На правах рукописи

ДУБИНИН Михаил Васильевич

Дисфункция митохондрий в экспериментальной модели мышечной дистрофии Дюшенна у мышей: механизмы и возможные подходы к коррекции

Специальность 1.5.22. Клеточная биология (биологические науки)

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Йошкар-Ола – 2024

Работа выполнена на кафедре биохимии, клеточной биологии и микробиологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Марийский государственный университет».

Научный консультант: доктор биологических наук, доцент
Белослудцев Константин Николаевич

Официальные оппоненты: **Шенкман Борис Стивович,** доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией миологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Государственного научного центра Российской Федерации – Института медико-биологических проблем Российской академии наук

Плотников Егор Юрьевич, доктор биологических наук, заведующий лабораторией структуры и функции митохондрий Научно-исследовательского института физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова

Бережнов Алексей Валерьевич, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории клеточных механизмов нейропатологий Института биофизики клетки Российской академии наук – обособленного подразделения Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Пущинский научный центр биологических исследований Российской академии наук»

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита состоится 22 мая 2024 г. в 10.00 часов на заседании диссертационного совета 24.2.434.01, созданного на базе федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Чувашский государственный университет имени И.Н. Ульянова» по адресу: 428034, Чувашская Республика, г. Чебоксары, ул. Университетская, д. 38, учебный корпус № 3, зал заседаний Ученого совета, к. 301.

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке Чувашского государственного университета имени И.Н. Ульянова по адресу: 428034, Чувашская Республика, г. Чебоксары, ул. Университетская, д. 38 и на сайте www. chuvsu.ru.

Автореферат разослан 19 февраля 2024 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета 24.2.434.01
доктор биологических наук, доцент Голубцова Наталья Николаевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы работы. Мышечная дистрофия Дюшенна (МДД) представляет собой рецессивное Х-сцепленное наследственное заболевание, которое вызвано мутациями в гене *DMD*, кодирующем белок дистрофин (Monaco et al., 1986). Это одна из самых частых форм мышечных дистрофий – МДД диагностируют в среднем у 1 из 3500 новорожденных мальчиков (Emery, 1991; Mendell et al., 2013; Duan et al., 2021). Патология характеризуется прогрессирующей мышечной слабостью, которая проявляется в раннем детстве и приводит к неспособности самостоятельно передвигаться уже во втором десятилетии жизни. При МДД отмечено поражение сердечной и гладкомышечной мускулатуры, пищеварительной и выделительной систем, однако именно скелетная мускулатура поражается в первую очередь (Литвинова, 2013; Архипова, 2015; Mercuri et al., 2019).

Развитие МДД обусловлено потерей белка дистрофина, обеспечивающего структурную целостность мышечной ткани, а также координирующего сборку ионных каналов и сигнальных молекул. Это приводит к прогрессирующей дестабилизации мышечного волокна, дисрегуляции ионного гомеостаза, развитию воспаления, замещению функциональной мышечной ткани соединительной и жировой тканью (Angelini et al., 2022). В настоящее время продолжаются исследования, направленные на создание генной терапии, позволяющей восстановить экспрессию дистрофина (Mendell et al., 2020; Happi Mbakam et al., 2022). Однако комплексный характер нарушений, присущих патологии МДД, предполагает применение дополнительных, наряду с генной терапией, подходов для лечения этого заболевания, поэтому актуальным является выявление новых мишеней и создание дополнительных способов терапии МДД, которые были бы эффективны и безопасны как для лечения патологии скелетных мышц, так и сердца и других органов.

Степень разработанности темы исследования. Большое внимание уделяется коррекции ионного гомеостаза, прежде всего кальциевого, дисрегуляция которого при МДД способствует увеличению количества активных форм кислорода (АФК), развитию хронического воспаления и фиброзу (Allard, 2006; Allen et al., 2016; Leyva-Leyva et al., 2018). Известно, что дистрофин-дефицитные мышечные волокна характеризуются увеличением уровня внутриклеточного Ca^{2+} (Emery and Burt, 1980; Harisseh et al., 2013; Tian et al., 2014). Это приводит к гиперсокращению и угнетению мышечного расслабления, что является специфическим признаком МДД (Hara et al., 2002). Избыток Ca^{2+} в цитоплазме клетки также приводит к нарушению дифференциации мышечных клеток (Niranjan et al., 2019), увеличению активности Ca^{2+}-зависимых протеаз (кальпаинов), что способствует протеолизу клеточных белков (Gailly et al., 2007; Voit et al., 2017), а также Ca^{2+}-зависимых фосфолипаз, нарушающих структуру и упаковку мембран клеток и органелл (Lindahl et al., 1995).

Дисрегуляция ионного гомеостаза обусловлена нарушением работы ионных каналов сарколеммы, ведущим к избыточному поступлению Ca^{2+} и Na^{+}

из внеклеточного матрикса в мышечные волокна (Allard, 2006; Leyva-Leyva et al., 2018). Кроме того, нарушение ионного гомеостаза при МДД связано с высвобождением большого количества Ca^{2+} из внутриклеточных депо, прежде всего саркоплазматического ретикулума и митохондрий (Ignatieva et al., 2021; Mareedu et al., 2021a). К настоящему времени выявлены конкретные транспортные системы саркоплазматического ретикулума, перестройки в которых приводят к нарушению буферизации Ca^{2+} в органеллах (SERCA, RyR и другие), а также разработаны подходы для нормализации их структуры и функции, ведущие к замедлению развития патологии МДД (Mareedu et al., 2021б). Также известно, что для МДД характерно развитие митохондриальной дисфункции, которая сопровождается снижением содержания аденозин-5'-трифосфата (АТФ) в мышечной ткани (Cole et al., 2002; Shuttlewood and Griffiths, 1982). При этом неизвестно, какие именно системы и механизмы ответственны за развитие митохондриальной дисфункции при МДД и возможно ли применение подходов, связанных с улучшением структуры и функции этих органелл для коррекции течения патологии скелетных мышц и сердца.

Изложенное определило цель исследования.

Целью исследования являлось изучение роли митохондриальной дисфункции в прогрессировании патологии скелетных мышц и сердца при МДД в модели дистрофин-дефицитных мышей линии *mdx* и влияния различных терапевтических подходов на структурно-функциональные параметры органелл и развитие заболевания.

В соответствии с целью были поставлены следующие **задачи**:

1. Оценить состояние мускулатуры скелетных мышц и сердца, а также структурно-функциональные особенности митохондрий этих тканей при развитии патологии МДД на модельных дистрофин-дефицитных мышах.

2. Выяснить влияние симптоматической противовоспалительной терапии на основе глюкокортикоида дефлазакорта на состояние скелетных мышц дистрофин-дефицитных мышей и структурно-функциональные параметры их митохондрий.

3. Изучить влияние метаболической модуляции скелетной мускулатуры и сердца дистрофин-дефицитных мышей нуклеозидом уридином на состояние тканей и структурно-функциональные параметры их митохондрий при МДД.

4. Оценить влияние активации митохондриального, активируемого ионами кальция калиевого канала производным бензимидазола NS1619 на состояние скелетной мускулатуры и сердца дистрофин-дефицитных мышей, а также структурно-функциональные параметры митохондрий этих органов при МДД.

5. Изучить влияние ингибирования кальций-зависимой МРТ-поры циклическим пептидом алиспоривиром на состояние скелетной мускулатуры и сердца дистрофин-дефицитных мышей и структурно-функциональные параметры митохондрий этих органов при МДД.

6. Оценить влияние митохондриальной заместительной терапии на дисфункцию митохондрий и сопутствующую патологию скелетных мышц дистрофин-дефицитных мышей.

Научная новизна. Впервые показано, что развитие патологии скелетных мышц *mdx*-мышей сопровождается нарушением ультраструктуры митохондрий, а также перестройками в митохондриальных системах транспорта и буферизации Ca^{2+}. Это приводит к угнетению способности органелл поглощать и удерживать Ca^{2+} в матриксе. При этом митохондрии дистрофин-дефицитных скелетных мышц также характеризуются снижением эффективности транспорта K^+ и общего уровня этого иона в матриксе, что может быть обусловлено снижением уровня и активности K^+-каналов в мембране органелл. Все это вносит существенный вклад в дисфункцию органелл и развитие патологии МДД.

Впервые показано, что кортикостероид дефлазакорт (ДФК), применяемый в терапии МДД, лишь частично нормализует ультраструктуру и функциональную активность митохондрий скелетных мышц *mdx*-мышей, улучшая эффективность поглощения кальция, но угнетая способность органелл буферизовать и удерживать большие концентрации Ca^{2+}.

Впервые обнаружено, что митохондрии сердца *mdx*-мышей характеризуются увеличением эффективности рециклизации и буферизации Ca^{2+}, обусловленным перестройками в системах транспорта иона. Предположено, что такие перестройки могут способствовать адаптации сердца к условиям МДД и отсрочивать развитие выраженной сердечной патологии. С другой стороны, в сердце *mdx*-мышей впервые выявлено подавление митохондриального гомеостаза ионов калия, что может обуславливать ультраструктурные нарушения органелл и лежать в основе развития аритмии и кардиомиопатии, характерных для МДД.

Установлено, что ингибирование поры митохондриального перехода проницаемости (МРТ-поры) с помощью циклического пептида алиспоривира (Али) приводит к улучшению ультраструктуры и функции митохондрий, в том числе способности органелл аккумулировать Ca^{2+}, что сопровождается снижением интенсивности деструктивных процессов в мышечной ткани и улучшением мышечной функции, а также тенденцией к нормализации электрофизиологических параметров работы сердца.

Впервые показано, что активация Ca^{2+}-зависимого K^+-канала с помощью производного бензимидазола NS1619 приводит к улучшению ультраструктуры и функциональной активности митохондрий скелетных мышц и сердца *mdx*-мышей и способствует снижению интенсивности окислительного стресса, а также улучшению состояния тканей животных, несмотря на выявленные побочные эффекты, обусловленные плейотропностью действия NS1619.

Впервые выявлено положительное влияние метаболического модулятора уридина (Ури) на состояние скелетных мышц и сердца дистрофин-дефицитных мышей, которое выражается в снижении уровня фиброза в тканях. Это, как предполагается, обусловлено как известным комплексным влиянием уридина на энергетический обмен, так и его непосредственными эффектами на функционирование митохондрий скелетных мышц и сердца.

Впервые показано, что митохондриальная заместительная терапия, которая заключается во введении аллогенных митохондрий скелетных мышц от здоровых животных приводит к улучшению состояния и функционирования

скелетных мышц *mdx*-мышей. Установлено, что такой эффект может быть обусловлен снижением интенсивности окислительного стресса в митохондриях скелетных мышц при МДД и нормализацией ультраструктуры органелл.

Теоретическая и практическая значимость работы. Полученные при выполнении диссертационной работы научные результаты расширяют представление о структуре и механизмах функционирования митохондрий скелетных мышц и сердца в норме и патологии. С одной стороны, они позволяют проследить цепь драматических событий в поперечнополосатой мышечной ткани, обусловленных потерей белка дистрофина и ведущих к структурно-функциональным изменениям в митохондриальной сети, вносящим вклад в развитие каскада дегенеративных процессов в тканях скелетной мускулатуры и сердца. С другой стороны, полученные результаты демонстрируют изменения в митохондриях, которые в ряде случаев могут способствовать адаптации мышечных клеток, тканей и организма в целом к условиям мышечной дистрофии. В работе предложены подходы, позволяющие комплексно оценить структурно-функциональные изменения в поперечнополосатой мускулатуре при развитии МДД. Результаты работы могут быть использованы в лекционных курсах в области клеточной биологии, биофизики, биоэнергетики, патофизиологии и медицины, поскольку дисфункция биоэнергетического аппарата клеток, представленного митохондриями, обуславливает развитие множества патофизиологических состояний. Полученные данные имеют практическую значимость и могут найти применение в разработке новых перспективных подходов для поддержания функции тканей скелетной мускулатуры и сердца при МДД и других типах мышечных дистрофий, имеющих схожий патогенез.

Методология и методы исследования. Изучение параметров, отражающих развитие МДД, проведено на организменном и тканевом (скелетные мышцы, миокард) уровне, а также на уровне митохондрий, изолированных из этих тканей. Для этого использованы современные методы клеточной биологии, общей гистологии, биофизики, физиологии, молекулярной биологии, для обработки результатов применены адекватные статистические методы. В качестве объекта исследования были выбраны дистрофин-дефицитные мыши линии C57BL/10ScSn-Dmdmdx (*mdx*-мыши) и мыши линии C57BL/10 дикого типа (контроль). Материал исследования – ткани скелетных мышц и миокарда, а также митохондрии, изолированные из этих тканей.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Дистрофин-дефицитная патология *mdx*-мышей сопровождается структурно-функциональными изменениями в митохондриях скелетных мышц и сердца животных, обусловленными перестройками в белковых комплексах органелл, регулирующих транспорт и уровень ионов кальция и калия. Это способствует развитию окислительного стресса, дегенеративному процессу и фиброзу, а также функциональным нарушениям скелетной мускулатуры и сердца.
2. Нормализация гомеостаза ионов калия и кальция в митохондриях скелетных мышц и сердца *mdx*-мышей замедляет развитие дистрофин-дефицитной патологии.

3. Митохондриальная заместительная терапия, основанная на введении аллогенных митохондрий, полученных из мышц здоровых животных, в скелетную мускулатуру *mdx*-мышей, снижает интенсивность патологического процесса.

Достоверность полученных результатов.

Достоверность результатов исследования основана на использовании современных и адекватных методов, статистической обработке полученных данных и на достаточном объеме выборок. Эксперименты выполнены на сертифицированных животных с генетически обусловленным дефицитом дистрофина.

Апробация результатов исследований. Материалы диссертации были представлены на международной конференции Biomembranes 2018 (Долгопрудный, 2018), на Всероссийской школе-конференции молодых ученых «Биохимия – основа наук о жизни» (Казань, 2019), VI и VII Съезде биофизиков России (Сочи, 2019; Краснодар, 2023), XII Всероссийском симпозиуме с международным участием «Биологическая подвижность» (Пущино, 2019), 72-75 Всероссийских с международным участием школах-конференциях молодых ученых «Биосистемы: организация, поведение, управление» (Нижний Новгород, 2019, 2020, 2021, 2022), Всероссийской конференции «Современные проблемы естественных наук и медицины» (Йошкар-Ола, 2020, 2021), международной конференции «Рецепторы и внутриклеточная сигнализация» (Пущино, 2021), X Всероссийской с международным участием школе-конференции «Новые подходы к изучению проблем физиологии экстремальных состояний» (Москва, 2021), Всероссийской конференции «Современные проблемы естественных наук и фармации» (Йошкар-Ола, 2022, 2023), XXVIII Всероссийской конференции молодых ученых с международным участием «Актуальные проблемы биомедицины – 2022» (Санкт-Петербург, 2022), научной конференции «Young researchers: challenges and prospects» (Йошкар-Ола, 2022), IX Российской, с международным участием, конференции по управлению движением «Motor control 2022» (Казань, 2022), XXIV съезде Физиологического Общества им. И.П. Павлова (Санкт-Петербург, 2023). Материалы конференций опубликованы в виде тезисов и сборников статей.

Соответствие паспорту специальности. Диссертационная работа соответствует паспорту научной специальности 1.5.22. Клеточная биология (биологические науки):

– Изучение строения клеток и тканей и общих закономерностей генеза, ультраструктурной организации и функции клеток эукариот, в том числе в составе тканей и органов (п. 1).

– Клеточные компартменты и органеллы, их пространственная и структурнофункциональная организация. Цитоплазма, ядро, митохондрии, эндоплазматический ретикулум, комплекс Гольджи, эндосомы, лизосомы и лизосомоподобные органеллы, пероксисомы, хлоропласты и другие пластиды, плазматическая мембрана, клеточная оболочка. Рибосомы. Протеасомы. Немембранные органеллы и структуры, формируемые внутренне неупорядоченными белками и РНК. (п. 2).

– Мембраны клетки и органелл, их состав и структурно-функциональная организация. Ионные каналы, транспортеры и другие механизмы транспорта через мембрану. Механизмы поддержания ионного гомеостаза (п. 6).

– Энергетика клетки, регуляция редокс-статуса клетки. Молекулярные, иммунологические и физиологические аспекты изучения клеток многоклеточных и одноклеточных организмов в норме и патологии (п. 18).

Реализация и внедрение результатов работы.

Работа выполнена при финансовой поддержке грантов РНФ (18-75-00011 и 20-75-10006).

Личный вклад автора.

Планирование, организация, выполнение экспериментов, анализ данных, подготовка материалов к публикации и написание статей, их перевод (при публикации в международных изданиях) на английский язык проводился при личном участии автора. Помощь в выполнении ряда экспериментов оказывали соавторы статей, сотрудники Марийского государственного университета (Семенова А.А., Теньков К.С., Шарапов В.А., Ведерников А.А.), а также сотрудники Института теоретической и экспериментальной биофизики РАН (Белослудцева Н.В., Старинец В.С., Михеева И.Б., Таланов Е.Ю.).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 36 печатных работ, из них 17 статей в изданиях, рекомендованных ВАК РФ, 1 монография, 7 статей в сборниках и 11 тезисов докладов.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 269 страницах, включает введение, обзор литературы, описание материалов и методов исследования, собственные результаты и их обсуждение, заключение, выводы, список литературы, содержащий 555 источников. Работа иллюстрирована 111 рисунками и 21 таблицей.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во **введении** представлены актуальность данного исследования, степень разработанности проблемы, цели и задачи исследования, научная новизна, научно-практическая значимость работы, методология и методы исследования, научные положения, выносимые на защиту, личный вклад автора, степень достоверности и апробация результатов научных исследований.

В **первой главе** проведен обзор литературы, который включает описание общей этиологии МДД и механизмов, ведущих к нарушению мышечной функции, роли нарушения метаболизма и митохондриальной дисфункции в прогрессировании заболевания, терапевтических подходов, используемых для коррекции этой патологии, а также характеристику экспериментального объекта – дистрофин-дефицитных мышей.

Вторая глава посвящена материалам и методам исследования. В работе использовались дистрофин-дефицитные мыши линии C57BL/10ScSn-Dmd*mdx* (*mdx*-мыши) и мыши линии C57BL/10 дикого типа (контроль). Содержание, кормление и выведение животных из эксперимента соответствовали международным правилам «Guide for the Care and Use of Animals» и проводились

в полном соответствии с Руководством по содержанию и уходу за лабораторными животными (NIH), правилами надлежащей лабораторной практики (приказ МЗ РФ от 01.04.2016 г., № 199н). При исследованиях *in vivo* влияния действия терапевтических агентов соединения вводились внутрибрюшинно или внутримышечно в течение месяца в объеме, не превышающем 150 мкл. Контрольные группы получали инъекции растворителя в те же сроки и в том же объеме.

Оценка мышечной силы и выносливости животных. Мышечную функцию и выносливость мышей оценивали с помощью теста «на струне». В этом случае мышь помещали на металлическую струну, где она удерживалась в течение 30 с. Подсчет результатов теста проводился по известной методике (Deacon et al., 2013). В ряде случаев для оценки мышечной силы животных использовали тест силы хватки (Grip Strength Test) («IITC Life Science», США).

Регистрация электрокардиограммы (ЭКГ) животных. ЭКГ иммобилизованных животных записывали во II стандартном отведении с помощью монитора сердечного ритма SparkFun Single Lead (SparkFun Electronics, США). Сигналы ЭКГ обрабатывали с помощью программного обеспечения Clampfit 11.2.0.59 (Molecular Devices LLC, США).

Гистологические исследования. Образцы скелетных мышц и сердца, окрашенные гематоксилином и эозином и по Ван-Гизону исследовали с помощью системы визуализации EVOS M5000 (Thermo Fisher Scientific, США). Изображения были проанализированы с использованием программного обеспечения ImageJ.

Просвечивающая электронная микроскопия. Электронно-микроскопическое исследование тканей скелетных мышц и сердца проводили на микроскопе JEM-100B (JEOL, Япония). Изображения снимались на пленку, негативы которой были оцифрованы с помощью сканера Epson V700 и использованы для ультраструктурного анализа. Морфометрический анализ изображений проводили при помощи программного обеспечения Image Tool 3.0.

Определение уровня АТФ в скелетных мышцах. Уровень АТФ в скелетных мышцах мышей (пмоль/мкл экстракта) определяли флуориметрически с помощью коммерчески доступного набора (Sigma-Aldrich, США).

ПЦР в реальном времени. Уровень экспрессии интересующих генов определяли методом ПЦР в реальном времени с этапом обратной транскрипции. ПЦР в реальном времени проводили с помощью амплификатора DTlite (ДНК Технология, Россия) с использованием набора qPCRmix-HS SYBR (Евроген, Россия). Оценку изменения относительного уровня мРНК проводили в соответствии с общепринятым методом ΔΔCt (Schmittgen et al., 2008).

Количественная оценка митохондриальной ДНК. Оценку содержания мтДНК в ткани сердца проводили методом ПЦР (Quiros et al., 2017), и выражали как отношение мтДНК/яДНК. В анализе оценивали уровни транскрипции гена *ND4*, кодируемого митохондриальным геномом, и гена *GAPDH*, кодируемого ядерным геномом, что дает возможность оценить отношение количества копий мтДНК к количеству копий яДНК.

Электрофорез и иммуноблоттинг. Определение количества исследуемых белков проводилось методом иммуноблоттинга с использованием соответствующих коммерческих антител на эти белки. Пероксидазная активность детектировалась с использованием ECL-хемилюминесцентного реагента. Исследуемые белки были визуализированы на системе LI-COR (LI-COR, США).

Выделение митохондрий. Митохондрии выделяли из скелетных мышц и сердца экспериментальных групп мышей общепринятым методом дифференциального центрифугирования в соответствии с описанным ранее протоколом (Frezza et al., 2007).

Оценка функциональных параметров митохондрий. Дыхание митохондрий регистрировали полярографическим методом с помощью электрода Кларка и установки Oxygraph-2k (Австрия) или Oxygraph Plus (Великобритания). Активность комплексов дыхательной цепи митохондрий оценивали спектрофотометрически согласно общепринятым протоколам (Spinazzi et al., 2012; Pollard et al., 2016; Venediktova et al., 2021) с использованием планшетного спектрофотометра Multiskan GO (Thermo Fisher Scientific, США). Разность электрических потенциалов ($\Delta\psi$) на внутренней мембране митохондрий оценивали по распределению флуоресцентного зонда сафранина О через внутреннюю мембрану с помощью планшетного спектрофлуориметра Varioskan LUX (Thermo Fisher Scientific, США). Скорость образования H_2O_2 измеряли с помощью флуоресцентного индикатора Amplex Red и пероксидазы хрена на флуориметре Varioskan LUX. Транспорт Ca^{2+} в митохондриях оценивали спектрофотометрически с помощью индикатора арсеназо III и планшетного спектрофотометра Tecan Spark 10 M (Tecan Group Ltd, Швейцария). Транспорт K^+ в митохондриях определяли по скорости 2,4-динитрофенол (ДНФ)-индуцированного выхода K^+ из органелл с помощью K^+-селективного электрода, а общее содержание K^+ в митохондриях определялось путем последующей солюбилизации Triton X-100 (Баранова и др., 2000). Уровень липидных перекисей, и прежде всего малонового диальдегида (МДА) в суспензии изолированных митохондрий, оценивали спектрофотометрически по изменению уровня реактивных соединений тиобарбитуровой кислоты (Belosludtseva et al., 2020). Фазовое состояние митохондриальных мембран определяли путем измерения интенсивности флуоресценции лаурдана (Amaral et al., 2016).

Митохондриальная заместительная терапия. Митохондрии скелетных мышц мыши линии C57BL/10, выделенные методом дифференциального центрифугирования и, при необходимости, предварительно окрашенные MitoTracker Red, вводились туберкулиновым шприцом в мышцы передней и задней поверхности бедра *mdx*-мышей, что соответствует предлагаемым подходам (Orfany et al., 2020). Оценку успешности митохондриальной трансплантации проводили на свежеприготовленных поперечных криосрезах скелетных мышц мышей. Исследования окрашенных препаратов проводились с использованием системы визуализации EVOS M5000.

Статистическая обработка результатов. Статистическую обработку данных выполняли с помощью GraphPad Prism 8.0.1 и *t*-теста Стьюдента или

однофакторного дисперсионного анализа (one-way ANOVA). Для последующего сравнения средних дисперсионного комплекса использовали тест Тьюки. Результаты представляли в виде среднего значения ± стандартная ошибка средней. Различия принимались как достоверные при уровне значимости 0,05.

В третьей главе представлены результаты исследования и их обсуждение.

1. Дисфункция скелетных мышц при мышечной дистрофии Дюшенна сопровождается нарушением ультраструктуры митохондрий и их функциональной активности

Дистрофин-дефицитные мыши линии *mdx* являются популярными моделями, используемыми для изучения МДД. Для этих животных характерно развитие хронической формы миодистрофии, при которой наблюдается повышение интенсивности повреждения мышц и снижение мышечной силы. На рисунке 1 представлены результаты физиологических тестов – тест удержания животного на горизонтальной струне и тест «сила хватки». Можно видеть, что *mdx*-мыши характеризуются существенным снижением показателей, отражающих мышечную силу и выносливость по сравнению с контрольными животными, что согласуется с данными литературы (Hughes et al., 2019).

Наряду со снижением мышечной силы и выносливости, mdx-мыши характеризуется следующими отличительными чертами, отражающими развитие патологии МДД: увеличением количества мышечных волокон, содержащих центрально расположенные ядра, что является свидетельством интенсивных циклов дегенерации и регенерации мышц (рисунок 2А, Б и Д); увеличением площади фиброза, свидетельствующим о замещении мышечной паренхимы элементами соединительной ткани (рисунок 2В, Г и Е); высоким уровнем активности креатинкиназы в сыворотке крови, что является маркером нарушения целостности мембран мышечных волокон (рисунок 2Ж).

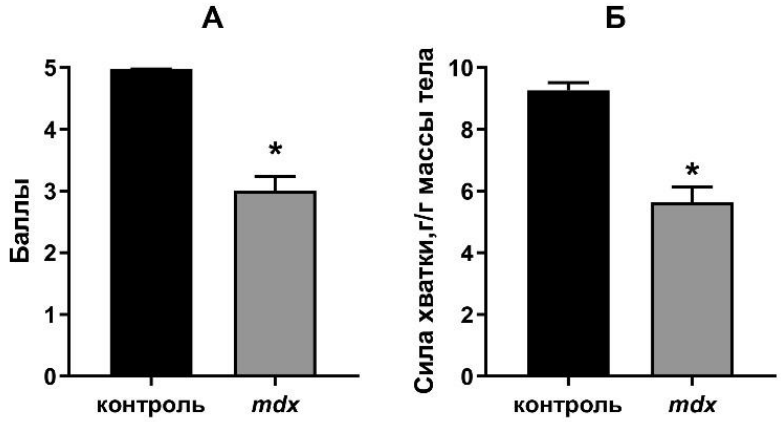

Рисунок 1 – Результаты физиологических тестов, отражающие мышечную силу и выносливость мышей: А – результаты теста «на струне». Б – результаты теста «сила хватки». Приведены средние значения ± ошибка средней (n=10). * различия между показателями *mdx*-мышей и контрольными животными статистически значимы, $p < 0,05$

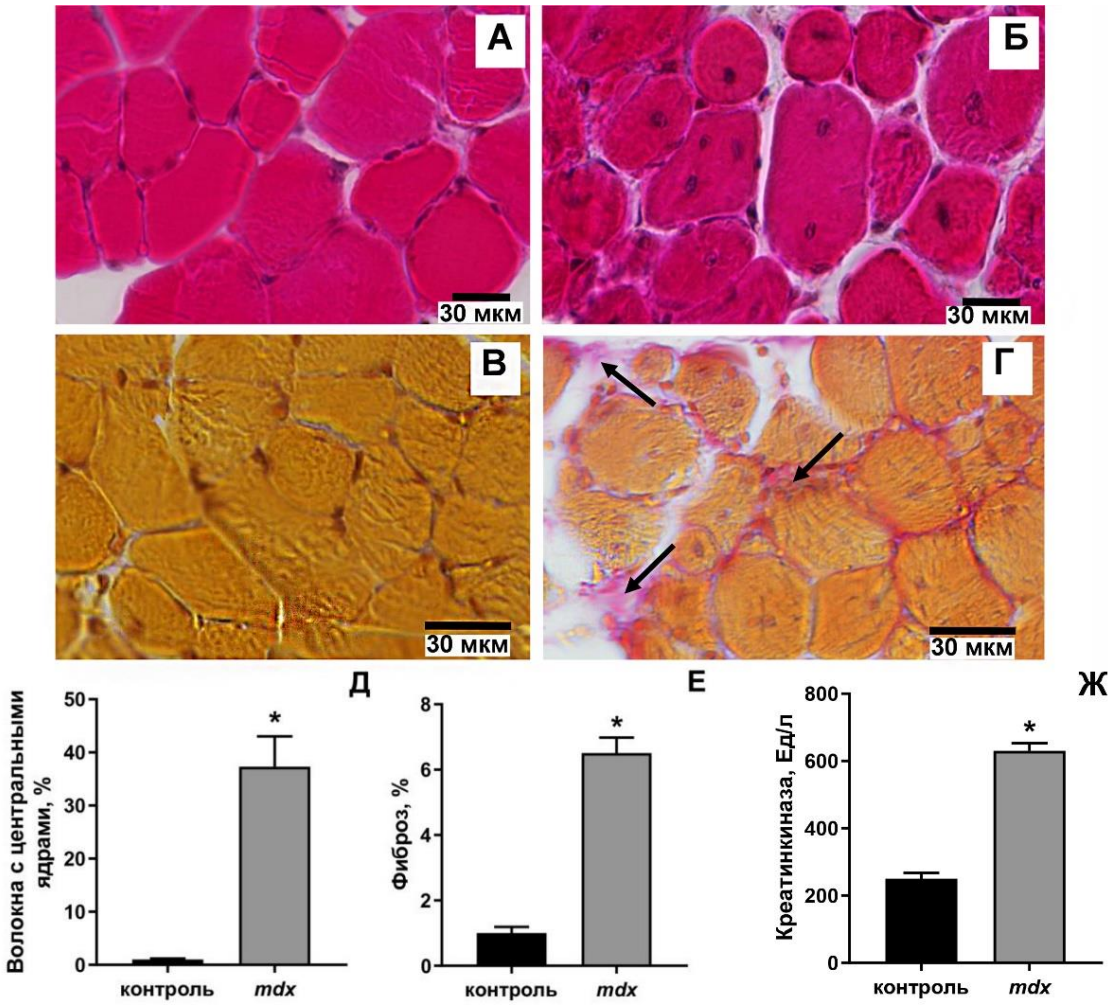

Рисунок 2 – Гистологическая структура четырехглавой мышцы бедра мышей группы контроль (А, В) и *mdx* (Б, Г), демонстрирующая волокна, содержащие центрально расположенные ядра (А, Б, окраска гематоксилином и эозином) и области фиброза (В, Г, указаны стрелкой, окраска по Ван-Гизону). Бар – 30 мкм. (Д) Процент волокон, содержащих центрально расположенные ядра, в мышцах мышей. (Е) Площадь интерстициального фиброза в скелетных мышцах мышей. (Ж) Активность креатинкиназы в сыворотке крови мышей. Приведены средние значения ± ошибка средней (n=3). * различия между параметрами *mdx*-мышей и контрольных животных статистически значимы, $p < 0{,}01$

В мышцах *mdx*-мышей наблюдаются и ультраструктурные изменения. На рисунке 3 представлены данные электронной микроскопии ткани четырёхглавой мышцы бедра контрольных животных и дистрофин-дефицитных мышей. Для мышечной ткани *mdx*-мышей характерны расширенные промежутки между миофибриллами, скопление в этих участках тубулярных структур, гликогена. В отдельных саркомерах в области I-дисков наблюдается расширение промежутков между актиновыми протофибриллами. Отмечается изменение формы митохондрий, исчезновение плотных гранул из матрикса, деформация крист, местами уменьшение их количества или полное исчезновение.

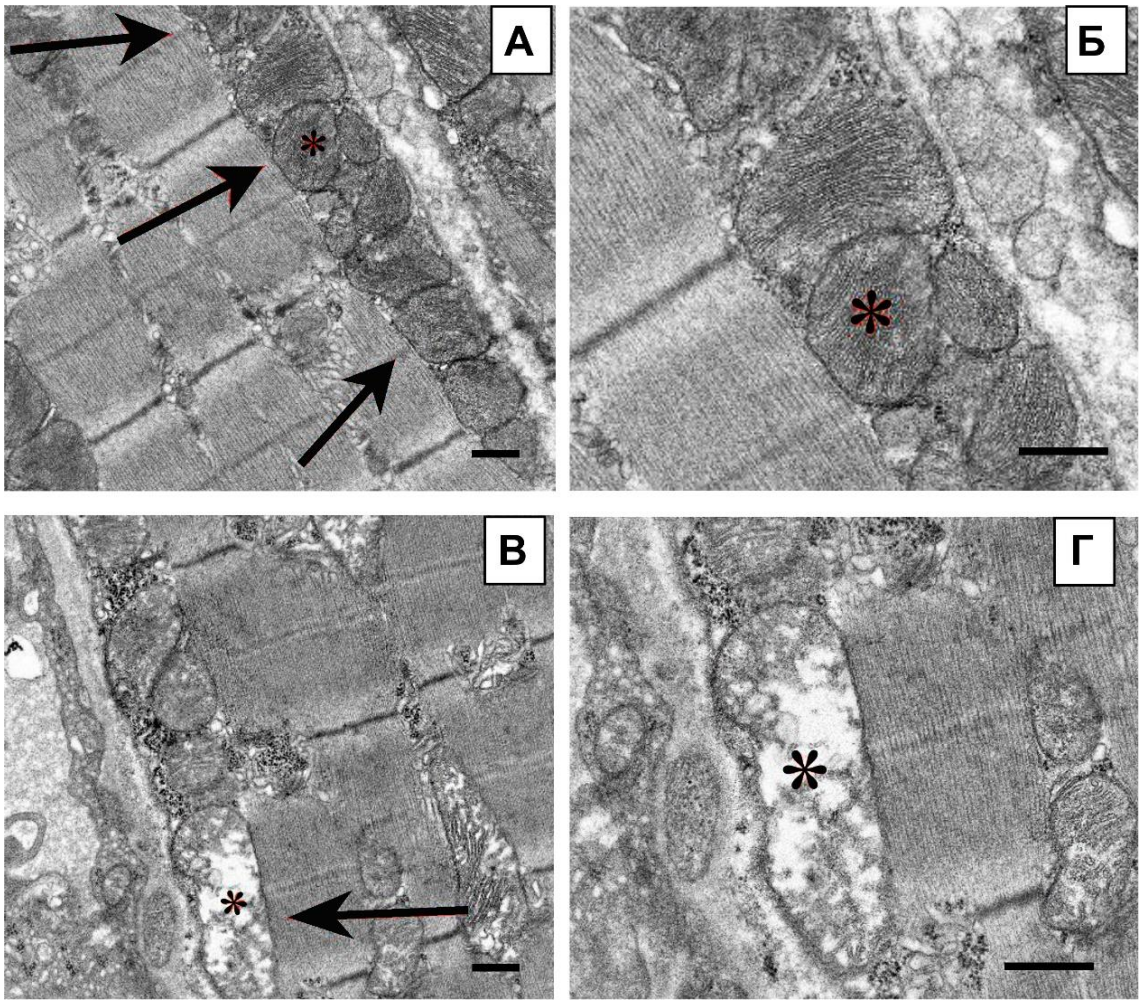

Рисунок 3 – Ультраструктура четырехглавой мышцы бедра контрольных мышей (А, Б) и *mdx*-мышей (В, Г). Стрелками отмечена субсарколеммальная популяция митохондрий. Звездочкой отмечены одни и те же митохондрии при малом и большом увеличении. Бар – 1 мкм

В следующих экспериментах мы оценили функциональную активность митохондрий, выделенных из скелетной мышечной ткани *mdx*-мышей и мышей дикого типа. В таблице 1 представлены данные, характеризующие параметры дыхания и окислительного фосфорилирования митохондрий скелетных мышц дистрофин-дефицитных мышей и мышей группы контроля. Как видно из представленных данных, для митохондрий скелетных мышц *mdx*-мышей характерно существенное снижение скоростей дыхания в стимулируемом аденозиндифосфатом (АДФ) состоянии (состояние 3) и в условиях разобщающего действия ДНФ (состоянии $3U_{ДНФ}$) по сравнению с контрольными животными. При этом параметр дыхательного контроля, отражающий степень сопряжения окисления и фосфорилирования, в митохондриях *mdx*-мышей был снижен практически на 50% по сравнению с митохондриями мышей дикого типа, а эффективность синтеза АТФ, оцененная по коэффициенту АДФ/О, снижалась на 15%.

Такое угнетение функциональной активности митохондрий скелетных мышц также сопровождается снижением уровня АТФ в скелетных мышцах (с 218±17 пмоль/мкл экстракта ткани у мышей дикого типа до 129±10 пмоль/мкл у

mdx-мышей, $p<0,01$). Таким образом, можно видеть, что митохондрии скелетных мышц *mdx*-мышей характеризуются более низкой эффективностью дыхания и окислительного фосфорилирования, что способствует снижению уровня АТФ в скелетных мышцах, необходимого, прежде всего, для мышечного сокращения.

Таблица 1 – Параметры дыхания и окислительного фосфорилирования митохондрий скелетных мышц мышей дикого типа (контроль) и *mdx*-мышей, энергизованных глутаматом и малатом

Мыши (n=5)	Состояние 2	Состояние 3	Состояние 4	Состояние $3U_{ДНФ}$	ДК	АДФ/О
	нмоль O_2 / мин на 1 мг белка				отн. ед.	
Контроль	11,4 ± 0,5	80,2 ± 4,5	19,6 ± 0,6	125,7 ± 7,2	4,1 ± 0,3	2,8 ± 0,1
mdx	14,0 ± 2,4	43,9 ± 2,0*	19,7 ± 2,5	77,1 ± 15,1*	2,1 ± 0,3*	2,4 ± 0,1*

Дыхание митохондрий в состоянии 3 индуцировано внесением 200 мкМ АДФ. ДК (дыхательный контроль) = состояние 3/состояние 4. Дыхание митохондрий в состоянии $3U_{ДНФ}$ индуцировано внесением 50 мкМ протонофорного разобщителя ДНФ. Приведены средние значения ± ошибка средней. * различия между параметрами митохондрий *mdx*-мышей и контрольных животных статистически значимы, $p < 0,05$

Нарушение функции митохондрий скелетных мышц *mdx*-мышей также сопровождается избыточной продукцией H_2O_2 по сравнению со здоровыми животными (рисунок 4А), что соответствует литературным данным (Hughes et al., 2019). Кроме того, мы отметили увеличение уровня МДА, одного из маркеров окислительного стресса, образующегося в результате перекисного окисления липидов, в митохондриях *mdx*-мышей (рисунок 4Б), что свидетельствует о развитии окислительного стресса в дистрофин-дефицитных скелетных мышцах.

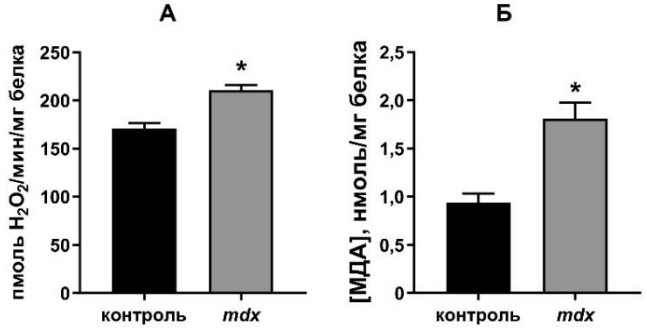

Рисунок 4 – Скорость продукции H_2O_2 (А) и уровень МДА-продуктов (Б) в митохондриях скелетных мышц контрольных и *mdx*-мышей. Приведены средние значения ± ошибка средней (n=6). * различия между параметрами *mdx*-мышей и контрольных животных статистически значимы, $p < 0,01$

Известно, что дисрегуляция гомеостаза ионов кальция в мышечных клетках способствует быстрому прогрессированию патологии МДД (Allen et al., 2016). Имеются предпосылки к тому, что нарушение гомеостаза Ca^{2+} на уровне митохондрий скелетных мышц лежит как в основе угнетения функционирования этих органелл, так и в целом мышечных клеток, обуславливая развитие миопатии и дистрофии (Schiavone et al., 2017), поэтому в следующей части работы нами были оценены кинетические параметры транспорта этого иона в митохондриях скелетных мышц *mdx*-мышей и мышей дикого типа, а также оценена способность органелл удерживать ионы кальция в матриксе. В этом случае была изучена скорость поглощения Ca^{2+} посредством унипорта в митохондриях скелетных мышц двух групп животных, а также их устойчивость к индукции кальций-зависимой МРТ-поры. Как видно из данных рисунка 5Б, для

митохондрий скелетных мышц *mdx*-мышей характерно существенное (более чем в 2 раза) снижение скорости поглощения Ca^{2+} по сравнению с митохондриями животных дикого типа.

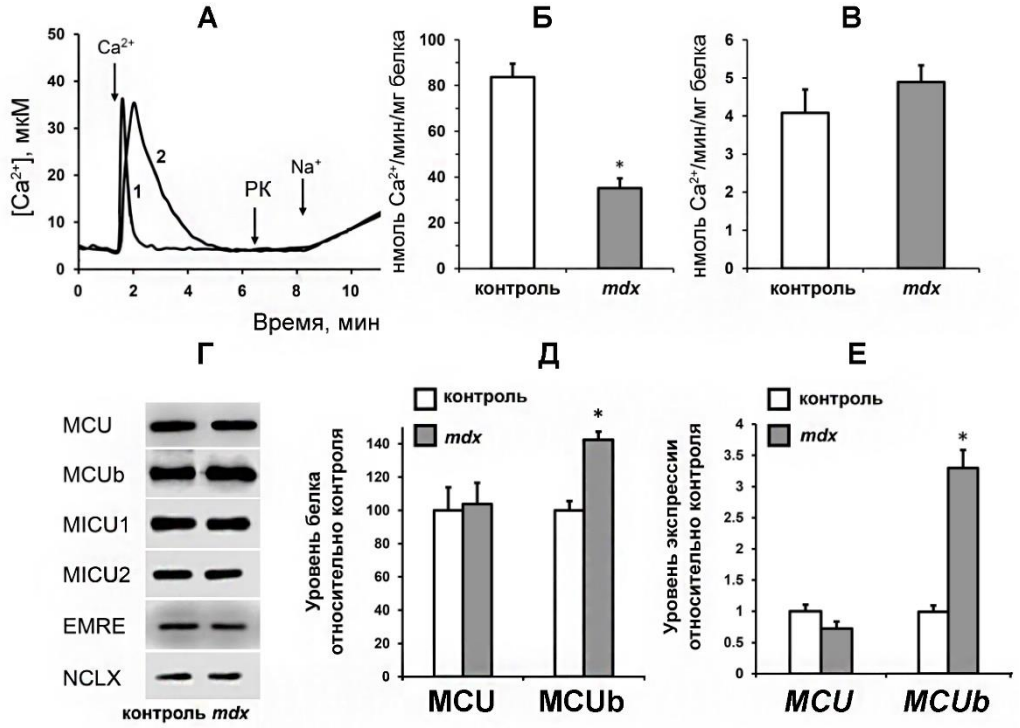

Рисунок 5 – Особенности системы Ca^{2+} унипорта в митохондриях скелетных мышц мышей: (А) Кинетика поглощения 50 мкМ Ca^{2+} и выброса иона в митохондриях контрольных мышей (кривая *1*) и *mdx*-мышей (кривая *2*). Выход Ca^{2+} индуцирован добавлением ингибитора Ca^{2+}-унипортера рутения красного (РК) и хлорида натрия (Na^+). (Б) Скорость Ca^{2+}-унипорта в митохондриях контрольных мышей и *mdx*-мышей. (В) Скорость Na^+-зависимого выброса Ca^{2+} из митохондрий контрольных мышей и *mdx*-мышей. (Г) Данные иммуноблоттинга белков Ca^{2+}-унипортера. (Д) Относительное количество белков-субъединиц кальциевого унипортера MCU и MCUb в митохондриях мышей. (Е) Экспрессия генов, кодирующих субъединицы MCU и MCUb, в скелетной мускулатуре. Приведены средние значения ± ошибка средней (n = 6 (Б, В), n = 4 (Д) и n = 10 (Е). * различия между параметрами митохондрий *mdx*-мышей и контрольных животных статистически значимы, $p < 0,05$

При этом различий в кинетике Na^+/Ca^{2+}-антипорта, осуществляющего выход Ca^{2+} из матрикса митохондрий в обмен на Na^+, между экспериментальными группами животных обнаружено не было (рисунок 5В). Мы оценили уровень белков – субъединиц Ca^{2+} унипортера, участвующих в транспорте иона в матрикс митохондрий. Установлено, что количество канальной субъединицы MCU, а также регуляторных субъединиц MICU1-2 и EMRE в митохондриях скелетных мышц мышей не различается. В то же время количество MCUb (неактивная канальная субъединица унипортера) увеличивается в 1,4 раза. Это приводит к тому, что отношение субъединиц MCU/MCUb в митохондриях скелетных мышц уменьшается с 1,06±0,06 у животных дикого типа до 0,62±0,01 у *mdx*-мышей (p<0,01). Также стоит отметить, что митохондрии исследуемых групп животных не различаются по количеству Na^+/Ca^{2+}-антипортера, что согласуется с отсутствием различий в кинетике выхода Ca^{2+} из органелл. Результаты ПЦР в реальном времени

подтверждают полученные данные (рисунок 5Е), что свидетельствует о регуляции экспрессии генов исследуемых белков на уровне транскрипции. Исходя из этого, нами предположено, что уменьшение скорости Ca^{2+} унипорта в митохондриях скелетных мышц *mdx*-мышей обусловлено увеличением количества доминант-негативной субъединицы MCUb в составе кальциевого унипортера органелл.

Наряду с этим нами установлено, что митохондрии скелетной мускулатуры *mdx*-мышей способны поглощать меньшее количество пульсовых добавок ионов кальция по сравнению с мышами дикого типа (рисунок 6А), что свидетельствует о снижении устойчивости первых к индукции Ca^{2+}-зависимой МРТ-поры. В численном выражении это соответствует существенному (в ~1,4 раза) уменьшению параметра кальциевой емкости митохондрий скелетных мышц *mdx*-мышей относительно контроля (рисунок 6Б).

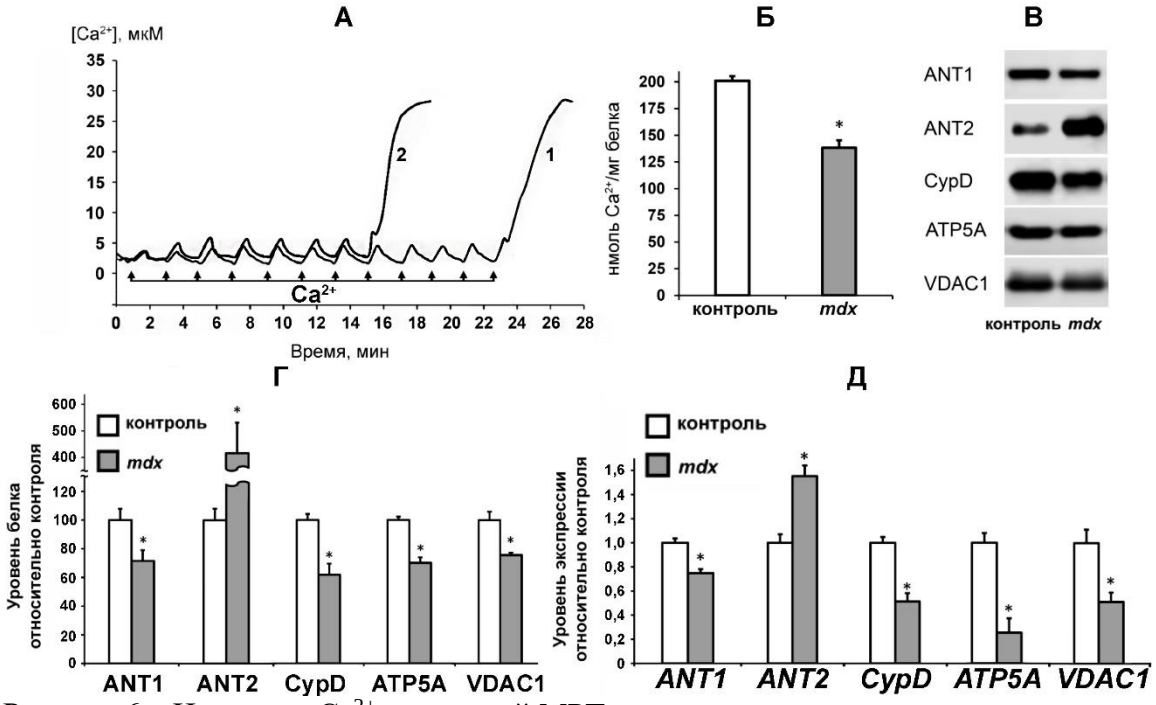

Рисунок 6 – Индукция Ca^{2+}-зависимой МРТ-поры в митохондриях скелетных мышц контрольных мышей и *mdx*-мышей: (А) Поглощение последовательных добавок 10 мкМ Ca^{2+} митохондриями контрольных мышей (кривая *1*) и *mdx*-мышей (кривая *2*). (Б) Сравнение Ca^{2+}-емкости митохондрий. (В) Данные иммуноблоттинга белков. (Г) Относительное количество белков – предполагаемых компонентов МРТ-поры в митохондриях контрольных мышей и *mdx*-мышей. (Д) Экспрессия генов, кодирующих белки МРТ-поры, в скелетной мускулатуре. Приведены средние значения ± ошибка средней (n = 5 (Б), n = 4 (Г) и n = 10 (Д). * различия между параметрами митохондрий *mdx*-мышей и контрольных животных статистически значимы, p<0,05

Нами также оценен уровень белков – предполагаемых компонентов МРТ-поры в митохондриях двух групп животных. Установлено, что для скелетных мышц *mdx*-мышей характерно существенное увеличение количества белка ANT2 в митохондриях (рисунок 6Г), способного формировать канал МРТ-поры (Karch et al., 2018), а также экспрессии кодирующего его гена в ткани (рисунок 6Д), по сравнению с животными дикого типа. Это может обуславливать

снижение устойчивости органелл *mdx*-мышей к индукции Ca^{2+}-зависимой поры по сравнению с контролем. При этом нами отмечено снижение уровня белков ANT1, АТФ-синтазы и VDAC1 в митохондриях скелетных мышц *mdx*-мышей, а также экспрессии кодирующих их генов в ткани, что может обуславливать снижение эффективности окислительного фосфорилирования и, таким образом, дополнительно способствовать митохондриальной дисфункции и развитию МДД. Стоит отметить снижение уровня регуляторного белка МРТ-поры циклофилина Д (CypD) в митохондриях скелетных мышц *mdx*-мышей и уровня экспрессии соответствующего гена в ткани, которое, в отличие от полного нокаута гена, не оказывает влияния на устойчивость органелл к индукции поры.

В ходе работы мы также оценили активность транспорта K^+ через внутреннюю мембрану митохондрий скелетных мышц животных, играющего важную роль в регуляции функциональной активности органелл. Из рисунка 7А можно видеть, что митохондрии *mdx*-мышей характеризуются двукратным снижением скорости ДНФ-индуцированного выхода K^+ из матрикса по сравнению с митохондриями животных дикого типа.

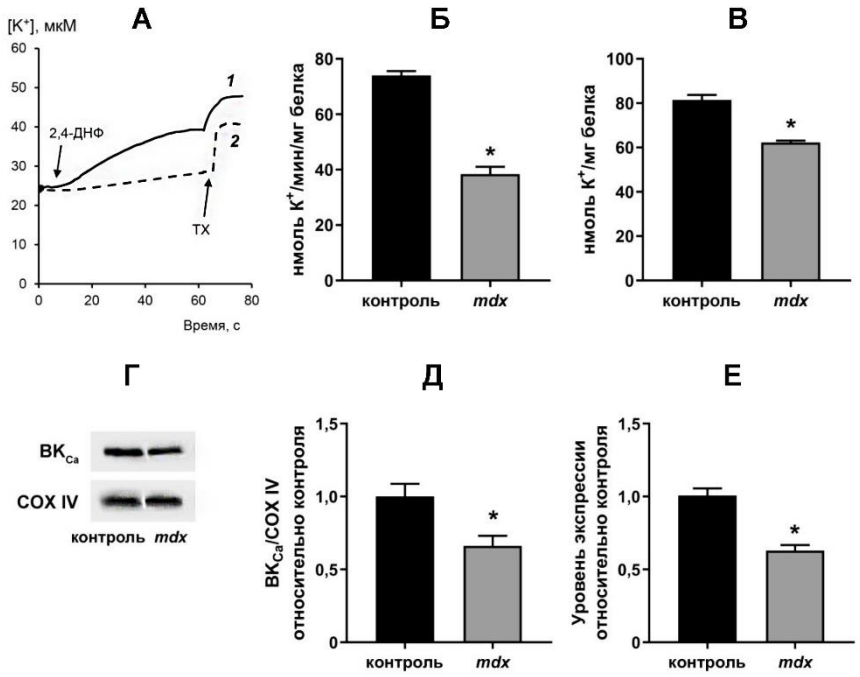

Рисунок 7 – Особенности гомеостаза K^+ в митохондриях скелетных мышц контрольных мышей и *mdx*-мышей: (А) ДНФ-индуцированный выход K^+ из митохондрий мышей группы контроль (кривая *1*) и *mdx* (кривая *2*). (Б) Скорость выхода K^+ из митохондрий мышей. (В) Общий уровень K^+ в митохондриях мышей. (Г) Данные иммуноблоттинга mitoBK$_{Ca}$ и COX IV в митохондриях. (Д) Относительное количество mitoBK$_{Ca}$ в митохондриях контрольных и *mdx*-мышей. (Е) Относительный уровень мРНК *BK-VEDEC* (кодирует mitoBK$_{Ca}$) в скелетных мышцах мышей. Приведены средние значения ± ошибка средней (n = 4 (Б и В), n = 3 (Д) и n = 6 (Е). * различия между параметрами митохондрий *mdx*-мышей и контрольных животных статистически значимы, $p < 0,05$

Более того, нами выявлено снижение общего уровня K^+ в митохондриях скелетных мышц *mdx*-мышей (рисунок 7Б). Установлено, что такие различия могут быть обусловлены разным уровнем калий-транспортирующих белков, в

частности, активируемого ионами кальция калиевого канала (mitoBK$_{Ca}$), во внутренней мембране митохондрий экспериментальных групп мышей. Действительно, из данных рисунка 7Г-Е можно видеть, что уровень mitoBK$_{Ca}$, оцененный в изолированных митохондриях (вследствие наличия BK-каналов цитоплазматической и ядерной мембран в гомогенате ткани), а также экспрессия кодирующего его гена в скелетных мышцах снижаются у *mdx*-мышей.

Таким образом, можно видеть, что снижение мышечной силы *mdx*-мышей, обусловленное развитием дегенеративных процессов в скелетной мускулатуре, сопровождается нарушением ультраструктуры митохондрий, угнетением окислительного синтеза АТФ, избыточной продукцией АФК, а также снижением эффективности транспорта и буферизации ионов Ca^{2+} и K^{+} в органеллах, обусловленным глубокими перестройками в соответствующих белковых системах, участвующих в гомеостазе этих ионов.

2. Развитие патологии сердечной мышцы при дистрофии Дюшенна сопровождается адаптационными изменениями функциональной активности митохондрий

Развитие МДД затрагивает также сердечную мускулатуру. Можно видеть, что для миокарда *mdx*-мышей характерен умеренно выраженный межмышечный отек, а также увеличение площади фиброза по сравнению с контрольными животными (рисунок 8А-В).

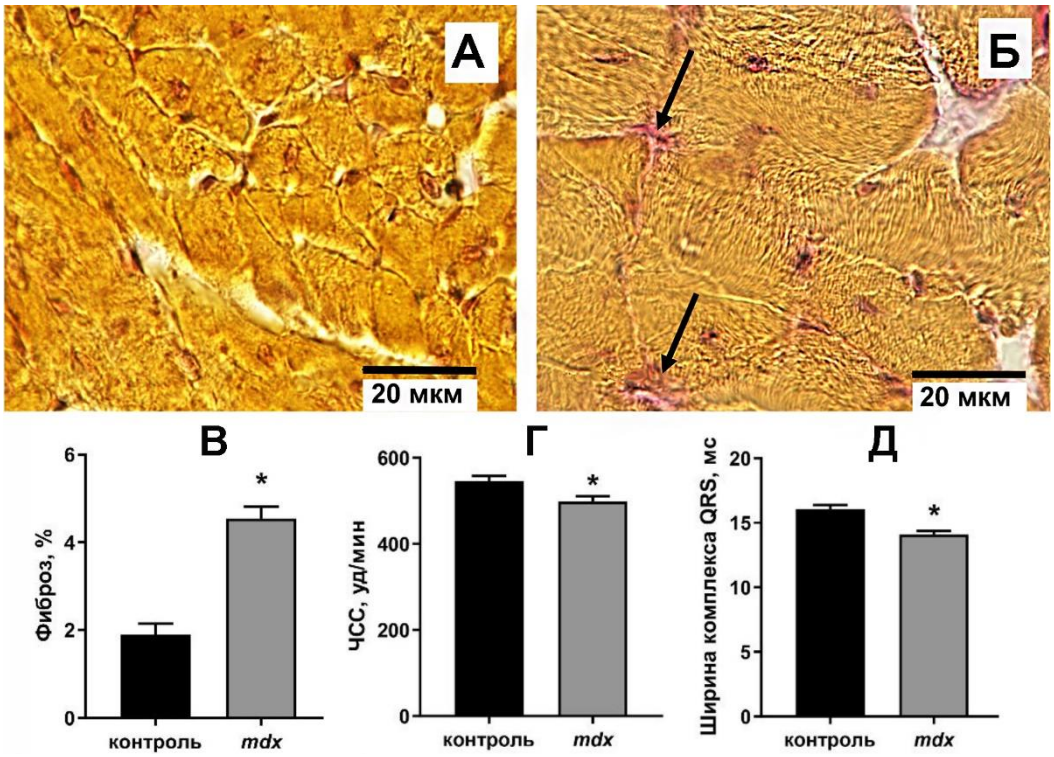

Рисунок 8 – Гистологическая структура ткани сердца (левый желудочек) контрольных мышей (А) и *mdx*-мышей (Б). Окраска по Ван-Гизону. Бар – 100 мкм. Участки фиброза розового цвета отмечены стрелкой. (В) Площадь фиброза в сердце мышей. (Г) Частота сердечных сокращений мышей. (Д) Ширина комплекса QRS ЭКГ у мышей. Приведены средние значения ± ошибка средней (n = 4). * – различия между параметрами *mdx*-мышей и контрольных животных статистически значимы, $p < 0{,}05$

Нами также выявлены электрофизиологические нарушения в работе сердца (рисунок 8Г и Д). Установлено, что *mdx*-мыши характеризуются брадикардией – снижением частоты сердечных сокращений (рисунок 8Г). Также на ЭКГ *mdx*-мышей отмечено укорочение комплекса QRS, отображающего возбуждение (деполяризацию) желудочков (рисунок 8Д).

Для сердца *mdx*-мышей также характерны ультраструктурные изменения. Из рисунка 9 видно, что у *mdx*-животных выражены изменения со стороны миофибрилл, точнее, в структуре саркомеров. Отмечено утолщение М-полоски в центре ряда саркомеров и расхождение актиновых протофибрилл в районе I-дисков. В отдельных саркомерах М-полоска почти не выявляется. Отмечается увеличение размера митохондрий сердца дистрофин-дефицитных мышей, появление гигантских форм наряду с митохондриями нормальных размеров.

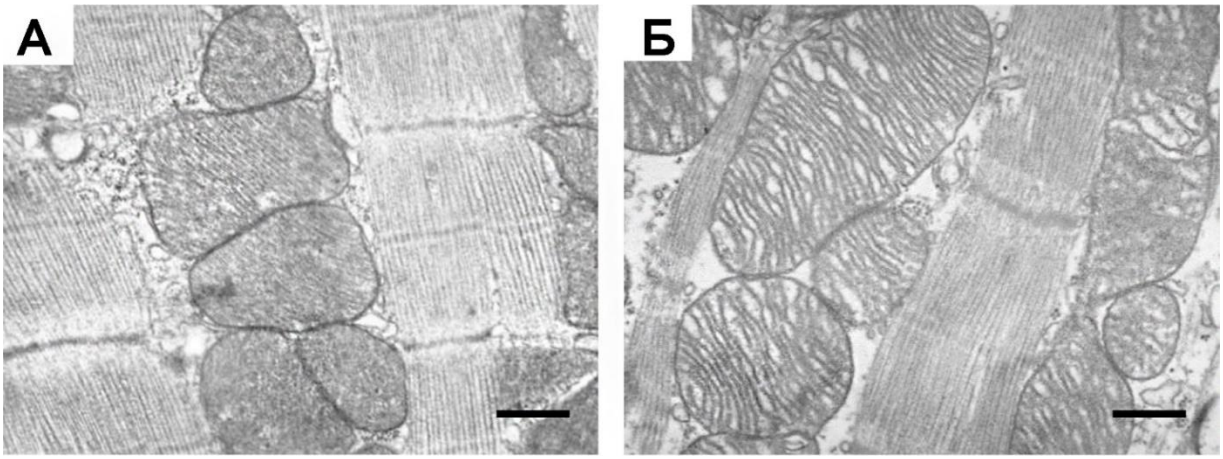

Рисунок 9 – Ультраструктура кардиомиоцитов мышей дикого типа (А) и *mdx*-мышей (Б). Бар – 0,5 мкм

Установлено, что морфологические изменения в сердечной ткани *mdx*-мышей сопровождаются небольшим увеличением функциональной активности митохондрий сердца. Из данных таблицы 2 можно видеть, что митохондрии сердца *mdx*-мышей не отличаются от контрольных животных по скоростям дыхания, а также эффективности синтеза АТФ, оцененного по величине коэффициента АДФ/О.

Таблица 2 – Параметры дыхания и окислительного фосфорилирования митохондрий сердца мышей дикого типа (контроль) и *mdx*-мышей, энергизованных глутаматом и малатом

Мыши (n=4)	Состояние 2	Состояние 3	Состояние 4	Состояние $3U_{ДНФ}$	ДК	АДФ/О
	нмоль O_2 / мин на 1 мг белка				отн. ед.	
Контроль	10,2 ± 1,2	56,1 ± 11,7	17,4 ± 3,6	50,0 ± 12,4	3,2 ± 0,1	2,8 ± 0,1
mdx	11,1 ± 0,7	74,3 ± 4,6	18,6 ± 1,5	65,0 ± 6,3	4,0 ± 0,2*	2,9 ± 0,1

Дыхание митохондрий в состоянии 3 индуцировано внесением 200 мкМ АДФ. ДК (дыхательный контроль) = состояние 3/состояние 4. Дыхание митохондрий в состоянии $3U_{ДНФ}$ индуцировано внесением 50 мкМ ДНФ. Приведены средние значения ± ошибка средней. * различия между параметрами митохондрий *mdx*-мышей и контрольных животных статистически значимы, $p < 0,05$

Однако параметр дыхательного контроля, отражающий степень сопряжения дыхания и фосфорилирования, в митохондриях *mdx*-мышей был выше на 25% по сравнению с митохондриями мышей дикого типа, что, по всей видимости, обусловлено тенденцией к увеличению скорости АДФ-стимулируемого дыхания.

При этом для митохондрий сердца дистрофин-дефицитных животных характерна более высокая скорость генерации H_2O_2 по сравнению с митохондриями мышей дикого типа (рисунок 10А), что согласуется с известными литературными данными (Jung et al., 2008). Это также сопровождается увеличением уровня маркера окислительного стресса МДА в митохондриях *mdx*-мышей (рисунок 10Б).

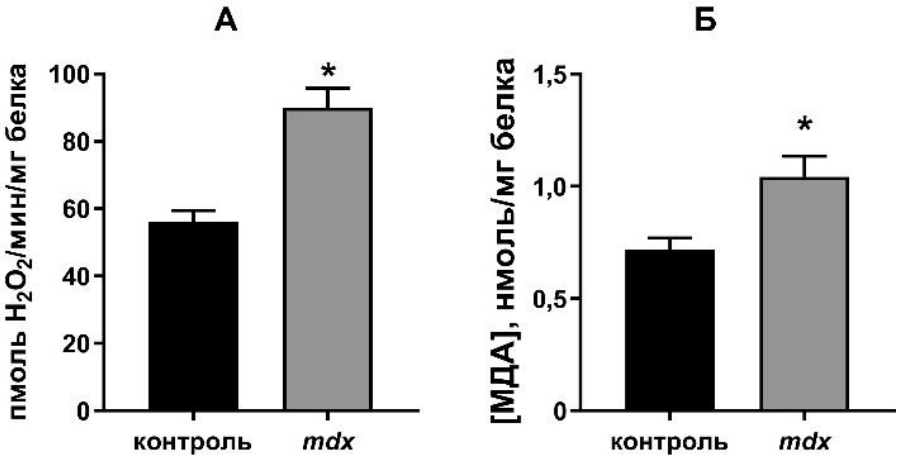

Рисунок 10 – Скорость продукции H_2O_2 (А) и уровень МДА-продуктов (Б) в митохондриях сердца контрольных и *mdx*-мышей. Приведены средние значения ± ошибка средней (n=4).
* различия между параметрами *mdx*-мышей и контрольных животных статистически значимы, $p < 0,01$

Кроме того, для митохондрий сердца дистрофин-дефицитных мышей характерно как увеличение скорости Ca^{2+} унипорта, так и Na^+-зависимого выхода Ca^{2+} из органелл (посредством NCLX) по сравнению с животными дикого типа (рисунок 11А-В). Это также может быть обусловлено перестройками в субъединичном составе белкового комплекса Ca^{2+}-унипортера, а также изменением уровня NCLX. Из рисунка 11 можно видеть, что для дистрофин-дефицитных животных характерно увеличение количества канальной субъединицы кальциевого унипортера MCU по сравнению с животными дикого типа в 1,7 раза.

Наряду с этим в митохондриях *mdx*-мышей наблюдается значительное (в 3,8 раза) снижение уровня субъединицы MCUb (неактивная канальная субъединица унипортера). Таким образом, отношение субъединиц MCU/MCUb в митохондриях сердца, определяющее скорость поглощения Ca^{2+}, увеличивается с 0,15±0,02 у животных дикого типа до 0,96±0,08 у *mdx*-мышей (p<0,001). Также отмечено увеличение количества регуляторной субъединицы MICU1 почти в 1,3 раза в митохондриях сердца дистрофин-дефицитных мышей, составляющей «воротный» механизм унипортера (p<0,05). Количество

регуляторной субъединицы EMRE не изменялось. В митохондриях сердца *mdx*-животных почти в 1,8 раза увеличивается количество Na^+/Ca^{2+}-антипортера (NCLX) по сравнению с контролем. Результаты ПЦР в реальном времени подтверждают полученные данные (рисунок 11Е), что свидетельствует о регуляции экспрессии генов исследуемых белков на уровне транскрипции. Исключение составляет субъединица MCUb, для которой не выявлено изменений в экспрессии гена. По всей видимости, снижение уровня MCUb на уровне белка обусловлено изменениями в его посттрансляционной модификации у *mdx*-мышей.

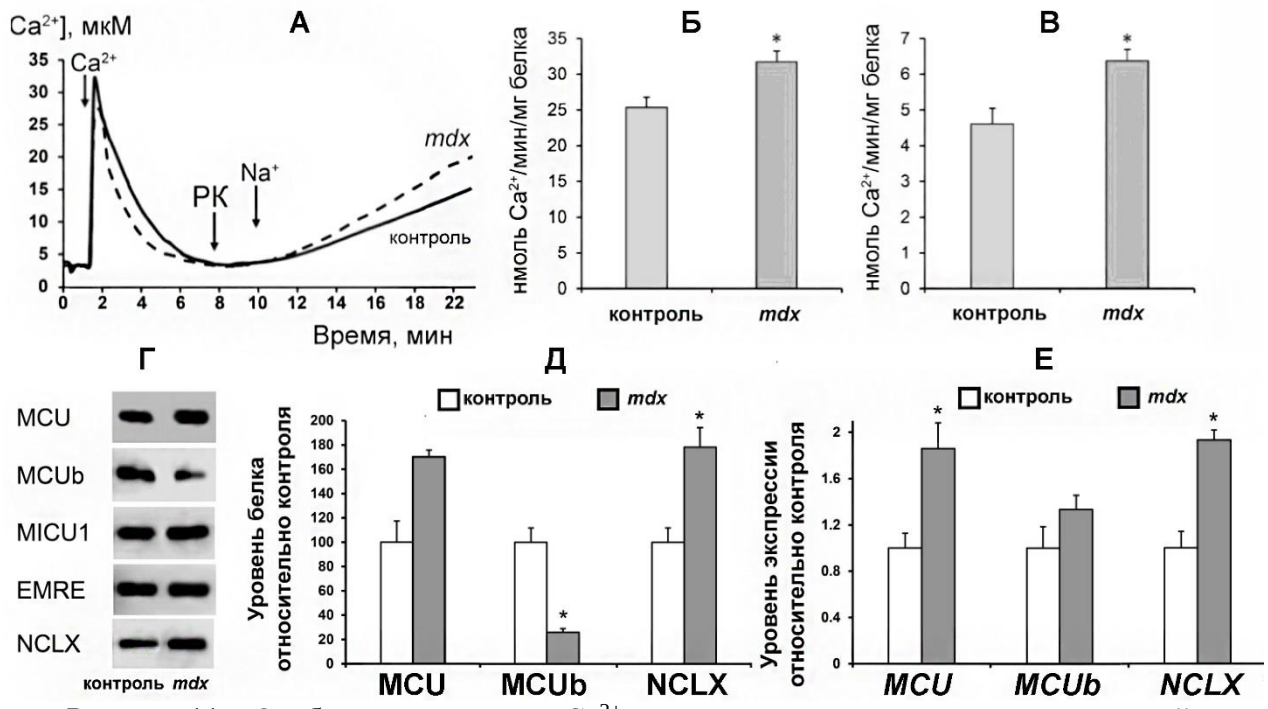

Рисунок 11 – Особенности системы Ca^{2+} унипорта в митохондриях сердца мышей: (А) Кинетика поглощения 50 мкМ Ca^{2+} и выброса иона в митохондриях сердца мышей. (Б) Скорость Ca^{2+} унипорта в митохондриях. (В) Скорость Na^+-зависимого выброса Ca^{2+} из митохондрий. (Г) Данные иммуноблоттинга белков. (Д) Относительное количество белков-субъединиц кальциевого унипортера MCU и MCUb, а также NCLX в митохондриях контрольных мышей и *mdx*-мышей. (Д) Экспрессия генов, кодирующих субъединицы MCU и MCUb кальциевого унипортера, а также NCLX, в сердце мышей. Приведены средние значения ± ошибка средней (n = 4 (Б, В), n = 3 (Д) и n = 6 (Е). * различия между параметрами митохондрий *mdx*-мышей и контрольных животных статистически значимы, p<0,05

Наряду с улучшением параметров рециклизации Ca^{2+} митохондрии сердца *mdx*-мышей также характеризуются более эффективной буферизацией этого иона. Из рисунка 12 можно видеть, что митохондрии сердца *mdx*-мышей способны поглощать большее количество последовательных добавок Ca^{2+} по сравнению с животными дикого типа, что количественно проявляется в увеличении параметра кальциевой емкости митохондрий.

Это также свидетельствует о том, что митохондрии сердца *mdx*-мышей обладают большей резистентностью к индукции МРТ-поры. При этом нами установлено, что устойчивость митохондрий сердца *mdx*-мышей к индукции МРТ-поры не сопровождается изменением количества белков – ее

предполагаемых компонентов (ANT1 и ANT2, АТР-синтаза, а также VDAC1) и, по всей видимости, обусловлена увеличением микровязкости мембран митохондрий. Действительно, можно видеть, что в митохондриях *mdx*-мышей наблюдается увеличение параметра генерализованной поляризации (ГП) флуоресцентного зонда лаурдана, отражающего фазовое состояние мембран, по сравнению с митохондриями сердца мышей дикого типа (рисунок 12В). Это свидетельствует о том, что в митохондриях сердца *mdx*-животных подвижность молекул воды в области липидных головок снижена, что говорит об увеличении микровязкости мембран и это, как предполагается, может обуславливать повышение устойчивости органелл к открытию МРТ-поры (Colell et al., 2003).

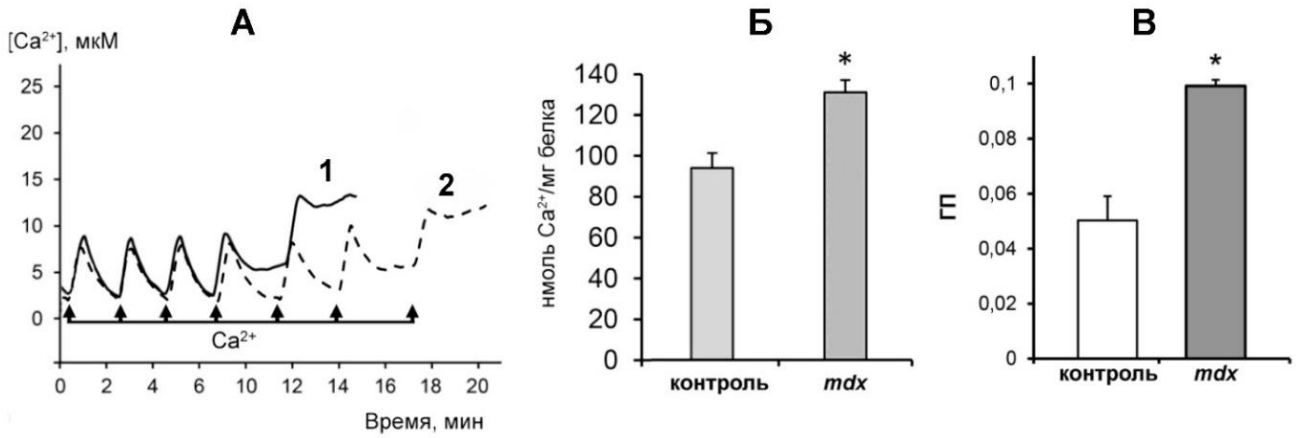

Рисунок 12 – Индукция Ca^{2+}-зависимой МРТ-поры в митохондриях сердца мышей дикого типа и *mdx*-мышей: (А) Поглощение последовательных добавок 10 мкМ Ca^{2+} митохондриями сердца контрольных мышей (кривая *1*) и *mdx*-мышей (кривая *2*). (Б) Сравнение Ca^{2+}-емкости митохондрий мышей. (В) Генерализованная поляризация (ГП) лаурдана в митохондриях сердца мышей. Приведены средние значения ± ошибка средней (n = 4 (Б) и n = 3 (В). * различия между параметрами митохондрий *mdx*-мышей и контрольных животных статистически значимы, p<0,05

Как показано выше, для митохондрий скелетных мышц дистрофин-дефицитных мышей характерно снижение эффективности транспорта K^+ и общего уровня этого иона, что также способствует развитию митохондриальной дисфункции, окислительного стресса и деструктивных процессов. Нами выявлено участие митохондриального Ca^{2+}-активируемого K^+-канала ($mitoBK_{Ca}$) в развитии этого феномена. Установлено, что снижение скорости транспорта K^+ и общего уровня этого иона имеет место и в случае митохондрий сердца *mdx*-мышей (рисунок 13А-В). При этом уровень $mitoBK_{Ca}$ и экспрессия кодирующего его гена не различаются между экспериментальными группами животных (рисунок 13Г-Е). Таким образом, угнетение митохондриального гомеостаза K^+ в сердце дистрофин-дефицитных мышей не связано с изменением уровня $mitoBK_{Ca}$. Это позволяет предположить, что наблюдаемые изменения могут быть обусловлены изменением активности имеющихся белковых субъединиц $mitoBK_{Ca}$ или же вкладом других переносчиков K^+ во внутренней митохондриальной мембране.

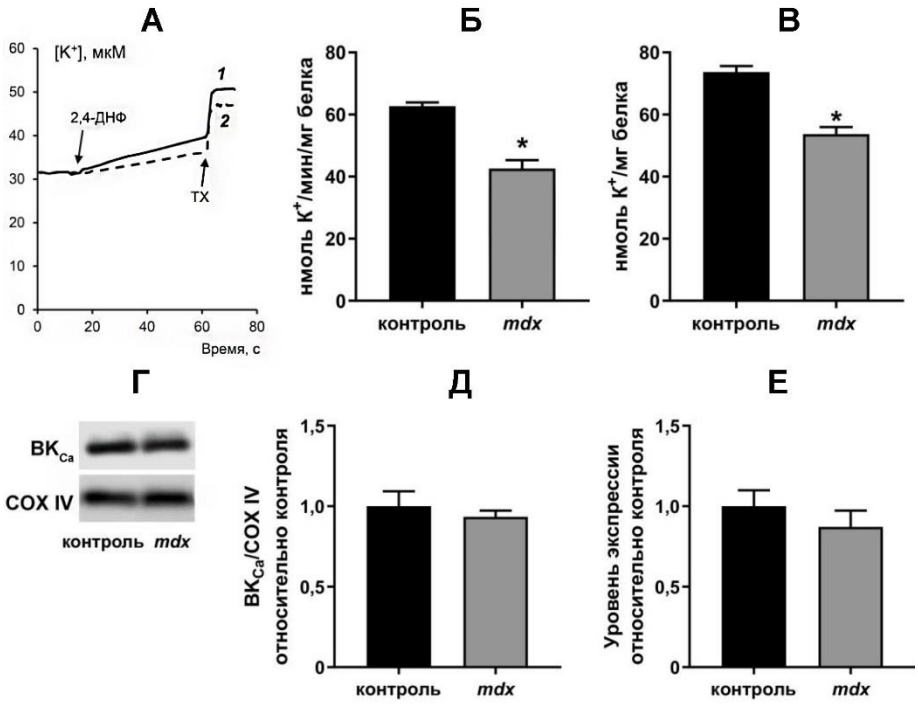

Рисунок 13 – Особенности гомеостаза K^+ в митохондриях сердца контрольных мышей и *mdx*-мышей: (А) ДНФ-индуцированный выход K^+ из митохондрий сердца мышей группы контроль (кривая *1*) и *mdx* (кривая *2*). (Б) Скорость выхода K^+ из митохондрий сердца мышей. (В) Общий уровень K^+ в митохондриях сердца мышей. (Г) Данные иммуноблоттинга mitoBK$_{Ca}$ и COX IV в митохондриях. (Д) Относительное количество mitoBK$_{Ca}$ в митохондриях контрольных и *mdx*-мышей. (Е) Относительный уровень мРНК *BK-VEDEC* (кодирует mitoBK$_{Ca}$) в сердце мышей. Приведены средние значения ± ошибка средней (n = 3 (Б, В и Д) и n = 6 (Е). * различия между параметрами митохондрий *mdx*-мышей и контрольных животных статистически значимы, $p < 0,05$

Таким образом, митохондрии сердца *mdx*-мышей демонстрируют адаптационные изменения, которые проявляются в увеличении эффективности окислительного фосфорилирования, улучшении рециклизации и забуферивания Ca^{2+}. Все эти изменения сопровождаются перестройками в белковых системах, регулирующих транспорт ионов в митохондриях. Наряду с этим митохондрии сердца *mdx*-мышей характеризуются увеличением продукции АФК, способствующим окислительному стрессу, а также угнетением гомеостаза K^+, что может вносить вклад в развитие аритмии и кардиомиопатии, характерных для МДД (Fauconnier et al., 2010).

3. Влияние глюкокортикоида дефлазакорта на митохондриальную дисфункцию и состояние скелетной мускулатуры *mdx*-мышей

Одним из доступных вариантов терапии МДД является применение глюкокортикоидов и, в частности, дефлазакорта. ДФК в виде активного метаболита 21-дезацетилдефлазакорта воздействует на глюкокортикоидные рецепторы, что приводит к подавлению иммунного ответа и воспалительных процессов в мышечной ткани (Bylo et al., 2020). Однако его использование сопровождается побочными эффектами, такими как синдром Кушинга, эритема, гирсутизм, увеличение веса, назофарингит, задержка полового созревания и

катаракта (McDonald et al., 2018). Стоит отметить, что ничего не известно о влиянии ДФК на развитие митохондриальной дисфункции, характерной для МДД. В связи с этим, в настоящей работе нами изучено *in vivo* влияние внутрибрюшинного введения ДФК (1 мг/кг массы тела в течение 4 недель) на состояние ткани скелетной мускулатуры и функциональную активность митохондрий скелетных мышц *mdx*-мышей, а также животных дикого типа.

Установлено, что митохондрии *mdx*-мышей, получавших ДФК, характеризовались увеличением скорости дыхания в состоянии 3 на 23% (p<0,05). Однако такой эффект не сопровождался изменением параметра дыхательного контроля митохондрий. В то же время ДФК не оказал влияния на другие параметры дыхания и окислительного фосфорилирования митохондрий скелетных мышц как *mdx*-мышей, так и контрольных животных. При этом индуцированное ДФК повышение функциональной активности органелл способствовало увеличению уровня АТФ в мышцах *mdx*-мышей (рисунок 14А).

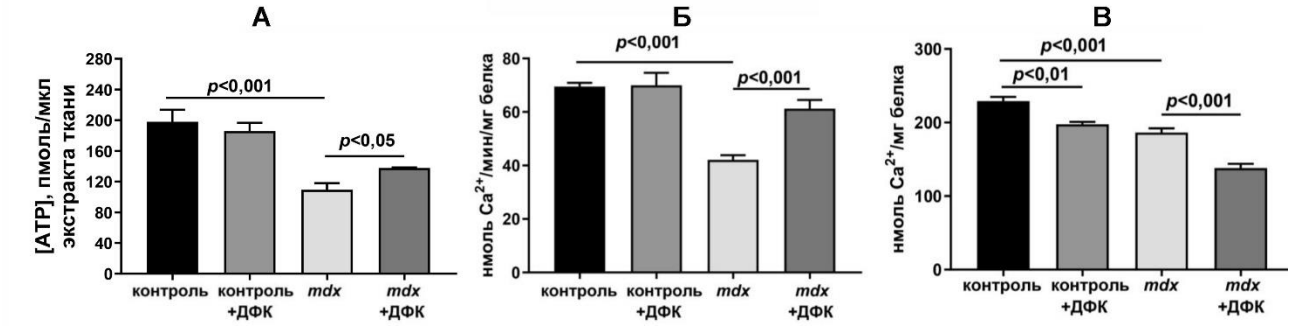

Рисунок 14 – Влияние ДФК на параметры функционирования митохондрий скелетных мышц мышей: (А) Уровень АТФ в скелетных мышцах. (Б) Скорость Ca^{2+}-унипорта в митохондриях скелетных мышц. (В) Ca^{2+}-емкость митохондрий скелетных мышц. Приведены средние значения ± ошибка средней (n = 3 (А) и n = 5 (Б и В)

Кроме того, ДФК нормализовал скорость унипорта Ca^{2+} в митохондрии скелетных мышц *mdx*-мышей до уровня животных дикого типа (рисунок 14Б). С другой стороны, нами установлено, что ДФК снижает устойчивость митохондрий обеих групп мышей к индукции МРТ-поры, что сопровождается уменьшением параметра кальциевой емкости по сравнению с контрольными *mdx*-мышами (рисунок 14В). Нами предположено, что кальциевая перегрузка и снижение устойчивости митохондрий к индукции МРТ-поры под действием ДФК может лежать в основе его многочисленных побочных эффектов. В частности, известно, что длительное применение этого препарата приводит к атрофии мышц (Quattrocelli et al., 2017).

Неизвестно, какое влияние окажет длительное применение ДФК на развитие МДД и характерную для патологии дисфункцию митохондрий. Тем не менее можно видеть, что в условиях настоящего эксперимента применение глюкокортикоида приводит к улучшению состояния мышечной ткани, о чем свидетельствует снижение интенсивности циклов дегенерации/регенерации мышечных волокон (рисунок 15А), восстановление размера саркомеров (рисунок 15Б и В) и, наконец, улучшение показателей мышечной силы и выносливости дистрофин-дефицитных животных (рисунок 15Г).

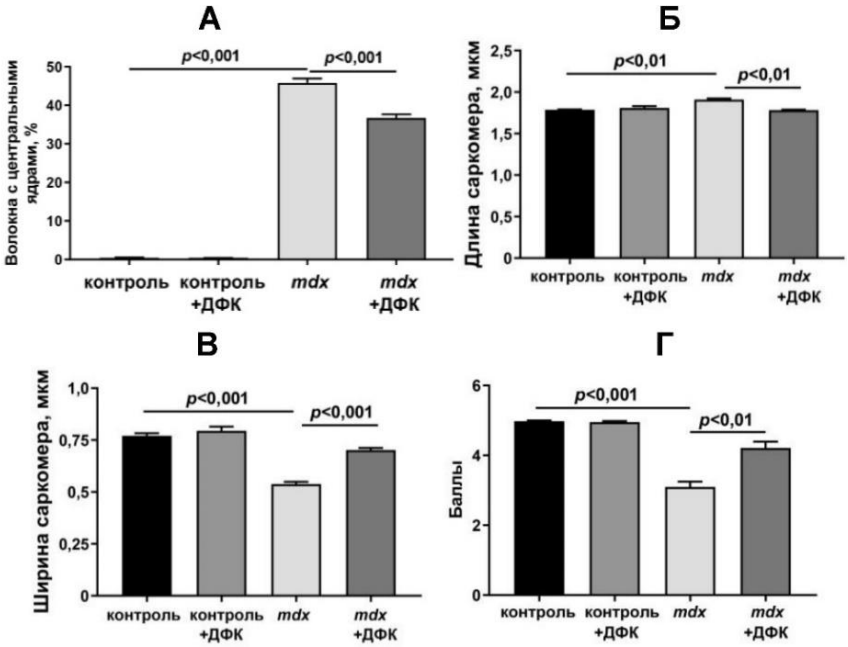

Рисунок 15 – Влияние ДФК на состояние скелетных мышц мышей: (А) Процент мышечных волокон, содержащих центрально расположенные ядра. (Б) Средняя длина саркомера мышц мышей. (В) Средняя ширина саркомера мышц мышей. (Г) Мышечная сила животных (тест «на струне»). Приведены средние значения ± ошибка средней (n = 3 (А-В) и n = 9 (Г)

4. Влияние метаболического модулятора уридина на функциональную активность митохондрий скелетных мышц и сердца, а также состояние тканей *mdx*-мышей

Одним из подходов, используемых для терапии МДД, является применение метаболических субстратов и модуляторов метаболических процессов, улучшающих обеспечение клетки АТФ, а также используемых в качестве предшественников клеточных структур (Angelini et al., 2022). В настоящей работе исследовано влияние внутрибрюшинного введения пиримидинового нуклеозида уридина (30 мг/кг массы тела в течение 4 недель), играющего роль строительного блока для биосинтеза РНК, аккумуляции гликогена, участвующего в процессах детоксикации ксенобиотиков, а также клеточной сигнализации, на развитие патологии МДД и сопутствующую дисфункцию митохондрий. Метаболизм уридина связан с гомеостазом глюкозы и обменом липидов и аминокислот (Zhang et al., 2020). Кроме того, некоторые позитивные эффекты уридина при ишемической болезни сердца, диабетической кардиомиопатии, а также других патологиях могут быть результатом улучшения функционирования митохондриальной сети (Krylova et al., 2006, 2021; Belosludtseva et al., 2022). В случае дистрофин-дефицитных мышей нами также отмечены положительные эффекты этого нуклеозида. Прежде всего, необходимо выделить улучшение гомеостаза ионов калия как в митохондриях скелетных мышц, так и сердца *mdx*-мышей. Уридин является предшественником уридин 5'-дифосфата – активатора митохондриального АТФ-зависимого K^+-канала. Можно видеть, что введение нуклеозида способствует достоверному увеличению как скорости ДНФ-индуцированного выброса ионов K^+ из

митохондрий скелетных мышц и сердца *mdx*-мышей, так и общего уровня этого иона в органеллах (рисунок 16).

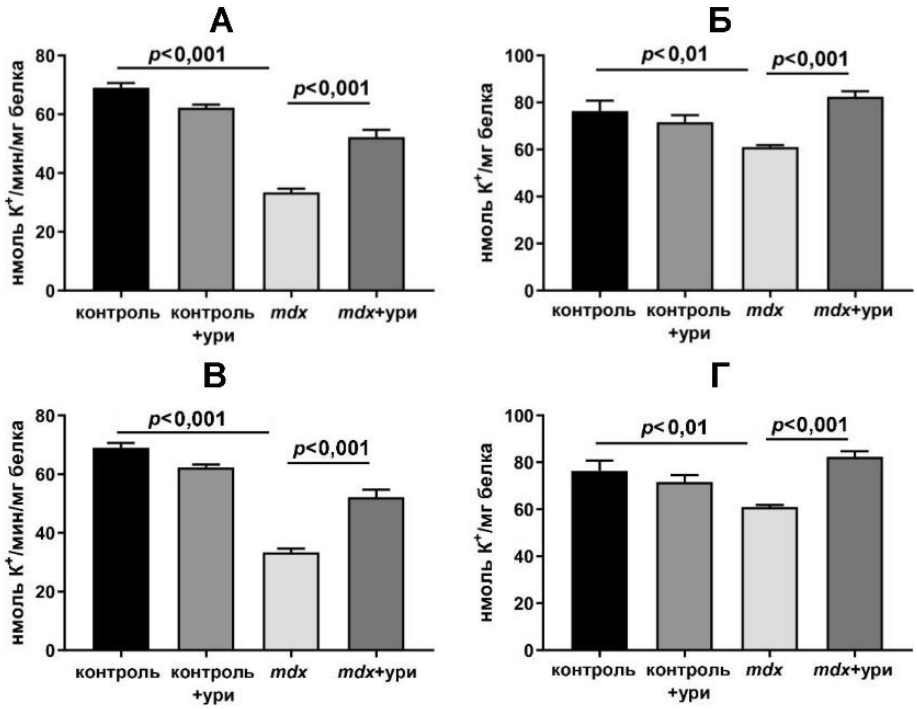

Рисунок 16 – Влияние уридина на транспорт и уровень K^+ в митохондриях скелетных мышц (А и Б) и сердца (В и Г) мышей. (А и В) Скорость ДНФ-индуцированного выхода K^+ из митохондрий. (Б и Г) Общее содержание K^+ в митохондриях. Приведены средние значения ± ошибка средней (n = 6-10 (А и Б) и n = 3 (В и Г)

Известно, что активация транспорта K^+ в митохондриях оказывает мягкое разобщающее влияние на органеллы, и это способствует снижению продукции АФК и интенсивности окислительного стресса в митохондриях и клетке (Krylova et al., 2021). Такой эффект наблюдается и в случае *mdx*-мышей – введение уридина приводит к нормализации уровня МДА в скелетных мышцах и сердце этих животных (рисунок 17), что может свидетельствовать о смягчении интенсивности окислительного стресса под действием этого нуклеозида.

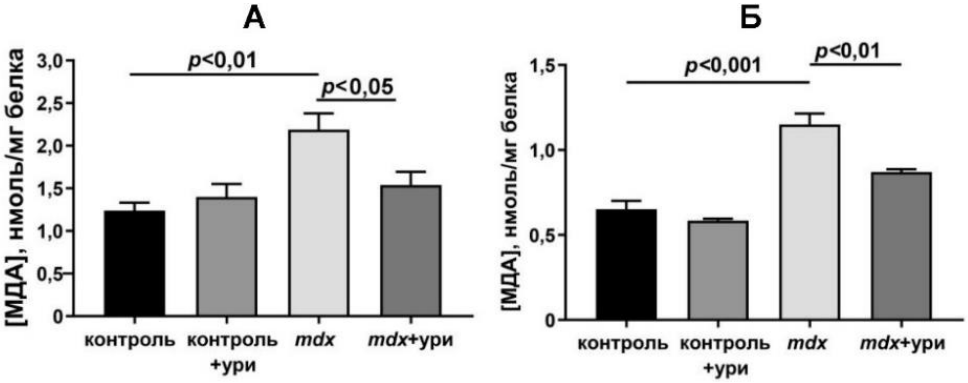

Рисунок 17 – Влияние уридина на уровень МДА-продуктов в митохондриях скелетных мышц (А) и сердца (Б) мышей. Приведены средние значения ± ошибка средней (n=3-4)

Также следует отметить возможное увеличение активности митофагии в скелетных мышцах *mdx*-мышей, получавших уридин, о чем свидетельствует

нормализация экспрессии гена *Parkin* (p<0,001), кодирующего белок, отвечающий за селективное удаление дефектных митохондрий. При этом такие эффекты не оказали влияния на сниженную эффективность окислительного фосфорилирования в митохондриях скелетных мышц *mdx*-мышей и на способность органелл поглощать Ca^{2+}. Также мы не отметили влияния уридина на параметры окислительного фосфорилирования и Ca^{2+}-емкость митохондрий сердца *mdx*-мышей, демонстрирующих признаки гиперфункционализации, выявленные в разделе 2. Все это свидетельствует лишь о частичной нормализации функциональной активности митохондрий в тканях дистрофин-дефицитных мышей под влиянием уридина. Тем не менее выяснено, что уридин способен снижать интенсивность деструктивных процессов как в скелетных мышцах, так и в сердце *mdx*-мышей. Такой эффект уридина связан с уменьшением отложения соединительной ткани в затрагивающих эту патологию тканях, то есть ослаблением развития фиброза (рисунок 18).

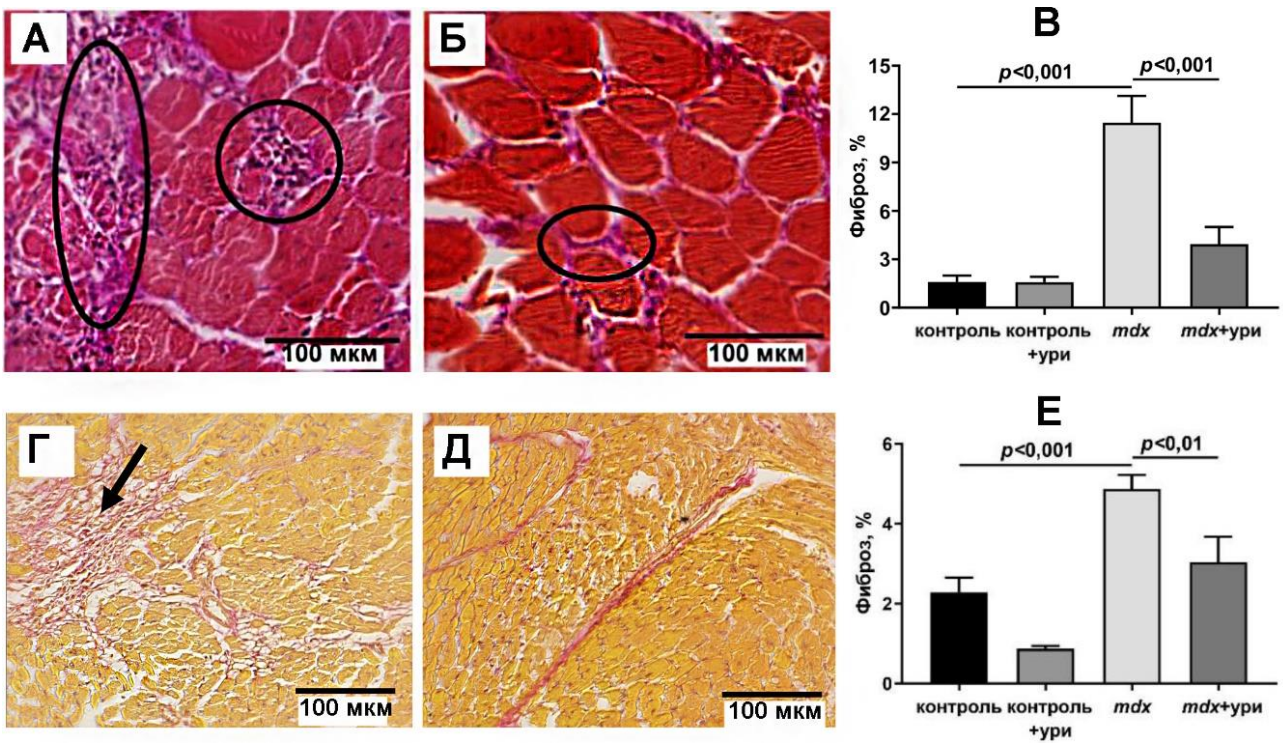

Рисунок – 18. Гистологическая структура четырехглавой мышцы бедра (А и Б) и левого желудочка сердца (Г и Д) мышей группы *mdx* (А и Г) и *mdx*+ури (Б и Д). Окраска по Ван-Гизону. Бар – 50 мкм. Области фиброза обведены черной линией. (В) Площадь фиброза в четырехглавой мышце бедра мышей (n=10). (Е) Площадь фиброза в сердце мышей (n=3). Приведены средние значения ± ошибка средней

В то же время мы не отметили влияния этого нуклеозида на интенсивность дегенерации в скелетных мышцах (по уровню волокон, содержащих центрально расположенные ядра) (рисунок 19А), уровень маркеров нарушения целостности мембран мышечных волокон, в частности, креатинкиназы (рисунок 19Б), а также на сниженную мышечную силу и выносливость *mdx*-мышей (рисунок 19В).

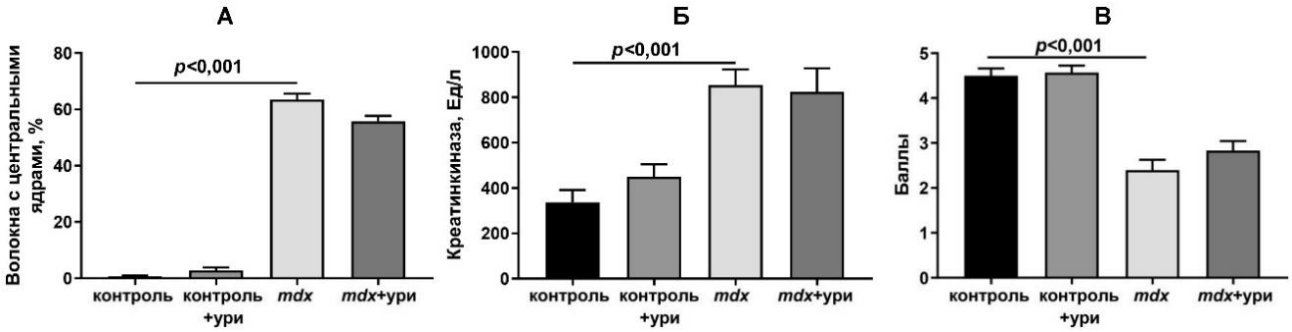

Рисунок – 19. Влияние уридина на процент волокон, содержащих центрально расположенные ядра в скелетных мышцах (А), активность креатинкиназы в сыворотке (Б) и мышечную силу животных (В). Приведены средние значения ± ошибка средней (*n*=10)

Можно полагать, что эффекта уридина недостаточно, чтобы значительно улучшить качество жизни модельных животных, которые все еще демонстрируют признаки МДД — интенсивную дегенерацию, воспаление и дисрегуляцию кальциевого метаболизма. Однако такой подход и уменьшение площади фиброза можно использовать в качестве дополнительной терапии для поддержания достаточного количества целевых мышечных волокон, которые могут быть доступны для терапии и восстановления.

5. Влияние активатора Ca^{2+}-зависимого K^+-канала NS1619 на функционирование митохондрий скелетной мускулатуры и сердца *mdx*-мышей и состояние тканей этих органов

В работе нами отмечено существенное изменение активности митохондриального, активируемого ионами кальция, калиевого канала (mitoBK$_{Ca}$) в скелетных мышцах и сердце *mdx*-мышей, которое вносит вклад в прогрессирование патологии МДД (разделы 1 и 2). Такая картина наиболее выражена в скелетных мышцах – нами выявлено снижение уровня белка mitoBK$_{Ca}$ и экспрессии кодирующего его гена, что отражает глубокие изменения на генном уровне. Известно, что активация mitoBK$_{Ca}$ обладает кардиопротекторным эффектом и защищает клетки от избыточного производства АФК и митохондриальной дисфункции (González-Sanabria et al., 2021). Действительно, ранее было показано, что активатор mitoBK$_{Ca}$ NS1619 защищает клетки сердца при ишемии/реперфузии (Wang et al., 2004), а также обладает нейропротекторным действием (Du et al., 2020), поэтому в настоящей работе нами было оценено влияние внутрибрюшинного введения NS1619 (0,5 мг/кг массы тела в течение 4 недель) на морфофункциональные изменения митохондрий скелетных мышц и сердца *mdx*-мышей, а также на состояние скелетных мышц и сердца животных. Аналогичные исследования проведены на мышах дикого типа с целью выявления побочных эффектов терапии.

Установлено, что NS1619 нормализует скорость транспорта и общий уровень K^+ в митохондриях скелетных мышц и сердца *mdx*-мышей (рисунок 20). При этом в случае скелетных мышц также наблюдалась нормализация уровня mitoBK$_{Ca}$ и экспрессии кодирующего его гена (рисунок 21).

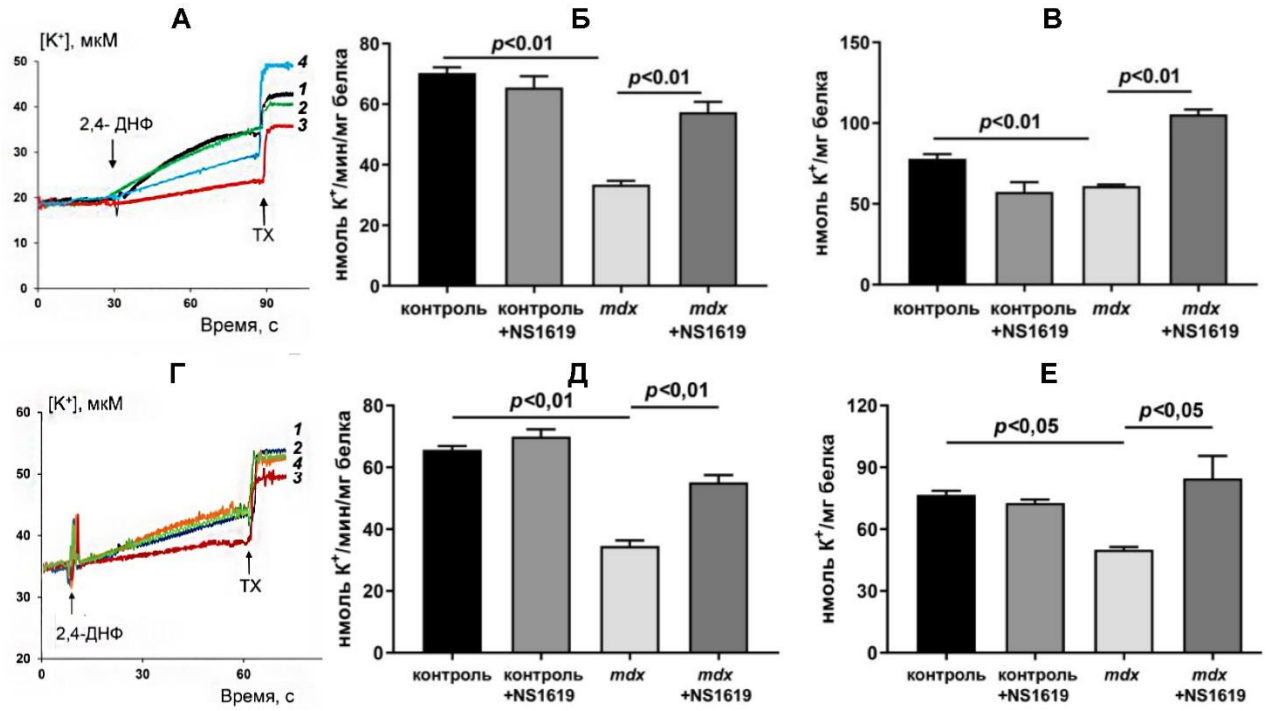

Рисунок 20 – Влияние NS1619 на транспорт и уровень K^+ в митохондриях скелетных мышц (А-В) и сердца (Г-Е) мышей. ДНФ-индуцированный выход K^+ из митохондрий скелетных мышц (А) и сердца (Г) мышей группы контроль (кривая *1*), контроль+NS1619 (кривая *2*), *mdx* (кривая 3) и *mdx*+NS1619 (кривая *4*). Скорость выхода K^+ из митохондрий (Б и Д). Общее содержание K^+ в митохондриях (В и Е). Приведены средние значения ± ошибка средней (*n* = 6-8 (Б и В) и *n* = 3 (Д и Е)

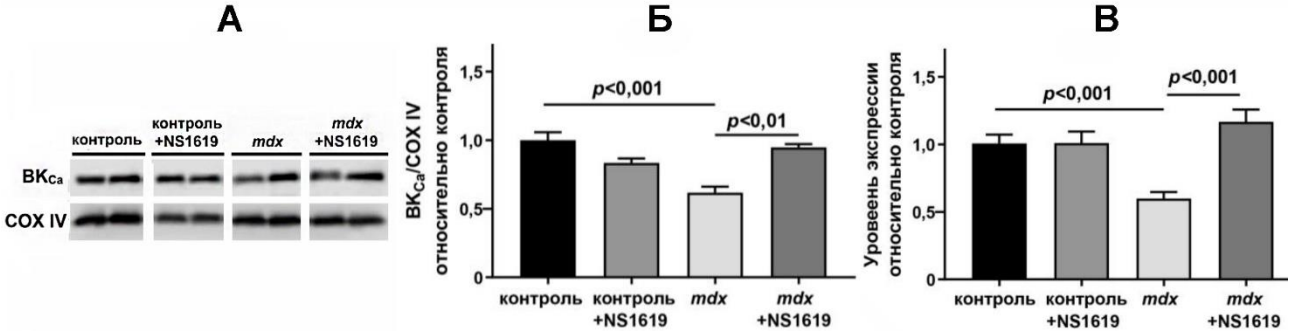

Рисунок 21 – Уровень mitoBK$_{Ca}$ в митохондриях (А и Б) и экспрессия кодирующего его гена (В) в скелетной мускулатуре мышей. Приведены средние значения ± ошибка средней (*n* = 3 (Б) и *n* = 10 (В)

Такой эффект NS1619 способствовал снижению интенсивности окислительного стресса в митохондриях скелетных мышц и сердца, о чем свидетельствовало уменьшение МДА-продуктов в органеллах (рисунок 22А и Б). Кроме того, митохондрии скелетных мышц *mdx*-мышей характеризовались улучшением способности аккумулировать Ca^{2+} (рисунок 22В), что важно в условиях избытка этого иона в дистрофин-дефицитных мышечных волокнах. Нами также отмечена нормализация размера органелл и их ультраструктуры (рисунок 23).

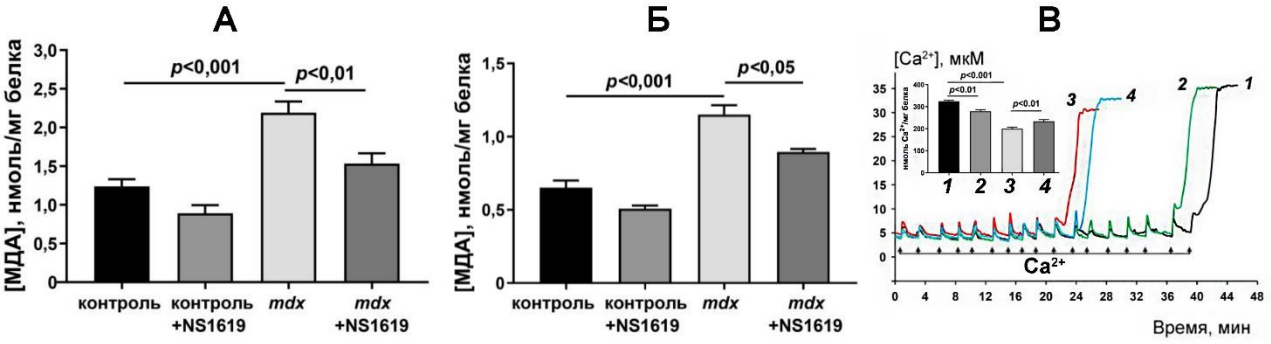

Рисунок 22 – Влияние NS1619 на уровень МДА-продуктов в митохондриях скелетных мышц (А) и сердца (Б) мышей. В – поглощение Ca^{2+} митохондриями скелетных мышц мышей группы контроль (кривая *1*), контроль+NS1619 (кривая *2*), *mdx* (кривая *3*) и *mdx*+NS1619 (кривая *4*). Во встроенной панели представлена Ca^{2+} емкость органелл, соответствующая кривым. Приведены средние значения ± ошибка средней (*n* = 4-6 (А), *n* = 3 (Б) и *n* = 10 (В)

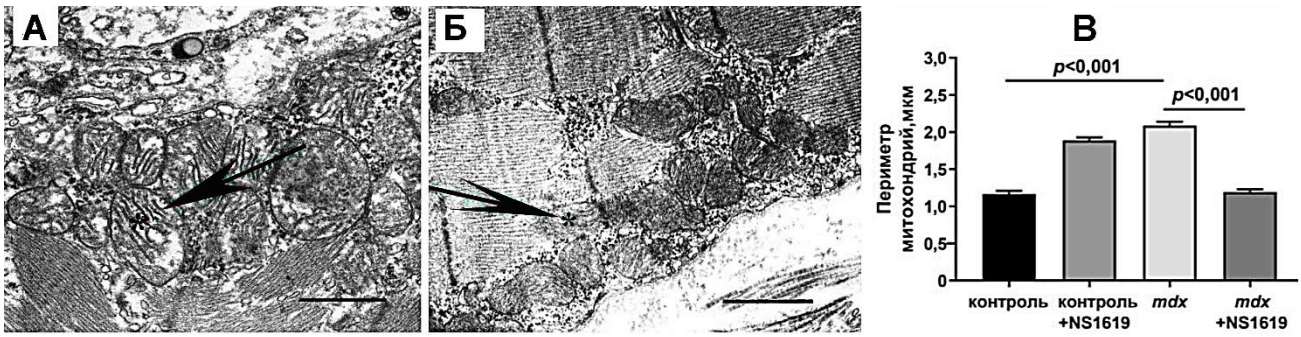

Рисунок 23 – Ультраструктура четырехглавой мышцы бедра мышей группы *mdx* (А) и *mdx*+NS1619 (Б). Стрелкой отмечена субсарколеммальная популяция митохондрий. Бар – 1 мкм. На панели В приведен периметр митохондрий экспериментальных групп мышей. Приведены средние значения ± ошибка средней

Действие NS1619 привело к уменьшению площади фиброза как в скелетных мышцах, так и в сердце *mdx*-мышей (рисунок 24А и Б). Однако это не сопровождалось улучшением параметров мышечной силы и выносливости этих животных (рисунок 24В).

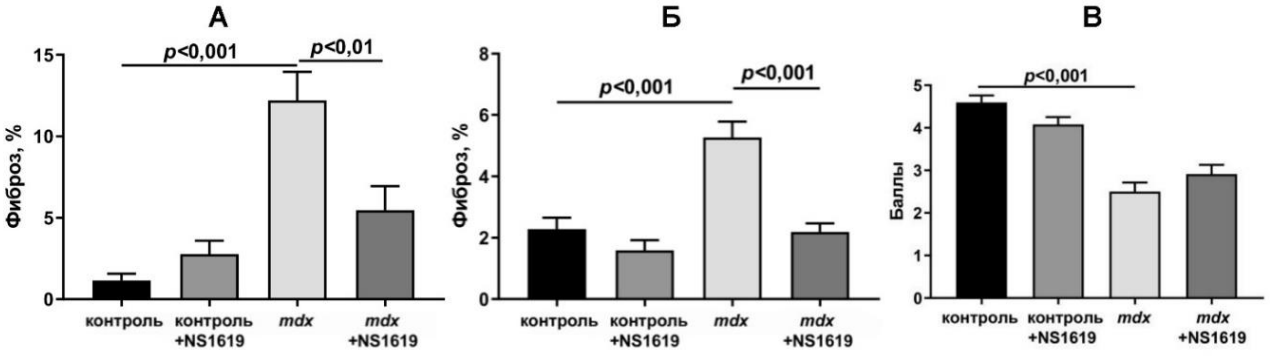

Рисунок 24 – Влияние NS1619 на площадь фиброза в скелетных мышцах (А) и сердце (Б), а также на мышечную силу мышей (В). Приведены средние значения ± ошибка средней (*n*=10)

Такой эффект, по всей видимости, обусловлен побочным действием NS1619. В частности, обладая плейотропным действием, NS1619 подавлял работу комплексов дыхательной цепи митохондрий (в концентрации 20 мкМ отмечено снижение активности комплексов I, III, IV и V на 17, 10, 11 и 12%,

соответственно, $p<0,05$) и снижал эффективность синтеза АТФ, необходимого для мышечного сокращения (параметр АДФ/О митохондрий скелетных мышц снижался в 1,4 раза при их энергизации глутаматом и малатом).

Полученные результаты свидетельствуют о том, что активация $mitoBK_{Ca}$ и применение NS1619 обладают терапевтическим эффектом при лечении МДД, что видно, по крайней мере, на *mdx*-мышах. Однако эффект такой терапии неполный и требует подбора оптимальной концентрации и режима введения препарата, а также поиска более селективных активаторов BK_{Ca}-каналов.

6. Влияние ингибитора Ca^{2+}-зависимой МРТ-поры алиспоривира на функционирование митохондрий скелетной мускулатуры и сердца *mdx*-мышей и состояние тканей этих органов

Наиболее эффективные варианты терапии МДД так или иначе включают в себя нормализацию гомеостаза Ca^{2+} в мышечных тканях. Результаты других групп (Wissing et al., 2010; Stocco et al., 2021) демонстрируют, что этого можно достичь путем улучшения способности митохондрий мышечных волокон аккумулировать Ca^{2+}. В частности, это возможно путем блокирования индукции МРТ-поры во внутренней мембране органелл путем фармакологического блокирования его активности с помощью специфических ингибиторов. В настоящее время идентифицировано несколько ингибиторов циклофилина Д. Одним из них является алиспоривир (Али) – неиммуносупрессивный блокатор МРТ-поры. В условиях настоящего эксперимента внутрибрюшинное введение Али (5 мг/кг в день в течение 4 недель) привело к улучшению функциональной активности митохондрий *mdx*-мышей, что было выражено в случае скелетных мышц. Али нормализовал способность митохондрий скелетных мышц аккумулировать Ca^{2+} в матриксе органелл (рисунок 25А), что также сопровождалось существенным снижением уровня активатора МРТ-поры циклофилина Д и экспрессии кодирующего его гена (рисунок 25Б-Г).

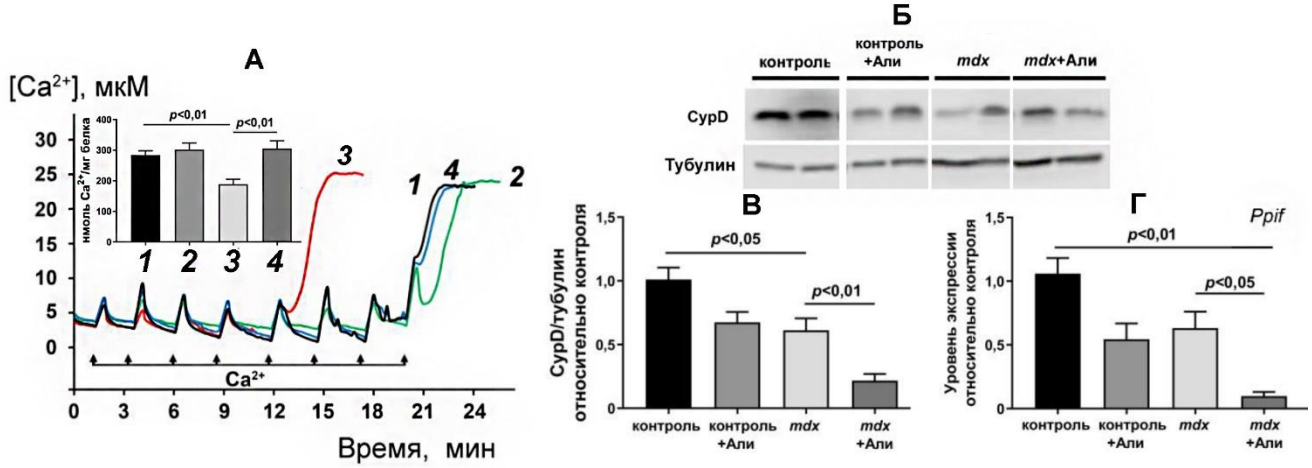

Рисунок 25 – Поглощение Ca^{2+} (А) митохондриями скелетных мышц мышей группы контроль (кривая *1*), контроль+Али (кривая *2*), *mdx* (кривая *3*) и *mdx*+Али (кривая *4*). Во встроенной панели представлена Ca^{2+} емкость органелл, соответствующая кривым. Данные иммуноблоттинга (Б), относительное количество белка циклофилина Д (В) и экспрессия гена *Ppif* (Г), кодирующего циклофилин Д, в скелетных мышцах мышей. Приведены средние значения ± ошибка средней (n = 6 (А), n = 5 (В) и n = 10 (Г)

Также Али снижал уровень МДА-продуктов в митохондриях скелетных мышц, что свидетельствует о смягчении окислительного стресса (рисунок 26). Кроме того, отмечено улучшение параметров окислительного фосфорилирования митохондрий скелетных мышц мышей группы *mdx*+Али – увеличение скорости дыхания в состояниях 3, $3U_{ДНФ}$ и дыхательного контроля по сравнению с *mdx*-мышами на 28, 34 и 14% соответственно (p<0,05), что позволило достичь показателей животных дикого типа. Такая нормализация параметров митохондриальной функции может быть обусловлена увеличением уровня комплекса I дыхательной цепи органелл под действием Али (рисунок 26Б и В). Наряду с этим мы не отметили влияния Али на показатели, отражающие гиперфункциональность митохондрий сердца *mdx*-мышей.

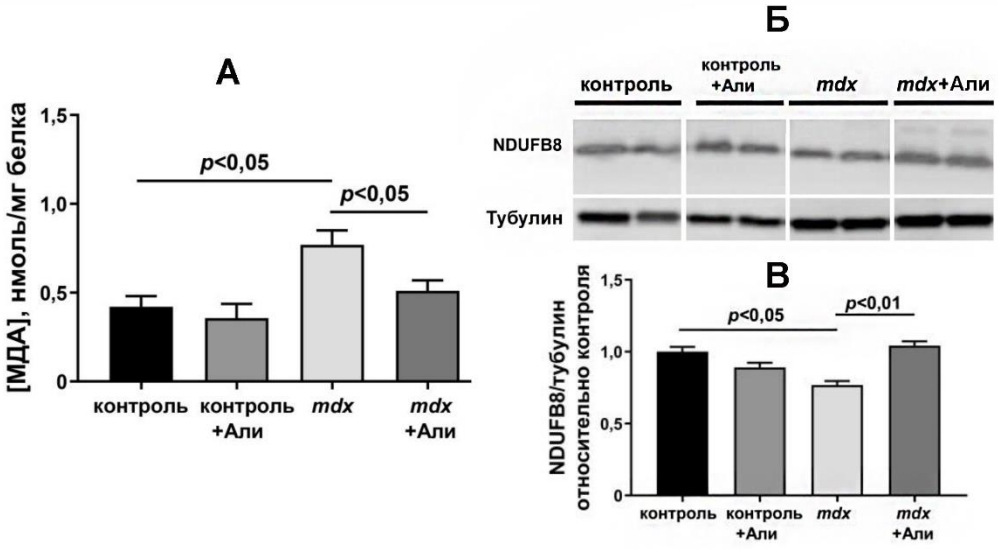

Рисунок 26 – Влияние Али на уровень МДА-продуктов в митохондриях скелетных мышц (А) и соотношение комплекса I/тубулин в скелетных мышцах мышей (Б и В). Приведены средние значения ± ошибка средней (n = 4 (А), n = 6 (В)

Следует отметить, что Али также снижал уровень экспрессии гена *Ppargc1a* в скелетных мышцах и сердце *mdx*-мышей, так и животных дикого типа (рисунок 27), что может свидетельствовать о подавлении митохондриального биогенеза. Однако при этом он не влиял на уровень мтДНК в тканях мышей.

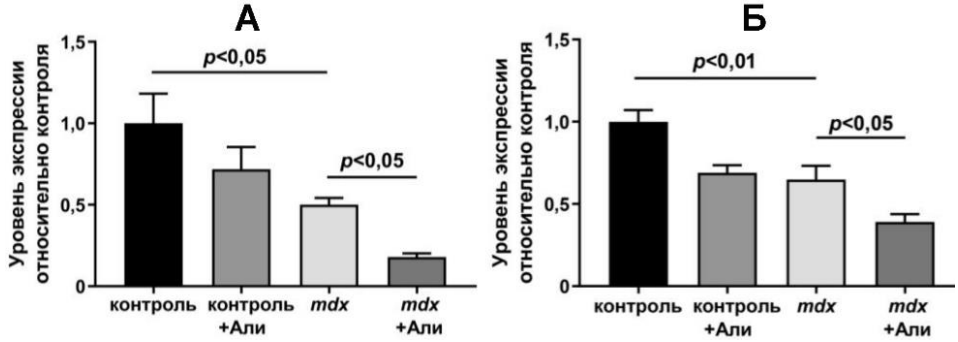

Рисунок 27 – Влияние Али на экспрессию гена *Ppargc1a*, кодирующего фактор биогенеза митохондрий PGC1a, в скелетных мышцах (А) и сердце (Б) мышей. Приведены средние значения ± ошибка средней (n = 10 (А) и n = 8 (Б)

Тем не менее, применение Али привело к снижению интенсивности воспалительного процесса в организме *mdx*-мышей, о чем свидетельствует снижение активности креатинкиназы в сыворотке крови (рисунок 28А). Также мы отметили улучшение мышечной функции *mdx*-мышей (рисунок 28Б), устранение гипертрофии сердечной мышцы и восстановление некоторых параметров функционирования этого органа, о чем свидетельствуют данные ЭКГ (рисунок 28).

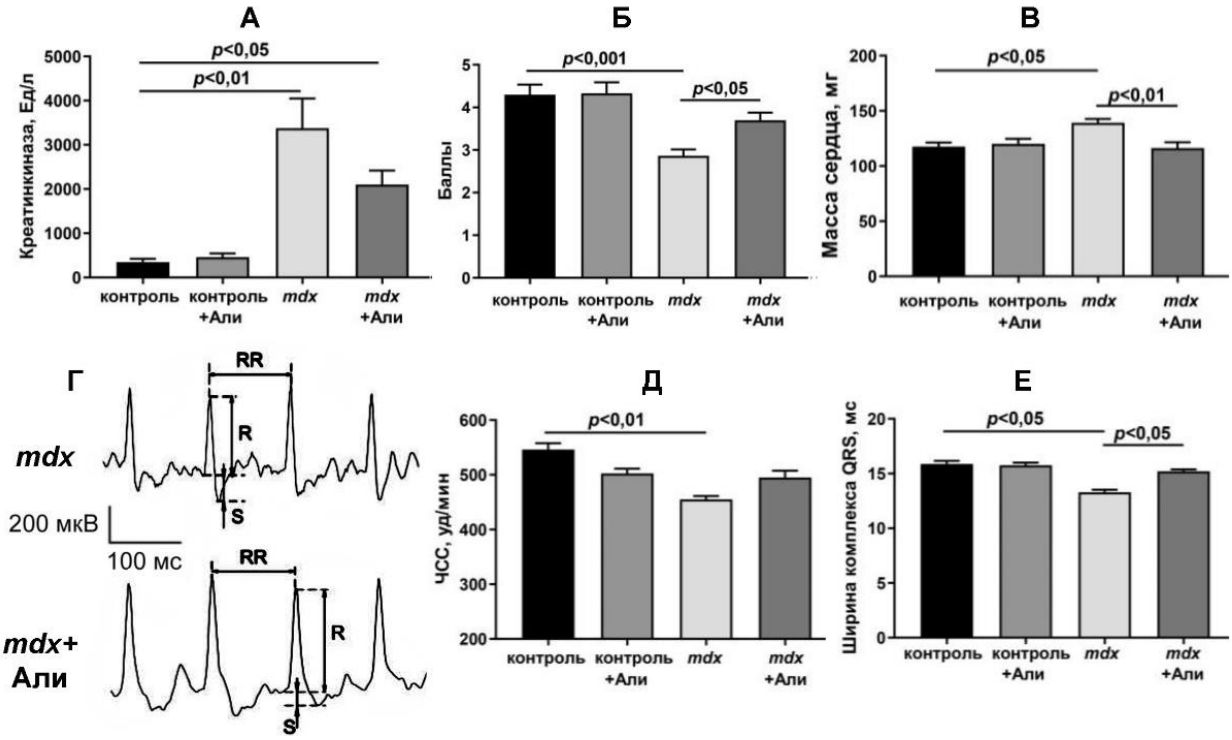

Рисунок 28 – Влияние Али на активность креатинкиназы в сыворотке крови (А), мышечную силу (тест «на струне») (Б) и массу сердца (В) мышей. Г – типичные записи ЭКГ, а также ЧСС (Д) и ширина комплекса QRS (Е), полученные из профилей ЭКГ мышей. Приведены средние значения ± ошибка средней (n = 10 (А-В) и n = 5 (Д, Е)

Ранее было показано, что подкожное введение алиспоривира в дозе 50 мг/кг/сут также оказывает благотворное влияние на скелетную мускулатуру *mdx*-мышей (Wissing et al., 2010), поэтому можно предполагать, что эффективная доза препарата при внутрибрюшинном способе введения может быть снижена как минимум в 10 раз для достижения значимого эффекта.

7. Применение митохондриальной заместительной терапии для коррекции дистрофин-дефицитного состояния *mdx*-мышей

Недавно было показано, что внесение митохондрий здорового донора в поврежденную скелетную мышцу способствует усилению регенерации мышц, снижению интенсивности фиброза и восстановлению нервно-мышечной функции (Alway et al., 2023). В настоящей работе мы также оценили влияние митохондриальной заместительной терапии на дисфункцию этих органелл в скелетных мышцах *mdx*-мышей и общее состояние ткани животных. Для этого производились инъекции аллогенных митохондрий, полученных из скелетной

мускулатуры мышей дикого типа, в скелетные мышцы (передняя и задняя поверхности бедра) *mdx*-мышей в дозе 1 мкг митохондриального белка/г массы мыши. Инъекции производились через два дня на третий, каждое животное было подвергнуто 10 процедурам. Для последней инъекции митохондрии были предварительно окрашены MitoTracker Red (для последующей визуализации). По завершению эксперимента животные выдерживались в течение недели в условиях вивария, после чего была оценена структура и функциональное состояние скелетных мышц. Кроме того, из мышц задних конечностей животных были выделены митохондрии и оценены их функциональные параметры. Полученные данные были сравнены с показателями контрольных *mdx*-мышей, получавших носитель (дополненный 1 мкМ MitoTracker Red в последней серии инъекций), а также животных дикого типа. Установлено, что в мышцах *mdx*-мышей, получавших инъекции меченых митохондрий, обнаруживается очаговая флуоресценция MitoTracker Red (рисунок 29А), тогда как в мышцах контрольных животных, получавших носитель (в том числе последнюю инъекцию с флуоресцентным красителем), интенсивного сигнала не выявлено (рисунок 29Б). Это может свидетельствовать об успешном проникновении меченых митохондрий через мембрану мышечного волокна *mdx*-мышей-реципиентов. В то же время в мышцах контрольных *mdx*-мышей краситель, по всей видимости, равномерно распределяется в тканях.

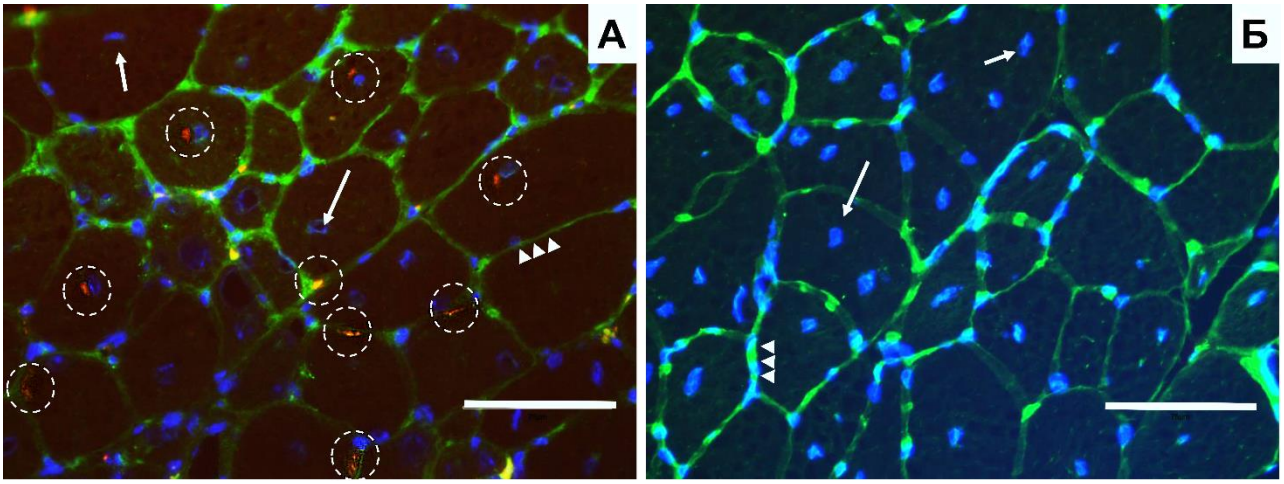

Рисунок 29 – Микрофотографии ткани четырехглавой мышцы бедра *mdx*-мышей, получавших аллогенные митохондрии, окрашенные MitoTracker Red (А) и животных, получавших инъекции носителя-среды инкубации (Б). Синий цвет соответствует клеточным ядрам, окрашенным флуоресцентным красителем Hoechst 33342 (отмечены стрелками). Мембраны мышечных волокон окрашены биотинилированным лектином и стрептавидин-меченным AlexaFluor488 (отмечены треугольниками). Красные скопления (на панели А, выделены пунктирной линией) соответствуют митохондриям, окрашенным MitoTracker Red CMXRos. Бар – 75 мкм

Для того чтобы выяснить влияние митохондриальной трансплантации на состояние ткани скелетных мышц, в работе оценена интенсивность циклов дегенерации/регенерации (по доле мышечных волокон, содержащих центральные ядра) и фиброза. Установлено, что введение митохондрий способствует достоверному снижению как уровня мышечных волокон,

содержащих центральные ядра (рисунок 30А), так и площади фиброза в скелетных мышцах *mdx*-мышей (рисунок 30Б). Это также сопровождалось снижением активности креатинкиназы в сыворотке крови мышей по сравнению с контрольными *mdx*-животными (рисунок 30В). Это свидетельствует о снижении интенсивности деструктивных процессов в скелетной мускулатуре дистрофин-дефицитных животных.

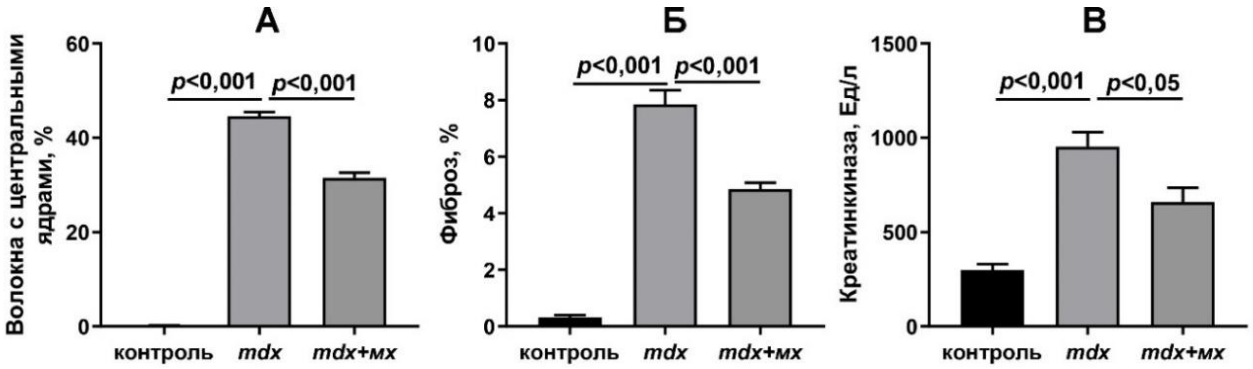

Рисунок 30 – Процент мышечных волокон, содержащих центрально расположенные ядра (А), площадь фиброза (Б) в скелетных мышцах, а также активность креатинкиназы в сыворотке крови мышей (В). Приведены средние значения ± ошибка средней (*n*=5 (А и Б), *n*=6-10 (В)

Нами также выявлено положительное влияние примененного подхода на мышечную силу животных, оцененную по тесту «сила хватки». Рисунок 31 демонстрирует тенденцию к увеличению мышечной силы *mdx*-мышей при использовании всех лап. В случае оценки мышечной силы задних конечностей, в которые производилась инъекция аллогенных митохондрий, различия были достоверными и свидетельствовали о нормализации этого параметра.

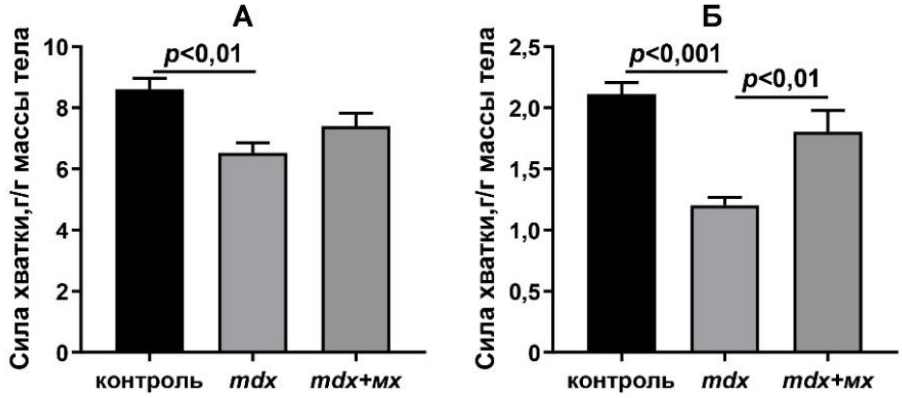

Рисунок 31 – Результаты теста силы хватки, полученные при удержании животного четырьмя лапами (А) и при удержании животного только задними конечностями (Б). Приведены средние значения ± ошибка средней (*n*=10-12)

Мы оценили влияние митохондриальной заместительной терапии на функционирование митохондрий *mdx*-мышей-реципиентов. Установлено, что для митохондрий животных группы *mdx*+мх характерно дальнейшее снижение скорости дыхания в состоянии 3 и $3U_{ДНФ}$, а также параметра дыхательного контроля (таблица 3).

Таблица 3 – Параметры дыхания и окислительного фосфорилирования митохондрий скелетной мускулатуры мышей, энергизованных глутаматом и малатом

Животные (n=5)	Состояние 2	Состояние 3	Состояние 4	Состояние $3U_{ДНФ}$	ДК
	нмоль O_2/мин/мг белка митохондрий				отн. ед
контроль	20,0±0,8	133,3±2,6	31,8±2,3	209,5±8,7	4,3±0,2
mdx	17,5±1,0	126,1±1,1*	33,7±2,0	180,3±1,7*	3,7±0,1*
mdx+мх	17,4±0,8	104,0±1,5*#	30,3±1,0	156,9±1,5*#	3,3±0,1*#

Условия как в подписи к таблице 1. Приведены средние значения ± ошибка средней. *p < 0,05 против группы контроль. #p < 0,05 против группы *mdx*

При этом нами не выявлено влияния терапии на сниженную способность митохондрий скелетных мышц *mdx*-мышей поглощать Ca^{2+} (рисунок 32А). Однако уменьшение функциональной активности митохондрий сопровождалось менее интенсивным образованием МДА-продуктов в органеллах (рисунок 32Б). Это, по всей видимости, может свидетельствовать об уменьшении интенсивности окислительного стресса в скелетной мускулатуре животных и замедлении развития патологии МДД.

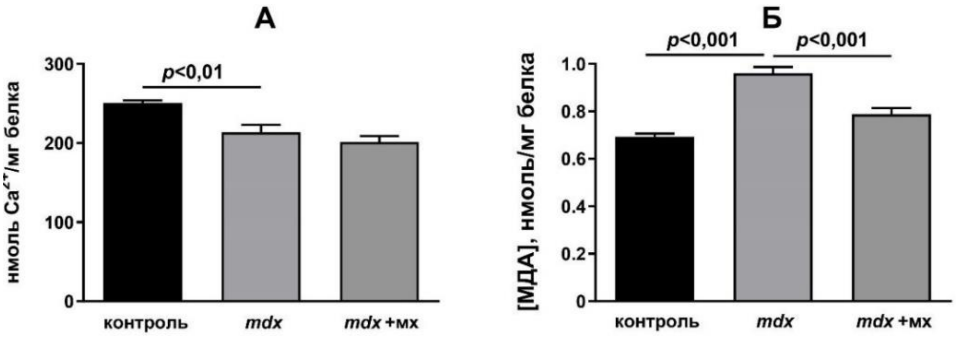

Рисунок 32 – Ca^{2+}-емкость (А) и уровень МДА-продуктов (Б) в митохондриях скелетных мышц мышей. Приведены средние значения ± ошибка средней (n=6)

Можно предполагать, что митохондриальная заместительная терапия приводит к восполнению функциональных митохондриальных белков в скелетных мышцах *mdx*-мышей, менее активно генерирующих АФК, а также нормализации их взаимодействия с сигнальными молекулами мышечных клеток. При этом нельзя исключать и то, что эффект терапии обусловлен внешними стимулами, влияющими на состояние мышечной ткани и митохондрий. В частности, митохондрии содержат молекулярные паттерны, связанные с повреждением, которые могут вызывать неинфекционную воспалительную реакцию (Плотников и др., 2020) и влиять на развитие патологии.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ диссертационной работы содержит сопоставление полученных результатов исследования с данными литературы.

Проведенные исследования позволили комплексно оценить ультраструктурные и функциональные изменения в скелетных мышцах и сердце дистрофин-дефицитных мышей линии *mdx*, представляющих собой приближенную модель МДД. Показано, что снижению мышечной силы и выносливости *mdx*-мышей, сопровождающемуся нарушением целостности мембран мышечных волокон, их интенсивной дегенерацией, а также отложением

фиброзной ткани в скелетных мышцах, способствует развитие дисфункции митохондриальной сети. Это выражается в нарушении ультраструктуры митохондрий скелетных мышц – нарушении целостности мембран органелл, набухании и снижении плотности упаковки крист внутренней мембраны. Такие изменения сопровождаются драматическим снижением эффективности окислительного фосфорилирования и синтеза АТФ в митохондриях и, напротив, активацией продукции АФК в органеллах, ведущей к их окислительному повреждению и способствующей развитию окислительного стресса в мышечных волокнах, а также провоспалительным и профибротическим процессам. Установлено, что дисфункция митохондрий скелетных мышц *mdx*-мышей связана с угнетением как трансмембранного транспорта Ca^{2+} и K^{+} в органеллах, так и способности митохондрий выполнять функцию их временного депо. Выяснено, что такая дисрегуляция ионного гомеостаза в митохондриях скелетных мышц трансгенных животных обусловлена перестройками в белковых системах, обеспечивающих транспорт Ca^{2+} и K^{+} через внутреннюю мембрану органелл. Можно полагать, что подобные изменения в функционировании систем транспорта Ca^{2+} и K^{+} в митохондриях вносят дополнительный вклад в нарушение ионного гомеостаза, характерное для дистрофин-дефицитных скелетных мышц, ускоряя развитие патологии.

В ткани сердца дистрофин-дефицитных мышей также выявлено развитие фиброза, которое сопровождается электрофизиологическими нарушениями и гипертрофией органа. В этом случае нами отмечены изменения в ультраструктуре кардимиоцитов, хотя они не столь драматичны, как в случае скелетных мышц этих животных. Это касается и ультраструктуры митохондрий сердца *mdx*-мышей, в целом сохраняющих классическую архитектуру. Более того, нами отмечено повышение функциональной активности митохондрий сердца *mdx*-мышей, которое проявляется в увеличении эффективности окислительного фосфорилирования, более активной рециклизации Ca^{2+} через внутреннюю мембрану, а также буферизации Ca^{2+} в матриксе. Показано, что это также может быть обусловлено изменениями в белковых системах, отвечающих за транспорт Ca^{2+} в митохондриях. Такие изменения, по всей видимости, способны маскировать дисфункцию биоэнергетического аппарата кардиомиоцитов при развитии мышечной дистрофии и отсрочивать развитие выраженной сердечной патологии, что характерно для *mdx*-мышей. С другой стороны, нами установлено, что уже на ранних этапах развития патологии митохондрии сердца *mdx*-мышей характеризуются существенным снижением эффективности транспорта K^{+} через внутреннюю мембрану и общего уровня этого иона в матриксе, а также повышенной продукцией АФК, способствующей окислительному стрессу. Можно полагать, что эти изменения вносят существенный вклад в развитие патологии сердца на поздних этапах МДД.

Симптоматическая противовоспалительная терапия на основе глюкокортикоида дефлазакорта лишь частично устранила развитие митохондриальной дисфункции в скелетных мышцах *mdx*-мышей и, более того, привела к дальнейшему снижению способности органелл аккумулировать Ca^{2+}. Таким образом, проблема устранения митохондриальной дисфункции при МДД

остается актуальной и может быть решена путем применения специфических фармакологических агентов, способных модулировать активность митохондриальных белков. Исходя из результатов работы, к таким мишеням можно отнести белки внутренней мембраны митохондрий, участвующие в регуляции гомеостаза Ca^{2+} и K^+ (рисунок 33). Коррекция функционирования этих систем способствует улучшению структуры и функции митохондрий и замедляет развитие патологии. В частности, активация K^+-транспортирующих каналов, а именно, $K_{АТФ}$-канала и BK_{Ca}-канала, с помощью уридина и NS1619, соответственно, с разной степенью эффективности улучшает параметры митохондриального гомеостаза K^+ в скелетных мышцах и сердце *mdx*-мышей и способствует снижению интенсивности окислительного стресса, улучшению ультраструктуры митохондрий и их функции (рисунок 33А). Замедление дегенеративных процессов и уменьшение отложения фиброзной ткани в скелетных мышцах и сердце *mdx*-животных, наблюдаемое в обоих случаях, может свидетельствовать о терапевтическом эффекте модуляторов K^+-каналов.

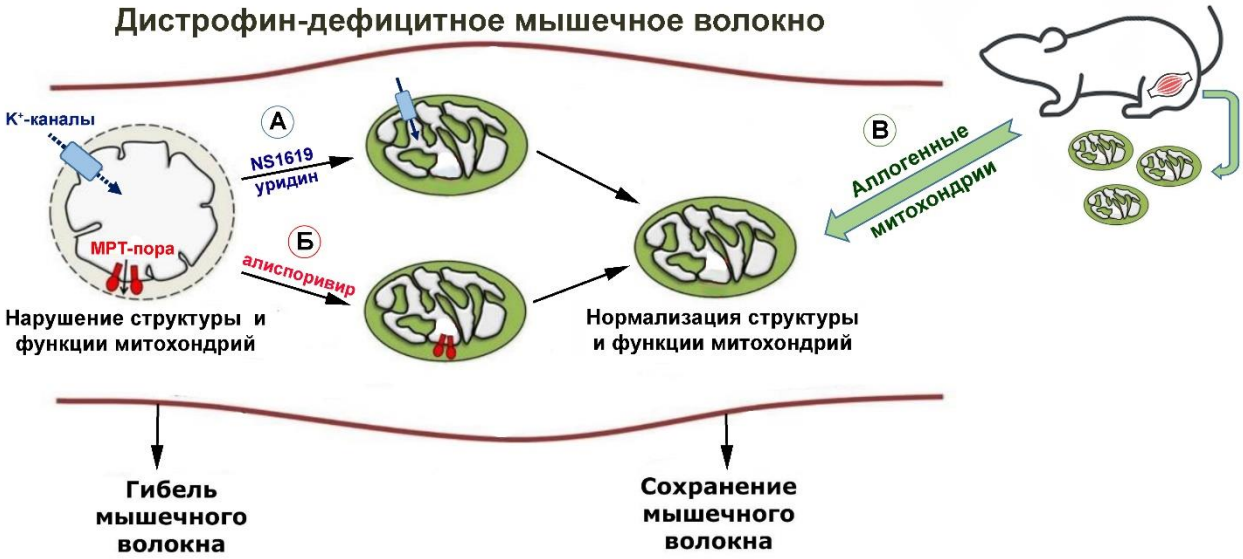

Рисунок 33 – Стратегии, примененные для улучшения функции митохондрий в мышечной ткани *mdx*-мышей и замедления развития МДД: (А) Активация K^+-каналов митохондрий с помощью уридина или NS1619. (Б) Ингибирование индукции МРТ-поры алиспоривиром. (В) Трансплантация аллогенных митохондрий из скелетных мышц мышей дикого типа

Другим подходом является ингибирование открытия неспецифической Ca^{2+}-зависимой МРТ-поры в митохондриях *mdx*-мышей с помощью алиспоривира. Выявлено, что этот агент улучшает способность митохондрий поглощать и удерживать Ca^{2+}, что, по всей видимости, способствует снижению перегрузки саркоплазмы ионами кальция (рисунок 33Б). Это сопровождается снижением интенсивности окислительного стресса и улучшением параметров окислительного фосфорилирования в митохондриях и оказывает терапевтическое влияние на дистрофин-дефицитных мышей, замедляя развитие патологии и улучшая функцию скелетных мышц и сердца животных.

Наряду с улучшением функции собственных митохондрий в мышцах *mdx*-мышей с помощью модуляторов ионных каналов, нами апробирован и

принципиально иной подход, связанный с применением митохондриальной заместительной терапии. Показано, что внутримышечное введение аллогенных митохондрий от здоровых животных *mdx*-мышам приводит к снижению интенсивности окислительного стресса и дегенеративных процессов, замедлению отложения фиброзной ткани в скелетной мускулатуре *mdx*-мышей, а также улучшению мышечной функции животных (рисунок 33В).

Полученные результаты свидетельствуют о том, что нарушение функции митохондрий является одним из важных последствий потери белка дистрофина в поперечнополосатых мышцах. Тем не менее, учитывая, что МДД не демонстрирует эмбриональную летальность, можно полагать, что в ряде случаев имеет место адаптационное репрограммирование многих систем организма. Это касается и митохондрий, демонстрирующих изменения в экспрессии и характере регуляции митохондриальных белков. Такие изменения особенно выражены в ткани сердца, что может способствовать отсроченному развитию кардиомиопатии как у модельных животных, так и у человека. Однако подобные перестройки зачастую выглядят недостаточными и не приводят к улучшению состояния поперечнополосатых мышц. С другой стороны, адаптация дистрофин-дефицитных тканей организма к развитию патологии может проявляться и в виде низкого уровня экспрессии генов, контролирующих митохондриальный биогенез, динамику органелл и митофагию. Возможно, что это позволяет поддерживать минимально необходимый уровень синтеза АТФ и метаболической активности в дистрофин-дефицитных поперечнополосатых мышцах и в то же время снизить интенсивность продукции АФК дисфункциональными митохондриями. Фармакологическая модуляция белковых каналов органелл в ряде случаев приводит к улучшению структуры и функции скелетной мускулатуры и сердца, а также качества жизни экспериментального объекта. Однако стоит отметить, что многие результаты, в том числе представленные в настоящей работе, получены на модельных животных и требуют подтверждения в клинических исследованиях. Тем не менее совокупность полученных и известных данных позволяет полагать, что модуляция функции митохондрий может рассматриваться в качестве перспективного подхода для вторичной терапии МДД.

Выводы:

1. Митохондрии скелетных мышц дистрофин-дефицитных мышей характеризуются нарушением ультраструктуры, угнетением окислительного фосфорилирования, развитием окислительного стресса, снижением активности транспорта Ca^{2+} и K^{+}, а также устойчивости к индукции МРТ-поры. Это сопровождается перестройками в белках, формирующих системы транспорта ионов кальция и калия в митохондриях, и вносит вклад в прогрессирование патологии МДД, что проявляется в дегенерации мышечных волокон и фиброзе, ведущем к снижению мышечной силы и выносливости *mdx*-мышей.

2. В митохондриях сердца *mdx*-мышей выявлены адаптационные изменения, которые проявляются в увеличении эффективности окислительного фосфорилирования, улучшении рециклизации ионов кальция посредством унипорта и Na^{+}-зависимого антипорта, а также увеличении устойчивости

органелл к индукции МРТ-поры. Эти изменения также сопровождаются перестройками в белковых системах, регулирующих транспорт ионов кальция в митохондриях. Наряду с этим митохондрии сердца *mdx*-мышей характеризуются развитием окислительного стресса и угнетением гомеостаза ионов калия, что может способствовать электрофизиологическим нарушениям, фиброзу и гипертрофии органа уже на ранних этапах развития МДД.

3. Глюкокортикоид дефлазакорт улучшает параметры дыхания и окислительного фосфорилирования митохондрий скелетных мышц *mdx*-мышей, а также увеличивает эффективность транспорта Ca^{2+} митохондриями. Применение глюкокортикоида приводит к увеличению уровня АТФ в скелетных мышцах, а также улучшению показателей мышечной силы и выносливости дистрофин-дефицитных животных. В то же время дефлазакорт вызывает дальнейшее снижение устойчивости органелл к индукции МРТ-поры.

4. Метаболический модулятор уридин улучшает функциональную активность митохондрий скелетных мышц и сердца дистрофин-дефицитных мышей, что проявляется в нормализации гомеостаза ионов калия, а также смягчении окислительного стресса. Это сопровождается уменьшением площади фиброза в скелетной мускулатуре и сердце *mdx*-мышей, но не оказывает влияния на интенсивность дегенерации мышечных волокон и уровень ферментов – маркеров нарушения целостности их мембран, а также мышечную силу животных.

5. Активация Ca^{2+}-зависимого K^+-канала производным бензимидазола NS1619 приводит к улучшению гомеостаза K^+, а также снижению интенсивности окислительного стресса в митохондриях скелетных мышц и сердца *mdx*-мышей. Эффект NS1619 сопровождается улучшением ультраструктуры органелл, в случае скелетных мышц отмечено увеличение их устойчивости к индукции МРТ-поры. Это способствует снижению интенсивности дегенерации мышечных волокон, а также площади фиброза как в скелетных мышцах, так и в сердце *mdx*-мышей. Наряду с этим NS1619, ингибируя активность комплексов дыхательной цепи митохондрий и АТФ-синтазы, снижает эффективность окислительного фосфорилирования в условиях *in vivo* эксперимента. Это может обуславливать отсутствие влияния такой терапии на мышечную силу и выносливость *mdx*-мышей.

6. Увеличение устойчивости митохондрий к индукции МРТ-поры с помощью неиммуносупрессивного агента алиспоривира приводит к улучшению способности органелл аккумулировать ионы кальция, а также смягчению окислительного стресса и улучшению параметров окислительного фосфорилирования. Это способствует снижению интенсивности воспалительного процесса в организме *mdx*-мышей, улучшению мышечной функции, устранению гипертрофии сердца и восстановлению некоторых электрофизиологических параметров функционирования этого органа.

7. Введение аллогенных митохондрий *mdx*-мышам сопровождается улучшением ультраструктуры скелетной мускулатуры животных, снижением интенсивности дегенеративных процессов, а также улучшением мышечной функции. При этом трансплантация аллогенных митохондрий не приводит к

изменению параметров, отражающих функциональную активность органелл в скелетных мышцах *mdx*-мышей и, более того, отмечается дальнейшее снижение эффективности окислительного фосфорилирования в митохондриях этих животных. Также отмечено снижение интенсивности окислительного стресса в митохондриях *mdx*-мышей-реципиентов, что может свидетельствовать о замедлении развития патологии МДД.

Основные положения диссертационного исследования отражены в следующих публикациях автора:

Статьи в журналах, входящих в «Перечень ведущих рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертации на соискание ученой степени доктора наук»

1. Белослудцев, К. Н. Транспорт ионов Ca2+ митохондриями: механизмы, молекулярные структуры и значение для клетки / К. Н. Белослудцев, **М. В. Дубинин**, Н. В. Белослудцева, Г. Д. Миронова // Биохимия. – 2019. – Т. 84, №6. – С. 759–775. (1,8/0,5 п.л.).
2. Дубинин, М. В. Таксономические особенности механизмов специфического транспорта Ca^{2+} в митохондриях / **М. В. Дубинин**, К. Н. Белослудцев // Биологические мембраны. – 2019. – Т. 36, №4. – С. 231–241. (1,1/0,8 п.л.).
3. Dubinin, M. V. Duchenne muscular dystrophy is associated with the inhibition of calcium uniport in mitochondria and an increased sensitivity of the organelles to the calcium-induced permeability transition / **M. V. Dubinin**, E. Y. Talanov, K. S. Tenkov, V. S. Starinets, I. B. Mikheeva, M. G. Sharapov, K. N. Belosludtsev // Biochimica et biophysica acta. Molecular basis of disease. – 2020. – Vol. 1866, №5. – 165674. (1,2/0,8 п.л.).
4. Efimov, S. V. Comparison of cyclosporin variants B-E based on their structural properties and activity in mitochondrial membranes / S. V. Efimov, **M. V. Dubinin**, P. P. Kobchikova, Y. O. Zgadzay, I. A. Khodov, K. N. Belosludtsev, V. V. Klochkov // Biochemical and biophysical research communications. – 2020. – Vol. 526, №4. – P. 1054–1060. (0,7/0,1 п.л.).
5. Dubinin, M. V. Transport of Ca^{2+} and Ca^{2+}-dependent permeability transition in heart mitochondria in the early stages of Duchenne muscular dystrophy / **M. V. Dubinin**, E. Y. Talanov, K. S. Tenkov, V. S. Starinets, I. B. Mikheeva, K. N. Belosludtsev // Biochimica et biophysica acta. Bioenergetics. – 2020. – Vol. 1861, №10. – 148250. (1,4/0,8 п.л.).
6. Dubinin, M. V. The effect of deflazacort treatment on the functioning of skeletal muscle mitochondria in Duchenne muscular dystrophy / **M. V. Dubinin**, E. Y. Talanov, K. S. Tenkov, V. S. Starinets, N. V. Belosludtseva, K. N. Belosludtsev // International journal of molecular sciences. – 2020. – Vol. 21, №22. – 8763. (1,7/1,0 п.л.).
7. Дубинин, М. В. Влияние глюкокортикоида дефлазакорта на дыхание и Ca^{2+}-зависимую проницаемость митохондрий печени крыс / **М. В. Дубинин**, А. А.

Семенова, Е. И. Хорошавина, К. Н. Белослудцев // Биологические мембраны. – 2021. – Т. 38, № 2. – С. 139–151. (1,1/0,8 п.л.).

8. Dubinin, M. V. Alisporivir improves mitochondrial function in skeletal muscle of *mdx* mice but suppresses mitochondrial dynamics and biogenesis / **M. V. Dubinin**, V. S. Starinets, E. Y. Talanov, I. B. Mikheeva, N. V. Belosludtseva, K. N. Belosludtsev // International journal of molecular sciences. – 2021. – Vol. 22, №18. – 9780. (1,6/1,0 п.л.).

9. Dubinin, M. V. Effect of the non-immunosuppressive MPT pore inhibitor alisporivir on the functioning of heart mitochondria in dystrophin-deficient *mdx* mice / **M. V. Dubinin**, V. S. Starinets, E. Y. Talanov, I. B. Mikheeva, N. V. Belosludtseva, D. A. Serov, K. S. Tenkov, E. V. Belosludtseva, K. N. Belosludtsev // Biomedicines. – 2021. – Vol. 9, №9. – 1232. (1,3/0,8 п.л.).

10. Дубинин, М. В. Влияние алиспоривира на транспорт ионов кальция и митофагию в митохондриях скелетных мышц и сердца дистрофиндефицитных мышей / **М. В. Дубинин**, В. С. Старинец, И. Б. Михеева, К. Н. Белослудцев // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2021. – Т. 172, № 12. – С. 691–697. (0,4/0,3 п.л.).

11. Dubinin, M. V. Comparison of structural properties of cyclosporin A and its analogue alisporivir and their effects on mitochondrial bioenergetics and membrane behavior / **M. V. Dubinin**, V. A. Sharapov, A. I. Ilzorkina, S. V. Efimov, V. V. Klochkov, S. V. Gudkov, K. N. Belosludtsev // Biochimica et biophysica acta. Biomembranes. – 2022. – Vol. 1864, №9. – 183972. (1,0/0,7 п.л.).

12. Dubinin, M. V. The effect of uridine on the state of skeletal muscles and the functioning of mitochondria in Duchenne dystrophy / **M. V. Dubinin**, V. S. Starinets, N. V. Belosludtseva, I. B. Mikheeva, Y. A. Chelyadnikova, D. K. Penkina, A. A. Vedernikov, K. N. Belosludtsev // International journal of molecular sciences. – 2022. – Vol. 23, №18. – 10660. (1,3/0,8 п.л.).

13. Dubinin, M. V. BK_{Ca} activator NS1619 improves the structure and function of skeletal muscle mitochondria in Duchenne dystrophy / **M. V. Dubinin**, V. S. Starinets, N. V. Belosludtseva, I. B. Mikheeva, Y. A. Chelyadnikova, A. D. Igoshkina, A. B. Vafina, A. A. Vedernikov, K. N. Belosludtsev // Pharmaceutics. – 2022. – Vol. 14, №11. – 2336. (1,6/0,6 п.л.).

14. Dubinin, M. V. Ion channels of the sarcolemma and intracellular organelles in Duchenne muscular dystrophy: a role in the dysregulation of ion homeostasis and a possible target for therapy / **M. V. Dubinin**, K. N. Belosludtsev // International journal of molecular sciences. – 2023. – Vol. 24, №3. – 2229. (2,9/2,4 п.л.).

15. Дубинин, М. В. Влияние активатора кальций-зависимого K+-канала NS1619 на функцию митохондрий в сердце дистрофин-дефицитных мышей / **М. В. Дубинин**, В. С. Старинец, Ю. А. Челядникова, Н. В. Белослудцева, И. Б. Михеева, Д. К. Пенкина, А. Д. Игошкина, Е. Ю. Таланов, И. И. Киреев, Д. Б. Зоров, К. Н. Белослудцев // Биохимия. – 2023. – Т. 88, № 2. – С. 228–242. (1,3/0,6 п.л.).

16. Дубинин, М. В. Производное бензимидазола NS1619 подавляет функционирование изолированных митохондрий скелетных мышц мышей / **М. В. Дубинин**, А. Д. Игошкина, А. А. Семенова, Н. В. Микина, Е. И. Хорошавина,

К. Н. Белослудцев // Биологические мембраны. – 2023. – Т. 40, № 4. – С. 279–288. (1,0/0,7 п.л.).
17. Дубинин, М. В. Применение уридина способствует нормализации функции митохондрий сердца дистрофиндефицитных мышей и снижению уровня фиброза в ткани / **М. В. Дубинин**, Н. В. Белослудцева, И. Б. Михеева, Ю. А. Челядникова, Д. К. Пенкина, А. Б. Вафина, В. С. Старинец, И. И. Киреев, К. Н. Белослудцев // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2023. – Т. 176, №7. – С. 65–70. (0,4/0,3 п.л.).

Монография

18. Самарцев, В.Н. Взаимодействие жирных кислот с митохондриями: индукция свободного окисления и кальций-зависимой проницаемости внутренней мембраны [Текст]: монография / В.Н. Самарцев, **М.В. Дубинин.** - Йошкар-Ола: Мар. гос. ун-т, 2016. - 176 с. (10/4 п.л.).

Статьи в сборниках трудов конференций

19. Дубинин, М. В. Особенности транспорта кальция и индукции кальций-зависимой поры в митохондриях скелетных мышц дистрофин-дефицитных мышей *mdx* / **М. В. Дубинин**, К. С. Теньков, В. С. Старинец, Е. Ю. Таланов, К. Н. Белослудцев // Биологическая подвижность. Материалы XII Всероссийского симпозиума с международным участием. – Пущино, 2019. – С. 85–88. (0,2/0,1 п.л.).
20. Дубинин, М. В. Транспорт Ca^{2+} в митохондриях сердца в условиях мышечной дистрофии Дюшенна / **М. В. Дубинин**, Е. Ю. Таланов, В. С. Старинец, К. С. Теньков, К. Н. Белослудцев // Биохимия – основа наук о жизни: материалы 2-ой Всероссийской школы-конференции молодых ученых. – Казань, 2019. – С. 42–45. (0,2/0,1 п.л.).
21. Дубинин, М. В. Влияние дефлазакорта на функционирование митохондрий при дистрофии Дюшенна / **М. В. Дубинин**, Е. Ю. Таланов, В. С. Старинец, К. С. Теньков, Н. В. Белослудцева, К. Н. Белослудцев // Современные проблемы естественных наук и медицины. Сборник статей Всероссийской научной конференции. – Йошкар-Ола, 2020. – С. 151–154. (0,2/0,1 п.л.).
22. Дубинин, М. В. Влияние алиспоривира на функционирование митохондрий сердца при дистрофии Дюшенна / **М. В. Дубинин**, В. С. Старинец, Е. Ю. Таланов, А. А. Семенова, К. Н. Белослудцев // Современные проблемы естественных наук и медицины. Сборник статей Всероссийской научной конференции с международным участием. – Йошкар-Ола, 2021. – С. 69–74. (0,25/0,15 п.л.).
23. Дубинин, М. В. Применение алиспоривира для in vivo коррекции митохондриальной дисфункции скелетных мышц при дистрофии Дюшенна / **М. В. Дубинин**, В. С. Старинец, К. С. Теньков, Н. В. Белослудцева, В. А. Шарапов, К. Н. Белослудцев // Рецепторы и внутриклеточная сигнализация. Сборник статей. – Пущино, 2021. – С. 655–659. (0,25/0,15 п.л.).

24. Дубинин, М. В. Влияние циклоспорина А и алиспоривира на функционирование изолированных митохондрий скелетных мышц / **М. В. Дубинин**, Ю. А. Челядникова, Е. И. Хорошвина, А. А. Семенова // Современные проблемы естественных наук и фармации. Сборник статей Всероссийской научной конференции. – Йошкар-Ола, 2022. – С. 35–37. (0,22/0,15 п.л.).
25. Дубинин, М. В. Оценка влияния митохондриальной трансплантации на ультраструктуру скелетной мускулатуры дистрофин-дефицитных мышей / **М. В. Дубинин**, А. Д. Игошкина, А. Е. Степанова, Э. И. Кислицына, Ж. Б. Бейшеналиев, Т. А. Попенова, И. А. Турбина, И. Б. Михеева // Современные проблемы естественных наук и фармации. Сборник статей Всероссийской научной конференции. – Йошкар-Ола, 2023. – С. 30–33. (0,25/0,10 п.л.).

Публикации в других изданиях

26. Дубинин, М. В. Ca2+ uptake and permeability transition in heart and skeletal muscle mitochondria: a comparative study / **М. В. Дубинин**, К. С. Теньков, В. С. Старинец, Е. И. Хорошавина, К. Н. Белослудцев // Journal of Bioenergetics and Biomembranes. – 2018. – Vol. 50, №6. – С. 70. (0,07/0,05 п.л.).
27. Дубинин, М. В. Транспорт ионов кальция в митохондриях скелетных мышц и сердца при мышечной дистрофии Дюшенна / **М. В. Дубинин**, В. С. Старинец, К. С. Теньков, К. Н. Белослудцев // VI Съезд биофизиков России. Сборник научных трудов. – Сочи, 2019. – С. 219–220. (0,12/0,08 п.л.).
28. Дубинин, М. В. Особенности функционирования митохондрий при мышечной дистрофии Дюшенна / **М. В. Дубинин**, К. С. Теньков, В. С. Старинец, Е. Ю. Таланов, К. Н. Белослудцев // Биосистемы: организация, поведение, управление. Тезисы докладов 72-й Всероссийской с международным участием школы-конференции молодых ученых. – Нижний Новгород, 2019. – С. 80. (0,08/0,06 п.л.).
29. Дубинин, М. В. Глюкокортикоид дефлазакорт корректирует митохондриальную дисфункцию при мышечной дистрофии Дюшенна / **М. В. Дубинин**, В. С. Старинец, К. С. Теньков, Е. Ю. Таланов, Н. В. Белослудцева, К. Н. Белослудцев // Биосистемы: организация, поведение, управление. Тезисы докладов 73-й Всероссийской с международным участием школы-конференции молодых ученых. – Нижний Новгород, 2020. – С. 66. (0,09/0,07 п.л.).
30. Дубинин, М. В. Митохондриальная дисфункция при мышечной дистрофии Дюшенна и ее терапевтическая коррекция с помощью неиммуносупрессивного агента Debio 025 / **М. В. Дубинин**, В. С. Старинец, А. А. Семенова, Н. В. Белослудцева, К. Н. Белослудцев // Новые подходы к изучению проблем физиологии экстремальных состояний. Материалы X Всероссийской с международным участием школы-конференции по физиологии мышц и мышечной деятельности, посвященной памяти Инесы Бенедиктовны Козловской и приуроченной к году науки и технологий. – Москва, 2021. – С. 96. (0,05/0,04 п.л.).
31. Дубинин, М. В., Алиспоривир корректирует митохондриальную дисфункцию при мышечной дистрофии Дюшенна / **М. В. Дубинин**, В. С. Старинец, К. С.

Теньков, Н. В. Белослудцева, К. Н. Белослудцев // Биосистемы: организация, поведение, управление. Тезисы докладов 74-й Всероссийской с международным участием школы-конференции молодых ученых, посвященной памяти проф. А. П. Веселова. – Нижний Новгород, 2021. – С. 74. (0,08/0,06 п.л.).

32. Дубинин, М. В. Влияние модуляторов калиевого транспорта на функционирование митохондрий скелетных мышц и сердца при дистрофии Дюшенна / **М. В. Дубинин**, Н. В. Белослудцева, А. Д. Игошкина, К. С. Теньков // Актуальные проблемы биомедицины - 2022. Материалы XXVIII Всероссийской конференции молодых учёных с международным участием. – Санкт-Петербург, 2022. – С. 60–61. (0,10/0,08 п.л.).

33. Дубинин, М. В. Активация кальций-зависимого калиевого канала улучшает функцию митохондрий, но не влияет на интенсивность деструктивных процессов в скелетных мышцах при дистрофии Дюшенна / **М. В. Дубинин**, В. С. Старинец, Н. В. Белослудцева, Ю. А. Челядникова, И. Б. Михеева, К. Н. Белослудцев // Motor control 2022. Сборник тезисов IX Российской, с международным участием, конференции по управлению движением, посвященной 95-летию со дня рождения И. Б. Козловской. – Казань, 2022. – С. 54. (0,06/0,04 п.л.).

34. Дубинин, М. В. Роль дисфункции митохондриальных систем транспорта ионов кальция и калия в прогрессировании мышечной дистрофии Дюшенна. Пути коррекции / **М. В. Дубинин**, К. Н. Белослудцев // VII Съезд биофизиков России. Сборник научных трудов. – Краснодар, 2023. – С. 268–269. (0,10/0,08 п.л.).

35. Игошкина, А. Д. Влияние NS1619 на функционирование изолированных митохондрий скелетных мышц мышей / А. Д. Игошкина, Е. И. Хорошавина, **М. В. Дубинин** // Биосистемы: организация, поведение, управление. Тезисы докладов 76-й Всероссийской с международным участием школы-конференции молодых ученых. – Нижний Новгород, 2023. – С. 137. (0,08/0,06 п.л.).

36. Дубинин, М. В. Митохондриальная заместительная терапия мышечной дистрофии Дюшенна: пилотное исследование / **М. В. Дубинин**, А. Д. Игошкина, И. Б. Михеева, А. Е. Степанова, А. А. Семенова, В. А. Шарапов, К. Н. Белослудцев // Сборник тезисов XXIV съезда физиологического общества им. И. П. Павлова. – Санкт-Петербург, 2023. – С. 240. (0,07/0,05 п.л.).

Дубинин Михаил Васильевич

ДИСФУНКЦИЯ МИТОХОНДРИЙ В ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ МОДЕЛИ МЫШЕЧНОЙ ДИСТРОФИИ ДЮШЕННА У МЫШЕЙ: МЕХАНИЗМЫ И ВОЗМОЖНЫЕ ПОДХОДЫ К КОРРЕКЦИИ

Специальность 1.5.22. Клеточная биология (биологические науки)

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Подписано в печать 14.02.2024 г. Формат 60x90/16.
Гарнитура Times New Roman. Бумага офсетная. Печать оперативная.
Усл. печ. л. 2,0. Тираж 110 экз.

Отпечатано с готового оригинал-макета в типографии «11-й ФОРМАТ» 115230,
г. Москва, Варшавское ш., дом 36