
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

РАСПАД ДЕСМИНА В СКЕЛЕТНЫХ МЫШЦАХ У ПАЦИЕНТОВ
В ХРОНИЧЕСКОМ КРИТИЧЕСКОМ СОСТОЯНИИ

© 2023 г. С. А. Тыганов^{1, *}, К. А. Зарипова¹, О. В. Туртикова¹, Е. Н. Скитева^{1, 2},
С. П. Белова¹, Ю. М. Забродская², С. А. Кондратьев³, Е. А. Кондратьева^{2, 4},
А. Н. Кондратьев², Б. С. Шенкман¹

¹Институт медико-биологических проблем Российской академии наук, Москва, Россия

²Российский научно-исследовательский нейрохирургический институт
им. профессора А.Л. Поленова, Санкт-Петербург, Россия

³AIMIS Healthcare Group, Clinic Athonitissa, Limassol, Cyprus

⁴Военно-медицинская академии им. С.М. Кирова Министерства обороны РФ,
Санкт-Петербург, Россия

*E-mail: s.a.tyganov@gmail.com

Поступила в редакцию 27.09.2023 г.

После доработки 12.10.2023 г.

Принята к публикации 22.10.2023 г.

Пациенты в хроническом критическом состоянии теряют значительную часть мышечной массы за время пребывания в отделении интенсивной терапии, что может иметь долгосрочные пагубные последствия. В том числе, это приводит к разрушению целостности цитоскелета мышц, и в настоящее время нет полноценных исследований, описывающих механизмы развития этого процесса. Целью данной работы было исследование сигнальных процессов, приводящих к распаду десмина у пациентов при миопатии критических состояний (critical illness myopathy, CIM). Инцизионные мышечные биопсии из камбаловидной мышцы были взяты у 6 пациентов, проходящих лечение в РНХИ им. проф. А.Л. Поленова – филиал НМИЦ им. В.А. Алмазова, с хроническим нарушением сознания (не менее 2 мес.). В качестве контроля использовали мышечные биоптаты, взятые у здоровых мужчин с помощью игольчатой биопсии. Биопсии замораживались в жидком азоте для дальнейшего проведения вестерн-блот и ПЦР-анализа, а также иммуногистохимического исследования. Проведенный анализ показал, что у 4 из 6 исследованных пациентов визуально были выявлены волокна с измененной гистологической картиной десмина. Мы также наблюдали достоверное снижение содержания десмина на 69% и снижение содержания его мРНК на 24% у пациентов с CIM. Распад десмина может быть связан с повышенной активностью кальпаина и с активацией убиквитин-протеасомной системы. В данной работе содержание кальпаина-1 повышалось в условиях CIM на уровне белка и не изменялось на уровне мРНК. Мы наблюдали изменения в фосфорилировании GSK3- β (Ser9), что является ключевым этапом деполимеризации десминовых филаментов кальпаином-1. Исследование убиквитинлигаз, в свою очередь, показало достоверное увеличение экспрессии Trim32 на 155%, при снижении экспрессии Atrogin1 и MuRF1. Таким образом, в данной работе наблюдалось снижение содержания десмина в условиях CIM. Распад десмина может быть связан с увеличением его фосфорилирования с помощью GSK3 β и дальнейшим расщеплением кальпаином-1. Кроме того, мы зафиксировали повышенную экспрессию E3-убиквитинлигазы Trim32, активность которой, судя по литературным данным, также повышается после фосфорилирования десмина.

Ключевые слова: хроническое нарушение сознания, хроническое критическое состояние, скелетная мышца, десмин, миопатия критических состояний, убиквитинлигазы, протеолиз

DOI: 10.31857/S0869813923120129, **EDN:** CHNTIY

ВВЕДЕНИЕ

Достижения в области интенсивной терапии позволили большему количеству пациентов пережить острое критическое состояние, но они также способствовали появлению большого количества пациентов, которые переходят из комы в состояния хронического нарушения сознания (вегетативное состояние и состояние минимального сознания) [1, 2]. Пациенты в хроническом критическом состоянии [3] теряют значительную часть мышечной массы за время пребывания в отделении интенсивной терапии, что может иметь долгосрочные пагубные последствия. Миопатия критических состояний (critical illness myopathy, CIM) представляет собой нервно-мышечное расстройство, часто наблюдаемое в отделении интенсивной терапии [4]. Основным признаком CIM является мышечная слабость, которая носит диффузный характер с вовлечением всех мышц конечностей и сгибателей шеи, а часто лицевых мышц и диафрагмы [5]. CIM также характеризуется мышечной атрофией и потерей миозина и связанных с миозином белков [4, 6–8]. Острые и продолжительные функциональные последствия CIM значительно зависят от возраста, сопутствующих заболеваний и продолжительности пребывания в отделении интенсивной терапии [9]. Поражение мышц у пациентов в хроническом критическом состоянии по своей природе неспецифично и является следствием нескольких процессов: адаптивной реакции на тяжелое повреждение как центральной, так и периферической нервной системы, неспецифического воздействия лекарственных препаратов. Развитие знаний о патофизиологии критических состояний и совершенствование оказания помощи на современном этапе привели к улучшению выживаемости пациентов в критическом состоянии [10]. Мышечная атрофия при критических состояниях является одной из основных причин смертности в палате интенсивной терапии, но молекулярные механизмы, лежащие в основе этого процесса, в значительной степени неизвестны [11].

В каждой мышечной клетке присутствуют многочисленные белки цитоскелета. Различные миопатии, в том числе и CIM, напрямую связаны с изменением в содержании и взаимодействии этих белков. В скелетных мышцах основной единицей сокращения является саркомер, состоящий из множества структурных и регуляторных белков. Белки промежуточных филаментов (в том числе, десмин) служат каркасом, который соединяет миофибриллы между собой и с другими органеллами (такими, как митохондрии или ядро), чтобы поддерживать клеточную целостность и способствовать механотрансдукции [12]. В работах, где исследовались мутации и посттрансляционные модификации десмина человека, были нарушения цитоскелетной сети, что приводило к потере функции как десмина, так и его партнеров по связыванию, а также к потенциальным токсическим эффектам образовавшихся агрегатов [13]. Следовательно, координированное действие всех узлов цитоскелета имеет решающее значение для обеспечения правильной сократительной функции мышц, а нарушение целостности любого компонента часто приводит к сердечной или скелетной миопатии [12]. Недавно был выявлен механизм, способствующий разборке десминовых филаментов, которая приводит к разрушению миофибрилл во время мышечной атрофии, вызванной денервацией или голоданием [14]. Индукция этого механизма связана с активностью GSK-3 β , кальпаина и убиквитинлигазы Trim32 [14, 15]. Авторы предположили, что фосфорилирование десмина с помощью GSK-3 β способствует его убиквитинированию с помощью Trim32 и по-

следующей его деполимеризации кальпаином-1, что ведет к разборке миофибрилл и атрофии мышечных волокон [14, 16]. Целью данной работы явилась проверка гипотезы о возможном влиянии этого пути на распад десмина в камбаловидной мышце человека в условиях длительной миопатии критических состояний.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Взятие мышечных биопсий у пациентов

Инцизионные мышечные биопсии из камбаловидной мышцы были взяты у 6 пациентов в хроническом критическом состоянии (на рисунках и в результатах обозначены С1), проходивших лечение в отделении анестезиологии и реанимации РНХИ им. проф. А.Л. Поленова — филиал НМИЦ им. В.А. Алмазова. В исследование включались пациенты с хроническим нарушением сознания не менее 2 месяцев. Критерии исключения: инфекция в области забора биопсийного материала, непереносимость местных анестетиков, индекс массы тела (ИМТ) не ниже 15, наличие выраженного системного воспалительного ответа и сепсиса, а также нестабильности витальных функций. В условиях “малой хирургической операции”, осуществлялся забор исследуемой ткани под местной анестезией 1%-ным раствором ропивакаина.

В качестве контроля (на рисунках и в результатах обозначены Соп) использовали мышечные биоптаты, взятые у здоровых мужчин с помощью игольчатой биопсии под местной анестезией. В горизонтальном положении в помещении, предназначенном для хирургических манипуляций, проводили местную анестезию путем внутривенной инъекции 2%-ного раствора лидокаина над поверхностью задней группы мышц голени. Затем выполняли кожный разрез с помощью однократного хирургического лезвия и производили стерильный забор ткани с помощью биопсийной аспирационной иглы Бергстрема. После извлечения иглы рану обрабатывали гемостатической губкой и закрывали бактерицидным лейкопластырем. После взятия биопсии у пациентов с хроническим критическим состоянием и у здоровых добровольцев мышечная ткань в течение одной минуты замораживалась в жидком азоте для последующих анализов.

Анализ экспрессии генов

Для анализа экспрессии мРНК генов из мышечной ткани с помощью набора RNeasy micro kit (Qiagen, США) была выделена тотальная фракция РНК и использована в качестве матрицы для проведения обратной транскрипции с последующей ПЦР-реакцией. Для проведения обратной транскрипции были использованы компоненты фирмы “Синтол” (Россия): 30 мкМ случайных гексануклеотидов, 17,4 мкМ олиго-d(T)15, 1,3 мМ дНТФ, 0,02 ед./мкл ингибитора РНКазы, 6 ед./мкл М-MLV-ревертазы, 5х-буфер для М-MLV-ревертазы. Обратную транскрипцию проводили в амплификаторе (CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System, “Bio-Rad Laboratories”, США). Для проведения ПЦР в реальном времени использовали полученную в результате обратной транскрипции кДНК, праймеры с концентрацией 10 мкМ мастер-микс (0,3 мМ дНТФ, 3 мМ MgCl₂, 2,5 мкл 10-кратного ПЦР-буфера Б (рН 8,8), 0,06 ед./мкл Taq ДНК-полимеразы, “Синтол”). Нормирование данных ПЦР проводили на экспрессию housekeeping гена *GAPDH*. Все праймеры, использовавшиеся в эксперименте, представлены в табл. 1.

Анализ содержания белков в тотальной фракции камбаловидной мышцы

Для выделения тотальной белковой фракции был использован набор реагентов RIPA Lysis Buffer System (“Santa Cruz”, США). При этом дополнительно использо-

Таблица 1. Список использованных в работе праймеров

Ген	Последовательность праймеров
<i>MuRF-1</i>	GCCAATTTGGTGCTTTTGT AAATTCAGTCCTCTCCCCGT
<i>MAFbx</i>	CTACGATGTTGCAGCCAAGA GGCAGTCGAGAAGTCCAGTC
<i>Trim32</i>	CTCGGAAGTTCTTCACAGGCTC CTCCAGTAGTGCTACATCTGCC
<i>Desmin</i>	CTGAGCAAAGGGGTTCTGAG CTTCAGGGAGCAGTGAGGAC
<i>Calpain</i>	TGTCGGAGGAGATCATCACG TCTTGAGGAATTGGGACCC
<i>GAPDH</i>	ACCCAGAAGACTGTGGATG TTCAGCTCAGGGATGACCTT

вались ингибиторы протеаз Complete Protease Inhibitor Cocktail (“Santa Cruz”, США), 10 мкг/мл апротинина (“SIGMA”, США), 10 мкг/мл лейпептина (“SIGMA”, США), 10 мкг/мл пепстатина (“SIGMA”, США), 20 мкл “complete Mini Protease Inhibitor Cocktail” (Roche, Швейцария), 40 мкл фосфоингибиторного коктейля (Santa Cruz, США).

Для проведения электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ) образцы разводились в двукратном буфере для образцов (5.4 mM Tris-HCl (pH 6.8), 4%-ный Ds-Na, 20%-ный глицерин, 10%-ный β -меркаптоэтанол, 0.02%-ный бромфеноловый синий). Электрофорез был проведен в 10%-ном разделяющем ПААГ. Образцы группы С1 загружались на один гель с контрольными образцами. Электрофорез проводили при силе тока 17 мА на гель в мини-системе (“Bio-Rad Laboratories”) при комнатной температуре. Электроперенос белков проводили на нитроцеллюлозную мембрану при 100 В при температуре 4°C в течение 120 мин в системе mini Trans-Blot (“Bio-Rad Laboratories”). После электропереноса НЦ-мембраны инкубировали в растворе 5%-ного сухого молока (“Bio-Rad Laboratories”) в PBST (PBS + 0.1% Tween 20) в течение 1 ч при комнатной температуре. Для выявления белковых полос использовали первичные поликлональные антитела: фосфорилированной (Ser9) GSK3 β (“cell signalling”, #9323, 1 : 1000, США), тотальной GSK3 β (“cell signalling”, #9315, 1 : 1000, США), фосфорилированной (Ser473) АКТ (“cell signalling”, #9271, 1 : 1000, США), тотальной АКТ (“cell signalling”, #9272, 1 : 1000, США), десмина (“cell signalling”, #4024, 1 : 2000, США), кальпаина (“santa cruz”, #sc-58323, 1 : 1000, США). В качестве вторичных антител использовали антитела goat anti-rabbit, конъюгированные с пероксидазой хрена (Santa Cruz, США) в разведении 1 : 50000. Инкубация блотов с первичными антителами проводилась в течение ночи при 4°C, со вторичными антителами 1 ч при комнатной температуре. Анализ белковых полос проводили с использованием C-DiGit Blot Scanner (LI-COR Biotechnology, США). Все измерения плотности изображений проводились в линейном диапазоне проявляющего реагента и сканера. Медиану оптического поглощения (ОП) полос вывешенной группы делили на медиану ОП полос соответствующей контрольной группы, отличия выражали в процентах. Медиану ОП полос контрольной группы принимали за 100%. Статистическая обработка данных вестерн-блота производилась с помощью программы Image Studio Digits Ver4.0.

Иммуногистохимический анализ десмина

С помощью микротомы Leica CM1900 изготавливали поперечные срезы замороженной мышцы толщиной 9 мкм. Срезы высушивали на воздухе и хранили при -20°C . Перед окрашиванием срезы оттаивали и регидратировали при комнатной температуре в фосфатно-буферном растворе (PBS) в течение 20 мин, а затем инкубировали с антителами против десмина ("cell signalling", #4024, 1 : 2000, США) 1 : 400 в PBS во влажной камере при 37°C в течение часа (или при 4°C в течение ночи). Затем антитела отмывали в PBS 3 раза по 5 мин. Инкубацию со вторичными антителами, конъюгированными с AlexaFluor, 1 : 500 в PBS проводили в течение 40 мин при комнатной температуре. После отмывки вторичных антител срезы заключали в среду, стабилизирующую флуоресцентную метку. Срезы анализировали с использованием флуоресцентного микроскопа LeicaQ500MC с встроенной цифровой фотокамерой (TCM 300F, Leica, Германия), с увеличением $\times 200$.

Статистическая обработка данных

Данные по содержанию белков представлены как средние $\pm SEM$, данные о содержании мРНК представлены в виде максимума, минимума и интерквартильной широты (0.25–0.75). Средние значения всех групп показаны в % от контроля. Чтобы проверить, были ли различия между группами статистически значимы, учитывая небольшой размер выборки и сравнения между двумя группами, был использован непараметрический U-критерий Манна–Уитни. Значение p менее 0.05 рассматривали как статистически значимое.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Атрофия волокон в условиях миопатии критических состояний происходит со средней скоростью 3–4% площади поперечного сечения волокна в день и связана с потерей филаментной структуры миозина [17]. Потеря этой структуры происходит до существенной деградации актина и белков цитоскелета и связана с повышенной экспрессией лизосомальных ферментов и убиквитина [17]. Изменения в иммуномаркировке десмина является надежным индикатором этих изменений, поскольку трехмерный нитевидный каркас, образуемый промежуточными филаментами, играет центральную роль в структурной и функциональной ориентировке и закреплении миофибрилл, расположении клеточных органелл и сигнальных событиях [18]. Проведенный нами иммуногистохимический анализ показал, что у 4 из 6 исследованных пациентов в хроническом критическом состоянии визуально были выявлены волокна с измененной гистологической картиной десмина. При этом аномальное окрашивание десмина не было зафиксировано у двух пациентов с наименьшей длительностью пребывания в хроническом критическом состоянии. Наблюдались следующие аномальные паттерны окрашивания на десмин: отсутствие иммунореактивности (рис. 1б, указано стрелками), снижение общей интенсивности сигнала десмина, наличие небольших субсарколеммальных и саркоплазматических агрегатов десмина (рис. 1б). Зафиксированные в данной работе аномалии соответствуют изменениям, которые часто наблюдаются при различных десминопатиях, где первичной клинической особенностью является прогрессирующая мышечная слабость [18–20]. Для миопатии критических состояний ранее была также показана повышенная иммунореактивность десмина в волокнах меньшего размера [17], которая наблюдалась и в данной работе (рис. 1).

Мы также наблюдали достоверное снижение содержания десмина на 69% (рис. 2а) и снижение содержания его мРНК (рис. 3а) на 24% в группе С1 относительно контроля. Распад десмина может быть связан с повышенной активностью кальпаина и

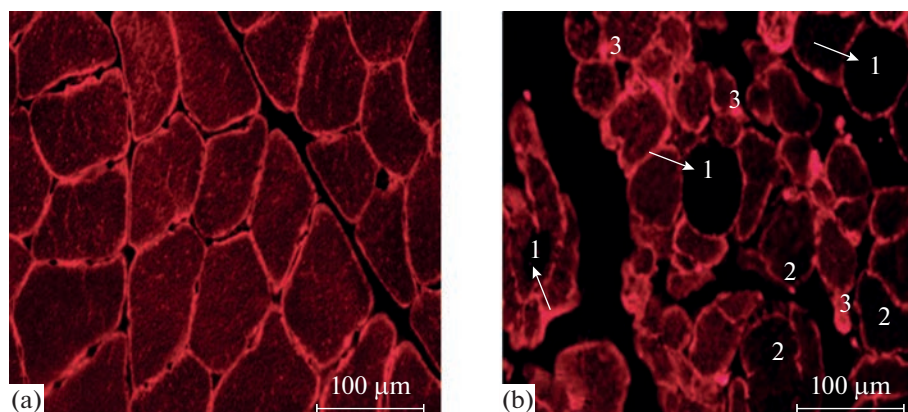


Рис. 1. Окрашивание волокон *m. soleus* на десмин у здоровых людей (a) и людей с СИМ (b). 1 — отсутствие иммуореактивности — десмин-негативные волокна, 2 — снижение общей интенсивности сигнала десмина, 3 — наличие небольших субсарколеммальных и саркоплазматических агрегатов десмина.

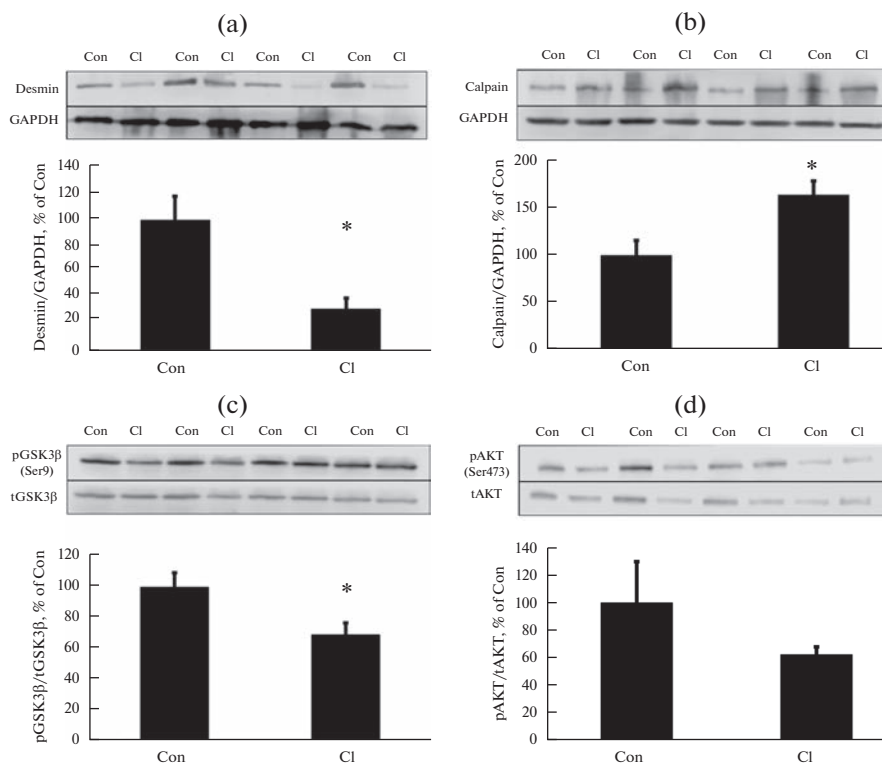


Рис. 2. Содержание десмина (a), кальпаина (b) и уровень фосфорилирования GSK3β (c) и АКТ (d). Соп — здоровые люди, СИ — критические состояния. Данные представлены в виде средних ± стандартная ошибка среднего. * — достоверное отличие от Соп.

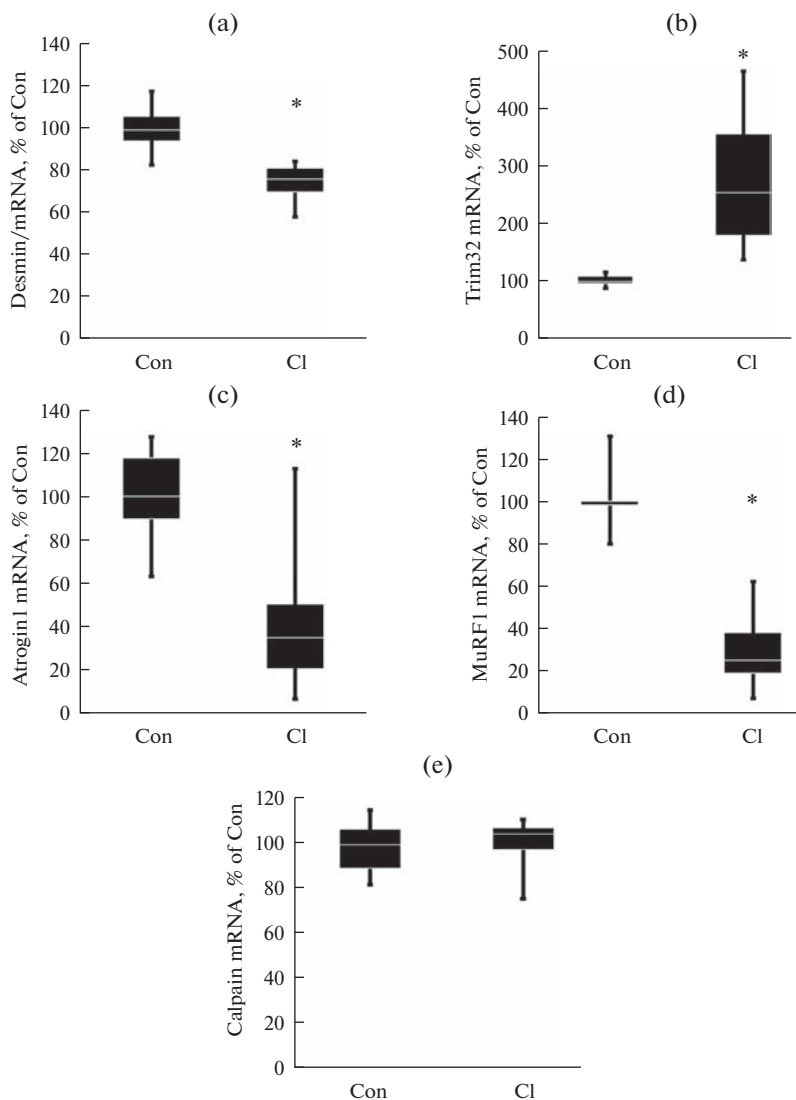


Рис. 3. Содержание мРНК десмина (а), Trim32 (b), Atrogin1 (с), MuRF1 (d), Calpain (е). Con – здоровые люди, CI – критические состояния. Данные представлены в виде максимума, минимума и интерквартильной широты (0.25–0.75). * – достоверное отличие от Con.

с активацией убиквитин-протеасомной системы. Содержание кальпаина-1 повышалось в условиях СИМ на уровне белка (рис. 2b), и не изменялось на уровне мРНК (рис. 3е). Фосфорилирование GSK3- β является начальным ключевым этапом селективной деполимеризации десминовых филаментов кальпаином-1 и, как следствие, потери миофибрилл [14]. В условиях СИМ наблюдалось достоверное снижение ингибирующего фосфорилирования GSK3- β (Ser9) (рис. 2с), которое осуществляется протеинкиназой В (АКТ). Активность АКТ, в свою очередь, определяется ее фосфорилированием по сайту Ser473, и в данной работе мы наблюдали тенденцию к его снижению (рис. 2d).

Потеря мышечной массы или мышечная атрофия происходит, когда деградация белка превышает синтез белка, и ключевым событием является влияние убиквитин-протеасомной системы. Две важнейших E3-убиквитинлигазы, которые были обнаружены при различных моделях разгрузки скелетных мышц, это специфичные для мышц Atrogin-1 и MuRF-1 [21–23]. Кроме того, в последнее время было показано участие в атрофических процессах скелетных мышц неспецифичной для мышц E3-убиквитинлигазы Trim32 [14]. В скелетной мышце на моделях механической разгрузки для этих трех убиквитинлигаз было зафиксировано убиквитинирование десмина [24–26]. Кроме того, рост Atrogin1 и MuRF1 был ранее показан на экспериментальной модели искусственной вентиляции легких грызунов в течение 4, 8 и 14 дней [27]. Изучение экспрессии Trim32 показало достоверное увеличение его мРНК на 155% (рис. 3b). При этом экспрессия Atrogin1 и MuRF1, наоборот, достоверно снизилась (рис. 3c, 3d). Ранее в работах с использованием модели гравитационной разгрузки мышц задних конечностей грызунов было показано, что рост экспрессии убиквитинлигаз MuRF1 и Atrogin1 постепенно снижается с увеличением длительности разгрузки. Так, после 3 сут вывешивания экспрессия этих убиквитинлигаз была выше контрольного уровня на 230 и 110% соответственно, к седьмым суткам уже на 27 и 52% [28], а с 14-х и по 28-е сут этот рост вообще отсутствовал. Также в экспериментах с иммобилизацией конечностей человека в течение двух недель был показан рост экспрессии MuRF1 и Atrogin1 [29], а на более поздних сроках эти убиквитинлигазы, наоборот, снижали свою экспрессию [30]. Исходя из этих фактов, мы считаем, что снижение экспрессии MuRF1 и Atrogin1 в проведенном эксперименте связан с высокой продолжительностью развития СИМ, и более важную роль начинает играть Trim32.

Таким образом, в данной работе мы наблюдали достоверное значительное снижение содержания десмина в условиях СИМ. Распад десмина может быть связан с увеличением его фосфорилирования с помощью GSK3 β и дальнейшим расщеплением кальпаином-1. Кроме того, мы зафиксировали повышенную экспрессию E3-убиквитинлигазы Trim32, активность которой, судя по литературным данным, также повышается после фосфорилирования десмина.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием людей, соответствуют этическим стандартам национального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 г. и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики. Забор биоптатов скелетных мышц проводили в диагностических целях с согласия законных представителей пациентов. Исследование одобрено локальным Этическим комитетом № 1411-20 (выписка из протокола заседания № 11-20 от 16 ноября 2020 г.) Национального медицинского исследовательского центра им. В.А. Алмазова.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект 22-25-00615).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией данной статьи.

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента Б.С.Ш., А.Н.К., Ю.М.З., С.А.К. Сбор материала биопсии С.А.К., Е.Н.С. Сбор данных С.А.Т., Е.Н.С., С.П.Б., К.А.З., О.Н.Т. Обработка

данных С.А.Т., С.П.Б., К.А.З., О.Н.Т. Написание и редактирование манускрипта С.А.Т., Б.С.Ш., Е.А.К., С.А.К., Ю.М.З.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают глубокую благодарность Е.М. Ледневу и Т.Ф. Вепхадзе за проведение игольчатой биопсии, К.К. Куканову, Н.Е. Войнову за выполнение забора биопсионного материала у исследуемой группы больных.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Nelson JE, Cox CE, Hope AA, Carson SS (2010) Chronic critical illness. *A J Respirat Crit Care Med* 182(4): 446–454.
<https://doi.org/10.1164/rccm.201002-0210CI>
2. van Erp WS, Lavrijsen JC, Vos PE, Bor H, Laureys S, Koopmans RT (2015) The vegetative state: prevalence, misdiagnosis, and treatment limitations. *J Am Med Dir Assoc* 16(1): e85–e89.
<https://doi.org/10.1016/j.jamda.2014.10.014>
3. Parfenov AL, Razzhivin VP, Petrova MV (2022) Chronic Critical Illness: Current Aspects of the Problem (Review). *Sovrem Tekhnol Med* 14(3): 70–81.
<https://doi.org/10.17691/stm2022.14.3.08>
4. Llano-Diez M, Cheng AJ, Jonsson W, Ivarsson N, Westerblad H, Sun V, Cacciani N, Larsson L, Bruton J (2016) Impaired Ca^{2+} release contributes to muscle weakness in a rat model of critical illness myopathy. *Critic Care Med* 20(1): 254.
<https://doi.org/10.1186/s13054-016-1417-z>
5. Bolton CF (2005) Neuromuscular manifestations of critical illness. *Muscle & Nerve* 32(2): 140–163.
<https://doi.org/10.1002/mus.20304>
6. Larsson L, Li X, Edstrom L, Eriksson LI, Zackrisson H, Argentini C, Schiaffino S (2000) Acute quadriplegia and loss of muscle myosin in patients treated with nondepolarizing neuromuscular blocking agents and corticosteroids: mechanisms at the cellular and molecular levels. *Critic Care Med* 28(1): 34–45.
<https://doi.org/10.1097/00003246-200001000-00006>
7. Latronico N, Tomelleri G, Filosto M (2012) Critical illness myopathy. *Curr Opin Rheumatol* 24(6): 616–622.
<https://doi.org/10.1097/BOR.0b013e3283588d2f>
8. Lacomis D, Zochodne DW, Bird SJ (2000) Critical illness myopathy. *Muscle & Nerve* 23(12): 1785–1788.
[https://doi.org/10.1002/1097-4598\(200012\)23:12<1785::aid-mus1>3.0.co;2-j](https://doi.org/10.1002/1097-4598(200012)23:12<1785::aid-mus1>3.0.co;2-j)
9. Meznaric M, Angelini C (2016) Intensive Care Unit-Acquired Weakness. In: *Angelini C* (ed) *Acquired Neuromuscular Disorders: Pathogenesis, Diagnosis and Treatment*. Springer Int Publ. Cham. 163–175.
https://doi.org/10.1007/978-3-319-29514-5_13
10. Addinsall AB, Cacciani N, Akkad H, Salah H, Tchkonja T, Kirkland JL, Larsson L (2021) JAK/STAT inhibition augments soleus muscle function in a rat model of critical illness myopathy via regulation of complement C3/3R. *J Physiol* 599(11): 2869–2886.
<https://doi.org/10.1113/JP281220>
11. Aare S, Radell P, Eriksson LI, Chen YW, Hoffman EP, Larsson L (2012) Role of sepsis in the development of limb muscle weakness in a porcine intensive care unit model. *Physiol Genom* 44(18): 865–877.
<https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00031.2012>
12. Henderson CA, Gomez CG, Novak SM, Mi-Mi L, Gregorio CC (2017) Overview of the Muscle Cytoskeleton. *Compr Physiol* 7(3): 891–944.
<https://doi.org/10.1002/cphy.c160033>
13. Capetanaki Y, Papathanasiou S, Diokmetzidou A, Vatsellas G, Tsikitis M (2015) Desmin related disease: a matter of cell survival failure. *Current Opin Cell Biol* 32: 113–120.
<https://doi.org/10.1016/j.ceb.2015.01.004>
14. Aweida D, Rudesky I, Volodin A, Shimko E, Cohen S (2018) GSK3-beta promotes calpain-1-mediated desmin filament depolymerization and myofibril loss in atrophy. *J Cell Biol* 217(10): 3698–3714.
<https://doi.org/10.1083/jcb.201802018>
15. Mirzoev TM, Sharlo KA, Shenkman BS (2021) The Role of GSK-3beta in the Regulation of Protein Turnover, Myosin Phenotype, and Oxidative Capacity in Skeletal Muscle under Disuse

- Conditions. *Int J Mol Sci* 22(10): 508.
<https://doi.org/10.3390/ijms22105081>
16. *Cohen S* (2020) Role of calpains in promoting desmin filaments depolymerization and muscle atrophy. *Bioch Biophys Acta Mol Cell Res* 1867(10): 118788
<https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2020.118788>
17. *Helliwell TR, Wilkinson A, Griffiths RD, McClelland P, Palmer TE, Bone JM* (1998) Muscle fibre atrophy in critically ill patients is associated with the loss of myosin filaments and the presence of lysosomal enzymes and ubiquitin. *Neuropathol Appl Neurobiol* 24(6): 507–517.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-2990.1998.00144.x>
18. *Clemen CS, Herrmann H, Strelkov SV, Schroder R* (2013) Desminopathies: pathology and mechanisms. *Acta Neuropathol* 125(1): 47–75.
<https://doi.org/10.1007/s00401-012-1057-6>
19. *Shah F, Franklin KA, Holmlund T, Levrang Jaghagen E, Berggren D, Forsgren S, Stal P* (2019) Desmin and dystrophin abnormalities in upper airway muscles of snorers and patients with sleep apnea. *Respir Res* 20(1): 31.
<https://doi.org/10.1186/s12931-019-0999-9>
20. *Carlsson L, Thornell LE* (2001) Desmin-related myopathies in mice and man. *Acta Physiol Scand* 171(3): 341–348.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-201x.2001.00837.x>
21. *Kisselev AF, Goldberg AL* (2001) Proteasome inhibitors: from research tools to drug candidates. *Chem Biol* 8(8): 739–758.
[https://doi.org/10.1016/s1074-5521\(01\)00056-4](https://doi.org/10.1016/s1074-5521(01)00056-4)
22. *Bodine SC, Baehr LM* (2014) Skeletal muscle atrophy and the E3 ubiquitin ligases MuRF1 and MAFbx/atrogen-1. *Am J Physiol Endocrinol Metabol* 307(6): E469–E484.
<https://doi.org/10.1152/ajpendo.00204.2014>
23. *Gomes MD, Lecker SH, Jagoe RT, Navon A, Goldberg AL* (2001) Atrogen-1, a muscle-specific F-box protein highly expressed during muscle atrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(25): 14440–14445.
<https://doi.org/10.1073/pnas.251541198>
24. *Baehr LM, Hughes DC, Lynch SA, Van Haver D, Maia TM, Marshall AG, Radoshevich L, Impens F, Waddell DS, Bodine SC* (2021) Identification of the MuRF1 Skeletal Muscle Ubiquitylome Through Quantitative Proteomics. *Function* 2(4): zqab029.
<https://doi.org/10.1093/function/zqab029>
25. *Lokireddy S, Wijesoma IW, Sze SK, McFarlane C, Kambadur R, Sharma M* (2012) Identification of atrogen-1-targeted proteins during the myostatin-induced skeletal muscle wasting. *Am J Physiol Cell Physiol* 303(5): C512–C529.
<https://doi.org/10.1152/ajpcell.00402.2011>
26. *Cohen S, Zhai B, Gygi SP, Goldberg AL* (2012) Ubiquitylation by Trim32 causes coupled loss of desmin, Z-bands, and thin filaments in muscle atrophy. *J Cell Biol* 198(4): 575–589.
<https://doi.org/10.1083/jcb.201110067>
27. *Akkad H, Corpeno R, Larsson L* (2014) Masseter muscle myofibrillar protein synthesis and degradation in an experimental critical illness myopathy model. *PloS One* 9(4): e92622.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0092622>
28. *Kachaeva EV, Shenkman BS* (2012) Various jobs of proteolytic enzymes in skeletal muscle during unloading: facts and speculations. *J Biomed Biotechnol* 2012: 493618.
<https://doi.org/10.1155/2012/493618>
29. *Jones SW, Hill RJ, Krasney PA, O'Conner B, Peirce N, Greenhaff PL* (2004) Disuse atrophy and exercise rehabilitation in humans profoundly affects the expression of genes associated with the regulation of skeletal muscle mass. *FASEB J: Official Publicat Federat Am Soc Exp Biol* 18(9): 1025–1027.
<https://doi.org/10.1096/fj.03-1228fje>
30. *de Boer MD, Selby A, Atherton P, Smith K, Seynnes OR, Maganaris CN, Maffulli N, Movin T, Narici MV, Rennie MJ* (2007) The temporal responses of protein synthesis, gene expression and cell signalling in human quadriceps muscle and patellar tendon to disuse. *J Physiol* 585(Pt 1): 241–251.
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.2007.142828>

Desmin Degradation in the Skeletal Muscle of Patients with Chronic Critical Illness

**S. A. Tyganov^{a,*}, K. A. Zaripova^a, O. V. Turtikova^a, E. N. Skiteva^{a,b}, S. P. Belova^a,
Yu. M. Zabrodskaya^b, S. A. Kondratiev^c, E. A. Kondratieva^{b,d},
A. N. Kondratiev^b, and B. S. Shenkman^a**

^a*Institute of Biomedical Problems, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia*

^b*Department of Anesthesiology and Intensive Care of the Russian National Institute of Chemistry, Saint Petersburg, Russia*

^c*AIMIS Healthcare Group, Clinic Athonitissa, Limassol, Cyprus*

^d*Kirov Military Medical Academy, Saint Petersburg, Russia*

^{*}*e-mail: s.a.tyganov@gmail.com*

Chronically critically ill patients lose a significant amount of muscle mass during their stay in the intensive care unit, which can have long-term detrimental consequences. This, among other factors, leads to the degradation of the muscle cytoskeleton's integrity, and at present there are no comprehensive studies that describe the mechanisms behind the development of this process. The purpose of this study was to investigate the signaling processes that contribute to the degradation of desmin in patients with critical illness myopathy (CIM). Incisional muscle biopsies were taken from the soleus muscle from 6 patients undergoing treatment at the A.L. Polenov Russian Research Institute - branch of the Almazov National Medical Research Center, with chronic impairment of consciousness (lasting at least 2 months). Muscle biopsies taken from healthy men using a needle biopsy technique were used as controls. Biopsies were frozen in liquid nitrogen for subsequent Western blot and PCR analysis, as well as immunohistochemical studies. The analysis showed that fibers with an altered histological pattern of desmin were visually identified in 4 out of 6 patients studied. We also observed a significant decrease in desmin content by 69% and a 24% decrease in its mRNA content in patients with CIM. Desmin breakdown may be associated with increased calpain activity and activation of the ubiquitin-proteasome system. In this study, the content of calpain-1 increased under conditions of CIM at the protein level, but remained unchanged at the mRNA level. We observed changes in GSK3- β (Ser9) phosphorylation, which is a crucial step in the depolymerization of desmin filaments by calpain-1. A study on ubiquitin ligases revealed a significant 155% increase in the expression of Trim32, along with a decrease in the expression of Atrogin1 and MuRF1. Thus, in this study, we observed a decrease in desmin content under conditions of CIM. The breakdown of desmin may be due to increased phosphorylation by GSK3 β and subsequent cleavage by calpain-1. In addition, we observed an increase in the expression of the E3 ubiquitin ligase Trim32, the activity of which, according to literature, also increases after phosphorylation of desmin.

Keywords: chronic disorder of consciousness, chronic critical illness, skeletal muscle, desmin, critical illness myopathy, ubiquitin ligases, proteolysis