

DOI: 10.15825/1995-1191-2026-2-83-93

АНАЛИЗ ОСОБЕННОСТЕЙ НАНОСТРУКТУРЫ МИОЦИТОВ СКЕЛЕТНОЙ МЫШЕЧНОЙ ТКАНИ МЕТОДОМ СКАНИРУЮЩЕЙ ЗОНДОВОЙ НАНОТОМОГРАФИИ

А.Е. Ефимов¹, Т.К. Миленин², Е.И. Подболотова¹, Н.В. Грудинин¹, О.И. Агапова¹, И.И. Агапов¹

¹ ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова» Минздрава России, Москва, Российская Федерация

² ФГАОУ ВО «Московский физико-технический институт (Национальный исследовательский университет)», Москва, Российская Федерация

Цель: провести статистический анализ угловых ориентаций гексагональных решеток миофиламентов в миофибриллах скелетных мышц крысы с использованием технологии сканирующей зондовой нанотомографии. **Материалы и методы.** Для исследования были получены образцы скелетных мышечных тканей здоровых крыс породы Wistar. Препараты мышечных волокон поясничной мышцы крысы были залиты в эпоксидную смолу. Исследование поверхности образцов после среза ультрамикротомом производилось методом сканирующей зондовой нанотомографии. Анализ изображений срезов саркомеров позволяет определить ориентации гексагональных решеток миозиновых миофиламентов. **Результаты.** Разработана методика вычисления угловых ориентаций гексагональных решеток по муаровым структурам на изображениях срезов саркомеров. Статистический анализ полученных изображений показал, что относительные повороты гексагональных решеток не подчиняются нормальному распределению по тесту Колмогорова–Смирнова ($p = 0,3$) и решетки меняют свою ориентацию вдоль миофибрилл случайным образом. **Заключение.** Анализ ориентаций решеток в смежных саркомерах позволил впервые в научной практике получить и статистически проанализировать данные об их взаимных ориентациях на протяжении миофибрилл. По результатам расчетов выявлена низкая степень согласованности ориентаций миозиновых решеток вдоль миофибрилл в скелетных мышцах крысы. Разработанные подходы и алгоритмы могут в дальнейшем быть применены для исследований особенностей наноструктурной организации миоцитов и кардиомиоцитов различных видов.

Ключевые слова: миоциты, миофибриллы, саркомеры, сканирующая зондовая микроскопия, нанотомография.

NANOSTRUCTURAL ORGANIZATION OF SKELETAL MUSCLE MYOCYTES REVEALED BY SCANNING PROBE NANOTOMOGRAPHY

A.E. Efimov¹, T.K. Milenin², E.I. Podbolotova¹, N.V. Grudinin¹, O.I. Agapova¹, I.I. Agapov¹

¹ Shumakov National Medical Research Center of Transplantology and Artificial Organs, Moscow, Russian Federation

² Moscow Institute of Physics and Technology, Moscow, Russian Federation

Objective: to perform a statistical analysis of the angular orientations of hexagonal myofilament lattices in rat skeletal muscle myofibrils using scanning probe nanotomography (SPN). **Materials and methods.** Skeletal muscle tissue samples were obtained from healthy Wistar rats for the study. Specimens of rat lumbar skeletal muscle fibers were embedded in epoxy resin. After sectioning with an ultramicrotome, the specimen surfaces were examined using SPN. Analysis of the resulting images of sarcomere cross-sections enabled the determination

Для корреспонденции: Агапов Игорь Иванович. Адрес: 123182, Москва, ул. Щукинская, д. 1. Тел. (499) 190-66-19. E-mail: igor_agapov@mail.ru

Corresponding author: Igor Agapov. Address: 1, Shchukinskaya str., Moscow, 123182, Russian Federation. Phone: (499) 190-66-19. E-mail: igor_agapov@mail.ru

of the angular orientations of the hexagonal lattices formed by myosin myofilaments. **Results.** A method was developed to calculate the angular orientations of hexagonal lattices based on moiré patterns observed in images of sarcomere cross-sections. Statistical analysis of the obtained images showed that the relative rotations of the hexagonal lattices do not follow a normal distribution according to the Kolmogorov–Smirnov test ($p = 0.3$). The results indicate that the orientations of the lattices vary randomly along the myofibrils. **Conclusion.** Analysis of lattice orientations in adjacent sarcomeres made it possible, for the first time, to obtain and statistically evaluate data on their mutual orientations along myofibrils. The results revealed a low degree of alignment in the orientations of myosin filaments within myofibrils of rat skeletal muscle. The proposed methods and algorithms may be further applied to studies of the nanostructural organization of myocytes and cardiomyocytes in different species.

Keywords: myocytes, myofibrils, sarcomeres, scanning probe microscopy, nanotomography.

ВВЕДЕНИЕ

Структурные особенности и функциональные молекулярные механизмы сократительных клеток поперечно-полосатой мышечной ткани активно изучаются с середины XIX века. Развитие методов микроскопии в 1950 гг. позволило сделать ряд ключевых открытий в этой области и сформулировать модель «скользящих филаментов», согласно которой сокращение миофибрилл происходит за счет скольжения актиновых миофиламентов вдоль миофиламентов миозина в каждом сегменте миофибриллы (саркомере), которые разделены между собой Z-дисками.

Миозиновые и актиновые филаменты в саркомере формируют трехмерную гексагональную решетку, в которой каждый миозиновый филамент окружен 6 актиновыми филаментами [1]. У позвоночных на каждом миозиновом волокне формируются «короны» из трех головок миозина, расположенных под углом 120° друг к другу в плоскости, перпендикулярной волокну. Расстояние между соседними коронами составляет 14,3 нм, причем каждая следующая корона повернута на 40° относительно предыдущей. Таким образом, ориентация головок миозина полностью повторяется с периодом 42,9 нм [2]. Головки миозина связаны с волокном шарнирными участками, которые могут изменять свою пространственную ориентацию при взаимодействии с актином.

В состав актиновых филаментов кроме актина входят также белки тропонин и тропомиозин. Молекулы актина имеют глобулярное строение и, соединяясь вместе, образуют длинные нити. В актиновых филаментах в саркомерах две длинные актиновые нити образуют двойную спираль с полупериодом 35,75 нм в состоянии покоя. В промежутках между цепями актина находятся молекулы тропомиозина, к которым на равных расстояниях друг от друга прикрепляются молекулы тропонина. Тропоминовый комплекс состоит из трех глобулярных субъединиц: тропонин Т, тропонин С и тропонин I. Тропонин Т осуществляет прикрепление тропоминового комплекса к тропомиозину. Тропонин С связывается с ионами кальция. Тропонин I препятствует взаимодействию миозиновых головок с актином. В состоянии покоя тропомиозин и тропонины блокируют

молекулы актина таким образом, что он не может взаимодействовать с миозином [3].

При повышении концентрации ионов Ca^{2+} в области миофиламентов включается взаимодействие актиновых и миозиновых филаментов. Субъединица тропонина С актинового миофиламента, связываясь с ионом Ca^{2+} , подвергается пространственной конформации, что меняет форму тропоминового комплекса. Это приводит к перестройке пространственной конфигурации тропомиозина таким образом, что миозинсвязывающие участки нитей актина становятся доступны для взаимодействия с головками миозина. Головки миозина обладают АТФ-азной активностью, это значит, что при расщеплении молекул АТФ головки могут менять свою конформацию, причем конформационные изменения головки способны вызывать движения в ее шарнирной части, и если головка миозина связана с молекулой актина, то движение головки вызывает движение актинового миофиламента вдоль нити миозина [4].

Многочисленные исследования структуры и молекулярного механизма саркомеров при помощи методов электронной и флуоресцентной микроскопии, рентгеновской дифракции и молекулярной биохимии полностью подтвердили данную модель, а также позволили охарактеризовать роль ряда других структурных белков (α -актинин, титин, небулин, миозинсвязывающий белок С (MyBP-C) и др.) в миофибриллах мышечных клеток и влияние структурных и молекулярных изменений в саркомерах на развитие патологических состояний мышечной ткани, в частности кардиомиопатий различной природы [5–8].

Исследования трехмерной наноструктуры миоцитов при помощи таких современных методов, как рентгеновская нанотомография [9] и сканирующая электронная микроскопия с фокусированным ионным пучком (ФИП/СЭМ) [10], позволили изучить трехмерную организацию и взаимодействие миофибрилл и систем Т-трубочек [11], саркоплазматического ретикулума и митохондрий. В работе [12] технологии трехмерной реконструкции на основе ФИП/СЭМ позволили выявить взаимосвязанность систем митохондрий в мышечных клетках. Подобные исследования демонстрируют мощные возможности

методов 3D-наноимиджинга в раскрытии трехмерных структурных взаимодействий между различными клеточными органеллами и компартментами [13], которые сложно проанализировать с помощью традиционной 2D-электронной микроскопии, ограниченной плоским представлением трехмерной клеточной структуры.

Использование технологии электронной томографии позволило реконструировать трехмерную структуру Z-дисков, соединяющих смежные саркомеры [14–16], охарактеризовать перестройку решеток Z-дисков при сокращении кардиомиоцитов [17], а также восстановить трехмерную молекулярную структуру миозиновых миофиламентов [18, 19]. В работе [20] метод *in situ* криоэлектронной томографии позволил напрямую охарактеризовать взаимодействие решеток актиновых и миозиновых миофиламентов при сокращении неонатальных кардиомиоцитов крысы.

Применение метода рентгеновской микродифракции позволяет изучать степень интегральной упорядоченности ориентаций гексагональных решеток в саркомерах на протяжении миофибриллы. Исследования [21, 22] показывают, что, например, миофибриллы асинхронных летательных мышц ряда насекомых (*Heteroptera*, *Thysanoptera*, *Coleoptera*, *Hymenoptera* и *Diptera*) имеют высокую степень согласованности ориентаций гексагональных решеток в саркомерах, в то время как для некоторых других видов наблюдается меньшая степень согласованности (*Coperia annulata* и *Neogurelca himachala*) или полное отсутствие согласованности ориентаций (*Ctenoplusia albostriata*). При этом показано, что небольшие различия в наноструктурной организации решеток миофиламентов могут соответствовать различной функциональности мышц одного и того же организма [23]. Имеющиеся данные по млекопитающим ограничены и свидетельствуют о наличии некоторой степени согласованности в скелетных мышцах (поясничная мышца кролика) [22]. Однако данные микродифракционных исследований являются интегральными и не могут дать информации об изменениях взаимной ориентации смежных саркомеров на протяжении миофибриллы, а также не отвечают на вопрос об ультраструктурной обусловленности данных изменений. Систематический анализ подобных изменений ориентации решеток миофиламентов на наноструктурном уровне в литературе отсутствует. При этом новейшие исследования наноструктуры кардиомиоцитов млекопитающих в норме и при сердечной недостаточности при помощи методов малоугловой рентгеновской дифракции указывают на то, что изменения ориентаций индивидуальных миофибрилл и миофиламентов могут рассматриваться и в качестве возможных маркеров сердечных патологий [24].

Задача данной работы – изучить важные особенности наномасштабной организации миофиламентов в миоцитах, остающиеся не исследованными систематически на сегодняшний день, выявить особенности и закономерности изменений взаимной ориентации решеток миозиновых волокон в смежных саркомерах на протяжении миофибрилл. Для решения данной задачи мы использовали технологию сканирующей зондовой нанотомографии (СЗНТ), которая дает возможность исследовать наноструктуру решеток миофиламентов в миофибриллах клеток мышечной ткани после среза ультрамикротомом. Следует подчеркнуть, что работа носит характер фундаментального исследования наноструктуры миоцитов скелетной мышечной ткани и посвящена в первую очередь разработке алгоритма анализа получаемых данных с использованием этой биологической модели.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Подготовка образцов мышечной ткани крысы для исследований методами сканирующей зондовой нанотомографии

Мышечные волокна поясничной мышцы были получены от самцов крыс породы Wistar возрастом 1 год (вес особи 250–350 г). Операции с животными осуществлялись под ингаляционным наркозом с применением препарата «Изофлуран» в концентрации 5% по объему. Животные в процессе операции находились на спонтанном дыхании с частотой 75 ± 10 дыхательных циклов в минуту, что соответствовало хирургической стадии наркоза. Затем проводилась эвтаназия животных с применением препарата «Золетил 100» в дозировке 20 мг. Всего в работе было использовано 7 животных. Исследование выполнено в соответствии с принципами, установленными Хельсинкской декларацией Всемирной медицинской ассоциации, и одобрено локальным этическим комитетом ФГБУ «НМИЦ ТИО им. ак. В.И. Шумакова» Минздрава России (Заключение № 231221-1/1д от 23 декабря 2021 г.).

Для получения образцов скелетной мышечной ткани выполнялся разрез скальпелем и забор фрагмента поясничной мышцы (*m. psoas*), полученный образец помещался в кардиоплегический раствор кустодиола (состав на 1000 мл: L-гистидин 27,9289 г, маннитол 5,4651 г, L-гистидина гидрохлорид моногидрат 3,7733 г, натрия хлорид 0,8766 г, магния хлорида гексагидрат 0,8132 г, калия хлорид 0,671 г, L-триптофан 0,4085 г, калия кетоглутарат 0,1842 г, кальция хлорида дигидрат 0,0022 г) при температуре 4 °С, выполнялась отмывка от крови данным раствором. Затем мышцы рассекались на полоски мышечных волокон, в также в кустодиоле зажимались в растянутом состоянии на металлических пластинах

при помощи хирургических зажимов и также в зажимах мышечные волокна фиксировались при помощи 2% раствора глутаральдегида в фосфатном буфере в течение 1 ч при температуре 4 °С.

Далее образцы мышечных волокон были дегидратированы методом проводки по спиртам с увеличивающейся концентрацией по схеме:

- а) раствор этанола 30% – 10 мин;
- б) раствор этанола 50% – 10 мин;
- в) раствор этанола 70% – 10 мин;
- г) раствор этанола 80% – 10 мин;
- д) раствор этанола 96% – 10 мин.

Заливка образцов производилась в акрилатной среде Lowicryl HM20 (Polysciences, Cat. № 15924-1). После дегидратации выполнялось инкубирование образца в смеси Lowicryl : этиловый спирт 95% (1 : 1) в течение 60 мин и в смеси Lowicryl : этиловый спирт 95% (2 : 1) в течение 2 часов при комнатной температуре. Затем образцы в небольшом количестве среды помещали в вакуумный эксикатор на 30 минут с последующим постепенным сбросом давления для удаления остатков этилового спирта. После удаления спирта образцы погружали в заливочную среду и помещали под УФ-лампу 366 нм для полимеризации акрилатной среды в течение 48 часов.

Получение сверхтонких срезов и сканирующая зондовая микроскопия

После полимеризации образцов были выполнены сверхтонкие срезы образцов при помощи ультрамикротомы Leica UC6 (Leica Microsystems GmbH, Австрия) с использованием алмазного ножа Diatome UltraAFM (Diatome Ltd., Швейцария) с шириной кромки 2,0 мм и углом схождения граней 35°, оптимизированного производителем для подготовки поверхностей для измерений методами сканирующей зондовой микроскопии (СЗМ). Срезы толщиной 100 нм выполнялись под заданным углом 15° к направлению мышечных волокон.

Были выполнены СЗМ-измерения поверхностей блоков образцов после срезов, в полуконтактном режиме с использованием кремниевых зондов NSG10 (Tipnano, Эстония) с резонансной частотой 240 кГц и радиусом кривизны острия зонда менее 10 нм. Для измерений были использованы сканирующий зондовый микроскоп Solver P47 (НТ-МДТ, Россия) и приборный комплекс для сканирующей зондовой нанотомографии (СЗНТ) Ntegra Tomo (НТ-МДТ, Россия).

Сделанный алмазным ножом срез препарата не является идеально гладким, на поверхности образца после среза детектируется соответствующий молекулярным структурам мышечного волокна наномасштабный рельеф, возникающий за счет релаксации внутренних напряжений и неоднородностей залитого образца [25], поэтому режим сканирования

топографии среза является информативным. Управление микроскопом и получение изображений сканов осуществлялось при помощи программы Nova (НТ-МДТ, Россия). После окончания сканирования одного участка для сканирования другого участка зонд сдвигался вдоль срезов миофибрилл с наложением краев участков друг на друга для возможности совмещения сканов в одно изображение.

Математическая обработка результатов

На рис. 1, а, изображена модель идеальной гексагональной решетки саркомера, состоящей из миозиновых филаментов в виде вытянутых в одном направлении цилиндров. Одна из возможных плоскостей среза гексагональной решетки выделена желтым цветом. В данном случае она совпадает с плоскостью решетки, определяемой как плоскость, параллельная горизонтальным рядам филаментов гексагональной решетки. Оси среза X и Y лежат на плоскости среза. Ось Y направлена перпендикулярно филаментам, а ось X – перпендикулярно оси Y.

На рис. 1, б, гексагональная решетка повернута относительно плоскости среза. Плоскость решетки выделена зеленым. Угол между плоскостью решетки и осью Y, обозначенный, как α , определяет ориентацию гексагональной решетки. Этот угол можно определить по муаровому узору, возникающему на изображении среза гексагональной решетки. Угол α не зависит от наклона решетки относительно плоскости среза, определяемого как поворот плоскости решетки вокруг оси Y. Для решения поставленной задачи нами был разработан специализированный

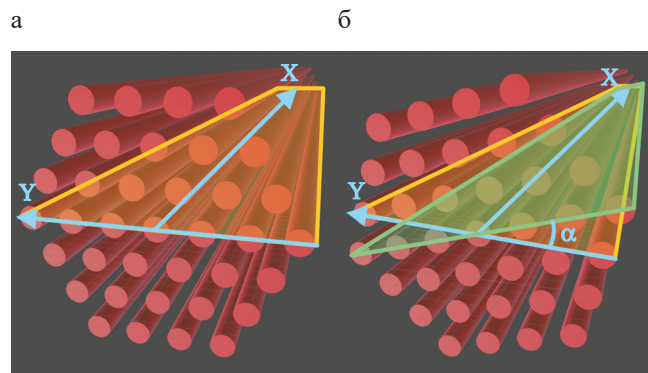


Рис. 1. Модель гексагональной решетки: а – желтым выделена одна из возможных плоскостей среза, совпадающая с плоскостью решетки, голубым выделены оси среза; б – определение угла поворота α , плоскость решетки, повернутая относительно плоскости среза, обозначена зеленым

Fig. 1. Model of a hexagonal lattice: а – one of the possible cross-sectional planes coinciding with the lattice plane is highlighted in yellow, the axes of the cross-sectional plane are highlighted in blue; б – determination of the rotation angle α , the lattice plane rotated relative to the cross-sectional plane is shown in green

алгоритм определения угла α для каждого отдельного саркомера на основе данных СЗНТ.

Получаемые СЗМ-изображения срезов мышечных волокон совмещались в одно изображение в графическом редакторе. По срезам саркомеров на получившемся изображении для каждого саркомера определялся угол α – ориентация гексагональной решетки саркомера относительно плоскости среза. Для определения угла α использовалась полученная нами формула $\text{tg}(\alpha) = \text{tg}(\beta)\text{tg}(\gamma)$. Здесь β – угол наклона оси гексагональной решетки относительно плоскости среза, равный в нашей работе 15° , а γ – угол наклона муаровых полос на срезе саркомера относительно прямой, перпендикулярной оси миофибриллы и параллельной Z-дису анализируемого саркомера, принимаемой нами за ось Y. Угол γ измерялся либо

напрямую, либо при помощи двумерного преобразования Фурье, примененного к муаровым полосам соответствующего саркомера. При прямом измерении углов γ на скане среза каждого анализируемого саркомера проводилась прямая, параллельная муаровым полосам среза гексагональной решетки, и измерялся угол γ , образованный этой прямой с осью Y.

Метод преобразования Фурье использовался в случае, когда прямое измерение угла γ наклона муаровых полос саркомера было затруднено из-за нечеткости скана муарового узора. На скане среза препарата выделялись прямоугольные фрагменты, каждый из которых содержал муаровый узор среза одного саркомера (рис. 2, а). Затем производилось двумерное преобразование Фурье каждого из этих фрагментов (рис. 2, б). Максимум преобразования

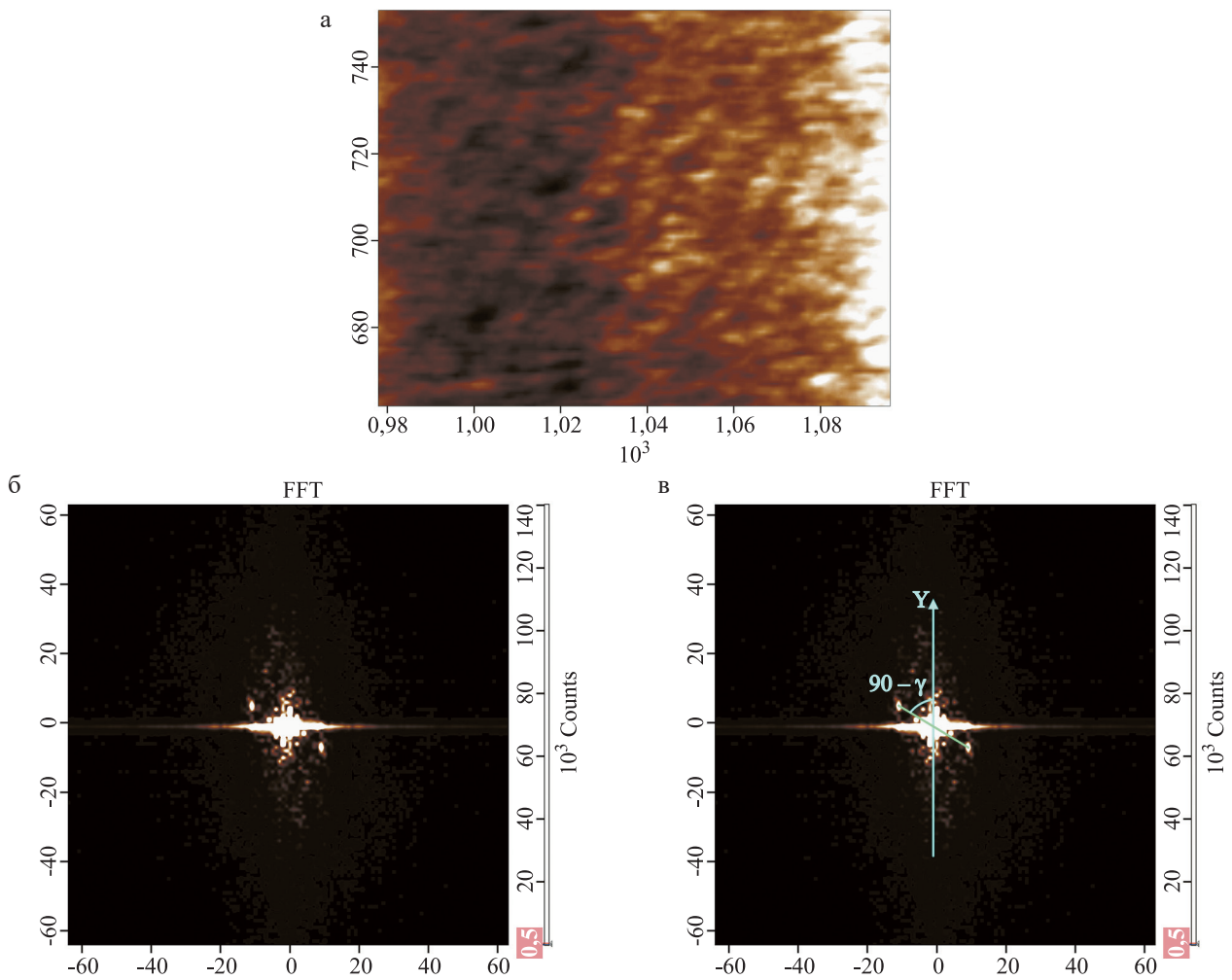


Рис. 2. Определение углов γ с помощью Фурье-преобразования: а – фрагмент скана, содержащий муаровый узор одной гексагональной решетки, по осям отложены номера пикселей; б – двумерное Фурье-преобразование этого фрагмента, по осям отложены номера пикселей, вертикальная шкала сопоставляет значение каждого пикселя Фурье-преобразования с цветом; в – ось Y вместе с прямой, соединяющей максимум Фурье-преобразования и его центр, образуют угол $90^\circ - \gamma$

Fig. 2. Determination of the angle γ using the Fourier transform; а – scan fragment containing the moiré pattern of a single hexagonal lattice; pixel numbers are indicated along the axes; б – two-dimensional Fourier transform of the fragment, pixel numbers are shown along the axes, and the vertical scale maps the value of each pixel of the Fourier transform to a color; в – the Y-axis and the line connecting the Fourier transform maximum with its center form an angle of $90^\circ - \gamma$

Фурье в виде пятна в определенном диапазоне частот давал информацию о муаровом узоре. Расстояние пятна от центра Фурье-преобразования определяло период муаровых полос, в данной работе этот параметр не использовался. Угол между прямой, соединяющей центр Фурье-преобразования и центр его максимума, и осью Y, равен $90^\circ - \gamma$ (рис. 2, в). Этот угол выделялся и измерялся на Фурье-преобразовании муара саркомера с помощью встроенной функции измерения углов в программе Nova. Суммарная погрешность определения угла поворота решетки α приведенными методами оценивается на уровне $\pm 3^\circ$.

Статистическая обработка данных

Для проверки статистических гипотез использовался тест Колмогорова–Смирнова. Статистическая обработка результатов выполнялась с использованием функций библиотеки SciPy программной среды Python.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Сканирование среза препарата

Традиционным методом получения изображений молекулярных структур живых организмов является электронная микроскопия, как трансмиссионная (ТЭМ), так и сканирующая (СЭМ). В частности, с помощью электронной микроскопии и томографии в ряде работ были получены и проанализированы

изображения и трехмерные реконструкции структуры миофибрилл [14–20, 26]. Используемые нами методы СЗНТ, объединяющие сканирующую зондовую микроскопию и ультрамикротомию, позволяют также определять трехмерный нанорельеф поверхности, ее механические свойства, а также такие трехмерные характеристики, как нанопористость биологических материалов [27], топологические и морфологические параметры клеточно-инженерных конструкций и внутриклеточных структур [25, 28, 29].

В данной работе получены СЗМ-изображения срезов препаратов мышечного волокна скелетной мышцы крысы, дающие богатую информацию о строении миофибрилл. При помощи ультрамикротомы были выполнены срезы препарата под углом 15° к оси мышечного волокна, залитого в ловикрил, и получены СЗМ-изображения гексагональных решеток саркомеров под этим же углом, обозначаемым нами как угол β . Фрагмент скана поверхности препарата представлен на рис. 3, а. Цвет пикселей определяется высотой рельефа в соответствии с приведенной шкалой. Миофибриллы и их срезы вытянуты слева направо, видны чередующиеся ряды I-зон (светлые полосы) и A-зон (темные полосы), перпендикулярные направленности миофибрилл. На рис. 3, б выделены срезы отдельных миофибрилл, A-зоны и Z-диски. На срезе каждого саркомера обозначен угол γ (см. раздел «Определение ориентации гексагональной решетки»).

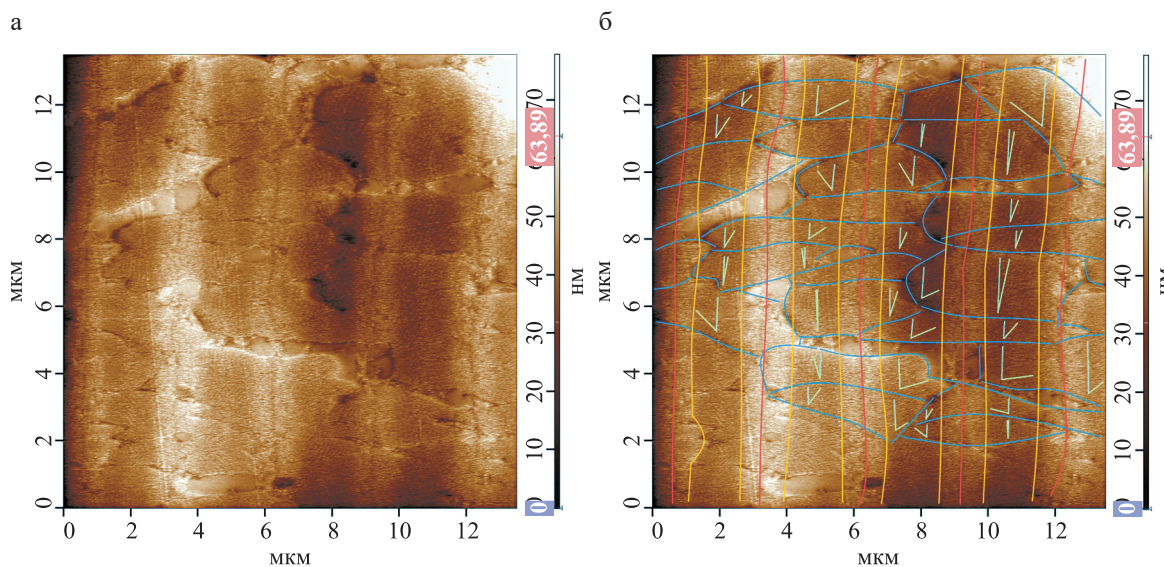


Рис. 3. Фрагмент скана среза препарата скелетной мышцы крысы в ловикриле: а – скан без разметки, по осям отложены микрометры, вертикальная шкала сопоставляет цвет каждого пикселя с высотой рельефа среза на этом пикселе; б – разметка фрагмента скана, синим контуром выделены срезы отдельных миофибрилл, голубые и зеленые линии на срезах саркомеров вместе образуют угол γ , красными контурами выделены середины Z-дисков, желтые контуры разграничивают A-зоны и I-зоны саркомеров

Fig. 3. Scan fragment of a rat skeletal muscle specimen embedded in Lowicryl: а – no annotation, the axes are indicated in micrometers, and the vertical scale represents the height of the section’s surface relief by color coding each pixel; б – annotated scan fragment, blue outlines indicate cross-sections of individual myofibrils, the light blue and green lines on the sarcomere cross-sections form the angle γ , red outlines mark the centers of the Z-discs, while yellow outlines delineate the A-bands and I-bands of the sarcomeres

Определение ориентации гексагональной решетки

На сканах срезов гексагональных решеток саркомеров возникает так называемый муаровый узор (рис. 4, а). Он представляет из себя выпуклые параллельные полосы, направленные под некоторым углом к оси миофибриллы. Сами полосы состоят из параллельно идущих срезов миозиновых филаментов. На рис. 4, б, обозначен угол γ наклона муаровых полос к оси Y, перпендикулярной оси миофибриллы. По нему можно определить интересующий нас угол α ориентации гексагональной решетки саркомера относительно плоскости среза по формуле $\text{tg}(\alpha) = \text{tg}(\beta)\text{tg}(\gamma)$.

Угол α может принимать значения от -30° до 30° , так как ориентация гексагональной решетки повторяется через каждые 60° из-за ее радиальной симметрии. Всего угол α был измерен у 240 саркомеров по всей области сканирования. При этом 51 из 240 (21%) углов α оказался больше 30° по модулю. Такие значения не имеют смысла в рассматриваемой в работе модели гексагональной решетки. Они могут возникать по нескольким причинам. Во-первых, возможно некорректное определение угла наклона муаровой решетки γ , так как большие углы γ , по модулю близкие к 60° и более, имеют наибольшую погрешность определения. Во-вторых, возможно неточное соответствие заданного угла среза β фактическому углу наклона оси данной миофибриллы к плоскости среза, что приводит к систематической погрешности используемого в работе метода вычисления ориентации гексагональной решетки. Данные ошибки могут быть минимизированы путем разработки более сложного

алгоритма вычисления углов поворота решетки α , с измерением дополнительного параметра шага муаровых полос для каждого анализируемого саркомера и решением возникающей системы из двух уравнений. Однако в рассматриваемом случае миофибрилл скелетных мышц отбрасываемые значения углов α не оказывают значимого влияния на статистическое распределение полученных результатов.

На гистограмме (рис. 5) представлено распределение ориентаций гексагональных решеток по распространенности. Из гистограммы исключены значения углов α , больше 30° по модулю. Гистограмма показывает, что у решеток на данной области сканирования нет предпочтительной ориентации.

Анализ поворотов гексагональных решеток

Одной из задач данной работы было проанализировать разности ориентаций (относительные повороты) гексагональных решеток соседних саркомеров одной миофибриллы. Необходимо учитывать, что при срезе мышечных волокон под углом $\beta = 15^\circ$ срезы миофибрилл получаются короткими, проходящими всего через 1–3 саркомера миофибриллы.

На рис. 6, а, представлен скан части среза миофибриллы. На срезах смежных саркомеров этой миофибриллы, разделенных Z-диском, видны муаровые узоры с разными углами наклона, обозначенными как γ_1 и γ_2 (рис. 6, б). Этим углам соответствуют ориентации гексагональных решеток этих саркомеров α_1 и α_2 . Разность $\alpha_2 - \alpha_1 = x$ и является поворотом гексагональных решеток.

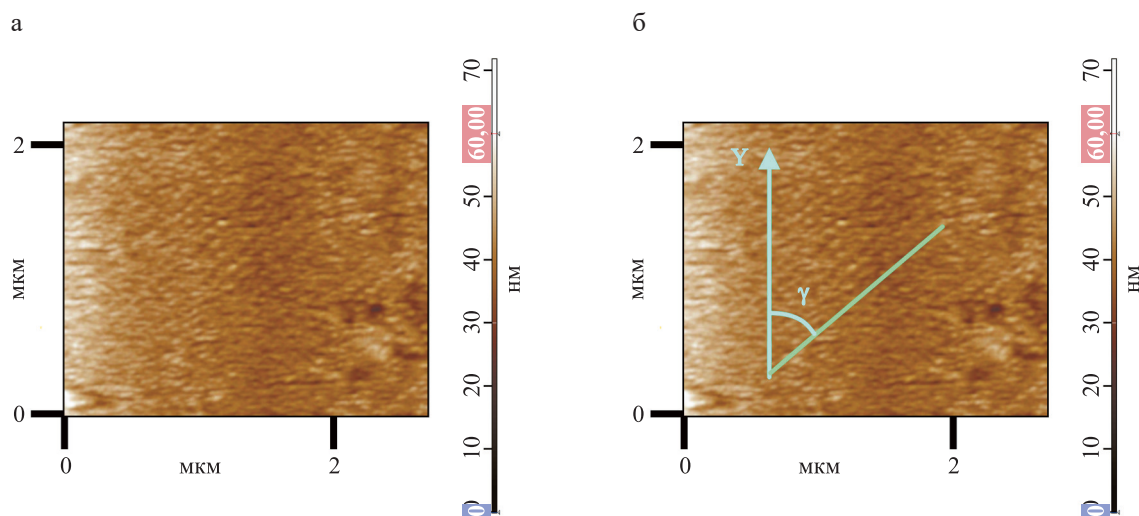


Рис. 4. Скан среза А-зоны саркомера препарата скелетной мышцы: а – отчетливо видны муаровые полосы; б – угол наклона муаровых полос γ , голубым обозначена ось y, зеленая линия проходит параллельно муаровым полосам

Fig. 4. Cross-sectional scan of the A-band of a sarcomere of a skeletal muscle specimen: а – moiré fringes are clearly visible; б – determination of the inclination angle γ of the moiré fringes: the y-axis is shown in blue, and the green line runs parallel to the moiré fringes

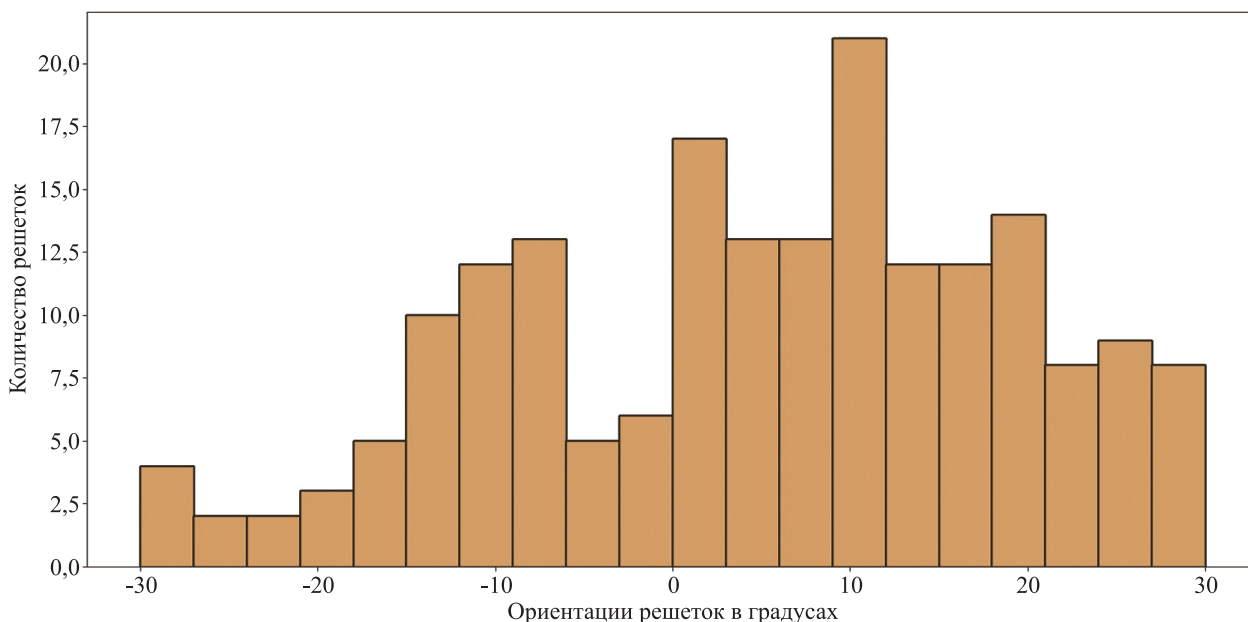


Рис. 5. Гистограмма распределения ориентаций α гексагональных решеток саркомеров со всего скана. По оси абсцисс отложены углы в градусах, а по оси ординат – количество решеток с данной ориентацией. Ширина каждого столбца диаграммы равна диапазону в три градуса. Столбцы, соответствующие не имеющим смысла значениям угла α , по модулю большим 30° , не показаны

Fig. 5. Histogram showing the distribution of α orientations of hexagonal sarcomere lattices across the entire scan. The x-axis represents angles (degrees), and the y-axis indicates the number of lattices with a given orientation. The width of each bar corresponds to a 3° interval. Bars representing non-informative values of α greater than $\pm 30^\circ$ are not shown

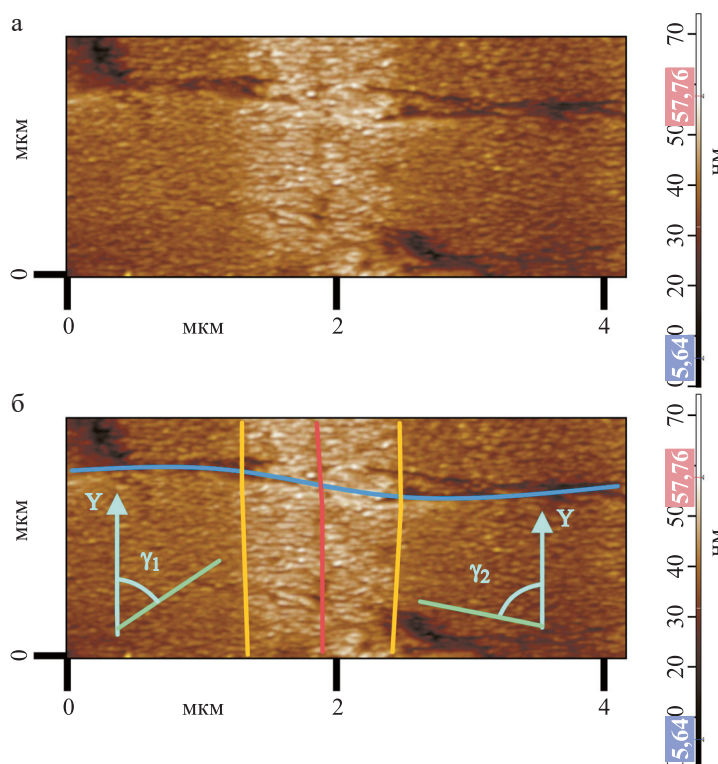


Рис. 6. Скан части среза миофибриллы препарата скелетной мышцы: а – скан без разметки; б – гексагональные решетки двух соседних саркомеров этой миофибриллы имеют разные ориентации, на что указывают разные углы наклона муаровых полос двух этих саркомеров, обозначенные, как γ_1 и γ_2

Fig. 6. A scan of a section of a myofibril cross section of a skeletal muscle specimen: а – no annotation; б – the hexagonal lattices of the two adjacent sarcomeres within this myofibril have different orientations, as indicated by the differing inclination angles of the moiré fringes of these two sarcomeres, denoted as γ_1 and γ_2

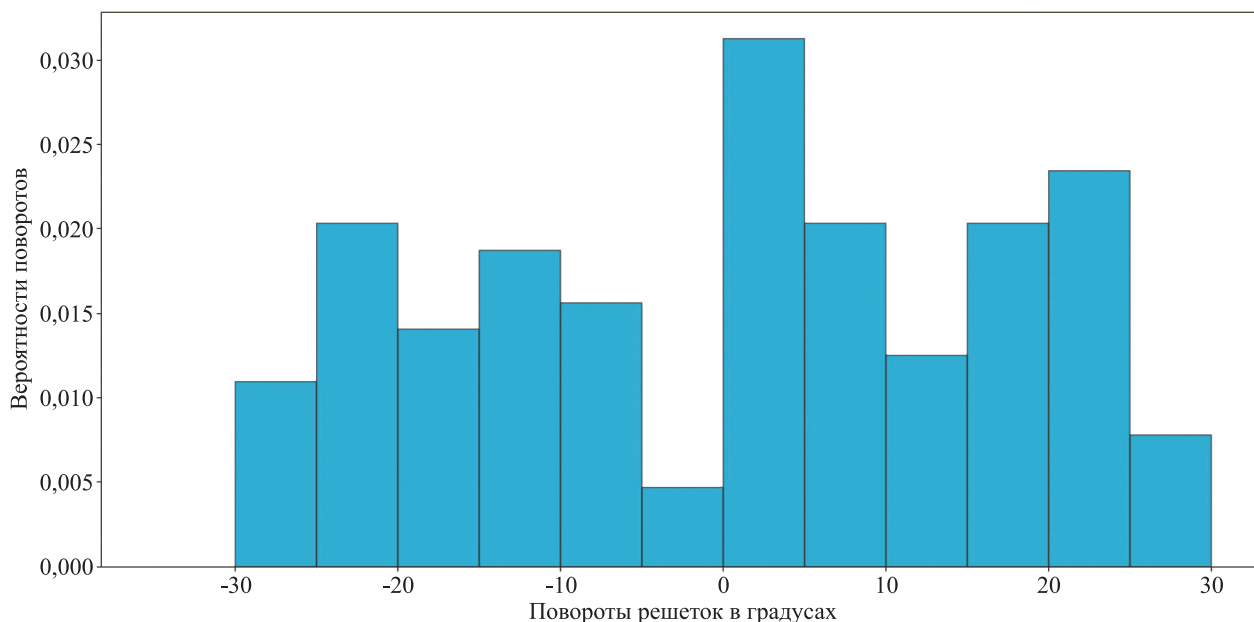


Рис. 7. Гистограмма распределения углов поворота гексагональных решеток вдоль миофибрилл. По оси абсцисс отложены повороты в градусах, а по оси ординат – вероятность такого поворота. Ширина каждого столбца диаграммы равна диапазону в пять градусов

Fig. 7. Histogram showing the distribution of rotation angles of hexagonal lattices along myofibrils. The x-axis represents rotations (degrees), and the y-axis indicates the probability of a given rotation. The width of each bar in the histogram corresponds to a 5° interval

При этом из-за симметрии гексагональной решетки ее повороты на x° и на $(60 - |x|)^\circ$ в противоположную сторону представляют из себя одно и то же. Поэтому для удобства, если поворот x был больше 30° по модулю, ему присваивалось значение $(60 - |x|)^\circ$ с противоположным знаком, меньшее 30° по модулю. Таким образом, повороты могли принимать значения $-30^\circ \leq x \leq 30^\circ$.

В работе были вычислены разности ориентаций двух соседних гексагональных решеток для 112 срезов миофибрилл по всей области сканирования, содержащих срезы 2 или 3 саркомеров, поэтому было получено более 112 поворотов. На гистограмме (рис. 7) представлено распределение поворотов гексагональных решеток по вероятности встретить такой поворот в обработанных нами данных. Углом α , большим 30° по модулю, присваивалось значение 30° или -30° , в зависимости от их знака, после чего они использовались в вычислении поворотов. Повороты решеток не подчиняются нормальному распределению по тесту Колмогорова–Смирнова ($p = 0,3$). Гистограмма показывает, что гексагональные решетки на данной области сканирования меняют свою ориентацию вдоль миофибрилл случайным образом.

ОБСУЖДЕНИЕ

Существующие модели ультраструктурной организации саркомеров не описывают возможных механизмов изменений взаимной ориентации гексаго-

нальных решеток в саркомерах, а также каких-либо закономерностей подобных изменений. Тем не менее исследования, выполненные методом рентгеновской микродифракции [21, 22], показывают, что, например, у насекомых различных отрядов может наблюдаться как высокая, так и низкая степень интегральной согласованности ориентаций гексагональных решеток в саркомерах, вплоть до полного отсутствия подобной согласованности. Однако данный метод позволяет лишь интегрально оценить степень согласованности ориентаций решеток в объеме миофибриллы, которая может включать в себя несколько сотен саркомеров.

Таким образом, вопрос об анализе относительных углов поворота решеток миофиламентов в последовательных саркомерах на протяжении миофибриллы, а также соответствующих ультраструктурных особенностей систем миофиламентов на сегодняшний день остается открытым. В частности, это касается и мышечных тканей млекопитающих, для которых интегрально регистрируется промежуточная степень взаимной согласованности (поясничная мышца кролика) [22]. Это согласуется с полученными нами данными о низкой степени упорядоченности ориентаций гексагональных решеток вдоль миофибрилл в скелетных мышцах крысы.

Для решения поставленной задачи с использованием сканирующей зондовой микроскопии (СЗМ) был проведен анализ СЗМ-изображений поверхности

продольных срезов миофибрилл в клетках мышечной ткани после среза ультрамикротомом и разработан алгоритм вычисления угловой ориентации гексагональных актин-миозиновых решеток по муаровым структурам на изображениях срезов саркомеров. Данный алгоритм универсален и применим для анализа миофибрилл любых мышечных тканей.

Известно, что миофиламенты образуют гексагональную решетку в А-зонах саркомеров миофибрилл. В I-зонах актиновые филаменты образуют тетрагональную решетку, которая зафиксирована Z-диском, разграничивающим смежные саркомеры в миофибрилле. При этом современные модели структуры Z-дисков, с высокой точностью подтверждаемые рядом ультраструктурных исследований [14–17], показывают, что ориентации тетрагональных решеток актиновых миофиламентов смежных саркомеров согласованы между собой структурой общего Z-диска. Однако остается открытым вопрос о согласованности ориентаций тетрагональных решеток соседних Z-дисков вдоль одной миофибриллы. В исследуемом в работе образце поперечно-полосатой мышцы Z-диски смежных миофибрилл выстраивались в ряды, перпендикулярные миофибриллам, поэтому представляется целесообразным дальнейшая разработка алгоритмов для исследования закономерностей ориентаций тетрагональных решеток в этих рядах. Также можно исследовать наличие зависимостей ориентаций гексагональных решеток миофиламентов и ориентаций смежных им тетрагональных решеток актиновых филаментов.

Разработанные методы и алгоритмы могут быть применены для анализа не только скелетных, но и сердечных мышечных клеток – кардиомиоцитов, в том числе и с контролируемыми патологическими изменениями. Известно, что белковый состав сократительного аппарата у кардиомиоцитов и миоцитов скелетной мускулатуры заметно отличается. В частности, у человека примерами белков семейств миозина и актина, экспрессирующихся преимущественно в сердечной мышце, являются MYH6, MYL4, MYL7 и ACTC1. Другое семейство, связанное с мышечным сокращением белков, – это тропонины, регулирующие связывание миозина с актином посредством конформационных различий, зависящих от концентрации ионов кальция в клетках. Два представителя семейства тропонинов, экспрессирующихся исключительно в сердце, – это TNNI3 и TNNT2. Другие примеры включают миозин-связывающий белок MYBPC3, влияющий на сокращение посредством образования поперечных мостиков в саркомере, и белок кальциевого канала SACNA1C, регулирующий сокращение посредством входа ионов кальция в возбудимые клетки [30]. Также в ткани миокарда присутствуют вставочные диски, которые соединяют кардиомиоциты и обеспечивают механическую и

электрическую связь между ними. При этом миофибриллы в кардиомиоцитах даже в пределах одной клетки имеют заметно больший угловой разброс направлений, чем в миоцитах скелетных мышц. Таким образом, нельзя исключать, что и аспекты наноструктурной организации миофиламентов, рассмотренные в данной работе, могут отличаться у кардиомиоцитов, что представляет интерес для дальнейших исследований.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Анализ ориентаций решеток миофиламентов в смежных саркомерах с использованием технологии сканирующей зондовой нанотомографии позволил впервые в научной практике получить и статистически проанализировать данные о распределении их взаимных угловых поворотов. По результатам расчетов выявлена низкая степень согласованности ориентаций миозиновых решеток вдоль миофибрилл в скелетных мышцах крысы. Разработанные подходы и алгоритмы могут в дальнейшем быть применены для исследований особенностей наноструктуры мышечных клеток различных видов.

Исследование выполнено при поддержке Российского научного фонда (проект № 24-24-20113, <https://rscf.ru/project/24-24-20113/>).

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

The authors declare no conflict of interest.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Luther PK, Squire JM. Three-dimensional structure of the vertebrate muscle A-band: II. The myosin filament superlattice. *J Mol Biol.* 1980; 141 (4): 409–439. doi: 10.1016/0022-2836(80)90254-5.
2. Al-Khayat HA, Morris EP, Kensler RW, Squire JM. 3D structure of relaxed fish muscle myosin filaments by single particle analysis. *J Struct Biol.* 2006; 155 (2): 202–217. doi: 10.1016/j.jsb.2006.01.014.
3. Bordas J, Svensson A, Rothery M, Lowy J, Diakun GP, Boesecke P. Extensibility and symmetry of actin filaments in contracting muscles. *Biophys J.* 1999; 77 (6): 3197–3207. doi: 10.1016/S0006-3495(99)77150-X.
4. Squire J. Special Issue: The actin-myosin interaction in muscle: background and overview. *Int J Mol Sci.* 2019; 20 (22): 5715. doi: 10.3390/ijms20225715.
5. Henderson CA, Gomez CG, Novak SM, Mi-Mi L, Gregorio CC. Overview of the muscle cytoskeleton. *Compr Physiol.* 2017; 7 (3): 891–944. doi: 10.1002/cphy.c160033.
6. Mukund K, Subramaniam S. Skeletal muscle: a review of molecular structure and function, in health and disease. *WIREs Syst Biol Med.* 2020; 12 (1): e1462. doi: 10.1002/wsbm.1462.

7. Harris SP. Making waves: A proposed new role for myosin-binding protein C in regulating oscillatory contractions in vertebrate striated muscle. *J Gen Physiol.* 2021; 153 (3): e202012729. doi: 10.1085/jgp.202012729.
8. Mun JY, Gulick J, Robbins J, Woodhead J, Lehman W, Craig R. Electron microscopy and 3D reconstruction of F-actin decorated with cardiac myosin-binding protein C (cMyBP-C). *J Mol Biol.* 2011; 410 (2): 214–225. doi: 10.1016/j.jmb.2011.05.010.
9. Müller WG, Heymann JB, Nagashima K, Guttman P, Werner S, Rehbein S et al. Towards an atlas of mammalian cell ultrastructure by cryo soft X-ray tomography. *J Struct Biol.* 2012; 177 (2): 179–192. doi: 10.1016/j.jsb.2011.11.025.
10. Narayan K, Subramaniam S. Focused ion beams in biology. *Nature Methods.* 2015; 12 (11): 1021–1031. doi: 10.1038/nmeth.3623.
11. Sulkin MS, Yang F, Holzem KM, Van Leer B, Bugge C, Laughner JJ et al. Nanoscale three-dimensional imaging of the human myocyte. *J Struct Biol.* 2014; 188 (1): 55–60. doi: 10.1016/j.jsb.2014.08.005.
12. Glancy B, Hartnell LM, Malide D, Yu ZX, Combs CA, Connelly PS et al. Mitochondrial reticulum for cellular energy distribution in muscle. *Nature.* 2015; 523 (7562): 617–620. doi: 10.1038/nature14614.
13. Dahl R, Larsen S, Dohlmann TL, Qvortrup K, Helge JW, Dela F et al. Three-dimensional reconstruction of the human skeletal muscle mitochondrial network as a tool to assess mitochondrial content and structural organization. *Acta Physiol (Oxf).* 2015; 213 (1): 145–155. doi: 10.1111/apha.12289.
14. Luther PK. The vertebrate muscle Z-disc: sarcomere anchor for structure and signalling. *J Muscle Res Cell Motil.* 2009; 30 (5–6): 171–185. doi: 10.1007/s10974-009-9189-6.
15. Burgoyne T, Heumann JM, Morris EP, Knupp C, Liu J, Reedy MK et al. Three-dimensional structure of the basketweave Z-band in midshipman fish sonic muscle. *PNAS.* 2019; 116 (31): 15534–15539. doi: 10.1073/pnas.1902235116.
16. Rusu M, Hu Z, Taylor KA, Trinick J. Structure of isolated Z-disks from honeybee flight muscle. *J Muscle Res Cell Motil.* 2017; 38 (2): 241–250. doi: 10.1007/s10974-017-9477-5.
17. Oda T, Yanagisawa H. Cryo-electron tomography of cardiac myofibrils reveals a 3D lattice spring within the Z-discs. *Commun Biol.* 2020; 3 (1): 585. doi: 10.1038/s42003-020-01321-5.
18. Zoghbi ME, Woodhead JL, Moss RL, Craig R. Three-dimensional structure of vertebrate cardiac muscle myosin filaments. *PNAS.* 2008; 105 (7): 2386–2390. doi: 10.1073/pnas.0708912105.
19. Al-Khayat HA, Morris EP, Kensler RW, Squire JM. Myosin filament 3D structure in mammalian cardiac muscle. *J Struct Biol.* 2008; 163 (2): 117–126. doi: 10.1016/j.jsb.2008.03.011.
20. Burbaum L, Schneider J, Scholze S, Böttcher RT, Baummeister W, Schwille P et al. Molecular-scale visualization of sarcomere contraction within native cardiomyocytes. *Nat Commun.* 2021; 12 (1): 4086. doi: 10.1038/s41467-021-24049-0.
21. Iwamoto H, Nishikawa Y, Wakayama J, Fujisawa T. Direct X-ray observation of a single hexagonal myofibril lattice in native myofibrils of striated muscle. *Biophys J.* 2002; 83 (2): 1074–1081. doi: 10.1016/S0006-3495(02)75231-4.
22. Iwamoto H, Inoue K, Yagi N. Evolution of long-range myofibrillar crystallinity in insect flight muscle as examined by X-ray cryomicrodiffraction. *Proc R Soc B.* 2006; 273 (1587): 677–685. doi: 10.1098/rspb.2005.3389.
23. Tune TC, Ma W, Irving T, Sponberg S. Nanometer-scale structure differences in the myofilament lattice spacing of two cockroach leg muscles correspond to their different functions. *Journal of Experimental Biology.* 2020; 223 (Pt 9): jeb212829. doi: 10.1242/jeb.212829.
24. Ma W, Gong H, Jani V, Lee KH, Landim-Vieira M, Papadaki M et al. Myofibril orientation as a metric for characterizing heart disease. *Biophys J.* 2022; 121 (4): 565–574. doi: 10.1016/j.bpj.2022.01.009.
25. Matsko N, Mueller M. AFM of biological material embedded in epoxy resin. *J Struct Biol.* 2004; 146 (3): 334–343. doi: 10.1016/j.jsb.2004.01.010.
26. Traeger L, Mackenzie J, Epstein H, Goldstein M. Transition in the thin-filament arrangement in rat skeletal muscle. *J Muscle Res Cell Motil.* 1983; 4 (3): 353–366. doi: 10.1007/BF00712001.
27. Efimov AE, Moisenovich MM, Bogush VG, Agapov II. 3D nanostructural analysis of silk fibroin and recombinant spider silk scaffolds by scanning probe nanotomography. *RSC Adv.* 2014; 4: 60943–60947. doi: 10.1039/c4ra08341e.
28. Efimov AE, Agapova OI, Safonova LA, Bobrova MM, Parfenov VA, Koudan EV et al. 3D scanning probe nanotomography of tissue spheroid fibroblasts interacting with electrospun polyurethane scaffold. *Express Polymer Letters.* 2019; 13 (7): 632–641. doi: 10.3144/expresspolymlett.2019.53.
29. Balashov V, Efimov A, Agapova O, Pogorelov A, Agapov I, Agladze K. High resolution 3D microscopy study of cardiomyocytes on polymer scaffold nanofibers reveals formation of unusual sheathed structure. *Acta Biomaterialia.* 2018; 68: 214–222. doi: 10.1016/j.actbio.2017.12.031.
30. Lindskog C, Linné J, Fagerberg L, Hallström BM, Sundberg CJ, Lindholm M et al. The human cardiac and skeletal muscle proteomes defined by transcriptomics and antibody-based profiling. *BMC Genomics.* 2015; 16 (1): 475. doi: 10.1186/s12864-015-1686-y.

Статья поступила в редакцию 3.10.2025 г.
The article was submitted to the journal on 3.10.2025