

На правах рукописи

ЛЫСЕНКО Евгений Алексеевич

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ СИНТЕЗА БЕЛКА ПРИ
МЫШЕЧНОЙ АТРОФИИ: МОДЕЛИРУЕМАЯ ГРАВИТАЦИОННАЯ
РАЗГРУЗКА И ХРОНИЧЕСКАЯ АЛКОГОЛЬНАЯ МИОПАТИЯ

03.03.01 – физиология

03.01.04 - биохимия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Москва - 2011

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

НАУЧНЫЙ РУКОВОДИТЕЛЬ:

Доктор биологических наук, профессор Шенкман Борис Стивович

ОФИЦИАЛЬНЫЕ ОППОНЕНТЫ:

Доктор биологических наук, профессор Тарасова Ольга Сергеевна

Доктор медицинских наук, профессор Маевский Евгений Ильич

ВЕДУЩАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ:

Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН

Защита диссертации состоится «__» _____ 2011 г. в _____ часов на
заседании диссертационного совета Д 002.111.01 в Учреждении
Российской академии наук Государственном научном центре Российской
Федерации — Институте медико-биологических проблем РАН по адресу:
123007, Москва, Хорошевское шоссе, д.76-а.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Учреждения
Российской академии наук Государственном научном центре Российской
Федерации — Институте медико-биологических проблем РАН.

Автореферат разослан «__» _____ 2011 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор биологических наук

М.А. Левинских

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

Атрофия мышц наблюдается при многочисленных заболеваниях, связанных с нарушением белкового метаболизма, при гипокинезии, вызванной необходимостью соблюдать длительный постельный режим, а также во время космического полета. Результатом атрофических изменений мышц является снижение их функциональных возможностей. Известно, что белок является не только строительным элементом клетки, он также обеспечивает основную функцию мышцы — сокращение. Поддержание или изменение мышечной массы осуществляется за счет изменения соотношения скоростей синтеза и распада белка. Интенсивность и специфичность этих процессов регулируется с помощью многочисленных сигнальных механизмов, результатом взаимодействия которых является формирование качественного и количественного белкового состава мышечного волокна.

Как правило причиной развития атрофических изменений в мышечной ткани является уменьшение скорости синтеза белка, и увеличение скорости его распада. Подобное представление основывается на многочисленных свидетельствах разнонаправленной регуляции этих процессов. И действительно, активация систем положительно влияющих на скорость синтеза белка, как правило, приводит к подавлению активности сигнальных каскадов, запускающих катаболические процессы, и наоборот. Однако, существуют примеры, нарушающие данную закономерность. Так при моделировании гравитационной разгрузки и при хронической алкогольной миопатии наблюдается уменьшение скорости синтеза белка. И, если в первом случае уменьшение скорости синтеза белка играет ключевую роль в развитии атрофии при коротких сроках воздействия, то при хронической алкогольной миопатии оно практически полностью определяет течение заболевания. Исходя из вышесказанного, представляет интерес сравнение механизмов развития атрофии при моделировании гравитационной разгрузки и при хронической алкогольной миопатии.

Известным последствием гравитационной разгрузки (в частности, космического полета) как человека, так и животных является потеря массы мышц, особенно тех, которые участвуют в поддержании позы тела в условиях земной гравитации [Черепяхин М.А. И др., 1973; Какурин Л.И., 1964; Португалов В.В. И др., 1976; Shenkman B.S. et al., 1994]. Совокупность изменений в поперечнополосатой мышце, которые вызывает гравитационная разгрузка, принято называть гипогравитационным мышечным синдромом [Григорьев А.И., Козловская И.Б., Шенкман Б.С., 2004]. Для детального исследования влияния гравитационной разгрузки на организм человека и животных используются наземные модели, повторяющие эффекты невесомости. Одной из таких моделей является антиортостатическое вывешивание грызунов [Novikov V.E., Ilyin E.A., 1981; Morey-Holton

E.R., Globus R.K., 2002]. Антиортостатическое вывешивание крыс приводит к развитию атрофии мышц задних конечностей, наиболее заметны эти изменения в волокнах камбаловидной мышцы [Ohira Y. et al., 1992]. Кроме того известно, что вывешивание приводит к снижению скорости синтеза белка уже после коротких сроков воздействия [Loughna P. et al., 1986; Thomason D.B., 1989]. Точный механизм, приводящий к уменьшению скорости синтеза белка во время гравитационной разгрузки, ни у человека, ни у животных в настоящий момент не установлен. Кроме того, данные о состоянии сигнальных систем не отражают динамику развития процесса, на их основе невозможно сформировать целостное представление о механизмах регуляции синтеза белка во время разгрузки.

Пассивное растяжение камбаловидной мышцы, применяемое на фоне антиортостатического вывешивания, предотвращает развитие в ней атрофических изменений [Goldspink D.F., 1977; Loughna P. et al., 1986]. Кроме того известно, что при применении пассивного растяжения на фоне трехсуточного вывешивания в мышце увеличивается скорость синтеза белка [Loughna P. et al., 1986]. Согласно данным Hornberger с соавторами одним из триггеров, воспринимающих механический сигнал является белковый комплекс mTORC1 [Hornberger T.A., Chien S., 2006]. Однако, до сих пор не была проведена оценка активности этой системы во время пассивного растяжения камбаловидной мышцы, применяемого на фоне антиортостатического вывешивания задних конечностей.

Результатом длительного и чрезмерного потребления алкоголя является развитие атрофии мышц. В отличие от функциональной разгрузки при алкогольной миопатии нарушения развиваются в волокнах, экспрессирующих тяжелые цепи миозина II типа. Причем во время алкогольной интоксикации в первую очередь уменьшается скорость синтеза белка, тогда как скорость распада белка остается неизменной [Lang C.H. et al., 2000]. Ряд работ по исследованию причин развития алкогольной миопатии был проведен с использованием модели хронического алкоголирования животных. Было в частности показано, что причиной уменьшения скорости синтеза белка как при острой алкогольной интоксикации, так и при хроническом потреблении спирта является снижение эффективности инициации трансляции, тогда как скорость элонгации трансляции уменьшается только после сравнительно более длительного периода потребления этанола [Lang C.H. et al., 2000; Lang C.H. et al., 1999]. Тем не менее, не проводился анализ состояния систем регуляции синтеза белка при хронической алкогольной миопатии в мышцах человека. А учитывая то факт, что у людей встречаются гораздо более экстремальные случаи развития алкогольной миопатии, исследование процессов регуляции синтеза белка у таких пациентов может позволить выявить ранее не известные проявления заболевания.

Восстановление нормальных функциональных возможностей скелетных мышц у пациентов с проявлениями хронической алкогольной миопатии занимает от 3 месяцев до

года [Martin F. et al., 1985; Preedy V.R. et al., 2001]. Понимание механизмов развития и течения заболевания могло бы способствовать разработке методов, ускоряющих восстановление функциональных возможностей организма.

Цель работы состояла в анализе молекулярных механизмов регуляции синтеза белка при мышечной атрофии, вызванной моделируемой гравитационной разгрузкой или длительным потреблением этанола.

Задачи работы:

1. Исследовать динамику изменения уровня экспрессии инсулиноподобного ростового фактора — 1 (IGF-I) в печени и камбаловидной мышце крыс во время антиортостатического вывешивания.

2. Исследовать динамику изменения активности сигнальных каскадов, ответственных за регуляцию инициации (Akt/mTOR и MEK/Erk) и элонгации (eEF2) трансляции, в камбаловидной мышце крыс во время антиортостатического вывешивания.

3. Исследовать активность mTOR системы по уровню фосфорилирования ее субстрата p70S6k при пассивном растяжении камбаловидной мышцы крыс на фоне антиортостатического вывешивания.

4. Определить содержание инсулиноподобного ростового фактора -1 (IGF-I) в крови и активность IGF-I-зависимых сигнальных каскадов (Akt/mTOR и MEK/Erk) в латеральной головке четырехглавой мышце бедра пациентов с различной степенью выраженности симптомов хронической алкогольной миопатии.

5. Определить содержание инсулиноподобного ростового фактора -1 (IGF-I) в крови и активность IGF-I-зависимых сигнальных каскадов (Akt/mTOR и MEK/Erk) в медиальной головке икроножной мышцы крыс, длительное время потреблявших этанол.

6. Оценить возможность применения аминокислотных пищевых добавок или механозависимого ростового фактора (MGF) для ускорения процесса восстановления мышц животных, длительное время потреблявших этанол.

Научная новизна работы:

1. Впервые проанализирована динамика экспрессии IGF-I в печени крыс во время антиортостатического вывешивания, характеризующаяся прогрессивным снижением концентрации мРНК IGF-I.

2. Впервые проанализирована динамика изменения активности киназ S6 белка рибосом (p70S6k и p90 RSK) в волокнах камбаловидной мышцы крыс во время антиортостатического вывешивания. Показано, что снижение тотального содержания и активности p70S6k наблюдается лишь после 14 суток воздействия, а p90 RSK даже демонстрирует повышение активности после 7 суток разгрузки.

3. Впервые обнаружено изменение активности киназ S6 белка рибосом (p70S6k, p90

RSK) в латеральной головке четырехглавой мышцы бедра пациентов с различной степенью выраженности симптомов хронической алкогольной миопатии.

4. Впервые показано, что снижение активности киназ S6 белка рибосом (p70S6k, p90 RSK) в волокнах медиальной головки икроножной мышцы крыс, восстанавливавшихся в течение месяца после длительного периода алкоголизации, может быть предотвращено введением соответственно аминокислотных пищевых добавок либо механозависимого ростового фактора (MGF).

Научно-практическая значимость

Полученные результаты способствуют лучшему пониманию механизмов регуляции синтеза белка в постуральной мышце млекопитающих в условиях гравитационной разгрузки, разгрузки в сочетании с пассивным растяжением (моделью эксцентрической нагрузки) и разгрузки в сочетании с применением L-аргинина. Исследование ростовых процессов в постуральной мышце имеет большое практическое значение для оценки эффективности мероприятий, направленных на профилактику атрофии мышц, в том числе на предотвращение негативного влияния на них невесомости.

Проведенный анализ механизмов регуляции синтеза белка во время хронической алкогольной миопатии способствует лучшему пониманию течения заболевания. Кроме того, применение аминокислотных пищевых добавок или механозависимого ростового фактора (MGF) в период восстановления может стать эффективным методом, способствующими скорейшему восстановлению функциональных возможностей мышц пациентов с симптомами хронической алкогольной миопатии.

Положения, выносимые на защиту.

1. Уменьшение скорости синтеза белка на ранних сроках функциональной разгрузки (3 и 7 суток) вызвано снижением эффективности элонгации трансляции, которое, в свою очередь, вызвано инактивацией фактора элонгации трансляции eEF2.

2. Уменьшение активности систем регуляции синтеза белка (Akt/mTOR и MEK/Erk сигнальных каскадов) происходит до морфологических изменений волокон четырехглавой мышцы бедра пациентов с признаками хронической алкогольной миопатии.

3. Применение аминокислотных пищевых добавок способствует активации mTOR системы и восстановлению площади поперечного сечения быстрых волокон медиальной головки икроножной мышцы животных, восстанавливающихся после длительного периода алкоголизации.

Публикации. Результаты диссертации изложены в 14 публикациях в научных журналах и сборниках конференций, из них 4 в ведущих российских рецензируемых журналах, входящих в Перечень ВАК.

Апробация работы. Основные результаты были доложены на X «Конференции

молодых ученых, специалистов и студентов», посвященной дню космонавтики (Москва, 19 апреля 2011 года, С.44); на IV Всероссийской с международным участием школе-конференции по физиологии мышц и мышечной деятельности (Москва, 1-4 февраля 2011 года, С.28); на XXXIX Европейской Мышечной конференции (Падуя, Италия, 11-15 сентября 2010 года, С.115).

Диссертация апробирована на заседании секции Ученого совета ГНЦ РФ-ИМБП РАН «Космическая физиология и биология» (протокол №2 от 27 мая 2011 г.).

Работа выполнена при поддержке программы Президиума РАН «Фундаментальные науки - медицине», грантов РФФИ №№ 07-04-00763-а, 08-04-01557-а и 10-04-00504-а.

Структура диссертации. Работа включает в себя введение, обзор литературы, описание материалов и методов исследования, изложение результатов и их обсуждение, а также выводы. Диссертационная работа изложена на 124 страницах, содержит 26 рисунков, 3 таблицы и список цитированной литературы из 210 источников.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Организация экспериментов

Антиортостатическое вывешивание различной продолжительности. Для моделирования гравитационной разгрузки применялся метод антиортостатического вывешивания по Новикову — Ильину [Novikov V.E., Ilyin E.A., 1981]. Самцы крыс породы Вистар весом 180-200 грамм были разделены на 4 группы (по 7 животных в каждой): интактный контроль (С), 3-суточное вывешивание (HS3), 7-суточное вывешивание (HS7) и 14-суточное вывешивание (HS14). После окончания эксперимента у животных под авертиновым наркозом (в среднем 2 мл. 2.5% авертина внутривенно на животное весом 200 г.)(100% авертин: 10 г. 2,2,2-трибромэтанол и 10 мл. Tert-амилового спирта) отбиралась кровь из почечной вены, выделялась печень и камбаловидная мышца.

Пассивное растяжение камбаловидной мышцы на фоне антиортостатического вывешивания. Применение специфического ингибитора серин/треониновой протеинкиназы mTOR — рапамицина. Животным под авертиновым наркозом на голеностоп накладывалась гипсовая повязка таким образом, чтобы между голенью и стопой был острый угол. Для определения вклада mTOR системы в поддержание мышечной массы во время разгрузки применялся специфический блокатор этой системы — рапамицин. За 6 дней до начала вывешивания животные получали рапамицин в виде внутривенных инъекций в дозе 5 мг/кг массы тела. Затем крысы были вывешены с иммобилизацией задних конечностей. В течение всего периода вывешивания животным вводили внутривенно рапамицин в дозе 1,5 мг на килограмм массы тела.

28 самцов крыс породы Вистар весом 200-220 грамм были разделены на 4 группы по 7 животных в каждой: интактный контроль (С), вывешивание 14 суток (HS14), вывешивание

14 суток с пассивным растяжением камбаловидной мышцы (HSS14), вывешивание 14 суток с пассивным растяжением камбаловидной мышцы и введением рапамицина (HSR). После окончания эксперимента под авертиновым наркозом у крыс выделялась камбаловидная мышца, после чего им вводилась вызывающая гибель животного доза наркоза.

Хроническая алкогольная миопатия. Было обследовано 38 пациентов, находившихся на стационарном лечении в клинике нервных болезней Первого МГМУ им. И.М.Сеченова. У всех больных был длительный алкогольный анамнез (10-20 лет). Взятие проб мышечной ткани из латеральной головки четырехглавой мышцы бедра осуществляли методом инцизионной биопсии. Кроме того, были взяты пробы мышечной ткани у 3 здоровых добровольцев с помощью игольчатой биопсии.

По результатам определения площади поперечного сечения медленных и быстрых волокон, сравнив эти показатели со средними значениями морфометрических показателей здоровых лиц, 15 пациентов были разделены на 3 группы: пациенты без морфометрически выявленных атрофических изменений - «0», пациенты с атрофическими изменениями волокон II типа - «II», пациенты с атрофическими изменениями волокон I и II типов - «I+II». Три добровольца составили группу контроль - «С».

Перед исследованиями пациенты и добровольцы подписывали информированное согласие на участие в клиничко-лабораторных исследованиях. Проводимые исследования были одобрены Комиссией Первого МГМУ им. И.М. Сеченова по биомедицинской этике.

Хроническая алкоголизация животных. Методика алкоголизации животных была разработана на основе работ Ch. Lang [Lang C.H. et al., 2004]. Животные были разделены на 6 групп: «С» — контроль, «Alc» — 16 недель алкоголизации, «R» — 16 недель алкоголизации и последующее восстановление в течение месяца, «R+AA» — 16 недель алкоголизации и последующее восстановление в течение месяца в сочетании с кормлением аминокислотными пищевыми добавками, «R+Sal» — 16 недель алкоголизации и последующее восстановление в течение месяца в сочетании с инъекциями физиологического раствора, «R+MGF» - 16 недель алкоголизации и последующее восстановление в течение месяца в сочетании с инъекциями механозависимого ростового фактора (MGF).

Методики обработки биоматериала и анализа данных

Определение концентрации инсулиноподобного фактора роста в сыворотке крови проводили согласно стандартному протоколу непрямого иммуноферментного анализа. Использовались моноклональные первичные антитела против IGF-I (Abcam) и вторичные антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена (Santa Cruz).

Определение общего белка в мышечной ткани. Камбаловидную мышцу гомогенизировали в лизирующем буфере (10 mM Tris-HCl, 10 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, pH 7,6) и растворяли 1:1 в 2N NaOH при 37° С в течение 30 минут [Goto K. et al., 2004].

Концентрации белка в гомогенате определяли с помощью protein assay kit (Bio Rad, Hercules, CA) и спектрофотометра “SHIMADZU”. По данным колориметрии рассчитывали процент общего белка в мышце.

Определение сухого веса мышцы. Для определения сухого веса мышцы от нее отрезалась часть и взвешивалась. Затем ее помещали в термостат (90°C). Через двое суток ее доставали, взвешивали и снова помещали в термостат. Если еще через сутки высушенная часть мышцы не потеряла в весе, данные фиксировались.

Определение площади поперечного сечения волокон с преобладанием быстрых или медленных изоформ тяжелых цепей миозина. Поперечные срезы мышцы готовились на микротоме криостате фирмы Leica Microsystems при температуре -20°C. Срезы последовательно инкубировались с первичными моноклональными антителами против “быстрых” или “медленных” изоформ тяжелых цепей миозина NCL-MHCf и NCL-MHCs (Novocastra Laboratories, Великобритания) и вторичными антителами конъюгированными с FITC (ИМТЕК, Россия). Срезы фотографировались с помощью флуоресцентного микроскопа Leica Q500MC (Германия) и фотокамеры Leica DC300, средняя площадь поперечного сечения волокон измерялась с помощью программного обеспечения Leica Qwin.

PCR в реальном времени. Тотальная РНК выделялась из m.soleus с помощью набора «RNeasy Micro kit» («Qiagen», Германия) согласно протоколу выделения для тканей, обогащенных соединительнотканными волокнами, с некоторыми модификациями. кДНК синтезировали набором с обратной транскриптазой MMLV («Синтол», Россия). Полимеразная цепная реакция (ПЦР) проводилась в амплификаторе iQ5 (“Bio-Rad”, США) с набором, содержащим флуоресцентный краситель SYBR Green I и конъюгированную с антителами Taq-полимеразу для «горячего старта» («Синтол», Россия). Определение количества мРНК IGF-I относительно количества мРНК референсного гена β-актина было выполнено методом $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Анализ продуктов амплификации проводился путем плавления в амплификаторе от 72°C до 95°C с шагом 0,5°C и последующим электрофорезом аликвоты образца в 2% агарозном геле.

Вестерн блот. Замороженная мышца измельчалась с помощью микротом-криостата фирмы Leica Microsystems (Германия) на срезы толщиной 20 микрон, которые затем заливались холодным лизирующим буфером (TrisHCl (pH=8,0) 50 mM; NaCl 150 mM; SDS 0,1%; Triton X-100 0,1%; EDTA 10 mM; β-glycerophosphat 50 mM; EGTA 5 mM; NaF 50 mM; Na₃VO₄ 1mM; Aprotinin 20μg/ml; Leupeptin 50μg/ml; Pepstatin 20μg/ml; PMSF 1mM). Образцы гомогенизировались на холоде с помощью гомогенизатора «Хепох» и открывались в центрифуге с охлаждением в течение 10 мин при 10000g (+4°C). Содержание белка в лизатах определялось с помощью бицинханинового метода. Предварительно готовилась смесь из 1 ml реагента А pH=11,25 (0,1% бицинхониновая кислота; 2% Na₂CO₃; 0,95% NaHCO₃; 0,16%

калия-натрия тартрат тетрагидрат; 0,4% NaOH; H₂O) и 80 µl реагента В (1%CuSO₄). К 1 ml приготовленной смеси добавлялось по 50 µl предварительно разведенных проб, либо стандартов (бычий сывороточный альбумин). Пробирки тщательно перемешивались и инкубировались в термостате в течение 30 минут при 60°C. После инкубации пробирки охлаждались, оптическая плотность измерялась на спектрофотометре при длине волны 562 nm. Концентрация белка в пробах рассчитывалась по калибровочной кривой. Перед использованием лизаты смешивали с буфером Laemly (Tris-HCl pH=6,8 50mM; SDS 2%; бромфеноловый синий 0,1%; глицерин 10%; H₂O). Равное количество белка (10-20µg) наносилось в лунки для последующего разделения с помощью SDS-PAAG электрофореза (электрофорез в полиакриламидном геле) [Burnette W.N., 1981]. Белок переносился на нитроцеллюлозную мембрану (BioRad). Мембрана последовательно инкубировалась в 5% растворе сухого обезжиренного молока, в первичных и вторичных, конъюгированных с пероксидазой хрена, антителах. Каждый этап сопровождался отмывкой в PBS-TWEEN. Интенсивность свечения метки фиксировали на Medical X-ray film. Полученные изображения сканировали, обработка изображений производилась с помощью программы ImageJ.

Статистическая обработка данных. Статистическая обработка данных производилась с помощью программы OpenOffice.org Calc, находящейся в свободном доступе. Достоверность отличий между группами определялась с помощью U-критерия Манна-Уитни. В эксперименте с пассивным растяжением камбаловидной мышцы и введением рапамицина применялся критерий Данна.

РЕЗУЛЬТАТЫ ЭКСПЕРИМЕНТОВ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Выявление механизмов снижения скорости синтеза белка во время антиортостатического вывешивания различной продолжительности.

Для того, чтобы продемонстрировать эффект вывешивания на камбаловидную мышцу крыс, измерялась ее масса и «сухой вес».

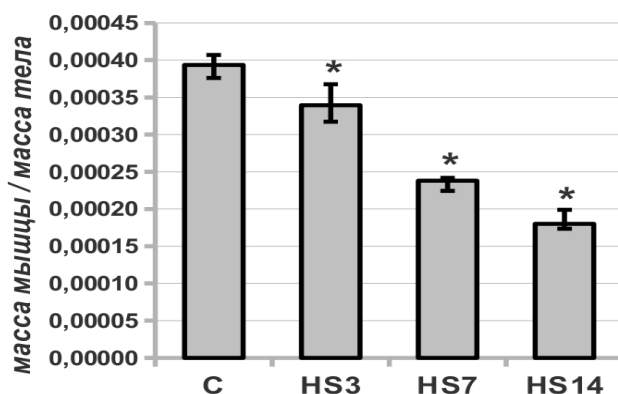


Рис.1. Отношение сырого веса камбаловидной мышцы к массе тела животного.

C — интактный контроль; HS3 — вывешивание трое суток; HS7 — вывешивание семь суток; HS14 — вывешивание четырнадцать суток.

Данные представлены в виде медианы и интерквартильной широты (0,25-0,75).

* - достоверные отличия от контроля ($p < 0,05$)

В нашем эксперименте отношение сырого веса камбаловидной мышцы к весу тела животного было достоверно снижено уже после 3 суток вывешивания. После 7 и 14 суток этот параметр был снижен вдвое по сравнению с контролем (Рисунок 1).

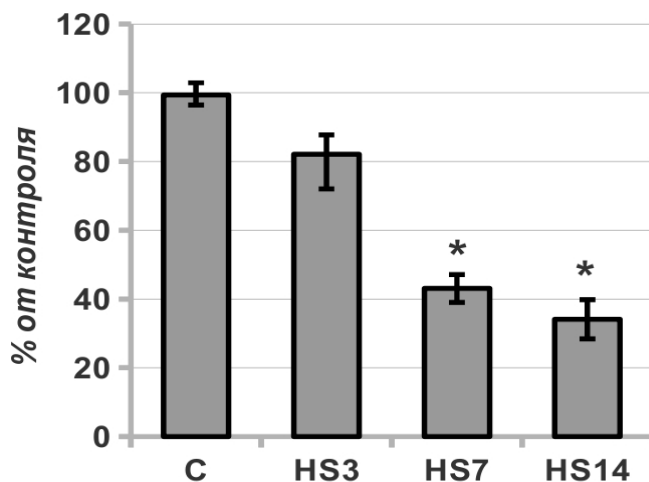


Рис.2. Содержание белка в камбаловидной мышце.

С — интактный контроль; HS3 — вывешивание трое суток; HS7 — вывешивание семь суток; HS14 — вывешивание четырнадцать суток.

Данные представлены в виде медианы и интерквартильной широты (0,25-0,75).

* - достоверные отличия от контроля ($p < 0,05$)

Было обнаружено достоверное снижение содержание белка в мышце после 7 и 14 суток вывешивания, тогда как после 3 суток вывешивания наблюдалась тенденция к снижению этого параметра (Рисунок 2). Исходя из этих данных, можно заключить, что снижение массы камбаловидной мышцы во время вывешивания происходило из-за снижения содержания основного строительного и функционального элемента клетки — белка. И, если снижение мышечной массы на третьи сутки функциональной разгрузки еще можно объяснить потерей воды, то при более продолжительном воздействии изменение содержание белка в мышце пропорционально изменению ее веса. Ранее также сообщалось, что после 7-ми и 14-ти дней вывешивания снижение содержания белка в камбаловидной мышце пропорционально снижению содержания воды [Ohira, 2002], а при коротком воздействии, потеря воды вносит больший вклад в снижение массы мышцы [Istomina, 2007].

Очевидно, что снижение содержания белка в мышце являлось следствием снижения скорости его синтеза или увеличения скорости его распада. Известно, что снижение синтеза миофибрилярных белков в m. soleus наблюдается при антиортостатическом вывешивании крыс и одностороннем вывешивании конечности у людей [Fluckey J.D. et al., 2004; Loughna P. et al., 1986; Gustafsson T. et al., 2010]. В частности, Loughna с соавторами в 1986 г. показали, что уже на третьи сутки вывешивания происходит снижение скорости синтеза белка на 21% [Loughna P. et al., 1986]. Это вполне согласуется с нашими данными, если считать, что результат подобного снижения проявился к 7 суткам разгрузки.

Инсулиноподобный ростовой фактор 1 (IGF-I) является важным системным регулятором процессов анаболизма и катаболизма в мышечном волокне. Анализ уровня его экспрессии в камбаловидной мышце и печени был важным этапом оценки вклада системных механизмов в регуляцию процесса синтеза белка при функциональной разгрузке (Рисунок 3).

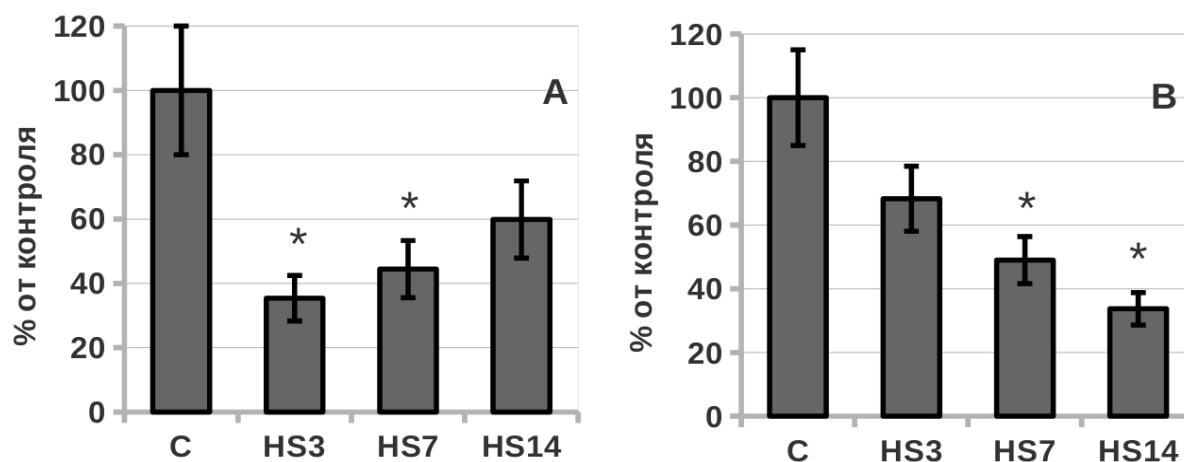


Рис.3. Уровень экспрессии IGF-I в *m. soleus* (A) и печени (B).

C — интактный контроль; HS3 — вывешивание трие суток; HS7 — вывешивание семь суток; HS14 — вывешивание четырнадцать суток.

Данные представлены в виде среднего значения и стандартного отклонения.

* - достоверные отличия от контроля ($p < 0,05$)

В камбаловидной мышце уровень экспрессии IGF-I резко снижался уже после 3 суток вывешивания, после 7 суток он оставался сниженным, а после 14 суток воздействия был снижен недостоверно. В печени крыс происходило прогрессивное снижение уровня экспрессии IGF-I, однако после трех суток вывешивания эти изменения еще не отличались от контроля.

Поскольку печень является основным источником IGF-I в системном кровотоке в покое [LeRoith D. et al., 1992], а его экспрессия в камбаловидной мышце может влиять на содержание ростового фактора в межклеточной жидкости можно было бы предположить, что подобные изменения приводили к снижению содержания IGF-I в крови и межклеточной жидкости камбаловидной мышцы.

И действительно, ранее было показано, что содержание IGF-I в плазме крови достоверно снижается после 14 дней космического полета [Adams, 2000]. Кроме того сотрудниками нашей лаборатории было показано, что после 14 дней антиортостатического вывешивания крыс происходило достоверное снижение IGF-I в сыворотке крови [Литвинова К.С. и др., 2007].

Киназа S6 белка рибосом р70S6k является одним из ключевых регуляторов процесса инициации и элонгации трансляции. Методом электрофореза с последующим вестерн блоттингом проводился анализ ее тотального содержания и уровня фосфорилирования по сайту T389 (Рисунок 4). Анализировалось фосфорилирование именно этого сайта, так как этот показатель максимально коррелирует с активностью фермента [Karlsson H.K. et al.,

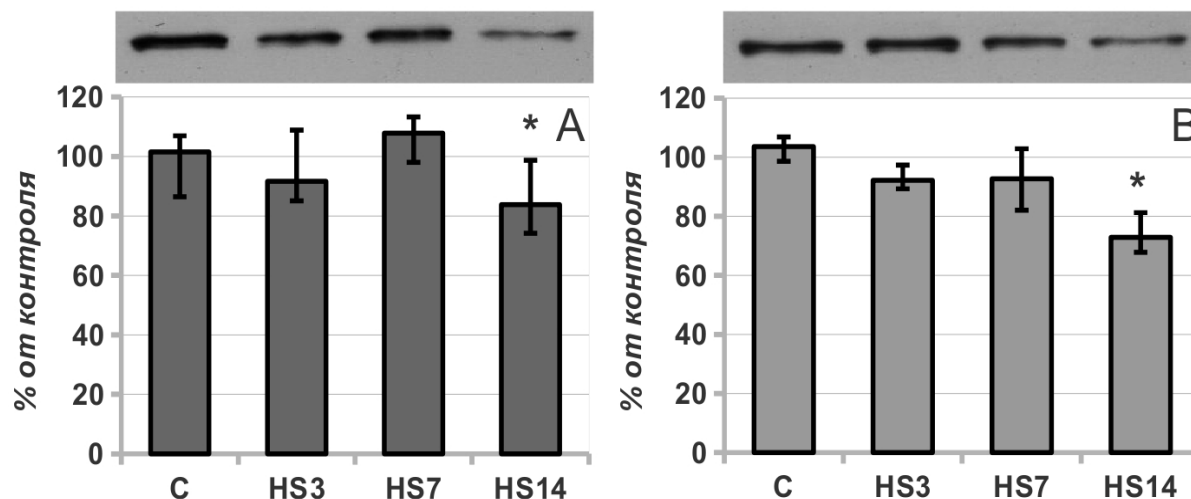


Рис.4. Общее содержание (А) и уровень фосфорилирования (В) p70S6k.

С — интактный контроль; HS3 — вывешивание трое суток; HS7 — вывешивание семь суток; HS14 — вывешивание четырнадцать суток.

Данные представлены в виде медианы и интерквартильной широты (0,25-0,75).

* - достоверные отличия от контроля ($p < 0,05$)

В наших исследованиях активность p70S6k не менялась после 3 и 7, и снижалась только после 14 суток вывешивания. Кроме того, соотношение фосфорилированной и тотальной форм p70S6k (степень фосфорилирования) не менялось при различных сроках воздействия, что может свидетельствовать о том, что снижение активности фермента произошло из-за снижения его тотального содержания, а не из-за снижения активности сигнального каскада. Эти данные согласуются с исследованиями, в которых было показано, что активность p70S6k не меняется после 7 и 10 суток вывешивания и достоверно снижается только после 14 суток воздействия [Childs T.E. et al., 2003; Gwag T. et al., 2009; Sugiura T. et al., 2005]. Однако, в работах Hornberger и DuPont с соавторами наблюдалась противоположная тенденция. Активность p70S6k снижалась после 12 часов, 7ми и 14ти суток вывешивания, а также снижался уровень фосфорилирования mTOR и Akt [Hornberger T.A. et al., 2001; Dupont E. et al., 2011; Bajotto G. et al., 2011].

Существует альтернативный путь активации синтеза белка, эффектором которого является киназа S6 белка рибосом p90 RSK. Так как ее функции и функции p70S6k во многом перекрываются, было сделано предположение, что для поддержания нормальной эффективности трансляции необходимо нормальное функционирование обоих ферментов. В таком случае снижение активности p90 RSK после 3-суточного вывешивания объясняло бы снижение скорости синтеза белка.

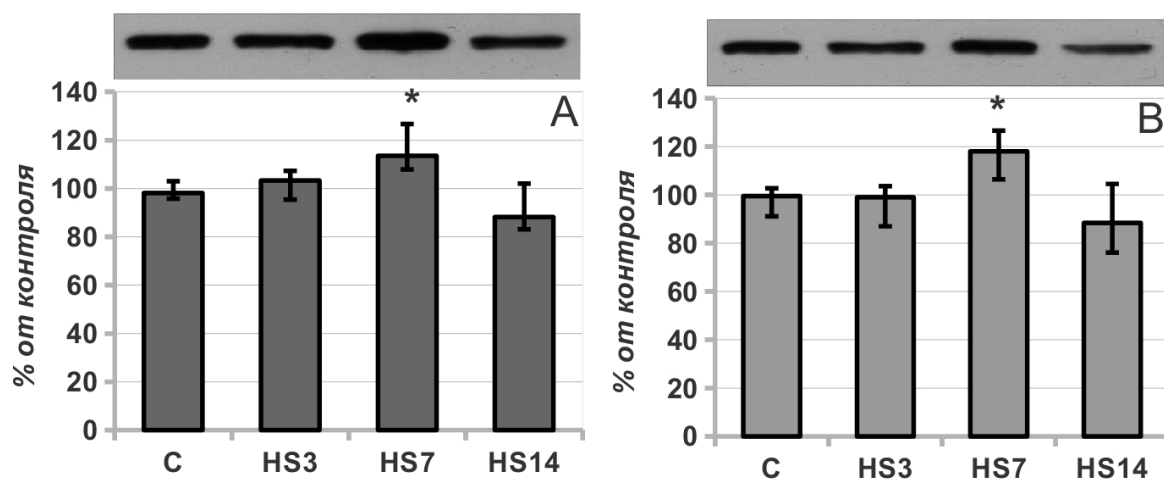


Рис.5. Общее содержание (А) и уровень фосфорилирования р90 RSK.
 С — интактный контроль; HS3 — вывешивание трое суток; HS7 — вывешивание семь суток; HS14 — вывешивание четырнадцать суток.
 Данные представлены в виде медианы и интерквартильной широты (0,25-0,75).
 * - достоверные отличия от контроля ($p < 0,05$)

Общее содержание и уровень фосфорилирования р90 RSK не отличались от контроля после 3 и 14 суток вывешивания, а после 7 суток превышали его (Рисунок 5). Тенденции этих параметров были схожими, о чем свидетельствует тот факт, что отношение содержания фосфорилированной формы к нефосфорилированной не менялось во всех группах животных.

Субстратом рибосомальных киназ является s6 белок рибосом. О том, к каким результатам привели изменения активности рибосомальных киназ, можно было судить по степени фосфорилирования четырех основных сайтов s6 белка (Рисунок 6).

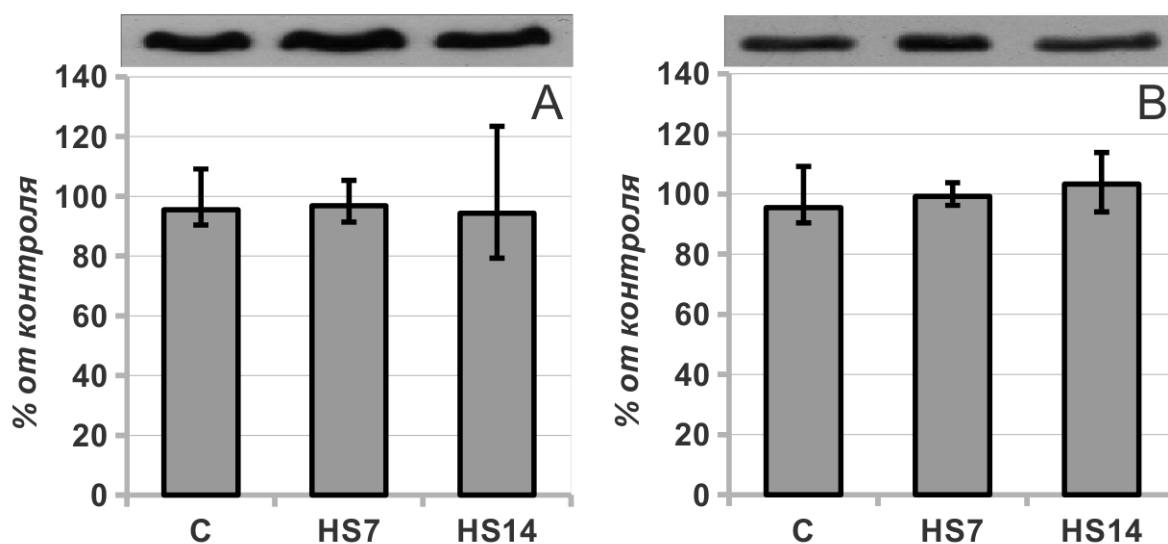


Рис.6. Уровен фосфорилирования s6 белка рибосом в положениях 240/244 (А) и 235/236 (В).
 С — интактный контроль; HS7 — вывешивание семь суток; HS14 — вывешивание четырнадцать суток.
 Данные представлены в виде медианы и интерквартильной широты (0,25-0,75).
 * - достоверные отличия от контроля ($p < 0,05$)

Никаких изменений уровня фосфорилирования s6 белка рибосом не было выявлено.

Таким образом, исходя из наших данных, активность киназ S6 белка рибосом не снижалась на ранних сроках разгрузки. Тогда как после более длительного периода функциональной разгрузки (14 суток) снижение эффективности трансляции может быть вызвано снижением активности mTOR и ее эффектора p70S6k.

Фактором, который во многом определяет эффективность элонгации трансляции, является eEF2. В работе Rose с соавторами было показано, что увеличение $[Ca^{2+}]$, происходящее в частности во время тренировки, приводит к инактивации eEF2 посредством активации специфической кальмодулинкиназы eEF2K [Rose A.J. et al., 2009]. Исходя из этого, было сделано следующее предположение: повышение уровня $[Ca^{2+}]$ во время функциональной разгрузки, как и во время тренировки, приводит к инактивации элонгационного фактора eEF2 (фосфорилированию в положении T56) и снижению эффективности элонгации трансляции. А поскольку увеличение концентрации $[Ca^{2+}]$ происходит уже на вторые сутки вывешивания [Ingals C.P. et al., 2001], этот механизм может лежать в основе снижения скорости синтеза белка на 21% после трехсуточного вывешивания.

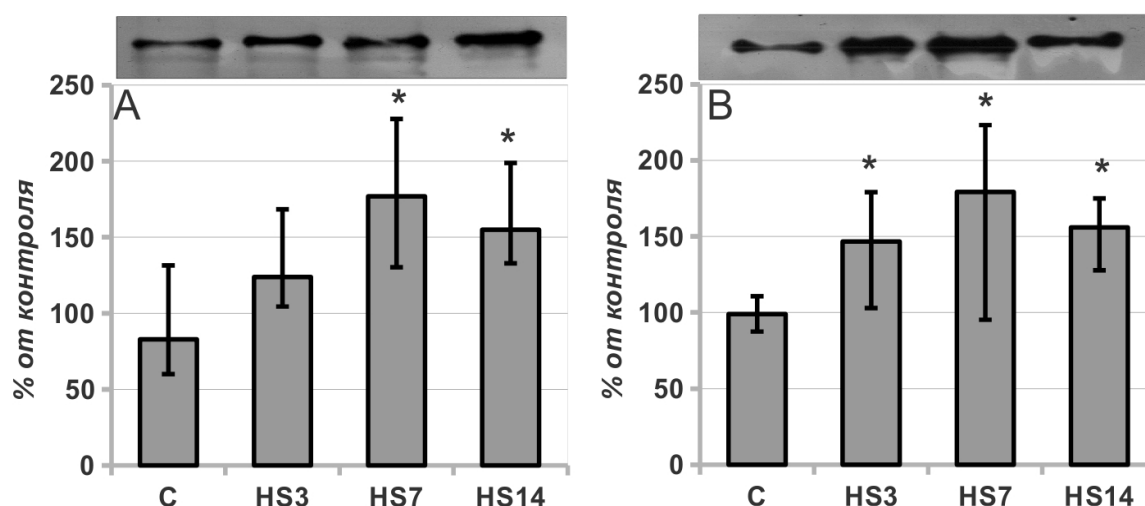


Рис.7. общее содержание eEF2K (A) и уровень фосфорилирования eEF2.
 C — интактный контроль; HS3 — вывешивание трое суток; HS7 — вывешивание семь суток; HS14 — вывешивание четырнадцать суток.
 Данные представлены в виде медианы и интерквартильной широты (0,25-0,75).
 * - достоверные отличия от контроля ($p < 0,05$)

Общее содержание eEF2K после 3 суток вывешивания еще не отличалось от контроля, а после 7 и 14 - существенно превышало его уровень. Фосфорилирование eEF2 по двум важнейшим сайтам, определяющим его активность, было существенно повышено после всех сроков воздействия (Рисунок 7). Несмотря на то, что после трех суток вывешивания данные по содержанию фермента и уровню фосфорилирования его субстрата отличаются, в целом тенденции этих двух параметров схожи.

Таким образом, снижение скорости синтеза белка на ранних сроках функциональной разгрузки вероятно связано со снижением эффективности трансляции, вызванным

снижением активности элонгационного фактора eEF2. Инактивация которого, в свою очередь, происходила из-за повышения концентрации ионов $[Ca^{2+}]$ в волокне.

Пассивное растяжение камбаловидной мышцы на фоне антиортостатического вывешивания. Применение специфического ингибитора mTOR системы — рапамицина.

Ранее многими авторами, в том числе сотрудниками нашей лаборатории было показано, что пассивное растяжение на фоне функциональной разгрузки приводит к поддержанию массы камбаловидной мышцы и площади поперечного сечения волокон, увеличению скорости синтеза белка [Loughna P. et al, 1986; Baewer D.V. et al., 2004; Kandarian S.C., Stevenson E.J., 2002; Miyazaki M. et al., 2008; Таракина М.В. и др., 2008]. Одним из возможных механизмов действия пассивного растяжения может быть активация mTOR системы. Как известно одним из стимулов этой системы является механическая нагрузка [Hornberger T.A., Chien S., 2006].

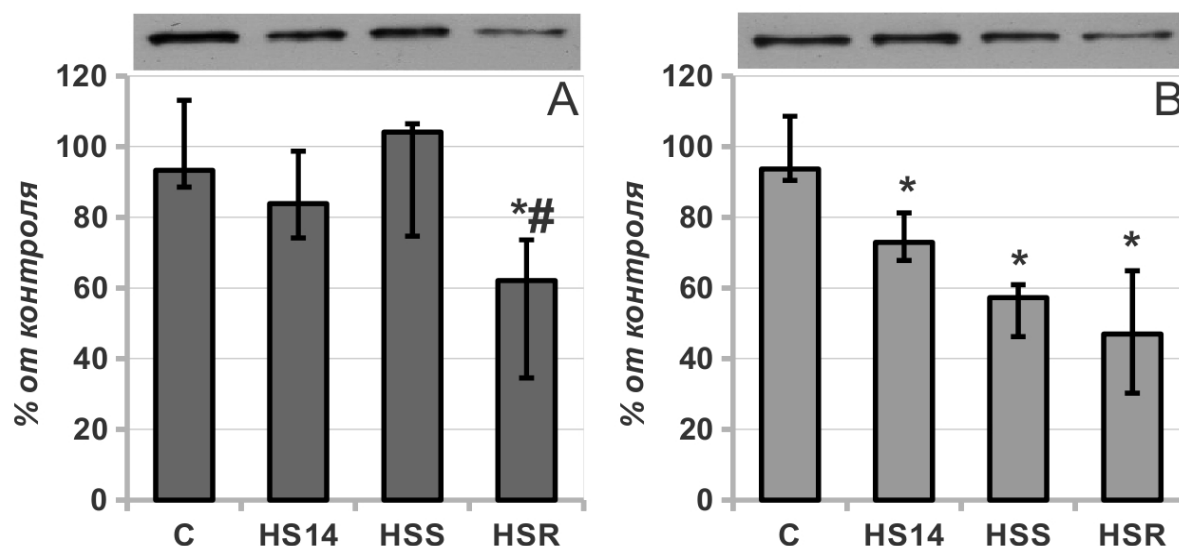


Рис.8. Общее содержание (A) и уровень фосфорилирования (B) p70S6k.

C — интактный контроль; HS14 — вывешивание четырнадцать суток; HSS — вывешивание и растяжение 14 суток; HSR — вывешивание, растяжение и инъекции рапамицина 14 суток.

Данные представлены в виде медианы и интерквартильной широты (0,25-0,75).

* - достоверные отличия от контроля ($p < 0,05$)

- достоверные отличия от HSS ($p < 0,05$)

При исследовании уровня фосфорилирования субстрата mTOR (p70S6k) было показано, что при применении пассивного растяжения на фоне разгрузки данный параметр был достоверно снижен в сравнении с контрольной группой, несмотря на то, что общее содержание киназы находилось на уровне контроля (Рисунок 8). Если предположить, что снижение уровня фосфорилирования p70S6k во время вывешивания было вызвано активацией протеолиза в волокне и снижением общего содержания фермента, то эффект поддержания его общего уровня при применении пассивного растяжения косвенно указывает на защитные механизмы данного воздействия. Поэтому возможным механизмом

поддержания мышечной массы при применении пассивного растяжения на фоне разгрузки в течение 14 суток является подавление протеолиза в мышечном волокне.

Применение рапамицина не способствовало изменению уровня фосфорилирования p70S6k относительно группы, в которой пассивное растяжение камбаловидной мышцы применялось на фоне вывешивания. Уровень фосфорилирования фермента был достоверно снижен относительно контрольной группы. Таким образом тот факт, что введение рапамицина не предотвращало эффект пассивного растяжения является следствием подавленного состояния mTOR системы в отсутствие ингибитора.

Исследование механизмов развития атрофии мышц у людей, длительное время потреблявших алкоголь.

На основании полученных при морфометрии данных все пациенты были разделены на две группы. В первую группу с морфологически подтвержденной атрофией мышечных волокон вошли 10 мужчин, средний возраст которых составил 45,6 лет, длительность приема алкоголя - 17,1 лет, среднее количество потребляемого этанола в сутки - 185,5 мл.

Вторую группу составили пациенты без морфологически подтвержденной атрофии мышечных волокон. В неё вошли 6 мужчин, средний возраст - 41,2 лет, длительность алкогольной интоксикации составила в среднем 9,6 лет, среднее количество употребляемого этанола - 200,0 мл/сут.

На основании результатов морфометрии в группе пациентов с атрофией мышечных волокон выделены две подгруппы: с атрофией только волокон II типа (53%) и с атрофией волокон как I, так и II типов (47%) (Рис. 10). Данные подгруппы были сопоставимы по возрасту и количеству потребляемого этанола в сутки.

При оценке длительности алкогольного анамнеза выявились статистически достоверные различия между группами. Так, в группе пациентов без атрофии мышечных волокон длительность алкогольной интоксикации составила 9,6 лет, с селективной атрофией волокон II типа - 15,1 лет, с атрофией обоих типов - 20,7 лет.

Оценка концентрации IGF-I в плазме крови выявила достоверные различия между пациентами с морфологически подтвержденной атрофией мышечных волокон (121,8 нг/мл) и группой контроля (216 нг/мл) (Рисунок 9).

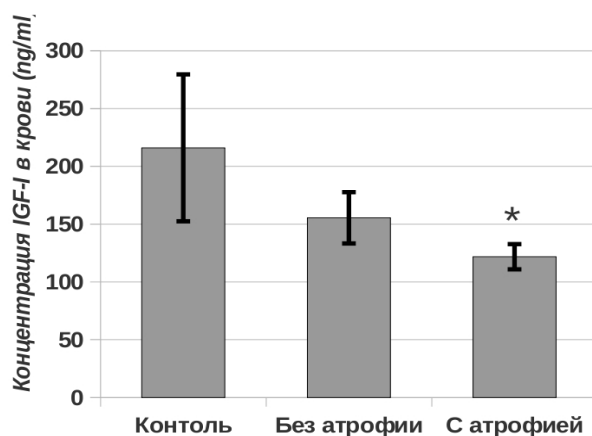


Рис.9. Концентрация инсулиноподобного ростового фактора 1 (IGF-I) в плазме крови. Данные представлены в виде медианы и интерквартильной широты (0,25-0,75).
* - достоверные отличия от контроля ($p < 0,05$)

Наши данные, свидетельствующие о снижении уровня IGF-1 у пациентов, согласуются с результатами, полученными в экспериментальных исследованиях на животных [Kumar V. et al., 2002; Lang C.H. et al., 2004]. Не исключено, что снижение уровня IGF-I у пациентов с хронической алкогольной интоксикацией может быть связано с той или иной степенью поражения печеночных тканей. Ведь основным источником циркулирующего IGF-I являются клетки печени.

Анализировались два IGF-I—зависимых сигнальных каскада, конечными эффекторами которых являются киназы S6 белка рибосом р70S6k (Рисунок 10) и р90 RSK (Рисунок 11).

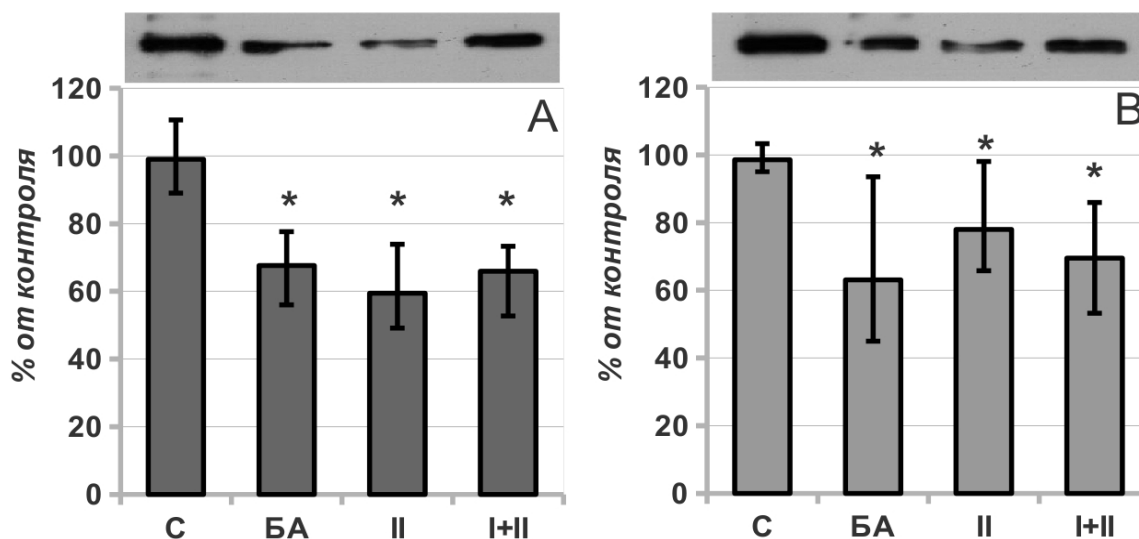


Рис.10. Общее содержание (А) и уровень фосфорилирования (В) р70S6k. С — контроль (здоровые добровольцы); БА — Пациенты без выявленных иммуногистохимически признаков атрофии; II — пациенты с атрофией волокон II типа; I+II — пациенты с атрофией волокон I и II типов. Данные представлены в виде медианы и интерквартильной широты (0,25-0,75).
* - достоверные отличия от контроля ($p < 0,05$)

Общее содержание и уровень фосфорилирования р70S6k были достоверно снижены во всех группах пациентов не зависимо от степени развития атрофических изменений.

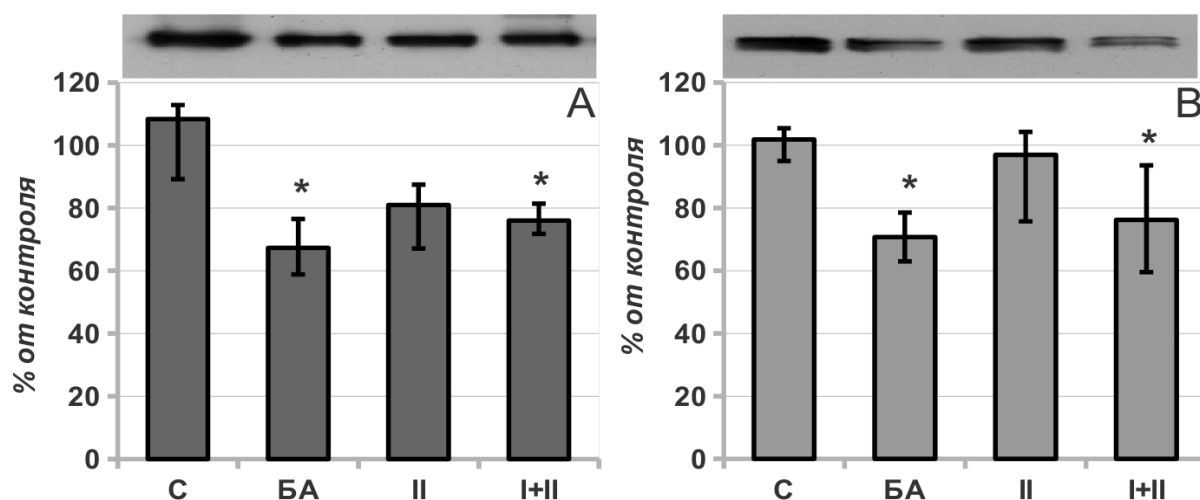


Рис.11. Общее содержание (A) и уровень фосфорилирования (B) p90 RSK. C — контроль (здоровые добровольцы); БА — Пациенты без выявленных иммуногистохимически признаков атрофии; II — пациенты с атрофией волокон II типа; I+II — пациенты с атрофией волокон I и II типов.

Данные представлены в виде медианы и интерквартильной широты (0,25-0,75).

* - достоверные отличия от контроля ($p < 0,05$)

Общее содержание и уровень фосфорилирования p90 RSK были также достоверно снижены во всех группах кроме группы с атрофией волокон второго типа. Тем не менее общая тенденция к снижению очевидна.

Ранее в экспериментах на хронически алкоголизированных животных было показано, что IGF-I-зависимые, выше лежащие по отношению к mTOR компоненты этого сигнального каскада не затронуты влиянием алкогольной интоксикации. Соответственно предполагается, что изменения p70S6k при хроническом алкоголизме обусловлены прямым действием этанола на mTOR. Естественнo предположить, что в настоящем исследовании снижение общего содержания и фосфорилированной формы p70S6K у обследованных пациентов связано с действием аналогичного патогенетического механизма. Что же касается изменений p90RSK, то эта киназа S6 белка рибосом является компонентом другого сигнального каскада, запускаемого IGF-I с помощью иных механизмов, до сих пор неисследованных применительно к алкогольной миопатии. Поэтому обнаруженные нами впервые изменения этой сигнальной молекулы у пациентов с хронической алкогольной интоксикацией могут быть обусловлены снижением концентрации IGF-I в системном кровотоке.

Хроническая алкоголизация животных.

На модели хронической алкоголизации животных исследовалась возможность применения стимуляторов белкового анаболизма (аминокислоты с разветвленными боковыми цепями — BCAA, механозависимый ростовой фактор — MGF) для устранения негативных эффектов хронической интоксикации в период восстановления животных после периода алкоголизации в условиях полного исключения этанола из рациона питания. Поскольку восстановительный период у пациентов клиники МГМУ им. И.М. Сеченова

составлял от 3 месяцев до года, учитывая межвидовые различия, было сделано предположение, что для возникновения положительных изменений в мышце животных, длительное время потреблявших алкоголь, достаточно будет одного месяца восстановительного периода. Также предполагалось, что при таком длительном восстановительном периоде негативные эффекты первоначального острого периода, так называемого абстинентного синдрома, не окажут существенного влияния на итоговые результаты.

После окончания периода алкоголизации производилась оценка потребления этанола, этот показатель составил в среднем $25 \text{ г} \cdot \text{кг} \text{ веса}^{-1} \cdot \text{день}^{-1}$. Причем в первые 6 недель эксперимента потребление этанола в группах увеличивалось, после чего этот показатель постепенно снижался (Рис.12).

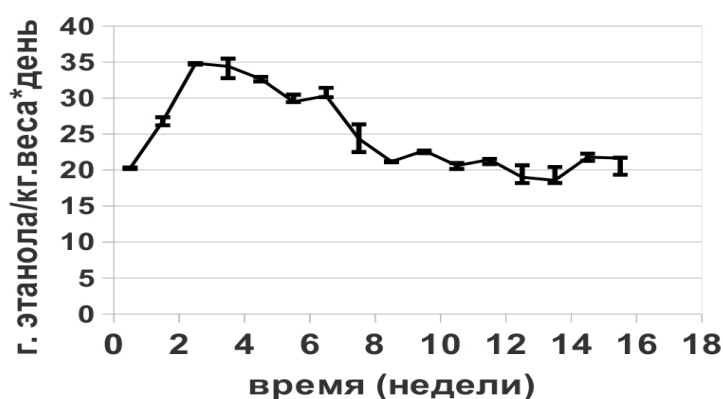


Рис.12. Потребление этанола животными в период алкоголизации. Данные представлены в виде медианы и интерквартильной широты (0,25-0,75).

Проводилась оценка площади поперечного сечения волокон медиальной головки икроножной мышцы с «быстрым» и «медленным» миозиновым фенотипом (Рисунок 13).

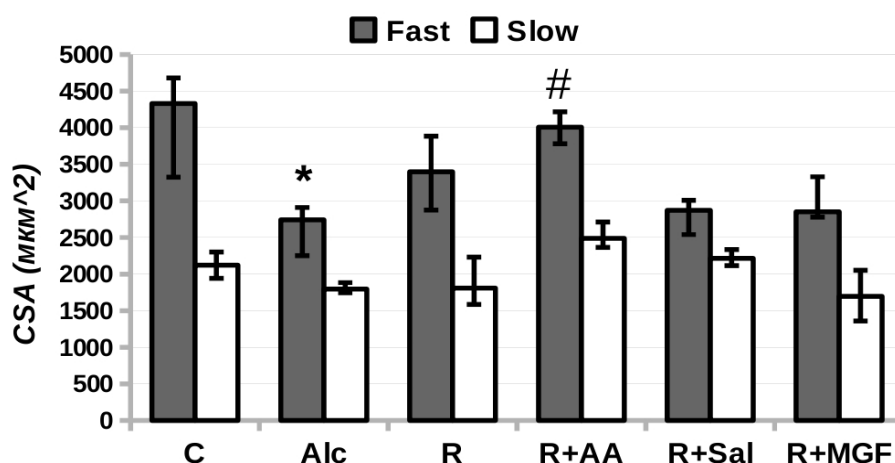


Рис.13. Площадь поперечного сечения волокон.

C — контроль; Alc — алкоголизация; R — восстановление; R+AA — восстановление с аминокислотами; R+Sal — восстановление с инъекциями физиологического раствора; R+MGF — восстановление с инъекциями MGF.

Данные представлены в виде медианы и интерквартильной широты (0,25-0,75).

* - достоверные отличия от контроля ($p < 0,05$)

- достоверные отличия от Alc ($p < 0,05$)

Хроническое потребление этанола не влияло на площадь поперечного сечения волокон с тяжелыми цепями миозина I типа, тогда как происходила атрофия волокон, содержащие тяжелые цепи миозина II типа, после алкоголизации. Восстановление этого параметра наблюдалось в группе, получавшей в период восстановления аминокислотные пищевые добавки. Внутримышечное введение MGF не приводило к подобным изменениям. Это согласуется с ранее опубликованными данными, свидетельствующими о том, что после алкоголизации происходит снижение площади поперечного сечения «быстрых» волокон, и двухнедельное восстановление в условиях исключения алкоголя из рациона животных не приводило к восстановлению этого параметра [Otis J.S., Guidot D.M., 2010].

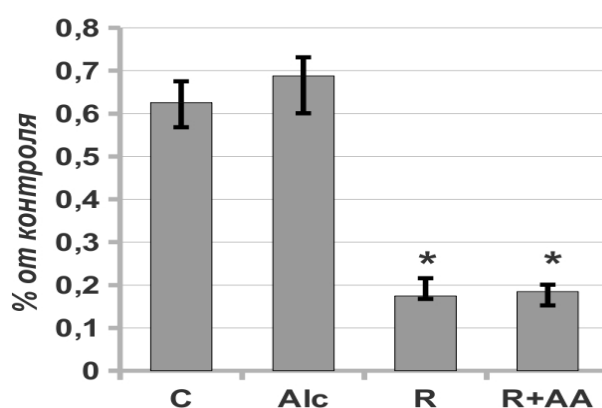


Рис.14. Содержание IGF-I в сыворотке крови.

C — контроль; Alc — алкоголизация; R — восстановление; R+AA — восстановление с аминокислотами

Данные представлены в виде медианы и интерквартильной широты (0,25-0,75).

* - достоверные отличия от Alc ($p < 0,05$)

Для анализа системных механизмов регуляции белкового метаболизма оценивалось содержание IGF-I в сыворотке крови (Рисунок 14). После 16 недель алкоголизации содержание этого ростового фактора не снижалось относительно контрольной группы, тогда как после месяца восстановления в условиях исключения алкоголя из рациона происходило снижение этого параметра на 70%. Эти данные не согласуются с работой, в которой было показано снижение IGF-I в плазме крови уже после 6 недель алкоголизации [Lang C.H. et al., 2003], однако, потребление этанола в нашем эксперименте было не столь интенсивным.

Для анализа клеточных механизмов регуляции синтеза белка оценивалась активность (фосфорилирование) киназ S6 белка рибосом p70S6k и p90 RSK (Рисунок 15).

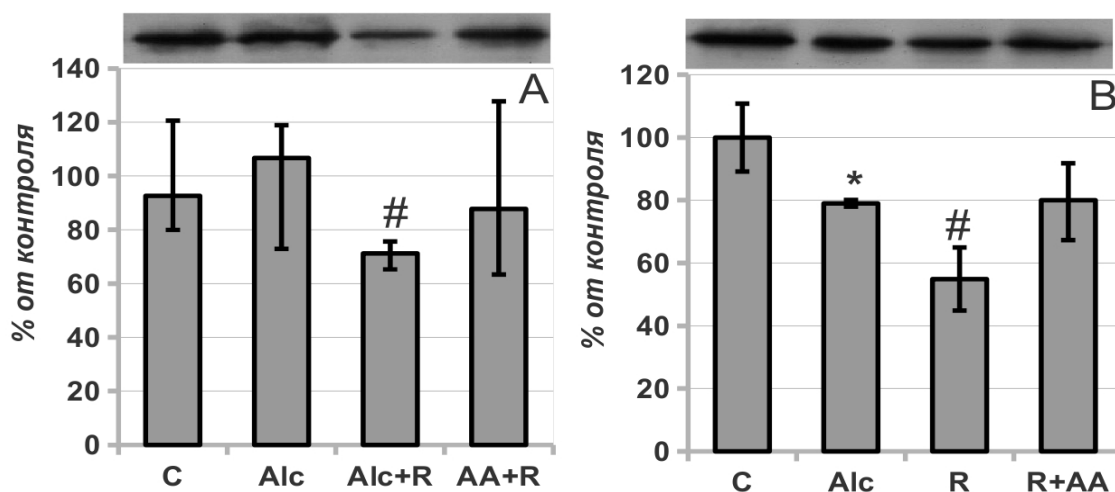


Рис.15. Уровень фосфорилирования p70S6k (A) и p90 RSK (B).

C — контроль; Alc — алкоголизация; R — восстановление; R+AA — восстановление с аминокислотами

Данные представлены в виде медианы и интерквартильной широты (0,25-0,75).

* - достоверное отличие от C ($p < 0,05$)

- достоверное отличие от Alc ($p < 0,05$)

Не происходило ожидаемого снижения уровня фосфорилирования p70S6k после периода алкоголизации, тогда как в период восстановления этот параметр снижался, а при восстановлении в сочетании с кормлением аминокислотами наблюдалась тенденция к восстановлению активности фермента. Отсутствие изменения активности p70S6k после 16 недель алкоголизации не согласуется с данными Lang [Lang C.H. et al., 2003]. Однако можно предположить, что на отсутствие изменения этого параметра могло повлиять либо недостаточное потребление этанола, либо снижение его потребления, которое наблюдалось в последние несколько недель эксперимента.

Впервые в случае с алкогольной миопатией анализировался уровень фосфорилирования другой киназы S6 белка рибосом p90 RSK. Активность этой киназы достоверно снижалась после периода алкоголизации, а прекращение приема алкоголя приводило к еще большему снижению параметра. Применение аминокислотных пищевых добавок не приводило к восстановлению ее активности, тогда как внутримышечное введение MGF восстанавливало уровень фосфорилирования p90 RSK до контрольных значений (Рисунок 16). Стимуляция киназы S6 белка рибосом, относящейся к MEK/Erk сигнальному каскаду, согласуется с представлениями о том, что анаболический эффект MGF опосредуется именно этим сигнальным каскадом [Philippou A. Et al., 2009]. Тем не менее восстановление активности p90 RSK не привело к восстановлению площади поперечного сечения быстрых волокон m.gastrocnemius.

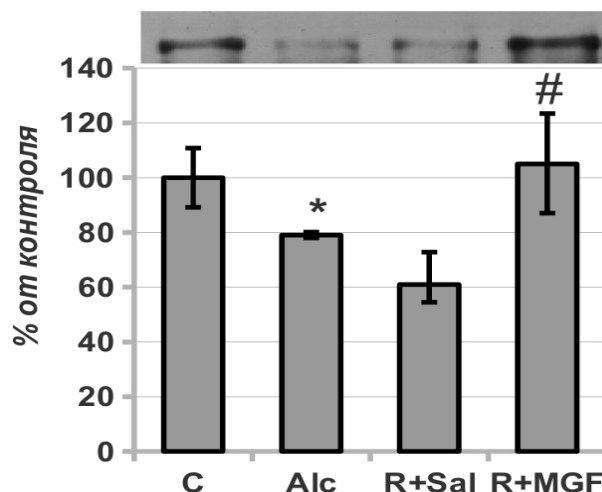


Рис.16. Уровень фосфорилирования p90 RSK при введении MGF.

C — контроль; Alc — алкоголизация; R+Sal — восстановление с инъекциями физиологического раствора; R+MGF — восстановление с инъекциями MGF.

Данные представлены в виде медианы и интерквартильной широты (0,25-0,75).

* - достоверные отличия от контроля ($p < 0,05$)

- достоверные отличия от R+Sal ($p < 0,05$)

Таким образом, длительное потребление алкоголя оказывало негативное действие на системы регуляции синтеза белка в мышце и развитие атрофии. Исключение этанола из рациона питания животных приводило к еще более существенным изменениям, что свидетельствует о развитии абстинентного синдрома на данном этапе эксперимента. Тем не менее, применение различных стимуляторов синтеза белка может ускорить восстановление анаболических процессов в мышце.

ВЫВОДЫ

1. Во время антиортостатического вывешивания различной продолжительности у крыс уменьшается уровень экспрессии системного регулятора синтеза белка инсулиноподобного фактора роста I (IGF-I) в печени (после 7 и 14 суток вывешивания) и камбаловидной мышце (после 3 и 7 суток вывешивания).

2. Динамика изменения активности и общего содержания киназ S6 белка рибосом (p70S6k, p90RSK) не совпадает с динамикой изменения содержания белка в камбаловидной мышце крыс во время антиортостатического вывешивания различной продолжительности. Причем снижение как уровня фосфорилирования, так и общего содержания p70S6k наблюдается лишь после 14 суток вывешивания, а уровень фосфорилирования и общее содержание p90RSK не снижаются после 3 и 14 и повышаются после 7 суток воздействия.

3. Во время антиортостатического вывешивания различной продолжительности в камбаловидной мышце крыс происходит увеличение уровня фосфорилирования фактора элонгации трансляции eEF2.

4. При хроническом пассивном растяжении камбаловидной мышцы крыс во время 14-

суточного вывешивания активность mTOR системы подавлена, а поддержание массы мышцы осуществляется за счет других механизмов.

5. У людей с морфологически выявленными атрофическими изменениями волокон латеральной головки четырехглавой мышцы бедра, вызванными длительным злоупотреблением алкоголя, происходит уменьшение уровня в крови системного регулятора синтеза белка IGF-I.

6. У людей и животных, длительное время потреблявших алкоголь, наряду с уменьшением площади поперечного сечения быстрых волокон происходит уменьшение активности сигнальных систем, ответственных за регуляцию синтеза белка (mTOR, MEK/Erk), независимо от степени проявления атрофических изменений.

7. В течение 30 суток после окончания периода алкоголизации уровень IGF-I в крови и активность сигнальных каскадов, активируемых им (mTOR, MEK/Erk) оказывается сниженной. При этом введение аминокислот с разветвленными боковыми цепями (BCAA) и внутримышечное введение механозависимого ростового фактора (MGF) способствует восстановлению активности mTOR системы и MEK/Erk сигнального каскада соответственно. Введение аминокислот также способствует восстановлению размеров быстрых волокон.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Е.А. Лысенко**, О.В. Туртикова, Е.В. Качаева, член корреспондент РАН И. Б. Ушаков, Б.С. Шенкман . АКТИВНОСТЬ РИБОСОМАЛЬНЫХ КИНАЗ ПРИ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ РАЗГРУЗКЕ РАЗЛИЧНОЙ ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТИ // ДОКЛАДЫ АКАДЕМИИ НАУК. 2010. Т.434(1):126–129.
2. Ю.В. Казанцева, Г.А. Маслова, **Е.А. Лысенко**, О.Е. Зиновьева, Б.С. Шенкман, Н.Н. Яхно. Механизмы развития атрофии скелетных мышц при хронической алкогольной интоксикации // Анналы клинической и экспериментальной неврологии. 2010. Т.4(4):15-19.
3. **Е.А.Лысенко**, Ю.В.Казанцева, О.Е. Зиновьева, Н.Н.Яхно, Б.С.Шенкман. Клеточные сигнальные механизмы в развитии атрофии скелетных мышц человека при хронической алкогольной миопатии // Технологии живых систем. 2010. Т.7(8):38-44.
4. Ю.Н. Ломоносова, Г.Р. Каламкаров, А.Е. Бугрова, Т.Ф. Шевченко, Н.Л. Карташкина, **Е.А. Лысенко**, В.И. Швеи, Т.Л. Немировская. ЗАЩИТНОЕ ДЕЙСТВИЕ L АРГИНИНА НА БЕЛКИ m. soleus ПРИ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ РАЗГРУЗКЕ МЫШЦЫ // БИОХИМИЯ. 2011. Т.76(5):699–710.
5. Туртикова О.В., **Лысенко Е.А.** Ростовые процессы в постуральной мышце в условиях гравитационной разгрузки и мышечного напряжения на ее фоне // VIII «Конференция молодых ученых, специалистов и студентов», посвященная дню космонавтики. Москва, 14 апреля 2009 года, С. 58.
6. Туртикова О.В., **Лысенко Е.А.**, Скачков И.В. Эффекты внутримышечного введения рекомбинантного механозависимого фактора роста у крыс // IX «Конференция молодых ученых, специалистов и студентов», посвященная дню космонавтики. Москва, 14 апреля 2010 года, С.72.
7. **Лысенко Е.А.**, Туртикова О.В., Качаева Е.В. Активность рибосомальных киназ при функциональной разгрузке задних конечностей животных различной продолжительности // IX «Конференция молодых ученых, специалистов и студентов», посвященная дню космонавтики. Москва, 14 апреля 2010 года, С.56.
8. **Лысенко Е.А.**, Туртикова О.В. Негативные эффекты хронической алкоголизации

животных и методы их предотвращения // X «Конференция молодых ученых, специалистов и студентов», посвященная дню космонавтики. Москва, 19 апреля 2011 года, С.44.

9. Шенкман Б.С., Качаева Е.В., **Лысенко Е.А.** Внутриклеточные сигнальные механизмы в процессах гипогравитационной атрофии мышц // XXI Съезд физиологического общества им. И.П.Павлова. Калуга, 19-25 сентября 2010 года, С.692.

10. **Лысенко Е.А.**, Туртикова О.В., Качаева Е.В., Шенкман Б.С. Механизмы регуляции синтеза белка при функциональной разгрузке различной продолжительности // IV Всероссийская с международным участием школа-конференция по физиологии мышц и мышечной деятельности. Москва, 1-4 февраля 2011 года, С.28.

11. Качаева Е.В., Лейнсо Т.А., **Лысенко Е.А.**, Туртикова О.В., Шенкман Б.С. IGF-I и его роль в регуляции изменений мышечной массы, синтеза белка в скелетных мышцах при функциональной разгрузке // IV Всероссийская с международным участием школа-конференция по физиологии мышц и мышечной деятельности. Москва, 1-4 февраля 2011 года, С.23.

12. B.S.Shenkman, **E.A.Lysenko**, E.V.Kachaeva, T.A.Leinso. Muscle mass regulation during gravitational unloading and reloading: facts and unsolved problems // International symposium Biological motility. Пущино, 2010 год. С.242.

13. **E.Lysenko**, E.Kachaeva, Yu.Kazantseva, G.Maslova, O.Zinovyeva, B.Shenkman. Some parameters of the protein synthesis during chronic alcohol intoxication in human // XXXIX European Muscle Conference. Падуя, Италия, 11-15 сентября 2010 года, С.115.

14. B.Shenkman, T.Leinso, E.Kachaeva, **E.Lysenko**. Liver and muscle IGF-I expression and signalling molecules in soleus muscle in the course of hindlimb unloading // XXXIX European Muscle Conference. Падуя, Италия, 11-15 сентября 2010 года, С.120.