На правах рукописи

МИРЗОЕВ Тимур Махмашарифович

МЕХАНИЗМЫ АНАБОЛИЧЕСКОЙ ПЛАСТИЧНОСТИ СКЕЛЕТНЫХ МЫШЦ МЛЕКОПИТАЮЩИХ В УСЛОВИЯХ ГРАВИТАЦИОННЫХ ВОЗДЕЙСТВИЙ

03.03.01 – физиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени

доктора биологических наук

Москва – 2021

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Государственном научном центре Российской Федерации – Институте медико-биологических проблем Российской академии наук (ГНЦ РФ – ИМБП РАН)

Научный консультант: **Шенкман Борис Стивович** доктор биологических наук, профессор, в.н.с., заведующий лабораторией миологии ГНЦ РФ – ИМБП РАН

Официальные оппоненты: **Камкин Андрей Глебович** доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой физиологии и лабораторией электрофизиологии Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования "Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова" Министерства здравоохранения РФ

Колесников Станислав Сергеевич член-корреспондент РАН, доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией молекулярной физиологии клетки Института биофизики клетки РАН – обособленного подразделения Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Пущинский научный центр биологических исследований Российской академии наук»

Ширинский Владимир Павлович доктор биологических наук, профессор, и.о. руководителя лаборатории клеточной подвижности Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии» Министерства здравоохранения РФ

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет»

Защита диссертации состоится «__» _____ 2021 г. в _____ часов на заседании диссертационного совета Д 002.111.01 в ГНЦ РФ – ИМБП РАН по адресу: 123007, г. Москва, Хорошёвское шоссе, д.76а.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ГНЦ РФ – ИМБП РАН и на сайте http://www.imbp.ru/WebPages/win1251/ScienceN/DisserSov/Mirzoev2021/Mirzoev.html

Автореферат разослан «__»_____ 2021 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат биологических наук С.В. Поддубко

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования

Скелетные мышцы, составляющие до 40% от общей массы тела человека (Lee et al., 2000), не только обеспечивают движение и поддержание тела в пространстве, но также выполняют роль важнейшего регулятора обмена веществ и энергии всего организма (Izumiya et al., 2008; Pedersen & Febbraio, 2012). Регулярная мышечная активность необходима для поддержания нормального функционирования различных органов и систем, в том числе функций головного мозга, отвечающих за когнитивные способности (Pedersen, 2019; Pedersen & Febbraio, 2012). И наоборот, недостаточная физическая активность (гипокинезия) является фактором риска для возникновения таких заболеваний, как диабет 2 типа, ишемическая болезнь сердца, рак толстой кишки, деменция и депрессия (Booth et al., 2000; Pedersen, 2009). В связи с этим, поддержание массы и функциональных возможностей скелетных мышц является необходимым условием для снижения заболеваемости и смертности населения, а также улучшения качества жизни.

Обладая выраженной пластичностью, скелетная мышца млекопитающих способна перестраивать свой структурно-метаболический профиль в зависимости от характера сократительной активности. Длительное механическое напряжение приводит к усилению синтеза белка и последующей гипертрофии (Goldberg, 1968; Goldberg et al., 1975). В то же время, продолжительное снижение сократительной активности скелетных мышц млекопитающих, например, вследствие длительного пребывания в невесомости, постельной гипокинезии, иммобилизации и денервации выражается в снижении скорости белкового синтеза, усилении протеолитических процессов и последующей атрофии мышечных волокон и потере их силы (Bodine et al., 2001; Fitts et al., 2010; Fluckey et al., 2004; Loughna et al., 1986; McDonald & Fitts, 1995; Sandri et al., 2004; Thomason & Booth, 1990; Toursel et al., 1999; Григорьева & Козловская, 1987; Ильина-Какуева & Португалов, 1981; Оганов et al., 1982; Оганов et al., 1981). Ключевую роль в механической регуляции мышечной массы играют внутриклеточные сигнальные пути, регулирующие белковый синтез (анаболические сигнальные пути). При этом в мышечных волокнах особую роль играют сигнальные системы, обеспечивающие передачу информации об изменённом механическом состоянии волокна. Однако в настоящее время механизмы анаболической механотрансдукции, т.е. преобразования внешнего механического сигнала в последовательность внутриклеточных биохимических каскадов (сигнальных путей), регулирующих синтез белка, при различных уровнях гравитации (гипо- и гиперграватация) в скелетной мышце млекопитающих остаются малоизученными. Кроме того, важнейшей проблемой для космической и реабилитационной медицины является эффективное восстановление массы и работоспособности скелетных мышц, атрофированных вследствие пребывания в условиях невесомости/гипокинезии. Однако молекулярные механизмы активации синтеза мышечных белков в период восстановления (реадаптации) после функциональной разгрузки остаются неисследованными.

Известно, что в условиях земной гравитации постуральная мышца (*m. soleus*) демонстрирует сократительную активность, удерживая вес животного в течение большей части суток (Hodgson et al., 2005). Не исключено, что именно эта «антигравитационная» активность и позволяет поддерживать стабильную работу анаболических сигнальных путей. При этом антигравитационная активность постуральной мышцы характеризуется как объемом сократительной деятельности, регистрируемым потенциал-зависимыми и энергосенсорными внутриклеточными механизмами, так и резистивным напряжением, воспринимаемым комплексом механосенсорных молекулярных структур. В связи с этим, можно предположить, что при различных уровнях гравитации компоненты анаболических сигнальных путей в зависимости от их состояния и роли в процессах регуляции белкового синтеза будут в разной степени зависеть от объема сократительной активности и резистивного напряжения, отвечая на сигналы различных молекулярных сенсоров.

Более глубокое понимание тонких молекулярных механизмов, регулирующих синтез белка и мышечную массу скелетных мышц, особенно актуально для космической физиологии и реабилитационной медицины, поскольку позволит разработать эффективные меры профилактики мышечной атрофии, вызванной длительным бездействием (disuse atrophy).

Степень разработанности проблемы

Исследования, проведённые в условиях реальной невесомости (космический полёт) и в наземных модельных экспериментах показали, что снижение гравитационной нагрузки приводит к нарушению работы основных звеньев и структур двигательного аппарата млекопитающих (Григорьев et al., 2004). Совокупность негативных изменений, имеющих место в двигательной системе животных и человека в условиях реальной или моделируемой микрогравитации, получила название синдрома «гипогравитационной мышечной детренированности» или «гипогравитационного двигательного синдрома» (Kozlovskaya et al., 2007; Григорьев et al., 2004; Шенкман et al., 2017).

Хорошо известно, что реальная или моделируемая гравитационная разгрузка приводит к значительной атрофии скелетных мышц млекопитающих, при этом наиболее глубокие атрофические изменения наблюдаются в постуральной (позно-тонической, антигравитационной) камбаловидной мышце (Fitts et al., 2001; Jiang et al., 1992; Ohira et al., 1992; Ohira et al., 2002). Мышечная атрофия от бездействия (disuse atrophy) обусловлена как снижением скорости синтеза белка, так и активацией протеолитических процессов, что было показано в многочисленных модельных исследованиях на животных и человеке (Baehr et al., 2017; English et al., 2016; Ferrando et al., 1996; Fluckey et al., 2004; Glover et al., 2008; Goldspink et al., 1986; Loughna et al., 1986; Paddon-Jones et al., 2006; Symons et al., 2009; Tanner et al., 2015; Wall et al., 2013). Ранее было показано, что моделируемая гравитационная разгрузка может приводить к снижению скорости белкового синтеза в камбаловидной мышце крысы как *in vivo* (Baehr et al., 2017; Loughna et al., 1986) так и *in vitro* (Fluckey et al., 2004; Fluckey et al., 2002). При этом известно, что регуляция

белкового синтеза в скелетной мышце в ответ на изменение механической нагрузки (а также уровня гормонов, аминокислот) может осуществляться на уровне кэп-зависимой инициации трансляции (Hornberger et al., 2001; Kimball & Jefferson, 2010). Каноническим сигнальным путём, регулирующим синтез белка на уровне инициации трансляции, является каскад IGF-1/AKT/mTORC1, главные эффекторы которого – рибосомальная киназа p70 (p70S6K) и белок, связывающий фактор инициации трансляции 4E (4E-BP1) (Bodine et al., 2001; Glass, 2003). Кроме того, регуляция инициации трансляции может осуществляться посредством киназы гликогенсинтазы 3β (GSK-3β), являющейся ключевым звеном сигнального пути AKT/GSK-3β/eIF2B (Egerman & Glass, 2014). Протеинкиназа B (AKT) способна фосфорилировать и ингибировать GSK-3β, тем самым активируя фактор инициации трансляции 2B (eIF2B) (Egerman & Glass, 2014). Регуляция трансляции также может осуществляться посредством mTORC1-независимого сигнального пути MAPK/ERK, эффектором которого является киназа рибосомального белка p90 (p90RSK) (Roux & Topisirovic, 2012). В регуляции элонгации трансляции важная роль принадлежит эукариотическому фактору элонгации (eEF2), гиперфосфорилирование которого, как известно, ведёт к ингибированию элонгационной фазы трансляции белка (Matsakas & Patel, 2009). Важно отметить, что кроме регуляции процессов инициации и элонгации трансляции, определяющей эффективность трансляции (translational efficiency) важная роль в биосинтезе белка принадлежит трансляционной ёмкости (translational capacity), главным компонентом которой является рибосомальный биогенез (Chaillou et al., 2014; von Walden, 2019). Ключевыми маркерами биогенеза рибосом являются рибосомальные РНК (рРНК)18S и 28S, а также транскрипционный фактор c-Myc (Chaillou et al., 2014).

К настоящему времени накоплено достаточно много данных, касающихся состояния ключевых маркеров сигнальных путей, регулирующих синтез белка в камбаловидной мышце млекопитающих после 10-, 14 и более суток гравитационной разгрузки/иммобилизации. Так, было показано достоверное снижение фосфорилирования AKT (Ser473) (Dupont et al., 2011; Gwag et al., 2009), p70S6K (Thr389) (Dupont et al., 2011; Gwag et al., 2009; Лысенко et al., 2010), 4E-BP1 (Dupont et al., 2011) в камбаловидной мышце крысы после 14-суточного антиортостатического вывешивания. В то же время, некоторые авторы не обнаружили увеличения фосфорилированных форм p70S6K (Thr389) в *m.soleus* грызунов после 10 дней функциональной разгрузки (Sugiura et al., 2005). Van der Velden et al. (2007) не обнаружили изменений фосфорилирования AKT (Ser473) и GSK-3β (Ser9) в камбаловидной мышце мышей после 14-суточной гравитационной разгрузки (van der Velden et al., 2007). Полученные ранее данные об увеличении фосфорилирования eEF2 (Thr 56) в *m. soleus* крысы после 3-суточного антиортостатического вывешивания (Красный et al., 2013) могли свидетельствовать об ингибировании процесса элонгации трансляции. Bajotto et al. (2011) показали достоверное снижение содержания маркеров биогенеза рибосом 18S и 28S рРНК в камбаловидной мышце крысы после 6-суточного антиортостатического вывешивания (Bajotto et al., 2011).

В период первых 3-5 суток реадаптации (восстановления) после антиортостатического вывешивания (или иммобилизации конечности) в камбаловидной мышце грызунов наблюдалось увеличение фосфорилирования таких сигнальных молекул, как AKT, GSK-3β и p70S6K (Childs et al., 2003; Sugiura et al., 2005; van der Velden et al., 2007), при этом достоверное увеличение интенсивности синтеза белка в *m. soleus* крысы наблюдалось уже через 18 часов реадаптации после функциональной разгрузки (Taillandier et al., 2003). В целом, согласно гипотезе Д. Райли, в ранний период реадаптации в постуральных мышцах происходят изменения аналогичные тем, которые имеют место после эксцентрической нагрузки (Krippendorf & Riley, 1994; Riley et al., 1992; Riley et al., 1996).

В отличие от данных, касающихся эффектов воздействия гипогравитации, внутриклеточный анаболический ответ (фосфорилирование ключевых анаболических маркеров, интенсивность белкового синтеза) на действие хронической гиперграватации (вращение на центрифуге) в скелетных мышцах млекопитающих остаётся практически неисследованным.

В настоящее время в литературе отсутствуют систематические данные, которые позволили бы сформировать целостное представление о вкладе внутриклеточных анаболических сигнальных путей в регуляцию синтеза белка в скелетных мышцах млекопитающих как в условиях функциональной разгрузки, так и в период последующей реадаптации. Кроме того, молекулярные механизмы регуляции синтеза белка и мышечной массы в условиях гиперграватации до сих пор остаются нераскрытыми.

Цель и задачи исследования

Цель исследования состоит в раскрытии механизмов регуляции анаболических сигнальных путей в скелетных мышцах млекопитающих в условиях гравитационных воздействий.

Для успешной реализации цели поставлены следующие **основные задачи исследования**:

1. Проанализировать динамику синтеза белка и активность различных звеньев анаболического сигналинга в постуральной мышце крысы в процессе функциональной разгрузки и последующей реадаптации.
2. Оценить вклад AKT-зависимых и AKT-независимых сигнальных путей в активацию синтеза белка камбаловидной мышцы крысы в процессе трёхсуточного восстановления после функциональной разгрузки.
3. Выявить роль механочувствительных ионных каналов в реализации анаболического ответа на изменение механического состояния постуральной мышцы в острой фазе реадаптации после функциональной разгрузки.
4. Исследовать влияние хронической гиперграватации (30 суток) на внутриклеточные анаболические сигнальные пути и синтез белка в скелетных мышцах мышей линии C57BL/6.
5. Оценить состояние анаболического сигналинга в скелетных мышцах мышей линии C57BL/6 после 30-суточного космического полёта на борту биоспутника «БИОН-М» № 1.

Научная новизна исследования

Показано, что при переходе от тонической активности постуральной камбаловидной мышцы крысы к функциональной разгрузке (disuse) происходит перестройка сигнальных путей, обеспечивающих реализацию механической активности данной мышцы, что выражается в активации эндогенного ингибитора трансляции (GSK-3β), подавлении трансляционной ёмкости и последующем снижении интенсивности белкового синтеза.

Впервые проанализирована динамика интенсивности синтеза белка и активности ключевых маркеров анаболических сигнальных путей в *m.soleus* крысы в период реадаптации (до 24 часов (острая фаза), а также на 3, 7 и 14 сутки) после функциональной разгрузки. Было установлено, что один из молекулярных механизмов, обусловливающий активацию синтеза белка в *m.soleus* крысы в острой фазе реадаптации, связан с работой стретч-активируемых ионных каналов. Кроме того, с помощью ингибиторного анализа впервые показано, что активация синтеза белка в *m. soleus* крысы в период 3-суточной реадаптации после функциональной разгрузки обусловлена как AKT-зависимым сигнальным путём, так и AKT-независимым механизмом.

Впервые продемонстрировано, что пребывание мышей в условиях хронической 30-суточной гипергравитации (вращение на центрифуге с ускорением 2g) может приводить к дифференцированному ответу анаболических сигнальных систем в камбаловидной (*m. soleus*) и передней большеберцовой (*m. tibialis anterior*) мышцах. Так, в отличие от *m.soleus*, пребывание мышей в условиях непрерывной гипергравитации (2g) привело к выраженному анаболическому ответу в *m. tibialis anterior*. Усиление белкового синтеза в передней большеберцовой мышце сопровождалось активацией mTORC1-зависимых и mTORC1-независимых сигнальных путей. Также было впервые установлено, что усиление синтеза белка в *m. longissimus dorsi* мышей после периода непрерывной гипергравитации (2g) сопровождалось увеличением фосфорилирования 4E-BP1 – белка, являющегося субстратом протеинкиназного комплекса mTORC1.

Впервые получены данные о белковом содержании ключевых сигнальных молекул (IRS-1, GSK-3β, eEF2), задействованных в регуляции синтеза белка в икроножной мышце (*m. gastrocnemius medialis*) и длиннейшей мышце спины (*m. longissimus dorsi*) мышей после 30-суточного космического полёта на биоспутнике «БИОН-М» №1. После космического полёта в *m. gastrocnemius medialis* мышей наблюдалось достоверное снижение содержания субстрата инсулинового рецептора (IRS-1) и фосфорилирования киназы гликогенсинтазы (GSK-3β).

Теоретическая и практическая значимость работы

Полученные в рамках настоящего исследования результаты и выводы вносят существенный вклад в расширение представлений о природе и механизмах атрофии скелетных мышц, вызванной изменениями анаболического сигналинга в условиях реальной или моделируемой гравитационной разгрузки.

Решение проблемы молекулярных механизмов развития *атрофии от бездействия* (disuse atrophy) является одной из актуальных проблем в области современной физиологии скелетных мышц. Понимание механизмов развития мышечной атрофии позволит разработать новые эффективные средства профилактики (биологически активные добавки, фармакологические препараты, комплекс физических упражнений), которые смогут найти применение как в космической физиологии, так и клинической медицине.

Восстановление работоспособности скелетных мышц после функциональной разгрузки (атрофии) разного генеза (гипсовая иммобилизация конечностей, постельная гипокинезия, длительное пребывание в невесомости) является одной из важнейших задач космической физиологии и реабилитационной медицины. Существенная роль в восстановлении (реадаптации) скелетной мышцы после атрофии и/или атонии принадлежит синтезу белка. В связи с этим, полученные в рамках настоящей работы результаты вносят важный вклад в понимание фундаментальных закономерностей анаболического ответа скелетной мышцы в условиях острой реадаптации. Понимание механизмов активации синтеза белка в период реадаптации после функциональной разгрузки скелетных мышц может быть использовано для создания более эффективных методов реабилитации необходимых для восстановления мышечной массы и работоспособности после длительного периода гипокинезии/бездействия.

Материалы настоящей диссертации (обзор литературы, результаты, выводы) могут быть использованы преподавателями вузов и научными сотрудниками при написании учебников, научных работ и разработке новых курсов лекций по гравитационной физиологии, молекулярной физиологии и биохимии скелетных мышц млекопитающих. Кроме того, материалы диссертации могут быть востребованы студентами и аспирантами вузов и научных учреждений при написании выпускных квалификационных работ и диссертаций.

Положения, выносимые на защиту

1. Снижение интенсивности белкового синтеза в *m.soleus* крысы в первую неделю функциональной разгрузки сопровождается как снижением трансляционной ёмкости, так и трансляционной эффективности. Интенсификация белкового синтеза в период первой недели реадаптации после функциональной разгрузки сопровождается изменением активности сигнальных путей mTORC1/p70S6K и GSK-3β/eIF2B.

2. Активация синтеза белка в *m.soleus* крысы в ранний период восстановления после функциональной разгрузки обусловлена AKT-зависимыми и AKT-независимыми сигнальными путями, а также работой механо-активируемых ионных каналов.

3. Пребывание мышей в условиях непрерывной гипергравитации (30 суток) приводит к выраженному анаболическому ответу во флексоре, но не в экстензоре голени. Пребывание мышей в условиях невесомости (30 суток) приводит к

изменениям внутриклеточных анаболических маркеров в экстензоре голени, но не вызывает изменений в экстензоре спины.

Апробация результатов

Основные результаты и положения, изложенные в настоящей диссертации, были представлены и обсуждены автором на следующих всероссийских и международных научных мероприятиях: Всероссийская с международным участием школа-конференция по физиологии мышц и мышечной деятельности (Москва, 2013, 2015), 37th Congress of International Union of Physiological Sciences (Бирмингем, Великобритания, 2013), XXII съезд Физиологического общества имени И.П. Павлова (Волгоград, 2013), Международный симпозиум «Biological Motility» (Пущино, 2014, 2016), 40th Scientific Assembly COSPAR (Москва, 2014), Advances in Skeletal Muscle Biology in Health and Disease Conference (Гейнсвилл, США, 2017), Annual Meeting of the International Society for Gravitational Physiology (Ватерлоо, Канада, 2014; Любляна, Словения, 2015; Тулуза, Франция, 2016; Звенигород, Россия, 2017), Конференция по космической биологии и авиакосмической медицине с международным участием (Москва, 2014, 2015, 2016, 2018), European Muscle Conference (Зальцбург, Австрия, 2014; Монпелье, Франция, 2016; Потсдам, Германия, 2017; Будапешт, Венгрия, 2018), Международная конференция «Рецепторы и внутриклеточная сигнализация» (Пущино, 2015), Всероссийская конференция «Внутриклеточная сигнализация, транспорт, цитоскелет» (Санкт-Петербург, 2015), XXXIX Академические чтения по космонавтике, посвящённые памяти академика С.П. Королёва и других выдающихся отечественных учёных-пионеров освоения космического пространства (Москва, 2015), XV Всероссийское Совещание с международным участием и VIII школа по эволюционной физиологии (Санкт-Петербург, 2016), Конференция с международным участием «Клеточная биология: проблемы и перспективы» (Санкт-Петербург, 2017), X Всероссийский конгресс молодых учёных-биологов (Казань, 2017), 17th International Biochemistry of Exercise Conference (Пекин, КНР, 2018), Всероссийская конференция с международным участием «Интегративная физиология» (Санкт-Петербург, 2019, 2020).

На заседании секции Ученого совета ГНЦ РФ – ИМБП РАН "Космическая физиология и биология" (21 июля 2020 г.) была пройдена апробация материалов, изложенных в настоящей диссертации.

Публикации по теме исследования

По материалам диссертации опубликовано 56 печатных работ: 16 статей в научных изданиях, рекомендованных ВАК при Минобрнауки России и входящих в международные базы данных Scopus и/или Web of Science Core Collection, тезисов докладов – 40.

Личный вклад автора

Все разделы диссертационной работы выполнены непосредственно автором или при его непосредственном руководстве и личном участии. Автором диссертации разработано направление исследований, сформулированы цель и задачи исследования, осуществлено планирование экспериментов с животными. Полученные данные были обработаны, обобщены и интерпретированы лично автором. Ряд параметров в экспериментах, связанных с влиянием эксцентрических сокращений изолированной мышцы крыс на анаболический сигналинг и синтез белка получены совместно с научным сотрудником лаборатории миологии ГНЦ РФ – ИМБП РАН С.А. Тыгановым под руководством автора диссертации. Данные ПЦР анализа получены совместно с К.Г. Птицыным и Ю.Н. Ломоносовой. Организация эксперимента с вращением мышей на центрифуге была осуществлена сотрудниками лаборатории интегративной биологии костной ткани (руководитель лаборатории – проф. Л. Вико) (Национальный институт здоровья и медицинских исследований Франции, Лионский Университет, г. Сент-Этьен, Франция). В организации экспериментов с животными принимали участие сотрудники лаборатории миологии ГНЦ РФ – ИМБП РАН. Автору диссертации принадлежала ведущая роль в написании научных статей, тезисов докладов и представлении результатов исследований на международных конференциях.

Структура и объём диссертации

Диссертация изложена на 209 страницах, содержит 56 рисунков, 12 таблиц и включает следующие разделы: введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты и обсуждение, заключение и выводы. Список литературы состоит из 299 цитируемых источников.

Исследования, проведённые в рамках настоящей диссертации, были поддержаны грантами РФФИ (№ 14-04-31414, № 16-04-00530, № 16-34-60055), РНФ (№ 17-75-20152), а также Программой фундаментальных исследований ГНЦ РФ – ИМБП РАН.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Организация экспериментов

Все биохимические и молекулярно-биологические эксперименты на мышечной ткани лабораторных животных были выполнены в лаборатории миологии ГНЦ РФ – ИМБП РАН (заведующий лабораторией – доктор биологических наук, профессор Б.С. Шенкман) при участии следующих сотрудников лаборатории: С.А. Тыганов, Н.А. Вильчинская, С.П. Белова, О.В. Туртикова, С.В. Рожков. Все процедуры с животными были одобрены Комиссией по биомедицинской этике ГНЦ РФ – ИМБП РАН (Физиологическая секция Российского Комитета по биоэтике при Комиссии РФ по делам ЮНЕСКО). Эвтаназия животных осуществлялась с помощью внутрибрюшинного введения трибромэтанола (авертин). Материалом для

исследования служила мышечная ткань, полученная из следующих скелетных мышц лабораторных грызунов: *m. soleus, m. gastrocnemius, m. tibialis anterior, m. longissimus dorsi*. Ниже приведено описание основных экспериментов, на основе которых были получены главные выводы диссертационного исследования.

Динамика внутриклеточных анаболических маркеров и синтеза белка в m. soleus крысы в течение 7-суточной функциональной разгрузки задних конечностей

Цель эксперимента: оценить динамику синтеза белка и активность различных звеньев анаболических сигнальных систем в камбаловидной мышце крысы на ранних сроках функциональной разгрузки.

Организация эксперимента

Проведение эксперимента и обработка полученного биоматериала проводилась совместно с сотрудниками лаборатории миологии ГНЦ РФ – ИМБП РАН С.А. Тыгановым и Ю.Н. Ломоносовой. В эксперименте использовались самцы крыс Вистар массой 220±5 г., которые были случайным образом разделены на следующие группы: 1) «Контроль» (n=7), 2) «1HS» (n=7) – 1-суточное антиортостатическое вывешивание, 3) «3HS» (n=7) – 3-суточное вывешивание, 4) «7HS» (n=7) – 7-суточное вывешивание. Животные содержались в стандартных виварных условиях, получая стандартный корм и воду *ad libitum*. Все процедуры с животными были одобрены Комиссией по биомедицинской этике ГНЦ РФ – ИМБП РАН (протокол № 351 от 10.02.2014 г). Для определения интенсивности белкового синтеза методом SUnSET за 30 минут до эвтаназии каждой крысе внутрибрюшинно вводился гидрохлорид пуромицина (Enzo Life Sciences, США) в дозе 40 нмоль/г. Сразу после окончания процедуры антиортостатического вывешивания из задних конечностей крыс выделялись камбаловидные мышцы, быстро взвешивались, замораживались в жидком азоте, а затем хранились в низкотемпературном морозильнике (при температуре -85ºС) до последующего биохимического анализа. С помощью вестерн-блоттинга было проанализировано содержание тотальных и фосфорилированных форм ключевых внутриклеточных анаболических маркеров, а также белков, конъюгированных с пуромицином (для определения интенсивности белкового синтеза). С помощью ПЦР была проанализирована экспрессия 28S рРНК.

Динамика синтеза белка и маркеров анаболических сигнальных путей в камбаловидной мышце крысы в процессе реадаптации после функциональной разгрузки

Цель эксперимента: оценить динамику синтеза белка и сигнальных молекул, регулирующих белковый синтез в камбаловидной мышце крысы на разных сроках реадаптации (1, 3, 7 и 14 суток) после моделируемой гравитационной разгрузки.

Организация эксперимента

В эксперименте использовались самцы крыс Вистар массой 220±5 г., которые были случайным образом разделены на следующие группы: 1) «Контроль» (n=7), 2) «14HS» (n=7) – 14-суточное антиортостатическое вывешивание, 3) «1R» (n=7) – 1-суточная реадаптация после вывешивания, 4) «3R» (n=7) – 3-суточная реадаптация после вывешивания, 5) «7R» (n=7) – 7-суточная реадаптация после вывешивания, 6) «14R» (n=7) – 14-суточная реадаптация после вывешивания. Все процедуры с животными были одобрены Комиссией по биомедицинской этике ГНЦ РФ – ИМБП РАН (протокол № 392 от 15.05.2015). Животные содержались в виварных условиях, получая стандартный корм и воду *ad libitum*. Для определения интенсивности белкового синтеза методом SUnSET за 30 минут до эвтаназии каждой крысе внутрибрюшинно вводился гидрохлорид пуромицина (Enzo Life Sciences, США) в дозе 40 нмоль/г.

Молекулярные механизмы активации синтеза белка в камбаловидной мышце крысы на 3-и сутки реадаптации после функциональной разгрузки

Цель эксперимента: с помощью специфических ингибиторов определить возможный вклад PI3K/AKT-зависимых и PI3K/AKT-независимых внутриклеточных сигнальных путей в процесс активации синтеза белка в камбаловидной мышце крысы на 3-й день реадаптации после функциональной разгрузки.

Организация эксперимента

В исследовании использовались самцы крыс Вистар массой 200±10 г, которые были случайным образом разделены на 5 групп (в каждой группе по 7 животных): «С» (контроль), «14-HS» (вывешивание в течение 14 суток), «3R+placebo» (восстановление в течение 3 суток после 14-суточного вывешивания на фоне введения физраствора), «3R+Wort» (восстановление в течение 3 суток с введением вортманнина), «3R+But» (восстановление в течение 3 суток с введением бутанола-1). Животные группы «Контроль» содержались в виварных условиях, получая стандартный корм и воду *ad libitum*. Вводимые дозы ингибиторов были подобраны на основании анализа литературных данных (Hornberger et al., 2006; O'Neil et al., 2009). Внутримышечные инъекции ингибиторов делали один раз в сутки в течение 3-суточного периода восстановления. Все ингибиторы растворяли в 0,5 % растворе диметилсульфоксида (ДМСО). Доза вортманнина составила 0,8 мг/кг веса животного (инъекции по 100 мкл в каждую заднюю конечность). Доза 1% бутанола-1 составляла 2 мл на каждую крысу (1мл внутрибрюшинно + по 500 мкл в каждую заднюю конечность). Группе «3R+placebo» вводили плацебо (0,5% ДМСО в физрастворе, по 100 мкл в каждую заднюю конечность). Программа эксперимента и все манипуляции, выполняемые с животными, были одобрены комиссией по биомедицинской этике ГНЦ РФ – ИМБП РАН (Протокол № 351 от 10.02.2014г.). Для определения интенсивности белкового синтеза методом SUnSET за 30 минут до

эвтаназии каждой крысе внутрибрюшинно вводился гидрохлорид пуромицина (Enzo Life Sciences, США) в дозе 40 нмоль/г.

Роль стретч-активируемых ионных каналов в активации внутриклеточных анаболических процессов в камбаловидной мышце крысы в период острой реадаптации (12 часов) после функциональной разгрузки

Цель эксперимента: с помощью ингибитора стретч-активируемых каналов – соли гадолиния – выявить возможный вклад данных ионных каналов в активацию синтеза белка в *m. soleus* крысы в период острой реадаптации после антиортостатического вывешивания.

Организация эксперимента

Двадцать восемь самцов крыс Вистар массой 225±10 г, были случайным образом разделены на четыре группы (по 7 животных в каждой группе): 1) «Con» (n=7) – виварный контроль, 2) «HS» (n=7) – 14-суточное антиортостатическое вывешивание, 3) «12h R» (n=7) – 12-часовая реадаптация после вывешивания, 4) «12h R+Gd» (n=7) - 12-часовая реадаптация после вывешивания с введением ингибитора ($GdCl_3$) стретч-активируемых каналов. Внутрибрюшинная инъекция хлорида гадолиния (Santa Cruz Biotechnology, США) в дозе 10 мг/кг производилась сразу после окончания антиортостатического вывешивания. Программа эксперимента и все манипуляции, выполняемые с животными, были одобрены комиссией по биомедицинской этике ГНЦ РФ – ИМБП РАН (протокол № 444 от 28.03.2017г.). Для определения интенсивности белкового синтеза методом SUnSET за 30 минут до эвтаназии каждой крысе внутрибрюшинно вводился гидрохлорид пуромицина (Enzo Life Sciences, США) в дозе 40 нмоль/г. Эвтаназия животных проводилась посредством внутрибрюшинного введения 10% раствора авертина (10 мл/кг). Исследованию подвергалась камбаловидная мышца.

Влияние 30-суточной гипергравитации (2g) на скорость синтеза белка и маркеры анаболических сигнальных путей в различных скелетных мышцах мышей

Цель эксперимента: оценить скорость белкового синтеза и степень фосфорилирования ключевых анаболических маркеров в скелетных мышцах (флексорах и экстензорах) мышей после хронической 30-суточной гипергравитации, создаваемой вращением на центрифуге с ускорением 2g.

Организация эксперимента

Эксперименты проводились на самцах мышей линии C57BL/6J (масса тела ~ 25,5 г). Животные были разделены на контрольную группу (группа «Контроль», n = 8) и группу, которая подвергалась 30-суточному вращению на центрифуге с ускорением 2 g (группа «2 g», n = 8). Эксперимент с хроническим вращением проходил на базе Лионского университета (г. Сент-Этьен, Франция). На протяжении всего эксперимента животные получали корм и воду *ad libitum*. Эвтаназия животных

осуществлялась методом цервикальной дислокации. После этого исследуемые скелетные мышцы быстро извлекались, взвешивались и замораживались в жидком азоте. Программа эксперимента и все манипуляции, выполняемые с животными, были одобрены Комиссией по биомедицинской этике Лионского университета (Франция) и Министерством сельского и лесного хозяйства Франции (разрешение № 04827). Материалом исследования служили камбаловидная мышца (*m. soleus*), передняя большеберцовая мышца (*m. tibialis anterior*) и фрагмент длиннейшей мышцы спины (*m. longissimus dorsi*) мышей линии C57BL/6J. Для определения интенсивности белкового синтеза методом SUnSET за 30 минут до эвтаназии каждому животному внутрибрюшинно вводился гидрохлорид пуромицина (Enzo Life Sciences, США) в дозе 40 нмоль/г.

Влияние 30-суточного космического полёта на маркеры анаболических сигнальных путей в скелетных мышцах мышей

Цель исследования: оценить содержание ключевых маркеров анаболических сигнальных путей в *m. gastrocnemius medialis* и *m. longissimus dorsi* мышей C57/BL6, которые находились в условиях невесомости в течение 30 суток.

Организация исследования

Исследованию были подвергнуты мыши линии C57/BL6 (возрастом 19-20 недель, весом 22-25 г), которые в 2013 году пребывали в условиях невесомости (30 суток) на борту биоспутника «БИОН-М» №1 (группа «полёт», n=5). С момента приземления биоспутника до изъятия проб мышечной ткани прошло приблизительно 12-14 часов. Эвтаназию животных осуществляли методом цервикальной дислокации. После извлечения, исследуемую мышцу быстро взвешивали и немедленно замораживали в жидком азоте, а затем хранили при температуре -85ºС до начала биохимического анализа. В процедурах, связанных с эвтаназией животных и извлечением биоматериалов участвовали сотрудники лаборатории миологии ГНЦ РФ – ИМБП РАН, а именно Т.Л. Немировская, С.П. Белова, О.В. Туртикова, Э.Г. Алтаева. Мыши из группы «полёт» сравнивались с группой мышей, которые находились в стандартных виварных условиях (группа «контроль», n=7). Все процедуры с животными были одобрены Комиссией по биоэтике НИИ митоинженерии МГУ (протокол № 35 от 1 ноября 2012 г.) и Комиссией по биомедицинской этике ГНЦ РФ – ИМБП РАН (протокол № 319 от 4 апреля 2013 г.). Эксперименты выполнялись в соответствии с Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (Страсбург, 18 марта 1986 г.).

Методология и методы исследования

Для успешной реализации цели настоящего исследования использовалась современная методология, позволившая адекватно подойти к выполнению научных задач исследования. Ниже описываются основные методологические подходы и методы, которые нашли применение в рамках настоящего диссертационного исследования.

1. *Космический полёт на биоспутнике «БИОН М» №1.* Данный подход использовался с целью исследования влияния 30-суточного космического полёта на ключевые маркеры анаболических сигнальных путей в скелетных мышцах мышей линии C57/BL6. С подробной информацией о проекте *«БИОН М» №1* и описанием экспериментов, проводимых на борту данного биоспутника можно ознакомиться в публикации Andreev-Andrievskiy et al. (2014).

2. *Модель антиортостатического вывешивания грызунов* (англ. – hindlimb unloading, HU или hindlimb suspension, HS) *по Ильину-Новикову* (Novikov & Ilyin, 1981) *в модификации Morey-Holton* (Morey-Holton & Globus, 2002) (Рисунок 1). В настоящей диссертационной работе данная модель являлась основным экспериментальным подходом для функциональной разгрузки задних конечностей лабораторных крыс. Антиортостатическое вывешивание грызунов широко используется для моделирования микрогравитации, т.к. оно обеспечивает функциональную разгрузку скелетных мышц задней группы голени, вызывая структурные и функциональные изменения, которые наблюдаются в условиях пребывания в невесомости (Globus & Morey-Holton, 2016; Morey-Holton & Globus, 2002). Антиортостатическое вывешивание грызунов также позволяет исследовать процессы реадаптации (восстановления) скелетных мышц задних конечностей после периода функциональной разгрузки. Антиортостатическое вывешивание заключается в том, что крысы или мыши подвешиваются за хвост под углом около 30 градусов к полу клетки таким образом, чтобы задние конечности не касались пола, а передние конечности опирались на него (Рисунок 1). Благодаря специально сконструированной системе, данная экспериментальная модель позволяет животным свободно передвигаться по клетке передними ногами, вращаться на 360º, имея при этом свободный доступ к корму и питьевой воде.

Рисунок 1 – Модель антиортостатического вывешивания грызунов (Atherton et al., 2016).

При правильном выполнении всех условий содержания животных, хронические эксперименты с использованием этой модели, как правило, не сопровождаются гормональными проявлениями стрессовой реакции (Morey-Holton & Globus, 2002; Ogneva et al., 2014; Thomason & Booth, 1990; Tyganov et al., 2019). Все эксперименты с использованием данной модели, выполненные в рамках настоящего исследования, были одобрены Комиссией по биомедицинской этике ГНЦ РФ – ИМБП РАН. Для реализации задач настоящего исследования антиортостатическое вывешивание самцов крыс Вистар проводилось в течение 1, 3, 7 и 14 суток.

3. *Продолжительное вращение мышей на центрифуге для создания условий хронической гипергравитации.* Эксперимент с хроническим вращением (30 суток) самцов мышей C57/BL на центрифуге с ускорением 2g проходил на базе Лионского университета (г. Сент-Этьен, Франция). Диаметр центрифуги для животных составлял 2,8 м. Скорость вращения центрифуги составляла 29,6 оборотов в минуту. Программа эксперимента и все манипуляции, выполняемые с животными, были одобрены комиссией по биомедицинской этике Лионского университета (Франция) и Министерством сельского и лесного хозяйства Франции (разрешение № 04827).

4. *Метод SUnSET (англ. – surface sensing of translation).* Представляет собой нерадиоактивный метод определения скорости общего синтеза белка *in vivo* (Goodman et al., 2011). Данный метод предполагает использование антибиотика пуромицина (структурного аналога тирозил-тРНК) и соответствующих антител для выявления количества пуромицина, встраивающегося в образующиеся пептидные цепи (Schmidt et al., 2009). Было показано, что включение пуромицина в растущую полипептидную цепь ограничивает элонгацию, причём, когда пуромицин используется в низких дозах (40 нмоль/г веса животного), накопление конъюгированных с пуромицином пептидов отражает интенсивность белкового синтеза (Schmidt et al., 2009). В настоящее время технология пуромицинового мечения с последующим использованием методов иммуногистохимии и/или вестерн-блоттинга позволяет исследовать интенсивность белкового синтеза *in vivo* не только на уровне какой-либо ткани, но и на уровне отдельной клетки/мышечного волокна (Goodman et al., 2011).

5. *Электрофорез белков в полиакриламидном геле с последующим иммуноблоттингом*. Предварительно замороженные образцы мышечной ткани нарезали (75-80 срезов толщиной 20 микрон) в пробирки на криомикротоме (Leica, Германия) при температуре минус 23 ^{o}C. После этого в пробирки с мышечной тканью добавлялся охлаждённый лизирующий буфер *RIPA Lysis Buffer System* (sc-24948, Santa Cruz Biotechnology, США) с добавлением 5мМ EDTA, 1мМ Na3VO4, 1мМ DTT, 1мМ PMSF, 1мМ апротинина, 1мМ лейпептина, 1мМ пепстатина А и коктейля ингибиторов фосфатаз (40 мкл/мл) (Phosphatase Inhibitor Cocktail B, sc-45045, Santa Cruz Biotechnology, США) из расчёта 130 мкл буфера на одну пробирку. Далее проводилась гомогенизация и центрифугирование (15 минут, 12 000 об/мин, при температуре +4°C). Затем отбиралась надосадочная жидкость и определялась концентрация белка в пробах с помощью спектрофотометра UV – 2450 (Shimadzu, Япония) или планшетного спектрофотометра Epoch (BioTek, США) методом Bradford (Bradford, 1976). С помощью калибровочной кривой была рассчитана

концентрация белка в пробах мышечной ткани. Гель-электрофорез по методу Лэммли (Laemmli, 1970) (1 час, сила тока 17мА на один гель) проводили в 8-10% разделяющем полиакриламидном геле в системе Bio-Rad (США). Перенос белков на нитроцеллюлозную мембрану по методу Towbin et al.. (1979) (Towbin et al., 1979) осуществляли в системе mini Trans-Blot (Bio-Rad, США) в течение 2 часов при температуре +4ºС и постоянном напряжении 100 В. Сразу после процедуры переноса белков нитроцеллюлозная мембрана окрашивалась красителем Ponceau S для того, чтобы убедиться в равной загрузке белка на все дорожки. После этого мембрану отмывали от Ponceau S и блокировали в 5% растворе сухого молока в PBST (фосфатно-солевой буффер с 0,1% содержанием Tween 20) при комнатной температуре в течение 1 часа. После этого проводилась инкубация мембраны с первичными антителами (в течение 15 часов, +4ºС) против целевых регуляторных белков или пуромицина. Далее проводилась отмывание мембраны в PBST 3 раза по 5 минут и последующая инкубация мембраны (1 час) с вторичными антителами goat anti-rabbit или goat anti-mouse. После этого мембрана отмывалась в PBST 3 раза по 5 минут. Белковые полосы выявляли на мембране с помощью ClarityTM Western ECL Substrate (#1705061, Bio-Rad, США). Анализ белковых полос проводили с использованием блот-сканера C-DiGit (LI-COR Biotechnology, США) и соответствующей программы Image Studio Digits. Для пуромицина измеряли оптическую плотность каждой целой дорожки от 20 до 175 кДа. Часть параметров была выявлена на плёнке с помощью Star TM Substrate Kit (Bio-Rad, США) с последующим анализом на денситометре GS-800 (Quantity One software TM, Bio-Rad, США). Вестерн-блоттинг для каждого эксперимента проводился не менее двух раз.

6. *Выделение РНК и определение её общего содержания*. На криомикротоме (Leica, Германия) при температуре минус 23 °С мышечную ткань нарезали в пробирки и взвешивали на электронных весах. Выделение РНК из образцов мышечной ткани проводилось с помощью набора RNeasy Micro Kit (Qiagen, США) согласно инструкции производителя. Концентрацию общей РНК определяли на планшетном спектрофотометре Epoch (BioTek, США) при длине волны 260 нм.

7. *Метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени с обратной транскрипцией.* После выделения общей РНК из мышечной ткани с помощью RNeasy Micro Kit (QIAGEN, Германия), все образцы РНК обрабатывались протеиназой К и ДНК-азой I. Для обратной транскрипции использовались водный раствор 0,5 мкг РНК, олиго(dT)15, гексануклеотиды d(N)6, обратная транскриптаза MMLV (Синтол, Россия). Обратную транскрипцию проводили при 37°С в течение 60 мин согласно стандартному протоколу. Полученные образцы кДНК хранили при –80°С. Далее проводилась ПЦР в реальном времени с использованием интеркалирующего красителя SYBR Green I в амплификаторе CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories, США). Для анализа данных использовали программу REST (Relative expression software tool) 2009 v.2.0.12 (QIAGEN, Германия). О программе REST можно подробно ознакомиться в статье Pfaffl et al. (2002).

Последовательности праймеров, использованные для проведения ПЦР были следующие: 5’-GAGATTCCCACTGTCCCTACCT-3’ и 5’-GGCCTCCCACTTATTCTACACC-3’ для *Rn28s* (28S рРНК); 5’-TTGATGGGGATGACCCTGAC-3’ и 5’-CTCGCCCAAATCCTGTACCT-3’ для *Myc*; 5’-TCATGAAGTGTGACGTTGACATCC-3’ и 5’-GTAAAACGCAGCTCAGTAACAGTC-3’ для *β-actin* (референсный ген); 5’-ACGGCAAGTTCAACGGCACAGTCAA-3’ и 5’-GCTTTCCAGAGGGGCCATCCACA-3’ для *GAPDH* (референсный ген).

8. *Статистическая обработка данных*. Полученные данные анализировали с использованием таких программ, как REST 2009 v.2.0.12 и Microsoft Excel. Данные представлены в виде средних значений ± стандартная ошибка среднего значения. Статистический анализ полученных экспериментальных данных проведён с помощью дисперсионного анализа (ANOVA) с *post-hoc* критерием Тьюки для множественных сравнений. Если выборка не отвечала параметрам нормального распределения, то анализ данных проводился с помощью непараметрических методов (U-критерий Манна-Уитни, критерий Краскела – Уоллиса). Значимыми считали отличия при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Динамические изменения внутриклеточных анаболических маркеров и синтеза белка в *m. soleus* крысы в течение 7-суточной функциональной разгрузки задних конечностей.

После 3-х суток антиортостатического вывешивания было отмечено достоверное снижение сухой массы *m. soleus* (-11%, $p<0,05$). В группе «7HS» снижение сухого веса *m. soleus* было более глубоким (- 35%, $p<0,05$). После 7-суточной функциональной разгрузки отношение массы сухой *m. soleus* к массе тела животного было снижено на 32% ($p<0,05$). Функциональная разгрузка задних конечностей крыс в течение 3 и 7 суток привела к достоверному снижению скорости общего синтеза белка в *m. soleus* более, чем на 40% ($p<0,05$) по сравнению в группой виварного контроля (Рисунок 2).

По сравнению с контролем, статус фосфорилирования AKT был достоверно снижен через трое (-32%, $p<0,05$) и семь (-58%, $p<0,05$) суток функциональной разгрузки (Рисунок 3). Для GSK-3β наблюдался схожий паттерн фосфорилирования в процессе разгрузки: достоверное снижение на 53% и 91% ($p<0,05$) на 3-и и 7-е сутки, соответственно (Рисунок 3).

Уровень фосфорилирования p70S6K был выше контрольных значений после 1- и 3-суточной функциональной разгрузки ($p<0,05$), а на 7-е сутки не отличался от контрольных значений (Рисунок 4). Фосфорилирование p90RSK снизилось на 31% ($p<0,05$) относительно контроля на 3-и сутки разгрузки (Рисунок 4). Уровень фосфорилирования 4E-BP1 снизился на 35% ($p<0,05$) через 24 часа после функциональной разгрузки.

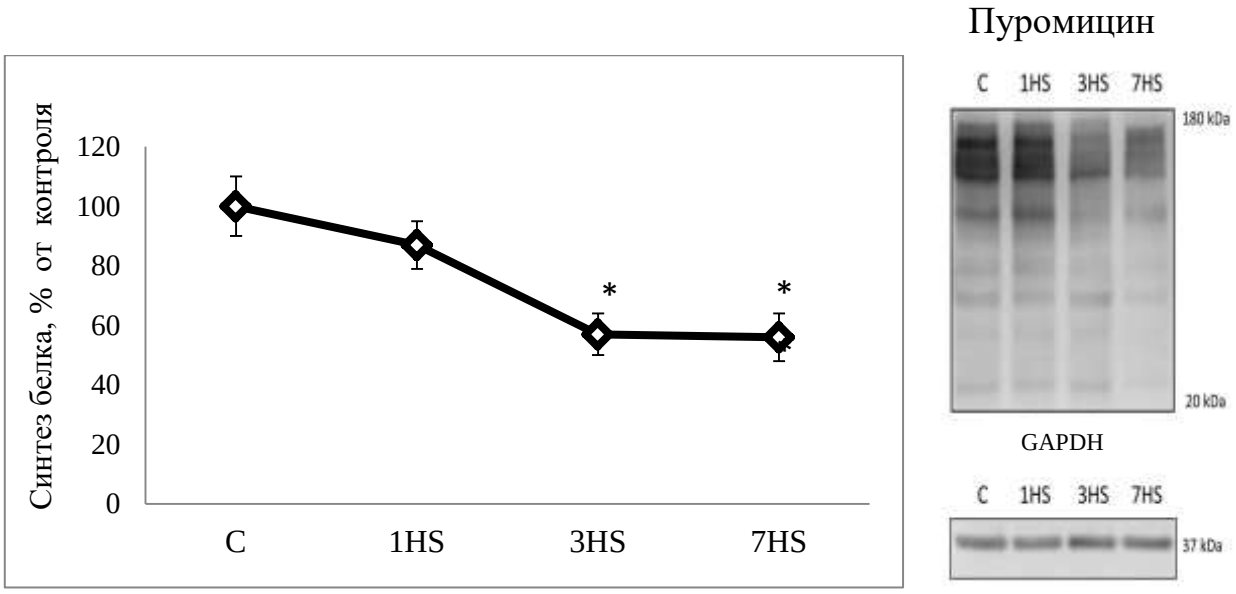


Рисунок 2 – Динамика интенсивности белкового синтеза в m. soleus крысы. С – контроль, 1HS, 3HS, 7HS – антиортостатическое вывешивание в течение 1, 3 и 7 суток. * – достоверное отличие от контрольной группы (p<0,05); n=7 для каждой группы. (Данные получены совместно с С.А. Тыгановым – сотрудником лаборатории миологии ГНЦ РФ – ИМБП РАН). *Источник: Mirzoev T., Tyganov S., Vilchinskaya N., Lomonosova Y., Shenkman B. Key Markers of mTORC1-Dependent and mTORC1-Independent Signaling Pathways Regulating Protein Synthesis in Rat Soleus Muscle During Early Stages of Hindlimb Unloading // Cell. Physiol. Biochem. – 2016 – Vol. 39, №3. – P.1011–1020.*

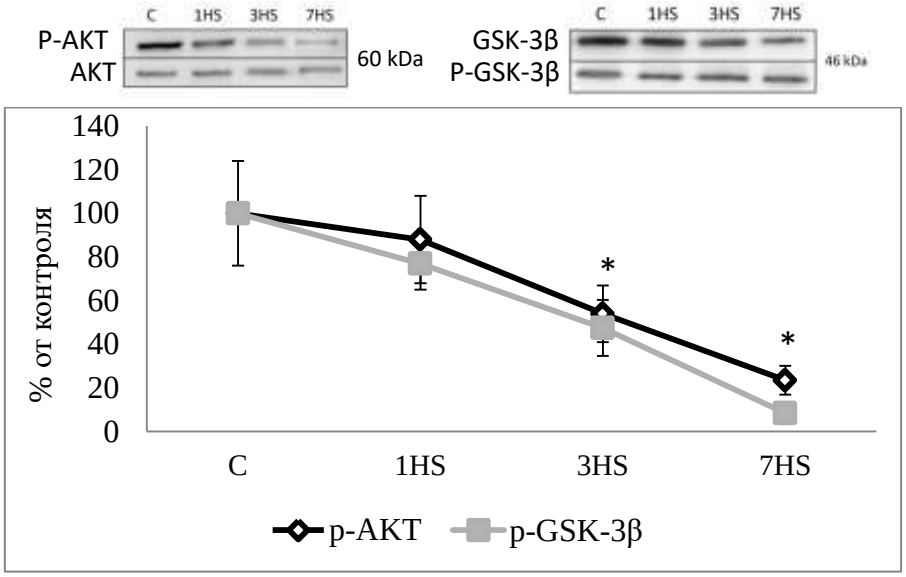


Рисунок 3 – Динамика фосфорилирования AKT и GSK-3β в *m. soleus* крысы. С – контроль, 1HS, 3HS, 7HS – антиортостатическое вывешивание в течение 1, 3 и 7 суток. * – достоверное отличие от контрольной группы (p<0,05); n=7 для каждой группы. (Данные получены совместно с С.А. Тыгановым – сотрудником лаборатории миологии ГНЦ РФ – ИМБП РАН). *Источник: Mirzoev T., Tyganov S., Vilchinskaya N., Lomonosova Y., Shenkman B. Key Markers of mTORC1-Dependent and mTORC1-Independent Signaling Pathways Regulating Protein Synthesis in Rat Soleus Muscle During Early Stages of Hindlimb Unloading // Cell. Physiol. Biochem. – 2016 – Vol. 39, №3. – P.1011–1020.*

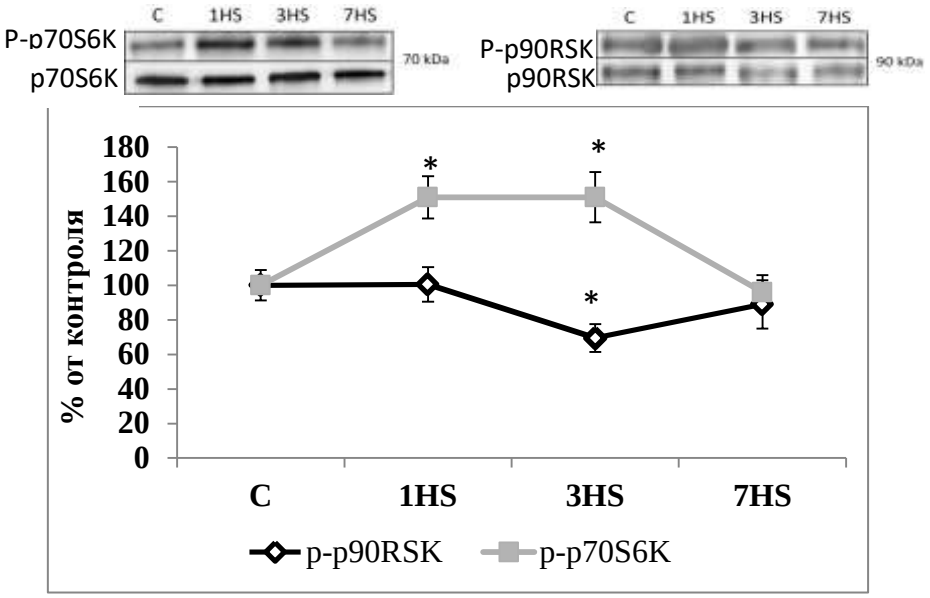


Рисунок 4 – Динамика фосфорилирования p70S6K и p90RSK в *m. soleus* крысы. С – контроль, 1HS, 3HS, 7HS – антиортостатическое вывешивание в течение 1, 3 и 7 суток. * – достоверное отличие от контрольной группы ($p<0,05$); n=7 для каждой группы. (Данные получены совместно с С.А. Тыгановым – сотрудником лаборатории миологии ГНЦ РФ – ИМБП РАН).

Важно отметить, что функциональная разгрузка в течение 1, 3 и 7 суток привела к достоверному снижению таких маркеров рибосомального биогенеза, как содержание общей РНК (рРНК составляет около 80% от общей РНК в клетке) и экспрессия 28S рРНК (Таблица 1).

Таблица 1 – Содержание общей РНК и экспрессия 28S рРНК в камбаловидной мышце крысы в динамике функциональной разгрузки (данные получены совместно с Ю.Н. Ломоносовой – сотрудницей лаборатории миологии ГНЦ РФ – ИМБП РАН). *Источник: Mirzoev T., Tyganov S., Vilchinskaya N., Lomonosova Y., Shenkman B. Key Markers of mTORC1-Dependent and mTORC1-Independent Signaling Pathways Regulating Protein Synthesis in Rat Soleus Muscle During Early Stages of Hindlimb Unloading // Cell. Physiol. Biochem. – 2016 – Vol. 39, №3. – P.1011–1020.*

	Общая РНК, мкг/ мышечная ткань, мг	28S рРНК, $2^{-\Delta\Delta Ct}$
C	1,041±0,0909	1±0,1
1 HS	0,7082±0,0483*	0,772±0,112*
3HS	0,792±0,0759*	0,623±0,134*
7 HS	0,8595±0,0464*	0,361±0,152*

* – достоверное отличие от контрольной группы ($p<0,05$); n=7 для каждой группы

Одной из главных причин уменьшения содержания белка в камбаловидной мышце в условиях функциональной разгрузки является снижение скорости белкового синтеза. Об этом свидетельствуют как результаты настоящего

исследования, так и данные, полученные ранее данные о том, что интенсивность синтеза белка в *m. soleus* крысы снижается после 3-х (Loughna et al., 1986), 4-х (Fluckey et al., 2004) и 28-и (Fluckey et al., 2002) суток функциональной разгрузки. Достоверное снижение белкового синтеза наблюдалось и в камбаловидной мышце мышей после 7-суточной иммобилизации задней конечности (You et al., 2015). Ведущая роль в регуляции синтеза белка принадлежит комплексу mTORC1, который, обладая протеинкиназной активностью, может фосфорилировать p70S6K и 4E-BP1, инициируя процесс трансляции на рибосоме (Kimball & Jefferson, 2010). В настоящем исследовании наблюдалось увеличение фосфорилирования p70S6K после 1- и 3-суточного функциональной разгрузки, что не согласуется с ранее опубликованными данными о снижении фосфорилирования этого белка на более длительных сроках антиортостатического вывешивания (Dupont et al., 2011; Sugiura et al., 2005; Лысенко et al., 2010). Однако You et al. (2015), используя модель иммобилизации конечности, показали, что снижение синтеза белка и одновременное увеличение фосфорилирования p70S6K может происходить в *m. soleus* мышей на 3-и и 7-е сутки функциональной разгрузки (You et al., 2015). You et al.(2015) предполагают, что такая активация mTORC1-сигналинга на фоне снижения синтеза белка может являться физиологическим ответом, направленным на компенсацию снижения количества белка в мышце в процессе развития атрофии. Однако возможные молекулярные механизмы, приводящие к активации mTORC1 на ранних сроках функциональной разгрузки, не рассматриваются. В то же время недавно полученные в лаборатории миологии ГНЦ РФ – ИМБП РАН данные свидетельствуют о том, что на начальном этапе функциональной разгрузки в камбаловидной мышце крысы снижается фосфорилирование AMPK (Vilchinskaya et al., 2017). AMPK, как известно, является эндогенным ингибитором mTORC1 (Bolster et al., 2002; Inoki et al., 2003; Kimura et al., 2003; Williamson et al., 2006). Можно предположить, что снижение активности AMPK приводит к ослаблению ингибирующего влияния на mTORC1 и, соответственно, к повышению активности p70S6K.

Уровень фосфорилирования другого субстрата mTORC1 – белка 4E-BP1 – в настоящем исследовании был достоверно снижен после 1-суточной функциональной разгрузки, а после 3-х и 7-и суток не отличался от контрольных значений. В ранее опубликованных работах данные о фосфорилировании 4E-BP1 в скелетных мышцах в условиях функциональной разгрузки неоднородны. Так, в *m. soleus* мышей фосфорилирование 4E-BP1 после 3-х и 7-и суток разгрузки не отличалось от контрольных показателей (Cannavino et al., 2014), тогда как в *m. soleus* крысы на более длительных сроках разгрузки наблюдалось снижение фосфорилирования 4E-BP1 (Dupont et al., 2011). Важно также отметить, что к настоящему моменту накопились данные о том, что фосфорилирование комплексом mTORC1 своих основных субстратов, а именно p70S6K по Thr 389 и 4E-BP1 по Thr 37/46, может значительно отличаться в ответ на одни и те же сигналы (Kang et al., 2013; You et al., 2019). Речь идёт о наличии как рапамицин-чувствительных сайтов фосфорилирования (сайт Thr 389 у p70S6K), так и рапамицин-резистентных сайтов

фосфорилирования (сайт Thr 37/46 у 4E-BP1) (Goodman et al., 2017; Kang et al., 2013; You et al., 2019).

Значительное снижение уровня фосфорилирования AKT и GSK-3β после 3- и 7-суточной функциональной разгрузки могло приводить к ингибированию активности фактора eIF2B и последующему подавлению инициации трансляции на рибосоме (Pap & Cooper, 2002). Фосфорилирование маркера mTORC1-независимого пути MAPK/ERK - белка p90RSK - снизилось относительно контрольного уровня после 3-х суток антиортостатического вывешивания. Это вполне согласуется с данными, ранее опубликованными сотрудниками лаборатории миологии ГНЦ РФ – ИМБП РАН (Лысенко et al., 2010). Снижение уровня фосфорилирования p90RSK могло негативно повлиять на процесс синтеза белка в мышце. Важно также отметить, что на раннем этапе функциональной разгрузки (3 суток) в камбаловидной мышце крысы наблюдалось повышенное фосфорилирование фактора элонгации eEF2 (Красный et al., 2013), что могло приводить к ингибированию процесса элонгации трансляции.

В связи с тем, что в последние годы роли трансляционной ёмкости в регуляции синтеза белка и мышечной массы стало уделяться повышенное внимание (Chaillou et al., 2014; von Walden, 2019) в настоящем исследовании произведена оценка 2-х маркеров биогенеза рибосом (содержание общей РНК и экспрессия 28S рРНК). Полученные данные согласуются с работой Bajotto et al. (2011) о значительном снижении содержания рибосомальных РНК в скелетной мышце крысы после антиортостатического вывешивания (Bajotto et al., 2011). Кроме того, достоверное снижение общей РНК в скелетных мышцах грызунов после функциональной разгрузки было показано в более ранних исследованиях (Babij & Booth, 1988; Goldspink et al., 1986).

Таким образом, полученные результаты позволяют предположить, что снижение интенсивности белкового синтеза в *m. soleus* крысы в первую неделю функциональной разгрузки (3 и 7 дней) может быть связано со снижением рибосомального биогенеза, а также трансляционной эффективности через сигнальный путь AKT/GSK3β.

После окончания периода реальной или моделируемой гипогравитации атрофированная постуральная мышца (*m. soleus*) оказывается в условиях реадаптации. Поскольку существует схожесть морфологических изменений, происходящих в волокнах постуральных мышц в период острой реадаптации и после выполнения эксцентрических мышечных сокращений, можно предположить, что в ранний период реадаптации после функциональной разгрузки будет наблюдаться активация белкового синтеза. Однако молекулярные механизмы активации синтеза мышечного белка в постуральной камбаловидной мышце в ранний период реадаптации до сих пор оставались неисследованными. С целью выявления потенциальных молекулярных механизмов активации белкового синтеза в *m. soleus* крысы в ранний период восстановления были проведены нижеописанные эксперименты.

Динамика синтеза белка и маркеров анаболических сигнальных путей в камбаловидной мышце крысы в процессе реадаптации после функциональной разгрузки. Отношение веса *m.soleus* к весу животного оказалось достоверно ($p<0,05$) ниже контрольных значений во всех экспериментальных группах животных, кроме группы 14-суточного восстановления. При этом достоверное ($p<0,05$) увеличение массы *m.soleus* относительно группы 14-суточной функциональной разгрузки наблюдалось на 1, 3, 7 и 14 сутки реадаптации. Уже на начальном этапе (24 часа) реадаптации атрофированной мышцы наблюдалось резкое увеличение скорости синтеза белка как относительно группы вывешивания, так и относительно контроля (Рисунок 5). После 3-х и 7-и суток периода реадаптации интенсивность трансляции оставалась повышенной относительно контрольного уровня ($p<0,05$), а к 14-м суткам уже не отличалась от контрольных значений (Рисунок 5).

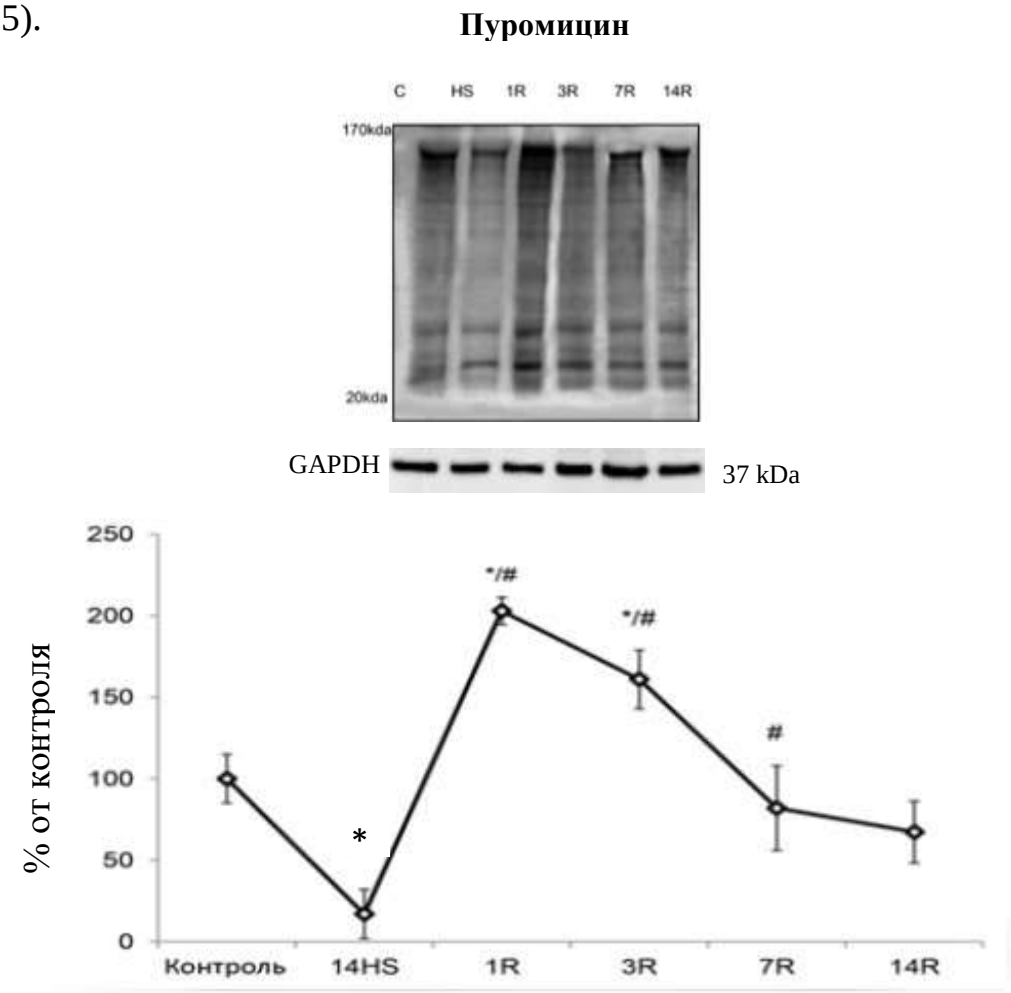


Рисунок 5 – Динамика синтеза белка в *m. soleus* крысы. 14HS – антиортостатическое вывешивание в течение 14 суток, 1R, 3R, 7R, 14R – реадаптация после функциональной разгрузки в течение 1,3,7 и 14 суток; n=7 для каждой группы. * – достоверное отличие от контроля, $p<0,05$; # – достоверное отличие от группы «14HS», $p<0,05$. *Источник: Мирзоев Т.М., Тыганов С.А., Петрова И.О., Шенкман Б.С. Сигнальные пути регуляции синтеза белка в постуральной мышце крысы в период реадаптации после функциональной разгрузки // Авиакосмическая и экологическая медицина. – 2017. – Т. 51, № 7. – С. 99–105.*

Содержание одного из субстратов mTORC1 – фосфо-p70S6K –достоверно снизилось после моделируемой гравитационной разгрузки на 25% (p<0,05) относительно контрольного уровня (Рисунок 6). Пониженное содержание фосфо-p70S6K сохранилось и после 24 часов реадаптации (Рисунок 6). Однако к 3-м суткам реадаптации произошло резкое увеличение содержания фосфо-p70S6K на 75% (p<0,05) относительно группы «14HS» и на 50% (p<0,05) относительно контроля (Рисунок 6). Через неделю после функциональной разгрузки содержание фосфо-p70S6K оказалось несколько сниженным относительно контроля (p<0,05), а после 14-суточной реадаптации не отличалось от контрольных значений (Рисунок 6). Схожая динамика фосфорилирования наблюдалась и для другого субстрата системы mTOR – 4E-BP1. Фосфорилирование маркера mTORC1-независимого сигнального пути – GSK-3β – оказалось достоверно увеличенным (p<0,05) через трое суток периода реадаптации относительно контроля, однако содержание тотальной формы GSK-3β не изменялось (Рисунок 7).

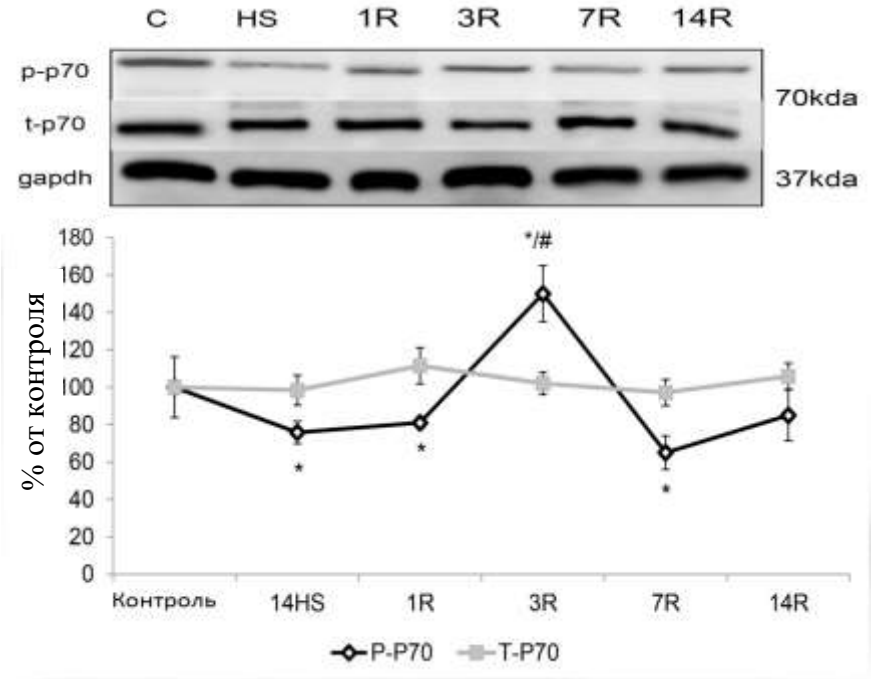


Рисунок 6 – Содержание тотальной и фосфорилированной форм p70S6K в камбаловидной мышце крысы. 14HS – антиортостатическое вывешивание в течение 14 суток, 1R, 3R, 7R, 14R – реадаптация после функциональной разгрузки в течение 1,3,7 и 14 суток; n=7 для каждой группы. * – достоверное отличие от контроля, p<0,05; # – достоверное отличие от группы «14HS», p<0,05. *Источник: Мирзоев Т.М., Тыганов С.А., Петрова И.О., Шенкман Б.С. Сигнальные пути регуляции синтеза белка в постуральной мышце крысы в период реадаптации после функциональной разгрузки // Авиакосмическая и экологическая медицина. – 2017. – Т. 51, № 7. – С. 99–105.*

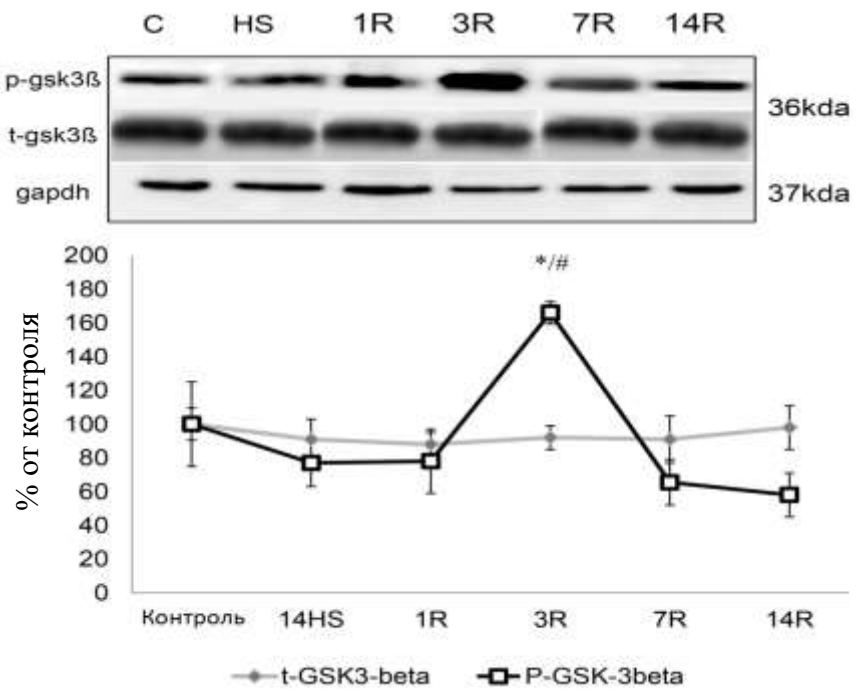


Рисунок 7 – Содержание тотальной и фосфорилированной форм GSK-3β в камбаловидной мышце крысы. 14HS – антиортостатическое вывешивание в течение 14 суток, 1R, 3R, 7R, 14R – реадаптация после функциональной разгрузки в течение 1,3,7 и 14 суток; n=7 для каждой группы. * – достоверное отличие от контроля, p<0,05; # – достоверное отличие от группы «14HS», p<0,05. *Источник: Мирзоев Т.М., Тыганов С.А., Петрова И.О., Шенкман Б.С. Сигнальные пути регуляции синтеза белка в постуральной мышце крысы в период реадаптации после функциональной разгрузки // Авиакосмическая и экологическая медицина. – 2017. – Т. 51, № 7. – С. 99–105.*

Исходя из обоснованной гипотезы профессора Д. Райли (D. Riley) о том, что ранний период реадаптации после функциональной разгрузки воспринимается скелетной мышцей как эксцентрическая нагрузка (Krippendorf & Riley, 1994; Riley et al., 1992; Riley et al., 1996), можно было предположить, что интенсивность синтеза белка в первые сутки восстановления после моделируемой гравитационной разгрузки будет увеличена. Действительно, с помощью метода SUnSET мы обнаружили резкое увеличение скорости трансляции в *m.soleus* крысы через 24 часа реадаптации. Это согласуется с данными Taillandier et al.. (2003), которые обнаружили достоверное усиление синтеза белка в камбаловидной мышце крысы через 18 часов реадаптации после 9-суточной функциональной разгрузки (Taillandier et al., 2003). Согласно нашим данным, повышенная скорость синтеза белка относительно контроля отмечалась и на 3-и сутки восстановления, но через неделю реадаптации достоверных отличий от контрольных значений уже не наблюдалось. Хорошо известно, что важнейшим регулятором синтеза белка в мышечных и других клетках является протеинкиназа mTOR, главными индикаторами активности которой являются p70S6K и 4E-BP1 (Bodine et al., 2001). В многочисленных исследованиях показано, что фосфорилирование данных субстратов mTOR приводит к активации процессов инициации трансляции белка посредством индуцирования сборки комплекса eIF4F и фосфорилирования рибосомального белка

S6 (Brunn et al., 1997; Kawasome et al., 1998; Lin et al., 1994; Terada et al., 1994). В настоящем исследовании было измерено содержание фосфорилированных форм обоих субстратов mTORC1, которые показали схожую динамику в течение всего периода реадаптации. Так, через сутки реадаптации содержание фосфорилированных p70S6K и 4E-BP1 не отличалось от контроля, затем наблюдался рост на 3-и сутки и спад на 7-е сутки восстановления. Аналогичное увеличение фосфорилирования p70S6K и 4E-BP1 в *m.soleus* крысы на 3-и сутки восстановления после 10-суточной гипсовой иммобилизации или антиортостатического вывешивания было ранее показано рядом зарубежных авторов (Childs et al., 2003; Sugiura et al., 2005). Инициация трансляции белка может также регулироваться посредством mTOR-независимого сигнального пути Akt-GSK3β-eIF2B (Glass, 2003). Протеинкиназа B (Akt) может снижать киназную активность GSK-3β через фосфорилирование по Ser9 (Harwood, 2001). Инактивирование GSK3β может приводить к дефосфорилированию фактора инициации eIF2B-ε по S539, что, в свою очередь, позволяет активировать инициацию трансляции (Pap & Cooper, 2002; Welsh et al., 1998). Повышенное фосфорилирование GSK-3β было отмечено после 3 суток реадаптации, что согласуется с данными, полученными на *m. soleus* мышей (van der Velden et al., 2007). Важно заметить, что резкое увеличение синтеза белка через 24 часа реадаптации не сопровождалось предполагаемым увеличением фосфорилированных форм таких сигнальных молекул как GSK-3β, p70S6K или 4E-BP1, поэтому мы не можем говорить о механизмах, влияющих на трансляционную эффективность (увеличение скорости трансляции на данной рибосомной инфраструктуре). В то же время, не исключено, что повышенная скорость синтеза белка на 1 сутки реадаптации могла быть обусловлена увеличением трансляционной ёмкости (объём рибосомного аппарата). Возможно, на фоне пониженного фосфорилирования p70s6k на 14 сутки гравитационной разгрузки, мог активироваться рибосомальный биогенез, которому, по последним данным, принадлежит ключевая роль в регуляции мышечной массы (Chaillou et al., 2014). Не исключено, что при первых опорных нагрузках на мышцу (после периода функциональной разгрузки) происходит немедленная активация mTOR-зависимых механизмов. Это предположение связано с известной интерпретацией процессов острой реадаптации как процессов, сопровождающихся эксцентрическими нагрузками (гипотеза Д. Райли). Известно, что серия эксцентрических сокращений скелетной мышцы уже через 30 минут может активировать mTOR (O'Neil et al., 2009). Исследование сигнальных механизмов трансляции в первые часы после функциональной разгрузки позволит ответить на этот вопрос. Измерение активности сигнальных молекул, регулирующих синтез белка в *m. soleus* крысы в течение первых суток реадаптации, являлось целью отдельного эксперимента с 12-часовой реадаптацией, описанного ниже.

Таким образом, впервые прослежена динамика интенсивности синтеза белка в *m. soleus* крысы в течение 14-суточной реадаптации после функциональной разгрузки. При этом проанализирована динамика содержания фосфорилированных форм

p70S6K, 4E-BP1, GSK-3β – сигнальных молекул, которые являются регуляторами процесса биосинтеза белка в мышечном волокне.

Молекулярные механизмы активации синтеза белка в камбаловидной мышце крысы на 3-и сутки реадаптации после функциональной разгрузки. Используя специфические ингибиторы *in vivo*, было произведено блокирование работы сигнальных каскадов PI3K/Akt/mTORC1 и PI3K/Akt/GSK3β/eIF2B с помощью вортманнина (ингибитора PI3K), а также пути PA/mTORC1 с помощью бутанола-1 (ингибитора продукции фосфатидной кислоты). Оказалось, что применение обоих специфических ингибиторов приводит к снижению интенсивности синтеза белка, активируемого в естественных условиях на 3 сутки реадаптации (Рисунок 8).

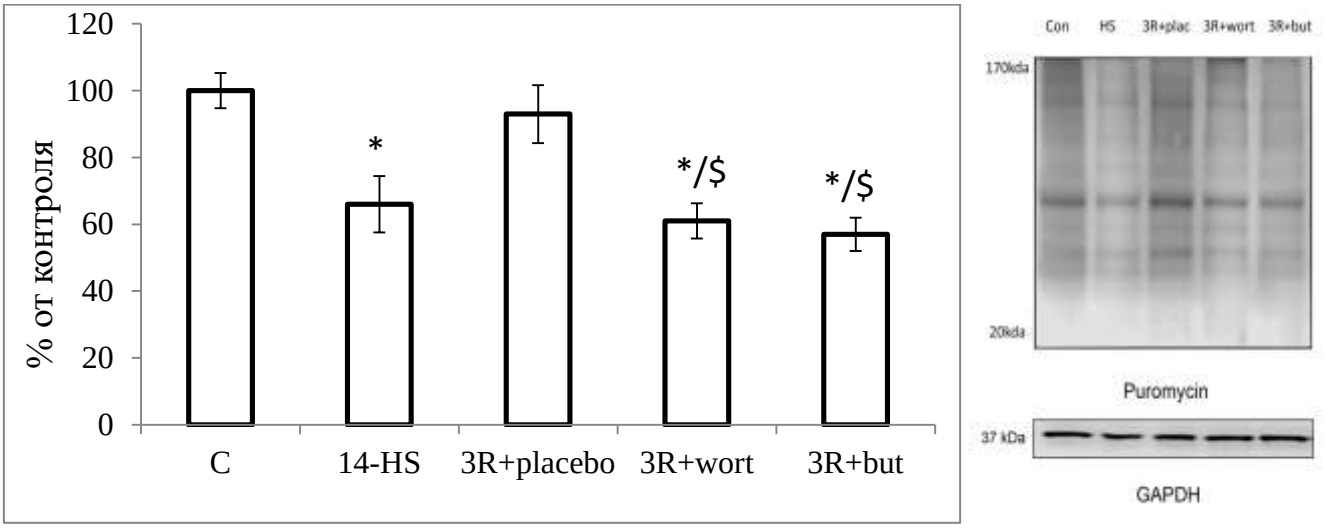


Рисунок 8 – Интенсивность синтеза белка в *m.soleus* крысы. С – виварный контроль, 14-HS – 14-суточное антиортостатическое вывешивание, 3R+placebo – реадаптация после вывешивания в течение 3 суток, 3R+wort – 3-суточная реадаптация + инъекция вортманнина (ингибитор PI3K), 3R+but – 3-суточная реадаптация + инъекция бутанола-1 (ингибитор продукции фосфатидной кислоты). * – достоверное отличие от группы «С», $p<0,05$; $ – достоверное отличие от группы «3R+placebo», $p<0,05$; n=7 для каждой группы. *Источник: Mirzoev T.M., Tyganov S.A., Shenkman B.S. Akt-dependent and Akt-independent pathways are involved in protein synthesis activation during reloading of disused soleus muscle // Muscle Nerve. – 2017. – Vol. 55, № 3. – P. 393–399.*

Под действием бутанола-1 наблюдалось уменьшение содержания IRS-1 (Рисунок 9 А), фосфорилирования AKT (Ser473) (рисунок 9 Б), GSK-3β (Ser9) (Рисунок 9 В) и p70S6K (Рисунок 9 Г). Объяснить причины такого действия бутанола-1 на IRS-1, AKT и GSK-3β в настоящее время не представляется возможным. В группе с введением вортманнина было отмечено только снижение фосфорилирования AKT (Рисунок 9 Б). В то же время, существенное снижение интенсивности белкового синтеза при действии ингибитора PI3K вортманнина позволяет предположить существование значимого вклада канонического пути IGF1-зависимой регуляции белкового синтеза в активацию анаболических процессов при реадаптации. Однако в настоящем исследовании вортманнин не предотвратил фосфорилирование

p70S6K, что указывает на вклад такого ответвления канонического пути, которое прямо не затрагивает деятельность mTORC1.

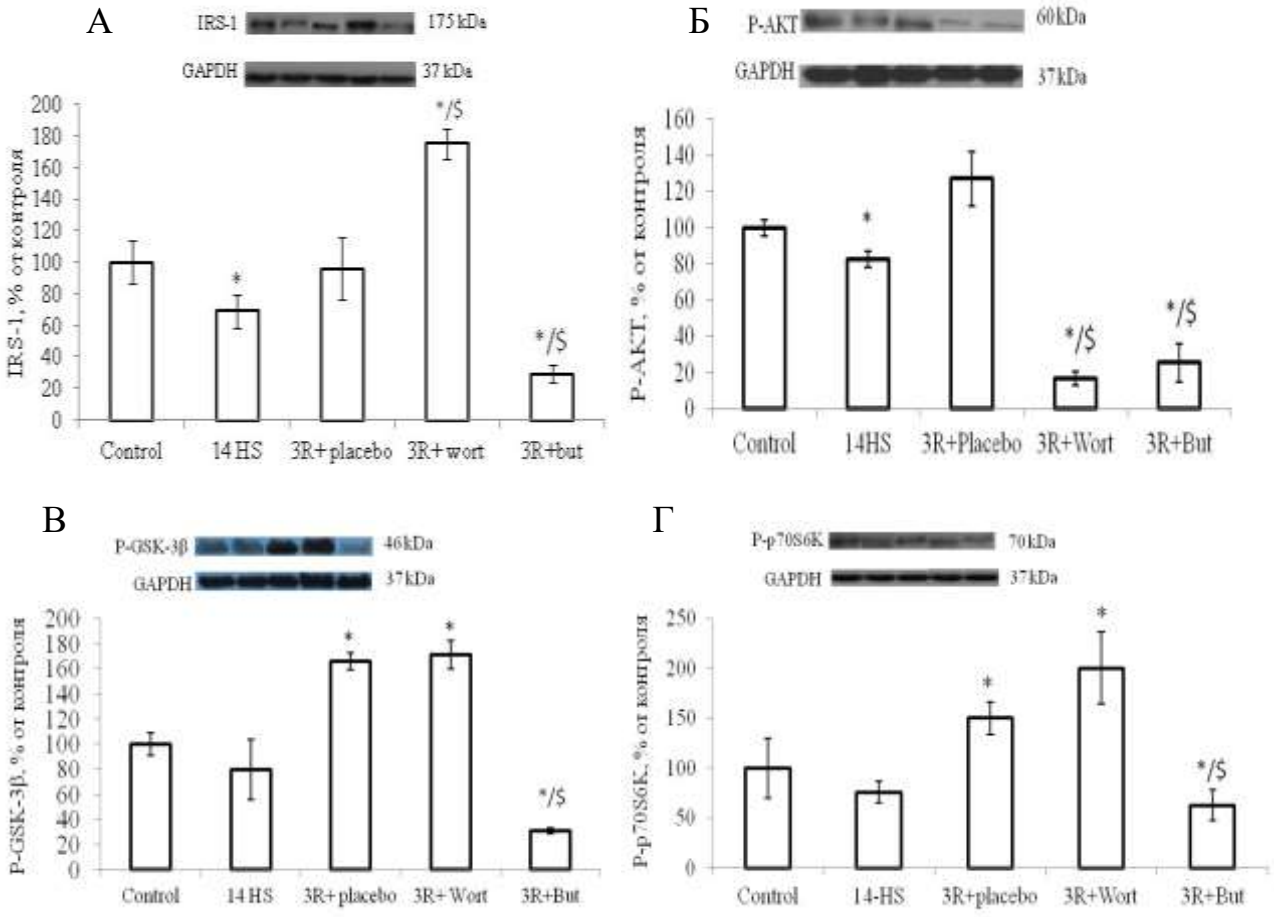


Рисунок 9 – Содержание IRS1 (А), p-AKT (Б), p-GSK-3β (В) и p-p70S6K (Г) в *m.soleus* крысы. С – виварный контроль, 14-HS – 14-суточное антиортостатическое вывешивание, 3R+placebo – реадаптация после вывешивания в течение 3 суток, 3R+wort – 3-суточная реадаптация + инъекция вортманнина (ингибитор PI3K), 3R+but – 3-суточная реадаптация + инъекция бутанола-1 (ингибитор продукции фосфатидной кислоты). * – достоверное отличие от группы «С», $p<0,05$; $ – достоверное отличие от группы «3R+placebo», $p<0,05$; n=7 для каждой группы. *Источник: Mirzoev T.M., Tyganov S.A., Shenkman B.S. Akt-dependent and Akt-independent pathways are involved in protein synthesis activation during reloading of disused soleus muscle // Muscle Nerve. – 2017. – Vol. 55, № 3. – P. 393–399.*

Можно предположить, что вклад канонического каскада в увеличение интенсивности синтеза белка в начальный период реадаптации мог быть связан с AKT-зависимой активацией «катаболического» ответвления канонического каскада, связанного со снижением экспрессии E3 убиквитин-лигазы MAFbx/atrogin-1, что определило «выживание» (survival) фактора инициации трансляции eIF3f (Csibi et al., 2009; Csibi et al., 2008; Lagirand-Cantaloube et al., 2008). Интересно, что применение вортманнина привело к ещё большему увеличению содержания

субстрата инсулинового рецептора. Такой ответ может иметь компенсаторное значение и ранее в литературе не отмечался.

Таким образом, в активации синтеза белка в камбаловидной мышце крысы на 3-и сутки восстановления после функциональной разгрузки могли принимать участие как АКТ-зависимые, так и АКТ-независимые сигнальные пути.

Роль стретч-активируемых ионных каналов (SAC) в активации внутриклеточных анаболических процессов в камбаловидной мышце крысы в период острой реадаптации (12 часов) после функциональной разгрузки. К 12 часам реадаптации наблюдался заметный рост интенсивности синтеза белка, при этом была отмечена тенденция ($p<0,07$) к превышению контрольных значений (Рисунок 10). В группе с введением ингибитора стретч-активируемых ионных каналов (SAC) на фоне реадаптации произошло достоверное снижение синтеза белка на 50% ($p<0,05$) по сравнению с группой «12h R», при этом отличий от контрольной группы не наблюдалось (Рисунок 10).

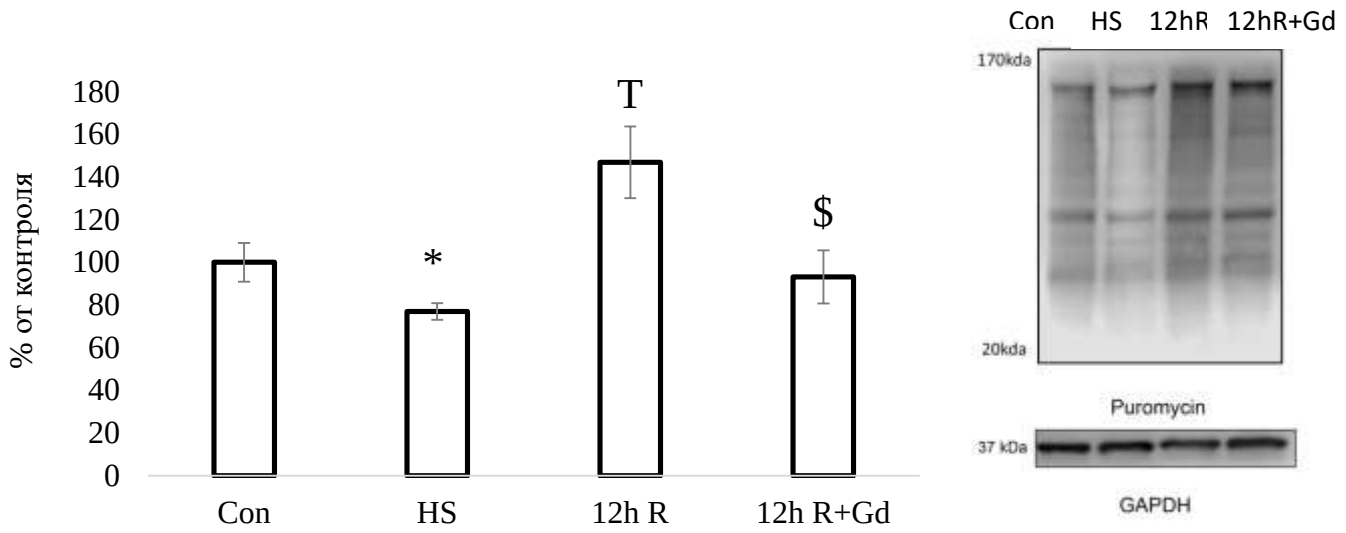


Рисунок 10 – Интенсивность синтеза белка в *m.soleus* крысы. Con – виварный контроль, HS – 14-суточное антиортостатическое вывешивание, 12h R – реадаптация после вывешивания в течение 12 часов, 12h R+Gd – реадаптация после вывешивания в течение 12 часов + инъекция хлорида гадолния – ингибитора стретч-активируемых каналов. * – достоверное отличие от группы «Con», $p<0,05$; $ - достоверное отличие от группы «12h R», $p<0,05$; T – тенденция к отличию от группы «Con», $p<0,07$; n=7 для каждой группы. *Источник: Mirzoev T.M., Tyganov S.A., Petrova I.O., Shenkman B.S. Acute recovery from disuse atrophy: the role of stretch-activated ion channels in the activation of anabolic signaling in skeletal muscle // Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. – 2019. – Vol. 316, № 1. – P. 86–95.*

В настоящем исследовании была впервые продемонстрирована потенциальная связь между активностью SAC и нижестоящими сигнальными путями, регулирующими синтез белка во время острого восстановления скелетной мышцы крысы после механической разгрузки. Полученные данные свидетельствуют о том, что Gd^{3+}-индуцированное ингибирование SAC в камбаловидной мышце крысы во время острой реадаптации (12 часов) предотвращает гиперфосфорилирование таких

ключевых анаболических маркеров как p70S6K (Рисунок 11 А), RPS6, а также снижает фосфорилирование GSK-3β (Ser9) (Рисунок 11 Б).

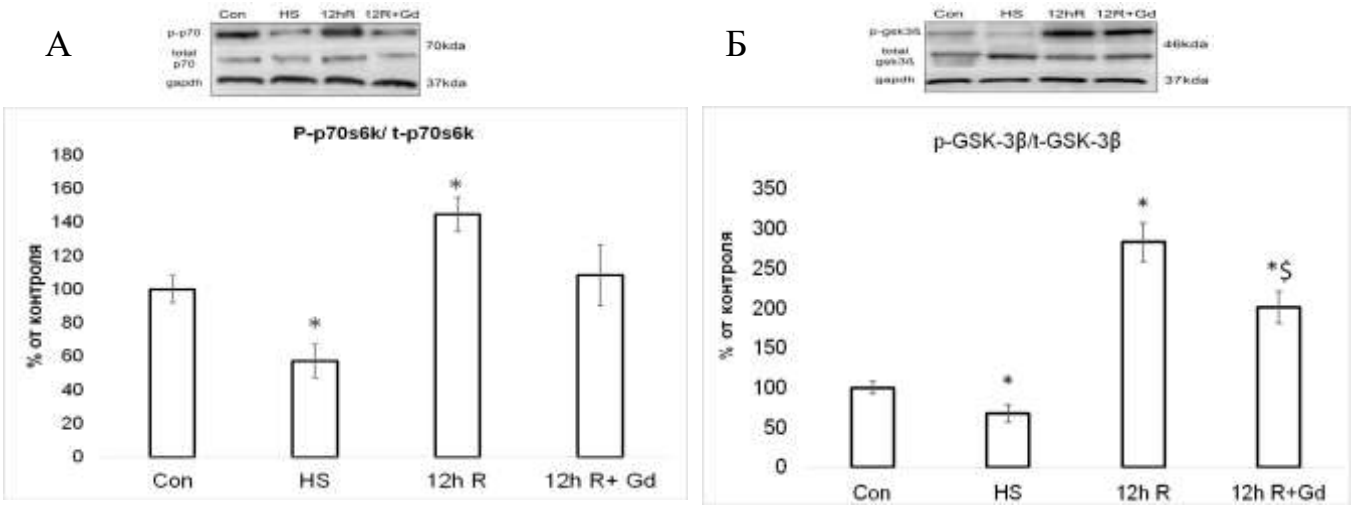


Рисунок 11 – Статус фосфорилирования GSK-3β. Con – виварный контроль, HS – 14-суточное антиортостатическое вывешивание, 12h R – реадаптация после вывешивания в течение 12 часов, 12h R+Gd – реадаптация после вывешивания в течение 12 часов + инъекция хлорида гадолиния – ингибитора стретч-активируемых каналов. * – достоверное отличие от группы «Con», $p<0,05$, $ – достоверное отличие от группы «12h R», $p<0,05$; n=7 для каждой группы.

Стретч-активируемые ионные каналы первоначально были описаны в мышечных клетках как разновидность каналов, которые увеличивают вероятность своего открытия в ответ на механическое напряжение (Franco & Lansman, 1990). Данные каналы проницаемы для ионов Ca^{2+} и Na^{+} (Franco & Lansman, 1990) и могут быть блокированы как Gd^{3+}, так и стрептомицином (Franco et al., 1991). Ранее было продемонстрировано, что блокирование SAC уменьшает гипертрофию мышц, вызванную тренировками в режиме эксцентрических сокращений (McBride, 2003). Кроме того, SAC, по-видимому, необходимы для полной активации AKT и p70S6K в передней большеберцовой мышце крысы в ответ на эксцентрическую нагрузку (Spangenburg & McBride, 2006). Yeung et al. (2003, 2005) также предположили, что ингибирование работы SAC может ослабить повреждения мышцы, наблюдаемые на мышиных моделях мышечной дистрофии Дюшенна (мыши *mdx*), путем блокировки входа ионов Ca^{2+} через эти каналы (Yeung et al., 2003; Yeung et al., 2005).

Молекулярная идентификация чувствительных к гадолинию каналов до сих пор остается неопределенной. Есть данные о том, что ионные каналы семейства TRPC (transient receptor potential cation channels) являются вероятными молекулярными кандидатами для SAC (Maroto et al., 2005; Stiber et al., 2009). Однако этот вопрос является спорным, поскольку было показано, что в физиологических условиях канал TRPC1 может не проявлять механочувствительных свойств (Zanou et al., 2010). Ранее было продемонстрировано, что белковое содержание TRPC1 в подошвенной мышце мыши после 14-суточной функциональной разгрузки достоверно снижалась, тогда как экспрессия мРНК TRPC1 оставалась неизменной (Zhang et al., 2014).

Интересно, что снижение содержания TRPC1 на белковом уровне сохранялось после 3, 7 и 14 дней реадаптации (Zhang et al., 2014). Однако наши данные свидетельствуют о том, что уже после 12 часов восстановления SAC могут играть важную роль в активации анаболического сигналинга.

Несмотря на то, что точные механизмы того, как ионы кальция могут влиять на анаболические сигнальные пути в скелетных мышцах все еще не определены, есть данные о том, что вызванное хронической мышечной нагрузкой увеличение внутриклеточной концентрации Ca^{2+} может привести к активации mTORC1 посредством активации каналов семейства TRPV1 (Ito et al., 2013). Важно отметить, что это вызванное механической нагрузкой повышение концентрации Ca^{2+} не было полностью предотвращено в TRPV1-нулевых миотубах. Это предполагает, что другие ионные каналы (например, SAC) также могли быть вовлечены в вызванное нагрузкой увеличение уровня Ca^{2+} и последующую активацию mTORC1. Также стоит отметить, что на культивируемых клетках было показано, что начальный этап активации p70S6K зависит от кальция, и отказ от этого этапа приводит к глобальному снижению фосфорилирования p70S6K (Hannan et al., 2003). Поэтому, вполне возможно, что поток ионов Ca^{2+} через SAC способствует активации анаболического сигналинга и последующего увеличения синтеза белка в скелетной мышце крысы в острый период реадаптации после функциональной разгрузки.

Таким образом, стретч-активируемые ионные каналы могут вносить вклад в процесс усиления синтеза белка в период острой реадаптации атрофированной камбаловидной мышцы крысы посредством модуляции mTORC1-сигналинга, а также, GSK3β.

Хорошо известно, что пребывание человека в условиях невесомости может приводить к возникновению боли в спине, при этом такая боль может быть вызвана изменениями в мышцах спины, выполняющих постуральную (антигравитационную) функцию (Kerstman et al., 2012; Hides et al., 2019). Одной из ключевых постуральных мышц спины является длиннейшая мышца спины (*m. longissimus dorsi*). Однако наземная модель антиортостатического вывешивания не подходит для исследования влияния функциональной разгрузки на данную мышцу. Наиболее адекватным подходном для исследования *m. longissimus dorsi* в данном случае является пребывание животных в условиях реальной, а не моделируемой невесомости. В связи с этим была исследована *m. longissimus dorsi* (постуральная мышца спины) (в сопоставлении с локомоторной мышцей голени – *m. gastrocnemius*) мышей после 30-суточного космического полёта на борту биоспутника «БИОН-М» №1. Выбор мышей в качестве объекта для исследования в условиях невесомости обусловлен, в частности, тем, что мыши являются наиболее подходящим видом млекопитающих для проведения генетических манипуляций (наличие инбредных линий, хорошо разработанные методы генетической трансформации). С целью сопоставления данных, полученных в скелетных мышцах мышей после перехода от условий земной гравитации (1g) к микрогравитации (~0g) (30-суточный космический полёт) с результатами, полученными после перехода от условий земной гравитации (1g) к гипергравитации (2g) был организован эксперимент с непрерывным 30-суточным вращением мышей на центрифуге

Влияние 30-суточной гипергравитации (2g) на скорость синтеза белка и маркеры анаболических сигнальных путей в скелетных мышцах мышей. Масса тела, а также вес камбаловидной мышцы (*m. soleus*) достоверно не отличались от контрольных значений, однако вес передней большеберцовой мышцы (*m. tibialis anterior*) оказался достоверно выше в группе «2G» (хроническая гипергравитация) по сравнению с контролем. При этом интенсивность синтеза белка в *m.soleus* в группе 2G от контроля не отличалась (Рисунок 12 А). Увеличение массы *m. tibialis anterior* после периода гипергравитации, по-видимому, было связано с более интенсивным синтезом белка в данной мышце (Рисунок 12 Б). Согласно полученным в настоящем исследовании результатам, интенсификация белкового синтеза в *m. tibialis anterior* могла быть связана с активацией ряда сигнальных белков, регулирующих процесс трансляции. В частности, в *m. tibialis anterior* мышей из группы 2G был достоверно увеличен уровень фосфорилирования p70S6k (Thr389) (Рисунок 13 Б), GSK-3β (Ser9) (Рисунок 14 Б), что могло свидетельствовать об активации инициации трансляции. В то же время каких-либо значимых изменений содержания фосфорилированных анаболических маркеров в *m.soleus* мышей после вращения на центрифуге отмечено не было (Рисунки 13А, 14А).

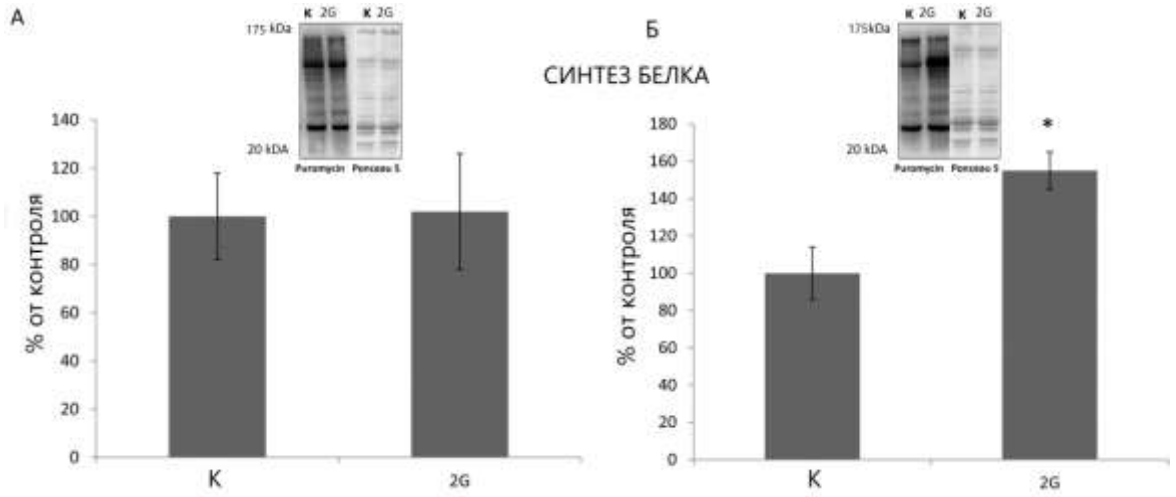


Рисунок 12 – Интенсивность белкового синтеза в *m.soleus* (А) и *m. tibialis anterior* (Б) мыши. К – контрольная группа животных, 2G – группа животных, находившихся в условиях гипергравитации в течение 30 суток. * – $p<0,05$ по сравнению с контрольной группой; n=8 в каждой группе.

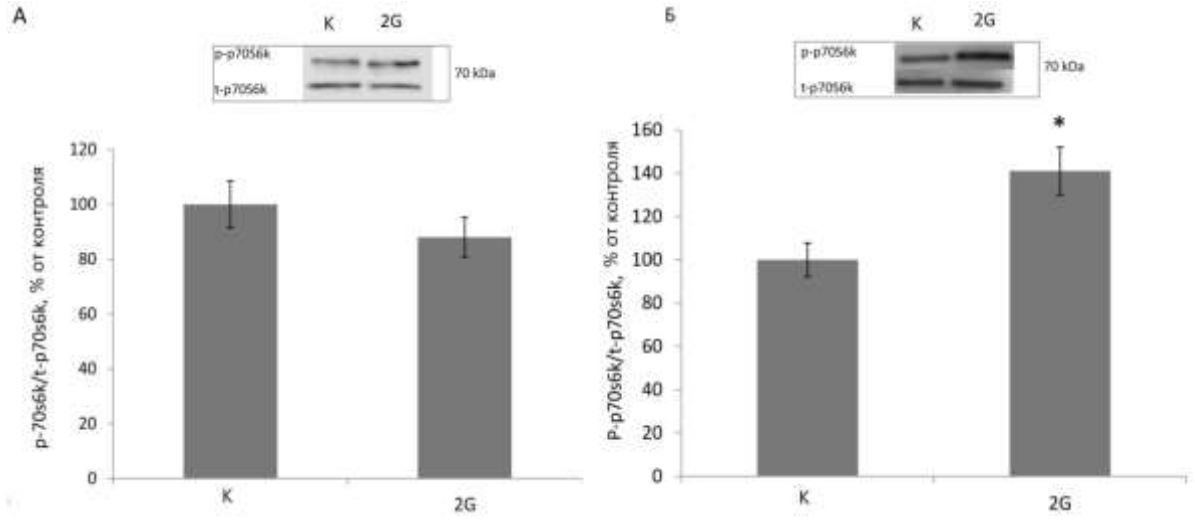


Рисунок 13 – Уровень фосфорилирования p70S6K в *m.soleus* (А) и *m. tibialis anterior* (Б) мыши. К – контрольная группа животных, 2G – группа животных, находившихся в условиях гипергравитации в течение 30 суток. * – p<0,05 по сравнению с контрольной группой; n=8 в каждой группе.

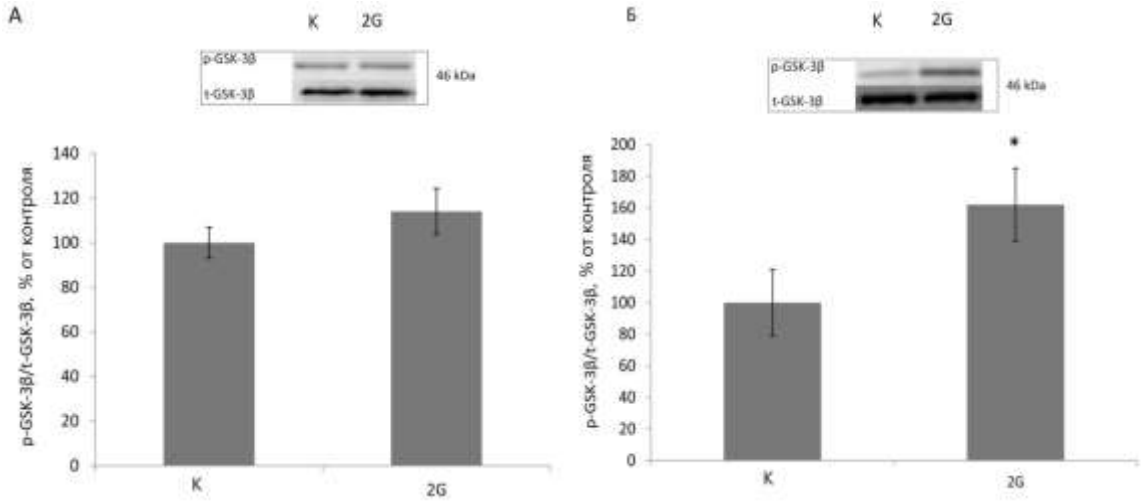
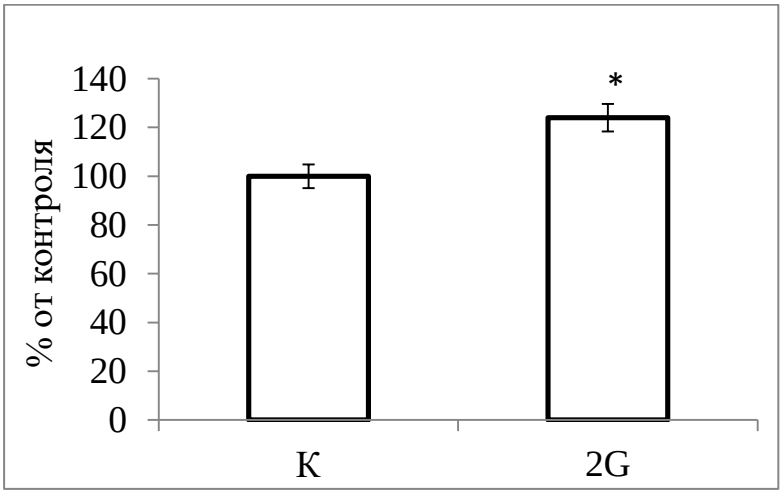


Рисунок 14 – Уровень фосфорилирования GSK-3β в *m.soleus* (А) и *m. tibialis anterior* (Б) мыши. К – контрольная группа животных, 2G – группа животных, находившихся в условиях гипергравитации в течение 30 суток. * – p<0,05 по сравнению с контрольной группой; n=8 в каждой группе.

Отсутствие гипертрофического ответа в виде увеличения массы *m.soleus* крысы после 21-суточной гипергравитации было ранее отмечено в работе В.С. Оганова и соавторов (Оганов et al., 1985). Также достоверных изменений веса камбаловидной мышцы крысы не было отмечено и на более длительных сроках (33 суток и 8 недель) гипергравитации с ускорением 2g (Fuller et al., 2006; Немировская et al., 2005). Различный анаболический ответ камбаловидной и передней большеберцовой мышц после хронической гипергравитации мог быть связан с разной нагрузкой на экстензоры и флексоры в период вращения. Хорошо известно, что при коротких периодах гипергравитации во время параболических полётов ЭМГ-активность

мышц-экстензоров значительно увеличивается, а биоэлектрическая активность мышц-флексоров лишь незначительно увеличивается или остаётся без изменений (Kawano et al., 2002; Leterme & Falempin, 1998; Юганов et al., 1963). В то же время известно, что во время сократительной активности интенсивность синтеза белка в скелетных мышцах подавляется или не отличается от контрольных значений (Bylund-Fellenius et al., 1984; Hayasaka et al., 2014; Kumar et al., 2009; Rennie, 2005; Rose et al., 2009). Следовательно, отсутствие изменения веса камбаловидной мышцы могло быть связано с тем, что синтез белка во время хронической нагрузки в виде гипергравитации был подавлен. Также можно предположить, что хроническая 30-суточная гипергравитация для постуральной камбаловидной мышцы могла оказаться чрезмерной (т.к. в условиях 1g данная мышца уже являлась нагруженной), и *m.soleus* достигла предела своих адаптационных возможностей, что выразилось в отсутствии анаболического ответа. Данное предположение подкреплено ранее полученными данными о том, что хроническое вращение крыс с ускорением 2G может приводить к повреждению миофибрилл и увеличению ядер с высококонденсированым хроматином (Nemirovskaia et al., 2001; Немировская et al., 2005). Ещё одно объяснение различной реакции *m.soleus* и *m. tibialis anterior* на хроническую гипергравитацию может заключаться в том, что *m. tibialis anterior*, не являясь постуральной мышцей, в условиях нормальной земной гравитации не подвергается постоянной нагрузке (в отличие от постуральной *m.soleus*). Соответственно, в условиях гипергравитации *m. tibialis anterior* могла стать более чувствительной к изменённому уровню гравитационного поля, что нашло своё отражение в гипертрофии. Не исключено, что это связано с тем, что гипертрофия в ответ на резистивную нагрузку, как правило, больше выражена в волокнах быстрого типа (Hakkinen et al., 1985; Hather et al., 1991; Houston et al., 1983).

Непрерывное воздействие гравитационной перегрузки привело к повышению интенсивности синтеза белка в постуральной мышце спины *m. longissimus dorsi* по сравнению с контролем (Рисунок 15).



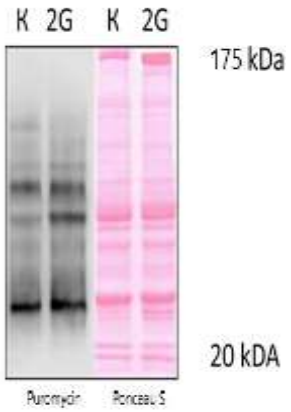
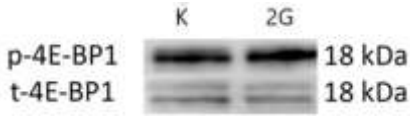


Рисунок 15 – Интенсивность белкового синтеза в *m.longissimus dorsi* мыши. К – контрольная группа животных, 2G – группа животных, находившихся в условиях гипергравитации в течение 30 суток. * – $p<0,05$ по сравнению с контрольной группой.

Активация синтеза белка в *m. longissimus dorsi* сопровождалась повышенным фосфорилированием белка 4E-BP1 (Thr37/46) (Рисунок 16), являющегося одним из маркеров активности mTORC1. Можно предположить, что гиперфосфорилирование 4E-BP1 могло способствовать активации инициации трансляции и увеличению её эффективности в *m. longissimus dorsi* в условиях непрерывной 30-суточной гравитационной перегрузки.



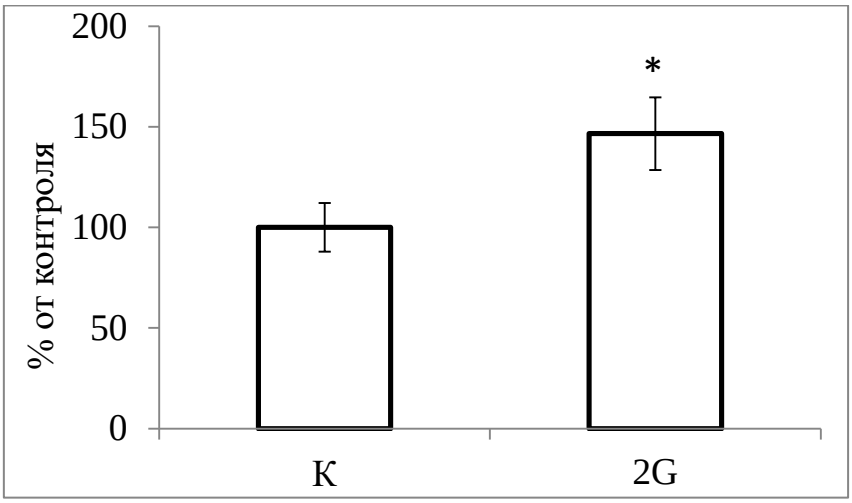


Рисунок 16 – Уровень фосфорилирования 4E-BP1 в *m.longissimus dorsi* мыши. К – контрольная группа животных, 2G – группа животных, находившихся в условиях гипергравитации в течение 30 суток. * – $p<0,05$ по сравнению с контрольной группой; n=8 в каждой группе.

Таким образом, пребывание в условиях хронической гипергравитации (2g, 30 суток) привело к различному анаболическому ответу в двух мышцах-антагонистах – камбаловидной и передней большеберцовой. Интенсивность синтеза белка и анаболических сигнальных путей была достоверна повышена в *m. tibialis anterior*, но не в *m. soleus*. Активация синтеза белка в *m. tibialis ant*erior могла быть связана с увеличенной активностью mTORC1-зависимых и mTORC1-независимых сигнальных путей.

Влияние 30-суточного космического полёта на маркеры анаболических сигнальных путей в *m. gastrocnemius medialis* и *m. longissimus dorsi* мышей линии C57/BL6. Космический полёт на биоспутнике не привёл к достоверным отличиям между группами как по весу животных, так и по соотношению веса *m. gastrocnemius medialis* к весу животного. Данные вестерн-блоттинга показали, что содержание субстрата инсулинового рецептора (IRS-1) в *m. gastrocnemius medialis* достоверно снизилось на 72% ($p<0,05$) в группе «Полёт» по сравнению с группой виварного контроля (Рисунок 17А). Содержание фосфорилированных форм протеинкиназы B (AKT) и киназы рибосомального белка S6 (p70S6K) в *m. gastrocnemius medialis* после 30-суточного космического полёта относительно

контрольной группы достоверно не изменилось. Однако в группе «Полёт» было отмечено достоверное снижение фосфорилирования киназы гликогенсинтазы 3β (GSK-3β) по Ser 9 на 68% ($p<0,05$) относительно группы синхронного виварного контроля (Рисунок 17Б). Также произошло снижение фосфорилирования фактора элонгации 2 (eEF2) по Thr56 на 82% ($p<0,05$) по сравнению с группой «виварный контроль».

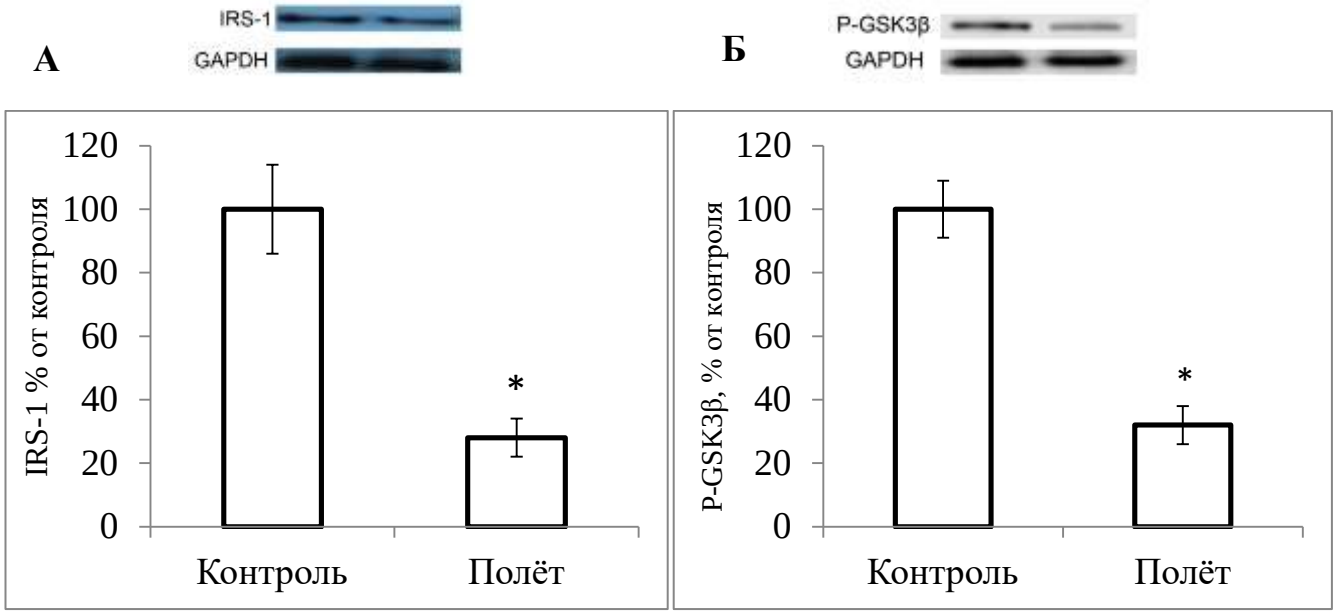


Рисунок 17 – Содержание IRS-1 (А) и фосфо-GSK-3β (Б) в *m. gastrocnemius medialis* мышей после 30-суточного космического полёта. * - $p<0,05$ относительно группы «Контроль»; n=7 для группы «Контроль», n=5 для группы «Полёт».

В постуральной мышце спины *m. longissimus dorsi* мышей после 30-суточного космического полёта содержание IRS-1 и фосфо-GSK-3β (Ser 9) от контрольных значений не отличалось (Рисунок 18).

В данном эксперименте впервые показаны изменения внутриклеточных анаболических параметров в скелетных мышцах мышей линии C57/BL6 после 30-суточного орбитального полёта на борту биоспутника «БИОН-М» №1. Один из важнейших результатов состоит в том, что продолжительный космический полёт может вызывать нарушение инсулинового сигналинга в икроножной мышце мышей. Достоверное снижение содержания субстрата инсулинового рецептора, наблюдаемое после 30-суточного пребывания в невесомости, может быть одной из причин развития инсулиновой резистентности скелетной мускулатуры. Действительно, ранее было показано, что функциональная разгрузка (unloading) приводит к преддиабетическому состоянию, которое может вносить вклад в развитие мышечной слабости (weakness) (Qaisar et al., 2019). Кроме того, в икроножной мышце полётных мышей наблюдалось достоверное снижение фосфорилированной формы GSK-3β (Ser 9), что могло привести к ингибированию фактора инициации трансляции 2B.

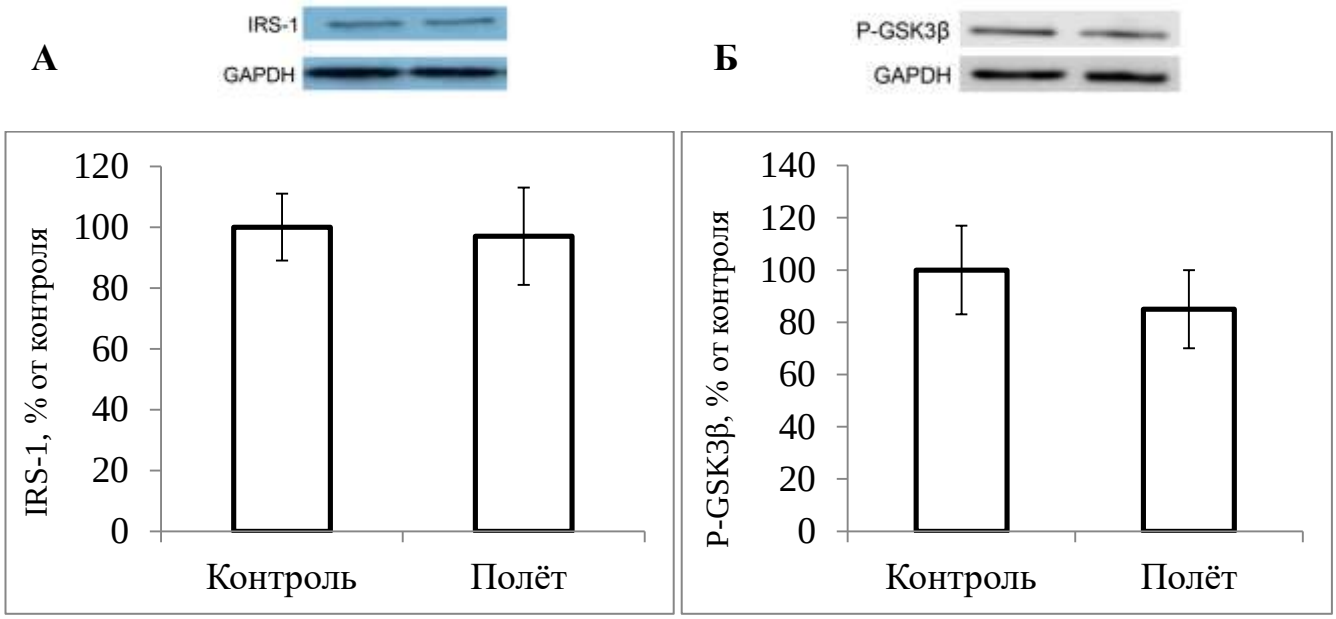


Рисунок 18 – Содержание IRS-1 (А) и фосфо-GSK-3β (Б) в *m. longissimus dorsi* мышей после 30-суточного космического полёта. * - p<0,05 относительно группы «Контроль»; n=7 для группы «Контроль», n=5 для группы «Полёт».

Однако было также обнаружено, что после космического полёта в *m. gastrocnemius medialis* содержание фосфо-eEF2 (Thr56) достоверно снизилось. Снижение фосфорилирования данного регуляторного белка может приводить к облегчению процесса элонгации трансляции на рибосоме. Объяснить причину таких разнонаправленных изменений в сигнальных молекулах, регулирующих синтез белка пока не представляется возможным, однако можно предположить, что в этом случае большую роль мог сыграть тот факт, что взятие биоматериала у мышей проводилось через 12-14 часов после приземления. В связи с этим, скелетные мышцы находились в условиях острой реадаптации после пребывания в невесомости. Это обстоятельство могло привести к тому, что в мышце стали активироваться процессы, связанные с усилением белкового синтеза и началом восстановления нормальной мышечной массы. Можно предположить, что именно этим обстоятельством было обусловлено снижение фосфорилирования eEF2 (и, следовательно, облегчение процесса элонгации трансляции) в *gastrocnemius medialis* мышей после космического полёта. В отличие от икроножной мышцы, в длиннейшей мышце спины (*m. longissimus dorsi*) достоверных изменений в содержании исследуемых анаболических маркеров обнаружено не было. Важно отметить, что вес икроножной мышцы после 30-суточного космического полёта не отличался от веса данной мышцы у животных из контрольной группы. Ранее в многочисленных исследованиях было показано, что пребывание грызунов как в условиях реальной, так и моделируемой гравитационной разгрузки приводит к развитию атрофии скелетных мышц, выполняющих антигравитационную функцию (в частности, в камбаловидной мышце) (Desplanches et al., 1990; Fitts et al., 2001; Harrison et al., 2003; Ohira et al., 1992; Ohira et al., 2002). Относительно короткое пребывание в невесомости, как правило, выражается в атрофии волокон камбаловидной мышцы, при этом степень атрофии в волокнах I типа («медленных»)

выражена сильнее, чем в «быстрых» волокнах 2А (Allen et al., 1996; Caiozzo et al., 1994; Ohira et al., 1992; Staron et al., 1998). В работе Sandona et al. (2012) также была отмечена атрофия мышечных волокон *m. soleus* мышей после длительного (91 день) пребывания в невесомости на борту Международной космической станции (Sandona et al., 2012). При этом также было показано, что после 14-суточного космического полёта (Hansen et al., 2004) или антиортостатического вывешивания (Ohira et al., 1992) атрофия *m. gastrocnemius* и *m. tibialis anterior* у крыс не наблюдалась. Атрофические процессы после коротких и длительных космических полётов также отсутствовали и в «быстрой» мышце *extensor digitorum longus* (Riley et al., 1996; Sandona et al., 2012). Таким образом, данные об отсутствии атрофии в «быстрой» *m.gastrocnemius* согласуются с результатами, ранее полученными на «быстрых» мышцах.

На основании полученных данных можно сделать вывод о том, что после 30-суточного космического полёта (около 12 часов после приземления) у мышей линии C57/BL6 происходят изменения в содержании ряда ключевых внутриклеточных анаболических маркеров (IRS-1, GSK-3β, eEF2) в *m. gastrocnemius*, но не в *m. longissimus dorsi*. Изменения на уровне сигнальных путей в *m. gastrocnemius* могут свидетельствовать о предрасположенности к инсулинорезистентности.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Диссертационная работа посвящена раскрытию молекулярных механизмов, регулирующих анаболический сигналинг в скелетных мышцах млекопитающих в условиях гравитационных воздействий. Гравитационно-зависимые механизмы регуляции анаболических сигнальных путей в скелетных мышцах грызунов исследовались после пребывания животных в условиях реальной или моделируемой невесомости (космический полёт или модель антиортостатического вывешивания) и гипергравитации (вращение на центрифуге).

Повышенная сократительная активность в течение суток характерна для «антигравитационных» постуральных мышц (в частности, для камбаловидной мышцы), удерживающих вес тела в поле земной гравитации. В этих условиях повышенной мышечной активности синтез белка, как правило, подавляется. Угнетение белкового синтеза в этом случае может быть связано с изменением уровня активности таких внутриклеточных регуляторов трансляции, как AMPK и eEF2. В условиях реальной или моделируемой микрогравитации осевая нагрузка (вес тела) и сила реакции опоры резко снижаются (или устраняются), что приводит к «отключению» медленных мотонейронов, иннервирующих большинство волокон *m. soleus*. Следствием этого является глубокое снижение сократительной активности камбаловидной мышцы и её переход сначала в состояние физиологического покоя (наблюдаемого в естественных условиях в течение суток), а затем в состояние пролонгированного покоя, обусловленного длительной функциональной разгрузкой. В этот период в постуральной мышце наблюдается перестройка сигнальных каскадов, вовлечённых в регуляцию анаболических процессов при длительной сократительной активности мышцы. Эта трансформация сопровождается изменениями параметров трансляционной ёмкости, факторов, регулирующих эффективность трансляции (GSK-3β, p70S6K, 4E-BP1, p90RSK), а также снижением интенсивности белкового синтеза. Изменения ряда регуляторных сигнальных молекул, связанных с регуляцией эффективности трансляции (например, p70S6K и AMPK) в камбаловидной мышце крысы демонстрируют сложную динамику на начальных этапах функциональной разгрузки. Таким образом, перестройка анаболических сигнальных путей в волокнах постуральной камбаловидной мышцы после прекращения её активности и сопутствующих изменений молекулярных триггеров разворачивается постепенно и имеет сложную временную динамику.

При возвращении к условиям земной гравитации (после окончания периода реальной или моделируемой микрогравитации) атрофированная камбаловидная мышца сталкивается с необходимостью вновь удерживать вес тела, выполняя антигравитационную функцию. Это приводит к одновременному напряжению и растяжению мышечных волокон, что характерно для эксцентрического режима мышечного сокращения. На начальном этапе реадаптации (первые трое суток) в камбаловидной мышце крысы наблюдается сложная многофазная динамика ключевых сигнальных молекул (в частности, GSK-3β и p70S6K), регулирующих процесс трансляции на рибосомах. При этом активация анаболического сигналинга и интенсификация белкового синтеза в *m. soleus* крысы в остром периоде

реадаптации реализуется при участии механо-чувствительных ионных каналов (SAC). На третьи сутки восстановления после функциональной разгрузки активация синтеза белка в камбаловидной мышце, по-видимому, зависит от активности сигнального пути PI3K/AKT и внутриклеточной концентрации фосфатидной кислоты (AKT-независимый механизм).

При нахождении лабораторных грызунов в условиях повышенного уровня гравитации (при вращении животных на центрифуге с ускорением 2g) скелетные мышцы могут испытывать повышенную механическую нагрузку. Пребывание мышей в условиях непрерывной 30-суточной гипергравитации (2g) приводит к различному анаболическому ответу в двух мышцах-антагонистах – *m. soleus* и *m. tibialis anterior*: увеличение активности анаболических сигнальных путей и скорости синтеза белка наблюдается в *m. tibialis anterior*, но не в *m. soleus*. В отличие от пребывания в условиях 30-суточной гипергравитации, нахождение мышей в условиях реальной микрогравитации в течение 30 дней приводит к нарушению сигнального пути IGF-1/IRS-1 в *m. gastrocnemius* (это событие может вносить вклад в развитие инсулинорезистентности), а также к снижению содержания фосфо-GSK-3β (Ser 9) – киназы, которая может быть задействована в регуляции процесса инициации трансляции посредством белка eEF2B. Таким образом, продолжительный космический полёт (30 суток) может приводить к нарушению сигнальных путей, опосредующих регуляцию белкового синтеза в скелетных мышцах мышей.

Теоретические обобщения полученных данных, а также анализ релевантной литературы позволили сформулировать концепцию *дифференцированного анаболического ответа скелетных мышц млекопитающих на гравитационные воздействия в зависимости от функциональной активности мышцы и её структурно-метаболического профиля* (соотношение «медленных» и «быстрых» мышечных волокон), которая изложена ниже.

Атрофия скелетных мышц млекопитающих во многом обусловлена изменениями анаболических процессов, связанных с интенсивностью белкового синтеза в мышечных волокнах. В зависимости от природы действующего атрофического фактора, атрофии могут подвергаться преимущественно мышечные волокна «быстрого» или «медленного» типа. Хорошо известно, что длительная постельная гипокинезия, иммобилизация конечностей или пребывание в условиях невесомости приводят к выраженной атрофии медленных волокон, значительная доля которых приходится на постуральные мышцы-разгибатели (экстензоры). При этом мышцы-сгибатели (флексоры), состоящие преимущественно из быстрых волокон и выполняющие локомоторную функцию, как правило, менее чувствительны к функциональной разгрузке. Из литературных данных и результатов настоящего исследования следует, что у лабораторных крыс в условиях моделируемой гипогравитации (антиортостатическое вывешивание) уже к третьим суткам воздействия в «медленном» экстензоре *m. soleus* наблюдается значительное снижение интенсивности белкового синтеза, сопровождаемое изменениями в содержании/фосфорилировании ключевых маркеров трансляционной эффективности и ёмкости. При этом в *m. soleus* крысы в период реадаптации после

функциональной разгрузки происходит резкая активация скорости синтеза белка, которая может быть обусловлена как работой механо-активируемых ионных каналов, так и АКТ-зависимыми и АКТ-независимыми сигнальными каскадами. Однако в «быстром» флексоре *m. tibialis anterior* в условиях функциональной разгрузки выраженных изменений в анаболическом ответе (синтез белка) и мышечной массе обычно не наблюдается. Противоположные изменения в этих двух мышцах-антагонистах отмечаются после периода длительной (30 суток) и непрерывной гипергравитации (2g): гипертрофия и активация анаболических процессов во флексоре *m. tibialis anterior* и отсутствие изменений в экстензоре *m. soleus*.

Дифференцированный анаболический ответ камбаловидной *(m. soleus*) и передней большеберцовой мышц (*m. tibialis anterior)* после функциональной разгрузки и хронической гипергравитации может быть связан с разной сократительной активностью экстензоров *(m. soleus*) и флексоров (*m. tibialis anterior)* в этих условиях. Как только животное попадает в условия реальной или моделируемой микрогравитации происходит резкое снижение электромиографической (ЭМГ) активности экстензоров (например, *m. soleus, m. quadriceps femoris)* и одновременное увеличение ЭМГ- активности флексоров (*m. tibialis anterior*) (Alford et al., 1987; Leterme & Falempin, 1998; Юганов et al., 1963). Во время перегрузок (1,5–1,8g) наблюдается другая картина: ЭМГ-активность мышц-разгибателей увеличивается, а биоэлектрическая активность мышц-сгибателей существенно не изменяется (Leterme & Falempin, 1998; Юганов et al., 1963). В то же время известно, что во время сократительной активности интенсивность синтеза белка в скелетной мышце, как правило, подавлена. Отсюда следует, что отсутствие анаболического ответа в камбаловидной мышце в условиях хронической гипергравитации (2g) может быть связано с подавлением процесса трансляции на рибосомах вследствие повышенной биоэлектрической (и, следовательно, сократительной) активности данной мышцы. Ещё одно объяснение может основываться на том, что в норме *m. soleus* грызунов активна в течение 11-15 часов в сутки (Hodgson et al., 2005), однако в условиях длительных непрерывных перегрузок данная мышца может достигать предела своих адаптационных возможностей, что выражается в отсутствии анаболического ответа. В отличие от камбаловидной мышцы, передняя большеберцовая мышца в условиях земной гравитации не подвергается длительной нагрузке. Соответственно, в условиях хронической гипергравитации *m. tibialis anterior* становится более «чувствительной» к изменённому уровню гравитационного поля, что и выражается в активации анаболических процессов и последующей гипертрофии.

Таким образом, влияние гравитационных (гипо- и гипергравитация) факторов оказывает различное влияние на скелетные мышцы млекопитающих. Выраженность изменений в работе внутриклеточных анаболических сигнальных путей и интенсивности синтеза белка под воздействием гравитационных факторов определяется как особенностями функциональной активности конкретной мышцы, так и композицией мышечных волокон, обусловливающей характер метаболизма в данной мышце.

Результаты и выводы, полученные в рамках диссертационной работы, позволят заложить основу для разработки более эффективных методов и способов, направленных на поддержание и/или восстановление массы и функций скелетных мышц, атрофированных в результате длительной гипокинезии.

ВЫВОДЫ

1. Переход от тонической активности постуральной мышцы крысы к состоянию физиологического покоя и далее к хронической функциональной разгрузке (первая неделя разгрузки) сопровождается снижением параметров трансляционной ёмкости (общая РНК, 28S рРНК) и трансляционной эффективности (AKT, GSK-3β). При этом наблюдается транзиторная активация mTORC1-сигналинга. Трёхсуточная реадаптация после функциональной разгрузки сопровождается снижением активности GSK-3β, а также активацией p70S6K и белкового синтеза в *m. soleus* крысы.

2. Протеинкиназа B (AKT) и фосфатидная кислота могут быть задействованы в активации синтеза белка в камбаловидной мышце крысы на 3-и сутки восстановления после функциональной разгрузки.

3. Стретч-активируемые ионные каналы вносят вклад в процесс усиления синтеза белка в период острой реадаптации атрофированной камбаловидной мышцы крысы посредством модуляции mTORC1-сигналинга, а также активности GSK-3β.

4. Пребывание мышей в условиях хронической гипергравитации (2g, 30 суток) приводит к различному анаболическому ответу в *m. soleus* и *m. tibialis anterior*. Воздействие хронической гравитационной перегрузки на мышей вызывает увеличение интенсивности белкового синтеза в *m. tibialis anterior*, но не в *m. soleus*. Активация синтеза белка в *m. tibialis anterior* сопровождается повышенной активностью mTORC1-зависимых и mTORC1-независимых сигнальных путей.

5. Космический полёт в течение 30 суток приводит к снижению содержания IRS-1 и уменьшению фосфорилирования GSK-3β в *m. gastrocnemius*, но не в *m. longissimus dorsi* мышей. Изменения на уровне сигнальных путей в *m. gastrocnemius* могут свидетельствовать о предрасположенности животных к инсулинорезистентности.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ В РЕЦЕНЗИРУЕМЫХ ЖУРНАЛАХ

1. Мирзоев Т.М., Вильчинская Н.А., Ломоносова Ю.Н., Немировская Т.Л., Шенкман Б.С. Влияние 30-суточного космического полёта и последующей реадаптации на сигнальные процессы в m. longissimus dorsi мыши // Авиакосмическая и экологическая медицина. – 2014. – Т. 48, № 2. – С. 12–15.
2. Mirzoev T., Tyganov S., Vilchinskaya N., Lomonosova Y., Shenkman B. Key Markers of mTORC1-Dependent and mTORC1-Independent Signaling Pathways Regulating Protein Synthesis in Rat Soleus Muscle During Early Stages of Hindlimb Unloading // Cell. Physiol. Biochem. – 2016 – Vol. 39, №3. – P.1011–1020. (Q1, IF: 4.64 согласно SCImago Journal Rank, 2020 г.; Q1, IF: 5.50 согласно Journal Citation Reports, 2017 г.).
3. Мирзоев Т.М., Тыганов С.А., Петрова И.О., Шенкман Б.С. Реализация механического сигнала на фоне гравитационной разгрузки: реакция молекулярных мишеней mTORC1 на эксцентрические сокращения // Биофизика. – 2016. – Т. 61, № 5. – С. 979–985.
4. Mirzoev T.M., Tyganov S.A., Shenkman B.S. Akt-dependent and Akt-independent pathways are involved in protein synthesis activation during reloading of disused soleus muscle // Muscle Nerve. – 2017. – Vol. 55, № 3. – P. 393–399. (Q2, IF: 2.55 согласно SCImago Journal & Country Rank, 2020).
5. Mirzoev T., Tyganov S., Petrova I., Gnyubkin V., Laroche N., Vico L., Shenkman B. Divergent Anabolic Signalling Responses of Murine Soleus and Tibialis Anterior Muscles to Chronic 2G Hypergravity // Scientific Reports. – 2017 – Vol.7, № 1. doi: 10.1038/s41598-017-03758-x. (Q1, IF: 4.011 согласно Journal Citation Reports, 2018 г.).
6. Мирзоев Т.М., Тыганов С.А., Петрова И.О., Шенкман Б.С. Сигнальные пути регуляции синтеза белка в постуральной мышце крысы в период реадаптации после функциональной разгрузки // Авиакосмическая и экологическая медицина. – 2017. – Т. 51, № 7. – С. 99–105.
7. Мирзоев Т.М., Шенкман Б.С. Биогенез рибосом и гипогравитационная атрофия скелетных мышц млекопитающих // Авиакосмическая и экологическая медицина. – 2018. – Т. 52, № 5. – С. 5–12.
8. Мирзоев Т.М., Шенкман Б.С. Регуляция синтеза белка в инактивированной скелетной мышце: входные сигналы, протеинкиназные каскады и биогенез рибосом // Биохимия. – 2018. – Т. 83, № 11. – С. 1606–1626.
9. Мирзоев Т.М., Тыганов С.А., Петрова И.О., Вико Л., Шенкман Б.С. Влияние хронической гипергравитации на скорость синтеза белка и маркеры анаболических сигнальных путей в скелетных мышцах мыши // Авиакосмическая и экологическая медицина. – 2018. – Т. 52, № 6. – С. 54-60.
10. Мирзоев Т.М., Тыганов С.А., Шенкман Б.С. Роль стретч-активируемых каналов в реализации mTORC1 сигналинга в изолированной *m.soleus* крысы в ответ на механический стимул после функциональной разгрузки // Рос. Физиол. Журн. им И.М. Сеченова. – 2018. – Т.104, №2. – С. 217–225.

11. Tyganov S., Mirzoev T., Shenkman B. An Anabolic Signaling Response of Rat Soleus Muscle to Eccentric Contractions Following Hindlimb Unloading: A Potential Role of Stretch-Activated Ion Channels // Int. J. Mol. Sci. – 2019. – Vol. 20, №5. doi: 10.3390/ijms20051165. (Q1, IF: 4.556 согласно Journal Citation Reports, 2019 г.).

12. Тыганов С.А., Мирзоев Т.М., Рожков С.В., Шенкман Б.С. Роль киназы фокальных контактов в анаболическом ответе на механический стимул в атрофированной постуральной мышце крысы // Авиакосмическая и экологическая медицина. – 2019. – Т. 53, № 4. – С. 74–79.

13. Belova S.P., Vilchinskaya N.A., Mochalova E.P., Mirzoev T.M., Nemirovskaya T.L., Shenkman B.S. Elevated p70S6K phosphorylation in rat soleus muscle during the early stage of unloading: causes and consequences // Arch. Biochem. Biophys. – 2019. – Vol. 674. doi: 10.1016/j.abb.2019.108105. (Q1, IF: 3.53 согласно SCImago Journal Rank, 2020 г.).

14. Mirzoev T.M., Tyganov S.A., Petrova I.O., Shenkman B.S. Acute recovery from disuse atrophy: the role of stretch-activated ion channels in the activation of anabolic signaling in skeletal muscle // Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. – 2019. – Vol. 316, № 1. – P. 86–95. (Q1, IF: 3.469 согласно Journal Citation Reports, 2019 г.).

15. Шенкман Б.С., Мирзоев Т.М., Козловская И.Б. Тоническая активность и гравитационный контроль постуральной мышцы. // Авиакосмическая и экологическая медицина. – 2020. – Т. 54, № 6. – С. 58-72.

16. Mirzoev T.M. Skeletal Muscle Recovery from Disuse Atrophy: Protein Turnover Signaling and Strategies for Accelerating Muscle Regrowth. // Int. J. Mol. Sci. – 2020. – Vol. 21, № 21. doi: 10.3390/ijms21217940. (Q1, IF: 4.556 согласно Journal Citation Reports, 2019 г.).

Статья, опубликованная в мае 2021 г.:

17. Mirzoev T.M., Sharlo K.A., Shenkman B.S. The Role of GSK-3β in the Regulation of Protein Turnover, Myosin Phenotype, and Oxidative Capacity in Skeletal Muscle under Disuse Conditions. // Int. J. Mol. Sci. – 2021. – Vol. 22, № 10. doi: 10.3390/ijms22105081. (Q1, IF: 4.556 согласно Journal Citation Reports, 2019 г.).

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ

рРНК – рибосомальная РНК

ЭМГ – электромиография

4E-BP1 – translation initiation factor 4E-binding protein 1 (белок, связывающий эукариотический фактор инициации 4E)

AKT – protein kinase B (PKB) (протеинкиназа B)

AMPK – AMP-activated protein kinase (АМФ-активируемая протеинкиназа)

eIF2B – eukaryotic translation initiation factor 2B (эукариотический фактор инициации трансляции 2B)

ERK – extracellular signal-regulated kinase (киназа, регулируемая внеклеточным сигналом)

GSK-3β – glycogen synthase kinase 3β (киназа гликогенсинтазы 3β)

HS – hindlimb suspension (функциональная разгрузка задних конечностей грызунов методом антиортостатического вывешивания)

IGF-1 – insulin-like growth factor 1 (инсулиноподобный фактор роста-1)

IRS-1 – insulin receptor substrate 1 (субстрат инсулинового рецептора-1)

MAPK – mitogen-activated protein kinase (митоген-активируемая протеинкиназа

mTORC1 – mammalian (or mechanistic) target of rapamycin complex 1 (мишень рапамицина млекопитающих, (или механо-зависимая мишень рапамицина), комплекс 1)

p70S6K – ribosomal protein S6 kinase p70 (рибосомальная киназа p70 белка S6)

p90RSK – ribosomal protein S6 kinase p90 (рибосомальная киназа p90 белка S6)

SAC – stretch-activated ion channels (стретч-активируемые ионные каналы)

SUnSET – surface sensing of translation (метод оценки скорости трансляции с помощью пуромицинового мечения)

TRPC – transient receptor potential canonical channels (канонические катионные каналы с транзиторным рецепторным потенциалом)

TRPV – transient receptor potential vanilloid channels (ваниллоидные катионные каналы с транзиторным рецепторным потенциалом)