. № 7. С. 448 – 458. Юганов Е.М., Афанасьев Д.Б., Павлов Г.И. *Медико-биологические исследования в невесомости / Под ред. В.В. Парина и И.И. Касьяна. - М.: Медицина, 1963. - С. 289-297.*