

На правах рукописи

ЗАРИПОВА КСЕНИЯ АСХАТОВНА

**АТФ-ЗАВИСИМАЯ РЕГУЛЯЦИЯ СИГНАЛЬНЫХ ПУТЕЙ
В СКЕЛЕТНЫХ МЫШЦАХ ПРИ МОДЕЛИРУЕМОЙ
ГРАВИТАЦИОННОЙ РАЗГРУЗКЕ**

3.3.7. Авиационная, космическая и морская медицина

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2024

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Государственном научном центре Российской Федерации – Институте медико-биологических проблем Российской академии наук.

Научный руководитель:

Белова Светлана Павловна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории миологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Государственного научного центра Российской Федерации – Института медико-биологических проблем Российской академии наук

Официальные оппоненты:

Балезина Ольга Петровна, доктор биологических наук, профессор кафедры физиологии человека и животных биологического факультета ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»

Вихлянец Иван Милентьевич, доктор биологических наук, главный научный сотрудник с возложением обязанностей заведующего лабораторией структуры и функций мышечных белков ФГБУН Института теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук

Ведущая организация:

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Казанский (Приволжский) федеральный университет»

Защита диссертации состоится «3» октября 2024 г. в _____ часов на заседании диссертационного совета Д 24.1.023.01 в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Государственном научном центре Российской Федерации – Институте медико-биологических проблем Российской академии наук по адресу: 123007, г. Москва, Хорошевское шоссе, 76 А.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения науки Государственном научном центре Российской Федерации – Институте медико-биологических проблем Российской академии наук и на сайте:

<http://www.imbp.ru/WebPages/win1251/ScienceN/DisserSov/Zaripova2024/Zaripova.html>

Автореферат разослан «__» _____ 2024 г.

Ученый секретарь диссертационного совета:
кандидат биологических наук

Светлана Викторовна Поддубко

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

Скелетная мышца обладает пластичностью и способна отвечать атрофией на состояние функциональной разгрузки, вызванное микрогравитацией, иммобилизацией, повреждением нерва, а также длительным постельным режимом, связанным с различными патологическими состояниями. Атрофия скелетных мышц сопровождается снижением диаметра мышечных волокон, изменениями в содержании белка, снижением силы и увеличением утомляемости (Baldwin, Haddad, 2002; Fitts *et al.*, 2000; Fluck, Hoppeler, 2003). По современным представлениям, мышечная атрофия – результат увеличения деградации белка и снижения его синтеза (Glass, 2003; Vodine, Baehr, 2014; Мирзоев, Шенкман, 2018; Shenkman, 2020). При гипокинезии скелетные мышцы подвергаются атрофии в результате снижения или полного прекращения сократительной активности (Шенкман и соавт., 2020). Недавно в нашей лаборатории было показано, что даже непродолжительное нахождение крыс в клетках ограниченного размера вызывает атрофию «быстрых» скелетных мышц и набор веса тела животного (Белова и соавт., 2021). Исследование причины атрофии мышц и разработка способов её профилактики актуальны, особенно когда большие популяции людей столкнулись с условиями ограничения подвижности, что оказало негативное влияние на состояние здоровья.

Для разработки способов предотвращения развития атрофического процесса необходимо выявить фундаментальные механизмы его инициирования. В недавних работах показано, что изменения внутриклеточных сигнальных путей происходят в первые дни и даже часы функциональной разгрузки мышц (Мирзоев, Шенкман, 2018; Shenkman, 2020). Известно, что экспрессия основных мышечных E3-убиквитинлигаз, участвующих в процессе деградации белка, значительно повышается через 24 часа разгрузки мышц и достигает пика к 3-м суткам (Kachaeva, Shenkman, 2012; Tyganov *et al.*, 2019; Shenkman, 2020). Поэтому имеет смысл исследовать ранние этапы развития этого процесса для разработки эффективных средств его профилактики, так как физиологические механизмы, активизирующие эти процессы не полностью понятны.

При длительной функциональной разгрузке мышц происходит накопление макроэргических фосфатов (Gupta *et al.*, 1989; Wakatsuki *et al.*, 1994) и ионов Ca^{2+} в мышечных волокнах (Ohira *et al.*, 1994; Shenkman, Nemirovskaya, 2008; Ingalls *et al.*, 1999). Однако недавно было обнаружено, что фосфорилирование сенсора аденозинтрифосфата (АТФ) АМФ-активируемой протеинкиназы (AMP activated protein kinase, АМПК) снижается на 1-3 сутки функциональной разгрузки (Vilchinskaya *et al.*, 2018). Кроме того, было показано, что разгрузка мышц вызывает снижение мембранного потенциала покоя в *musculus soleus*, и это сопровождается накоплением ионов кальция в саркоплазме уже после 3 дней разгрузки (Kravtsova *et al.*, 2015). Мы предположили, что эти процессы могут быть стимулами, запускающими процесс атрофии мышц.

В экспериментах на культуре мышечных клеток было обнаружено, что в мышечных волокнах внеклеточный АТФ активирует мембранный сигнальный каскад, который в конечном итоге, высвобождая Ca^{2+} , регулирует экспрессию генов (Casas *et al.*, 2014). Было показано, что АТФ, который оказывается в межклеточном пространстве, вызывает отставленное медленное высвобождение кальция через путь P2Y2-PLC-IP3 (Рисунок 1) (Liu *et al.*, 2018; Casas *et al.*, 2014).

Возникает вопрос каким образом подобный механизм может работать в скелетных мышцах при атрофии? При

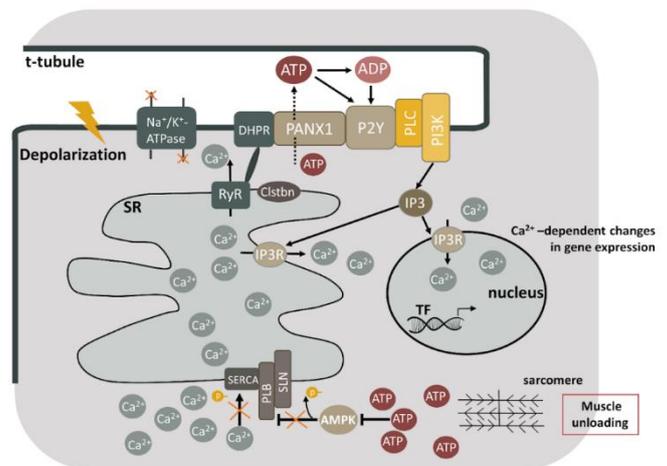


Рисунок 1 – Молекулярные механизмы АТФ-зависимой передачи сигналов в скелетных мышцах

функциональной разгрузке АТФ через паннексиновые каналы (Panx1) может выходить во внеклеточное пространство. Эти нуклеотиды затем могут взаимодействовать с каналами P2Y, которые в свою очередь активируют фосфоинозитид-3-киназу гамма (PI3K) в T-каналах мембраны и, в конечном итоге, рецепторы инозитолтрифосфата (IP3R), находящиеся в ядре и саркоплазматическом ретикулуме. Активация IP3R может вызывать слабый сигнал высвобождения кальция как цитозольный, так и нуклеоплазматический, который способствует (возможно, с другими сигнальными каскадами) активации транскрипционных факторов, что приводит к изменению экспрессии ключевых генов скелетной мышцы (Рисунок 1).

Итак, мы впервые предположили, что АТФ и кальций-зависимый сигналинг на ранних этапах функциональной разгрузки могут быть центральными интеграторами всех стимулов, которые активируют запуск внутриклеточных сигнальных путей атрофических процессов. Мы впервые рассмотрели данный сигнальный путь в экспериментах *in vivo* на модели функциональной разгрузки мышц крыс в следующих экспериментах:

1. Эксперимент с ингибированием паннексиновых каналов при трёхдневной функциональной разгрузке крыс Wistar.
2. Эксперимент с ингибированием пуринергических P2Y1 и P2Y2 рецепторов при трёхдневной функциональной разгрузке крыс Wistar.
3. Эксперимент с ингибированием PI3K при трёхдневной функциональной разгрузке крыс Wistar.

Цель и задачи исследования

Цель нашей работы – исследовать АТФ-зависимые пути регуляции сигналинга скелетных мышц при их функциональной разгрузке.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

1. Измерить содержание АТФ в *m. soleus* крыс на коротких сроках (сутки, трое суток) функциональной разгрузки.
2. Оценить роль паннексиновых каналов в регуляции катаболических и анаболических сигнальных путей при 3-суточной функциональной разгрузке *m. soleus* крысы с помощью селективного ингибирования паннексиновых каналов пробенецидом.
3. Проанализировать участие рецепторов P2Y1 и P2Y2 в регуляции атрофических процессов при 3-суточной функциональной разгрузке *m. soleus* крысы с помощью селективных антагонистов этих рецепторов – MRS2179 и AR-C 118925XX.
4. Исследовать роль PI3K в регуляции атрофических процессов при 3-суточной функциональной разгрузке *m. soleus* крысы с помощью селективного ингибитора LY294002.

Научная новизна

Впервые показано, что на ранних этапах функциональной разгрузки происходит накопление АТФ в мышцах. Паннексиновые каналы участвуют в АТФ-зависимом транспорте при функциональной разгрузке мышц. Panx1-опосредованный транспорт АТФ влияет на экспрессию мышечно-специфичных E3-убиквитинлигаз MuRF1 и MAFbx, и регулирует сигнальные пути, контролирующие процессы трансляции и элонгации белка.

Впервые показано, что P2Y1/2 рецепторы участвуют в регуляции атрофического процесса и клеточного сигналинга при функциональной разгрузке мышц. Ингибирование как P2Y1, так и P2Y2 предотвращает накопление АТФ и регулирует интенсивность синтеза белка. Предотвращение атрофии *m. soleus* при вывешивании крыс с ингибированием рецепторов P2Y2 в большей степени связано с ингибированием катаболических процессов и влиянием на энергетический гомеостаз, чем с изменением анаболического сигналинга. Ингибирование рецепторов P2Y1 препятствует активации p38MAPK и замедляет экспрессию мРНК E3-лигазы MuRF1.

Впервые показано, что PI3K участвует в регуляции сигналинга при функциональной разгрузке *m. soleus*. Ингибирование PI3K при функциональной разгрузке предотвращает накопление АТФ и замедляет атрофию *m. soleus* путем снижения скорости элонгационных

процессов и замедления экспрессии ЕЗ-лигаз и убиквитина, а также регулирует активность кальций-зависимых сигнальных путей при функциональной разгрузке мышц.

Впервые показано, что АТФ может являться триггером для изменения экспрессии генов при функциональной разгрузке мышц. В передаче сигнала участвуют последовательно находящиеся в плазмолемме каналы Panx1, рецепторы P2Y1/2 и P13K.

Научно-практическая значимость

Исследование АТФ-зависимых путей регуляции сигналинга скелетных мышц при их функциональной разгрузке - фундаментальное направление в мышечной физиологии, которое может найти приложение в неврологии, экстремальной и реабилитационной медицине, геронтологии. Новые данные о работе ключевых сигнальных путей в скелетной мышце, подвергшейся атрофии, могут изменить традиционную парадигму о фармацевтических мишенях для её лечения при разгрузке, вызванной постельным режимом, космическим полётом или иммобилизацией. Результаты исследования можно будет использовать для разработки новых препаратов, ингибирующих работу паннексиновых каналов, P2Y и IP3 рецепторов при функциональной разгрузке мышц для снижения степени атрофии или её предотвращения. Кроме того, полученные данные могут существенно расширить представление о фундаментальных механизмах развития атрофических процессов в мышце и позволит разработать подходы фармакологической коррекции негативных последствий гипокинезии и гравитационной разгрузки. Исследование работы Panx1-P2Y-IP3 пути позволит найти терапевтическую мишень для профилактики и лечения мышечной атрофии. По результатам работы зарегистрировано два патента: 1. “Способ предотвращения атрофии скелетных мышц при их функциональной разгрузке” №2797216; 2. “Способ предотвращения развития утомления скелетной мышцы” (рег. № 2023114128).

Положения, выносимые на защиту

1. На ранних этапах функциональной разгрузки происходит накопление АТФ в мышцах.
2. Часть молекул АТФ в условиях функциональной разгрузки транспортируются через паннексиновые каналы в интерстициальное пространство, и, взаимодействуя с пуринорецепторами, принимают участие в регуляции экспрессии ЕЗ-лигаз и анаболических сигнальных путей.
3. P13K при функциональной разгрузке мышц регулирует активность сигнальных путей, зависимых от кальция и регулирующих белковый гомеостаз.

Степень достоверности результатов проведённых исследований

Диссертационная работа выполнена с использованием современных методов биохимии и молекулярной биологии, к результатам которых была применена адекватная статистическая обработка данных.

Апробация работы

Результаты исследований и основные положения работы были представлены и обсуждены на: Aerospace and Environmental Medicine. XXII International Symposium Human in Space 2021; Международной конференции “Рецепторы и внутриклеточная сигнализация” 2021; Всероссийской с международным участием школы-конференции по физиологии мышц и мышечной деятельности, посвященной памяти И.Б. Козловской и приуроченной к году науки и технологий, Москва, 2021; V Российском симпозиуме с международным участием “Клеточная сигнализация: итоги и перспективы” Казань 2021; Virtual European Muscle Conference, Warsaw, 2021; XIX Конференции молодых ученых, специалистов и студентов, посвященной 60-летию первого полета человека в космос 2021, г. Москва; 49th European Muscle Conference (Prague, Czech Republic) 2022; IX Российской конференции с международным участием по управлению движением, посвященной 95-летию со дня рождения И. Б. Козловской 2022; III объединенном научном форуме физиологов, биохимиков и молекулярных биологов (Сочи, 2021); XX Конференции молодых учёных, специалистов и студентов с международным участием, посвященной 165-летию со дня рождения К. Э. Циолковского; Всероссийской конференции с

международным участием “Интегративная физиология” Санкт-Петербург, 2022; VII Съезде биофизиков России, 2023 (г. Краснодар); 12-ой международной конференции "Рецепторы и внутриклеточная сигнализация" Пущино 22-26 мая 2023 г.; 42nd Annual ISGP Meeting Abstract book. 2-7 July 2023, Antwerp, Belgium; XXIV съезд Физиологического общества им. И.П. Павлова, Санкт-Петербург, 2023.

По теме диссертации опубликовано 19 научных работ. Среди них 4 статьи опубликованы в журналах из Перечня ведущих российских рецензируемых научных журналах и изданиях, рекомендованных ВАК, в том числе 2 статьи в журналах, индексируемом базами данных WoS и Scopus, 1 свидетельство о государственной регистрации патентов, 15 тезисов докладов.

Связь работы с научными программами

Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ №20-015-00138 и РНФ №21-15-00228

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 115 странице машинописного текста, состоит из введения, 3 глав, заключения, выводов и списка литературы, включающего 248 источников, из них 6 на русском и 242 на иностранном языке, содержит 35 рисунков и 3 таблицы.

ОРГАНИЗАЦИЯ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

При моделировании функциональной разгрузки скелетных мышц использовалась широко применяемая во всем мире методика Ильина-Новикова в модификации Morey-Holton.

Вывешивание задних конечностей делалось так, что задние конечности крыс не касались пола, а передние свободно опирались на пол и животные свободно передвигались. Крысы были подвешены на специальных мягких шинках. Данные показывают, что при таком способе проведения вывешивания животные не подвергаются стрессу, кровообращение хвоста не нарушается. Пищу и воду животные получали *ad libitum*. По окончании эксперимента крыс наркотизировали сверхдозой авертина (5 мл/кг веса 10 % раствора), *m.soleus* немедленно замораживали в жидком азоте и хранили при -85°C.

Введение ингибитора паннексиновых каналов на фоне трехсуточного вывешивания

Для изучения роли паннексиновых каналов крысам при вывешивании в течение трех суток вводился ингибитор этих каналов пробенецид (PRB), (Biokanol Pharma GmbH, Германия). Для проведения эксперимента 24 самца крыс Wistar массой 180-200 г. были случайным образом распределены на 3 группы по 8 животных в каждой: интактный контроль (С), 3-х суточное вывешивание с введением плацебо (Н), 3-х суточное вывешивание с введением ингибитора PRB (Р). Проведение эксперимента получило одобрение комиссии РАН по биомедицинской этике (протокол №537 от 18.02.2020). Животные экспериментальных групп получали пробенецид в дозе 50 мг/кг массы тела в сутки перорально при помощи зонда в течение 3 дней (Burma *et al.*, 2017; Carrillo-Mora *et al.*, 2010). Животные других групп получали плацебо.

Введение ингибиторов рецепторов P2Y2 и P2Y1 на фоне трехсуточного вывешивания

Для проверки роли рецепторов P2Y2 и P2Y1 в развитии атрофических процессов мы блокировали и эти рецепторы (чувствительные к адениловым нуклеотидам) при вывешивании крыс специфическими ингибиторами AR-C118925XX и MRS2179. Данные специфические ингибиторы появились недавно и используются впервые при моделировании функциональной разгрузки крыс. 32 самца крыс линии Wistar случайным образом были распределены на 4 группы по 8 крыс в каждой гр.: контроль (С) с введением плацебо (10% DMSO в физ. растворе, объём инъекции – 400 мкл), 3-суточное вывешивание (HS) с введением плацебо, 3-суточное вывешивание с введением ингибитора P2Y2 рецепторов AR-C 118925XX (10 мг/кг в день в 10% DMSO в физ. растворе, внутривентриально) (А) (Hu *et al.*, 2019), 3-суточное вывешивание с введением неселективного ингибитора семейства P2Y-рецепторов MRS2179 (25 мг/кг в день в 10% DMSO в физ. растворе, внутривентриально) (М) (Liu *et al.*, 2014). Эксперимент был одобрен

комиссией по биомедицинской этике ГНЦ РФ ИМБП РАН (протокол №585 от 31.05.2021) и соответствует современным нормам и стандартам работы с животными.

Введение ингибитора РІЗК на фоне трехсуточного вывешивания

Для изучения роли РІЗК в АТФ-зависимой регуляции сигналинга скелетных мышц при их функциональной разгрузке применялся ингибитор LY294002. 24 самца крыс линии Wistar случайным образом были распределены на 3 группы по 8 крыс в каждой гр.: контроль (С) с введением плацебо (10% DMSO в физрастворе, объём инъекции – 400 мкл), 3-суточное вывешивание (HS) с введением плацебо, 3-суточное вывешивание с введением ингибитора РІЗК LY294002 (30 мг/кг в день в 10% DMSO в физрастворе, внутривенно) (LY) (Su *et al.*, 2003). Эксперимент был одобрен комиссией по биомедицинской этике ГНЦ РФ ИМБП РАН (протокол № 617 от 22.06.2022) и соответствует современным нормам и стандартам работы с животными.

Выделение белка. Электрофорез с последующим вестерн-блоттингом

С каждого образца *m. soleus* 10-15 мг ткани прогомогенизированы в 125 мкл лизирующего буфера RIPA (Santa-Cruz, USA), протеазного ингибиторного коктейль (Santa-Cruz, USA) и фосфотазного ингибиторного коктейль (Santa-Cruz, USA). Цитоплазматическая фракция белков была выделена с помощью набора NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents («Thermo Fisher Scientific», США). Образцы для нанесения разводились в 2х-кратном Laemmli буфере.

Электрофорез проводили в 10%-ном разделяющем полиакриламидном геле (ПААГ).. Электроперенос белков проводился на нитроцеллюлозную мембрану при 100 V при температуре 4°C в системе mini Trans-Blot («Bio-Rad Laboratories») в течение 2 часов. После электропереноса НЦ-мембраны инкубировались в течение 5 минут в 0,3%-ом растворе Ponceau Red в 5%-ой уксусной кислоте, Мембраны блокировались в растворе 5%-го сухого молока («Bio-Rad Laboratories») в PBST 1 час при комнатной температуре, затем помещались в раствор первичных антител на ночь на +4°C. Затем мембрана отмывалась от первичных антител в PBST 3 раза по 5 минут на шейкере и инкубировалась 1 час с вторичными антителами. Хемилюминисцентный сигнал детектировался с помощью современного сканера C-DiGit Blot Scanner (LI-COR, США). Полученные на сканере изображения обрабатывались с помощью прилагаемого программного обеспечения Image Studio Software (LI-COR) для получения количественных данных для анализа.

Содержание АТФ в мышце

Для определения содержания АТФ в мышце использовался набор ATP Colorimetric / Fluorometric Assay Kit (МАК190; Sigma, St. Louis, MO, США).

Концентрация АТФ рассчитывалась по следующей формуле:

Концентрация АТФ = $B * DDF / V$, где

B - количество АТФ в лунке с образцом, рассчитанное по стандартной кривой;

V - объем пробы, добавленный в лунки (50 мкл в нашем случае);

DDF - deproteinization dilution factor – фактор разведения, считался по формуле:

$DDF = (500 \text{ мкл} + \text{объем KOH (мкл)}) / \text{начальный объем пробы}$.

Исследование экспрессии генов.

Для выделения тотальной РНК из скелетных мышц была использована широко применяемая во всем мире методика выделения РНК на микроколонках «RNeasy Micro» («Qiagen», Германия). Производилась нарезка 10-16 мкг *m. soleus* крысы на микротоме при толщине срезов 20 мкм. Для элюции на мембрану колонки наносилось 30 мкл воды. Эппендорф с водным раствором РНК немедленно был помещен в лёд, а затем на хранение в криохранилище (-85°C). Концентрация мРНК определялась по поглощению раствора мРНК при помощи спектрофотометра NanoPhotometer IMPLN.

Обратная транскрипция.

Для проведения обратной транскрипции были с использованием набора RevertAid RT Kit (Thermo Fisher Scientific, USA). Для проведения обратной транскрипции использовался амплификатор (CFX96 Touch, «Bio-Rad Laboratories») со следующей программой: 10 мин при 25°C, 60 мин при 42°C, 5 мин при 95°C. После проведения реакции образцы, содержащие кДНК, хранились при -25°C.

Проведения ПЦР в реальном времени.

Для проведения ПЦР в реальном времени использовался набор фирмы «Синтол» SYBR Green I. Все праймеры были синтезированы фирмой «Синтол» (Россия).

Относительное количественное определение проводили на основе порогового цикла (СТ) для каждого образца ПЦР (Pfaffl, 2001). Для анализа полученных с помощью ПЦР в реальном времени данных применялось относительное количественное определение исследуемого гена, нормализованное к референсному, метод 2- $\Delta\Delta C_t$ (метод Ливака). В качестве референсного гена был использован RPL19, экспрессия которого постоянна в *m. soleus* в условиях эксперимента.

Статистический анализ данных.

Статистическая обработка данных производилась с помощью программы REST 2009 v.2.0.12 и OpenOffice.org Calc, находящихся в свободном доступе. Для проверки нормальности распределения выборки использовался тест Шапиро-Уилка. Значимость отличий между группами определялась с помощью критерия Краскела-Уоллиса. В тексте и на гистограммах результаты анализа экспрессии представлены в виде медианы и интерквартильного размаха, результаты анализа относительного содержания белков с помощью вестерн-блоттинга и содержания АТФ представлены в виде среднего значения и ошибки среднего. Статистически значимыми различия считали при уровне достоверности $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Содержание АТФ в камбаловидной мышце на начальных этапах функциональной разгрузки

На первом этапе работы мы проверяли гипотезу о накоплении АТФ в мышцах на коротких сроках разгрузки. Мы обнаружили повышение содержания АТФ на 32% на третьей сутки функциональной разгрузки *m. soleus* относительно группы контроля, тогда как после суток вывешивания содержание АТФ не изменилось (Рисунок 2). Мы впервые показали, что на коротких сроках разгрузки (3 суток) происходит накопление АТФ в *m. soleus*.

Мы исследовали возможные механизмы АТФ-зависимой регуляции путей анаболического и катаболического сигналинга скелетных мышц при их функциональной разгрузке. И, в частности, влияет ли трафик АТФ через паннексиновые каналы на регуляцию этого сигналинга.

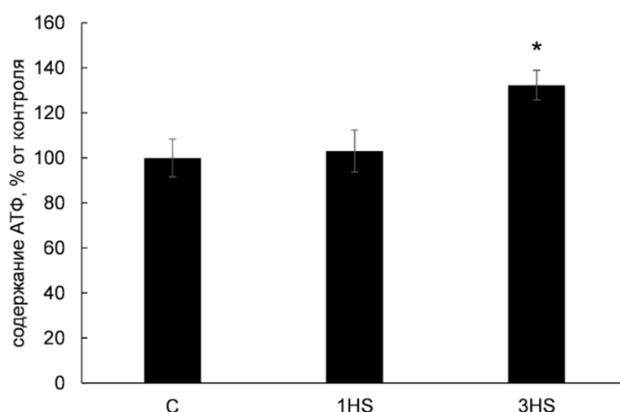


Рисунок 2 – Содержание АТФ в *m. soleus* на фоне суточного и трехсуточного вывешивания. С – контроль; 1HS – вывешивание 24 часа; 3HS – вывешивание 3 суток. * – значимое отличие от контроля ($p < 0,05$)

Роль PANX1 каналов в регуляции сигналинга в камбаловидной мышце при гравитационной разгрузке

Влияние пробенецида на вес разгруженной мышцы, содержание АТФ и экспрессию PANX1

Через 3 дня вывешивания вес *m. soleus* был снижен на 16 и 18% ($p < 0,05$) в обеих вывешенных группах. Ингибирование паннексиновых каналов не влияло на изменение веса *m. soleus* при вывешивании крыс, так как масса мышц в них снижалась так же, как при вывешивании с введением плацебо. В то же время мы обнаружили повышенное содержание АТФ в *m. soleus* к третьему дню вывешивания групп HS и P (на 32 и 52% соответственно) относительно группы контроля ($p < 0,05$).

Известно, что в мышечных волокнах АТФ выходит из клетки через паннексиновые каналы во внеклеточное пространство (MacVicar, Thompson, 2010; Penuela *et al.*, 2013; Dahl, 2015), а при разгрузке накапливается вследствие неиспользования. Блокирование паннексиновых

каналов при 3-дневной разгрузке в нашем эксперименте привело к 20-процентному повышению содержания АТФ в *m.soleus* (Рисунок 3А).

Мы обнаружили повышенную экспрессию мРНК *Panx1* только в группах вывешивания с ингибированием каналов после 3 суток (гр. Р, $p < 0,05$) на 44% по сравнению с группой интактного контроля (Рисунок 3Б). Мы полагаем, что повышенная экспрессия *Panx1* в *m.soleus* группы Р могла быть компенсаторной реакцией в ответ на угнетение функции каналов.

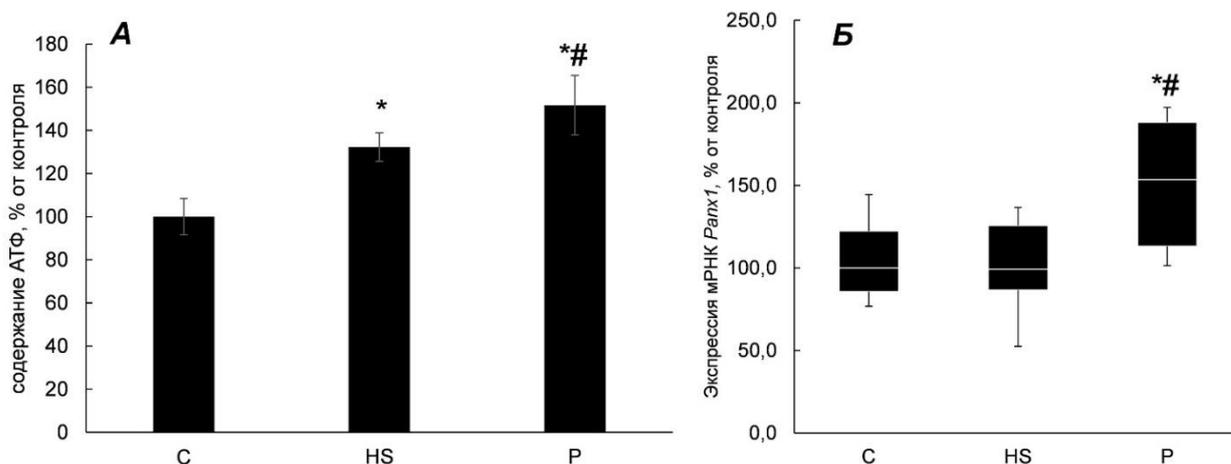


Рисунок 3 – Содержание АТФ и экспрессия мРНК паннексина в *m.soleus* при введении пробенецида на фоне 3-х суточного вывешивания.

C – контроль; HS – вывешивание 3 суток; P – вывешивание 3 суток + пробенецид; * – значимое отличие от контроля ($p < 0,05$); # – значимое отличие от группы HS ($p < 0,05$)

Влияние пробенецида на содержание катаболических сигнальных маркёров и их регуляцию

Мы впервые обнаружили более низкую экспрессию E3 лигаз MAFbx (которая участвует в убиквитинировании некоторых цитоскелетных белков) и MuRF1 (которая участвует в убиквитинировании сократительных белков миозинов) в ответ на ингибирование паннекссиновых каналов и накопление АТФ в волокне при функциональной разгрузке *m.soleus* крыс. В группе HS экспрессия MAFbx и MuRF1 была существенно повышена относительно группы контроля на 65 и 59% соответственно ($p < 0,05$). Экспрессия MuRF1 в группе Р снижена на 37% ($p < 0,05$) относительно группы, вывешенной без препарата HS (Рисунок 4А). Экспрессия MAFbx также была существенно снижена в группе Р относительно группы HS (на 38%, $p < 0,05$, Рисунок 4Б).

Мы предполагаем, что изменение экспрессии мРНК E3-лигаз может быть связано с активацией пуринергических рецепторов экзогенными агонистами, которые могут вызывать выход кальция, зависящий от активации сигнального пути IP3 (Maу et al., 2006). Мы впервые обнаружили свидетельства изменения регуляции экспрессии генов при ингибировании паннекссиновых

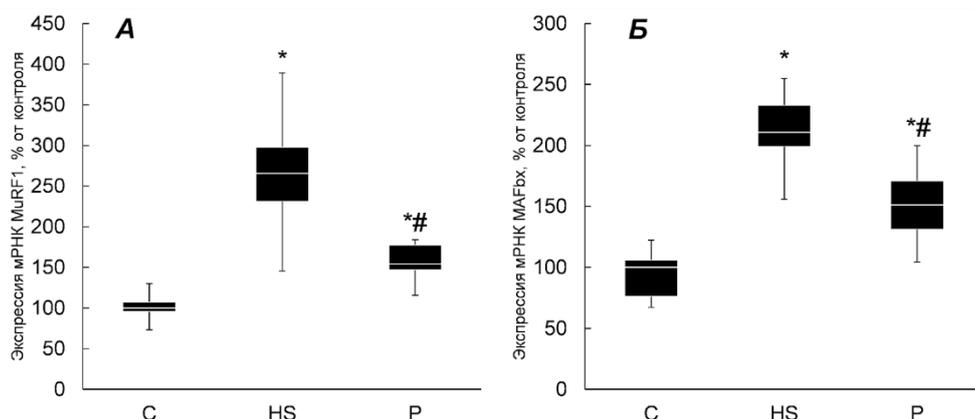


Рисунок 4 – Экспрессия мРНК MAFbx и MuRF1 в *m.soleus* при введении пробенецида на фоне 3-х суточного вывешивания.

C – контроль; HS – вывешивание 3 суток; P – вывешивание 3 суток + пробенецид; * – значимое отличие от контроля ($p < 0,05$); # – значимое отличие от группы HS ($p < 0,05$)

свидетельства изменения регуляции экспрессии генов при ингибировании паннекссиновых

каналов, осуществляющих транспорт макроэргических фосфатов во внеклеточное пространство во время 3-дневной разгрузки *m. soleus*.

Миогенин (MYOG) может участвовать в увеличении экспрессии E3-лигаз MuRF-1 и MAFbx/atrogen-1 при денервации мышц (Moresi *et al.*, 2010; Bricceno *et al.*, 2012; Furlow *et al.*, 2013) и прямо взаимодействовать с их промоторами.

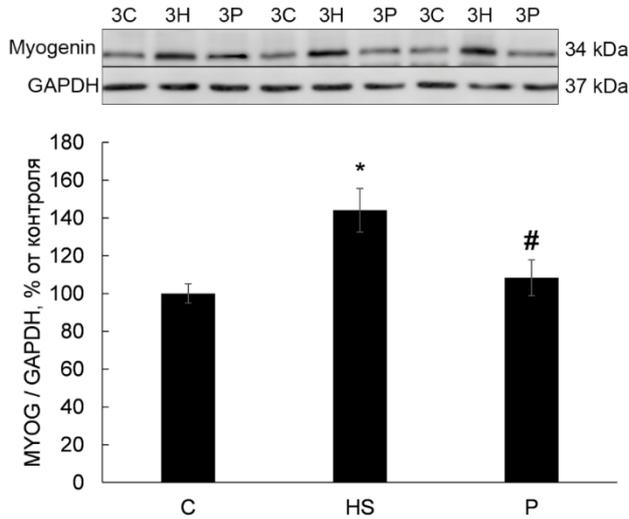


Рисунок 5 – Содержание миогенина в *m. soleus* при введении пробенецида на фоне 3-х суток вывешивания.

C – контроль; HS – вывешивание 3 суток; P – вывешивание 3 суток + пробенецид; * – значимое отличие от контроля ($p < 0,05$); # – значимое отличие от группы HS ($p < 0,05$)

Мы обнаружили повышение содержания миогенина при трехсуточном вывешивании на 44% относительно группы контроля. В группе P содержание миогенина достоверно не отличалось от группы контроля и было достоверно ниже, чем в группе HS ($p < 0,05$, Рисунок 5). Более низкая экспрессия E3-лигаз в группе P, вероятно, была связана с пониженным содержанием у них транскрипционного фактора миогенина, т.к. именно в этих группах его уровень ниже уровня контроля и вывешивания с введением плацебо.

Экспрессия E3-лигаз может регулироваться не только MYOG, но и FOXO3 (Furlow *et al.*, 2013). В отличие от миогенина, содержание фосфорилированной формы транскрипционного фактора FOXO3 было существенно более низким в группах HS и P относительно группы контроля (на 58 и 68% соответственно) ($p < 0,05$). Можно заключить, что в нашем эксперименте в регуляции экспрессии MuRF1 и MAFbx в группах с ингибированием

паннексиновых каналов принимал участие транскрипционный фактор миогенин, но не FOXO3.

Влияние пробенецида на содержание анаболических сигнальных маркеров и сигнальные каскады, регулирующие мышечный гомеостаз

eEF2 является ключевым компонентом аппарата трансляции белков. Гиперфосфорилирование eEF2 препятствует его связыванию с рибосомой, тем самым снижая скорость элонгации. eEF2K может фосфорилировать eEF2, предотвращая его транслокацию в ядро и блокируя элонгацию и белковый синтез (Bodine, 2013). Активность eEF2K регулируется с помощью фосфорилирования киназами p70S6K и p90RSK (Bodine, 2013) и кальций и

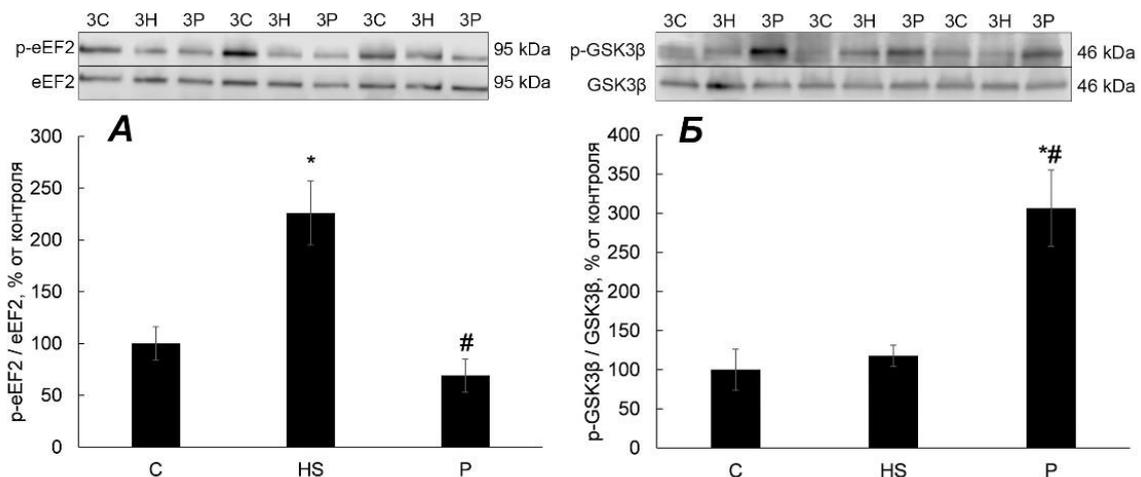


Рисунок 6 – Уровни фосфорилирования eEF2 и GSK3β в *m. soleus* при введении пробенецида на фоне 3-х суток вывешивания.

C – контроль; HS – вывешивание 3 суток; P – вывешивание 3 суток + пробенецид; * – значимое отличие от контроля ($p < 0,05$); # – значимое отличие от группы HS ($p < 0,05$)

кальмодулин-зависимыми процессами (Rose *et al.*, 2009). Ранее было обнаружено увеличение содержания p-eEF2 после вывешивания крыс (Shenkman *et al.*, 2015; Lomonosova *et al.*, 2017, Tuganov *et al.*, 2019). На третьи сутки вывешивания в группе с введением пробенецида (P) уровень фосфорилирования eEF2 был существенно ниже, чем в группе HS и не отличался от группы контроля (Рисунок 6А).

GSK-3 β выполняет множество функций в клетке. Ингибирование гликоген синтазы с помощью GSK-3 β приводит к снижению синтеза гликогена в мышце и развитию патологических состояний. Известно, что GSK-3 β взаимодействует более, чем со 100 белками, многие из которых он фосфорилирует, что затем приводит к их убиквитинированию (Robertson *et al.*, 2017). Обнаружено повышенное содержание фосфорилированной формы GSK-3 β в группе с ингибированием паннексинных каналов (P) относительно группы интактного контроля и группы вывешивания (на 206 и 188% соответственно, $p < 0,05$, Рисунок 6Б). В группе HS уровень фосфорилирования не отличался от группы С. Интересно отметить, что в группе, где GSK-3 β гиперфосфорилирован, экспрессия Е3-лигаз ниже, чем в группах вывешивания без ингибирования паннексинных каналов.

Мы исследовали митоген активируемую протеинкиназу ERK1/2 и серин/треонин S6-киназу массой 90 кДа (p90RSK), которая регулирует синтез белка посредством модуляции пути mTORC1. ERK1/2 непосредственно фосфорилирует и активирует p90RSK, которая, в свою очередь, активирует различные события передачи сигналов посредством выбора различных субстратов фосфорилирования. В частности, p90RSK может регулировать работу GSK3 β .

Обнаружено существенное снижение фосфорилирования ERK1/2 и p90RSK в вывешенной без введения препарата группе HS относительно группы контроля на 62 и 27% соответственно ($p < 0,05$, Рисунок 7А). Введение пробенецида существенно замедлило снижение фосфорилирования ERK1/2 и предотвратило снижение фосфорилирования p90RSK (Рисунок 7Б).

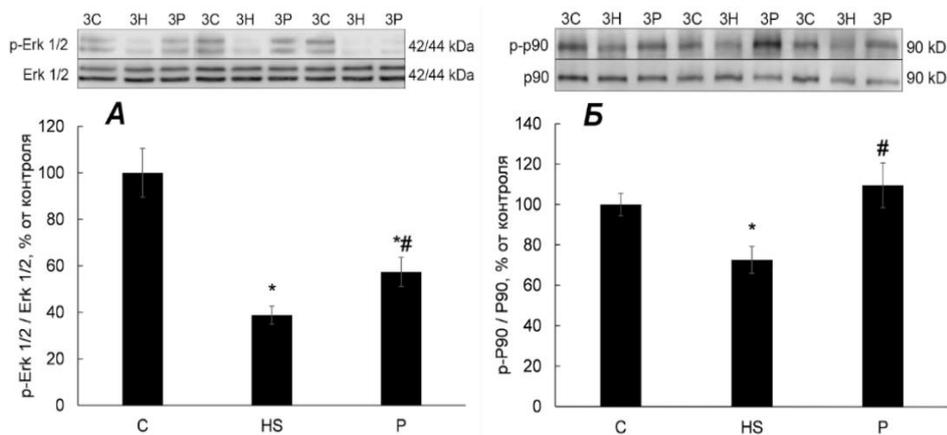


Рисунок 7 – Уровень фосфорилирования ERK1/2 и p90RSK в *m. soleus* при введении пробенецида на фоне 3-х суточного вывешивания.

С – контроль;
 HS – вывешивание 3 суток;
 P – вывешивание 3 суток + пробенецид; * – значимое отличие от контроля ($p < 0,05$); # – значимое отличие от группы HS ($p < 0,05$)

Ранее в нашей лаборатории уже наблюдали снижение p-p90RSK после 3-дневного вывешивания крыс (Shenkman *et al.*, 2015). Можно заключить, что фосфорилирование маркёров MAP-киназного ERK1/2 и p90RSK сигнального пути связано с содержанием макроэргических фосфатов в волокне, а предотвращение их трансфера из волокна активирует анаболический сигналинг при функциональной разгрузке мышц.

АМПК является центральным регулятором энергетического гомеостаза. Уровень её фосфорилирования может изменяться с продолжительностью функциональной разгрузки (Tuganov *et al.*, 2019, Vilchinskaya *et al.*, 2017, Stouth *et al.*, 2018). Снижение фосфорилирования АМПК часто наблюдается в первые сутки вывешивания (ещё до снижения мышечной массы), к 3 дню вывешивания фосфорилирование АМПК существенно не отличается от того, что обнаруживают у животных группы интактного контроля. Мы обнаружили высокое содержание фосфорилированной АМПК в группе P, которое достоверно отличалось на 191% от группы контроля, и на 206% от группы вывешивания без препарата ($p < 0,05$, Рисунок 8).

Итак, применив в модели функциональной разгрузки мышц крыс ингибирование паннексиновых каналов, пропускающих АТФ из цитоплазмы во внеклеточное пространство, мы обнаружили существенное повышение количества АТФ в *m. soleus* крыс при их 3-дневном вывешивании (относительно группы контроля). При ингибировании паннексиновых каналов при разгрузке *m. soleus* количество АТФ в ней увеличивается ещё на 20%. Таким образом при ингибировании паннексиновых каналов в *m. soleus* при 3-дневном вывешивании крыс: 1. Отмечено снижение активности катаболических сигнальных путей: экспрессия мРНК Е3-лигаз MuRF1 и MAFbx существенно ниже, содержание фосфорилированной GSK3 β на 189% выше, чем в группе Н, а повышение фосфорилирования eEF2 (подавляющего элонгацию) существенно предотвращено; 2. Наблюдается высокий уровень фосфорилирования маркёров, поддерживающих анаболические процессы в мышце – p70S6k и p90RSK.

Роль P2Y рецепторов в регуляции сигналинга в камбаловидной мышце при гравитационной разгрузке

Влияние введения ингибиторов P2Y рецепторов на вес разгруженной *m. soleus*, экспрессию мРНК P2Y2 рецепторов и энергетический гомеостаз

За время эксперимента изменения веса крыс ни в одной из групп не наблюдалось. В группах HS и M масса *m. soleus* была снижена по отношению к группе контроля на 10 и 9 мг соответственно ($p < 0,05$), в то время, как между группой A и контролем различий не наблюдалось. Мы обнаружили предотвращение атрофии *m. soleus* при 3-дневном введении ингибитора пуринергических рецепторов P2Y2 (гр. A) во время вывешивания крыс относительно группы интактного контроля. Недавно Chen *et al.*, 2021 обнаружили снижение атрофии мышц у мышей с отсутствием гена P2Y2 при денервации в течении 2, 4 и 6 недель. Было показано, что P2Y2 усиливают атрофию скелетных мышц и активацию фибробластов после мышечного повреждения.

Мы обнаружили пониженную на 17% и 36% соответственно экспрессию мРНК P2Y1 (гр. M) и P2Y2 (гр. A) при применении их специфических ингибиторов у вывешенных с препаратом животных ($p < 0,05$) относительно контрольной группы. Результат свидетельствует о специфическом действии ингибиторов на белок-мишень и снижении его экспрессии в мышце.

Показано, что паннексиновые каналы пропускают АТФ из цитоплазмы во внеклеточное пространство (Dahl, 2015). Так как оба рецептора взаимодействуют с нуклеотидами и АТФ в частности, мы определили его содержание в *m. soleus* всех экспериментальных групп. Уровень АТФ был существенно повышен только в группе вывешенных животных без введения препарата (HS) на 62 % по сравнению с группой контроля ($p < 0,05$, Рисунок 9А), похожие результаты мы наблюдали в предыдущем эксперименте с ингибированием Panx1. В группах с ингибированием P2Y рецепторов такого увеличения не наблюдалось. В группе M (с ингибированием P2Y1 рецепторов) уровень АТФ был достоверно ниже на 95% группы вывешивания без препарата (HS, $p < 0,05$), а в группе A (с ингибированием P2Y2 рецепторов) не отличался от группы контроля (Рисунок 9А).

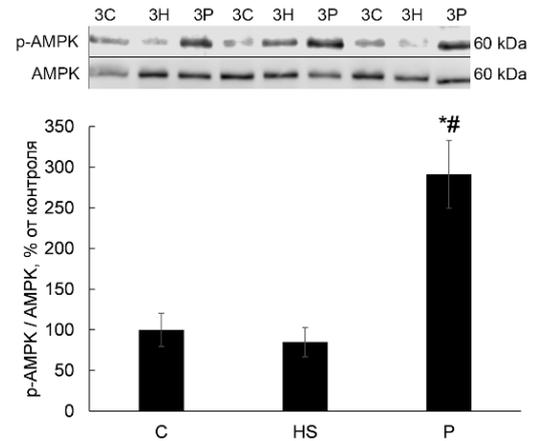


Рисунок 8 – Уровень фосфорилирования AMPK в *m. soleus* крыс при введении пробенецида на фоне 3-х суточного вывешивания. C – контроль; HS – вывешивание 3 суток; P – вывешивание 3 суток + пробенецид; * – значимое отличие от контроля ($p < 0,05$); # – значимое отличие от группы HS ($p < 0,05$)

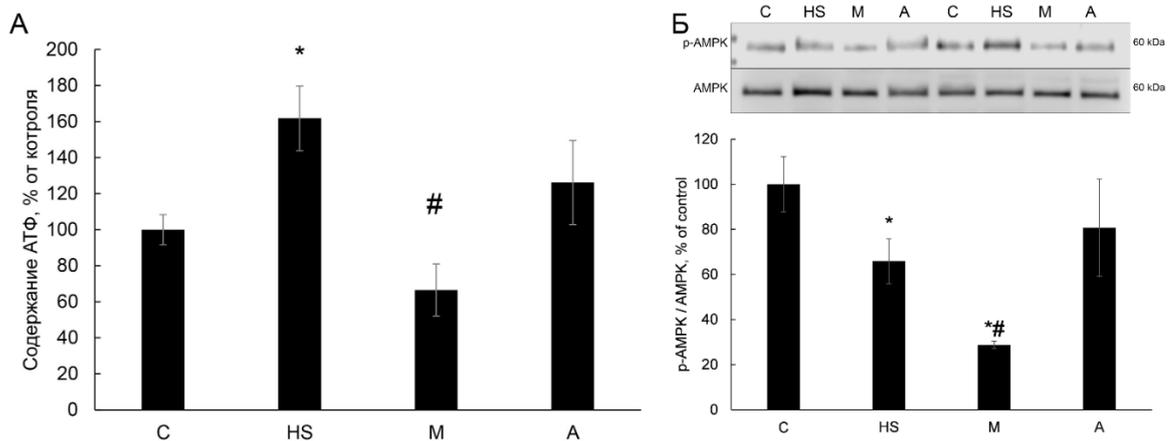


Рисунок 9 – Содержание АТФ и уровень фосфорилирования АМПК в *m. soleus* крыс после 3-дневного вывешивания.

С – контроль, HS – 3-х суточное вывешивание с введением плацебо, М – 3-х суточное вывешивание с введением MRS2179, А – 3-х суточное вывешивание с введением AR-C 118925XX. * – значимые отличия от группы С ($p < 0,05$); # – значимые отличия от группы HS ($p < 0,05$)

АМПК является ключевым регулятором энергетического гомеостаза. Уровень фосфорилирования АМПК может меняться в зависимости от продолжительности мышечной разгрузки (Vilchinskaya *et al.*, 2017; Tyganov *et al.*, 2019; Stouth *et al.*, 2018) В нашем исследовании содержание р-АМПК в группах HS и М было существенно ниже группы контроля (Рисунок 9Б). Однако в группе с ингибированием P2Y2 рецепторов (группа А) её уровень в *m. soleus* не отличался от группы контроля ($p < 0,05$). Фосфорилирование АМПК может регулироваться несколькими механизмами, включая метилирование (Stouth *et al.*, 2020). Активация АМПК регулируется также кальцием (Mathew *et al.*, 2014). Можно отметить, что повышенный уровень фосфорилирования АМПК при функциональной разгрузке *m. soleus* наблюдается только в группе, где ингибированы P2Y2, но не P2Y1 пуринергические рецепторы (Рисунок 9Б).

Влияние введения ингибиторов P2Y рецепторов на катаболические процессы и содержание IP3-рецепторов в разгруженной *m. soleus*

Ранее в работе Liu *et al.*, 2018 было отмечено, что сопряжение АТФ с сигнальным путем P2Y2R/PLC/IP3 вызывает высвобождение Ca^{2+} из эндоплазматического ретикулума. Известно, что P2Y2 пуринергические рецепторы активируют высвобождение IP3, которые затем

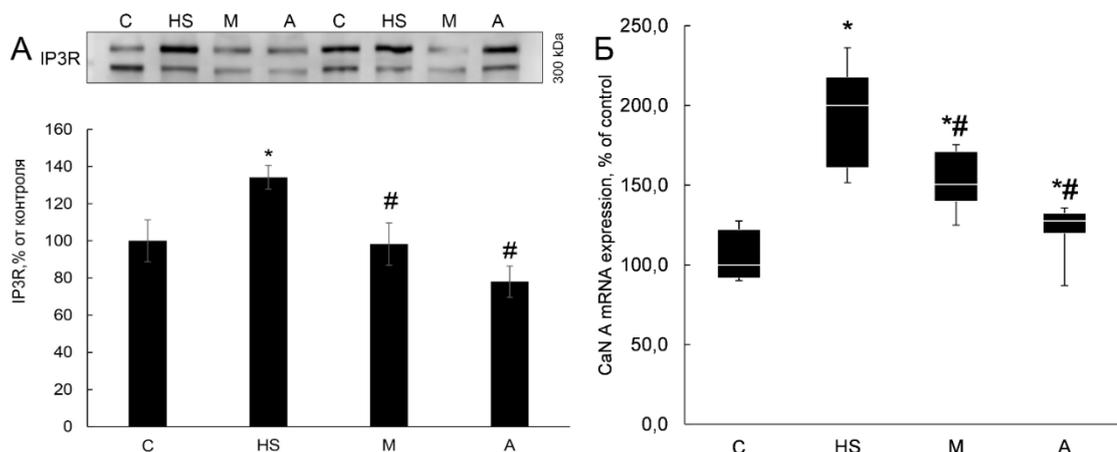


Рисунок 10 – Содержание IP3R и экспрессия мРНК CaN в *m. soleus* крыс после 3-дневного вывешивания.

С – контроль, HS – 3-х суточное вывешивание с введением плацебо, М – 3-х суточное вывешивание с введением MRS2179, А – 3-х суточное вывешивание с введением AR-C 118925XX. * – значимые отличия от группы С ($p < 0,05$); # – значимые отличия от группы HS ($p < 0,05$)

связываются с IP3R (May *et al.*, 2006; Casas *et al.*, 2014). Мы измерили содержание IP3R в *m. soleus* и обнаружили самое высокое их содержание в группе вывешенных без препарата крыс (HS) (на 34% относительно группы контроля, $p < 0,05$, Рисунок 10А). Уровень IP3R у вывешенных с введением ингибитора животных (группы М и А) не отличался от группы контроля, и был существенно ниже (на 36 и 56% соответственно), чем в группе HS ($p < 0,05$).

Изменение активности IP3R способно вызвать слабый сигнал высвобождения кальция как в цитозоле, так и в нуклеоплазме (Taylor *et al.*, 2010; Georgiev *et al.*, 2015). Уровень CaN повышается при увеличении концентрации кальция в мышцах. Экспрессия CaN в группах М и А была достоверно ниже, по сравнению с группой, вывешенной без препарата HS ($p < 0,05$), но выше, чем в группе контроля (Рисунок 10Б).

СаМК II может регулировать фосфорилирование большого количества различных белков, включая АМПК (Nakanishi *et al.*, 2017). В группах с введением ингибиторов рецепторов P2Y1 и P2Y2 содержание фосфорилированной СаМК II было ниже, чем в вывешенной группе с введением плацебо, и было сопоставимо с содержанием р-СаМК II в контроле (Рисунок 11). СаМК II представляет собой кальций-зависимую киназу (Park *et al.*, 2011). Таким образом, можно предположить, что введение ингибиторов влияет на уровень кальция и приводит к снижению фосфорилирования СаМК II во время разгрузки скелетных мышц.

IP3R-зависимые медленные сигналы Ca^{2+} могут участвовать в активации специфических транскрипционных программ мышечных волокон (Takeda *et al.*, 2018; Casas *et al.*, 2014). Мы определили уровень экспрессии мРНК E3-убиквитин лигаз MuRF1 и MAFbx. Экспрессия MuRF1 у всех вывешенных животных была достоверно выше по сравнению с группой контроля ($p < 0,05$, Рисунок 12А). Однако, в группе М (ингибирование P2Y1 рецепторов) экспрессия мРНК MuRF1

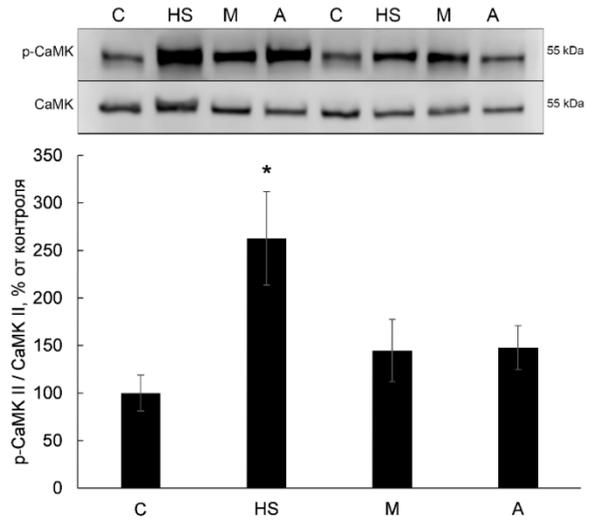


Рисунок 11 – Уровень фосфорилирования СаМК II в *m. soleus* крыс после 3-дневного вывешивания.

C – контроль, HS – 3-х суток вывешивание с введением плацебо, M – 3-х суток вывешивание с введением MRS2179, A – 3-х суток вывешивание с введением AR-C 118925XX. * – значимые отличия от группы C ($p < 0,05$); # – значимые отличия от группы HS ($p < 0,05$)

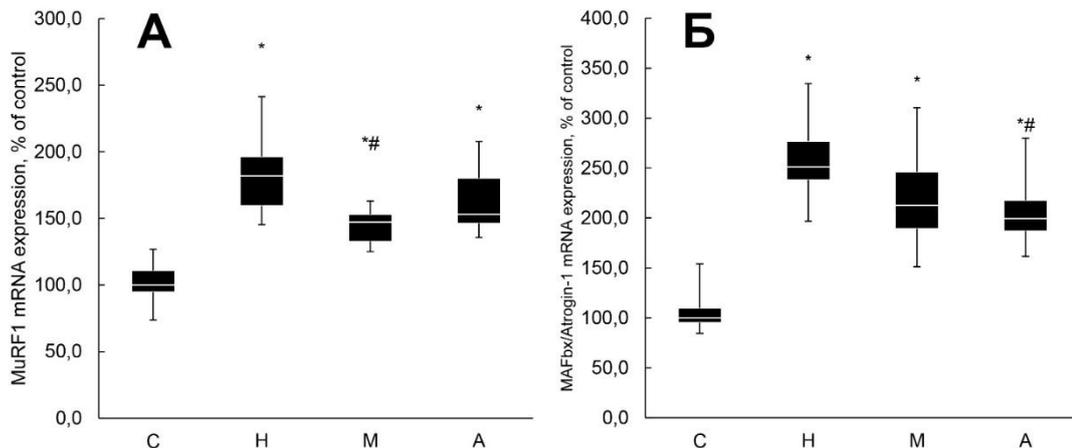


Рисунок 12 – Экспрессия мРНК MuRF1 (А) и MAFbx/Atrogin (Б) в *m. soleus* крыс после 3-дневного вывешивания.

C – контроль, HS – 3-х суток вывешивание с введением плацебо, M – 3-х суток вывешивание с введением MRS2179, A – 3-х суток вывешивание с введением AR-C 118925XX. * – значимые отличия от группы C ($p < 0,05$); # – значимые отличия от группы HS ($p < 0,05$)

повышалась в существенно меньшей степени (на 47% относительно контроля), чем в вывешенной без ингибитора группе HS (на 82% относительно контроля, $p < 0,05$, Рисунок 12А).

Экспрессия мРНК MAFbx также была высокой во всех вывешенных группах относительно уровня группы контроля ($p < 0,05$), но в группе А (введение ингибитора P2Y2 рецепторов) экспрессия его мРНК была существенно ниже, чем в группе HS вывешивания без препарата (на 151% выше контроля, $p < 0,05$, Рисунок 12Б). Обе E3-лигазы участвуют в убиквитинировании белков, что ведёт к атрофии мышц.

Увеличение экспрессии мРНК убиквитина частично было предотвращено только в группе, вывешенной с ингибированием P2Y2 рецепторов относительно группы контроля (выше на 48%, $p < 0,05$; Рисунок 13А), т.е. в той группе, где не было атрофии камбаловидной мышцы. В остальных вывешенных группах его уровень был существенно выше, чем в группе контроля (HS – на 114%, М – на 141%). Убиквитинирование белков является меткой их дальнейшей деградации.

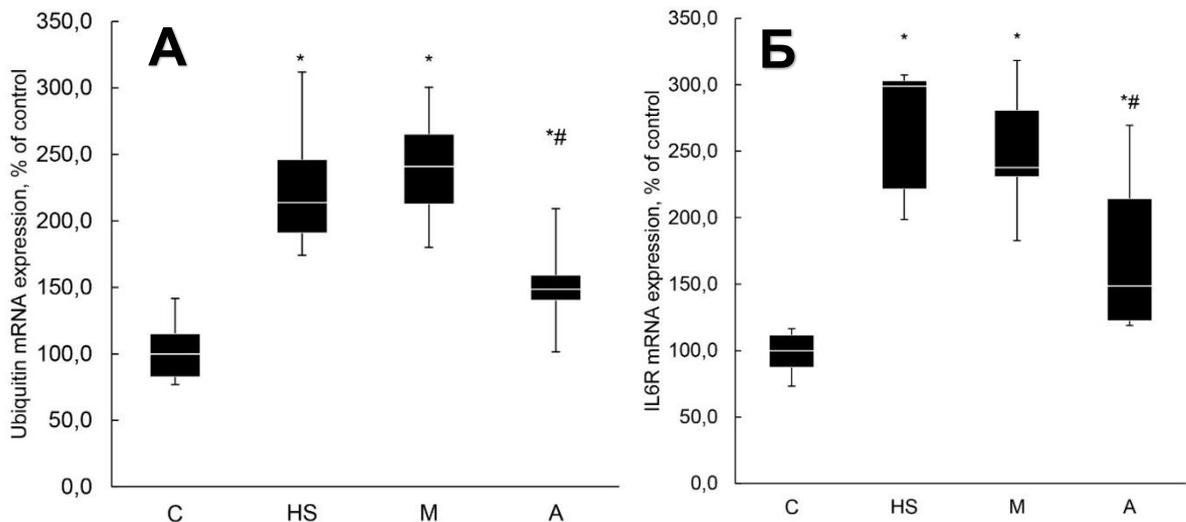


Рисунок 13 – Экспрессия мРНК убиквитина и IL6R в *m. soleus* крыс после 3-дневного вывешивания.

C – контроль, HS – 3-х суточное вывешивание с введением плацебо, M – 3-х суточное вывешивание с введением MRS2179, A – 3-х суточное вывешивание с введением AR-C 118925XX. * – значимые отличия от группы C ($p < 0,05$); # – значимые отличия от группы HS ($p < 0,05$)

Известно, что содержание IL-6, миокина, увеличивается при функциональной разгрузке мышц, что ассоциируется с экспрессией атрогенов (MuRF1 и MAFbx) и атрофией (Yakabe *et al.*, 2018). Блокирование рецепторов IL-6 предотвращает развитие атрофии, а введение IL-6 в мышцу, напротив, ведёт к её атрофии (Sun *et al.*, 2021). Мы обнаружили увеличение экспрессии IL-6R во всех *m. soleus* вывешенных животных (гр. HS, M, A) относительно группы контроля на 199, 138 и 48 % соответственно (Рисунок 13Б). Интересно отметить, что в группе А (где масса *m. soleus* не отличалась от группы контроля) экспрессия рецепторов IL-6 была значительно ниже, чем в группе вывешивания без препарата HS ($p < 0,05$).

Влияние ингибирования рецепторов P2Y1 и P2Y2 на маркёры MAPK сигнальных путей

МАРК способны активироваться внеклеточными сигналами, которые распознаются соответствующими рецепторами в том числе, ассоциированными с G-белками. В данном случае мы ингибировали пуринергические рецепторы P2Y1 и P2Y2. Мы исследовали сигнальные пути ERK1/2 и p38МАРК, и определили содержание их фосфорилированных форм в *m. soleus*. При ингибировании рецепторов P2Y1 и P2Y2 мы не обнаружили повышения уровня фосфорилированной p38МАРК в группе крыс, вывешенной с ингибированием P2Y1 рецепторов (М), в то время, как в остальных вывешенных группах (HS и А) фосфорилирование p38МАРК было достоверно выше на 90 и 58 % соответственно, чем в *m. soleus* группы контроля ($p < 0,05$,

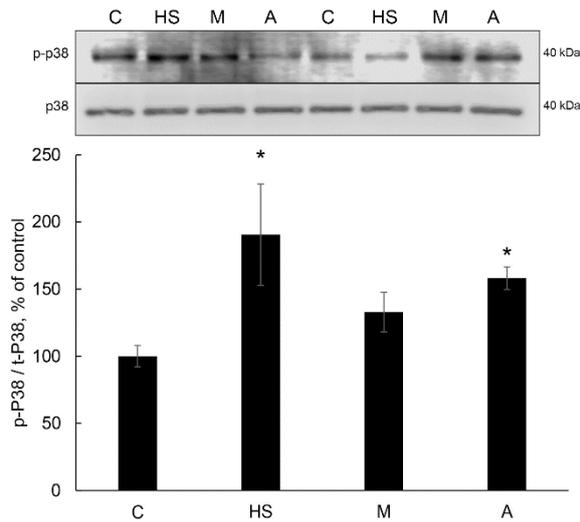


Рисунок 14 – Уровень фосфорилирования p38 в *m.soleus* крыс после 3-дневного вывешивания.

C – контроль; HS – 3-х суточное вывешивание с введением плацебо; M – 3-х суточное вывешивание с введением MRS2179; A – 3-х суточное вывешивание с введением AR-C 118925XX. * – значимые отличия от группы C ($p < 0,05$); # – значимые отличия от группы HS ($p < 0,05$)

Мишенью ERK1/2 является рибосомальная серин/треонин киназа p90RSK. В нашем эксперименте уровень фосфорилирования p90RSK был значительно снижен в вывешенной группе HS на 28% ($p < 0,05$) относительно группы контроля (Рисунок 15Б). Однако в обеих группах (M и A), вывешенных с ингибированием пуриnergических рецепторов, уровень фосфорилирования p90RSK в *m.soleus* не отличался от группы контроля, что было отмечено впервые.

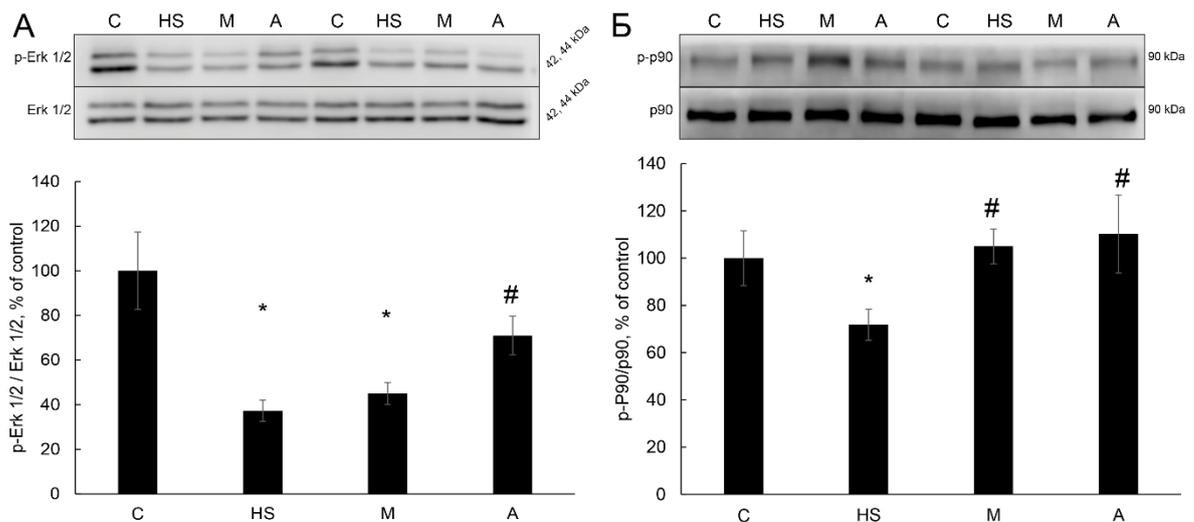


Рисунок 15 – Уровни фосфорилирования ERK 1/2 и p90RSK в *m.soleus* крыс после 3-дневного вывешивания.

C – контроль; HS – 3-х суточное вывешивание с введением плацебо; M – 3-х суточное вывешивание с введением MRS2179; A – 3-х суточное вывешивание с введением AR-C 118925XX.

* – значимые отличия от группы C ($p < 0,05$); # – значимые отличия от группы HS ($p < 0,05$)

Рисунок 14). Интересно отметить, что в этой же группе M экспрессия MuRF1 была существенно ниже, чем в остальных вывешенных группах (HS и A). Ранее в нашей лаборатории проверяли гипотезу о возможности регулирования с помощью p38МАРК экспрессии E3-лигаз и обнаружили, что её ингибирование при 3-дневном вывешивании крыс предотвращает развитие атрофии *m.soleus* и увеличение экспрессии MuRF1 (но не MAFbx) в мышце (Belova *et al.*, 2020).

Фосфорилирование ERK 1/2 в *m.soleus* в нашем эксперименте было снижено в группе вывешенных крыс на 63 % (HS) и вывешенных с введением ингибитора P2Y1 рецепторов на 55 % (M) относительно группы контроля ($p < 0,05$, Рисунок 15А). Мы впервые показали, что введение ингибитора P2Y2 рецептора полностью предотвращает индуцированное разгрузкой снижение фосфорилирования ERK 1/2 в группе А. Стоит также отметить, что в *m.soleus* группы А экспрессия мРНК экспрессия мРНК MAFbx была также существенно снижена относительно других вывешенных групп. В предыдущем эксперименте с ингибированием паннексиновых каналов мы уже отмечали снижение фосфорилирования ERK 1/2 при 3-дневном вывешивании.

Влияние ингибирования рецепторов P2Y1 и P2Y2 на маркёры, участвующие в регуляции белкового синтеза и мышечного гомеостаза

GSK-3 β является субстратом для фосфорилирования p90RSK (Fang *et al.*, 2000). В нашем эксперименте фосфорилирование GSK3 β в разных группах аналогично тем результатам, что мы наблюдали для p90RSK. В группе HS оно было существенно снижено на 25 % ($p < 0,05$), тогда как в группах с введением ингибиторов P2Y1 и P2Y2 оно не отличалось от группы контроля (Рисунок 16А). Можно предположить, что p90RSK могла иметь отношение к фосфорилированию GSK-3 β в ненагруженных мышцах крыс, которым вводили ингибиторы пуринергических рецепторов.

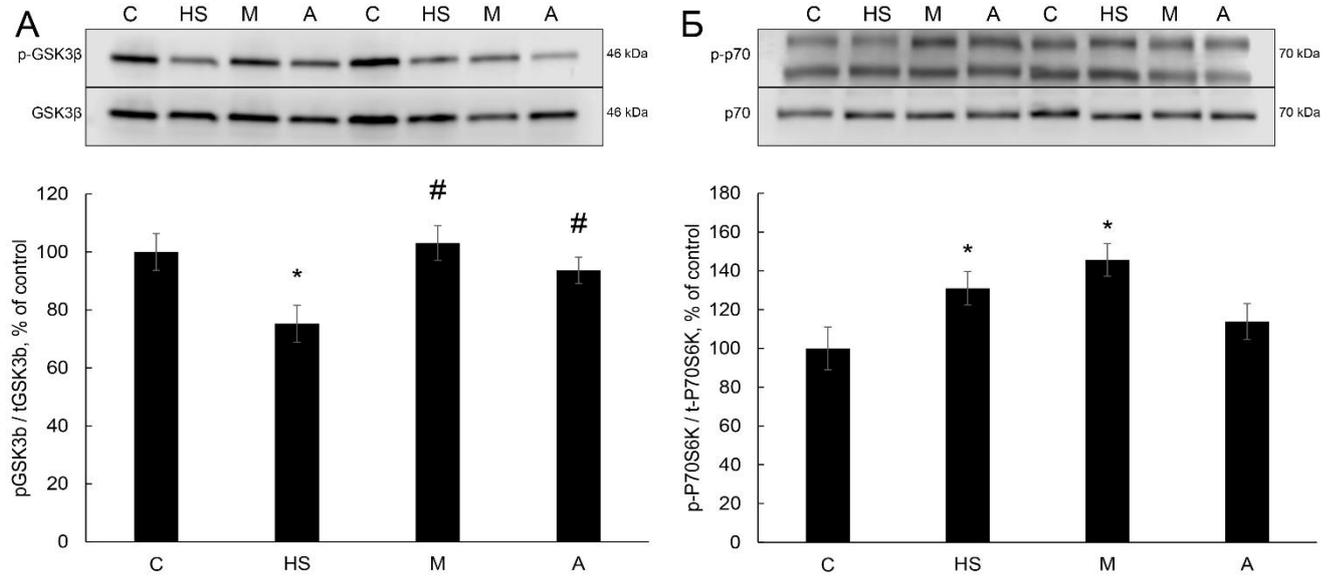


Рисунок 16 – Уровень фосфорилирования GSK3 β и p70 в *m. soleus* крыс после 3-дневного вывешивания. C – контроль; HS – 3-х суточное вывешивание с введением плацебо; M – 3-х суточное вывешивание с введением MRS2179; A – 3-х суточное вывешивание с введением AR-C 118925XX. * – значимые отличия от группы C ($p < 0,05$); # – значимые отличия от группы HS ($p < 0,05$)

Мы не обнаружили каких-либо различий в содержании белка mTORC1 между всеми вывешенными группами и контрольными животными, как и нижележащего маркёра этого сигнального пути 4E-BP1, фосфорилирование которого активирует трансляцию мРНК.

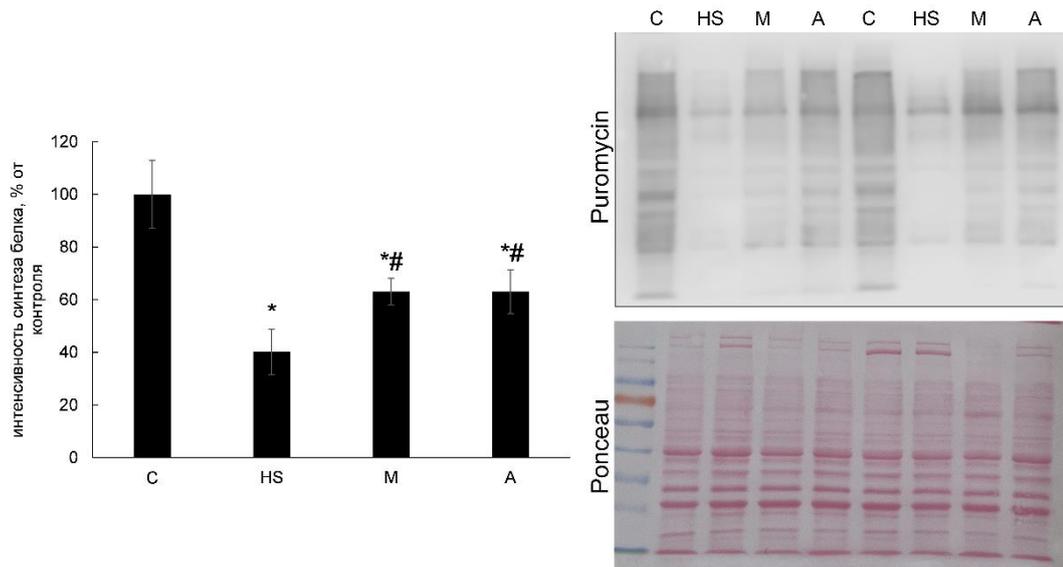


Рисунок 17 – Интенсивность синтеза белка в *m. soleus* крыс после 3-дневного вывешивания. C – контроль; HS – 3-х суточное вывешивание с введением плацебо; M – 3-х суточное вывешивание с введением MRS2179; A – 3-х суточное вывешивание с введением AR-C 118925XX. * – значимые отличия от группы C ($p < 0,05$); # – значимые отличия от группы HS ($p < 0,05$)

В нашем эксперименте мы наблюдали увеличение фосфорилирования p70S6K в группах HS и M, в то время как в группе A фосфорилирование p70S6K не отличается от контроля (Рисунок 16Б). В работе Belova *et al.*, 2019 показано, что повышению фосфорилирования p70S6K способствует снижение фосфорилирования AMPK. В статье обсуждалось, что механизм действия AMPK на p70S6K может осуществляться через подавление mTORC1. Таким образом, мы можем предположить, что в группе A снижение фосфорилирования p70S6K (Рисунок 16Б) относительно вывешивания связано с увеличением активности AMPK (Рисунок 9Б).

Оценивая интегральный показатель интенсивности синтеза белка с помощью введения пурамицина (метод SUnSET), мы обнаружили существенно более высокий уровень интенсивности синтеза белка в группах A и M с введением ингибиторов относительно группы вывешивания без препарата ($p < 0,05$, Рисунок 17). Это свидетельствует о активизации синтеза белка при блокировании пуринергических рецепторов.

Роль PI3K в регуляции сигналинга в камбаловидной мышце при гравитационной разгрузке

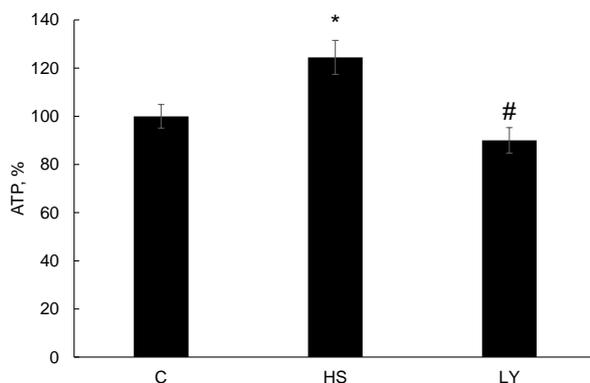


Рисунок 18 – Содержание АТФ в *m. soleus* при введении LY294002 на фоне 3-х суточного вывешивания.

C – контроль, HS – 3-суточное вывешивание, LY – 3-суточное вывешивание с введением LY294002. * – значимое отличие от контроля, # – значимое отличие от группы вывешивания, $p \leq 0,05$

при контакте с АТФ и продуктами его распада, и повлиять на содержание АТФ в мышце.

Влияние введения LY294002 на содержание IP3R и кальций-зависимый сигналинг

Содержание IP3R в группе LY также было существенно ниже, чем в группе, вывешенной без введения препарата (Рисунок 19). Имеется очевидная связь между ингибированием PI3K, уровнем её фосфорилирования и содержанием IP3R в *m. soleus*. IP3R – кальций-зависимые рецепторы, которые активируются при повышении концентрации ионов кальция в цитоплазме и пропускают их в ядро. В ядре кальций активирует транскрипционные факторы, запускающие экспрессию атрогенов (Takeda *et al.*, 2018; Casas *et al.*, 2014).

Влияние введения LY294002 на вес разгруженной *m. soleus* и энергетический гомеостаз

Камбаловидные мышцы крыс, вывешенных без введения препарата, подверглись существенной атрофии (по сравнению с группой контроля). Мы впервые обнаружили снижение скорости атрофии *m. soleus* в группе, вывешенной с введением ингибитора PI3K ($p < 0,05$) по сравнению с группой, вывешенной без введения препарата.

В отличие от группы, вывешенной без введения препарата (HS), ингибирование PI3K во время функциональной разгрузки *m. soleus* предотвратило накопление в ней АТФ (группа LY) и уровень АТФ в ней не отличался от группы интактного контроля (Рисунок 18). Можно предположить, что ингибирование активности PI3K могло отразиться на передаче сигнала от пуринергических рецепторов, активирующихся

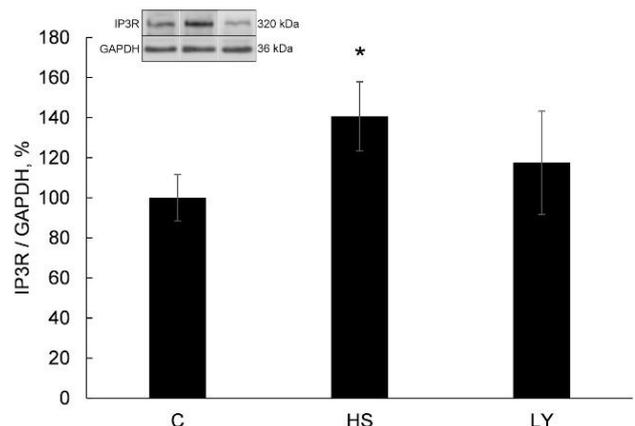


Рисунок 19 – Содержание рецепторов IP3 в *m. soleus* при введении LY294002 на фоне 3-х суточного вывешивания.

C – контроль, HS – 3-суточное вывешивание, LY – 3-суточное вывешивание с введением LY294002. * – значимое отличие от контроля, $p \leq 0,05$

Фосфорилирование CaMKII β было увеличено в ненагруженной камбаловидной мышце относительно группы контроля (Рисунок 20А). Введение ингибитора PI3K предотвратило эти изменения. Аналогичные результаты получены для CaN. Его экспрессия в *m.soleus* группы LY была существенно ниже, чем в группе, вывешенной без препарата (Рисунок 20Б). CaN представляет собой кальций- и кальмодулин-зависимую фосфатазу, активность которой повышается при увеличении концентрации кальция в мышцах (Sharlo *et al.*, 2019; Mochalova *et al.*, 2020).

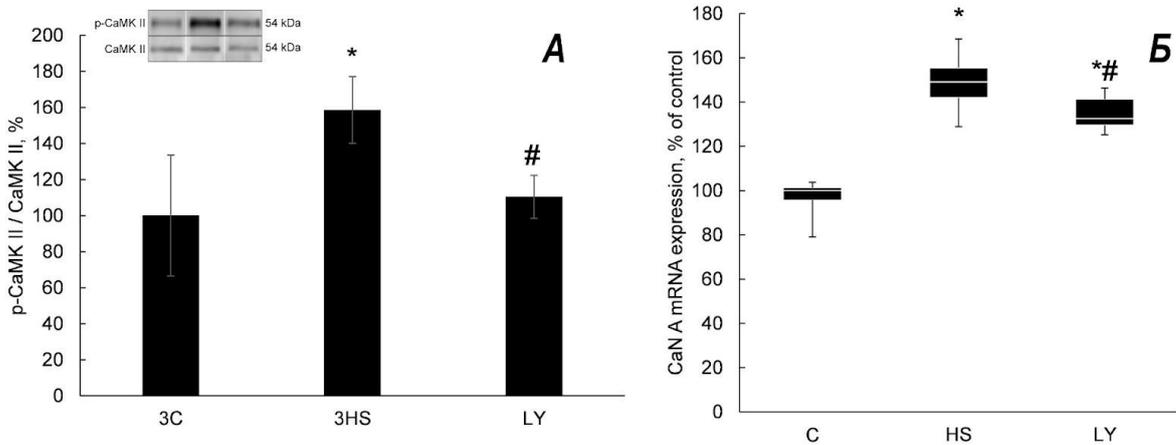


Рисунок 20 – Уровень фосфорилирования CaMK II β и экспрессия кальцинейрина A в *m.soleus* при введении LY294002 на фоне 3-х суточного вывешивания.

C – контроль, HS – 3-суточное вывешивание, LY – 3-суточное вывешивание с введением LY294002. * – значимое отличие от контроля, # – значимое отличие от группы вывешивания, $p \leq 0,05$

Результаты позволяют предположить, что ингибирование PI3K оказывает влияние на экспрессию CaN, уровень фосфорилирования CaMK II и регуляцию Ca-зависимых сигнальных путей при разгрузке.

Влияние введения LY294002 на содержание катаболических сигнальных маркёров и их регуляцию

В группе HS уровень экспрессии мРНК E3-лигаз MuRF1 и MAFbx (Рисунок 21), а также убиквитина (Рисунок 22А) был существенно выше, чем в группе контроля. Введение ингибитора PI3K полностью предотвратило повышение экспрессии мРНК MuRF1 в группе LY, и существенно снизило в ней экспрессию MAFbx и убиквитина (относительно группы HS).

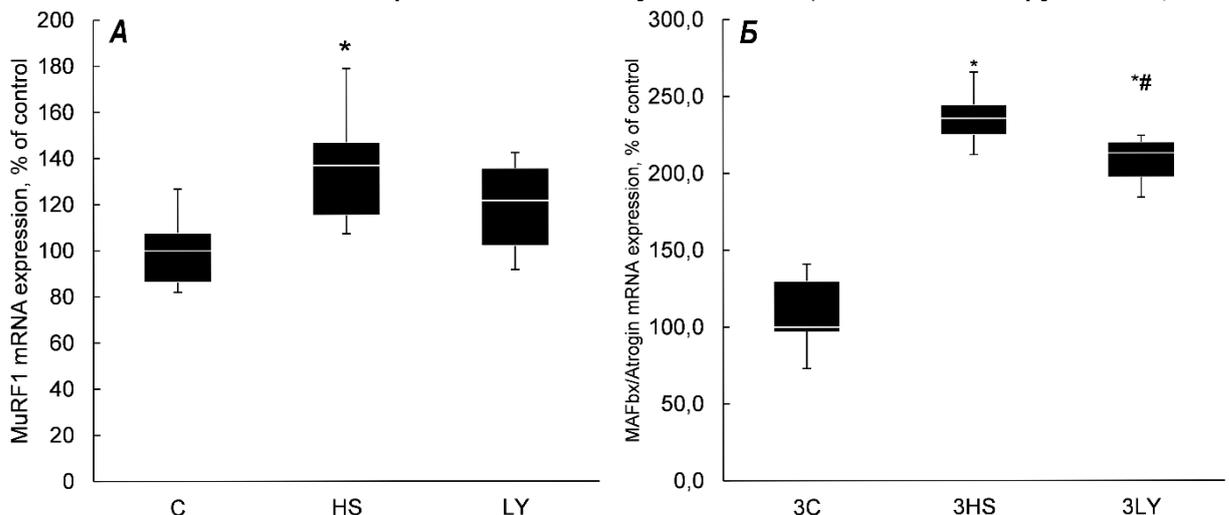


Рисунок 21 – Экспрессия MuRF1, MAFbx в *m.soleus* при введении LY294002 на фоне 3-х суточного вывешивания.

C – контроль, HS – 3-суточное вывешивание, LY – 3-суточное вывешивание с введением LY294002. * – значимое отличие от контроля, # – значимое отличие от группы вывешивания, $p \leq 0,05$

Анализ экспрессии транскрипционных факторов, способных регулировать экспрессию E3-лигаз, показал, что снижение их экспрессии при ингибировании PI3K может быть связано со снижением экспрессии транскрипционного фактора TFEB (Рисунок 22Б).

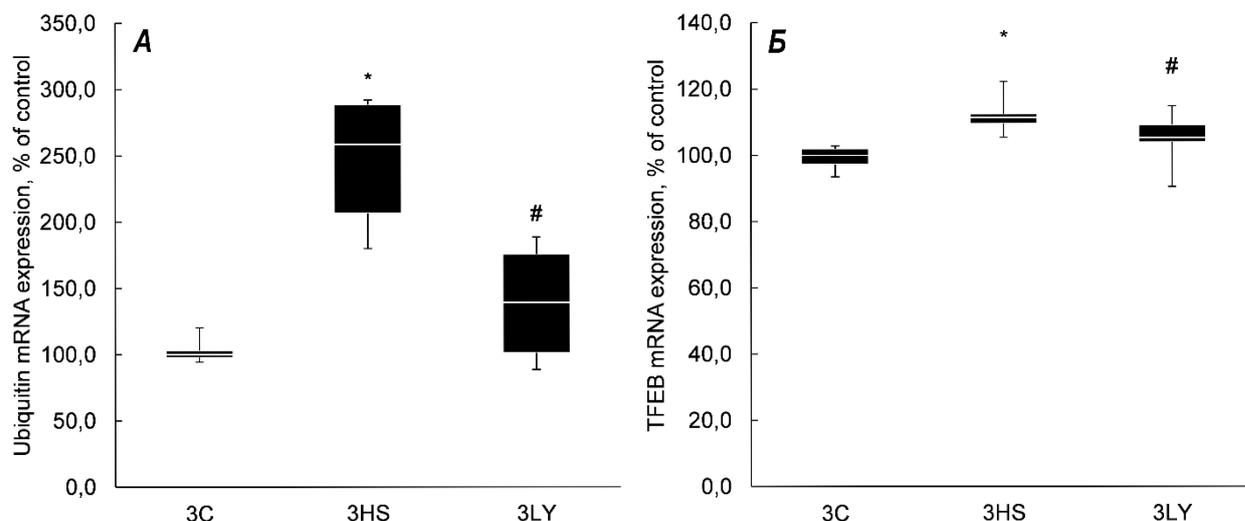


Рисунок 22 – Экспрессия мРНК убиквитина и TFEB в *m. soleus* при введении LY294002 на фоне 3-х суточного вывешивания.

C – контроль, HS – 3-суточное вывешивание, LY – 3-суточное вывешивание с введением LY294002.

* – значимое отличие от контроля, # – значимое отличие от группы вывешивания, $p \leq 0,05$

Влияние LY294002 на содержание анаболических сигнальных маркеров

Ингибирование PI3K снижает уровень экспрессии маркеров сигнальных путей белковой деградации при 3-дневной разгрузке *m. soleus*. В группе с введением ингибитора LY294002 при вывешивании крыс содержание маркеров белкового синтеза IRS-1 (Рисунок 23А), 4E-BP (Рисунок 23Б), фосфорилирование рибосомного белка S6 (Рисунок 24А) не отличалось от уровня группы контроля в то время, как в группе HS эти параметры были существенно снижены.

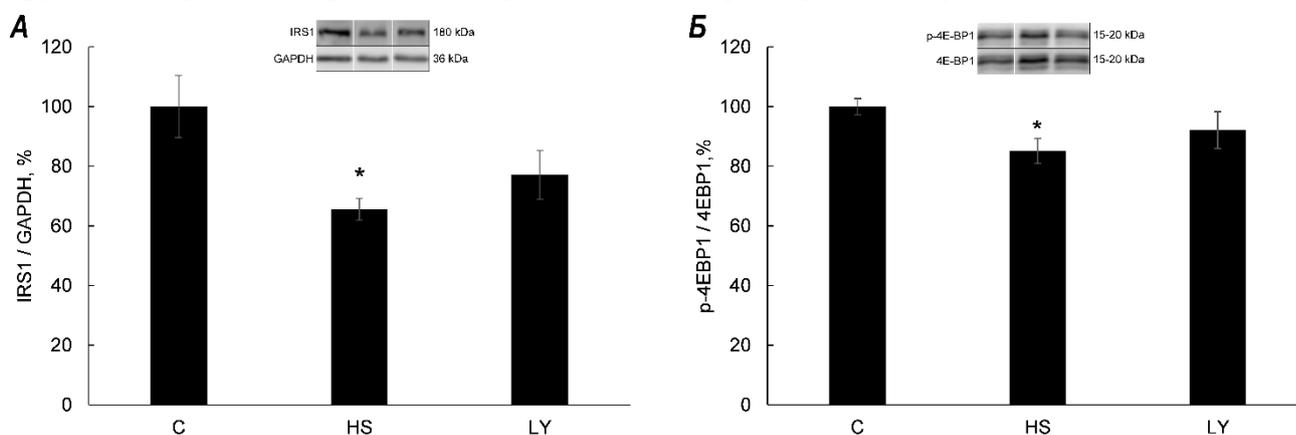


Рисунок 23 – Содержание IRS-1 и уровень фосфорилирования 4EBP1 в *m. soleus* при введении LY294002 на фоне 3-х суточного вывешивания.

C – контроль, HS – 3-суточное вывешивание, LY – 3-суточное вывешивание с введением LY294002.

* – значимое отличие от контроля, $p \leq 0,05$

Фосфорилирование S6 коррелирует с трансляцией мРНК рибосомных белков и факторов элонгации, необходимых для процесса трансляции (Meunhas, 2015). Одновременно в группе LY было предотвращено снижение скорости элонгационных процессов. Уровень фосфорилирования eEF2 в группе LY не отличался от контроля в то время, как в группе, вывешенной без введения препарата, уровень p-eEF2 был высоким (Рисунок 24Б).

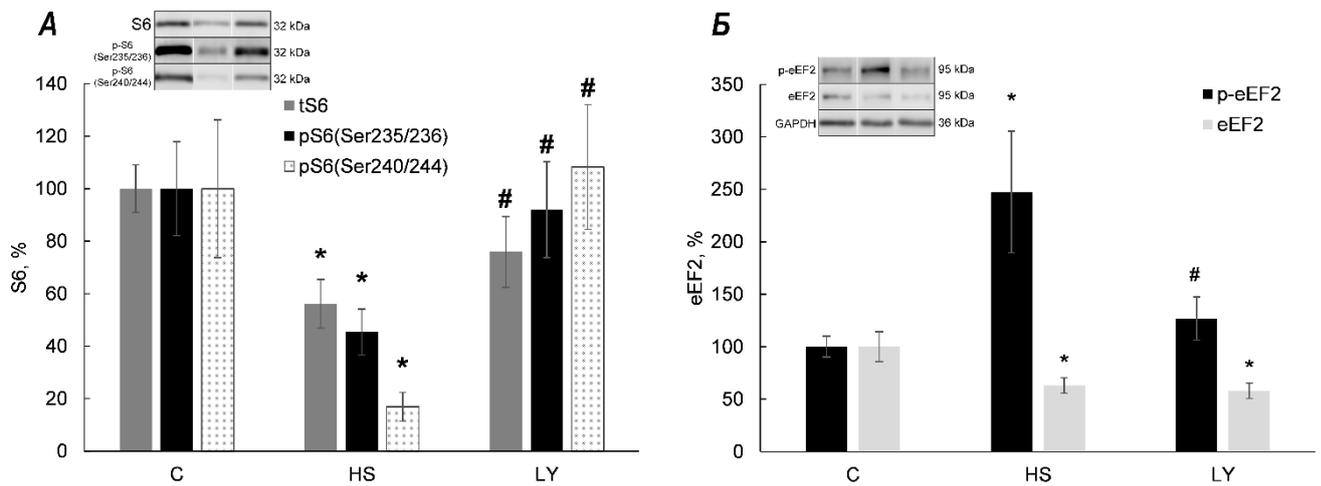


Рисунок 24 – Содержание рибосомального белка *S6* и *eEF2* в *m. soleus* при введении *LY294002* на фоне 3-х суточного вывешивания.

C – контроль, *HS* – 3-суточное вывешивание, *LY* – 3-суточное вывешивание с введением *LY294002*. * – значимое отличие от контроля, $p \leq 0,05$

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Мы предположили, что АТФ может быть запускающим сигналом для Ca^{2+} -зависимых сигнальных путей и атрофических процессов при разгрузке мышц. АТФ через *Panx1* может выходить во внеклеточное пространство и взаимодействовать с *P2Y* рецепторами, которые в свою очередь активируют *PI3K* в Т-каналах мембраны и, в конечном итоге, *IP3R*, находящиеся в ядре и саркоплазматическом ретикулуме, вызывая слабый сигнал высвобождения кальция, способствующего (возможно, с другими сигнальными каскадами) активации транскрипционных факторов и изменению экспрессии ключевых генов скелетной мышцы. Мы проанализировали содержание АТФ в *m. soleus* при функциональной разгрузке и проверили эту гипотезу, применив модель функциональной разгрузки мышц крыс (вывешивание по методу Ильина-Новикова) в экспериментах: 1. Ингибирование паннекссиновых каналов, пропускающих АТФ из цитоплазмы во внеклеточное пространство; 2. Ингибирование *P2Y1/2* пуринергических рецепторов, активируемых АТФ; 3. Ингибирование *PI3K*. Ранее показано, что *IP3R*-зависимые медленные сигналы Ca^{2+} могут участвовать в активации специфических транскрипционных программ формирования фенотипа медленных и быстрых мышечных волокон (Takeda *et al.*, 2018; Casas *et al.*, 2014). Наши гипотезы подтвердились, и исследование *Panx1-P2Y-IP3* пути позволило найти терапевтические мишени для профилактики мышечной атрофии.

Обнаружено, что АТФ-проницаемые паннекссиновые каналы участвуют в регуляции мышечных атрофических процессов путем изменения экспрессии *E3*-лигаз, а также процессов трансляции и элонгации белков во время функциональной разгрузки. Ингибирование паннекссиновых каналов в течение трех дней разгрузки скелетных мышц приводит к снижению активности катаболической сигнализации и поддержанию уровня фосфорилирования мышечных анаболических маркеров *p70S6K* и *p90RSK*, а также поддержанию элонгации белка на контрольном уровне. Впервые показано, что активация атрофических процессов при разгрузке *m. soleus* запускается в том числе с помощью передачи АТФ-опосредованных сигналов, и пуринергические рецепторы *P2Y2* принимают участие в её регуляции. Блокирование рецепторов *P2Y2* предотвращает развитие атрофии *m. soleus* при разгрузке как за счёт снижения протеолитических процессов, так и за счёт увеличения интенсивности синтеза белка через сигнальный каскад *ERK/p90RSK*. Ингибирование рецепторов *P2Y1* препятствует повышению фосфорилирования *p38 MAPK* в *m. soleus* и замедляет в ней экспрессию мРНК *MuRF1*. Ингибирование фосфоинозитид-3-киназы при функциональной разгрузке предотвращает накопление АТФ; замедляет атрофию *m. soleus*, а также экспрессию *E3* лигаз и убиквитина; регулирует активность кальций-зависимых сигнальных путей; влияет на регуляцию маркеров анаболической передачи сигналов в ненагруженных мышцах.

Таким образом, выход АТФ во внеклеточное пространство может являться пусковым сигналом для изменения экспрессии генов при функциональной разгрузке мышц. В передаче сигнала участвуют последовательно находящиеся в сарколемме Pannx1 каналы, P2Y1/2 рецепторы и P13K.

ВЫВОДЫ

1. Функциональная разгрузка *m. soleus* крыс приводит к накоплению АТФ в мышце на начальных этапах.
2. Ингибирование паннексиновых каналов в течение трех дней разгрузки скелетных мышц приводит к снижению экспрессии мРНК E3 убиквитинлигаз MAFbx и MuRF1, повышению уровня фосфорилирования GSK-3 β и мышечных анаболических маркеров p70S6K и p90RSK, а также усиливает процессы трансляции и препятствует снижению элонгации при функциональной разгрузке мышц.
3. Блокирование и P2Y1, и P2Y2 пуринергических рецепторов при 3-дневной функциональной разгрузке *m. soleus* крыс предотвращает накопление АТФ, увеличение содержания IP3R, снижение интенсивности синтеза белка. уровня фосфорилирования GSK-3 β и P90RSK. Предотвращение атрофии *m. soleus* наблюдается только при блокировании P2Y2 рецепторов и сопровождается замедлением экспрессии мРНК E3-лигазы MAFbx, убиквитина и IL6R, увеличением уровня фосфорилирования ERK1/2, АМПК и нормализацией уровня фосфорилирования p70S6K. Наблюдаемого при блокировании рецепторов P2Y1 снижения фосфорилирования p38 MAPK и экспрессии мРНК E3-лигазы MuRF1 оказывается недостаточно для предотвращения атрофии.
4. Ингибирование P13K при функциональной разгрузке *m. soleus* замедляет атрофию, предотвращая накопление в ней АТФ и увеличение экспрессии E3 убиквитинлигаз MuRF1 и MAFbx, убиквитина и IP3-рецепторов; регулируя активность кальций-зависимых сигнальных путей (снижение экспрессии мРНК CaN и фосфорилирования CaMKII); сохраняя скорость элонгационных процессов (замедляя рост фосфорилирования eEF2) и фосфорилирование маркеров анаболической передачи сигналов - 4E-BP, рибосомного белка S6.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО МАТЕРИАЛАМ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в журналах

1. **Zaripova K.A.**, Kalashnikova E.P., Belova S.P., Kostrominova T.Y., Shenkman B.S., Nemirovskaya T.L. Role of Pannexin 1 ATP-Permeable Channels in the Regulation of Signaling Pathways during Skeletal Muscle Unloading // Int. J. Mol. Sci. 2021. V. 22. I. 19. e10444. doi: 10.3390/ijms221910444. PMID: 34638792; PMCID: PMC8508840.
2. **Зарипова К.А.**, Белова С.П., Шенкман Б.С., Немировская Т.Л. Роль P2Y-рецепторов в регуляции атрофических процессов в *m. soleus* при функциональной разгрузке // Журнал эволюционной биохимии и физиологии. Т. 58. № 6. с. 487–497.
3. **Zaripova K.A.**, Belova S.P., Shenkman B.S., Nemirovskaya T.L. The Role of P2Y Receptors in the Regulation of Atrophic Processes in Rat Skeletal Muscles under Unloading // J. Evol. Biochem. Phys. 2022. V. 58. P. 1708–1719. <https://doi.org/10.1134/S0022093022060047>
4. **Zaripova K.A.**, Belova S.P., Kostrominova T.Y., Shenkman B.S., Nemirovskaya T.L. P2Y1 and P2Y2 receptors differ in their role in the regulation of signaling pathways during unloading-induced rat soleus muscle atrophy // Arch. Biochem. Biophys. 2023. V. 751. e109844. doi: 10.1016/j.abb.2023.109844. PMID: 38043889.

Тезисы конференций

1. **Zaripova K.A.**, Mochalova E.P., Belova S.P., Shenkman B.S., Nemirovskaya T.L. Role of ATP-dependet signalling in rat soleus muscle under hindlimb unloading. Aerospace and Environmental Medicine. XXII International Symposium Human in Space 2021. V. 55 № 1/1 special issue, p.p. 167 -168
2. **Зарипова К.А.**, Белова С.П., Мочалова Е.П., Шенкман Б.С., Немировская Т.Л. Роль паннексиновых каналов и АТФ-зависимых сигнальных путей в регуляции сигналинга при функциональной разгрузке скелетных мышц. Рецепторы и внутриклеточная сигнализация 24-28 мая 2021 г. сборник статей. Том 1, стр. 405-406

3. **Zaripova K.A.**, Mochalova E.P., Belova S.P., Shenkman B.S., Nemirovskaya T.L. Role pannexin channels of ATP-dependent pathways in regulation of signaling during skeletal muscle unloading. *Acta Biochimica Polonica* Vol. 68 No. S1 (2021): Supplement: Abstracts of the Virtual European Muscle Conference, Warsaw, September 20–22, 2021. Session 3. Cytoskeleton and (mechano)signalling P. 22. P3.5
4. **Зарипова К.А.**, Мочалова Е.П., Белова С.П., Шенкман Б.С., Немировская Т.Л. Роль паннексиновых каналов в регуляции сигнальных путей в скелетной мышце при функциональной разгрузке. Новые подходы к изучению проблем физиологии экстремальных состояний. Материалы X Всероссийской с международным участием школы-конференции по физиологии мышц и мышечной деятельности, посвященной памяти И.Б. Козловской и приуроченной к году науки и технологий, Москва, 28 июня –1 июля 2021 с. 97
5. **Зарипова К.А.**, Мочалова Е.П., Белова С.П., Шенкман Б.С., Немировская Т.Л. Роль P2Y рецепторов в регуляции сигнальных путей в скелетной мышце при трехсуточной функциональной разгрузке. Клеточная сигнализация: итоги и перспективы. Тезисы докладов. Казань, 14-17 сентября 2021 года. Стр. 35
6. **Зарипова К.А.**, Калашникова Е.П., Белова С.П., Шенкман Б.С., Немировская Т.Л. Исследование роли P2Y рецепторов в регуляции экспрессии скелетных мышц при трехсуточной функциональной разгрузке. XIX Конференция молодых ученых, специалистов и студентов, посвященная 60-летию первого полета человека в космос. 26 ноября 2021, г. Москва, С. 38
7. Немировская Т.Л., **Зарипова К.А.**, Белова С.П. Роль адренэргических P2Y рецепторов в регуляции атрофических процессов скелетных мышц крыс при их функциональной разгрузке. *Motor control 2022: Сборник тезисов IX Российской, с международным участием, конференции по управлению движением, посвященной 95-летию со дня рождения И. Б. Козловской (Казань, 2-4 июня, 2022г.)*, С. 60-61
8. Nemirovskaya T.L., Belova S.P., **Zaripova K.**, Mochalova E.P. Role of ATP-dependent pathways in the control of signalling during skeletal muscle unloading // 49th European Muscle Conference (Prague, Czech Republic) 22-26 September 2022, p. 16
9. **Зарипова К.А.**, Белова С.П., Е.П. Мочалова, Шенкман Б.С., Немировская Т.Л. Роль паннексиновых каналов и уровня АТФ в регуляции сигналинга при функциональной разгрузке скелетных мышц // III объединенный научный форум физиологов, биохимиков и молекулярных биологов (Сочи, Дагомыс, 3–8 октября 2021). Научные труды. Том 1. с. 45
10. **Зарипова К.А.**, Белова С.П. Роль P2Y рецепторов в регуляции атрофических процессов в камбаловидной мышце крыс при функциональной разгрузке // XX Конференции молодых учёных, специалистов и студентов с международным участием, посвященной 165-летию со дня рождения К. Э. Циолковского (17 ноября 2022, Москва), стр. 54-55
11. Т.Л. Немировская, Белова С.П., **Зарипова К.А.** Влияние АТФ-зависимых сигнальных путей на генную экспрессию скелетных мышц при их функциональной разгрузке // *Интегративная физиология*, 7-9 декабря 2022 года, Санкт-Петербург, стр. 56
12. **Зарипова К.А.**, Белова С.П., Шенкман Б.С., Немировская Т.Л. Участие P13K и IP3R в регуляции атрофических процессов в скелетных мышцах при функциональной разгрузке // *Сборник научных трудов VII съезда биофизиков России: в 2 томах, том 1, стр. 258*
13. Kostrominova T.Y., **Zaripova K.**, Belova S.P., Sharlo K., Shenkman B.S., Nemirovskaya T.L. P2Y1 and P2Y2 Receptors Differ in Their Role in the Regulation of Signaling Pathways During Unloading-induced Rat Soleus Muscle Atrophy // 42nd Annual ISGP Meeting Abstract book. 2-7 July 2023, Antwerp, Belgium.
14. **Зарипова К.А.**, Белова С.П., Шенкман Б.С., Немировская Т.Л. Участие P13K и IP3R в регуляции атрофических процессов в скелетных мышцах при функциональной разгрузке // *Сборник научных трудов VII Съезда биофизиков России: Сборник материалов съезда. В 2-х томах, Краснодар, 17–23 апреля 2023 года. – Краснодар: Кубанский государственный технологический университет, 2023. – С. 258.*
15. Немировская Т.Л., Белова С.П., **Зарипова К.А.** АТФ-зависимые пути регуляции сигналинга скелетных мышц при их функциональной разгрузке // *Сборник тезисов XXIV съезда*

физиологического общества им. И. П. Павлова : Сборник тезисов съезда, Санкт-Петербург, 11–15 сентября 2023 года. – Санкт-Петербург: ООО "Издательство ВВМ", 2023. – С. 235.

Патенты

Патент № 2797216 С1 Российская Федерация, МПК А61К 31/41, А61Р 21/00. Способ предотвращения атрофии скелетных мышц при их функциональной разгрузке: № 2022112525: заявл. 11.05.2022: опубл. 31.05.2023 / Т.Л. Немировская, **К.А. Зарипова**, С.П. Белова; заявитель Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Государственный научный центр Российской Федерации – Институт медико-биологических проблем Российской академии наук.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АТФ – аденозинтрифосфат
 кДНК – комплементарная дезоксирибонуклеиновая кислота
 мРНК – матричная рибонуклеиновая кислота
 ПААГ – полиакриламидный гель
 ПЦР – полимеразная цепная реакция
 4E-BP1 – эукариотический фактор инициации трансляции 4E-связывающий белок 1
 АКТ – серин/треонин-протеин киназа альфа, протеинкиназа В
 АМПК – AMP activated protein kinase, АМФ-активируемая протеинкиназа
 AR-C118925XX – $C_{28}H_{23}N_7O_3S$
 CaMK II – Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II, Ca^{2+} /кальмодулин-зависимая киназа II
 CaN – calcineurin, кальцинейрин
 DMSO – диметилсульфоксид
 eEF2 – фактор элонгации трансляции 2
 eEF2K – киназа элонгационного фактора 2
 ERK – extracellular signal-regulated kinase
 FOXO3 – forkhead box O3
 GAPDH – глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа
 GSK3 β – glycogen sintase kinase 3 β , киназа гликогенсинтаза 3 β
 IL-6 – interleukin-6, интерлейкин 6
 IP3 – инозитолтрифосфат
 IP3R – рецепторы инозитолтрифосфата
 IRS1 – insulin receptor substrate 1, субстрат инсулинового рецептора 1
 LY294002 – 2-morpholino-8-phenyl-4H-chromen-4-one
 MAFbx – E3-убиквитинлигаза MAFbx (Muscle Atrophy F-box), Atrogin-1
 MRS2179 – 2'-Deoxy-N6-methyladenosine 3',5'-bisphosphate tetrasodium salt
 mTOR – мишень рапамицина млекопитающих / механистическая мишень рапамицина
 MuRF1 – E3-убиквитинлигаза Muscle RING (really interesting new gene) Finger-1
 MYOG – миогенин
 p38MAPK – митоген-активируемая протеин киназа p38
 p70S6K – ribosomal protein S6 kinase beta-1, рибосомальная протеинкиназа S6 бета-1
 p90RSK – ribosomal s6 kinase p90, рибосомальная протеин киназа p90
 Panx1 – паннексиновые каналы
 PBST – phosphate-buffered saline +0,1% Tween20, фосфатно-солевой буфер с +0,1% Tween20
 PGC-1 α – peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha
 PI3K – фосфоинозитид-3-киназа
 PKC – протеинкиназа С
 PLC – фосфолипаза С
 RIPA – radioimmunoprecipitation assay buffer
 TFEB – транскрипционный фактор EB
 TSC2 – tuberous Sclerosis Complex 2, комплекс туберозного склероза 2