

НОВЫЕ ИЗОФОРМЫ ТАЙТИНА (КОННЕКТИНА) И ИХ ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ РОЛЬ В ПОПЕРЕЧНО-ПОЛОСАТЫХ МЫШЦАХ МЛЕКОПИТАЮЩИХ: ФАКТЫ И ПРЕДПОЛОЖЕНИЯ

© 2012 г. И. М. ВИХЛЯНЦЕВ^{1*}, З. А. ПОДЛУБНАЯ^{1,2}

¹ *Институт теоретической и экспериментальной биофизики
РАН, Пущино, Московская область*

² *Пушкинский государственный естественно-научный институт,
Пущино, Московская область*

I. Введение. II. История открытия тайтина и изучение его структуры и функциональных свойств. III. Этапы электрофоретического изучения изоформного состава тайтина в мышцах человека и животных. IV. Новые высокомолекулярные формы тайтина в поперечно-полосатых мышцах млекопитающих: агрегаты, изоварианты или интактные изоформы? V. Эксперименты по выделению изоформ тайтина. VI. Вклад изменений изоформного состава тайтина в функционирование мышц млекопитающих при гибернации и микрогравитации. VII. Разрушение NT-изоформ тайтина в мышцах млекопитающих при развитии патологических процессов. VIII. Заключение.

I. ВВЕДЕНИЕ

До открытия тайтина мышечное сокращение рассматривалось с позиции взаимодействия в саркомере двух типов нитей: толстых и тонких (рис. 1). Открытие тайтина (коннектина) [1, 2] разрушило старые представления о двунитевой структуре саркомера и определило интерес многих исследователей к выяснению роли этого белка

Принятые сокращения: ДКМП – дилатационная кардиомиопатия; кДНК – комплементарная дезоксирибонуклеиновая кислота; КМЦ – кардиомиоцит; ЛЖ – левый желудочек сердца; ТЦМ – тяжелые цепи миозина; SHR – спонтанно-гипертензивные крысы.

**Адрес для корреспонденции:* vikhlyantsev@iteb.ru

Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ (10-04-00141 и 11-04-01026) и программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России», ГК № 02.740.11.0710.

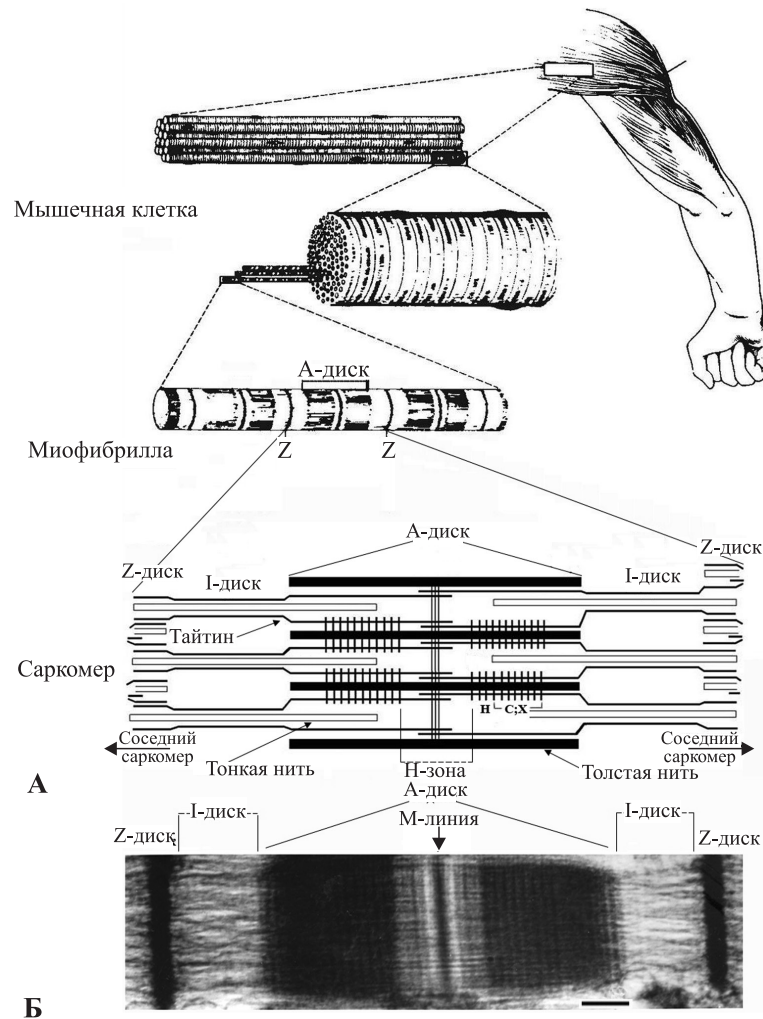


Рис. 1. Строение саркомера поперечно-полосатых мышц позвоночных.

А – схема расположения саркомера в миофибриллах и его строение. Толстые нити, состоящие в основном из миозина, расположены в А-диске. Тонкие нити, состоящие в основном из актина, располагаются в I-диске саркомера, а также в А-диске, где они перекрываются с толстыми нитями. Н-зона – центральная часть А-диска, свободная от тонких нитей. Молекулы тайтина располагаются от М-линии до Z-диска саркомера. Указаны поперечные полосы миозин-связывающих белков (Н, С, Х) в А-диске саркомера.

Б – микрофотография саркомера демембранизированной поясничной мышцы кролика. Шкала 200 нм.

в поддержании структуры и функционировании саркомера и мышцы в целом. В настоящее время известно, что тайтин – гигантский эластичный белок в саркомерах поперечно-полосатых мышц позвоночных [3–5]. Его молекулы, перекрывая расстояние от М-линии до Z-диска, формируют третью филаментную систему в миофибриллах [6, 7]. Молекулярные массы изоформ тайтина (N2A, N2BA и N2B) и их изовариантов составляют 3000–3700 кДа [8, 9].

Исследования, проведенные за последние 20 лет, показали, что тайтин является одним из ключевых компонентов саркомера поперечно-полосатых мышц позвоночных, играющим важную роль в сборке толстых нитей, формировании высокоупорядоченной структуры саркомера, регуляции актин-миозинового взаимодействия и процессов внутриклеточной сигнализации (см. ряд обзоров [4, 5, 10–19]). Тем не менее, не все функциональные свойства тайтина и структурные особенности разных его изоформ до конца изучены. Причины этого заключаются не только в относительной «молодости» тайтина, как объекта исследования, но и в методических трудностях изучения белка с такой огромной молекулярной массой. Способность тайтина легко деградировать во время препаративных процедур также сильно затрудняет исследование его структурно-функциональных свойств. Возможно поэтому, а также вследствие и других причин, научная задача, касающаяся изучения изоформного состава тайтина в мышцах животных и человека в норме и его изменений при адаптационных и патологических процессах, до конца не решена. Недостаток данных по этому вопросу, а также имеющиеся экспериментальные противоречия, в частности, касающиеся изоформных изменений тайтина при патологии, послужили стимулом для проведения собственных исследований в этом направлении. Эти исследования показали, что в поперечно-полосатых мышцах млекопитающих наряду с известными изоформами тайтина присутствуют более высокомолекулярные изоформы этого белка. Данный обзор суммирует наши результаты по выявлению новых изоформ тайтина и выяснению их функциональной роли в поперечно-полосатых мышцах млекопитающих в норме, при адаптации и патологии.

II. ИСТОРИЯ ОТКРЫТИЯ ТАЙТИНА И ИЗУЧЕНИЕ ЕГО СТРУКТУРЫ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ СВОЙСТВ

Согласно модели «скользящих нитей», впервые предложенной в 1954 г. одновременно двумя группами авторов [20, 21], мышечное сокращение рассматривалось с позиции взаимодействия в саркомере двух типов нитей: толстых (миозиновых) и тонких (актиновых) (рис. 1). Однако

в это же время Х. Хаксли и Дж. Хэнсон, основоположники модели «скользящих нитей», высказали предположение о существовании третьего типа нитей («S»-stretched, то есть растяжимых нитей), связывающих концы противоположных нитей актина в саркомере [22–24]. Это предположение было выдвинуто для объяснения упругих свойств расслабленной мышцы, проявляющихся при ее пассивном растяжении, а также для объяснения структурной непрерывности миофибрилл, сохраняющейся после экстракции миозина и при растяжении мышцы до исчезновения перекрытия между толстыми и тонкими нитями. Наличие системы параллельных эластичных элементов, обеспечивающих непрерывность саркомеров, могло бы объяснить указанные выше свойства мышцы. Однако экспериментальные данные, подтверждающие существование подобных нитей, в то время отсутствовали. Доказательства существования третьего типа нитей (эластичных нитей) в поперечно-полосатых мышцах как беспозвоночных, так и позвоночных животных были представлены в 1960–1980 гг. прошлого века в ряде исследований, выполненных с помощью электронной микроскопии [25–38]. Нити получили несколько названий: «промежуточные» («gap filaments») – то есть нити, видимые на микроснимках в промежутках между концами миозиновых и актиновых нитей при больших степенях растяжения саркомеров [26, 29, 34]; «остаточные» (residual) – нити остающиеся после удаления основных мышечных белков из саркомеров [31]; «сверхтонкие» (superthin T filaments, fine filaments) – нити, имеющие малый диаметр (~3–5 нм) [25, 30, 36]; «G-нити» и «connecting» нити – соединяющие концы толстых нитей с Z-дисксом [27, 28, 32, 33, 35]; «концевые» филаменты (end filaments) – тонкие нити диаметром 4–5 нм, видимые на концах изолированных толстых нитей [37, 38] (см. также для ссылок [39]). Электронно-микроскопические исследования, проводимые в те годы в нашей лаборатории, также выявили присутствие тонких нитей диаметром 3–5 нм в поперечно-полосатых мышцах беспозвоночных и позвоночных животных [40]. В частности, в «тенях» миофибрилл поясничной мышцы кролика, остающихся после последовательного удаления миозина, актина, тропомиозина, тропонинов и минорных белков М-полосы, была обнаружена непрерывная сетка тонких нитей диаметром 3–5 нм, проходящих через все саркомеры [40] (рис. 2).

Дальнейшие биохимические исследования, проводимые с целью идентификации белков, формирующих третий тип нитей, показали, что в поперечно-полосатых мышцах беспозвоночных животных, в частности, в летательных мышцах насекомых, таким белком может быть прожектин [41]. Это предположение подтвердилось в дальней-

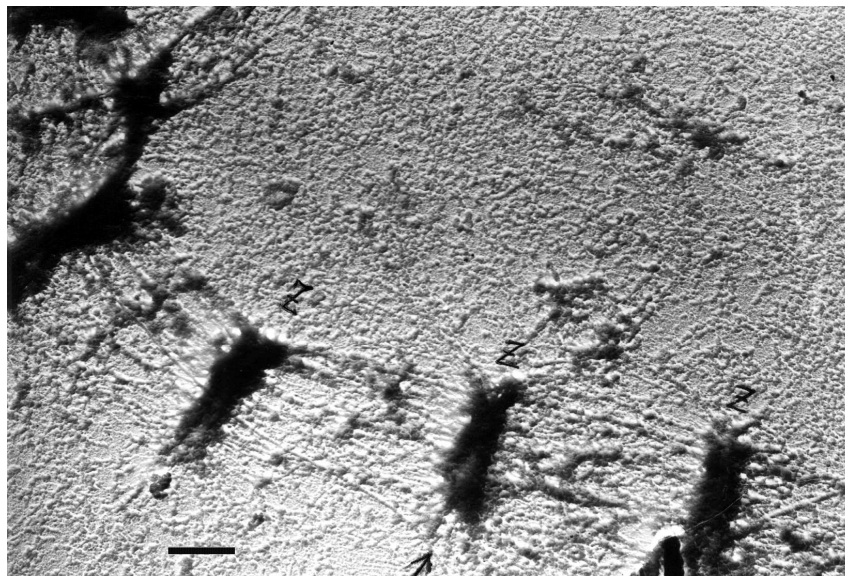


Рис. 2. Микрофотография изолированной негативно окрашенной миофибриллы поясничной мышцы кролика после экстракции миозиновых и актиновых нитей. Оставшиеся «Z-диски» удерживаются в регистре продольными нитями, проходящими непрерывно через всю миофибриллу (указано стрелкой). Шкала 100 нм.

ших исследованиях (см. для ссылок [42]). При этом были открыты и другие белки, формирующие третий тип нитей в саркомерах беспозвоночных животных (см. для ссылок [43]).

Белковый компонент эластичных нитей поперечно-полосатых мышц позвоночных животных оставался неизвестен до 1976 г., когда группе японских исследователей во главе с К. Маруяма удалось получить нерастворимый эластичный белковый остаток после обработки миофибрилл различными растворителями [44, 45]. Этот остаток был назван коннектином. Свойства его, как возможного претендента на роль белка эластичных нитей, стали интенсивно исследоваться этой группой авторов [46–51].

Независимо от К. Маруямы и его сотрудников, другая группа исследователей во главе с К. Вангом проводила электрофоретическое изучение скелетных мышц позвоночных с целью выявления в них филамина – актин-связывающего белка. При этом на картинах ДСН-гель-электрофореза поперечно-полосатых мышц кролика и цыпленка в крупнопористых (4%) полиакриламидных гелях исследователи обнаружили двойные полосы, которые соответствовали белкам с молекулярной массой более 1000 кДа [1]. Белки оказались

иммунологически идентичными и получили название тайтин-1 (Т1) и тайтин-2 (Т2). Дальнейшие исследования этой группы авторов показали, что белок коннектин, выделенный К. Маруяма и его сотрудниками в 1976 г., представлял собой смесь, содержащую преобладающее количество денатурированных, деградированных и агрегированных молекул тайтина и небулина, а также различные количества миозина, актина, белков соединительной ткани и промежуточных филаментов [52]. Проведенные впоследствии сравнительные исследования свойств тайтина и очищенного коннектина доказали тождественность этих двух белков [2]. С этого времени начались интенсивные исследования структурных и функциональных свойств тайтина (коннектина).

В настоящее время известно, что тайтин (в русскоязычной научной литературе используется также название «титин») – гигантский эластичный белок поперечно-полосатых [3–5] и гладких [53] мышц позвоночных животных. В саркомерах сердечной и скелетных мышц позвоночных тайтин является третьим по количеству (после актина и миозина) белком. Его молекулы длиной около 1 мкм и диаметром 3–4 нм [54–57] перекрывают половину саркомера от М-линии до Z-линии, формируя третью филаментную систему в миофибриллах [6, 7]. На каждую половину саркомера приходится по шесть молекул тайтина [58], N-концы которых перекрываются в Z-линии, а C-концы в М-линии саркомера [4]. В А-зоне саркомера тайтин связан с миозиновыми нитями [59]. В I-диске саркомера некоторые участки тайтиновой молекулы могут взаимодействовать с тонкими нитями [60–72], однако большая часть молекулы тайтина в этой зоне проходит свободно, соединяя концы миозиновых нитей с Z-мембраной. Исследования последних лет показали, что этот гигантский полипептид имеет различное строение в разных зонах саркомера и вносит свой вклад в их архитектуру и функционирование. Большая часть (~90%) молекулы тайтина состоит из повторяющихся иммуноглобулин-подобных (IgC2) и фибронектин-подобных (FnIII) доменов с β -складчатой структурой [4, 73]. Кроме этих доменов тайтин содержит уникальные последовательности: киназный домен вблизи М-линии саркомера, фосфорилируемые участки в М-, I- и Z-зонах саркомера, а также эластичные N2A, N2B и PEVK-элементы в I-зоне саркомера [3, 4, 10, 14, 18, 73, 74]. Уникальная структура молекулы тайтина, его гигантские размеры и расположение во всех зонах саркомера создают основу для полифункциональности этого белка. Показано, что тайтин: является каркасом для сборки толстых нитей и саркомера [75–79]; участвует в поддержании высокоупорядоченной саркомерной структуры и, вследствие этого, сократительной функции

мышцы [80, 81]; вносит вклад в пассивное напряжение, развиваемое мышцей при растяжении и развивает возвратную силу при сокращении саркомера [82–85]; участвует в запуске и регуляции актин-миозинового взаимодействия как через связывание с белками тонких нитей [64, 65, 67–72, 86–89], так и посредством изменения АТФазной активности и Ca^{2+} -чувствительности миозина [56, 57, 90, 91]. Кроме этого, результаты недавно проведенных исследований позволяют делать предположения о том, что эластичный белок тайтин, как механосенсор (сенсор растяжения и напряжения – strain sensor, stress sensor), играет важную роль в процессах внутриклеточной сигнализации и участвует в регуляции экспрессии мышечных генов и белкового обмена в саркомере [10, 12, 14–19, 74, 92–96]. Этот вывод основан на результатах исследований, показывающих наличие в саркомере механочувствительных «горячих точек» (mechanosensory «hotspots») – комплексов сигнальных белков, объединенных тайтином в единую сеть, активность которых меняется при растяжении мышцы или изменении ее механической нагрузки [15, 18, 92, 93, 97–100]. Предполагается, что тайтин «...чувствует механические стимулы и трансформирует их в биохимические сигналы...» [18]. Большое внимание сейчас уделяется изучению сигнальной роли киназного домена тайтина [74, 92–94, 96]. Наши усилия в последние годы были направлены на изучение изоформного состава тайтина в норме и его изменений в мышцах человека и животных при адаптационных и патологических процессах с целью выяснения роли этих изменений в функционировании мышцы. В данном обзоре представлены результаты этих исследований.

III. ЭТАПЫ ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКОГО ИЗУЧЕНИЯ ИЗОФОРМНОГО СОСТАВА ТАЙТИНА В МЫШЦАХ ЧЕЛОВЕКА И ЖИВОТНЫХ

Как было отмечено выше, тайтин (коннектин) был открыт электрофоретическим методом двумя независимыми группами исследователей, которые на электрофореграммах скелетных мышц кролика и цыпленка, полученных в 3–4% полиакриламидных гелях, обнаружили две неизвестных белковых полосы с молекулярной массой более 1000 кДа [1, 2]. Белки оказались иммунологически идентичными и получили название тайтин-1 (α -коннектин) и тайтин-2 (β -коннектин), последний, как показано позже, является протеолитическим фрагментом тайтина-1 (α -коннектина) [101]. По первоначальным оценкам молекулярная масса тайтина-1 (T1) и тайтина-2 (T2) в зависимости от их

электрофоретической подвижности в геле составила ~1400 кДа и ~1200 кДа соответственно [1, 102]. Более поздние оценки, проведенные японскими исследователями, использующими в качестве стандарта «сшитые» поперечными связями тяжелые цепи миозина, показали, что молекулярные массы α - и β -коннектина составляют ~2800 кДа и ~2100 кДа соответственно [101].

Дальнейшие электрофоретические исследования тайтина (коннектина), проведенные в гелях с разным содержанием полиакриламида, выявили на электрофореграммах поперечно-полосатых мышц рыб, земноводных, рептилий, птиц и млекопитающих различия в электрофоретической подвижности T1 (α -коннектина) [83, 105–116]. При этом в поперечно-полосатых мышцах млекопитающих молекулярные массы T1 в зависимости от его электрофоретической подвижности составили: ~2400–2500 кДа (сердечная мышца) и ~2800–2940 кДа (скелетные мышцы) [105, 106], что подтвердили результаты и наших исследований [56] (рис. 3). На основании полученных данных, выявивших различия в электрофоретической подвижности тайтина поперечно-полосатых мышц позвоночных, было сделано заключение о существовании изоформ этого белка [105, 111].

В 1995 году после определения последовательности кДНК и секвенирования гена тайтина изоформы получили названия: N2A, N2BA и N2B [3]. К настоящему времени установлено, что в медленной скелетной мышце *soleus* млекопитающих синтезируется длинный вариант N2A-изоформы тайтина (3700 кДа), а в быстрой мышце *psaos* – короткий вариант N2A-изоформы (3400 кДа) [8, 117]. В разных отделах сердца взрослых млекопитающих синтезируются две основные изоформы тайтина: короткая N2B-изоформа, с молекулярной массой 2970 кДа, и длинная N2BA-изоформа, с молекулярной массой ее вариантов от 3200 до 3350 кДа [8, 117].

Электрофоретические исследования, проведенные с использованием разных типов крупнопористых гелей (с содержанием полиакриламида 2.5–9.0%, 2% полиакриламидного геля, укрепленного агарозой и 1% агарозного геля) выявили на электрофореграммах поперечно-полосатых мышц млекопитающих изоформы T1, которые, соответственно, также стали называть N2A, N2BA и N2B [8, 10, 118–164]. Методом Вестерн-блоттинга с использованием антител к разным участкам молекулы тайтина (в том числе к N- и C-концам) была подтверждена интактность его N2A-, N2BA- и N2B-изоформ, выявляемых электрофоретическим методом [120, 136]. Их молекулярные массы стали считать равными 3000–3700 кДа, в соответствии с данными о кодировании геном тайтина (TTN) разных по длине изоформ этого белка [8, 117]. Между тем, исследования [117] показали

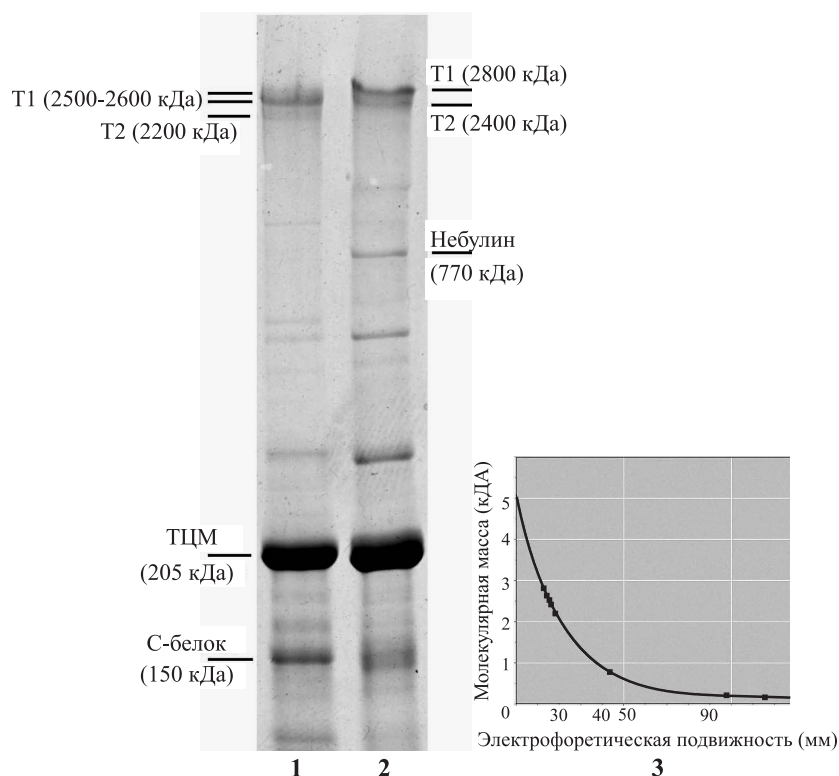


Рис. 3. Молекулярные массы изоформ тайтина-1 в поперечно-полосатых мышцах кролика.

Электрофорез проведен в градиентном 2.5–9.0% полиакриламидном вертикальном геле. 1 – ЛЖ сердца кролика; 2 – *m. soleus* кролика; 3 – логарифмическая зависимость молекулярной массы от электрофоретической подвижности белков в геле.

Для оценки молекулярной массы Т1 в качестве стандартов были использованы: сердечная изоформа С-белка (150 кДа) [103], а также тяжелые цепи миозина (ТЦМ, 205 кДа), небулин (770 кДа) и Т2-фрагмент (2400 кДа) скелетных мышц кролика [104–106].

возможность кодирования геном тайтина белка с молекулярной массой 4200 кДа. Однако электрофоретическим методом изоформ тайтина с подобной молекулярной массой обнаружено не было. С целью проверки предположения о существовании в поперечно-полосатых мышцах человека и животных изоформ тайтина с молекулярной массой более 3700 кДа мы провели собственные электрофоретические исследования.

IV. НОВЫЕ ВЫСОКОМОЛЕКУЛЯРНЫЕ ФОРМЫ ТАЙТИНА В ПОПЕРЕЧНО-ПОЛОСАТЫХ МЫШЦАХ МЛЕКОПИТАЮЩИХ: АГРЕГАТЫ, ИЗОВАРИАНТЫ ИЛИ ИНТАКТНЫЕ ИЗОФОРМЫ?

С использованием методики крупнопористого 2.0–2.3% полиакрил-амидного вертикального геля (размером 8×10 см), укрепленного агарозой [165] и Вестерн-блоттинга было проведено исследование изоформного состава тайтина в поперечно-полосатых мышцах человека и животных (суслик, кролик, мышь, крыса, монгольская песчанка, курица, лягушка). Результаты наших исследований, впервые опубликованные в 2004 г. [166–168], показали, что на электрофореграммах скелетных и сердечных мышц млекопитающих наряду с известными N2A-, N2BA-, N2B-изоформами и T2-фрагментами тайтина присутствуют новые, более высокомолекулярные изоформы (NT) этого белка [56, 169–175] (рис. 4), тогда как на электрофореграммах поперечно-полосатых мышц лягушки и курицы они отсутствовали (рис. 4, дорожки 10, 11, 13). Принимая во внимание данные о том, что в эмбриональном и неонатальном миокарде разных млекопитающих синтезируются изоварианты N2BA-изоформы тайтина с молекулярной массой ~3600–3700 кДа [136, 137, 141], мы предположили, что NT-изоформы тайтина являются изовариантами его известных изоформ [167–169, 171, 172]. Процентное содержание NT-изоформ тайтина в мышцах исследуемых животных и человека распределилось в следующем порядке: монгольская песчанка (8–14%), мышь (13–18%), крыса (9–26%), кролик (13–30%), суслик (24–33%), человек (29–41%) [56, 167, 169–171]. При этом в скелетных

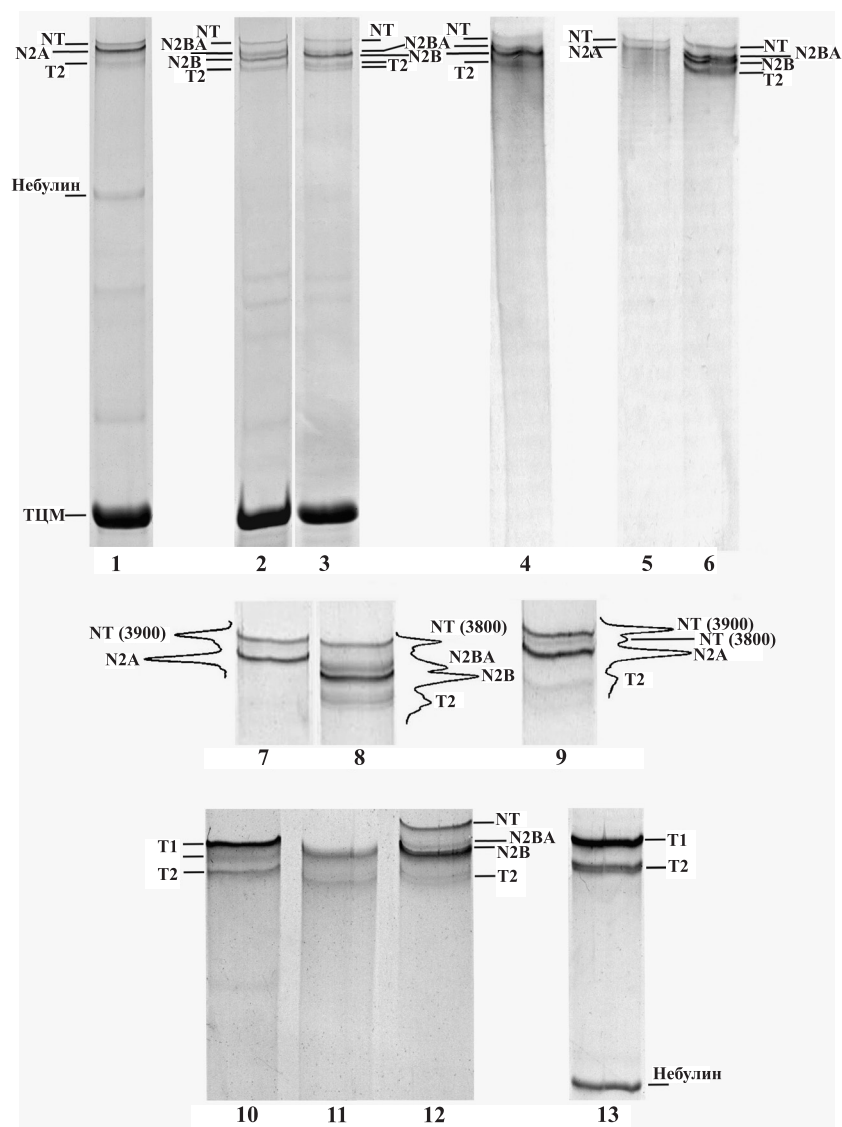
Рис. 4 (см. сл. стр.). Изоформный состав тайтина в поперечно-полосатых мышцах позвоночных животных и человека. Электрофорез проведен в вертикальном геле (размером 8×10 см) с содержанием агарозы 0.55% и полиакриламида 2–2.3%.

Электрофореграммы: 1 – m. longissimus dorsi (суслик); 2 – предсердие (суслик); 3 – ЛЖ сердца (мышь); 7 – m. soleus (суслик); 8 – ЛЖ сердца (суслик, период зимней активности); 9 – m. soleus (человек); 10 – сердечная мышца (желудочек) лягушки; 11 – сердечная мышца (желудочек) курицы; 12 – ЛЖ сердца (суслик, период летней активности); 13 – грудная мышца курицы.

Вестерн-блоттинг: 4 – ЛЖ сердца (кролик); 5 – m. soleus (человек); 6 – предсердие (суслик). Вестерн-блоттинг тайтина проведен с использованием моноклональных антител BD6.

Указаны белковые полосы: тяжелых цепей миозина (ТЦМ), небулина (белка тонких нитей), N2B-, N2BA- N2A-изоформ тайтина и новых, более высокомолекулярных NT-изоформ тайтина с молекулярной массой ~3800–3900 кДа.

Окончание подписи к рис. 4 см. сл. стр.



Окончание подписи к рис. 4

Для оценки молекулярной массы NT-изоформ тайтина в качестве стандартов были использованы: тяжелые цепи миозина (205 кДа), небулин скелетных мышц животных (770 кДа), небулин скелетных мышц человека (890 кДа), T2-фрагмент тайтина скелетных мышц кролика (2400 кДа), N2A-изоформа тайтина m. soleus кролика (3700 кДа) [104–106, 143].

мышцах их содержание было в ~1.5–2.0 раза выше, чем в разных отделах сердечной мышцы. По нашим оценкам, молекулярные массы NT-изоформ тайтина составили 3770–3840 кДа для сердечных и 3770–3910 кДа для скелетных мышц [166–171] (рис. 4) и не превысили максимально допустимого значения 4200 кДа [117].

Однако мы не исключали вероятности того, что NT-изоформы тайтина могут являться агрегатами известных изоформ и фрагментов этого белка. Это допущение было основано на данных Гранзиера и Ванга [106], которые в 1993 г. на электрофореграммах скелетных мышц кролика наряду с известными тайтином-1 и тайтином-2 обнаружили более высокомолекулярную белковую полосу, происхождение которой объяснили агрегацией T1 и T2 [106]. В 2003 г. были опубликованы данные, демонстрирующие на электрофореграммах левого желудочка сердца собаки наряду с известными N2BA-, N2B-изоформами и T2-фрагментами тайтина присутствие более высокомолекулярных двойных белковых полос, названных агрегатами тайтина [135]. Не исключалась также и вероятность агрегации тайтина с нуклеиновыми кислотами (Макаренко И.В., персональное сообщение). Проведенная нами окраска полиакриламидных гелей, укрепленных агарозой, бромистым этидием не выявила присутствия в NT-изоформах тайтина нуклеиновых кислот [174, 175]. Однако эти результаты не исключили вероятности агрегирования разных форм тайтина с образованием более высокомолекулярных агрегатов этого белка. Полагая, что молекулярные массы агрегатов тайтина должны значительно превышать полученные нами значения (3770–3910 кДа), мы задались целью выявить большие различия в электрофоретической подвижности NT-изоформ. Для решения этой задачи была разработана методика ДСН-электрофореза в крупнопористом полиакриламидном (1.0–1.3%) горизонтальном геле размером 8×13 см с добавлением агарозы [170]. Действительно, в подобном геле были выявлены более значительные различия в электрофоретической подвижности известных и новых изоформ тайтина (рис. 5).

С использованием в качестве стандартов ТЦМ (205 кДа) и небулина скелетных мышц животных и человека (770–890 кДа) [104–106] были проведены оценки молекулярных масс NT-, N2A-, N2BA-, N2B-изоформ и T2-фрагментов тайтина. Полученные результаты оказались весьма неожиданными. В частности, значения молекулярных масс T2-фрагментов, а также N2B- и N2A-изоформ тайтина составили ~2100–2300 кДа и ~2400–2800 кДа соответственно и совпали с известными значениями для изоформ T1 [105, 106] (рис. 3). Значения молекулярных масс NT-изоформ тайтина составили 3230–3730 кДа

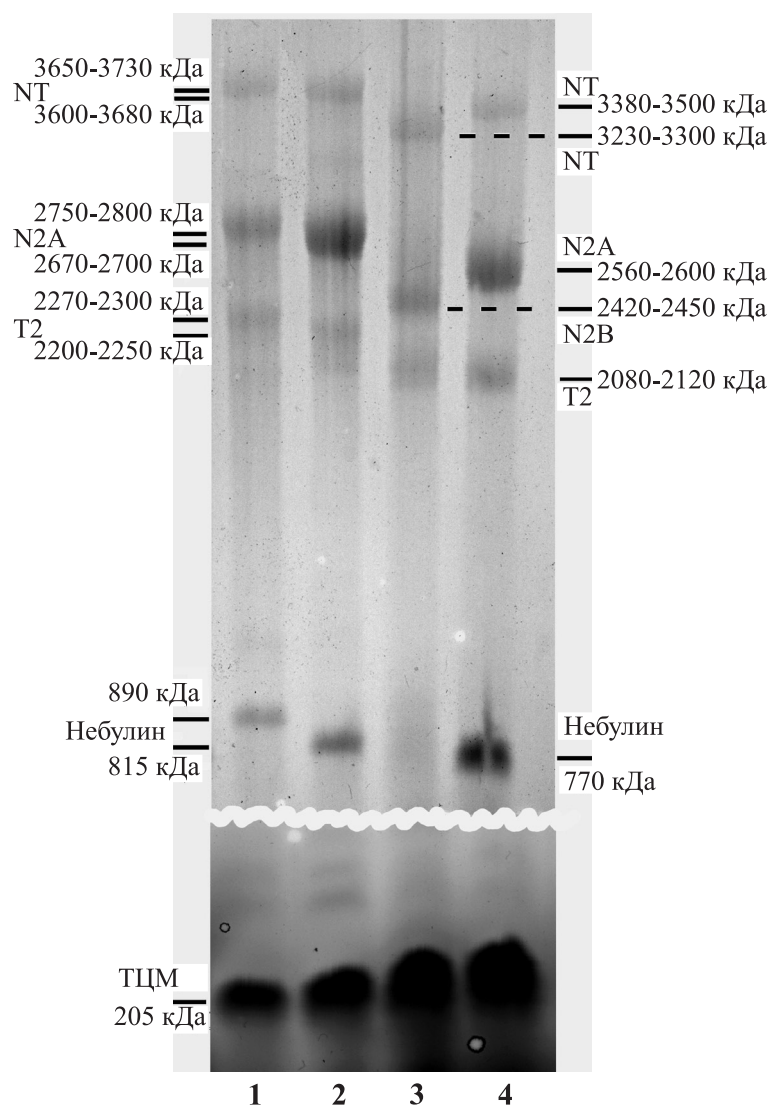


Рис. 5. Изоформный состав тайтина в поперечно-полосатых мышцах млекопитающих. Электрофорез проведен в горизонтальном геле с содержанием полиакриламида 1.3% и агарозы 0.6%.

1 – m. vastus lateralis (человек); 2 – m. soleus (кролик); 3 – ЛЖ сердца (суслик); 4 – m. psoas (кролик). При оценке молекулярной массы разных форм тайтина в качестве стандартов были использованы: тяжелые цепи миозина (205 кДа), небулин (770 кДа) m. psoas кролика и небулин (890 кДа) скелетных мышц человека [104, 106].

(рис. 5) и с большой точностью совпали со значениями для интактных N2B (~3000 кДа), N2BA (3200–3350 кДа) и N2A (3400–3700 кДа) изоформ тайтина, синтезирующихся в мышцах млекопитающих [8, 117]. Учитывая полученные результаты, мы предположили, что NT – это интактные изоформы тайтина, тогда как N2A-, N2BA- и N2B-изоформы тайтина, выявляемые электрофоретическим методом, – фрагменты этого белка [170, 173–175]. Нами были получены и другие результаты, подтверждающие это предположение. В частности, при использовании полиакриламидного (1.9–2.1%) вертикального геля размером 14.5×16.0 см, укрепленного агарозой, на электрофореграммах сердечной мышцы млекопитающих мы наблюдали двойные полосы NT-тайтина с молекулярной массой ~3300–3400 кДа [176]. При этом на электрофореграммах скелетных мышц мы всегда наблюдали одиночную полосу NT-тайтина с молекулярной массой ~3600–3700 кДа. Эти результаты согласуются с данными о присутствии двух изоформ тайтина (N2BA и N2B) в сердечной мышце и только одной изоформы (более длинной или более короткой изоформы N2A-изоформы) в скелетных мышцах млекопитающих [8, 117, 123]. Веским аргументом в поддержку нашего предположения, с одной стороны, послужили результаты Вестерн-блоттинга тайтина с антителами к N- и C-концам его молекулы, подтвердившие интактность NT-изоформ и не обнаружившие взаимодействия N2BA-изоформы с антителами к N-концу молекулы тайтина [176]. Однако с другой стороны, эти данные, выявившие также интактность N2A- и N2B-изоформ тайтина, противоречили нашему предположению. Анализируя полученные результаты, а также литературные данные, подтверждающие интактность известных изоформ тайтина методом Вестерн-блоттинга [120, 136], мы сделали заключение о том, что в саркомерах поперечно-полосатых мышц млекопитающих наряду с известными интактными изоформами тайтина (N2A, N2BA, N2B) присутствуют более высокомолекулярные изоформы этого белка (NT) [56, 176]. Следует отметить, что недавно зарубежными исследователями были получены данные, подтверждающие это заключение. В частности, в поперечно-полосатых мышцах мутантных крыс были обнаружены более высокомолекулярные, чем N2A, N2BA и N2B, изоформы тайтина [177–179]. Результаты наших исследований свидетельствуют о присутствии подобных изоформ тайтина в сердечной и скелетных мышцах млекопитающих в норме.

Однако, несмотря на полученные интересные результаты, мы не были до конца уверены в том, что NT-изоформы тайтина – не агрегаты его более низкомолекулярных изоформ и их фрагментов. Если это

так, то протеолитическое расщепление тайтина, сопровождающееся увеличением содержания его фрагментов, должно приводить к увеличению содержания агрегатов. С целью проверки этого предположения мы провели эксперименты по протеолитическому расщеплению тайтина в мышечной ткани под действием эндогенных протеаз [56] (рис. 6). Было обнаружено, что протеолиз тайтина в *m. soleus* в течение 30–60 минут приводил к снижению (в 6–7 раз) содержания NT-изоформы тайтина и двукратному снижению содержания его N2A-изоформы (рис. 6, дорожки 1, 2). При этом на электрофореграммах наблюдалось значительное увеличение содержания T2-фрагментов тайтина, а также появление полосы с молекулярной массой ~3200–3300 кДа (T3300), которая, вероятно, является продуктом деградации NT-тайтина. Протеолиз тайтина в сердечной мышце в течение 30–60 минут приводил к уменьшению в 2–3 раза содержания NT- и N2BA-изоформ тайтина (рис. 6, дорожки 3–4). При этом наблюдалось увеличение содержания не только T2-фрагментов, но и N2B-изоформы тайтина, что можно объяснить присутствием в этой белковой полосе фрагментов NT- и N2BA-изоформ тайтина. Правильность этого объяснения подтверждают данные, показывающие, что общее содержание тайтина (относительно содержания ТЦМ) в мышцах в результате 30–60-минутного протеолиза не изменилось [56] (рис. 6, дорожки 1–4).

Двухчасовой протеолиз приводил к почти полному разрушению NT-изоформы тайтина и T3300 в *m. soleus*, что также сопровождалось увеличением T2-фрагментов (рис. 6, дорожки 5, 6). Однако при этом не было выявлено ожидаемого более значительного уменьшения содержания N2A-изоформы тайтина, содержание которой хотя и было снижено (в ~1.5 раза) по сравнению с контрольной мышцей, но было выше, чем в *m. soleus* после одночасового протеолиза (рис. 6, дорожка 2). Полученный результат можно объяснить тем, что на электрофореграмме в полосе N2A-изоформы тайтина присутствуют фрагменты T3300 и NT-изоформы тайтина. В сердечной мышце двухчасовой протеолиз приводил к полной деградации NT- и N2BA-изоформ тайтина, а также снижению (в ~2 раза) содержания его N2B-изоформы, что сопровождалось увеличением (в 5–7 раз) содержания T2-фрагментов (рис. 6, дорожки 7, 8).

Таким образом, результаты проведенного исследования не подтвердили гипотезу агрегационного происхождения NT-изоформ тайтина. Более того, были получены новые доказательства правильности нашего предположения о том, что известные изоформы тайтина, выявляемые электрофоретическим методом, могут являться

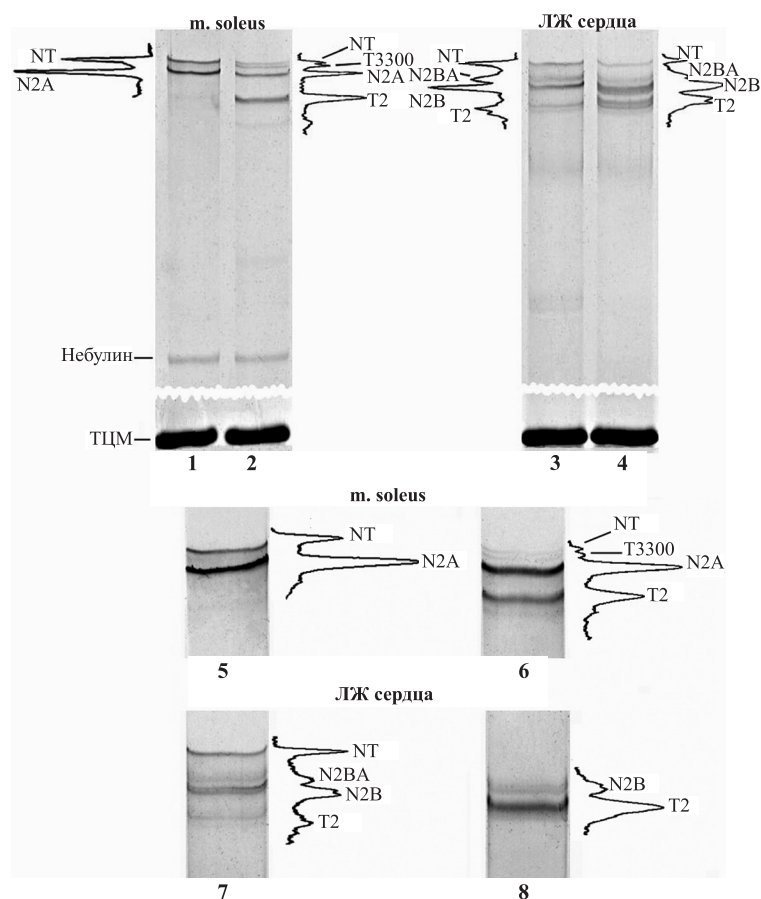


Рис. 6. Протеолитические изменения тайтина в мышцах суслика. Электрофорез проведен в вертикальном геле размером 8×10 см с содержанием агарозы 0.55% и полиакриламида 2.1%.

1 – m. soleus (контроль); 2 – m. soleus (протеолиз, 1 час); 3 – левый желудочек сердца (контроль); 4 – левый желудочек сердца (протеолиз, 30 мин.). 5 – m. soleus (контроль); 6 – m. soleus (протеолиз, 2 часа); 7 – левый желудочек сердца (контроль); 8 – левый желудочек сердца (протеолиз, 2 часа). T3300 – протеолитический фрагмент NT-тайтина с молекулярной массой ~3300 кДа.

Протеолитическое расщепление тайтина проводилось под действием эндогенных мышечных протеаз. Для этого небольшие кусочки мышечной ткани весом 20–30 мг выдерживались в течение 30–120 минут при температуре 25–30°C. Затем от мышечного образца брались кусочки весом 2–3 мг и помещались в солубилизирующий раствор (10 мМ трис-HCl, 1–1.2% ДСН, 10% глицерина, 2% β-меркаптоэтанол или 75 мМ ДТТ, 8–10 мкг/мл леупептина или Е64, pH 6.8–7.0.) для экстракции белков с целью их дальнейшего электрофоретического тестирования.

фрагментами более высокомолекулярных интактных NT-изоформ этого белка. Наши данные, подтверждающие интактность N2A- и N2B-тайтина методом Вестерн-блоттинга [176], можно объяснить тем, что в этих белковых полосах присутствуют фрагменты NT-изоформ, содержащие как N-, так и C-концы молекулы тайтина.

Почему другие исследователи не обнаруживают NT-изоформы тайтина на электрофореграммах поперечно-полосатых мышц млекопитающих? Ниже приведены результаты, которые предлагают ответы на этот вопрос.

ВЛИЯНИЕ НАГРЕВАНИЯ И КИПЯЧЕНИЯ ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКИХ ПРОБ НА СОДЕРЖАНИЕ ТАЙТИНА

Известно, что с целью лучшей солубилизации белков в растворе, содержащем ДСН, а также для предотвращения образования возможных белковых агрегатов проводится кипячение электрофоретических проб в течение нескольких минут перед проведением гель-электрофореза. При электрофоретическом изучении тайтина рекомендуется добавлять в экстрагирующий раствор ингибиторы протеаз (леупептин, Е64) для предотвращения возможного протеолиза тайтина эндогенными мышечными протеазами во время нагревания и кипячения пробы [180–182]. Однако рядом авторов были получены результаты, свидетельствующие о разрушении тайтина при кипячении электрофоретических проб [106, 116, 135, 183]. Учитывая это, авторы рекомендовали не кипятить электрофоретические пробы с тайтином, а только нагревать их при температурах 57–65°C, при которых не наблюдались деструктивные изменения в этом белке [106, 135]. Кроме этого, подобная термическая обработка электрофоретических проб, по мнению вышеуказанных авторов, также необходима для лучшей экстракции тайтина из мышечной ткани и для разрушения возможно формирующихся его более высокомолекулярных агрегатов [106, 135]. Полученные нами в 2000 г. результаты свидетельствовали о разрушающем действии на тайтин-1 температур выше 40°C [184], поэтому в дальнейших наших исследованиях мы не нагревали электрофоретические пробы с тайтином выше указанной температуры. Однако после такой термической обработки, по данным зарубежных авторов [106, 135], все же могли сохраняться возможно формирующиеся агрегаты тайтина. Не исключая вероятность того, что NT-изоформы тайтина могут быть агрегатами, разрушение которых должно происходить при 57–65°C [106, 135], мы изучили влияние нагревания мышечных ДСН-экстрактов (в диапазоне температур 20–100°C) на содержание

в них тайтина. Наши электрофоретические исследования снова не подтвердили «агрегатную» версию происхождения NT-изоформ тайтина. В частности, 20-минутное выдерживание при 60–65°C ДСН-экстрактов мышечной ткани поперечно-полосатых мышц животных приводило к уменьшению (в ~2 раза) содержания, но не разрушению NT-изоформ тайтина [170]. Разрушение NT-изоформ тайтина, сопровождающееся их отсутствием на электрофореграммах, наблюдалось после предварительного 15-минутного нагревания электрофоретических проб при 75–80°C (сердечная мышца) и 80–90°C (скелетные мышцы) [170]. Однако при этом наблюдалось и значительное снижение (в 1.5–2 раза) содержания N2A-, N2BA- и N2B-изоформ тайтина, не являющихся, как известно, агрегатами этого белка. Кипячение электрофоретических проб приводило к более значительному уменьшению (в 3–7 раз) содержания N2A-, N2BA- и N2B-изоформ тайтина. При этом была выявлена прямая зависимость между продолжительностью кипячения и снижением содержания этого белка [56, 170]. Таким образом, полученные нами результаты не подтвердили «агрегатную» версию происхождения NT-изоформ тайтина, но подтвердили данные других авторов о сильном разрушающем действии на этот белок температур выше 70°C [106, 116].

Следует также указать на другой важный результат, полученный в наших исследованиях. Мы показали, что не только кипячение, но и рекомендуемое зарубежными авторами нагревание электрофоретических проб при 57–65°C [106, 135] приводит к артефактам в данных о содержании тайтина, например, к изменению соотношения N2BA- и N2B-изоформ [56, 170]. Рекомендуемая нами максимальная температура нагревания мышечных ДСН-экстрактов, при которой на электрофореграммах не было выявлено изменений в содержании тайтина, составляет 35°C [56, 170]. Учитывая полученные результаты, можно говорить о необходимости критического пересмотра имеющихся в научной литературе данных о качественном и количественном составе тайтина в мышцах человека и животных в норме и его изменениях при адаптационных и патологических процессах [83, 105–116, 118–164, 177, 178, 235, 255].

V. ЭКСПЕРИМЕНТЫ ПО ВЫДЕЛЕНИЮ ИЗОФОРМ ТАЙТИНА

«At present we have not yet been successful in the isolation of the mother molecule, α -connectin. What has been isolated independently in Japan, the United States, and the United Kingdom is its proteolytic product, β -connectin... ...isolation of α -connectin does not seem impossible.» (Maruyama, 1986) [39].

Дальнейшие наши эксперименты были направлены на выделение NT-изоформ тайтина с целью исследования *in vitro* их структурно-функциональных свойств. Для этого мы провели выделение и очистку тайтина из поперечно-полосатых мышц животных по методу [185], позволяющему, по мнению авторов, получать интактный T1 со средней длиной молекул ~900 нм. Наши электронно-микроскопические наблюдения показали, что большинство одиночных выпрямленных молекул тайтина поперечно-полосатых мышц животных (кролик, суслик, песчанка) действительно имело длину ~850–900 нм [56, 57]. При этом некоторые молекулы были длинной 1.0–1.1 мкм, что согласовывалось с литературными данными для интактного T1 из сердечной и скелетных мышц кролика [55]. Для подтверждения интактности выделенных изоформ тайтина и оценки их количества мы провели электрофоретический анализ очищенных препаратов этого белка в 2% полиакриламидном геле, укрепленном агарозой, и получили неожиданные результаты [56, 57, 186]. Было обнаружено, что электрофоретическая подвижность тайтина, выделенного из быстрых и медленных скелетных мышц животных соответствует электрофоретической подвижности его T2-фрагментов с молекулярной массой ~2000–2100 кДа. При этом на электрофореграммах не было обнаружено присутствия NT- и N2A-изоформ тайтина [56, 57, 186]. Препараты сердечного тайтина содержали ~95% T2-фрагментов и ~5% N2B-изоформы этого белка. Перефразируя слова К. Маруямы [39], можно сказать, что наши попытки выделить интактные изоформы тайтина в количестве, достаточном для изучения их структурно-функциональных свойств, оказались безуспешными. Назрела необходимость разработки новых методик выделения интактных молекул тайтина, изоляция которых, по мнению К. Маруямы, возможна. Первые шаги в этом направлении уже делаются в нашей лаборатории. В частности, с помощью разработанного нами способа выделения тайтина [186] были получены препараты этого белка из сердечной мышцы животных с 40–50%

содержанием N2B-изоформы [187]. Методом кругового дихроизма было выявлено увеличение β -складчатой структуры в препаратах тайтина, полученных по новой методике, что также может свидетельствовать о большем содержании в них интактных молекул этого белка. В сравнении с менее выраженным активирующим (в 1.3–1.5 раза) эффектом T2 на АТФазную активность актомиозина *in vitro* выявлено двукратное ее увеличение в присутствии тайтина, содержащего 40–50% N2B-изоформы. Полученные результаты подтверждают участие тайтина в регуляции актин-миозинового взаимодействия в мышцах. Нами проводятся дальнейшие эксперименты, направленные на выделение из поперечно-полосатых мышц животных изоформ тайтина и изучение их структуры и функциональных свойств.

VI. ВКЛАД ИЗМЕНЕНИЙ ИЗОФОРМНОГО СОСТАВА ТАЙТИНА В ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ МЫШЦ МЛЕКОПИТАЮЩИХ ПРИ ГИБЕРНАЦИИ И МИКРОГРАВИТАЦИИ

Вследствие невозможности выделения NT-изоформ тайтина, изучение их структурно-функциональных свойств *in vitro* является пока невыполнимой задачей. Однако мы провели сравнительное исследование изоформных трансформаций тайтина в мышцах млекопитающих при адаптационных и патологических процессах с целью выяснения их вклада в изменения структуры и сократительных свойств мышц. В этой главе рассматриваются результаты изучения адаптационных изменений в мышцах при зимней спячке (гибернации) и в условиях микрогравитации.

Сравнительное изучение последствий мышечной невостремованности при гибернации и микрогравитации насчитывает не один десяток лет [188]. При этом исследователи обращали внимание на тот факт, что атрофические изменения в мышцах в условиях микрогравитации приводят к длительному нарушению их сократительных свойств [189, 190], тогда как атрофические изменения в мышцах гибернирующих животных не сопровождаются подобными нарушениями [191]. В частности, показано, что восстановление структурно-функциональных характеристик атрофированных в условиях микрогравитации мышц происходит в течение нескольких недель или месяцев [192], тогда как зимоспящие животные после длительного периода обездвиженности способны за несколько часов перейти к нормальной двигательной активности без патологических последствий [191]. Поскольку тайтин

играет важную роль в поддержании высокоупорядоченной саркомерной структуры и сократительной активности мышечных волокон [80], мы предположили, что атрофия мышц при гибернации и микрогравитации может сопровождаться разнонаправленными изменениями в содержании и/или изоформном составе этого белка. Для проверки этого предположения было проведено сравнительное изучение изменений изоформного состава тайтина в поперечно-полосатых мышцах зимоспящего длиннохвостого суслика (*Spermophilus undulatus*) при гибернации и в мышцах млекопитающих в условиях моделируемой и реальной микрогравитации.

РОЛЬ NT-ИЗОФОРМ ТАЙТИНА В ПОДДЕРЖАНИИ
СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ХАРАКТЕРИСТИК
ПОПЕРЕЧНО-ПОЛОСАТЫХ МЫШЦ ЗИМОСПЯЩИХ ЖИВОТНЫХ
В ПЕРИОД ГИБЕРНАЦИИ

Якутский длиннохвостый суслик (*Spermophilus undulatus*) относится к истинным (облигатным) гибернантам, для которых характерна четкая сезонная динамика перестройки метаболизма. Сезон спячки у таких животных продолжается 5–8 месяцев и состоит из циклов (баутов) продолжительностью от 7–10 до 30 суток, за которыми следуют кратковременные пробуждения на период от нескольких часов до суток [193]. Проведенные исследования показали, что изменения структурно-функциональных свойств миозина и связанных с ним белков (С-белка, Х-белка) вносят вклад в адаптацию поперечно-полосатых мышц зимоспящих животных к условиям гибернации [194–201]. Изучение роли тайтина в адаптации мышц истинных гибернантов к условиям зимней спячки ранее не проводилось.

Результаты наших исследований показали, что после 10–14-суточного баута спячки в сердечной и скелетных (m. soleus, m. psoas, m. longissimus dorsi, m. gastrocnemius, m. quadriceps femoris) мышцах длиннохвостого суслика наблюдалось уменьшение в ~1.5 раза содержания N2A-, N2BA-, N2B-изоформ тайтина и 1.5–3 раза T2-фрагментов [167, 202–204] (рис. 7). При этом содержание NT-изоформ тайтина в период спячки не изменялось или даже незначительно возрастало. Повышенное содержание NT-изоформ тайтина относительно содержания известных его изоформ сохранялось в мышцах пробуждающихся и активных межбаутных животных [203, 204]. Снижение содержания тайтина в период спячки, вероятно, объясняется незначительной активностью кальций-зависимых протеаз кальпаинов на фоне ингибирования синтеза белка [205–208] в этот период.

Каковы возможные последствия снижения содержания тайтина? Показано, что уменьшение содержания T1 в скинированных волокнах

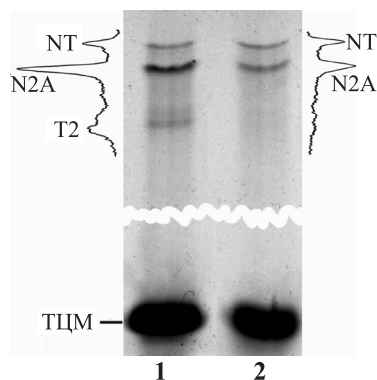


Рис. 7. Сезонные изменения изоформного состава тайтина в *m. gastrocnemius* (med.) длиннохвостого суслика.

Электрофорез проведен в вертикальном геле размером 8×10 см с содержанием агарозы 0.55% и полиакриламида 2.1%.

1 – летняя активность;

2 – зимняя спячка (гибернация).

скелетных мышц кролика в результате действия ионизирующей радиации приводило как к нарушению высокоупорядоченной структуры саркомеров, так и к снижению силы сокращения мышцы [80]. Обнаружено, что снижение содержания тайтина при развитии сердечных патологий также приводит к нарушению саркомерной структуры кардиомиоцитов [209]. Учитывая эти данные, можно было ожидать структурно-функциональные нарушения и в мышцах зимоспящих сусликов, вследствие уменьшения содержания тайтина. Однако результаты наших электронно-микроскопических исследований не выявили нарушений саркомерной структуры сердечной и скелетных мышц спящих и активных сусликов [210], что согласуется с ранее полученными данными [211, 212]. При этом в работе [211] не было обнаружено нарушений сократительной способности одиночных демембранизированных волокон *m. psoas* у вышедших из спячки сусликов. Известны данные об отсутствии изменений таких сократительных параметров, как максимальной скорости сокращения, времени сокращения, полупериода расслабления мышцы, латентного периода, измеренных при температурах 22°C и 37°C, в медленных и быстрых скелетных мышцах активных и спящих хомяков (*Mesocricetus auratus*) [213]. Не было выявлено достоверных изменений в указанных выше сократительных параметрах, а также значительного снижения силы сокращения атрофированной скелетной мышцы (*m. tibialis anterior*) черного медведя (*Ursus americanus*) после продолжительного периода спячки [214]. Не зарегистрировано изменений сократительных параметров, в частности, силы сокращения, измеренных при 25°C, скелетных мышц активных, спящих и пробуждающихся летучих мышей (*Murina leucogaster ognevi*) [191]. Показано, что, несмотря на 25% снижение массы миокарда и ~10–15% снижение общего содержания N2BA- и N2B-изо-

форм тайтина у гибернирующего медведя (*Ursus arctos horribilis*), такие характеристики сокращения сердечной мышцы, как диастолический объем, ударный объем и фракция выброса левого желудочка не изменялись в период спячки [155]. Не выявлено нарушений сократительной способности папиллярной мышцы сердца у пробуждающихся (температура сердечной мышцы +25–30°C) и вышедших из спячки сусликов (*Spermophilus undulatus*) [215]. Более того, известны данные об увеличении силы одиночного сокращения сердечной мышцы суслика (*Citellus dauricus*) в период спячки [216], что указывает на отсутствие структурных нарушений в миокарде.

Как объяснить явное противоречие, заключающееся в том, что, несмотря на уменьшение содержания тайтина, у зимоспящих животных отсутствуют нарушения саркомерной структуры и сократительной функции мышц? Анализ полученных нами результатов и литературных данных позволил сделать заключение о том, что одной из причин отсутствия подобных нарушений является сохранение NT-изоформ тайтина, необходимых для поддержания упорядоченной саркомерной структуры и нужного уровня сократительной активности мышц в разные периоды гибернации [56, 204]. Полученные данные также позволили предположить, что главную роль в поддержании структурно-функциональных характеристик мышц играют NT-изоформы тайтина. Следует заметить, что полученные нами результаты можно отнести в поддержку предположения о том, что N2A-, N2BA- и N2B-изоформы тайтина являются фрагментами [170], поэтому снижение их содержания в мышцах суслика в период спячки не сопровождается нарушением саркомерной структуры и сократительной функции поперечно-полосатых мышц.

С целью проверки предположения о ведущей роли NT-изоформ тайтина мы провели исследование изменений изоформного состава этого белка и структурно-функциональных свойств поперечно-полосатых мышц млекопитающих в условиях моделируемой и реальной микрогравитации.

ИЗМЕНЕНИЯ ИЗОФОРМНОГО СОСТАВА ТАЙТИНА И СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ СВОЙСТВ ПОПЕРЕЧНО-ПОЛОСАТЫХ МЫШЦ МЛЕКОПИТАЮЩИХ В УСЛОВИЯХ МИКРОГРАВИТАЦИИ

Известно, что пребывание человека и животных в условиях реальной или моделируемой (антиортостатическая постельная гипокinezия, «сухая» иммерсия, модель вывешивания) микрогравитации приводит к развитию в скелетных позно-тонических мышцах структурно-функциональных изменений [189, 190]. Комплекс этих изменений можно

представить, как своеобразный «гипогравитационный мышечный синдром», который при кратковременных (2–5 суток) воздействиях микрогравитации проявляется в снижении мышечного тонуса и силы мышечных сокращений, а также мышечной гиперрефлексией и координационными нарушениями [189, 217, 218]. Более длительное пребывание в условиях микрогравитации приводит к развитию мышечной атрофии [189, 218, 219–222], деструктивным изменениям в тонких нитях [221, 223], повышению деградации тяжелых цепей миозина [224], снижению содержания небулина и Х-белка [167, 225, 226], нарушению саркомерной структуры [227, 228] и целостности дистрофинового слоя сарколеммальной мембраны [229, 230], дезорганизации десминовых филаментов [231], увеличению объема экстрацеллюлярного матрикса [232], а также дальнейшему снижению тонуса, выносливости и общей работоспособности мышц [189]. Эти перестройки сопровождаются сдвигами внутриклеточных процессов, приводящих к изменению уровня синтеза саркомерных белков скелетных мышц, в частности, трансформации миозинового фенотипа в сторону увеличения доли быстрых изоформ тяжелых цепей миозина [222, 233, 234]. В наибольшей степени, описанные выше изменения наблюдаются в камбаловидной мышце (*m. soleus*), состоящей на 85–90% из медленных волокон. Учитывая наши результаты об отсутствии нарушений саркомерной структуры и сократительной функции в мышцах зимоспящих сусликов при сохранении содержания NT-изоформ тайтина [56, 204, 210], мы предположили, что описанные выше нарушения в мышцах в условиях микрогравитации будут сопровождаться снижением содержания, прежде всего, этих изоформ.

Изменения изоформного состава тайтина и нарушения структурно-функциональных свойств m. soleus человека и крысы в условиях моделируемой микрогравитации

На момент проведения наших исследований было известно, что 3-суточное вывешивание крысы не сопровождалось снижением содержания тайтина и нарушением саркомерной структуры в *m. soleus* [235]. Однако вышеуказанные авторы обнаружили структурные различия в *m. soleus* контрольных и вывешенных крыс при растяжении мышцы. В частности, с помощью иммуноэлектронной микроскопии было показано, что при растяжении *m. soleus* расстояние между Z-дисксом и полосой, окрашенной антителами к I-области тайтиновой молекулы, было меньше (в ~1.35 раза) в саркомерах мышцы вывешенных, а не контрольных крыс [235]. На основании полученных данных авторы сделали заключение о снижении эластичности коннек-

тиновых (тайтиновых) нитей в *m. soleus* крысы после 3-суточного вывешивания. Поскольку на электрофореграммах *m. soleus* контрольных и вывешенных крыс не было выявлено различий в содержании и молекулярной массе α -коннектина (T1) и β -коннектина (T2), причину снижения эластичности тайтина после 3-суточной гравитационной разгрузки авторы не смогли объяснить. Однако они сделали предположение, что обнаруженные изменения могут вносить вклад в нарушение контрактильной функции *m. soleus* [235]. Были известны данные о нарушении саркомерной структуры в *m. soleus* кролика после 7-суточной моделируемой гравитационной разгрузки [227], что, вероятно, могло быть следствием снижения содержания тайтина, однако результатов, подтверждающих это, получено не было. Снижение содержания N2A-изоформы тайтина (в ~ 2 раза) было обнаружено в *m. soleus* крыс после 14-суточной моделируемой гравитационной разгрузки, что сопровождалось уменьшением пассивного напряжения при растяжении мышцы [126]. Подобное уменьшение содержания T1 было зарегистрировано в *m. soleus* крысы после 6-недельной иммобилизации задней конечности, что приводило к снижению Ca^{2+} -чувствительности развития силы и структурным нарушениям в саркомерах указанной мышцы [152].

В наших исследованиях мы ожидали обнаружить значительное снижение содержания или разрушение NT-изоформы тайтина в *m. soleus* в условиях микрогравитации. Действительно, на электрофореграммах *m. soleus* крысы после 3-суточного вывешивания наблюдалось уменьшение (в ~ 1.6 раза) содержания NT-изоформы тайтина, что сопровождалось увеличением содержания T2-фрагмента и появлением фрагмента тайтина с молекулярной массой ~ 3300 кДа [176, 203, 236] (рис. 8, дорожка 3). При этом не было выявлено уменьшения содержания N2A-изоформы тайтина. Обнаруженные изменения сопровождалось снижением (в среднем на 15%) абсолютной силы Ca^{2+} -индуцированного сокращения скинированных волокон *m. soleus* вывешенных крыс [237], что подтвердило предположение японских авторов о возможном нарушении сократительной функции *m. soleus* после 3-суточного вывешивания [235]. Следует обратить внимание, что выявленное нами уменьшение содержания NT-изоформы тайтина, более длинной и более эластичной, чем N2A, объясняет снижение эластичности коннектиновых нитей в *m. soleus* крысы после 3-суточного вывешивания, обнаруженное японскими исследователями [235].

После семисуточной гравитационной разгрузки в *m. soleus* крысы и человека, как и в мышцах суслика во время спячки [204, 210] (рис. 7), наблюдалось уменьшение в ~ 1.6 раза содержания N2A-изо-

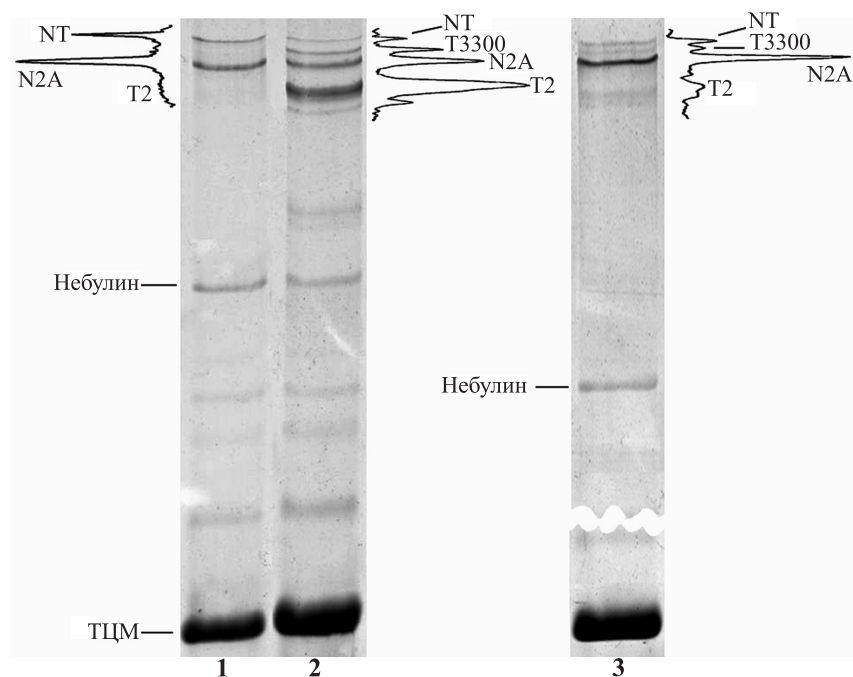


Рис. 8. Изменения изоформного состава тайтина в *m. soleus* крысы в условиях моделируемой микрогравитации. Электрофорез проведен в вертикальном геле размером 8×10 см содержанием агарозы 0.55% и полиакриламида 2.1–2.3%.

- 1 – *m. soleus* крысы (контроль);
- 2 – *m. soleus* крысы (7-суточное вывешивание);
- 3 – *m. soleus* крысы (3-суточное вывешивание).

формы тайтина [56, 176, 203] (рис. 8, дорожка 2). Однако при этом наблюдалось не сохранение, а уменьшение в ~3 раза содержания NT-изоформы тайтина, что сопровождалось почти двукратным снижением максимальной изометрической силы мышечных волокон *m. soleus* человека [176, 238, 239]. Обнаруженные нами деструктивные изменения тайтина, играющего важную роль в поддержании не только сократительной способности, но и саркомерной структуры мышечных волокон [80, 209] позволяют объяснить данные о нарушении высокоупорядоченной саркомерной организации в *m. soleus* кролика после 7-суточной моделируемой гравитационной разгрузки [227].

Более длительное пребывание крыс в условиях гравитационной разгрузки (14- и 30-суточное вывешивание) сопровождалось дальнейшими деструктивными изменениями в тайтине, в частности, полным

разрушением его NT-изоформы [176, 203]. Полученные результаты свидетельствуют о преобладании процессов протеолитической деградации тайтина над процессами синтеза этого белка в *m. soleus* в условиях моделируемой микрогравитации. Протеазами, ответственными за деградацию тайтина, по всей вероятности, являются кальпаины [240, 241], активность которых в мышце возрастает в первые сутки гравитационной разгрузки [242].

Таким образом, полученные нами результаты подтвердили важную роль тайтина в поддержании саркомерной структуры и сократительных свойств поперечно-полосатых мышц млекопитающих [80, 209]. Однако по нашим данным, основной вклад в нарушения этих свойств в *m. soleus* человека и животных в условиях микрогравитации вносит разрушение NT-, а не N2A-изоформы тайтина. Полученные данные подтвердили сделанное нами ранее предположение о главной роли NT-изоформ тайтина в поддержании структурно-функциональных характеристик поперечно-полосатых мышц млекопитающих. Для проверки этого предположения нами также были проведены исследования изменений изоформного состава тайтина и структурно-функциональных свойств поперечно-полосатых мышц монгольской песчанки (*Meriones unguiculatus*) после 12-суточного космического полета.

Изоформный состав тайтина и структурно-функциональные свойства поперечно-полосатых мышц монгольской песчанки после 12-суточного космического полета

Известно, что снижение сократительной способности волокон антигравитационных (постуральных) мышц вследствие их атрофии наблюдается у человека и животных после пребывания в условиях как моделируемой, так и реальной микрогравитации. В частности, после космических полетов длительностью от 5 до 18 суток обнаружено снижение амплитуды сокращения и Ca^{2+} -чувствительности изолированных скинированных волокон *m. soleus* и других скелетных мышц крысы [243–246]. Аналогичные изменения были обнаружены в *m. soleus* астронавтов после 17-суточного космического полета [247]. Атрофические изменения обнаружены и в сердечной мышце человека и крыс после 10–13-суточного пребывания в условиях реальной невесомости [248–250].

Учитывая наши результаты о значительном уменьшении содержания тайтина и, в первую очередь, его NT-изоформы в *m. soleus* крысы и человека в условиях моделируемой микрогравитации, мы предполагали обнаружить подобные изменения и в мышцах монгольской

песчанки после 12-суточного космического полета. Однако наше предположение не подтвердилось. По данным ДСН-гель-электрофореза не было обнаружено уменьшения содержания NT-изоформы в сердечной (левый желудочек) и скелетных (*m. tibialis anterior*, *m. soleus*, *m. gastrocnemius*) мышцах песчанок полетной группы [57, 251, 252]. При этом наблюдалось уменьшение содержания N2A-изоформы тайтина (в ~1.2–1.25 раза) в *m. soleus* и *m. gastrocnemius*, а также T2 (в ~1.5 раза) во всех скелетных мышцах песчанок группы «Полет». Эти изменения в тайтине не сопровождались нарушением саркомерной структуры [252] и сократительной функции [253] *m. soleus* песчанок полетной группы. В частности, при отсутствии изменений Ca^{2+} -чувствительности выявлено увеличение удельной силы волокон *m. soleus* песчанок полетной группы [253]. Следует обратить внимание на одинаковый характер изменений тайтина в мышцах песчанок в условиях невесомости и сусликов при гибернации [167, 202–204], а именно, на сохранение содержания NT-изоформ тайтина при снижении содержания других форм этого белка. Отметим, что и в том, и в другом случае обнаруженные изменения тайтина не сопровождались нарушением саркомерной структуры и сократительной способности поперечно-полосатых мышц этих животных. Полученные результаты свидетельствуют о важной роли NT-изоформ тайтина в поддержании структурно-функциональных характеристик поперечно-полосатых мышц млекопитающих. Правильность этого вывода также подтверждают результаты наших исследований эффективности разных подходов, снижающих или предотвращающих развитие мышечных нарушений в условиях микрогравитации, которые показали, что тенотомия мышц-антагонистов *m. soleus* крысы, а также стимуляция опорных зон стопы человека и крысы в условиях моделируемой микрогравитации предотвращают уменьшение содержания NT-тайтина и, вместе с этим, развитие «гипогравитационного мышечного синдрома» в камбаловидной мышце [56, 171, 254].

VII. РАЗРУШЕНИЕ NT-ИЗОФОРМ ТАЙТИНА В МЫШЦАХ МЛЕКОПИТАЮЩИХ ПРИ РАЗВИТИИ ПАТОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ

Известно, что патогенез ряда мышечных заболеваний сопровождается как изменением изоформного состава тайтина, так и снижением содержания этого белка [10, 14–16, 122, 124, 125, 129, 133, 134, 138, 140, 149, 151, 154, 157, 158, 161, 163, 209, 255–261], что вносит свой вклад

в нарушение структуры [209, 258, 260, 261] и сократительных свойств поперечно-полосатых мышц млекопитающих. Опираясь на наши результаты, подтверждающие ведущую роль NT-изоформ тайтина в поддержании саркомерной структуры и сократительной функции сердечной и скелетных мышц млекопитающих, мы предположили, что развитие патологических процессов будет приводить к снижению содержания или разрушению, прежде всего, этих изоформ тайтина. Для проверки этого предположения мы провели исследования изменений изоформного состава тайтина в гипертрофированном миокарде спонтанно-гипертензивных крыс (SHR) и в мышцах человека при развитии дилатационной кардиомиопатии (ДКМП), синдрома «ригидного человека» и постинсультной мышечной спастичности.

Гипертрофические изменения в сердце крыс линии SHR обусловлены в большей степени гипертрофией левого желудочка. Проведенные морфологические исследования гипертрофированного миокарда этих животных выявили большое количество кардиомиоцитов (КМЦ) с контрактурными повреждениями и субсегментарными контрактурами [262, 263]. В частности, было обнаружено, что в одной и той же клетке одни миофибриллярные пучки находились в состоянии сокращения, другие – в состоянии расслабления [262, 263]. При этом в некоторых КМЦ миофибриллярные пучки располагались под прямым углом друг к другу, что свидетельствовало о нарушении пространственной ориентации миофибрилл [263]. Учитывая эти данные, мы ожидали обнаружить в сердечной мышце спонтанно-гипертензивных крыс значительное уменьшение содержания тайтина и, прежде всего, его NT-изоформ. Действительно, по данным ДСН-гель-электрофореза в предсердиях и ЛЖ сердца 15-недельных и 26-недельных SHR-крыс обнаружено уменьшение содержания NT (в 2–3 раза), N2BA и N2B (1.5–2 раза) изоформ тайтина [173, 176, 264]. При этом почти в половине случаев на электрофореграммах сердечной мышцы этих животных NT-тайтин отсутствовал. Наши результаты частично согласуются с данными других авторов, которые показали уменьшение содержания только N2BA-изоформы тайтина в миокарде крыс линии SHR [134]. Данные о повышении экспрессии протеазы кальпаина [265] и увеличении внутриклеточной концентрации Ca^{2+} [265, 266] в кардиомиоцитах спонтанно-гипертензивных крыс объясняют обнаруженные деструктивные изменения тайтина.

Более значительное уменьшение содержания NT-тайтина, чем его N2A-изоформы было выявлено в спинной мышце пациентов с синдромом «ригидного человека» («stiff-man syndrome», «stiff-person syndrome» [267, 268]) – редким заболеванием центральной нервной

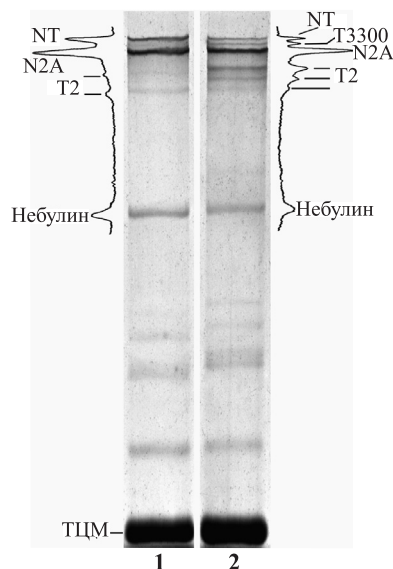


Рис. 9. Изменение изоформного состава тайтина в скелетной мышце пациента с постинсультной мышечной спастичностью.

Электрофорез проведен в вертикальном геле размером 8×10 см с содержанием агарозы 0.55% и полиакриламида 2.3%.

1 – m. soleus человека (контроль);

2 – m. soleus пациента с постинсультной мышечной спастичностью.

системы, характеризующимся прогрессирующей ригидностью и болезненными мышечными спазмами аксиальной мускулатуры и проксимальных групп мышц. В частности, на электрофореграммах скелетной мышцы *erector spinae* двух пациентов с синдромом «ригидного человека» обнаружено уменьшение в 4–5 раз содержания NT-изоформы и в 1.5–2 раза содержания N2A-изоформы тайтина, что сопровождалось увеличением в ~3 раза содержания протеолитических T2-фрагментов этого белка [176, 269, 270]. На электрофореграмме спинной мышцы третьего пациента с этим заболеванием NT-тайтин отсутствовал [270]. Уменьшение в 2–3 раза содержания NT-изоформы тайтина при незначительном уменьшении содержания N2A-тайтина было выявлено в m. soleus четырех пациентов с постинсультной мышечной спастичностью (неопубликованные данные, рис. 9). Несомненно, что значительное уменьшение содержания тайтина и, главным образом, его NT-изоформ вносит вклад в развитие изученных патологических процессов.

Полное разрушение NT-тайтина было обнаружено нами в миокарде четырех пациентов с конечной стадией развития ДКМП [172, 176, 203]. При этом наблюдалось уменьшение (в ~2–2.5 раза) содержания N2BA- и N2B-изоформ тайтина, что подтверждает данные о значительной деградации T1 в миокарде человека при ДКМП [256, 257]. Поскольку имеются данные о подавлении экспрессии гена тайтина при ДКМП [140, 271], можно утверждать, что уменьшение содержания тайтина в

патологическом миокарде является следствием преобладания процессов протеолиза над процессами синтеза этого белка. Известно, что уменьшение содержания тайтина при развитии ДКМП приводит к нарушению упорядоченной саркомерной структуры и снижению сократительной способности мышечных волокон миокарда человека [209, 261] и животных [260]. Мы полагаем, что основной вклад в эти нарушения вносит разрушение NT-изоформ тайтина.

VIII. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Подводя итог проведенным исследованиям, следует отметить, что нами получены экспериментальные доказательства существования в поперечно-полосатых мышцах млекопитающих наряду с известными N2A-, N2BA- и N2B-изоформами тайтина более высокомолекулярных изоформ этого белка, названных нами NT-изоформами. Сравнительные исследования изменений изоформного состава тайтина и структурно-функциональных свойств поперечно-полосатых мышц человека и животных при адаптационных и патологических процессах позволяют сделать заключение о ведущей роли NT-изоформ тайтина в поддержании саркомерной структуры и сократительной функции указанных мышц. Помимо фундаментальной ценности, полученные результаты имеют большое практическое значение, поскольку тестирование изменений качественного и количественного состава тайтина в мышцах может быть использовано в медицинской практике с целью диагностики развития патологических процессов и оценки эффективности подходов к их коррекции. Однако предстоит еще большая работа для поиска ответов на вопрос о том, чем являются NT-изоформы: новыми изовариантами тайтина, его интактными изоформами или, возможно, другим белком, иммунологически идентичным с тайтином. Ответы на этот вопрос ждут своих исследователей.

Выражаем благодарность Л.А.Цховребовой и Дж.Тринику за предоставленные антитела к тайтину. Благодарим сотрудников лаборатории механизмов природных гипометаболических состояний (ИБК РАН, Пущино) за проведение всех необходимых оценок физиологического состояния зимоспящих сусликов и подготовку животных к экспериментам. Выражаем благодарность проф. Б.С.Шенкману и сотрудникам его лаборатории (ГНЦ РФ – ИМБП РАН, Москва) за организацию и проведение экспериментов, связанных с пребыванием человека и животных в условиях моделируемой или реальной микрогравитации, а также за предоставление экспериментального материала. Благодарим проф. Е.А. Ильина и проф. Б.С.Шенкмана за полезные дискуссии. Благодарим академика РАМН Н.Н.Яхно и его коллег из Клиники нервных болезней им. А.Я. Кожевникова (Москва) за предоставление клинического материала и научные дискуссии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Wang, K., McClure, J., Tu, A. (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **76**, 3698–3702.
2. Maruyama, K., Kimura, S., Ohashi, K., Kuwano, Y. (1981) J. Biochem., **89**, 701–709.
3. Labeit, S., Kolmerer, B. (1995) Science, **270**, 293–296.
4. Gregorio, C.C., Granzier, H., Sormachi, H., Labeit, S. (1999) Curr. Opin. Cell Biol., **11**, 18–25.
5. Tskhovrebova, L., Trinick, J. (2010) J. Biomed. Biotechnol., 2010, Article ID 612482, 7 pages, doi: 10.1155/2010/612482.
6. Fürst, D.O., Osborn, M., Nave, R., Weber, K. (1988) J. Cell Biol., **106**, 1563–1572.
7. Fürst, D.O., Nave, R., Osborn, M., Weber, K. (1989) J. Cell Sci., **94**, 119–125.
8. Freiburg, A., Trombitás, K., Hell, W., Cazorla, O., Fougereusse, F., Centner, T., Kolmerer, B., Witt, C., Beckmann, J.S., Gregorio, C.C., Granzier, H., Labeit, S. (2000) Circ. Res., **86**, 1114–1121.
9. Guo, W., Bharmal, S.J., Esbona, K., Greaser, M.L. (2010) J. Biomed. Biotechnol., 2010, Article ID 753675, 8 pages, doi: 10.1155/2010/753675.
10. Granzier, H., Labeit, S. (2004) Circ. Res., **94**, 284–295.
11. Tskhovrebova, L., Trinick, J. (2004) J. Biol. Chem., **279**, 46351–46354.
12. Granzier, H.L., Labeit, S. (2006) Exerc. Sport Sci. Rev., **34**, 50–53.
13. Вихлянцева И.М., Подлубная З.А. (2007) Биофизика, **52**, 1030–1040.
14. Linke, W. (2008) Cardiovasc. Res., **77**, 637–648.
15. Linke, W.A., Krüger, M. (2010) Physiology (Bethesda), **25**, 186–198.
16. LeWinter, M.M., Granzier, H. (2010) Circulation, **121**, 2137–2145.
17. Ottenheijm, C.A., Granzier, H. (2010) Adv Exp Med Biol., **682**, 105–122.
18. Voelkel, T., Linke, W. (2011) Eur. J. Physiol., **4**, 143–154.
19. Gautel, M. (2011) Curr. Opin. Cell Biol., **23**, 39–46.
20. Huxley, A.F., Niedergerke, R. (1954) Nature, **173**, 971–973.
21. Huxley, H.E., Hanson, J. (1954) Nature, **173**, 973–976.
22. Hanson, J., Huxley, H.E. (1953) Nature, **172**, 530–532.
23. Hanson, J., Huxley, H.E. (1955) Symp. Soc. Exp. Biol., **9**, 228–264.
24. Huxley, H.E., Hanson, J. (1960) In book: Structure and function of muscle, Ed. Bourne G. H. (Acad. Press, New-York and London). **1**, 153–227.
25. Huxley, A.F., Peachy, L.D. (1961) J. Physiol., **156**, 150–165.
26. Sjöstrand, F.S. (1962) J. Ultrastruct. Res., **7**, 225–246.
27. Auber, J., Couteaux, R. (1963) J. Microsc., **2**, 309–324.
28. Garamvölgyi, N. (1965) J. Ultrastruct. Res., **13**, 409–429.
29. Carlsen, F., Fuchs, F., Knappeis, G.G. (1965) J. Cell Biol., **27**, 35–46.
30. McNeill, P.A., Hoyle, G. (1967) Amer. Zool., **7**, 483–498.
31. Guba, F., Harsanyi, V., Vajda, E. (1968) Acta Biochim. Biophys., **3**, 433–440.
32. Trombitás, K., Tigy-Sebes, A. (1974) Acta Biochim. Biophys. Sci. Hung., **9**, 243–253.
33. Locker, R.H., Leet, N.G. (1975) J. Ultrastruct. Res., **52**, 64–75.
34. Locker, R.H., Leet, N.G. (1976) J. Ultrastruct. Res., **56**, 31–38.
35. Bullard, B., Hammond, K.S., Luke, B.M. (1977) J. Mol. Biol., **115**, 417–440.

36. Dos Remedios, C.G., Gilmour, D. (1978) *J. Biochem.*, **84**, 235–238.
37. Trinick, J.A. (1981) *J. Mol. Biol.*, **151**, 309–314.
38. Trinick, J., Knight, P., Whiting, A. (1984) *J. Mol. Biol.*, **180**, 331–356.
39. Maruyama, K. (1986) *Int. Rev. Cytol.*, **104**, 81–114.
40. Лацабидзе И.Л. (1985) Электронно-микроскопическое изучение структуры миозин-содержащих нитей в составе анизотропных дисков поперечно-полосатых мышц позвоночных, Дисс. канд. биол. наук. Пушино, Ереванский Государственный Университет, с. 153.
41. Saide, J.D. (1981) *J. Mol. Biol.*, **153**, 661–679.
42. Ayme-Southgate, A., Philipp, R.A., Southgate, R.J. (2011) *Insect Mol. Biol.*, **20**, 347–356.
43. Bullard, B., Linke, W., Leonard, K. (2002) *J. Muscle Res. Cell Motil.*, **23**, 435–447.
44. Maruyama, K. (1976) *J. Biochem.*, **80**, 405–407.
45. Maruyama, K., Natori, R., Nomomura, Y. (1976) *Nature*, **262**, 58–60.
46. Maruyama, K., Kimura, S., Kuroda, M., Handa, S. (1977) *J. Biochem.*, **82**, 347–350.
47. Maruyama, K., Matsubara, R., Natori, Y., Nonomura, S., Kimura, S., Ohashi, K., Murakami, F., Handa, S., Eguchi, G. (1977) *J. Biochem.*, **82**, 317–337.
48. Maruyama, K., Murakami, F., Ohashi, K. (1977) *J. Biochem.*, **82**, 339–345.
49. Matsubara, S., Maruyama, K. (1977) *Jap. J. Physiol.*, **27**, 589–600.
50. Toyoda, N., Maruyama, K. (1978) *J. Biochem.*, **84**, 239–241.
51. Kimura, S., Maruyama, K. (1983) *J. Biochem.*, **94**, 2083–2085.
52. Wang, K. (1984) In book: *Contractile mechanisms in muscle*, Eds. G. H. Pollack and H. Sugi (Plenum. Press, New-York and London). 285–305.
53. Labeit, S., Lahmers, S., Burkart, C., Fong, C., McNabb, M., Witt, S., Witt, C., Labeit, D., Granzier, H. (2006) *J. Mol. Biol.*, **362**, 664–681.
54. Suzuki, J., Kimura, S., Maruyama, K. (1994) *J. Biochem.*, **116**, 406–410.
55. Tskhovrebova, L., Trinick, J. (1997) *J. Mol. Biol.*, **265**, 100–106.
56. Вихлянцев И.М. (2011) Полиморфизм тайтина поперечно-полосатых мышц в норме, при адаптации и патологии, Дисс. докт. биол. наук, Пушино, Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, с. 235.
57. Вихлянцев И.М., Окунева А.Д., Шпагина М.Д., Шумилина Ю.В., Молочков Н.В., Салмов Н.Н., Подлубная З.А. (2011) *Биохимия*, **76**, 1629–1639.
58. Liversage, A.D., Holmes D., Knight P.J., Tskhovrebova, L., Trinick, J. (2001) *J. Mol. Biol.*, **305**, 401–409.
59. Houmeida, A., Holt, J., Tskhovrebova, L., Trinick, J. (1995) *J. Cell Biol.*, **131**, 1471–1481.
60. Trombitás, K., Pollack, G.H. (1993) *J. Muscle Res. Cell Motil.*, **14**, 416–422.
61. Astier, C., Raynaud, F., Lebart, M.C., Roustan, C., Benyamin, Y. (1998) *FEBS Lett.*, **429**, 95–98.
62. Jin, J.P. (2000) *Adv. Exp. Med. Biol.*, **481**, 319–333, discussion 334–335.
63. Gutierrez-Cruz, G., Van Heerden, A.H., Wang, K. (2001) *J. Biol. Chem.*, **276**, 7442–7449.
64. Kulke, M., Fujita-Becker, S., Rostkova, E., Neagoe, C., Labeit, D., Manstein, D.J., Gautel, M., Linke, W.A. (2001) *Circ. Res.*, **89**, 874–881.
65. Linke, W.A., Kulke, M., Li, H., Fujita-Becker, S., Neagoe, C., Manstein, D.J., Gautel, M., Fernandez, J.M. (2002) *J. Struct. Biol.*, **137**, 194–205.
66. Podlubnaya, Z.A., Shpagina, M.D., Vikhlyantsev, I.M., Malyshev, S.L., Udaltsov, S.N., Ziegler, C., Beinbrech,

- G. (2003) *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, **33**, 789–793.
67. *Niederlander, N., Raynaud, F., Astier, C., Chaussepied, P.* (2004) *Eur. J. Biochem.*, **271**, 4572–4581.
 68. *Raynaud, F., Astier, C., Benyamin, Y.* (2004) *Biochim. Biophys. Acta*, **1700**, 171–178.
 69. *Bianco, P., Nagy, A., Kengyel, A., Szatmari, D., Mártonfalvi, Z., Huber, T., Kellermayer, M.S.* (2007) *Biophys. J.*, **93**, 2102–2109.
 70. *Fukushima, H., Chung, C.S., Granzier, H.* (2010) *J. Biomed. Biotechnol.*, 2010, 727239, doi: 10.1155/2010/727239.
 71. *Chung, C.S., Bogomolovas, J., Gasch, A., Hidalgo, C.G., Labeit, S., Granzier, H.L.* (2011) *J. Biomed. Biotechnol.*, 2011, 310791, doi: 10.1155/2011/310791.
 72. *Chung, C.S., Methawasin, M., Nelson, O.L., Radke, M.H., Hidalgo, C.G., Gotthardt, M., Granzier, H.L.* (2011) *J. Mol. Cell Cardiol.*, **51**, 428–434.
 73. *Labeit, S., Gautel, M., Lakey, A., Trinick, J.* (1992) *EMBO J.*, **11**, 1711–1716.
 74. *Gautel, M.* (2011) *Eur. J. Physiol.*, **462**, 119–134.
 75. *Peckham, M., Young, P., Gautel, M.* (1997) *Cell Struct. Funct.*, **22**, 95–101.
 76. *Gregorio, C.C., Trombitás, K., Centner, T., Kolmerer, B., Stier, G., Kunke, K., Suzuki, K., Obermayr, F., Herrmann, B., Granzier, H., Sorimachi, H., Labeit, S.* (1998) *J. Cell Biol.*, **143**, 1013–1027.
 77. *Ayoob, J.C., Turnacioglu, K.K., Mittal, B., Sanger, J.M., Sanger, J.W.* (2000) *Cell. Motil. Cytoskeleton.*, **45**, 67–82.
 78. *Van der Ven, P.F., Bartsch, J.W., Gautel, M., Jockusch, H., Furst, D.O.* (2000) *J. Cell Sci.*, **113**, 1405–1414.
 79. *Person, V., Kostin, S., Suzuki, K., Labeit, S., Schaper, J.* (2000) *J. Cell Sci.*, **113**, 3851–3859.
 80. *Horowitz, R., Kempner, E.S., Bisher, M.E., Podolsky, R.J.* (1986) *Nature*, **323**, 160–164.
 81. *Higuchi, H.* (1992) *J. Biochem.*, **111**, 291–295.
 82. *Linke, W.A., Popov, V.I., Pollack, G.H.* (1994) *Biophys. J.*, **67**, 782–792.
 83. *Granzier, H.L., Irving, T.C.* (1995) *Biophys. J.*, **68**, 1027–1044.
 84. *Linke, W.A., Bartoo, M.L., Ivemeyer, M., Pollack, G.H.* (1996) *J. Muscle Res. Cell Motil.*, **17**, 425–438.
 85. *Helmes, M., Trombitás, K., Granzier, H.* (1996) *Circ. Res.*, **79**, 619–626.
 86. *Yamasaki, R., Berri, M., Wu, Y., Trombitás, K., McNabb, M., Kellermayer, M.S., Witt, C., Labeit, D., Labeit, S., Greaser, M., Granzier, H.* (2001) *Biophys. J.*, **81**, 2297–2313.
 87. *Cazorla, O., Vassort, G., Garnier, D., Le Guennec, J.Y.* (1999) *J. Mol. Cell. Cardiol.*, **31**, 1215–1227.
 88. *Le Guennec, J.Y., Cazorla, O., Lacampagne, A., Vassort, G.* (2000) *Adv. Exp. Med. Biol.*, **481**, 337–348.
 89. *Lee, E.J., Peng, J., Radke, M., Gotthardt, M., Granzier, H.L.* (2010) *J. Mol. Cell Cardiol.*, **49**, 449–458.
 90. *Kimura, S., Maruyama, K., Huang, Y.P.* (1984) *Biochem. J.*, **96**, 499–506.
 91. *Вихлянцева И.М., Подлубная З.А.* (2003) *Биофизика*, **48**, 499–504.
 92. *Tskhovrebova, L., Trinick, J.* (2005) *Nat. Med.*, **11**, 478–479.
 93. *Lange, S., Xiang, F., Yakovenko, A., Vihola, A., Hackman, P., Rostkova, E., Kristensen, J., Brandmeier, B., Franzen, G., Hedberg, B., Gunnarsson, L.G., Hughes, S.M., Marchand, S., Sejersen, T., Richard, I., Edström, L., Ehler, E., Udd, B., Gautel, M.* (2005) *Science*, **308**, 1599–1603.
 94. *Puchner, E.M., Alexandrovich, A., Kho, A.L., Hensen, U., Schäfer, L.V., Brandmeier, B., Gräter, F., Grubmüller, H., Gaub, H.E., Gautel, M.* (2008) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 13385–13390.

95. Buyandelger, B., Ng, K.E., Miocic, S., Gunkel, S., Piotrowska, I., Ku, C.H., Knöll, R. (2011) *J. Cardiovasc. Transl. Res.*, **4**, 238–244.
96. Stahl, S.W., Puchner, E.M., Alexandrovich, A., Gautel, M., Gaub, H.E. (2011) *Biophys J.*, **101**, 1978–1986.
97. Miller, M.K., Bang, M.L., Witt, C.C., Labeit, D., Trombitás, C., Watanabe, K., Granzier, H., McElhinny, A.S., Gregorio, C.C., Labeit, S. (2003) *J. Mol. Biol.*, **333**, 951–964.
98. Hoshijima, M. (2006) *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **290**, H1313–H1325.
99. Zou, P., Pinotsis, N., Lange, S., Song, Y.H., Popov, A., Mavridis, I., Mayans, O.M., Gautel, M., Wilmanns, M. (2006) *Nature*, **439**, 229–233.
100. Sheikh, F., Raskin, A., Chu, P.H., Lange, S., Domenighetti, A.A., Zheng, M., Liang, X., Zhang, T., Yajima, T., Gu, Y., Dalton, N.D., Mahata, S.K., Dorn, G.W. 2nd, Heller-Brown, J., Peterson, K.L., Omens, J.H., McCulloch, A.D., Chen, J. (2008) *J. Clin. Invest.*, **118**, 3870–3880.
101. Maruyama, K., Kimura, S., Yoshidomi, H., Sawada, H., Kikuchi, M. (1984) *J. Biochem.*, **95**, 1423–1433.
102. Wang, K., Ramirez-Mitchell, R., Palter, D. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 3685–3689.
103. Yamamoto K., Moos C. (1983) *J. Biol., Chem.*, **258**, 8395–8401.
104. Krüger, M., Wright, J., Wang, K. (1991) *J. Cell Biol.*, **115**, 97–107.
105. Wang, K., McCarter, R., Wright, J., Beverly, J., Ramirez-Mitchell, R. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 7101–7105.
106. Granzier, H.L., Wang, K. (1993) *Electrophoresis*, **14**, 56–64.
107. Seki, N., Watanabe, T. (1984) *J. Biochem.*, **95**, 1161–1167.
108. Locker, R.H., Wild, D.J. (1986) *J. Biochem.*, **99**, 1473–84.
109. Hu, D.H., Kimura, S., Maruyama, K. (1986) *J. Biochem.*, **99**, 1485–1492.
110. Wang, K., Wright, J. (1988) *J. Cell Biol.*, **107**, 2199–2212.
111. Horowitz, R. (1992) *Biophys J.*, **61**, 392–398.
112. Kawamura, Y., Ohtani, Y., Maruyama, K. (1994) *Tissue Cell*, **26**, 677–685.
113. Trombitás, K., Jin, J.P., Granzier, H. (1995) *Circ Res.*, **77**, 856–861.
114. Spierts, I.L., Akster, H.A., Granzier, H.L. (1997) *J. Comp. Physiol B.*, **167**, 543–551.
115. Fry, A.C., Staron, R.S., James, C.B., Hikida, R.S., Hagerman, F.C. (1997) *Acta Physiol. Scand.*, **161**, 473–479.
116. Mitsuhashi, T., Kasai, M., Hatae, K. (2002) *J. Agric. Food Chem.*, **50**, 7499–7503.
117. Bang, M.L., Centner, T., Fornoff, F., Geach, A.J., Gotthardt, M., McNabb, N., Witt, C.C., Labeit, D., Gregorio, C.C., Granzier, H., Labeit, S. (2001) *Circ. Res.*, **89**, 1065–1072.
118. Helmes, M., Trombitás, K., Centner, T., Kellermayer, M., Labeit, S., Linke, W., Granzier, H. (1999) *Circ. Res.*, **84**, 1339–1352.
119. Trombitás, K., Redkar, A., Centner, T., Wu, Y., Labeit, S., Granzier, H. (2000) *Biophys. J.*, **79**, 3226–3234.
120. Cazorla, O., Freiburg, A., Helmes, M., Centner, T., McNabb, M., Wu, Y., Trombitás, K., Labeit, S., Granzier, H. (2000) *Circ. Res.*, **86**, 59–67.
121. Wu, Y., Cazorla, O., Labeit, D., Labeit, S., Granzier, H. (2000) *J. Mol. Cell Cardiol.*, **32**, 2151–2162.
122. Bell, S.P., Nyland, L., Tischler, M.D., McNabb, M., Granzier, H., LeWinter, M.M. (2000) *Circ. Res.*, **87**, 235–240.

123. Trombitás, K., Wu, Y., Labeit, D., Labeit, S., Granzier, H. (2001) *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **281**, H1793–H1799.
124. Wu, Y., Bell, S.P., Trombitás, K., Witt, C.C., Labeit, S., LeWinter, M.M., Granzier, H. (2002) *Circulation*, **106**, 1384–1389.
125. Neagoe, C., Kulke, M., del Monte, F., Gwathmey, J.K., de Tombe, P.P., Hajjar, R.J., Linke, W.A. (2002) *Circulation*, **106**, 1333–1341.
126. Toursel, T., Stevens, L., Granzier, H., Mounier, Y. (2002) *J. Appl. Physiol.*, **92**, 1465–1472.
127. Granzier, H., Labeit, S. (2002) *J. Physiol.*, **541**, 335–342.
128. Anderson, J., Joumaa, V., Stevens, L., Neagoe, C., Li, Z., Mounier, Y., Linke, W.A., Goubel, F. (2002) *Pflügers Arch.*, **444**, 771–776.
129. Granzier, H., Labeit, D., Wu, Y., Labeit, S. (2002) *J. Muscle Res. Cell Motil.*, **23**, 457–471.
130. Opitz, C.A., Kulke, M., Leake, M.C., Neagoe, C., Hinssen, H., Hajjar, R.J., Linke, W.A. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 12688–12693.
131. Fukuda, N., Wu, Y., Farman, G., Irving, T.C., Granzier, H. (2003) *J. Physiol.*, **553**, 147–154.
132. Neagoe, C., Opitz, C., Makarenko, I., Linke, W. (2003) *J. Muscle Res. Cell Motil.*, **24**, 175–189.
133. Hunter, R.J., C. Neagoe, H.A. Jarvelainen, Martin, C.R., Lindros, K.O., Linke, W.A., Preedy, V.R. (2003) *J. Nutr.*, **133**, 1154–1157.
134. Warren, C.M., Jordan, M.C., Roos, K.P., Krzesinski, P.R., Greaser, M.L. (2003) *Cardiovasc. Res.*, **59**, 86–94.
135. Warren, C.M., Krzesinski, P.R., Greaser, M.L. (2003) *Electrophoresis*, **24**, 1695–1702.
136. Lahmers, S., Wu, Y., Call, D.R., Labeit, S., Granzier, H. (2004) *Circ. Res.*, **94**, 505–513.
137. Opitz, C.A., Leake, M.C., Makarenko, I., Benes, V., Linke, W.A. (2004) *Circ. Res.*, **94**, 967–975.
138. Nagueh, S.F., Shah, G., Wu, Y., Torre-Amione, G., King, N.M., Lahmers, S., Witt, C.C., Becker, K., Labeit, S., Granzier, H.L. (2004) *Circulation*, **110**, 155–162.
139. Fujita, H., Labeit, D., Gerull, B., Labeit, S., Granzier, H.L. (2004) *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **287**, H2528–H2534.
140. Makarenko, I., Opitz, C.A., Leake, M.C., Neagoe, C., Kulke, M., Gwathmey, J.K., del Monte, F., Hajjar, R.J., Linke, W.A. (2004) *Circ. Res.*, **95**, 708–716.
141. Warren, C.M., Krzesinski, P.R., Campbell, K.S., Moss, R.L., Greaser, M.L. (2004) *Mech. Dev.*, **121**, 1301–1312.
142. Fukuda, N., Wu, Y., Nair, P., Granzier, H.L. (2005) *J. Gen. Physiol.*, **125**, 257–271.
143. Prado, L.G., Makarenko, I., Andresen, C., Krüger, M., Opitz, C.A., Linke, W.A. (2005) *J. Gen. Physiol.*, **126**, 461–480.
144. Preetha, N., Yiming, W., Helmes, M., Norio, F., Siegfried, L., Granzier, H. (2005) *J. Muscle Res. Cell Motil.*, **26**, 307–317.
145. Greaser, M.L., Krzesinski, P.R., Warren, C.M., Kirkpatrick, B., Campbell, K.S., Moss, R.L. (2005) *J. Muscle Res. Cell Motil.*, **26**, 325–332.
146. Opitz, C.A., Linke, W.A. (2005) *J. Muscle Res. Cell Motil.*, **26**, 333–342.
147. Krüger, M., Kohl, T., Linke, W.A. (2006) *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **291**, H496–H506.
148. Krüger, M., Linke, W.A. (2006) *J. Muscle Res. Cell Motil.*, **27**, 435–444.
149. LeWinter, M.M., Wu, Y., Labeit, S., Granzier, H. (2007) *Clin. Chim. Acta.*, **375**, 1–9.

150. Radke, M.H., Peng, J., Wu, Y., McNabb, M., Nelson, O.L., Granzier, H., Gotthardt, M. (2007) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 3444–3449.
151. Wu, Y., Peng, J., Campbell, K.B., Labeit, S., Granzier, H. (2007) *J. Mol. Cell Cardiol.*, **42**, 186–195.
152. Udaka, J., Ohmori, S., Terui, T., Ohtsuki, I., Ishiwata, S., Kurihara, S., Fukuda, N. (2008) *J. Gen. Physiol.*, **131**, 33–41.
153. Krüger, M., Sachse, C., Zimmermann, W.H., Eschenhagen, T., Klede, S., Linke, W.A. (2008) *Circ. Res.*, **102**, 439–447.
154. Jaber, W.A., Maniu, C., Krysiak, J., Shapiro, B.P., Meyer, D.M., Linke, W.A., Redfield, M.M. (2008) *Circ. Heart. Fail.*, **1**, 192–199.
155. Nelson, O.L., Robbins, C.T., Wu, Y., Granzier, H. (2008) *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **295**, H366–H371.
156. Krüger, M., Kötter, S., Grützner, A., Lang, P., Andresen, C., Redfield, M.M., Butt, E., dos Remedios, C.G., Linke, W.A. (2009) *Circ. Res.*, **104**, 87–94.
157. Williams, L., Howell, N., Pagano, D., Andreka, P., Vertesaljai, M., Pecor, T., Frenneaux, M., Granzier, H. (2009) *Clin. Sci. (Lond)*, **117**, 237–242.
158. Borbély, A., Falcão-Pires, I., van Heerebeek, L., Hamdani, N., Edes, I., Gavina, C., Leite-Moreira, A.F., Bronzwaer, J.G., Papp, Z., van der Velden, J., Stienen, G.J., Paulus, W.J. (2009) *Circ. Res.*, **104**, 780–786.
159. Krüger, M., Linke, W.A. (2009) *J. Mol. Cell Cardiol.*, **46**, 490–498.
160. Hidalgo, C., Hudson, B., Bogomolovas, J., Zhu, Y., Anderson, B., Greaser, M., Labeit, S., Granzier, H. (2009) *Circ. Res.*, **105**, 631–638.
161. Krüger, M., Babicz, K., von Frieling-Salewsky, M., Linke, W.A. (2010) *J. Mol. Cell Cardiol.*, **48**, 910–916.
162. Lee, E.J., Peng, J., Radke, M., Gotthardt, M., Granzier, H.L. (2010) *J. Mol. Cell Cardiol.*, **49**, 449–458.
163. Ali, M.A., Cho, W.J., Hudson, B., Kassiri, Z., Granzier, H., Schulz, R. (2010) *Circulation*, **122**, 2039–2047.
164. Falcão-Pires, I., Hamdani, N., Borbély, A., Gavina, C., Schalkwijk, C.G., van der Velden, J., van Heerebeek, L., Stienen, G.J., Niesen, H.W., Leite-Moreira, A.F., Paulus, W.J. (2011) *Circulation*, **124**, 1151–1159.
165. Tatsumi, R., Hattori, A. (1995) *Anal. Biochem.*, **224**, 28–31.
166. Вихлянцев И.М., Подлубная З.А., Козловская И.Б. (2004) Доклады РАН, **395**, 828–831.
167. Вихлянцев И.М., Малышев С.Л., Шенкман Б.С., Подлубная З.А. (2004) Биофизика, **49**, 995–1002.
168. Vikhlyantsev, I.M., Shenkman, B.S., Podlubnaya, Z.A. (2004) *J. Muscle Res. Cell Motil.*, **25**, 264 (Abstr. European Muscle Conference 2004 – 19–23 September 2004, Isola d'Elba, Italy).
169. Vikhlyantsev, I.M., Podlubnaya, Z.A. (2006) In book: «Biological motility: basic research and practice», Pushchino, ГУП МО «Сerpуховская типография», 2006, 38–39.
170. Вихлянцев И.М., Подлубная З.А. (2006) Биофизика, **51**, 951–958.
171. Вихлянцев И.М., Подлубная З.А., Шенкман Б.С., Козловская И.Б. (2006) Доклады РАН, **407**, 692–694.
172. Vikhlyantsev, I.M., Podlubnaya, Z.A. (2006) *J. Muscle Res. Cell Motil.*, **27**, 511 (Abstr. European Muscle Conference 2006 – 9th–12th September 2006, University of Heidelberg, Germany).
173. Вихлянцев И.М., Подлубная З.А., Карадулева Е.В., Храмов Р.Н., Мурашев А.Н., Козловская

- И.Б. (2007) Доклады РАН, **417**, 403–406.
174. Vikhlyantsev, I.M., Podlubnaya, Z.A., Marsagishvili, L.G. (2007) *J. Muscle Res. Cell Motil.*, **28**, 439 (Abstr. European Muscle Conference 2007, Stockholm, Sweden, September 8–12, 2007).
175. Vikhlyantsev, I.M., Podlubnaya, Z.A. (2008) In book «Biological Motility: achievements and perspectives» eds. Podlubnaya Z.A. and Malyshev S.L. (Pushchino, Foton-Vek, 2008), **1**, 54–56.
176. Вихлянцева И.М., Подлубная З.А. (2008) *Биофизика*, **53**, 1058–1065.
177. Greaser, M.L., Warren, C.M., Esbona, K., Guo, W., Duan, Y., Parrish, A.M., Krzesinski, P.R., Norman, H.S., Dunning, S., Fitzsimons, D.P., Moss, R.L. (2008) *J. Mol. Cell Cardiol.*, **44**, 983–991.
178. Li, S., Guo, W., Schmitt, B., Greaser, M.L. (2012) *J. Cell Biochem.*, **113**(4), 1265–1273.
179. Patel, J.R., Pleitner, J.M., Moss, R.L., Greaser, M.L. (2012) *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **302**, H697–H708.
180. Kim, K., Homma, Y., Ikeuchi, Y., Suzuki, A. (1993) *J. Biochem.*, **114**, 463–467.
181. Delgado, E.F., Geesink, G.H., Marchello, J.A., Goll, D.E., Koohmaraie, M. (2001) *J. Anim. Sci.*, **79**, 2097–2107.
182. Verburg, E., Murphy, R.M., Stephenson, D.G., Lamb, G.D. (2005) *J. Physiol.*, **564**, 775–790.
183. King, N.L., Kurth, L. (1980) In book: *Fibrous proteins* (Parry D., Creamer L.K. eds.), **2**, Acad. Press, London, 57–67.
184. Вихлянцева И.М., Макаренко И.В., Халина Я.Н., Удальцов С.Н., Малышев С.Л., Подлубная З.А. (2000) *Биофизика*, **45**, 831–835.
185. Soteriou, A., Gamage, M., Trinick, J. (1993) *J. Cell Sci.*, **14**, 119–123.
186. Vikhlyantsev, I.M., Shumilina, Yu.V., Shpagina, M.D., Molochkov, N.V., Podlubnaya, Z.A. (2010) In book: «Biological motility: from fundamental achievements to nanotechnologies», Pushchino, Synchrobook, 314–316.
187. Шумилина Ю.В., Вихлянцева И.М., Подлубная З.А. (2011) Тезисы V Российского симпозиума «Белки и пептиды», 8–12 августа 2011, Петрозаводск, с. 65.
188. Wickler, S.J., Horwitz, B.A., Kott, K.S. (1987) *J. Therm. Biol.*, **12**, 163–166.
189. Григорьев А.И., Козловская И.Б., Шенкман Б.С. (2004) Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова, **5**, 508–521.
190. Blaber, E., Marçal, H., Burns, B.P. (2010) *Astrobiology*, **10**, 463–473.
191. Lee, K., Park, J.Y., Yoo, W., Gwag, T., Lee, J.W., Byun, M.W., Choi, I. (2008) *J. Cell. Biochem.*, **104**, 642–656.
192. Hudson, N.J., Franklin, C.E. (2002) *J. Exp. Biol.*, **205**, 2297–2303.
193. Игнатъев Д.А., Сухова Г.С., Сухов В.П. (2001) *Журн. общ. биологии*, **62**, 66–77.
194. Morano, I., Adler, K., Agostini, B., Hasselbach, W. (1992) *J. Muscle Res. Cell Motil.*, **13**, 64–70.
195. Лукоянова Н.А., Игнатъев Д.А., Колаева С.Г., Подлубная З.А. (1997) *Биофизика*, **42**, 343–348.
196. Лукоянова Н.А., Шпагина М.Д., Удальцов С.Н., Игнатъев Д.А., Колаева С.Г., Подлубная З.А. (1997) *Российский Физиол. Журнал им. И.М. Сеченова*, **83**, 143–150.
197. Вихлянцева И.М., Алексеева Ю.А., Шпагина М.Д., Удальцов С.Н., Подлубная З.А. (2002) *Биофизика*, **47**, 701–705.

198. Rourke, B.C., Yokoyama, Y., Milsom, W.K., Caiozzo, V.J. (2004) *Physiol. Biochem. Zool.*, **77**, 582–593.
199. Зуйкова О.В., Осипова Д.А., Вихлянцев И.М., Малышев С.Л., Удальцов С.Н., Подлубная З.А. (2005) *Биофизика*, **50**, 797–802.
200. Малышев С.Л., Осипова Д.А., Вихлянцев И.М., Подлубная З.А. (2006) *Биофизика*, **51**, 929–933.
201. Nowell, M.M., Choi, H., Rourke, B.C. (2011) *J. Comp. Physiol. B.*, **181**, 147–164.
202. Вихлянцев И.М., Подлубная З.А. (2004) *Биофизика*, **49**, 430–435.
203. Vikhlyantsev, I.M., Karaduleva, E.V., Podlubnaya, Z.A. (2008) In book: «Biological Motility: achievements and perspectives» (eds. Podlubnaya Z.A. and Malyshev S.L.), Pushchino, Foton-Vek, **1**, 125–129.
204. Вихлянцев И.М., Карадулева Е.В., Подлубная З.А. (2008) *Биофизика*, **53**, 1066–1072.
205. Zhegunov, G.F., Mikulinsky, Y.E., Kudokotseva, E.V. (1988) *Cryo-Lett.*, **9**, 236–245.
206. Knight, J.E., Narus, E.N., Martin, S.L., Jacobson, A., Barnes, B.M., Boyer, B.B. (2000) *Mol. Cell. Biol.*, **20**, 6374–6379.
207. Morin, P.Jr., Dubuc, A., Storey, K.B. (2008) *Biochim. Biophys. Acta*, **1779**, 628–633.
208. Карадулева Е.В., Вихлянцев И.М., Тутукина М.Н., Подлубная З.А. (2010) *Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова*, **6**, 5–12.
209. Hein, S., Scholz, D., Fujitani, N., Rennollet, H., Brand, T., Friedl, A., Schaper, J. (1994) *J. Mol. Cell Cardiol.*, **26**, 1291–1306.
210. Trapeznikova, K.O., Vikhlyantsev, I.M., Kokoz, Yu.M., Okuneva, A.D., Rogachevsky, V.V., Khutsyan, S.S., Salmov, N.N., Podlubnaya, Z.A. (2012) In book: «Biological motility: fundamental and applied science», Pushchino, Foton-Vek, 227–231.
211. Хромов А.С., Сребницкая Л.К., Рождественская З.Е., Орлова А.А., Леднев В.В. (1987) В кн.: «Механизмы зимней спячки», Пушкино, ОНТИ, 95–101.
212. Steffen, J.M., Li, Y., Steele, P.S., Klueber, K.M., Milsom, W.K. (1993) In book: «Life in the Cold. Ecological, physiological, and molecular mechanisms» (edited by C. Carey, G. Florant, B. Wunder, B. Horwitz), Westview Press, Boulder, San Francisco, Oxford, 511–518.
213. Viskocil, F., Gutmann, E. (1977) *J. Comp. Physiol.*, **122**, 385–390.
214. Lohuis, T.D., Harlow, H.J., Beck, T.D., Iazzo, P.A. (2007) *Physiol. Biochem. Zool.*, **80**, 257–269.
215. Nakipova, O.V., Zakharova, N.M., Andreeva, L.A., Chumaeva, N.A., Averin, A., Kosarskii, L.S., Anufriev, A.I., Lewinski, D., Kockskamper, J., Pieske, B. (2007) *Cryobiology*, **55**, 173–181.
216. Wang, S.Q., Lakatta, E.G., Cheng, H., Zhou, Z. (2002) *J. Exp. Biol.*, **205**, 2957–2962.
217. Kozlovskaya, I.B., Kreidich, Yu.V., Oganov, V.S., Koserenko, O.P. (1981) *Acta Astronaut.*, **8**, 1059–1072.
218. Adams, G.R., Caiozzo, V.J., Baldwin, K.M. (2003) *J. Appl. Physiol.*, **95**, 2185–2201.
219. Shenkman, B.S., Kozlovskaya, I.B., Nemirovskaya, T.L., Tcheglova, I.A. (1997) *J. Gravit. Physiol.*, **4**, P137–P138.
220. Desplanches, D. (1997) *Int. J. Sports Med.*, **18**, S259–264.
221. Riley, D.A., Bain, J.L., Thompson, J.L., Fitts, R.H., Widrick, J.J., Trappe, S.W., Trappe, T.A., Costill, D.L. (1998) *Muscle Nerve*, **21**, 1280–1289.

222. Nemirovskaya T.L., Shenkman B.S. (2002) Eur. J. Appl. Physiol., **87**, 120–126.
223. Riley, D.A., Bain, J.L., Thompson, J.L., Fitts, R.H., Widrick, J.J., Trappe, S.W., Trappe, T.A., Costill, D.L. (2002) J. Appl. Physiol., **92**, 817–825.
224. Ikemoto, M., Nikawa, T., Takeda, S., Watanabe, C., Kitano, T., Baldwin, K.M., Izumi, R., Nonaka, I., Towatari, T., Teshima, S., Rokutan, K., Kishi, K. (2001) FASEB J., **15**, 1279–1281.
225. Shenkman, B.S., Nemirovskaya, T.L., Vikhlyantsev, I.M., Udaltsov, S.N., Muchina, A.M., Podlubnaya, Z.A. (2003) J. Gravit. Physiol., **10**, 53–54.
226. Подлубная З.А., Вихлянцева И.М., Мухина А.М., Немировская Т.Л., Шенкман Б.С. (2004) Биофизика, **49**, 424–429.
227. Anzil, A.P., Sancesario, G., Massa, R., Bernardi, G. (1991) Muscle Nerve, **14**, 358–369.
228. Riley, D.A., Thompson, J.L., Krippendorf, B.B., Slocum, G.R. (1995) Basic Appl. Myol., **5**, 139–145.
229. Chopard, A., Leclerc, L., Muller, J., Pons, F., Leger, J.J., Marini, J.F. (1998) J. Gravit. Physiol., **5**, 67–68.
230. Gasnikova, N.M., Shenkman, B.S. (2005) J. Gravit. Physiol., **12**, 125–126.
231. Nara, S., Hachisuka, K., Furukawa, H., Doi, Y., Kudo, H., Fujimoto, S. (2002) Histol Histopathol., **17**, 427–436.
232. Karpakka, J., Virtanen, P., Väänänen, K., Orava, S., Takala, T.E. (1991) J. Appl. Physiol., **70**, 1775–1780.
233. Talmadge, R.J., Roy, R.R., Edger-ton, V.R. (1996) J. Appl. Physiol., **81**, 2540–2546.
234. Мухина А.М., Алтаева Э.Г., Немировская Т.Л., Шенкман Б.С. (2006) Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. **92**, 1285–1295.
235. Goto, K., Okuyama, R., Honda, M., Uchida, H., Akema, T., Ohira, Y., Yoshioka, T. (2003) J. Appl. Physiol., **94**, 897–902.
236. Vikhlyantsev, I.M., Karaduleva, E.V., Malyshev, S.L., Podlubnaya, Z.A. (2008) J. Muscle Res. Cell Motil., **29**, 306 (Abstr. European Muscle Conference 2008, Keble College, Oxford 13th–16th September 2008).
237. Пономарева Е.В., Кравцова В.В., Качаева Е.В., Алтаева Э.Г., Вихлянцева И.М., Подлубная З.А., Крutoй И.И., Шенкман Б.С. (2008) Биофизика, **53**, 1087–1094.
238. Шенкман Б.С., Подлубная З.А., Вихлянцева И.М., Литвинова К.С., Удадьцов С.Н., Немировская Т.Л., Лемешева Ю.С., Мухина А.М., Козловская И.Б. (2004) Биофизика, **49**, 881–890.
239. Litvinova, K.S., Vikhlyantsev, I.M., Kozlovskaya, I.B., Podlubnaya, Z.A., Shenkman, B.S. (2004) J. Gravit. Physiol., **11**, P131–P132.
240. Shenkman, B.S., Litvinova, K.S., Nemirovskaya, T.L., Podlubnaya, Z.A., Vikhlyantsev, I.M., Kozlovskaya, I.B. (2004) J. Gravit. Physiol., **11**, P111–P114.
241. Goll, D.E., Neti, G., Mares, S.W., Thompson, V.F. (2008) J. Anim. Sci., **86**, E19–E35.
242. Enns, D.L., Raastad, T., Ugelstad, L., Belcastro, A.M. (2007) Eur. Journ. Appl. Physiol., **100**, 445–455.
243. Szilágyi, T., Szöör, A., Takács, O., Rapcsák, M., Oganov, V.S., Skuratova, S.A., Oganessian, S.S., Murashko, L.M., Eloyan, M.A. (1980) Physiologist, **23**, S67–70.
244. Oganov, V.S., Skuratova, S.A., Murashko, L.M., Shirvinskaya, M.A., Siladi, T. (1982) Biofizika, **27**, 26–30.

245. Rapcsák, M., Oganov, V.S., Szöör, A., Skuratova, S.A., Szilágyi, T., Takács, O. (1983) *Acta Physiol. Hung.*, **62**, 225–228.
246. Оганов В.С., Скуратова С.А., Мурашко Л.М., Губа Ф., Такач О. (1988) *Косм. биол. и авиакосм. мед.*, **22**, 50–54.
247. Widrick, J.J., Knuth, S.T., Norenberg, K.M., Romatowski, J.G., Bain, J.L.W., Riley, D.A., Karhanek, M., Trappe, S.W., Trappe, T.A., Costill, D.L., Fitts, R.H. (1999) *J. Physiol.*, **516**, 915–930.
248. Barańska, W., Skopiński, P., Kaplański, A. (1990) *Mater Med. Pol.*, **22**, 255–257.
249. Goldstein M.A., Edwards R.J., Schroeter J.P. (1992) *J. Appl. Physiol.*, **73**, 94S–100S.
250. Perhonen, M.A., Franco, F., Lane, L.D., Buckey, J.C., Blomqvist, C.G., Zerwekh, J.E., Peshock, R.M., Weatherall, P.T., Levine, B.D. (2001) *J. Appl. Physiol.*, **91**, 645–653.
251. Шумилина Ю.В., Вихлянцева И.М., Подлубная З.А., Козловская И.Б. (2010) Доклады РАН, **430**, 264–267.
252. Okuneva, A.D., Vikhlyantsev, I.M., Rogachevsky, V.V., Salmov, N.N., Podlubnaya, Z.A., Grigor'ev, A.I. (2012) In book: «Biological motility: fundamental and applied science», Pushchino, Foton-Vek, 152–155.
253. Липец Е.Н., Пономарева Е.В., Огнева И.В., Вихлянцева И.М., Карадулева Е.В., Карташкова Н.Л., Кузнецов С.Л., Подлубная З.А., Шенкман Б.С. (2009) *Авиакосмическая и экологическая медицина*, **43**, 34–39.
254. Шенкман Б.С., Немировская Т.Л., Мухина А.М., Подлубная З.А., Вихлянцева И.М., Ардабьевская А.В., Козловская И.Б., Григорьев А.И. (2005) Доклады РАН, **400**, 840–843.
255. van Heerebeek, L., Borbély, A., Niessen, H.W., Bronzwaer, J.G., van der Velden, J., Stienen, G.J., Linke, W.A., Laarman, G.J., Paulus, W.J. (2006) *Circulation*, **113**, 1966–1973.
256. Morano, I., Hädicke, K., Grom, S., Koch, A., Schwinger, R.H., Böhm, M., Bartel, S., Erdmann, E., Krause, E.G. (1994) *J. Mol. Cell Cardiol.*, **26**, 361–368.
257. Макаренко И.В., Шпагина М.Д., Вишневецкая З.И., Подлубная З.А. (2002) *Биофизика*, **47**, 706–710.
258. Cullen, M.J., Fulthorpe, J.J., Harris, J.B. (1992) *Acta Neuropathol.*, **83**, 158–169.
259. Matsumura, K., Shimizu, T., Sunada, Y., Mannen, T., Nonaka, I., Kimura, S., Maruyama, K. (1990) *J. Neurol Sci.*, **98**, 155–162.
260. Kawaguchi, N., Fujitani, N., Schaper, J., Onishi, S. (1995) *Mol. Cell Biochem.*, **144**, 75–79.
261. Hein, S., Kostin, S., Heling, A., Maeno, Y., Schaper, J. (2000) *Cardiovasc. Res.*, **45**, 273–278.
262. Лушникова Е.Л., Непомнящих Г.И., Туманов В.П., Непомнящих Л.М., Гончар А.М. (1983) *Бюллет. эксперимент. биол. мед.*, **1**, 97–100.
263. Лушникова Е.Л., Непомнящих Л.М. (2003) *Бюллет. эксперимент. биол. и мед.*, **135**, 208–214.
264. Карадулева Е.В., Вихлянцева И.М., Подлубная З.А. (2010) *Биофизика*, **55**, 612–618.
265. Белостоцкая Г.Б., Захаров Е.А., Ключева Н.З., Петрова Е.И., Наследов Г.А. (2008) *Биофизика*, **53**, 1033–1037.
266. Manso, A.M., Encabo, A., Ferrer, M., Balfagon, G., Salices, M., Marin, J. (1999) *J. Autonomic Pharmacology*, **19**, 123–130.

267. Moersch, F.P., Woltman, H.W. (1956) Proc. Staff Meet Mayo Clin., **31**, 421–427.
268. Cerimagić, D, Bilić, E. (2010) [Article in Croatian] Lijec Vjesn, **132**, 110–114.
269. Zinovyeva, O.E., Yakhno, N.N., Golubeva, V.V., Mozolevsky, Y.V., Katushkina, E.A, Shenkman, B.S., Chistiakov, I.N., Podlubnaya, Z.A., Vikhlantsev, I.M. (2008) Europ. J. Neurol., **15**, Suppl.3, SC203 (p 16).
270. Зиновьева О.Е., Катушкина Э.А., Мозолевский Ю.В., Голубева В.В., Шенкман Б.С., Чистяков И.Н., Подлубная З.А., Вихлянцеv И.М., Яхно Н.Н. (2009) Неврологический журнал, **14**, 11–17.
271. Ahmad, S., Rai, T.S., Khullar, M., Bahl, A., Saikia, U.N., Thungapathra, M., Kumar, R.M., Mahajan, R., Talwar, K.K. (2010) J. Clin. Immunol., **30**, 520–530.