

СЕЗОННЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ИЗОФОРМНОГО СОСТАВА ГИГАНТСКИХ БЕЛКОВ ТОЛСТЫХ И ТОНКИХ НИТЕЙ И СТЕПЕНИ ФОСФОРИЛИРОВАНИЯ ТАЙТИНА (КОННЕКТИНА) В ПОПЕРЕЧНО-ПОЛОСАТЫХ МЫШЦАХ МЕДВЕДЕЙ (*Ursidae*, *Mammalia*)

© 2015 Н.Н. Салмов¹, И.М. Вихлянцев^{1*}, А.Д. Уланова^{1,2},
Ю.В. Грицына¹, А.Г. Бобылев¹, А.П. Савельев³,
В.В. Макарющенко³, Г.Ю. Максудов⁴,
З.А. Подлубная^{1,2}

¹ Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН,
142290 Пущино Московской области, ул. Институтская, 3;
факс: +7(4967)33-0553, электронная почта: vikhlyantsev@iteb.ru

² Пущинский государственный естественно-научный институт,
142290 Пущино Московской области, пр. Науки, 3; факс: +7(4967)73-2711

³ Всероссийский научно-исследовательский институт охотничьего
хозяйства и звероводства им. профессора Б.М. Житкова,
610000 Киров, ул. Преображенская, 79; факс: +7(8332)38-1130

⁴ Московский зоопарк, 123242 Москва, ул. Б. Грузинская, 1;
факс: +7(495)605-1717

Поступила в редакцию 25.09.14

После доработки 01.12.14

Исследованы сезонные изменения изоформного состава белков толстых и тонких нитей (тайтина, тяжелых цепей миозина (ТЦМ), небулина), а также уровня фосфорилирования тайтина в поперечно-полосатых мышцах бурого медведя (*Ursus arctos*) и гибернарующего гималайского медведя (*Ursus thibetanus ussuricus*). Обнаружено снижение в 2,1–3,4 раза содержания Т2-фрагментов тайтина при отсутствии изменений в содержании небулина и изоформ интактного тайтина-1 (Т1) в скелетных мышцах (*m. gastrocnemius*, *m. longissimus dorsi*, *m. biceps*) медведей во время зимнего сна. В левом желудочке сердца гибернарующих медведей обнаружено увеличение содержания более жесткой N2B-изоформы тайтина по отношению к содержанию его более эластичной N2BA-изоформы. В миокарде бурого медведя в период зимнего сна наблюдалось уменьшение в ~1,6 раза содержания Т2-фрагментов при отсутствии снижения общего содержания изоформ Т1. Обнаружено незначительное увеличение уровня фосфорилирования тайтина в сердечной мышце гибернарующего бурого медведя. В скелетных мышцах бурого медведя не выявлено сезонных различий уровня фосфорилирования тайтина. Однако в них обнаружены изменения изоформного состава ТЦМ, направленные на увеличение доли медленной (I) и уменьшение доли быстрой (IIa) изоформ этого белка в период зимнего сна. Содержание изоформ ТЦМ I и IIa в скелетных мышцах гибернарующего гималайского медведя соответствовало таковому в скелетных мышцах гибернарующего бурого медведя.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: зимний сон, бурый медведь, гималайский медведь, поперечно-полосатые мышцы, толстые (миозиновые) нити, тонкие (актиновые) нити, тайтин, небулин, изоформы тяжелых цепей миозина, Pro-Q Diamond.

Зимняя спячка (гибернация) – эволюционно закрепленная способность некоторых млекопитающих к временному снижению метаболиз-

ма с целью выживания в условиях низких температур и малодоступности пищи [1]. Некоторые виды семейства Медвежьих (*Ursidae*), обитающие в областях с суровыми зимами, проводят самую холодную часть года, погрузившись в глубокий зимний сон в берлоге. В отличие от истинных гибернантов (сусликов, сурков, хомяков, ежей), температура тела которых во время оцепенения может снижаться до 0° и ниже [1–3], температура тела у медведей в период

Принятые сокращения: АТРаза – аденозинтрифосфатаза, ЛЖ – левый желудочек сердца, ТЦМ – тяжелые цепи миозина, Т2 – протеолитический фрагмент интактного тайтина-1 (Т1), ЧСС – частота сердечных сокращений, ПААГ – полиакриламидный гель.

* Адресат для корреспонденции.

зимнего сна снижается лишь на 5–7°, и они легко переходят в активное состояние. Однако скорость метаболических процессов во время зимнего сна у них снижается в несколько раз [4], и изменения обмена веществ сходны с таковыми у истинных гибернантов. Во время зимнего сна, который может длиться до 5–7 мес., медведи не едят и не пьют, а также не совершают акты дефекации и мочеиспускания [5]. Одной из интересных физиологических особенностей медведей, пребывающих в состоянии зимнего сна, является отсутствие выраженных атрофических изменений в скелетных мышцах и значительного снижения их максимальной силы после пробуждения животного [6–9]. Уникальной пластичностью обладает сердечная мышца медведей. В частности, длительный период сниженной активности миокарда в период зимнего сна (например, у гризли (*Ursus arctos horribilis*) частота сердечных сокращений (ЧСС) снижается с 84 до 19 уд/мин) не приводит к развитию сердечной недостаточности или дилатации камер сердца [10, 11]. Механизмы, ответственные за поддержание мышечной массы медведей во время зимнего сна, а также уникальную пластичность их сердечной мышцы в этот период, до конца не ясны.

В данной работе проведено исследование сезонных изменений изоформного состава белков толстых (тайтин, тяжелые цепи миозина) и тонких (небулин) нитей, а также уровня фосфорилирования тайтина в поперечно-полосатых мышцах бурого медведя (*Ursus arctos*) с целью выявления роли этих изменений в адаптации мышц к условиям зимнего сна. Аналогичные исследования проведены на поперечно-полосатых мышцах самца гималайского медведя (*Ursus thibetanus ussuricus*), находящегося в состоянии зимнего сна.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе были использованы поперечно-полосатые мышцы следующих медведей: 1) миокард левого желудочка сердца и скелетные мышцы (*m. longissimus dorsi*, *m. biceps*) взрослого самца гималайского медведя, добытого на берлоге 28 января 2013 г. в Облученском районе Еврейской автономной области в верховьях реки Дитур, 90 км западнее г. Биробиджан; 2) миокард левого желудочка сердца и скелетные мышцы (*m. longissimus dorsi*, *m. gastrocnemius*) взрослой самки бурого медведя, добытой 24 марта 2013 г. на берлоге в Юкаменском районе Удмуртской республики; 3) миокард левого желудочка сердца и *m. gastrocnemius* 6-летней самки бурого медведя, пребывавшей в активном состо-

янии и вынужденно застреленной 20 апреля 2013 г. на биостанции ВНИИОЗ, г. Киров; 4) миокард левого желудочка сердца и скелетные мышцы (*m. gastrocnemius*, *m. longissimus dorsi*) взрослого самца активного бурого медведя, добытого 9 сентября 2013 г. в окрестностях д. Катни в Котельничском районе Кировской области. Все животные были добыты легально на основании специальных разрешений, выданных региональными Управлениями по охране и использованию объектов животного мира.

Для электрофоретического разделения изоформ интактного тайтина-1 (N2B, N2BA, N2A, NT) и небулина использовали крупнопористый 2,1–2,2%-ный ПААГ в присутствии Ds-Na с содержанием агарозы 0,5–0,6%, приготовленный по методу Татсуми–Хаттори [12] с нашими модификациями [13]. Подготовку электрофоретических проб проводили по методу, исключающему их нагревание выше 40° [14], с целью предотвращения разрушения тайтина под действием более высоких температур. Для электрофоретического разделения изоформ тяжелых цепей миозина (ТЦМ) использовали 7%-ный ПААГ в присутствии Ds-Na, приготовленный по методу Тикунова с соавт. [15]. Электрофорез проводили в аппаратах с вертикальным расположением геля (ООО «Хеликон», Россия), размер пластинки геля 8 × 10 см, толщина геля 1 мм. Гели, окрашенные Coomassie Brilliant Blue G-250 и R-250, смешанными в пропорции 1 : 1, сканировали, а затем проводили денситометрическую обработку сканов с помощью компьютерной программы Total Lab v1.11. Содержание тайтина и небулина оценивали по отношению к содержанию тяжелых цепей миозина (крупнопористые гели, укрепленные агарозой). Содержание изоформ ТЦМ (7%-ный ПААГ) оценивали в процентах от общего содержания миозина.

Уровень фосфорилирования тайтина оценивали с помощью флуоресцентного красителя на фосфатные группы белков Pro-Q Diamond («Invitrogen», США) по методу Борбели с соавт. [16] с незначительными модификациями. После проведения электрофореза гель фиксировали в течение 12–18 ч в растворе, содержащем 50%-ный этанол и 10%-ную уксусную кислоту. После 30 мин отмывки в дистиллированной воде гель окрашивали в течение 1,5 ч красителем на фосфатные группы. Окрашенный гель отмывали в готовом растворе (Pro-Q(R) Diamond Phosphoprotein Gel Destaining Solution, «Invitrogen», США) в течение 1,5 ч. Полосы тайтина, содержавшие фосфатные группы, визуализировали с помощью системы гель-документирования и оценки содержания фосфатных групп в белках (Pharos FX Plus Molecular Image, «Bio-Rad», США). После

этого гели окрашивали Coomassie Brilliant Blue G-250 и R-250, смешанными в пропорции 1 : 1, для контрольной оценки содержания белка.

Для выяснения функциональной роли фосфорилирования тайтина было проведено выделение этого белка из сердечной мышцы бурых медведей с последующим измерением его влияния на актин-активируемую АТФазную активность миозина кролика *in vitro*. Выделение тайтина проводили по методу, описанному в работе Сотериоу с соавт. [17]. Тайтин очищали на колонке размером 1,0 × 60,0 см с Sepharose CL-2B («Sigma», США). Чистоту выделенных препаратов тайтина тестировали с помощью электрофореза в крупнопористом ПААГ, укрепленном агарозой, в присутствии Ds-Na. Выделение актина и миозина из мышц кролика и изучение влияния тайтина на актин-активируемую АТФазную активность миозина *in vitro* проводили по описанным ранее методам [18].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Сезонные изменения изоформного состава тайтина и небулина в скелетных мышцах медведей. Тайтин (титин/коннектин, 2000–3700 кДа) и небулин (600–900 кДа) – гигантские белки саркомерного цитоскелета поперечно-полосатых мышц позвоночных [19]. Тайтин – белок толстых (миозиновых) нитей. Его молекулы длиной более 1 мкм перекрывают половину саркомера от М-линии до Z-диска, формируя третью филаментную систему в миофибриллах. В А-зоне саркомера тайтин связан с миозиновыми нитями (эта часть молекулы получила название Т2). В I-зоне саркомера некоторые участки молекулы тайтина взаимодействуют с тонкими (актиновыми) нитями, однако большая часть его молекулы в этой зоне проходит свободно, формируя эластичное соединение между концами миозиновых нитей и Z-диском (для ссылок см. обзор Вихлянцева и Подлубной [20]). На каждую миозиновую нить в половине саркомера приходится по шесть молекул тайтина, N-концы которых перекрываются в Z-диске, а C-концы – в М-линии саркомера [21]. Тайтин – полифункциональный белок. Он участвует в поддержании высокоупорядоченной саркомерной структуры [22], запуске и регуляции актин-миозинового взаимодействия [20]. Как сенсор растяжения и напряжения (механосенсор) тайтин, связываясь со многими белками в саркомере и объединяя их в единую сеть (filament network, [23]), играет важную роль в процессах внутриклеточной сигнализации и участвует в регуляции экспрессии мышечных генов и белкового обмена в саркомере [23].

Небулин – белок тонких (актиновых) нитей. Функции этого белка заключаются в стабилизации актиновых нитей, регулировании их длины и поддержании структуры Z-диска саркомера [19, 24]. Результаты недавно проведенных исследований позволили сделать предположение об участии небулина в регуляции мышечного сокращения на уровне отдельных поперечных мостиков миозина [24].

Исследования изменений в тайтине и небулине при развитии атрофии скелетных мышц млекопитающих как во время гибернации [20, 25, 26], так и в условиях микрогравитации [25, 27–30] показали, что этот процесс сопровождается снижением содержания гигантских саркомерных белков. Это, в свою очередь, приводит к нарушению саркомерной структуры и ухудшению сократительных свойств мышц, атрофированных в условиях микрогравитации [29, 30]. Однако подобные негативные последствия атрофии не наблюдаются в скелетных мышцах истинных гибернантов (длиннохвостого суслика *Spermophilus undulatus*) [20]. Проведенные нами исследования позволили выявить отличительные особенности атрофических изменений на молекулярном уровне, как в том, так и в другом случаях. В частности, атрофия волокон *m. soleus* человека и крысы в условиях гравитационной разгрузки приводила к снижению содержания небулина и обеих изоформ интактного тайтина-1 (N2A и NT), тогда как в атрофированных скелетных мышцах суслика в период гибернации наблюдалось сохранение содержания небулина и незначительное снижение содержания только N2A-изоформы тайтина [20, 26]. Учитывая эти результаты, а также литературные данные о том, что длительный период неволевого бездействия мышц сопровождается незначительным ухудшением их сократительной способности у медведей [7–9], мы ожидали обнаружить сохранение нормального содержания гигантских цитоскелетных белков в скелетных мышцах медведей во время зимнего сна, что подтвердилось экспериментально. В частности, не выявлено уменьшения содержания небулина, NT- и N2A-изоформ тайтина в *m. gastrocnemius* спящего бурого медведя (рис. 1, а, б). При этом зарегистрировано увеличение (на 4,3%) доли NT-изоформы тайтина в этой мышце (рис. 1, в). Содержание небулина и изоформ тайтина-1 (Т1) в *m. longissimus dorsi* и *m. biceps* гибернирующего гималайского медведя соответствовало таковому для этих белков в *m. gastrocnemius* бурых медведей, находящихся как в состояниях активности, так и зимнего сна (рис. 1 и 2). Принимая во внимание результаты наших электрофоретических исследований (неопубликованные данные) и данные

зарубежных авторов [31], свидетельствующие об одинаковом содержании небулина и Т1 в мышцах разных позвоночных животных и человека в норме, можно утверждать о сохранении нормального содержания гигантских белков в ске-

летных мышцах спящего гималайского медведя (рис. 2). Необходимо отметить, что при этом процентное содержание NT-изоформы тайтина в *m. longissimus dorsi* и *m. biceps* гималайского медведя было выше такового в *m. gastrocnemius*

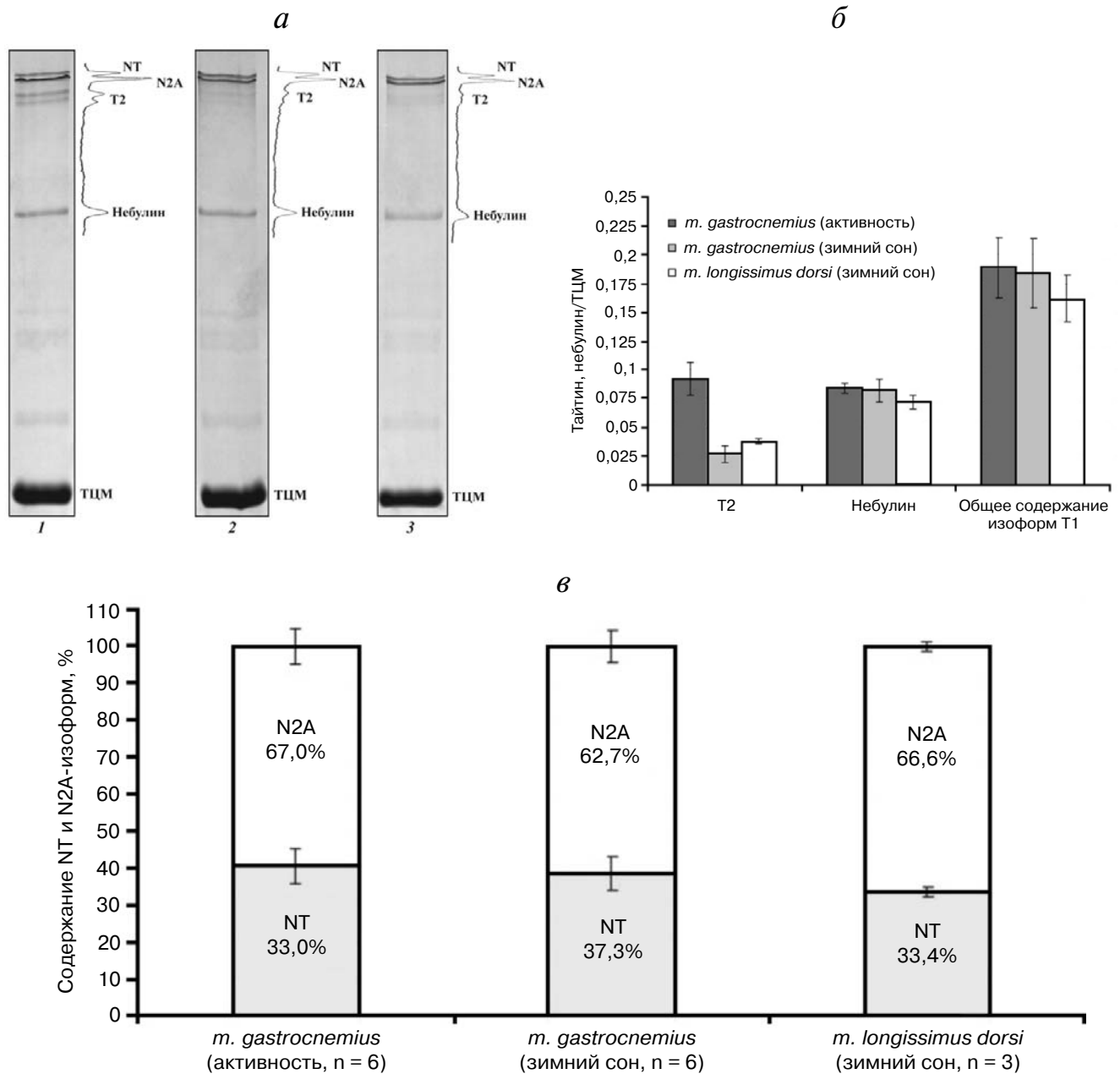


Рис. 1. Сезонные изменения содержания тайтина и небулина в скелетных мышцах бурого медведя. *а* – Электрофореграммы белков: 1 – *m. gastrocnemius* (активность), 2 – *m. gastrocnemius* (зимний сон), 3 – *m. longissimus dorsi* (зимний сон). Указаны полосы изоформ интактного тайтина-1 (NT, N2A), T2-фрагментов тайтина, небулина, тяжелых цепей миозина. Электрофорез проведен в ПААГ, укрепленном агарозой; *б* – содержание тайтина и небулина относительно содержания ТЦМ (данные денситометрии); *в* – сезонные изменения изоформного состава тайтина, % от общего содержания изоформ Т1. n – Количество повторов. Приведены средние значения и их стандартные отклонения. Примечание. В связи с незначительной деградацией тайтина в *m. longissimus dorsi* активного бурого медведя денситометрические данные для этой мышцы не приведены

спящего бурого медведя и составило 38,2 и 40,3% соответственно (рис. 1 и 2). Аналогичные изменения в изоформном составе тайтина, направленные на увеличение доли NT-изоформы этого белка, зарегистрированы нами ранее в скелетных мышцах длиннохвостых сусликов во время гибернации [26]. Эти результаты свиде-

тельствуют об однонаправленности адаптационных изменений на молекулярном уровне в мышцах истинных гибернантов (сусликов) и медведей. Однако у сусликов увеличение доли NT-изоформы тайтина наблюдается осенью в период подготовки к гибернации [26], когда эти животные совершают пробные погружения в

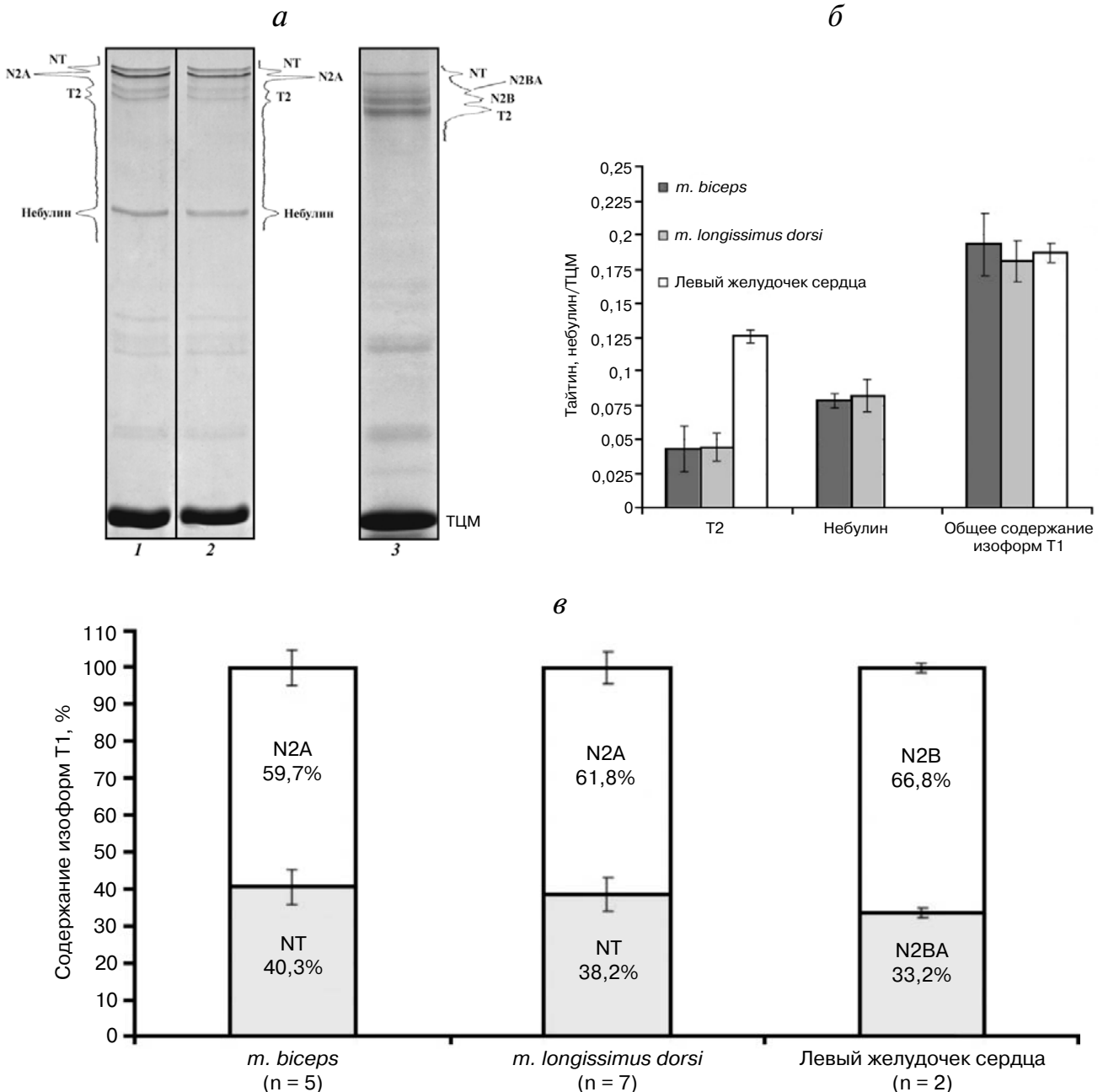


Рис. 2. Содержание тайтина и небулина в поперечно-полосатых мышцах гималайского медведя, находящегося в состоянии зимнего сна. *а* – Электрофореграммы белков: 1 – *m. biceps*, 2 – *m. longissimus dorsi*, 3 – левый желудочек сердца. Указаны полосы изоформ интактного тайтина-1 (NT, N2A, N2BA, N2B), T2-фрагментов тайтина, небулина, тяжелых цепей миозина. Электрофорез проведен в ПААГ, укрепленном агарозой; *б* – содержание тайтина и небулина относительно содержания ТЦМ (данные денситометрии); *в* – содержание изоформ Т1, %. n – Количество повторов. Приведены средние значения и их стандартные отклонения

спячку, снижая температуру тела на несколько градусов. У медведей, как известно, нет пробных погружений, поэтому можно полагать, что изменения изоформного состава тайтина в скелетных мышцах медведей происходят во время зимнего сна. Это предположение находит подтверждение в результатах исследований, свидетельствующих об увеличении экспрессии генов белков, ответственных за белковый биосинтез, в мышцах черного медведя (*Ursus americanus*) во время зимнего сна [32]. В частности, показано, что в скелетных мышцах черного медведя во время сна наблюдается увеличение экспрессии гена белка Rbm3 (RNA binding protein motif 3), который участвует в повышении интенсивности белкового синтеза при слабой гипотермии.

Незначительное снижение содержания небулина и T1 (на ~14% относительно содержания этих белков в *m. gastrocnemius* активного бурого медведя) было обнаружено нами в *m. longissimus dorsi* спящего бурого медведя (рис. 1, б), что, вероятно, является следствием более сильных атрофических изменений и повышенной деградации гигантских белков в этой мышце во время зимнего сна. Однако в отличие от атрофии скелетных мышц млекопитающих в условиях микрогравитации, сопровождающейся значительным уменьшением содержания прежде всего NT-изоформы тайтина [20], в *m. longissimus dorsi* спящего бурого медведя подобные изменения не выявлены (рис. 1, а, в). В частности, процентное содержание NT-изоформы тайтина в этой мышце составило 33,4% и было выше такового в *m. gastrocnemius* активного бурого медведя (33%, рис. 1, в). Учитывая этот факт, а также полученные нами ранее данные о важной роли NT-изоформы тайтина в поддержании структурно-функциональных свойств атрофированных скелетных мышц зимоспящих сусликов [20], можно полагать, что незначительное снижение содержания гигантских белков в *m. longissimus dorsi* спящего бурого медведя не будет приводить к выраженным негативным последствиям. Это предположение находит подтверждение в результатах наших электронно-микроскопических исследований, свидетельствующих о том, что 15%-ное снижение содержания T1 и 40%-ное снижение содержания небулина не сопровождалось нарушениями саркомерной структуры в *m. gastrocnemius* мышцей после 30-суточного космического полета [33].

Таким образом, сохранение нормального содержания гигантских саркомерных белков, по-видимому, является частью адаптационных изменений, направленных на снижение атрофии скелетных мышц медведей во время зимнего сна. Молекулярный механизм, лежащий в осно-

ве сохранения нормального содержания тайтина и небулина в мышцах медведей в период зимнего сна, по всей вероятности, заключается в снижении активности кальпаиновых протеаз, субстратами которых являются молекулы гигантских белков. Это предположение основано на данных, свидетельствующих об увеличении экспрессии кальпаистатина (ингибитора кальпаиновых протеаз) в *m. soleus* даурского суслика (*Spermophilus dauricus*) в период гибернации [34].

В отличие от сохранения содержания изоформ T1, в скелетных мышцах гибернирующих медведей обнаружено значительное снижение (в 2,1–3,4 раза) содержания протеолитических T2-фрагментов этого белка (рис. 1, а, б и рис. 2, а, б). Аналогичные изменения зарегистрированы ранее в скелетных мышцах гибернирующих сусликов [26] и, по-видимому, являются общей адаптационной особенностью зимоспящих животных. Снижение содержания T2-фрагментов, не содержащих растяжимую I-часть молекулы тайтина, не должно иметь негативных последствий для саркомерной структуры и сократительной функции мышц. Однако дальнейшее протеолитическое расщепление этих фрагментов может иметь важное адаптационное значение, заключающееся в поставке глюкогенных аминокислот для процесса глюконеогенеза в период гибернации.

Сезонные изменения изоформного состава тайтина в сердечной мышце медведей. В сердечной мышце млекопитающих присутствуют три основные изоформы тайтина: N2B, N2BA, а также NT, обнаруженная нами в поперечно-полосатых мышцах только этого класса позвоночных [20]. Известно, что N2BA-изоформа тайтина содержит более длинную (и, соответственно, менее жесткую) растяжимую часть молекулы в I-зоне саркомера, чем N2B-изоформа этого белка. Изменение экспрессии гена тайтина и, тем самым, соотношения его более жесткой (N2B) и более эластичной (N2BA) изоформ в сердце в ответ на влияние факторов внешней и внутренней среды (гибернация, микрогравитация, развитие патологических процессов) является частью молекулярного механизма, ответственного за изменение жесткости эластичных нитей и, соответственно, саркомера и мышцы в целом. В разных отделах сердечной мышцы длиннохвостого суслика обнаружено увеличение доли N2BA-изоформы тайтина в период гибернации [26]. В сердечной мышце медведя гризли (*Ursus arctos horribilis*) напротив выявлено увеличение доли короткой, более жесткой N2B-изоформы тайтина в период зимнего сна [10]. Учитывая эти данные, мы ожидали обнаружить подобные изменения в сердечной мышце бурого и гималайско-

го медведей в период спячки. Действительно, при отсутствии снижения общего содержания изоформ Т1 обнаружено увеличение на 4,2% (с 55,5 до 59,7%) доли короткой N2B-изоформы тайтина в левом желудочке сердца бурого медведя в период спячки (рис. 3, а, б). В левом желу-

дочке сердца спящего гималайского медведя содержание N2B-изоформы тайтина было выше и составило 66,8% от общего содержания N2B- и N2BA-изоформ этого белка (рис. 2, а, в). Подобное содержание N2B-изоформы тайтина (70,4%) было зарегистрировано в левом желудочке серд-

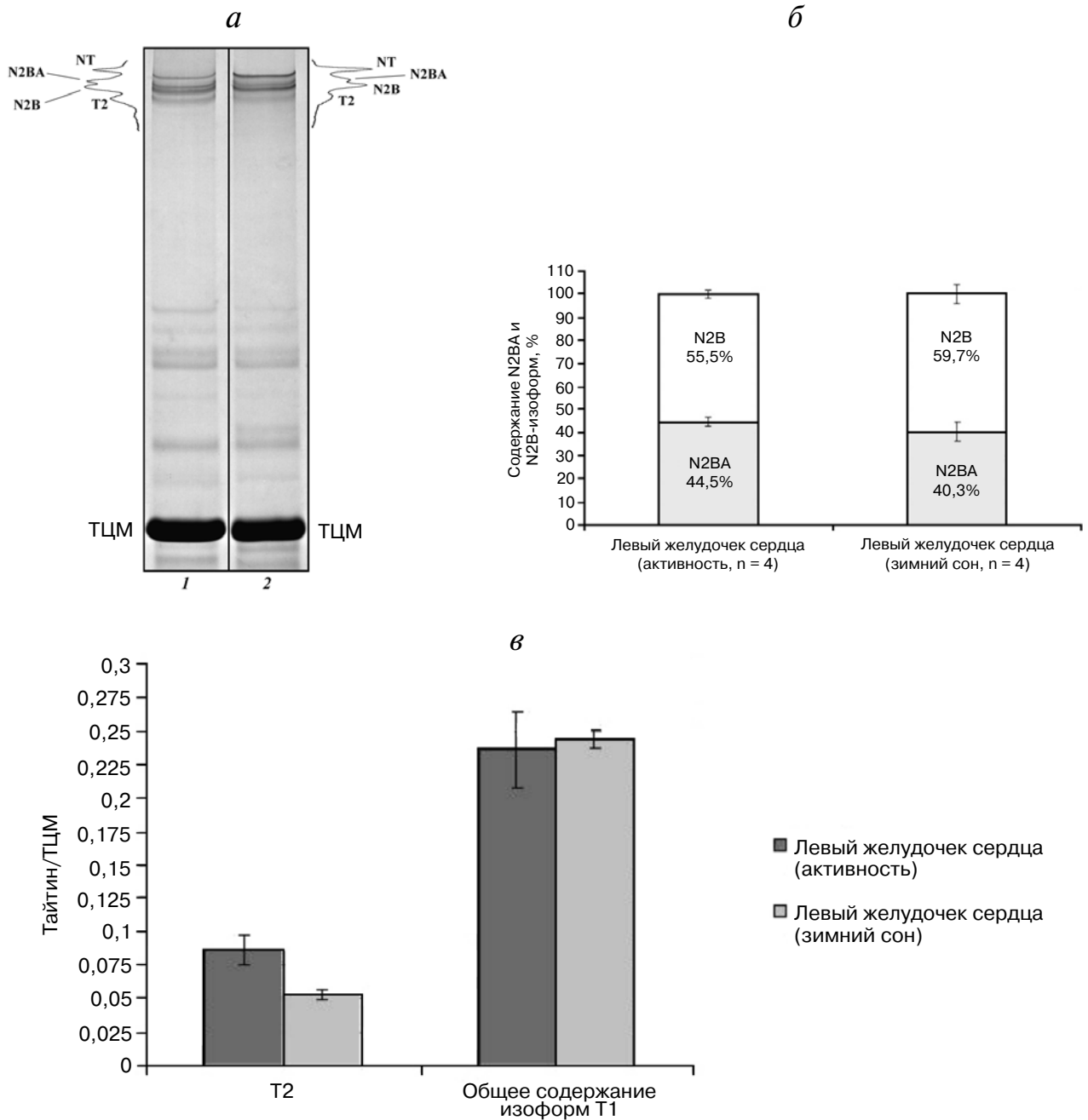


Рис. 3. Сезонные изменения изоформного состава тайтина в сердечной мышце бурого медведя. а – Электрофореграммы белков: 1 – левый желудочек сердца (активность), 2 – левый желудочек сердца (зимний сон). Указаны полосы изоформ интактного тайтина-1 (NT, N2BA, N2B), T2-фрагментов тайтина, тяжелых цепей миозина. Электрофорез проведен в ПААГ, укрепленном агарозой; б – сезонные изменения содержания N2BA и N2B-изоформ тайтина. n – Количество повторов. Приведены средние значения и их стандартные отклонения; в – содержание T2 и T1 относительно содержания ТЦМ (данные денситометрии)

ца гибернирующего медведя гризли (*Ursus arctos horribilis*) [10]. При этом содержание N2B-изоформы тайтина в миокарде активного гризли составило 57,8% [10], что почти совпадает с содержанием этой изоформы тайтина (55,5%) в миокарде активного бурого медведя (рис. 3, а, б). Таким образом, принимая во внимание полученные данные, а также учитывая близкое родство медведей (животные относятся к роду Медведи (*Ursus*)), можно с большей долей уверенности утверждать о сезонном увеличении доли N2B-изоформы тайтина и в миокарде гибернирующего гималайского медведя (рис. 2, а, в). Повышение содержания N2B-изоформы тайтина в миокарде медведей является, по всей вероятности, адаптацией, направленной на увеличение жесткости сердечной мышцы во время зимнего сна, что необходимо для предотвращения дилатации камер сердца в этот период. Принимая во внимание данные об увеличении экспрессии генов белков, вовлеченных в белковый биосинтез, в частности Rbm3, в сердечной мышце черного медведя (*Ursus americanus*) в период зимнего сна [35], можно полагать, что изменения изоформного состава тайтина в миокарде бурого и гималайского медведей протекают в этот период. Необходимо отметить, что в сердечной мышце гибернирующего бурого медведя, как и в его скелетных мышцах, также зарегистрировано снижение (в ~1,6 раза) содержания T2-фрагмента тайтина (рис. 3, в). В период зимнего сна медведя эти изменения могут иметь адаптационное значение, заключающееся в восстановлении содержания глюкозы, образующейся из аминокислот в процессе глюконеогенеза после деградации T2.

Исследование сезонных изменений уровня фосфорилирования тайтина в поперечно-полосатых мышцах бурого медведя. Известна способность тайтина к фосфорилированию *in vivo* [36]. Открыты сайты фосфорилирования этого белка, расположенные в разных частях его молекулы от M-линии до Z-диска саркомера [37]. Известно, что фосфорилирование/дефосфорилирование растяжимых участков молекулы сердечного тайтина, расположенных в I-зоне саркомера, изменяет их жесткость (для ссылок см. статью Линке и Хамдани [23]). Таким образом, фосфорилирование тайтина, как и регулирование экспрессии его коротких и длинных изоформ, является частью молекулярного механизма, ответственного за изменение эластичных свойств саркомера и мышцы в целом и адаптирующего сократительный ответ миокарда к действию факторов внутренней или внешней среды. Известна способность к фосфорилированию растяжимых участков I-зоны молекулы тайтина скелетных мышц [38]. Фосфорилированию подвергается и

T2-фрагмент тайтина, взаимодействующий в саркомере с миозиновыми нитями. Проведенные *in vitro* исследования показали, что T2, содержащий больше PO₃-групп, в меньшей степени активировал АТРазную активность актомиозина [18, 39]. Принимая во внимание данные об увеличении (в ~1,5 раза) уровня фосфорилирования T2, выделенного из скелетных мышц сусликов, пребывающих в торпидном состоянии, было сделано предположение об ингибирующей роли фосфорилирования тайтина в сократительной активности скелетных мышц этих животных в период зимней спячки [39]. Вполне вероятно, что и у медведей происходит увеличение уровня фосфорилирования тайтина, направленное на подавление сократительной способности мышц в период зимнего сна. С целью проверки этого предположения нами были проведены исследования сезонных изменений уровня фосфорилирования тайтина в сердечной и скелетной (*m. gastrocnemius*) мышцах бурого медведя с помощью флуоресцентного красителя фосфатных групп белков в геле Pro-Q Diamond. Не обнаружено сезонных различий в уровне фосфорилирования NT-, N2A-изоформ и T2-фрагмента тайтина в *m. gastrocnemius* бурого медведя (рис. 4, а, б). Однако в левом желудочке сердца спящего медведя зарегистрировано незначительное увеличение уровня фосфорилирования изоформ T1- (в 1,12 раза) и T2-фрагментов (в 1,23 раза) (рис. 4, а, в). Для выяснения функциональной роли фосфорилирования тайтина было проведено выделение этого белка из сердечной мышцы активного и гибернирующего бурого медведя с последующим изучением его влияния на актин-активируемую АТРазную активность контрольного миозина кролика *in vitro*. Выделение белка проводили по методу, с помощью которого были получены препараты T2-тайтина (~2000 кДа) сердечной мышцы медведей [17]. На рис. 5 представлены электрофореграммы T2-фрагментов тайтина и их фосфофореграммы. Не обнаружено различий в содержании фосфатных групп в препаратах T2, выделенных из миокарда активного и гибернирующего бурого медведя (рис. 5). Этот факт, по-видимому, объясняет и отсутствие различий в эффектах тайтина на АТРазную активность актомиозина *in vitro*. В частности, обнаружено увеличение (в 1,60 и 1,62 раза) актин-активируемой АТРазной активности миозина в присутствии T2, выделенного из сердечной мышцы гибернирующего и активного медведей соответственно. Таким образом, в этой серии *in vitro* экспериментов нам не удалось выяснить функциональное значение фосфорилирования тайтина. Тем не менее, учитывая *in vitro* результаты о меньшем активирующем эффекте

тайтина, содержащего больше PO₃-групп, на АТРазную активность актомиозина [39] и результаты, полученные в этом исследовании (рис. 4, а, в), можно полагать, что увеличение степени фосфорилирования тайтина в миокарде спящего бурого медведя будет вносить вклад в ингибирование сократительной активности сердечной мышцы и снижение ЧСС в период зимнего сна.

Сезонные изменения изоформного состава тяжелых цепей миозина в поперечно-полосатых мышцах медведей. В скелетных мышцах млекопитающих синтезируются четыре изоформы тяжелых цепей миозина (ТЦМ): IIa, IIb, IIx/d и I [40, 41]. Показано, что величина миофибриллярной АТРазной активности уменьшается в ряду изоформ ТЦМ следующим образом: IIb > IIx/d > IIa > I [40, 41]. Мышечные волокна, содержа-

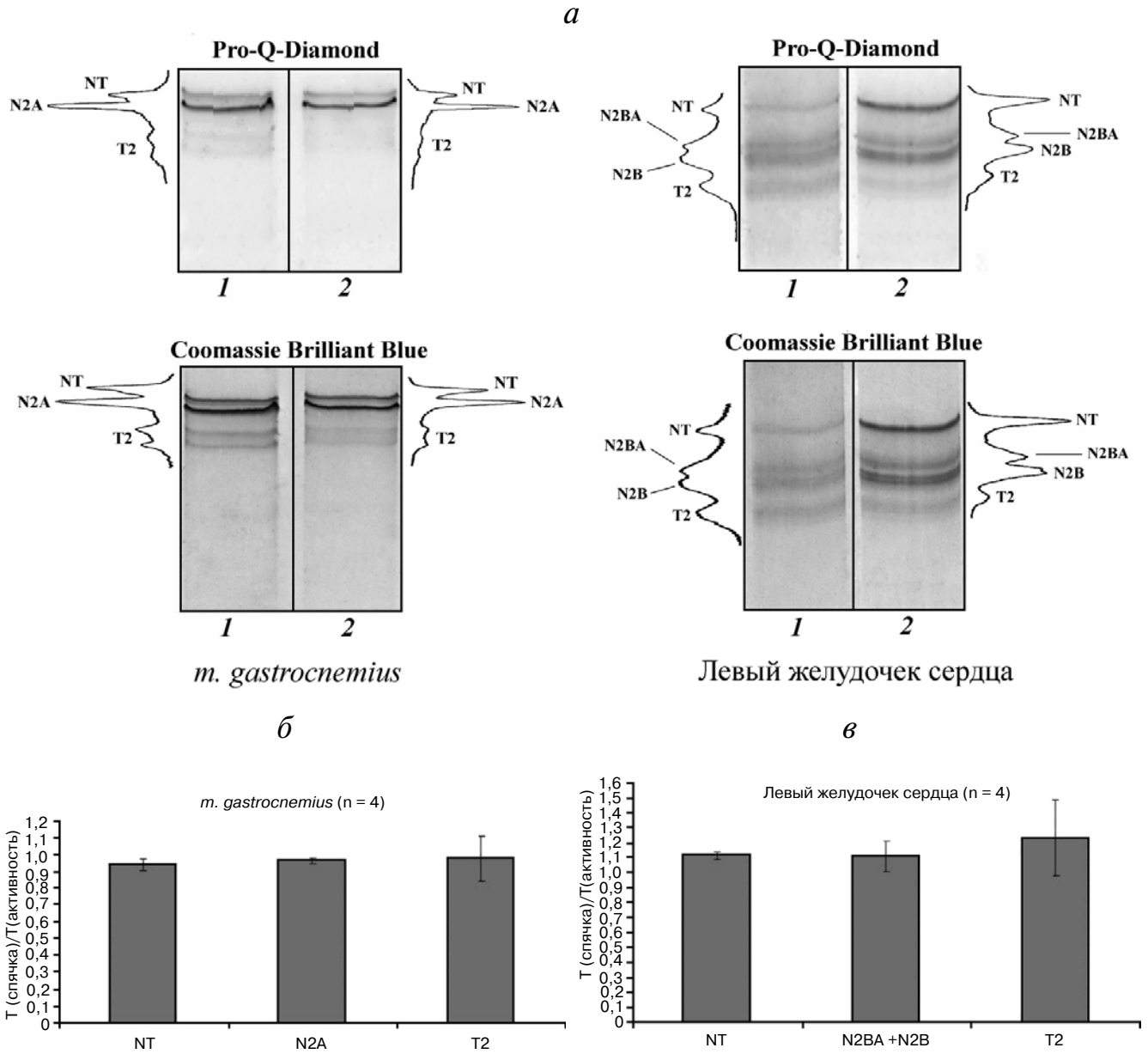


Рис. 4. Сезонные изменения степени фосфорилирования тайтина в поперечно-полосатых мышцах бурого медведя. а – Фосфофореграммы и электрофореграммы тайтина икроножной (*m. gastrocnemius*) и сердечной (левый желудочек сердца) мышц; 1 – активность, 2 – зимний сон. б, в – Диаграммы сезонных изменений уровня фосфорилирования тайтина в поперечно-полосатых мышцах бурого медведя. n – Количество повторов. Приведены средние значения и их стандартные отклонения

шие миозин с высокой активностью АТФазы, называют быстрыми (гликолитическими, окислительно-гликолитическими), а те, которые содержат миозин с более низкой активностью АТФазы, – медленными (окислительными). Известно, что пребывание человека и животных в условиях гравитационной разгрузки приводит к атрофии преимущественно медленных волокон, содержащих изоформу I ТЦМ [42, 43]. Показано, что в атрофированной мышце *soleus* крысы и человека при развитии патологических процессов также наблюдается снижение доли медленной изоформы I ТЦМ [44]. Наоборот, атрофические изменения в скелетных мышцах длиннохвостого суслика (*Spermophilus undulatus*) во время зимней спячки сопровождаются увеличением содержания медленной I- и снижением содержания быстрых IIa- и IIx/d-изоформ ТЦМ [45]. Аналогичные изменения изоформного состава ТЦМ были обнаружены и в скелетных мышцах бурого и гималайского медведей во время зимнего сна (рис. 6 и 7). В частности, в *m. gastrocnemius* и *m. longissimus dorsi* бурого медведя в период спячки наблюдалось увеличение (на 6,2 и 7,9% соответственно) содержания мед-

ленной изоформы I тяжелых цепей миозина с пропорциональным снижением содержания быстрой изоформы IIa этого белка (рис. 6). В *m. longissimus dorsi* гибернарующего гималайского медведя содержание изоформы I ТЦМ составило 51% (рис. 7) и соответствовало таковому в *m. longissimus dorsi* гибернарующего бурого медведя (51,4%) (рис. 6). Содержание изоформы I ТЦМ в *m. biceps* гибернарующего гималайского медведя составило 43,4% (рис. 7) и соответствовало таковому в *m. gastrocnemius* гибернарующего бурого медведя (43,7%) (рис. 6). Мы полагаем, что эти данные являются подтверждением трансформации миозинового фенотипа в сторону увеличения доли медленной изоформы I в скелетных мышцах гималайского медведя в период зимнего сна. Полученные нами результаты согласуются с данными, свидетельствующими о поддержании или об увеличении содержания медленной изоформы I тяжелых цепей миозина в скелетных мышцах черного медведя и луговой собачки (*Synomys leucurus*) в период гибернации [46]. Несомненно, что увеличение содержания медленных мышечных волокон, более энергетически выгодных и более выносливых, чем быст-

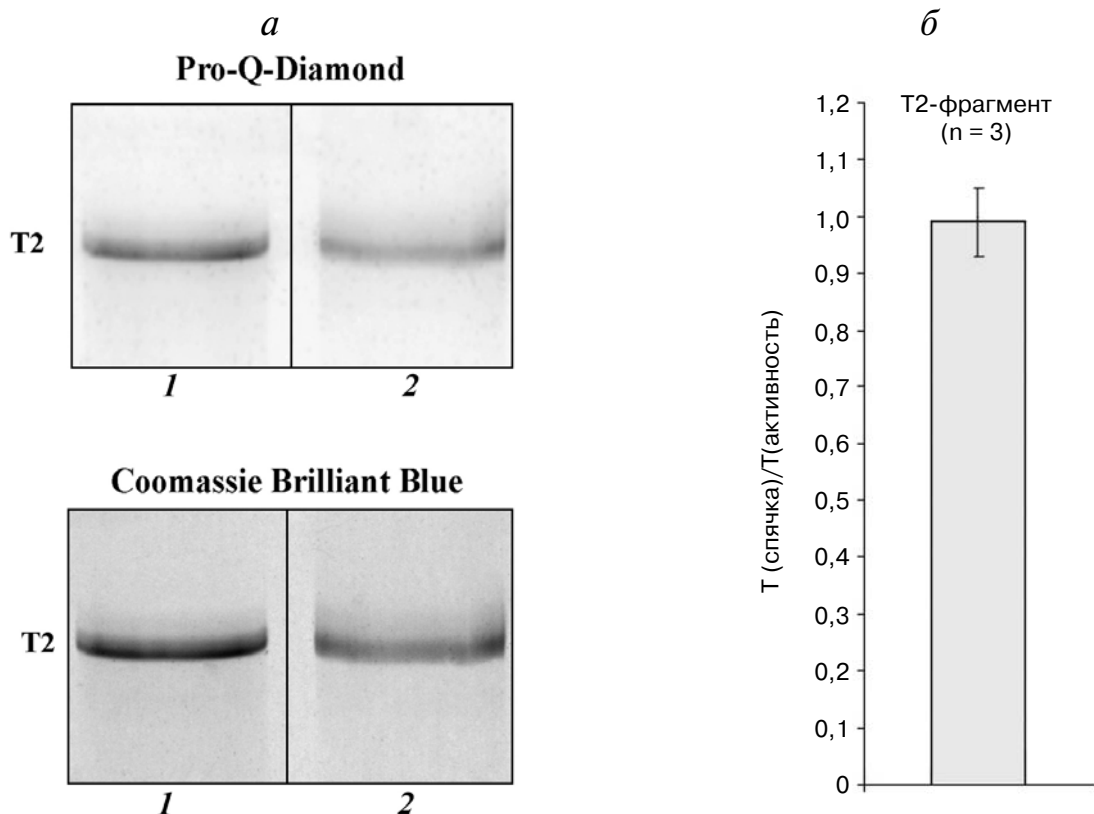


Рис. 5. Определение степени фосфорилирования Т2-фрагментов тайтина, полученных из сердечной мышцы бурого медведя. а – Фосфофореграмма и электрофореграмма Т2-тайтина: 1 – активность, 2 – зимний сон. б – Диаграмма сезонных изменений уровня фосфорилирования Т2. n – Количество повторов

рые волокна, является важной адаптационной особенностью гибернирующих животных, направленной на экономию энергоресурсов в период спячки.

В сердечной мышце млекопитающих экспрессируются α- и β-изоформы ТЦМ. Показано, что в сердце европейского хомяка (*Cricetus cricetus*) в период спячки наблюдается увеличение доли α-изоформы ТЦМ, имеющей более высокую АТРаэную активность, чем β-изоформа этого

белка [47]. Адаптационное значение этих изменений, по-видимому, заключается в необходимости более быстрого разогрева сердечной мышцы и тела животного в период выхода из состояния спячки. В левом желудочке сердца медведя гризли не было обнаружено сезонных изменений в изоформном составе миозина, тяжелые цепи которого на 100% состояли из β-изоформы этого белка [11]. Аналогичные результаты были получены и в наших исследованиях.

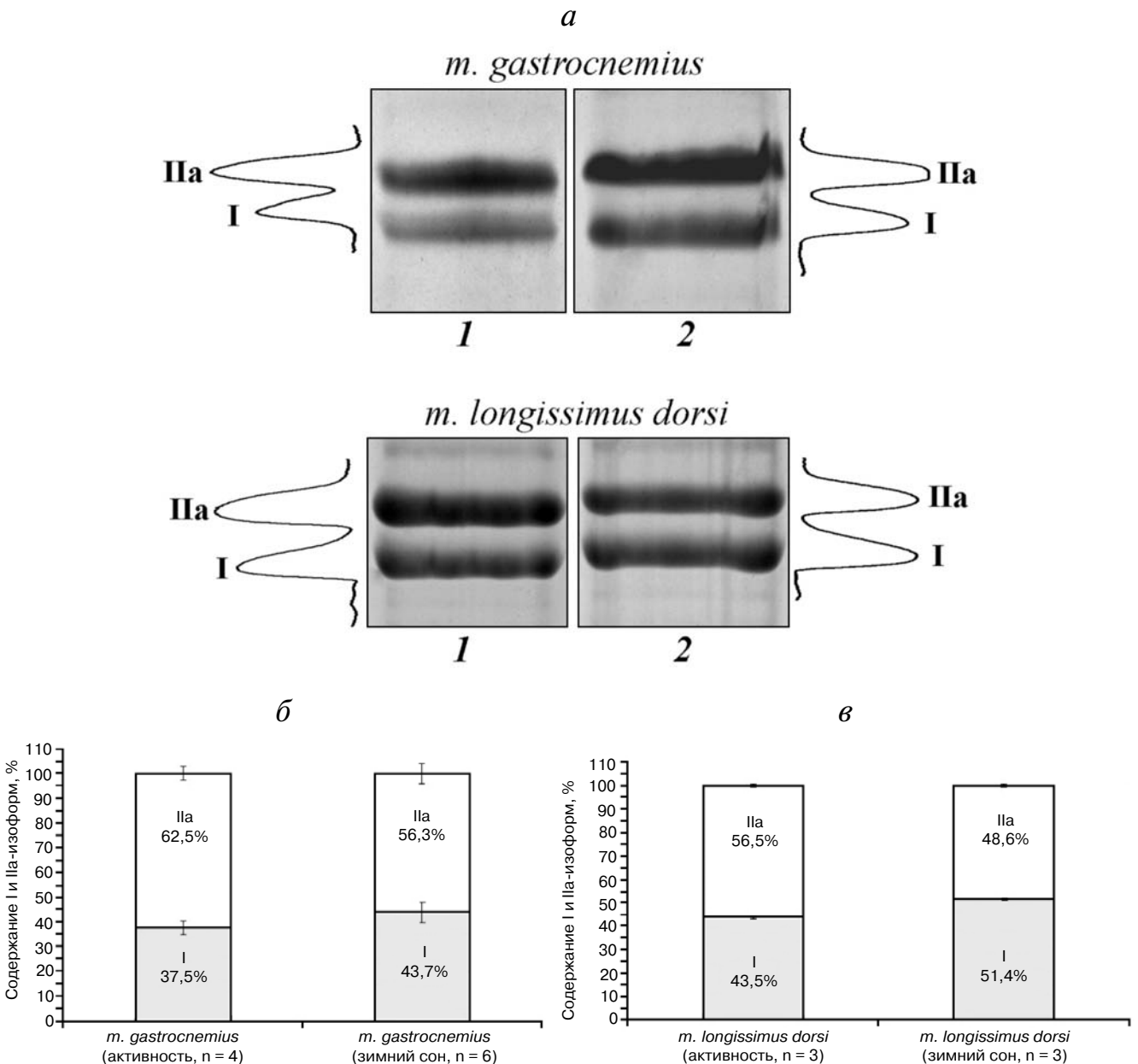


Рис. 6. Сезонные изменения изоформного состава тяжелых цепей миозина в скелетных мышцах бурого медведя. *a* – Электрофореграммы изоформ ТЦМ скелетных мышц: 1 – активность, 2 – зимний сон. Электрофорез проведен в 7%-ном ПААГ. *б, в* – Процентное соотношение изоформ тяжелых цепей миозина (I и IIa) (данные денситометрии). n – Количество повторов. Приведены средние значения и их стандартные отклонения

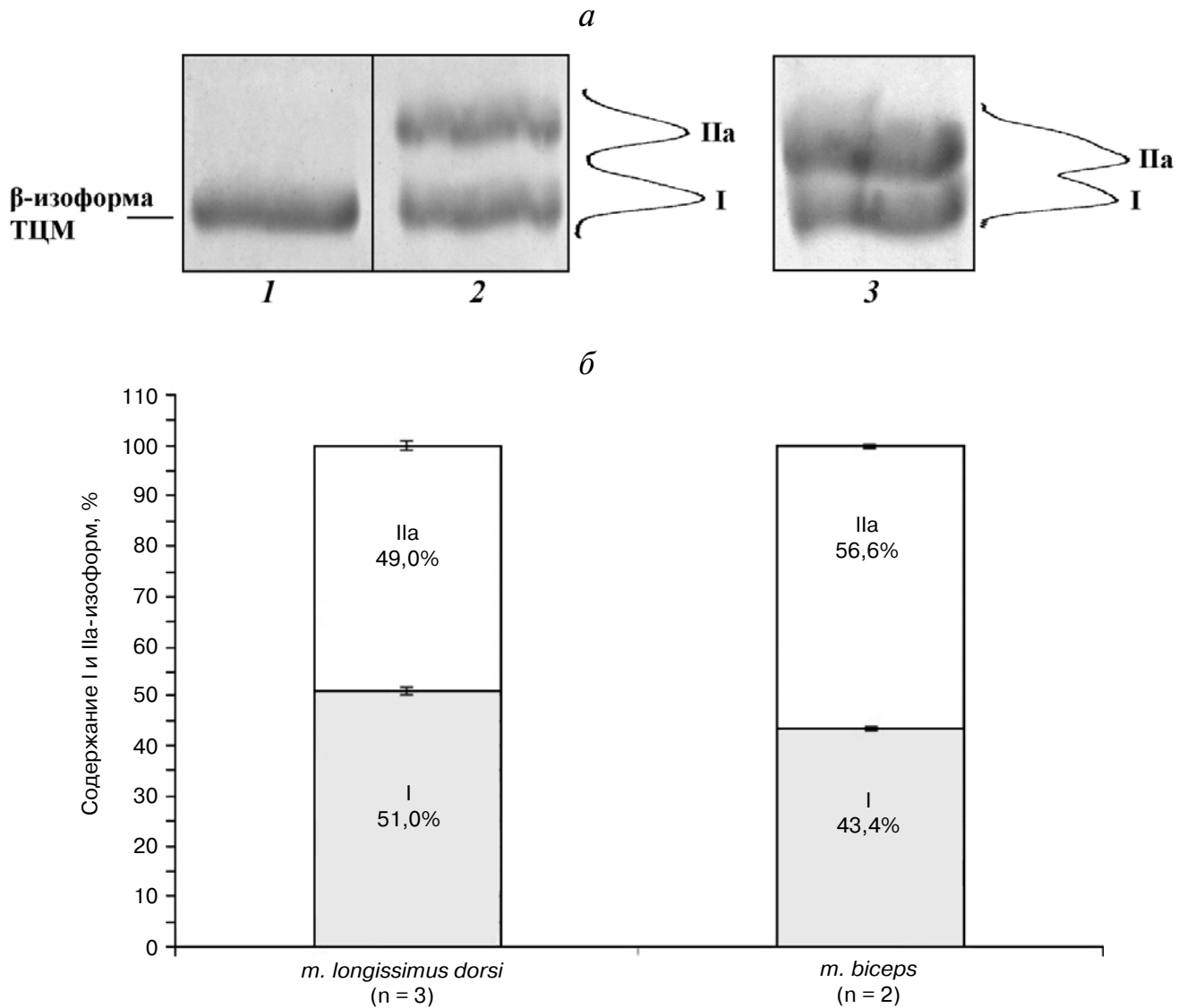


Рис. 7. Изоформный состав тяжелых цепей миозина в поперечно-полосатых мышцах гималайского медведя, находящегося в состоянии зимнего сна. *а* – Электрофореграммы изоформ ТЦМ: 1 – левый желудочек сердца, 2 – *m. longissimus dorsi*, 3 – *m. biceps*. Электрофорез проведен в 7%-ном ПААГ; *б* – процентное соотношение изоформ тяжелых цепей миозина (I и IIa) в скелетных мышцах гималайского медведя (данные денситометрии). n – Количество повторов. Приведены средние значения и их стандартные отклонения

В частности, в левом желудочке сердца гималайского (рис. 7, *а*) и бурых медведей выявлено присутствие только одной изоформы тяжелых цепей миозина, являющейся, по всей вероятности, β-изоформой этого белка. Таким образом, можно полагать, что главные адаптационные изменения в гигантских белках толстых нитей левого желудочка сердечной мышцы медведей в период зимнего сна заключаются в увеличении уровня фосфорилирования тайтина и содержания N2B-изоформы этого белка.

Авторы выражают благодарность руководителю группы исследования белков ИБП РАН

(г. Пушино) С.Е. Пермякову и его сотрудникам за предоставленную возможность использования системы гель-документирования PharosFX Plus («Bio-Rad», США) для оценки содержания фосфатных групп в белках, а также охотникам Кировской области, Удмуртской республики и Еврейской АО за помощь в получении биоматериала.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (гранты 13-04-00281, 14-04-32171, 14-04-00112, 14-04-92116).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Carey, H.V., Andrews, M.T., and Martin, S.L. (2003) Mammalian hibernation: cellular and molecular responses to depressed metabolism and low temperature, *Physiol. Rev.*, **83**, 1153–1181.
2. Barnes, B.M. (1989) Freeze avoidance in a mammal: body temperatures below 0 degree C in an Arctic hibernator, *Science*, **244**, 1593–1595.
3. Захарова Н.М. (2014) Некоторые особенности разогрева гибернирующих сусликов *Spermophilus undulatus* при вызванном пробуждении, *Фундаментальные исследования*, **6**, 1401–1405.
4. Toien, O., Blake, J., Edgar, D.M., Grahn, D.A., Heller, H.C., and Barnes, B.M. (2011) Hibernation in black bears: independence of metabolic suppression from body temperature, *Science*, **331**, 906–909.
5. Nelson, R.A., Wahner, H.W., Jones, J.D., Ellefson, R.D., and Zollman, P.E. (1973) Metabolism of bears before, during, and after winter sleep, *Am. J. Physiol.*, **224**, 491–496.
6. Tinker, D.B., Harlow, H.J., and Beck, T.D. (1998) Protein use and muscle-fiber changes in free-ranging, hibernating black bears, *Physiol. Zool.*, **71**, 414–424.
7. Harlow, H.J., Lohuis, T., Beck, T.D., and Iaizzo, P.A. (2001) Muscle strength in overwintering bears, *Nature*, **409**, 997.
8. Lohuis, T.D., Harlow, H.J., Beck, T.D., and Iaizzo, P.A. (2007) Hibernating bears conserve muscle strength and maintain fatigue resistance, *Physiol. Biochem. Zool.*, **80**, 257–269.
9. Hershey, J.D., Robbins, C.T., Nelson, O.L., and Lin, D.C. (2008) Minimal seasonal alterations in the skeletal muscle of captive brown bears, *Physiol. Biochem. Zool.*, **81**, 138–147.
10. Nelson, O.L., Robbins, C.T., Wu, Y., and Granzier, H. (2008) Titin isoform switching is a major cardiac adaptive response in hibernating grizzly bears, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **295**, 366–371.
11. Barrows, N.D., Nelson, O.L., Robbins, C.T., and Rourke, B.C. (2011) Increased cardiac alpha-myosin heavy chain in left atria and decreased myocardial insulin-like growth factor (Igf-I) expression accompany low heart rate in hibernating grizzly bears, *Physiol. Biochem. Zool.*, **84**, 1–17.
12. Tatsumi, R., and Hattori, A. (1995) Detection of giant myofibrillar proteins connectin and nebulin by electrophoresis in 2% polyacrylamide slab gels strengthened with agarose, *Anal. Biochem.*, **224**, 28–31.
13. Vikhlyantsev, I.M., Podlubnaya, Z.A., and Kozlovskaya, I.B. (2004) New titin isoforms in skeletal muscles of mammals, *Dokl. Biochem. Biophys.*, **395**, 111–113.
14. Вихлянцев И.М., Подлубная З.А. (2006) К вопросу об изоформах тайтина, *Биофизика*, **51**, 951–958.
15. Tikunov, V.A., Sweeney, H.L., and Rome, L.C. (2001) Quantitative electrophoretic analysis of myosin heavy chains in single muscle fibers, *J. Appl. Physiol.*, **90**, 1927–1935.
16. Borbely, A., Falcao-Pires, I., van Heerebeek, L., Hamdani, N., Edes, I., Gavina, C., Leite-Moreira, A.F., Bronzwaer, J.G., Papp, Z., van der Velden, J., Stienen, G.J., and Paulus, W.J. (2009) Hypophosphorylation of the Stiff N2B titin isoform raises cardiomyocyte resting tension in failing human myocardium, *Circ. Res.*, **104**, 780–786.
17. Soteriou, A., Gamage, M., and Trinick, J. (1993) A survey of interactions made by the giant protein titin, *J. Cell Sci.*, **14**, 119–123.
18. Вихлянцев И.М., Окунева А.Д., Шпагина М.Д., Шумилина Ю.В., Молочков Н.В., Салмов Н.Н., Подлубная З.А. (2011) Изменения изоформного состава, структуры и функциональных свойств тайтина сердечной мышцы Монгольской песчанки (*Meriones unguiculatus*) после пребывания в условиях реальной невесомости, *Биохимия*, **76**, 1629–1639.
19. Meyer, L.C., and Wright, N.T. (2013) Structure of giant muscle proteins, *Front. Physiol.*, **4**, 1–12.
20. Vikhlyantsev, I.M., and Podlubnaya, Z.A. (2012) New titin (connectin) isoforms and their functional role in striated muscles of mammals: facts and suppositions, *Biochemistry (Moscow)*, **77**, 1515–1535.
21. Liversage, A.D., Holmes, D., Knight, P.J., Tskhovrebova, L., and Trinick, J. (2001) Titin and the sarcomere symmetry paradox, *J. Mol. Biol.*, **305**, 401–419.
22. Horowitz, R., Kempner, E.S., Bisher, M.E., and Podolsky, R.J. (1986) A physiological role for titin and nebulin in skeletal muscle, *Nature*, **323**, 160–164.
23. Linke, W.A., and Hamdani, N. (2014) Gigantic business: titin properties and function through thick and thin, *Circ. Res.*, **114**, 1052–1068.
24. Ottenheijm C.A., Granzier H., and Labeit, S. (2012) The sarcomeric protein nebulin: another multifunctional giant in charge of muscle strength optimization, *Front Physiol.*, **3**, 37.
25. Вихлянцев И.М., Малышев С.Л., Шенкман Б.С., Подлубная З.А. (2004) Поведение тайтина и белков его семейства в скелетных мышцах сусликов (*Citellus undulatus*) при зимней спячке и крыс в условиях моделируемой микрогравитации, *Биофизика*, **49**, 995–1002.
26. Вихлянцев И.М., Карадулева Е.В., Подлубная З.А. (2008) Сезонные изменения изоформного состава тайтина в мышцах зимнеявляющихся сусликов, *Биофизика*, **53**, 1066–1072.
27. Tournel, T., Stevens, L., Granzier, H., and Mounier, Y. (2002) Passive tension of rat skeletal soleus muscle fibers: effects of unloading conditions, *J. Appl. Physiol.* (1985), **92**, 1465–1472.
28. Shenkman, B.S., Nemirovskaya, T.L., Belozeroва, I.N., Vikhlyantsev, I.M., Matveeva, O.A., Staroverova, K.S., and Podlubnaya, Z.A. (2002) Effects of Ca²⁺-binding agent on unloaded rat soleus: muscle morphology and sarcomeric titin content, *J. Gravit. Physiol.*, **9**, 139–140.
29. Шенкман Б.С., Подлубная З.А., Вихлянцев И.М., Литвинова К.С., Удальцов С.Н., Немировская Т.Л., Лемешева Ю.С., Мухина А.М., Козловская И.Б. (2004) Сократительные характеристики и белки саркомерного цитоскелета волокон *m. soleus* человека в условиях гравитационной разгрузки. Роль опорного стимула, *Биофизика*, **49**, 881–890.
30. Udaка, J., Ohmori, S., Terui, T., Ohtsuki, I., Ishiwata, S., Kurihara, S., and Fukuda, N. (2008) Disuse-induced preferential loss of the giant protein titin depresses muscle performance via abnormal sarcomeric organization, *J. Gen. Physiol.*, **131**, 33–41.
31. Kruger, M., Wright, J., and Wang, K. (1991) Nebulin as a length regulator of thin filaments of vertebrate skeletal muscles: correlation of thin filament length, nebulin size, and epitope profile, *J. Cell Biol.*, **115**, 97–107.
32. Fedorov, V.B., Goropashnaya, A.V., Toien, O., Stewart, N.C., Gracey, A.Y., Chang, C., Qin, S., Perteя, G., Quackenbush, J., Showe, L.C., Showe, M.K., Boyer, B.B., and Barnes, B.M. (2009) Elevated expression of protein biosynthesis genes in liver and muscle of hibernating black bears (*Ursus americanus*), *Physiol. Genomics*, **37**, 108–118.
33. Ulanova, A., Gričyna, Y., Vikhlyantsev, I., Salmov, N., Bobylev, A., Abdusalomova, Z., Rogachevsky, V., Shenkman, B., and Podlubnaya, Z. (2015) Isoform composition and gene expression of thick and thin filament proteins in striated muscles of mice after 30-day space flight, *BioMed. Res. Int.*, **2015**, in press.

34. Yang, C.X., He, Y., Gao, Y.F., Wang, H.P., and Goswami, N. (2014) Changes in calpains and calpastatin in the soleus muscle of Daurian ground squirrels during hibernation, *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.*, **176**, 26–31.
35. Fedorov, V.B., Goropashnaya, A.V., Toien, O., Stewart, N.C., Chang, C., Wang, H., Yan, J., Showe, L.C., Showe, M.K., and Barnes, B.M. (2011) Modulation of gene expression in heart and liver of hibernating black bears (*Ursus americanus*), *BMC Genomics*, **12**, 171.
36. Somerville, L.L., and Wang, K. (1988) Sarcomere matrix of striated muscle: *in vivo* phosphorylation of titin and nebulin in mouse diaphragm muscle, *Arch. Biochem. Biophys.*, **262**, 118–129.
37. Gregorio, C.C., Granzier, H., Sorimachi, H., and Labeit, S. (1999) Muscle assembly: a titanic achievement, *Curr. Opin. Cell Biol.*, **11**, 18–25.
38. Kruger, M., and Linke, W.A. (2006) Protein kinase-A phosphorylates titin in human heart muscle and reduces myofibrillar passive tension, *J. Muscle Res. Cell Motil.*, **27**, 435–444.
39. Вихлянцев И.М., Подлубная З.А. (2003) Фосфорилирование саркомерных цитоскелетных белков – адаптационный фактор ингибирования сократительной активности мышц при зимней спячке, *Биофизика*, **48**, 499–504.
40. Bottinelli, R., Canepari, M., Reggiani, C., and Stienen, G.J. (1994) Myofibrillar ATPase activity during isometric contraction and isomyosin composition in rat single skinned muscle fibres, *J. Physiol.*, **481**, 663–675.
41. Sieck, G.C., Zhan, W.Z., Prakash, Y.S., Daood, M.J., and Watchko, J.F. (1995) SDH and actomyosin ATPase activities of different fiber types in rat diaphragm muscle, *J. Appl. Physiol.* (1985), **79**, 1629–1639.
42. Ohira, Y., Yoshinaga, T., Ohara, M., Nonaka, I., Yoshioka, T., Yamashita-Goto, K., Shenkman, B.S., Kozlovskaya, I.B., Roy, R.R., and Edgerton, V.R. (1999) Myonuclear domain and myosin phenotype in human soleus after bed rest with or without loading, *J. Appl. Physiol.* (1985), **87**, 1776–1785.
43. Baldwin, K.M., Haddad, F., Pandorf, C.E., Roy, R.R., and Edgerton, V.R. (2013) Alterations in muscle mass and contractile phenotype in response to unloading models: role of transcriptional/pretranslational mechanisms, *Front. Physiol.*, **4**, 284.
44. Грицына Ю.В., Салмов Н.Н., Вихлянцев И.М., Уланова А.Д., Шарапов М.Г., Теплова В.В., Подлубная З.А. (2013) Изменение экспрессии гена и содержания тайтина (коннектина) в поперечно-полосатых мышцах хронически алкоголизированных крыс, *Мол. биология*, **47**, 996–1003.
45. Лазарева М.В., Трапезникова К.О., Вихлянцев И.М., Бобылев А.Г., Климов А.А., Подлубная З.А. (2012) Сезонные изменения изоформного состава тяжелых цепей миозина скелетных мышц зимоспящего суслика *Spermophilus undulatus*, *Биофизика*, **57**, 982–987.
46. Rourke, B.C., Cotton, C.J., Harlow, H.J., and Caiozzo, V.J. (2006) Maintenance of slow type I myosin protein and mRNA expression in overwintering prairie dogs (*Cynomys leucurus* and *ludovicianus*) and black bears (*Ursus americanus*), *J. Comp. Physiol. B*, **176**, 709–720.
47. Morano, I., Adler, K., Agostini, B., and Hasselbach, W. (1992) Expression of myosin heavy and light chains and phosphorylation of the phosphorylatable myosin light chain in the heart ventricle of the European hamster during hibernation and in summer, *J. Muscle Res. Cell Motil.*, **13**, 64–70.

**SEASONAL CHANGES IN ISOFORM
COMPOSITION OF GIANT PROTEINS OF THICK
AND THIN FILAMENTS AND TITIN (CONNECTIN)
PHOSPHORYLATION LEVEL IN STRIATED
MUSCLES OF BEARS (Ursidae, Mammalia)**

**N. N. Salmov¹, I. M. Vikhlyantsev^{1*}, A. D. Ulanova^{1,2},
Yu. V. Gritsyna¹, A. G. Bobylev¹, A. P. Saveljev³,
V. V. Makariushchenko³, G. Yu. Maksudov⁴,
Z. A. Podlubnaya^{1,2}**

¹ *Institute of Theoretical and Experimental Biophysics,
Russian Academy of Sciences, ul. Institutskaya 3,
Pushchino 142290, Moscow Region, Russia;
fax: +7(4967)33-0553, E-mail: vikhlyantsev@iteb.ru*

² *Pushchino State Institute of Natural Sciences, pr. Nauki 3,
Pushchino 142290, Moscow Region, Russia;
fax: +7(4967)73-2711*

³ *B. M. Zhitkov Russian Research Institute of Game
Management and Fur Farming, ul. Preobrazhenskaya 79,
Kirov 610000, Russia; fax: +7(8332)38-1130*

⁴ *Moscow Zoo, ul. Bol'shaya Gruzinskaya 1, Moscow
123242, Russia; fax: +7(495)605-1717*

Received September 25, 2014
Revision received December 1, 2014

Seasonal changes in the composition of isoforms of thick and thin filament proteins (titin, myosin heavy chains (MyHCs), nebulin) as well as in phosphorylation level of titin in striated muscles of the brown bear (*Ursus arctos*) and the hibernating Himalayan black bear (*Ursus thibetanus ussuricus*) were studied. It was found out that alterations that lead to skeletal muscle atrophy in bears during hibernation are not accompanied by decrease in nebulin and intact titin-1 (T1) isoform content. However, a decrease (by 2.1-3.4-fold) in the content of T2-fragments of titin was observed in the bears' skeletal muscles (*m. gastrocnemius*, *m. longissimus dorsi*, *m. biceps*) during hibernation. In the left ventricles of the hibernating bears, an increase in the stiffer N2B titin isoform content was registered relative to that of its more compliant N2BA isoform. However, in spite of no decrease in total content of T1 in the myocardium of the hibernating brown bear, the content of T2-fragments was lower (by ~1.6-fold). The phosphorylation level of titin insignificantly increased in the cardiac muscle of the hibernating brown bear. In skeletal muscles of the brown bear, the titin phosphorylation level was found to remain unchanged in different seasons. But the changes in the composition of myosin heavy chain isoforms (MyHCs) directed to increase in the content of the slow (I) and decrease in the content of the fast (IIa) isoforms of this protein during winter dormancy of the brown bear were detected. Contents of MyHCs I and IIa in skeletal muscles of hibernating Himalayan black bear corresponded to that in skeletal muscles of hibernating brown bear.

Key words: hibernation, brown bear, Himalayan black bear, striated muscles, thick (myosin) filaments, thin (actin) filaments, titin, nebulin, isoforms of myosin heavy chains, Pro-Q Diamond