

СОДЕРЖАНИЕ

От редактора специального выпуска

Молекулярные основы мышечной пластичности. Взгляд из России <i>Б. С. Шенкман</i>	665
---	-----

Обзорные и проблемные статьи

Как мышечная активность контролирует экспрессию медленного миозина <i>Б. С. Шенкман, К. А. Шарло</i>	669
Молекулярная и функциональная гетерогенность Na,K-АТФазы в скелетной мышце <i>В. В. Кравцова, И. И. Кривой</i>	695
Сателлитные клетки скелетных мышц в условиях гравитационной разгрузки <i>Н. А. Вильчинская, Б. С. Шенкман</i>	717
Особенности белкового метаболизма в скелетных мышцах костистых рыб <i>Н. Н. Немова, Н. П. Канцерова, Л. А. Лысенко</i>	730
Механизмы увеличения мышечной массы и силы при регулярных силовых тренировках <i>Е. А. Лысенко, О. Л. Виноградова, Д. В. Попов</i>	755
Роль гистондеацетилаз I и IIa (HDAC1, HDAC4/5) и сигнального пути MARK38 в регуляции атрофических процессов при функциональной разгрузке скелетных мышц <i>Т. Л. Немировская</i>	773
Отличительные особенности регуляторной функции тропомиозина при различных вариантах наследственной миопатии <i>О. Е. Карпичева</i>	785
Аутофагия как звено патогенеза и мишень для терапии заболеваний скелетно-мышечной системы <i>К. К. Калугина, К. С. Сухарева, А. И. Чуркина, А. А. Костарева</i>	810

Экспериментальные статьи

Стабильный уровень гигантских белков саркомерного цитоскелета в поперечнополосатых мышцах сони-полчка <i>Glis glis</i> при гибернации <i>С. С. Попова, Д. А. Юриенас, Г. З. Михайлова, Л. Г. Бобылёва, Н. Н. Салмов, О. В. Тяпкина, Л. Ф. Нуруллин, Г. Р. Газизова, И. Р. Нигметзянов, О. А. Гусев, Н. М. Захарова, И. М. Вихлянцев</i>	828
Ограничение двигательной активности и синтез белка в постуральных и локомоторных мышцах <i>С. П. Белова, С. А. Тыганов, Е. П. Мочалова, Б. С. Шенкман</i>	842
Влияние хронической свинцовой интоксикации на функциональные свойства и изоформный состав миозина левого желудочка сердца крыс <i>О. П. Герцен, С. Р. Набиев, Л. В. Никитина</i>	854

Влияние принудительных беговых нагрузок на содержание миокинов в скелетных мышцах мышей с моделью сахарного диабета II типа <i>А. Н. Захарова, Т. А. Кироненко, К. Г. Милованова, А. А. Орлова, Е. Ю. Дьякова, Ю. Г. Калининкова, А. В. Чибалин, Л. В. Капилевич</i>	864
Сравнительный анализ обусловленных возрастом изменений структуры митохондриального аппарата скелетных мышц видов с различной продолжительностью жизни <i>В. Б. Вайс, И. М. Вангели, Ч. М. Эльдаров, Л. Е. Бакеева</i>	876
Структурно-метаболические изменения скелетных мышц у пациентов с хроническим нарушением сознания – к вопросу о полинейромиопатиях критических состояний (ПЭТ-патоморфологическое исследование) <i>С. А. Кондратьев, Е. Н. Скитева, Ю. М. Забродская, Д. В. Рыжкова, Е. А. Кондратьева, А. Н. Кондратьев</i>	895
Мышечная пластичность в условиях функциональной разгрузки: эффекты ингибитора кислой сфингомиелиназы кломипрамина <i>А. В. Секунов, В. А. Протопопов, В. В. Скурыгин, М. Н. Шалагина, И. Г. Брындина</i>	911

CONTENTS

From the Special Edition Editor

- Molecular basis of muscle plasticity. View from Russia
B. S. Shenkman 665
-

Reviews

- How Muscle Activity Controls Slow Myosin Expression
B. S. Shenkman and K. A. Sharlo 669
- Molecular and Functional Heterogeneity of Na,K-ATPase in the Skeletal Muscle
V. V. Kravtsova and I. I. Krivoi 695
- Myosatellite Cells under Gravitational Unloading Conditions
N. A. Vilchinskaya and B. S. Shenkman 717
- The Traits of Protein Metabolism in the Skeletal Muscle of the Teleost Fish
N. N. Nemova, N. P. Kantserova, and L. A. Lysenko 730
- The Mechanisms of Muscle Mass and Strength Increase during Strength Training
E. A. Lysenko, O. L. Vinogradova, and D. V. Popov 755
- The Role of Histone Deacetylases I and IIa (HDAC1, HDAC4/5) and the MAPK38 Signaling Pathway in the Regulation of Atrophic Processes under Unloading of Skeletal Muscles
T. L. Nemirovskaya 773
- Hallmark Features of the Tropomyosin Regulatory Function in Several Variants of Congenital Myopathy
O. E. Karpicheva 785
- Autophagy as a Link in Pathogenesis and a Target for Therapy in Diseases of the Musculoskeletal System
K. K. Kalugina, K. S. Sukhareva, A. I. Churkina, and A. A. Kostareva 810
-

Experimental Articles

- Stable Level of Giant Proteins of Sarcomeric Cytoskeleton in Striated Muscles of Edible Dormouse *Glis glis* during Hibernation
S. S. Popova, D. A. Yurshenas, G. Z. Mikhailova, L. G. Bobyleva, N. N. Salmov, O. V. Tyapkina, L. F. Nurullin, G. R. Gazizova, I. R. Nigmatzhanov, O. A. Gusev, N. M. Zakharova, and I. M. Vikhlyantsev 828
- Restricted Activity and Protein Synthesis in Postural and Locomotor Muscles
S. P. Belova, S. A. Tyganov, E. P. Mochalova, and B. S. Shenkman 842
- Influence of Chronic Lead Intoxication on Functional Characteristics and Isoform Composition of Left Ventricular Myosin in Rats
O. P. Gerzen, S. R. Nabiev, and L. V. Nikitina 854
- Effect of Treadmill Running Exercise Training on the Content of Myokines in the Skeletal Muscles of Mice with Type II Diabetes Mellitus Model
A. N. Zakharova, T. A. Kironenko, K. G. Milovanova, A. A. Orlova, E. Yu. Dyakova, Yu. G. Kalinnikova, A. V. Chibalin, and L. V. Kapilevich 864
- Comparative Analysis of Age-Related Changes in the Structure of the Mitochondrial Apparatus of Skeletal Muscles in Species with Different Life Spans
V. B. Vays, I. M. Vangeli, Ch. M. Eldarov, and L. E. Bakeeva 876
- Structural and Metabolic Changes in Skeletal Muscles in Patients with Chronic Disorders of Consciousness – on the Issue of Critical Illness Polyneuromyopathies (Pet-Pathomorphological Study)
S. A. Kondratyev, E. N. Skiteva, Yu. M. Zabrodskaia, D. V. Ryzkova, E. A. Kondratyeva, and A. N. Kondratyev 895
- Muscle Plasticity at Functional Unloading: Effects of the Inhibitor of Acid Sphingomyelinase Clomipramine
A. V. Sekunov, V. A. Protopopov, V. V. Skurygin, M. N. Shalagina, and I. G. Bryndina 911
-
-

ОТ РЕДАКТОРА
СПЕЦИАЛЬНОГО ВЫПУСКА

**МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ОСНОВЫ МЫШЕЧНОЙ ПЛАСТИЧНОСТИ.
ВЗГЛЯД ИЗ РОССИИ**

© 2021 г. Б. С. Шенкман*

Институт медико-биологических проблем РАН, Москва, Россия

**E-mail: bshenkman@mail.ru*

DOI: 10.31857/S0869813921060121

Когда молодой Джеймс Уотсон был еще никому не известным пост-доком Кембриджского университета, он представлял себе, как бы сочинил первую строку статьи, “которую написал бы о ДНК, если бы установил ее строение “Гены представляют интерес для генетиков” [1]. Мы не совсем согласны с нобелевским лауреатом. Мы глубоко убеждены, что гены представляют огромный интерес не только для генетиков, но и для физиологов.

В молекулярной физиологии принято считать, что основой всех физиологических процессов в живой клетке, ткани, да и в целом организме являются селективные изменения экспрессии генов, немедленно следующие за физиологическими сигналами и стимулами. Так, потенциал действия, пришедший к нейрону, немедленно активирует большую батарею генов этой ключевой клетки. Однако далеко не всегда исследователю удастся проследить хотя бы основные вехи пути передачи сигнала от физиологического события к аппарату генетической экспрессии. Очень часто неизвестным остается даже исходное, пусковое, триггерное звено. Естественно, что одной из основных задач молекулярной физиологии является исследование механизмов, связывающих функциональное состояние клетки, ткани, органа с паттерном экспрессии как отдельного гена, кодирующего ключевую белковую молекулу, так и глобальных геномных комплексов. Чрезвычайно важно знать и те механизмы, которые трансформируют изменение экспрессии ключевого гена в изменение конкретных функциональных свойств живой системы.

В целом невезучим физиологам скелетных мышц (за весь XX век только одна Нобелевская премия!) в данном отношении повезло. К настоящему времени усилиями ряда лабораторий удалось выявить несколько молекулярных механизмов, связывающих сократительную активность мышцы с экспрессией конкретных генов, генов, кодирующих структуру ключевых мышечных белков. Как нам сегодня представляется, именно эти механизмы лежат в основе пластичности, фундаментального свойства поперечно-полосатых мышц. Поперечно-полосатые мышцы — чрезвычайно пластичные образования, способные отвечать глубокими изменениями структуры, функции и метаболизма на изменения сократительной активности и других условий существования (трофический и кислородный режимы, оксидативный стресс, механические повреждения и т.п.). Такая пластичность представляет огромный интерес не только для фундаментальной науки, но и для различных областей медицины, для животноводства и пищевой промышленности, для космонавтики и спорта. Сегодня исследователи уже многое знают о механизмах мышечной пластичности, связанных с изменениями внутри- и межклеточных сигнальных процессов и процессов селективной экспрессии генов. Различные аспекты этих

механизмов являются предметом обсуждений на многочисленных конференциях и симпозиумах по всему миру и в России. Ряд российских лабораторий уже хорошо известны в мировом сообществе. В последние годы они добились значительных успехов. Мы посчитали важным посвятить один из номеров нашего журнала проблеме мышечной пластичности и ее молекулярных механизмов, чтобы познакомить широкие круги российских физиологов с достижениями отечественных лабораторий в этой области науки.

Практически сегодня в России изучаются все основные аспекты мышечной пластичности. И все они нашли достойное место в тематическом номере. Среди них: регуляторные механизмы функционально-зависимой экспрессии генов (обзорная статья Б.С. Шенкмана и К.А. Шарло [2]), функциональная гетерогенность ключевых ферментативных комплексов (обзорная статья В.В. Кравцовой и И.И. Кривого [3]), резидентные стволовые клетки и их роль в регенерации и постнатальном онтогенезе (статья Н.А. Вильчинской [4]), регуляторные системы скелетных мышц в различных экологических условиях (обзорная статья Н.Н. Немовой и соавт. из Института биологии Карельского Научного Центра РАН в г. Петрозаводске и экспериментальное исследование эффектов гибернации группы авторов из Пушкино и Казани под руководством И.М. Вихлянцева [5, 6]). Классические проблемы пластичности скелетных мышц – это проблема механизмов рабочей гипертрофии (обзор Е.А. Лысенко [7]) и проблема механизмов атрофии при функциональной нагрузке (disuse) (работы Т.Л. Немировской и С.П. Беловой с соавт. [8, 9]).

Один из важнейших аспектов мышечной пластичности – это поведение молекулярных структур мышцы при ее патологических изменениях. В последние годы выявлено множество генетических миопатий, обусловленных мутациями генов, кодирующих структуру мышечных белков. Эти мутации в большинстве случаев сказываются на работе миофибриллярного аппарата, затрагивая структуру и локализацию, а следовательно и функцию его белков. Эта проблема является предметом интересного обзора О.Е. Карпичевой из Института цитологии РАН [10]. Поддержание структурного, метаболического и сигнального гомеостаза в патологически измененной мышце обеспечивает ряд молекулярных механизмов. Аутофагия – является одним из таких механизмов. Подавление аутофагии часто приводит к усугублению патологии вплоть до деструкции мышечных структур. Однако интенсификация аутофагических лизосомальных процессов также может обусловить обострение заболевания. Эти интереснейшие явления являются предметом обзорной статьи группы авторов из Национального исследовательского медицинского центра им. Алмазова (Санкт-Петербург) под руководством А.А. Костаревой [11]. Реакция поперечно-полосатой мышцы на действие тяжелых металлов описана в экспериментальной статье сотрудников Института иммунологии и физиологии Уральского отделения РАН (г. Екатеринбург), подготовленной под руководством Л.В. Никитиной [12]. Несомненно, сегодня патологии, вызванные антропогенными изменениями среды обитания, являются отдельной проблемой не только для клиницистов, но и для исследователей, раскрывающих патогенетические механизмы, используя самые современные подходы с применением бесклеточных систем.

Скелетная мышца является одной из наиболее уязвимых мишеней сахарного диабета 2-го типа, заболевания, разрушительные последствия которого приводят к инвалидизации миллионов людей. Физические упражнения являются эффективным средством борьбы с диабетом, однако мы еще не все знаем о механизмах как тканевой, так и системной адаптации к физическим нагрузкам организма, пораженного диабетом. Результаты оригинальной экспериментальной серии, направленной на решение этой проблемы, представлены коллективом Томского государ-

ственного научно-исследовательского университета под руководством Л.В. Капи-левича и А.В. Чибалина [13].

Особое место в тематическом выпуске занимает сравнительно-морфологическое исследование Л.В. Бакеевой и соавт. из Института физико-химической биологии Московского университета [14]. Эта работа посвящена возрастным изменениям ультраструктуры митохондрий в скелетных мышцах различных видов грызунов с разной продолжительностью жизни, включая уникального долгоживущего голого землекопа. Эта работа дает богатую пищу для размышлений как о природе старения, так и о загадочных механизмах эволюции онтогенеза позвоночных.

Итак, впервые за много лет в России предпринят тематический выпуск Российского физиологического журнала им. И.М. Сеченова, посвященный проблемам пластичности поперечно-полосатых мышц. Все авторы и авторские коллективы не новички в науке, имеют в своем активе большое количество интересных работ, опубликованных в лучших международных журналах. При этом наши авторы живут и работают в самых разных городах России: от Томска до Санкт-Петербурга.

Наши авторы описывают различные экспериментальные, патологические и природные ситуации, в которых пластичность скелетной мышцы позволяет ей приводить сигнальную и структурно-метаболическую перестройку в соответствии с изменениями ее сократительной активности. Это в свою очередь дает ей возможность выполнять функциональную задачу максимально эффективно применительно к задаваемым условиям. В основе описываемых процессов всегда лежат системно-организованные пост-трансляционные изменения сигнальных молекул и селективные изменения экспрессии генов. Эти изменения запускаются метаболическими, регуляторными и механическими стимулами, природа которых в большинстве случаев остается неизвестной. Только полная расшифровка сигнальных механизмов, лежащих в основе мышечной пластичности, позволит понять ее природу и разработать методы управления ею в интересах человечества.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Уотсон Д (2019) Двойная спираль М АСТ.
2. Шенкман БС, Шарло КА (2021) Как мышечная активность контролирует экспрессию медленного миозина. Рос физиол журн им ИМ Сеченова 107 (6): 669–694.
3. Кравцова ВВ, Кривой ИИ (2021) Молекулярная и функциональная гетерогенность Na,K-АТФазы в скелетной мышце. Рос физиол журн им ИМ Сеченова 107(6): 695–716.
4. Вильчинская НА, Шенкман БС (2021) Сателлитные клетки скелетных мышц в условиях гравитационной разгрузки. Рос физиол журн им ИМ Сеченова 107(6): 717–729.
5. Немова НН, Канцерова НП, Лысенко ЛА (2021) Особенности белкового метаболизма в скелетных мышцах костистых рыб. Рос физиол журн им ИМ Сеченова 107(6): 730–754.
6. Попова СС, Юриенас ДА, Михайлова ГЗ, Бобылёва ЛГ, Салмов НН, Тяпкина ОВ, Нуруллин НФ, Газизова ГР, Нигметзянов ИР, Гусев ОА, Захарова НМ, Вихлянец ИМ (2021) Стабильный уровень гигантских белков саркомерного цитоскелета в поперечнополосатых мышцах сони-полчка *Glis glis* при гибернации. Рос физиол журн им ИМ Сеченова 107(6): 828–841.
7. Лысенко ЕА, Виноградова ОЛ, Попов ДВ (2021) Механизмы увеличения мышечной массы и силы при регулярных силовых тренировках. Рос физиол журн им ИМ Сеченова 107(6): 755–772.
8. Немировская ТЛ (2021) Роль гистондеацетилаз I и II (HDAC1, HDAC 4/5) и сигнального пути MARK38 в регуляции атрофических процессов при функциональной разгрузке скелетных мышц. Рос физиол журн им ИМ Сеченова 107(6): 773–784.
9. Белова СП, Тыганов СА, Мочалова ЕП, Шенкман БС (2021) Ограничение двигательной активности и синтез белка в постуральных и локомоторных мышцах. Рос физиол журн им ИМ Сеченова 107(6): 842–853.
10. Карпичева ОЕ (2021) Отличительные особенности регуляторной функции тропомиозина при различных вариантах наследственной миопатии. Рос физиол журн им ИМ Сеченова 107(6): 785–809.

11. *Калугина КК, Сухарева КС, Чуркина АИ, Костарева АА* (2021) Аутофагия как звено патогенеза и мишень для терапии заболеваний скелетно-мышечной системы. Рос физиол журн им ИМ Сеченова 107(6): 810–827.
12. *Герцен ОП, Набиев СР, Никитина ЛВ* (2021) Влияние ионов свинца на механическую функцию левого желудочка на молекулярном уровне. Рос физиол журн им ИМ Сеченова 107(6): 854–863.
13. *Захарова АН, Кироненко ТА, Милованова КГ, Орлова АА, Дьякова ЕЮ, Калинин ЮГ, Чибалин АВ, Капилевич ЛВ* (2021) Влияние принудительных беговых нагрузок на содержание миокинов в скелетных мышцах мышей с моделью сахарного диабета II типа. Рос физиол журн им ИМ Сеченова 107(6): 864–875.
14. *Вайс ВБ, Вангели ИМ, Эльдаров ЧМ, Бакеева ЛЕ* (2021) Сравнительный анализ обусловленных возрастом изменений структуры митохондриального аппарата скелетных мышц видов с различной продолжительностью жизни. Рос физиол журн им ИМ Сеченова 107(6): 876–894.

ОБЗОРНЫЕ
И ПРОБЛЕМНЫЕ СТАТЬИ

КАК МЫШЕЧНАЯ АКТИВНОСТЬ КОНТРОЛИРУЕТ ЭКСПРЕССИЮ
МЕДЛЕННОГО МИОЗИНА

© 2021 г. Б. С. Шенкман¹, *, К. А. Шарло¹

¹*Институт Медико-биологических проблем РАН, Москва, Россия*

*E-mail: bshenkman@mail.ru

Поступила в редакцию 19.02.2021 г.

После доработки 25.03.2021 г.

Принята к публикации 28.03.2021 г.

Одной из главных гравитационно-обусловленных функций двигательной системы является поддержание вертикальной стойки. Эти функции по представлениям школы профессора И.Б. Козловской обеспечиваются тонической мышечной системой. Под термином “тоническая система” И.Б. Козловская понимала все структуры и регуляторные механизмы, способные длительное время поддерживать базальное механическое напряжение (тонус). У млекопитающих к тонической системе она относилась медленные волокна с преобладающей экспрессией медленной изоформы тяжелых цепей миозина типа I(β) – МунС I(β) и все контролирующие их нервные механизмы. Понятно, что от интенсивности экспрессии медленного миозина зависит способность мышцы длительно поддерживать тоническое напряжение. Поэтому не будет большим преувеличением, если мы назовем ген медленного миозина *myh7* истинным геном мышечного тонуса. В последние годы в целом стало понятно, каким образом на фоне длительной повышенной сократительной активности мышцы запускается повышение экспрессии медленной изоформы тяжелых цепей миозина – МунС I(β) и снижение экспрессии его быстрых изоформ. Гораздо меньше известно о механизмах снижения экспрессии МунС I(β) при снижении сократительной активности мышцы. Этот феномен наблюдали после экспозиции в реальной невесомости, после постельной гипокинезии (bedrest), “сухой” иммерсии, а также при использовании стандартной модели вывешивания задних конечностей грызунов. Многочисленные исследования пластичности миозинового фенотипа, как правило, сосредоточены на поисках механизмов, связывающих изменения экспрессии миозиновых генов с характером сократительной активности мышечного волокна. Данные, обсужденные в обзоре, свидетельствуют о том, что постоянная экспрессия медленного миозина контролируется тонической активностью и, в свою очередь, является необходимым условием поддержания такой активности. Когда такая активность значительно снижается или прекращается, то исцезают метаболические и механические стимулы, запускающие сигнальные пути, обеспечивающие экспрессию гена *myh7*. Именно этот феномен и был предметом обсуждения в настоящей работе.

Ключевые слова: функциональная разгрузка, экспрессия генов, медленный миозин, скелетная мышца

DOI: 10.31857/S086981392106011X

ВВЕДЕНИЕ

По представлениям школы профессора И.Б. Козловской, стабильное положение тела и локомоции животных на суше обеспечиваются существованием двух функциональных компонентов двигательной системы: тоническим (медленным) и фазным (быстрым). Одной из главных гравитационно-обусловленных функций двигательной системы является поддержание в гравитационном поле вертикальной стойки и положения отдельных частей тела. Эти функции обеспечиваются тонической мышечной системой. Под термином “тоническая система” И.Б. Козловская понимала не только волокна с полинейрональной иннервацией (как это принято в классической физиологии), но все структуры и регуляторные механизмы, способные длительное время поддерживать базальное механическое напряжение (тонус) [1]. У млекопитающих к тонической системе она относилась медленные волокна с преобладающей экспрессией медленной изоформы тяжелых цепей миозина типа I(β) – МуНС I(β) и все контролирующие их нервные механизмы двигательного управления. Медленный миозин характеризуется, прежде всего, своей способностью длительное время находиться во взаимодействии с актином в саркомере, поддерживая существование поперечных мостиков [2]. Медленные волокна высоко-устойчивы к утомлению, что позволяет, например, преимущественно медленной камбаловидной мышце демонстрировать механическую активность в течение 12–16 ч в сутки [3]. Постоянное поддержание базального механического напряжения является не только необходимой предпосылкой нормальной работы любой мышцы, но и обязательным условием существования и двигательной деятельности животного в гравитационном поле Земли [4].

Понятно, что от интенсивности экспрессии медленного миозина зависит количество мышечных волокон первого, медленного типа и, соответственно, способность мышцы поддерживать тоническое напряжение. Поэтому, на наш взгляд, не будет большим преувеличением, если мы назовем ген медленного миозина *myh7* истинным геном мышечного тонуса.

К 10-м годам XXI века в общих чертах стало понятно, каким образом на фоне длительной повышенной сократительной активности мышцы (моделируемой путем хронической низкочастотной электростимуляции – CLFS) запускается повышение экспрессии медленной изоформы тяжелых цепей миозина – МуНС I(β) и снижение экспрессии быстрых изоформ МуНС II d/x и МуНС II b .

Гораздо меньше известно о механизмах снижения экспрессии МуНС I(β) при снижении сократительной активности мышцы [5]. Такое снижение, как правило, приводит к уменьшению доли медленных волокон в медленной камбаловидной мышце *m. soleus* и в смешанных мышцах конечностей. Этот феномен наблюдали у человека и животных после экспозиции в реальной невесомости в условиях космического полета [6–8], после постельной гипокинезии (*bedrest*) [9], “сухой” иммерсии [10], а также при использовании стандартной модели вывешивания задних конечностей грызунов [11, 12]. Аналогичную трансформацию миозинового фенотипа в направлении “от медленных к быстрым” наблюдали при гипсовой иммобилизации сустава, денервации, спинальных травмах (цит. по [13]).

Наша лаборатория вот уже 15 лет пытается расшифровать механизмы такой трансформации. Эти исследования пластичности миозинового фенотипа, проводимые как в нашей лаборатории, так и в других лабораториях мира, сосредоточены на поисках механизмов, связывающих изменения экспрессии миозиновых генов с характером сократительной активности мышечного волокна. Анализируемая ситуация представляет собой уникальную возможность проследить влияние функциональной активности ткани на механизмы регуляции экспрессии одного или многих генов. Не исключено, что на этом примере удастся выявить некоторые об-

щие закономерности функционально-зависимого контроля активности генов. Как будет видно из настоящего обзора, многое в этой области уже известно. Однако общая непротиворечивая картина миозиновой трансформации как от быстрых к медленным, так и обратно, пока не складывается.

Данная проблема представляет не только теоретический интерес. Мышечные волокна, в которых преобладает экспрессия медленной изоформы тяжелых цепей миозина, характеризуются не только меньшей скоростью и силой сокращения, но и высокой устойчивостью к утомлению, большей выносливостью. Поэтому раскрытие механизмов, контролирующих экспрессию гена медленного миозина, несомненно, позволит приблизиться к разработке средств и методов преодоления утомляемости в спорте, в реабилитационной, космической и экстремальной медицине.

Нам представляется интересным и важным описать как историю исследований в этой области, так и перспективы, новые подходы и неожиданные гипотезы. Именно этому и посвящена настоящая работа.

1. ТИПЫ МЫШЕЧНЫХ ВОЛОКОН. ГЕННЫЕ КЛАСТЕРЫ

С глубокой древности известно, что мышцы бывают темные и светлые, красные и белые. Луи Антуан Ранвье в 1873 г. впервые показал, что красные и белые мышцы обладают разной силой и скоростью. “Красные” — более медленные, обладают меньшей силой сокращения, но также менее утомляемые; “белые” — наоборот, более быстрые, сильные, но высоко утомляемые [14]. Некоторые авторы считают, что эта дата — начало науки о клеточных и молекулярных основах сократительной функции мышц [15]. В наше время преобладание той или иной изоформы тяжелых цепей миозина — главный критерий классификации мышечных волокон. Оно определяет не только сократительные свойства (скорость и силу), но и общий характер метаболизма и структуры волокна. Например, если “быстрая” изоформа миозина осуществляет быстрое и мощное сокращение с высокой скоростью расхода АТФ, то АТФ должна быстро синтезироваться. Синтез АТФ путем окислительного фосфорилирования для такого режима сократительной активности оказывается слишком медленным. Поэтому в волокнах с преимущественной экспрессией быстрых изоформ миозина должны доминировать анаэробные пути энергопродукции: анаэробный гликолиз и креатин-фосфатный путь. Сигнал на такое “быстрое” сокращение должен тоже подаваться быстро, соответственно вся система регуляции мышечного сокращения должна поддерживаться соответствующими “быстрыми” изоформами соответствующих ферментов. Для медленных изоформ тяжелых цепей миозина все наоборот. Таким образом, преобладание той или иной изоформы тяжелых цепей миозина в волокне определяет почти все его характеристики. Весь метаболизм, как оркестр под дирижера, выстраивается под изоформы тяжелых цепей миозина [16].

Каждая изоформа тяжелых цепей миозина является продуктом отдельного гена. Гены тяжелых цепей миозина сгруппированы в геноме в отдельные кластеры (см. обзор [13]). У крыс на хромосоме 15 расположен так называемый “сердечный” кластер генов тяжелых цепей миозина. В этом кластере два гена тяжелых цепей миозина α (*myh6*) и β (*myh7*). α — сердечный миозин, β — одновременно самая медленная изоформа сердечного миозина и медленный миозин скелетной мышцы. В скелетной мышце β -миозин принято обозначать как тяжелые цепи миозина I типа. У позвоночных животных кроме основного гена тяжелых цепей миозина I β (ген *myh7*) имеется ген *myh7b* (*myh14*) (3-я хромосома), который у взрослых млекопитающих экспрессируется в скелетной мышце в виде мРНК; на уровне белка он реализуется только в глазодвигательной (экстраокулярной) мышце и в волокнах мышечных ве-

ретен. В обычных (экстрафузальных) волокнах скелетных мышц млекопитающих этот ген экспрессируется только в эмбриогенезе. Белковый продукт этого гена (медленный “тонический” миозин) обнаруживают в ряде медленных мышечных волокон представителей Anamnia, рептилий и птиц. В хромосоме 10 у крыс и в хромосоме 17 у человека расположены гены “скелетно-мышечного” кластера, продукты которых делятся на типы: ПА, Pd/x, ПВ. Быстрые миозины объединяются в изоформы II типа (табл. 1). У них скорость сокращения выше, чем у медленных и у α -миозинов. Самые быстрые волокна — те, в которых преобладают изоформы ПВ тяжелых цепей миозина. А самый медленный тип волокон — это волокна, содержащие I-й тип изоформ миозина. У волокон ПА типа из всех быстрых волокон самая высокая устойчивость к утомлению, но она не сопоставима с таковой у волокон первого типа. В этом типе волокон наиболее активны митохондриальные ферменты, здесь больше митохондрий, чем в волокнах, экспрессирующих другие быстрые изоформы тяжелых цепей миозина (Pd/x и Pb), но не больше, чем в волокнах первого типа (у человека, мыши, собаки и кролика). У крупных млекопитающих, включая человека, есть изоформы I, ПА, Pd/x. Самых быстрых форм миозина ПВ у крупных животных нет. А у мелких — мышей и крыс, они есть [16].

В “скелетно-мышечном” кластере миозиновых генов также расположены гены эмбрионального миозина, неонатального миозина и миозина глазодвигательных мышц — экстраокулярного миозина. Все эти гены можно считать генами “быстрых” миозинов. Итак, промежуточных волокон не существует, но есть гибридные. Гибридные волокна — это те волокна, в которых экспрессируются, то есть имеются в наличии в форме белка, а не мРНК, две сопоставимые по объему изоформы миозина. Известны волокна, содержащие одновременно I и ПА, I и Pd/x, ПА и Pd/x изоформы миозина. Таких волокон у новорожденных примерно 5–6%. У взрослых животных и у человека — не более 2%.

Экспрессия каждой из изоформ миозина детерминируется иннервацией волокон. Волокна, иннервированные одним мотонейроном, составляют двигательную единицу и в подавляющем большинстве случаев характеризуются единым миозиновым фенотипом [17]. Позно-тонические, или постуральные мышцы (например, камбаловидная мышца), имеющие высокий тонус и поддерживающие позу организма в условиях нормального гравитационного поля, содержат наибольшее количество волокон медленного типа I [18]. Мотонейрон управляет волокнами за счет паттерна импульсации (10 Гц для “медленных” и 50–60 Гц для “быстрых” двигательных единиц), который влияет на экспрессию миозиновых генов, т.е. на миозиновый фенотип волокна. Миозиновый фенотип весьма стабилен, однако существуют воздействия, способные существенно изменить экспрессию миозиновых генов и обусловить тем самым трансформацию медленных волокон в быстрые или наоборот. Например, низкочастотная электростимуляция в течение нескольких недель приводит к появлению около 30–40% волокон медленного типа преимущественно “быстрых” мышцах [15]. Такой же эффект в “быстрой” мышце голени *m. plantaris* наблюдается у животного с удаленной или теномированной трехглавой мышцей голени, т.е. с компенсаторной перегрузкой [19]. Во всех этих случаях ведущую роль в изменении миозинового фенотипа приписывают изменению паттерна сократительной активности мышцы в результате изменения характера импульсации мотонейрона или в результате прямой импульсации путем электростимуляции.

2. КОГДА ЛЕНИВАЯ МЫШЦА НАЧИНАЕТ РАБОТАТЬ. ХРОНИЧЕСКАЯ СТИМУЛЯЦИЯ. КАЛЬЦИЙ “ВКЛЮЧАЕТ” ГЕН

К настоящему моменту известно, что паттерн импульсации мышечного волокна регулирует фенотип данного волокна, изменяя уровень экспрессии генов изоформ тяжелых цепей миозина. Режим низкочастотной стимуляции позволяет длительное время поддерживать сократительную активность быстрых мышечных волокон, нативная активность которых проявляется крайне редко и ограничивается несколькими минутами в сутки [3]. Именно хроническая активность этих “ленивых” мышц и приводит к повышению экспрессии ранее репрессированного гена *myh7*, кодирующего медленную изоформу тяжелых цепей миозина.

Тем не менее, за счет каких именно молекулярных механизмов осуществляется эта регуляция в целом, при различных режимах работы мышцы, и, в частности, при хронической низкочастотной электростимуляции, до сих пор известно не полностью. Среди пусковых механизмов, определяющих ответ мышечных волокон на низкочастотную электростимуляцию, разные авторы упоминают увеличение в миоплазме волокон скелетных мышц ионов кальция, активирующих сигнальный путь кальцинейрин/NFATc1 и кальций-кальмодулин-зависимую киназу II, и снижение соотношения АТФ/АДФ, приводящее к активации АМФ-активируемой протеинкиназы [20–22].

Различная частота генерации импульсов мотонейронами приводит к различиям в амплитуде и длительности колебаний концентрации ионов кальция внутри мышечных волокон различных типов. Развитие потенциала действия на мембране мышечного волокна приводит к открытию дигидропиридиновых рецепторов, которые в свою очередь приводят к активации рианодиновых каналов и выбросу кальция из саркоплазматического ретикулума; данный механизм является основой электромеханического сопряжения в скелетной мышце [23].

В нормальном режиме двигательной активности млекопитающего волокна постверхальных мышц активны около 33% времени, тогда как скелетные волокна “быстрого” типа в зависимости от подтипа активны от 3% до 0.01% времени в течение суток [3]: таким образом, несмотря на то, что амплитуда кальциевого сигнала при активации быстрых скелетных волокон выше, чем при активации медленных, интегральная концентрация кальция в течение суток значительно больше в медленных скелетных волокнах. Концентрация кальция в покое в “медленных” мышечных волокнах также значительно выше чем в “быстрых” волокнах [16].

Содержание ионов кальция внутри волокон “быстрых” мышц *extensor digitorum longus (EDL)* и *tibialis anterior* крысы уже в первые сутки низкочастотной электростимуляции возрастает от 2.5 до 3.8 раз и остается повышенным даже спустя двое суток после прекращения стимуляции [24]. При низкочастотной стимуляции *extensor digitorum longus* концентрация ионов кальция в покое внутри мышечных волокон возрастала вдвое, приближаясь к значениям, характерным для “медленной” камбаловидной мышцы [25]. Низкочастотная электростимуляция “быстрых” мышц кролика приводит к возрастанию в скелетных волокнах “медленной” изоформы кальциевой АТФазы и Na/K-АТФазы, кальсеквестрина и кальретикулина, таким образом способствуя устойчивому повышению концентрации ионов кальция в саркоплазме мышечных волокон [26].

Отдельно следует отметить, что помимо классического механизма сопряжения возбуждения и сокращения существует и другой, “медленный” путь накопления ионов кальция в миоплазме в период между мышечными сокращениями. Суть этого механизма состоит в том, что в процессе работы мышцы происходит выход из мышечного волокна АДФ и АТФ, которые связываются с P2Y рецепторами и активируют их. Активация P2Y рецепторов, связанных с G-белками, через G-белки ак-

тивирует IP3-киназу, что способствует превращению фосфатидилинозитол-бифосфата в фосфатидилинозитол-трифосфат, который при взаимодействии с фосфолипазой C приводит к расщеплению фосфатидилинозитол-бифосфата на диацилглицерол и инозитол-1,4,5-трифосфат (IP3). IP3 связывается с IP3-рецепторами, представляющими собой кальциевые каналы, располагающимися в мембранах саркоплазматического ретикула, митохондрий и ядер, и приводит к выбросу ионов кальция из внутриклеточных депо [27]. Вполне возможно, что данный механизм играет важную роль в поддержании высокого уровня ионов кальция в миоплазме “медленных” волокон, однако пока его значение остается малоизученным.

Повышение концентрации ионов кальция покоя способствует запуску ряда молекулярных сигнальных каскадов, включающих в себя кальций-зависимые протеинкиназы, такие как кальций-кальмодулин-зависимая киназа II, и кальций-зависимая фосфатаза кальцинейрин. Данные ферменты регулируют работу транскрипционных активаторов и репрессоров, согласованное взаимодействие которых управляет экспрессией кальций-зависимых генов. Таким образом осуществляется процесс “сопряжения возбуждения и транскрипции” (excitation-transcription coupling), связывающий активность мышечного волокна и экспрессию генов в данном волокне, что в свою очередь определяет фенотип волокна и его функциональные свойства.

Кальцинейрин представляет собой серин/треониновую фосфатазу, активируемую Ca^{2+} -кальмодулиновым комплексом. Одним из субстратов кальцинейрина являются транскрипционные факторы семейства NFAT (ядерный фактор активации T-лимфоцитов, цитоплазматический). В скелетных мышцах кальцинейрином регулируются четыре транскрипционных фактора данного семейства, NFATc1–NFATc4 [28]. Дефосфорилирование ряда сериновых остатков, расположенных у N-конца молекул NFAT в серин-пролиновом (SP) повторе приводит к изменению конформации данных молекул, экспонированию участков ядерной локализации (NLS) и транслокации в ядро [28, 29]. Внутри ядра NFATc1 связывается с промотором гена медленной изоформы MYHC *myh7* и активирует транскрипцию этого гена, взаимодействуя с другими транскрипционными коактиваторами, включая транскрипционные факторы семейства MEF-2. В экспериментах с флуоресцентными репортерами транскрипционной активности NFATc1 *in vivo* в скелетных мышцах крыс показано, что NFATc1 является сенсором нервно-мышечной активности скелетных мышц: уровень NFATc1-зависимой транскрипции был выше в медленных мышцах в сравнении с быстрыми, при этом в денервированных медленных мышцах его транскрипционная активность снижалась, а при низкочастотной электростимуляции денервированных мышц восстанавливалась. При этом при высокочастотной электростимуляции, соответствующей режиму работы быстрых скелетных мышц, восстановления NFATc1-зависимой транскрипции не происходило [30]. В опытах с флуоресцентным мечением самой молекулы NFATc1 показано, что в камбаловидной мышце NFATc1 локализован преимущественно в мышечных ядрах; при этом уже 2 ч полной неподвижности камбаловидной мышцы приводят к его экспорту из ядер. При низкочастотной электростимуляции “быстрых” мышц, NFATc1, в быстрых мышцах локализованный преимущественно в цитоплазме, перемещается в мышечные ядра [31]. В экспериментах Calabria и соавт., в которых изучалось перемещение в ядро различных изоформ NFAT в зависимости от вида электростимуляции в волокнах преимущественно “быстрой” мышцы *extensor digitorum longus*, было показано, что в покое в ядрах мышечных волокон данной мышцы находится только изоформа NFATc4. При низкочастотной электростимуляции в ядрах локализуются все четыре изоформы NFAT, тогда как при высокочастотной стимуляции, моделирующей активность быстрых двигательных единиц, в ядрах локализу-

ются NFATc3, NFATc4 и, в меньшей степени, NFATc2 [32]. Таким образом, транскрипционные факторы NFAT совместно управляют экспрессией различных миозиновых изоформ в соответствии с режимом сократительной активности скелетной мышцы.

Вклад кальций-кальмодулин-зависимой киназы II в регуляцию экспрессии медленного миозина на фоне низкочастотной электростимуляции изучен в меньшей степени, несмотря на то, что чувствительность кальций-кальмодулин-зависимой киназы II к колебаниям уровня ионов кальция и ее способность активировать экспрессию генов медленного фенотипа скелетного волокна хорошо изучена на других моделях [33, 34]. Тем не менее, показано, что специфическое ингибирование кальций-кальмодулин-зависимой киназы II при электростимуляции культуры миотуб *flexor digitorum brevis* приводит к частичному предотвращению трансформации мышечных волокон в “медленную” сторону [35]. Кальций-кальмодулин-зависимая киназа II наряду с АМФ-активируемой протеинкиназой (АМРК) регулирует активность транскрипционного репрессора гена медленного миозина, гистондеацетилазы 4, и, опосредованно, активность транскрипционного фактора MEF-2D, который блокирует гистондеацетилазу 4 [36, 37]. При этом кальцинейрин, обеспечивающий транслокацию в ядро транскрипционных факторов NFAT, также способен повышать транскрипционную активность факторов семейства MEF-2 [38–40]. Гистондеацетилаза 4 располагается преимущественно в цитоплазме “медленных” скелетных волокон окислительного типа, тогда как в “быстрых” скелетных волокнах HDAC4 локализуется преимущественно в мышечных ядрах [37]. Повышение уровня ионов кальция блокирует репрессорную активность гистондеацетилазы 4: выброс ионов кальция приводит к связыванию кальций-кальмодулинового комплекса с кальций-кальмодулин-зависимой киназой (CaMK), которая активируется и фосфорилирует гистондеацетилазу 4, что приводит к ее экспорту из мышечных ядер [41, 42]. Низкочастотная электростимуляция приводит к CaMK-зависимому фосфорилированию HDAC4 и удалению ее из мышечных ядер, а также к усилению MEF-2 зависимой транскрипции [43].

Кальций-зависимый путь регуляции экспрессии медленной изоформы MYHC является наиболее изученным. Тем не менее, ряд исследований позволяет прийти к выводу, что паттерн иннервации регулирует экспрессию гена *myh7* не только с помощью кальций-зависимых механизмов. В частности, транслокация гистондеацетилазы 4 в мышечные ядра регулируется не только кальций-зависимым образом, но также с помощью АМРК [44]. Соотношение уровня макроэргических фосфатов в скелетной мышце, т.е. энергетический потенциал мышечных волокон является важным регуляторным сигналом и запускает ряд сигнальных каскадов, направленных на обеспечение функционирования мышцы в условиях повышенного расхода энергии. АМФ-активируемая протеинкиназа представляет собой ключевой энергосенсор скелетной мышцы, активирующийся в ответ на снижение соотношения АТФ/АДФ, повышение уровня АМФ и снижение содержания гликогена в мышечных волокнах. Активация АМРК, помимо регулирования уровня белкового обмена, приводит к активации ключевых факторов биогенеза митохондрий и к трансформации миозинового фенотипа волокон в “медленную” сторону. Хроническая низкочастотная электростимуляция мышцы *tibialis anterior* кролика приводит к снижению уровня АТФ и фосфокреатина, что сопровождается трансформацией миозинового фенотипа в “медленную” сторону, причем снижение соотношения АТФ к АДФ предшествует трансформации волокон [45, 46]. В работе Putman и соавт. показано, что введение креатина предотвращает как снижение соотношения АТФ к АДФ в волокнах скелетных мышц, так и трансформацию миозинового фенотипа в “медленную” сторону в ответ на хроническую низкочастотную стимуля-

цию [47]; таким образом, активность транскрипции медленной изоформы МУНС регулируется как кальций-зависимыми, так и энерго-зависимыми механизмами.

Еще одним регуляторным сигналом при электростимуляции является оксид азота. На культуре миотуб C2C12 было показано, что оксид азота через активацию гуанилатциклазы и протеинкиназы G способствует фосфорилированию GSK-3 β по 9-му остатку серина, что приводит к инактивации данной киназы. GSK-3 β противодействует кальцинейрину, фосфорилируя транскрипционный фактор NFATc1 и удаляя его из мышечных ядер, таким образом, блокирование активности GSK-3 β приводит к накоплению NFATc1 в мышечных ядрах и восстановлению экспрессии медленной изоформы МУНС [48]. Активность NO-синтазы возрастает как при низкочастотной электростимуляции, так и при произвольной сократительной активности скелетных мышц [49–51]. После прекращения электростимуляции активность GSK-3 β является необходимой для выхода NFATc1 из мышечных ядер [52] – вероятно, после прекращения сеанса электростимуляции уровень оксида азота в мышечных волокнах падает, что приводит к активации GSK-3 β , однако изменение содержания оксида азота в скелетных мышцах на фоне электростимуляции и сразу же после нее не проводилось. В работе Martins и соавт. было убедительно показано, что оксид азота играет ключевую роль в трансформации миоинового фенотипа волокон скелетных мышц при низкочастотной электростимуляции *in vivo*: блокирование активности NO-синтазы с помощью ингибитора L-NAME предотвращает транслокацию NFATc1 в мышечные ядра, как и увеличение экспрессии медленной изоформы МУНС [53]. На основании этих данных можно сделать вывод, что оксид азота, наряду с ионами кальция, также является одним из регуляторных сигналов, связывающих режим активности скелетного волокна с паттерном экспрессии миоинового генов в данном волокне.

Отдельно следует рассмотреть регуляторный каскад, активирующий экспрессию гена *myh7* по механизму положительной обратной связи. Ключевую роль в данном процессе играют микро-РНК. В процессе экспрессии мРНК гена *myh7*, кодирующего медленную изоформу МУНС, также происходит экспрессия микро-РНК 208b, закодированной в одном из интронов этого гена. В сердечной мышце экспрессируется микро-РНК 208a, закодированная в интроне сердечной изоформы МУНС *myh6* [54]. Микро-РНК 208a и 208b способны индуцировать экспрессию гена *myh7b*, который представляет собой древний ген одной из миоинового изоформ, у человека и у крысы практически не присутствующий в мышечном волокне постуральных мышц на уровне белка и имеющий исключительно регуляторную роль. мРНК гена *myh7b* кодирует регуляторную микро-РНК 499 [54]. Микро-РНК 499 и микро-РНК 208b связываются с 3'-нетранслируемой областью генов транскрипционных репрессоров, включая SOX6, блокирующий транскрипционную активность гена *myh7*, и блокируют их экспрессию [55–57], что приводит к активации транскрипции генов, с которыми связываются данные репрессоры, включая ген медленного миозина. Показано, что хроническая низкочастотная стимуляция активирует экспрессию микро-РНК 499 и 208 в камбаловидной мышце крыс, а также снижает содержание в ней транскрипционного репрессора SOX6 на фоне моделирования хронической болезни легких [58]. Тем не менее, роль данного механизма в трансформации фенотипа волокон на фоне электростимуляции изучена слабо.

Итак, серия классических экспериментов с низкочастотной электростимуляцией, кальциевыми ионофорами и плазмидной трансфекцией позволила сформировать более или менее целостное представление о механизмах повышения интенсивности экспрессии медленного миозина при повышении объема сократительной активности волокна. Оказалось, что в этот процесс вовлечены кальций-зависимые и энерго-зависимые механизмы ядерного траффика транскрипционных факторов

(NFATc1 и Mef2D и гистондеацетилазы 4 (HDAC4). Важно и то, что эти агенты, как способствующие, так и препятствующие экспрессии MyHC I(β), могут быть устранены из ядерного пространства под действием специфических киназ. Механизмы сайт-специфичного связывания NFATc1 и HDAC4 с промотором гена *myh7* изучены гораздо хуже, однако, скорее всего, они основаны на какой-либо из посттрансляционных модификаций этих молекул-посредников. Микро-РНК-зависимые механизмы, а также механизмы метилирования/деметиления ДНК применительно к экспрессии медленного миозина изучены пока крайне недостаточно.

То же можно сказать и про механизмы, препятствующие экспрессии медленного миозина в условиях пониженной сократительной активности или ее полного прекращения.

3. КОГДА ОТКЛЮЧАЕТСЯ ПОСТУРАЛЬНАЯ МЫШЦА. ДЕНЬ ПЕРВЫЙ. АМРК И ГИСТОНДЕАЦЕТИЛАЗЫ. GSK3 β

Исследования влияния функциональной разгрузки на скелетные мышцы проводятся как во время космических полетов (гравитационная разгрузка) [59, 60], так и с использованием наземных моделей, имитирующих гравитационную разгрузку: антиортостатической гипокинезии [61] и сухой иммерсии [62], или же модели антиортостатического вывешивания задних конечностей в экспериментах на грызунах [63, 64]. Трансформация миозинового фенотипа в быструю сторону (т.е. снижение содержания белка и мРНК медленной изоформы MYHC и увеличение содержания “быстрых” миозиновых изоформ) в той или иной степени наблюдается при использовании каждой из этих моделей [6, 8, 11, 12, 59, 65–67].

Сократительная активность постуральных мышц, прежде всего камбаловидной мышцы, определяется двумя основными биомеханическими факторами, действующими на двигательную систему животного и человека на нашей планете: осевой нагрузкой и силой реакции опоры. Оба фактора оказывают свое влияние в условиях земной гравитации и устраняются в условиях невесомости. При моделировании действия невесомости на Земле осевая нагрузка значительно снижена практически в одинаковой степени в условиях “сухой” иммерсии и постельной гипокинезии (bedrest). При этом сила реакции опоры в условиях гипокинезии перераспределена по поверхности тела и снижена, однако не устранена. В условиях иммерсии опора практически отсутствует для тела, “взвешенного” в воде [68, 69]. При моделировании невесомости у крыс методом антиортостатического вывешивания задних конечностей действие обоих факторов на заднюю часть тела животного пренебрежительно мало. Особый интерес представляют физиологические последствия устранения осевой механической нагрузки и особенно опоры. В экспериментах с вывешиванием задних конечностей, с кратковременной невесомостью при полете по параболе Кеплера у крыс, при сухой иммерсии у человека было неоднократно показано драматическое снижение, иногда вплоть до полного подавления, электрической активности камбаловидной мышцы [65, 70, 71].

Таким образом, устранение гравитационно-зависимых механических влияний приводит к “отключению” электрической и соответственно механической активности камбаловидной мышцы, основной антигравитационной мышцы млекопитающих. Это происходит уже в течение первых нескольких часов моделируемой гравитационной разгрузки. Возвращается электрическая активность камбаловидной мышцы к контрольному уровню лишь между 6-м и 9-м днями вывешивания [71]. При этом необходимо отметить, что восстановление электрической активности камбаловидной мышцы не приводит к восстановлению нормального для постуральных мышц процента “медленных” волокон. Таким образом, трансформацию

миозинового фенотипа на фоне функциональной разгрузки нельзя рассматривать как процесс обратный трансформации фенотипа в “медленную” сторону на фоне хронической низкочастотной стимуляции.

Результаты исследований, проведенных как в нашей лаборатории, так и за рубежом, свидетельствуют о том, что процесс изменения миозинового фенотипа постуральных мышц при функциональной разгрузке характеризуется нелинейностью и сменой определяющих данный процесс молекулярных регуляторов в ходе функциональной разгрузки. Тем не менее, ключевыми регуляторными сигналами, связывающими активность мышечного волокна и экспрессию гена медленной изоформы МУНС являются все те же три фактора, рассмотренные нами в предыдущем разделе: ионы кальция, оксид азота и соотношение уровня АТФ к АДФ. Отдельно следует рассмотреть роль ионов кальция в изменении экспрессии медленного миозина, поскольку накопленные в последние годы экспериментальные данные свидетельствуют о двойственности эффектов данного регулятора на экспрессию медленного миозина при функциональной разгрузке.

Снижение уровня экспрессии пре-мРНК и мРНК медленной изоформы МУНС в камбаловидной мышце наблюдается уже после первых суток вывешивания [72, 73]. Данные об экспрессии мРНК медленной изоформы МУНС после третьих суток вывешивания более противоречивы: ранее в нашей лаборатории, также, как и в работе Desaphy, была показана лишь тенденция к снижению экспрессии [74, 75], однако некоторые исследователи обнаруживали достоверное снижение экспрессии мРНК медленной изоформы МУНС после вторых суток и после четвертых суток вывешивания [72, 76]. После седьмых суток вывешивания и позднее наблюдается достоверное снижение экспрессии медленной изоформы МУНС как на уровне мРНК, так и на уровне белка, что показано во множестве исследований [13, 72, 77, 78]. Причины такого нелинейного изменения экспрессии медленного миозина в ходе функциональной разгрузки непосредственно связаны с кальций-зависимой регуляцией и будут рассмотрены далее по ходу обзора.

В нашей лаборатории было показано, что энерго-зависимые сигнальные процессы играют важную роль в экспрессии медленной изоформы МУНС на раннем этапе моделируемой гравитационной разгрузки: уже после первых суток вывешивания происходит инактивация АМРК, что сопровождается значительным увеличением содержания в мышечных ядрах камбаловидной мышцы гистондеацетилазы 4, при этом введение активатора АМРК предотвращает снижение экспрессии мРНК медленной изоформы МУНС, накопление в ядре гистондеацетилазы 4 и инактивацию АМРК [73, 79]. Еще в 1990-х годах было выдвинуто предположение, что моделируемая гравитационная разгрузка ведет к нарушению баланса макроэргических фосфатов в скелетной мышце и к сдвигу равновесия в сторону более высокоэнергетических соединений [80]. Уже после первых суток вывешивания в волокнах камбаловидной мышцы достоверно повышался уровень гликогена, являющегося ингибитором активности АМРК [81, 82]. После десяти дней вывешивания крыс в камбаловидных мышцах было обнаружено накопление фосфокреатина [83]. Применение β -гуанидинпропионовой кислоты, сдвигающей соотношение АТФ/АДФ + АМФ в сторону более низкоэнергетических фосфатов и являющейся активатором АМРК, предотвращало трансформацию миозинового фенотипа камбаловидных мышц вывешенных животных в “быструю” сторону после десяти дней вывешивания [84]. Тем не менее, общие механизмы влияния накопления макроэргических соединений на экспрессию миозиновых изоформ в условиях функциональной разгрузки остаются неясными с учетом того факта, что уже после 7-ми суток вывешивания активность АМРК возвращается к контрольному уровню, а к 14-м суткам она вдвое превышает значения, характерные для группы контроля [79].

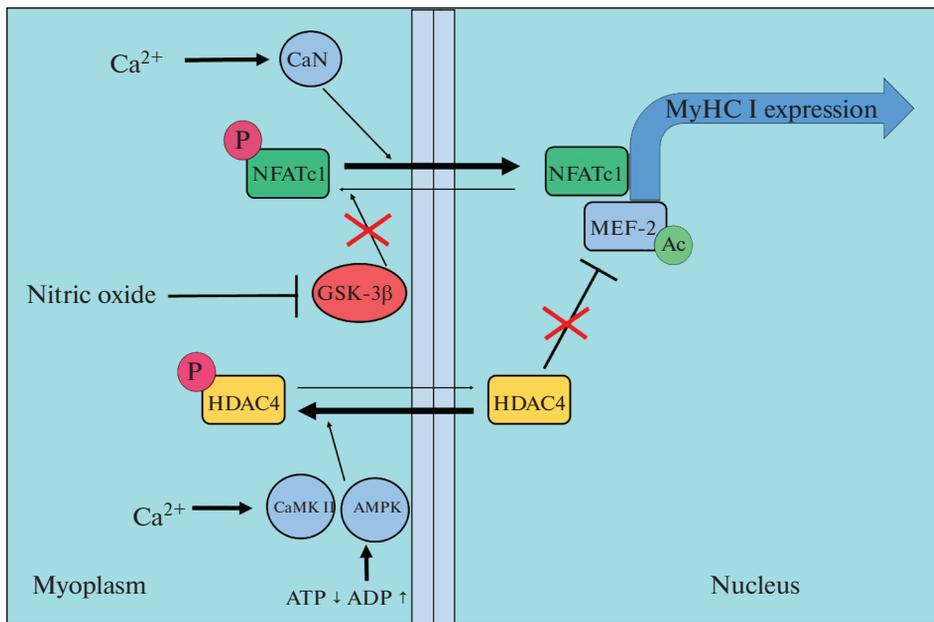


Рис. 1. Схема регуляции экспрессии медленной изоформы тяжелых цепей миозина в условиях электро-стимуляции.

CaN – кальцинейрин, NFATc1 – ядерный фактор активации Т-лимфоцитов, цитоплазматический 1, MEF-2 – миогенный регуляторный фактор, HDAC4 – гистондеацетилаза 4, MyHC I – изоформа тяжелых цепей миозина типа I, CaMK II – кальций-кальмодулин-зависимая киназа, AMPK – АМФ-зависимая протеинкиназа, GSK-3β – киназа гликогенсинтазы 3β, P – фосфорилирование, Ac – ацетилирование, nitric oxide – оксид азота.

Также в нашей лаборатории было впервые обнаружено, что уже после первых суток вывешивания содержание NFATc1 в мышечных ядрах снижено вдвое в сравнении с контролем, а NFAT-зависимая транскрипционная активность, измеренная по содержанию мРНК NFAT-зависимой изоформы гена *MCIP1.4*, снижается более чем на 90 процентов [85, 86]. Маловероятно, что такое изменение связано с кальций-зависимыми механизмами, поскольку содержание ионов кальция в миоплазме камбаловидных мышц на первые сутки вывешивания не отличается от контроля [87]. С учетом того факта, что уже в первые сутки функциональной разгрузки активируется киназа GSK-3β [88] а также падает уровень оксида азота в миоплазме камбаловидных мышц (неопубликованные данные), можно предположить, что инактивацию NFATc1 в первые сутки функциональной разгрузки определяет именно снижение уровня оксида азота. После 7-ми суток вывешивания содержание NFATc1 в мышечных ядрах также снижено, при этом фармакологическое восполнение дефицита NO до контрольного уровня приводит к инактивации GSK-3β, увеличению содержания NFATc1 в мышечных ядрах и поддержанию экспрессии медленной изоформы MyHC [89].

Таким образом, очевидно, что уже в течение первых суток после устранения опоры и тонической электрической (и сократительной) активности камбаловидной мышцы запускается перестройка ряда сигнальных механизмов, обеспечивающая снижение экспрессии гена медленного миозина *myh7*. Является ли данный эффект уникальным для данной экстремальной ситуации, практически не встречаю-

щейся (в таком виде) в обычной жизни животного? Оказывается, нет. В весьма элегантном эксперименте Дуаг и соавт. [90] показали, что циклические изменения двигательной активности животного, наблюдаемые в рамках суточного цикла (день/ночь), сопровождаются соответствующими изменениями ядерно-цитоплазматического траффика NFATc1. При снижении двигательной активности и соответствующем снижении сократительной активности данной мышцы содержание NFATc1 в ядрах мышечного волокна снижается, при возобновлении активности – снова повышается. Эта цикличность не обнаруживается при денервации мышцы. Поэтому мы вполне можем предположить, что наблюдаемые при хронической разгрузке изменения ядерно-цитоплазматического траффика NFATc1 являются продолжением и углублением процессов, сопровождающих периодически наступающее состояние физиологического покоя [91].

4. КАЛЬЦИЕВЫЙ РЕВАНШ И ЕГО ПОСЛЕДСТВИЯ

После 3-х суток разгрузки наблюдается временное прекращение процесса редукции экспрессии *myh7* [75]. При этом содержание мРНК медленной изоформы тяжелых цепей миозина примерно соответствует уровню виварного контроля. Мы предположили, что такое временное восстановление экспрессии медленного миозина может быть следствием известного накопления ионов кальция в мышечные волокна уже после 2-х суток разгрузки (“кальций-зависимый реванш”) [67, 87, 92, 93] с последующей активацией кальцинеурина и транслокацией NFATc1 в миоядра. Для проверки этой гипотезы мы проанализировали экспрессию миозиновых генов, содержание регуляторов транскрипции данных генов в мышечных ядрах и активность киназы АМПК в эксперименте с 3-суточным вывешиванием на фоне введения блокатора кальциевых каналов L-типа нифедипина [94]. После 3-х суток вывешивания в группе “чистого” вывешивания достоверно понизилось содержание мРНК *MyHC I(β)* и мРНК *MyHC IIa*. При этом содержание зрелой мРНК медленной изоформы *MyHC* в этой группе не имело достоверных отличий от группы контроля. В группе с введением нифедипина содержание пре-мРНК *MyHC I(β)*, а также экспрессия быстрых миозиновых генов не отличалась от группы “чистого” вывешивания, и имела те же отличия от контроля, однако экспрессия мРНК медленной изоформы *MyHC I(β)* была достоверно снижена в сравнении с группой “чистого” вывешивания. Таким образом, блокирование кальциевых каналов L-типа, препятствуя накоплению ионов кальция, приводит к снижению экспрессии медленной изоформы миозина на третьих сутках вывешивания. Данный факт подтверждает гипотезу о кальций-зависимой реактивации экспрессии медленной изоформы *MyHC* на третьи сутки вывешивания. Отсутствие различий в уровне экспрессии пре-мРНК *MyHC I(β)* при наличии различий в уровнях зрелой мРНК *MyHC I(β)* в группах *ZHS* и *ZHS + nif* свидетельствует о том, что кальций-зависимая реактивация экспрессии медленного миозина носит временный характер.

Также мы проанализировали экспрессию NFAT-зависимого гена *MSIP1.4* (модулирующий белок, взаимодействующий с кальцинеурином). Экспрессия *MSIP1.4* была достоверно снижена в обеих вывешенных группах в сравнении с группой виварного контроля; при этом в группе “чистого” вывешивания уровень экспрессии мРНК *MSIP1.4* составил 56% от группы виварного контроля, а в группе *ZHS + nif* – 42% от группы виварного контроля. При этом содержание NFATc1 в ядерной фракции камбаловидных мышц контрольных животных и животных из группы “чистого” вывешивания не различалось между собой, тогда как в группе вывешенных животных, получавших нифедипин, содержание NFATc1 в ядерной фракции было достоверно снижено вдвое в сравнении с группой *ZHS*. На основа-

нии этих данных можно сделать вывод, что транзиторное увеличение содержания NFATc1 в мышечных ядрах на третьи сутки вывешивания, показанное в более ранних работах, обусловлено кальций-зависимой реактивацией импорта NFATc1 в мышечные ядра, вероятнее всего, за счет активности кальций-зависимой фосфатазы кальцинейрина, дефосфорилирующей NFATc1, что приводит к его входу в мышечные ядра. При этом отсутствие достоверных различий между уровнем экспрессии MСIP1.4 в обеих группах вывешенных животных можно объяснить транзиторным характером этой реактивации.

Кальций-зависимая реактивация экспрессии медленной изоформы MuHC может осуществляться не только за счет восстановления ядерного NFATc1, но и за счет кальций-зависимого импорта гистондеацетилазы 4 путем ее фосфорилирования кальций-кальмодулин-зависимой киназой II. Кроме того, фосфорилирование гистондеацетилазы 4 может осуществляться с помощью АМПК, активность которой может регулироваться киназой кальций-кальмодулин-зависимой протеинкиназы бета (CaMKKβ).

Содержание гистондеацетилазы 4 в ядерной фракции в группе чистого вывешивания не отличалось от контроля. Однако в группе с введением нифедипина ядерное содержание гистондеацетилазы 4 достоверно повышено почти в три раза. Эти данные подтверждают нашу гипотезу о кальций-зависимом импорте гистондеацетилазы 4. Однако то, за счет каких киназ осуществляется данный трафик, нуждается в дальнейшем изучении. Содержание гистонацетилтрансферазы р300 в ядерной фракции в группе чистого вывешивания не отличалось от контроля. Однако в группе с введением нифедипина ядерное содержание р300 достоверно повышено почти в два раза. По-видимому, ядерный импорт р300 осуществляется также в кальций-зависимым способом. Однако молекулярные механизмы этого процесса неизвестны. На основании этих данных можно сделать вывод, что эпигенетические механизмы регуляции экспрессии MuHC I(β) также могут принимать участие в осуществлении кальций-зависимой реактивации экспрессии медленного миозина на третьи сутки вывешивания.

Следует подчеркнуть, что “кальциевый реванш” экспрессии медленного миозина является транзиторным: уже на седьмые сутки вывешивания экспрессия медленной изоформы тяжелых цепей миозина остается стабильно сниженной. В связи с этим интересны молекулярные механизмы подавления кальций-зависимого реванша. Вполне возможно, что, начиная с определенного момента, накопление ионов кальция выше контрольного уровня приводит не к активации, а к подавлению экспрессии медленного миозина. Так, оказалось, что ингибирование митоген-активируемой протеинкиназы р38 (фосфорилирование которой возрастает в этот период) приводит к повышению содержания NFATc1 в миоцитах и к повышению экспрессии медленного миозина [95]. Из ранних работ известно, что кальций может быть одним из активаторов MAPK р38 [96]. Таким образом, активность р38 может вносить вклад в кальций-зависимое подавление активности NFATc1 и экспрессии медленного миозина. Также следует обратить внимание на тот факт, что, начиная с третьих суток вывешивания, возрастает экспрессия эндогенного ингибитора кальцинейрина, кальсарцина-2 и остается повышенной минимум до 14-ти суток вывешивания [75]. Возможно, что именно кальсарцин блокирует активность кальцинейрина и это приводит к нивелированию кальций-индуцированной активации кальцинейрина. NO-зависимые механизмы регуляции экспрессии медленного миозина также вносят вклад в экспрессию медленного миозина как на 1–3, так и на 7-е сутки вывешивания: в 2021 г. в нашей лаборатории было показано, что оксид азота играет ключевую роль в эффекте механической опорной стимуляции на поддержание медленного фенотипа волокон камбаловидной мышцы на фоне

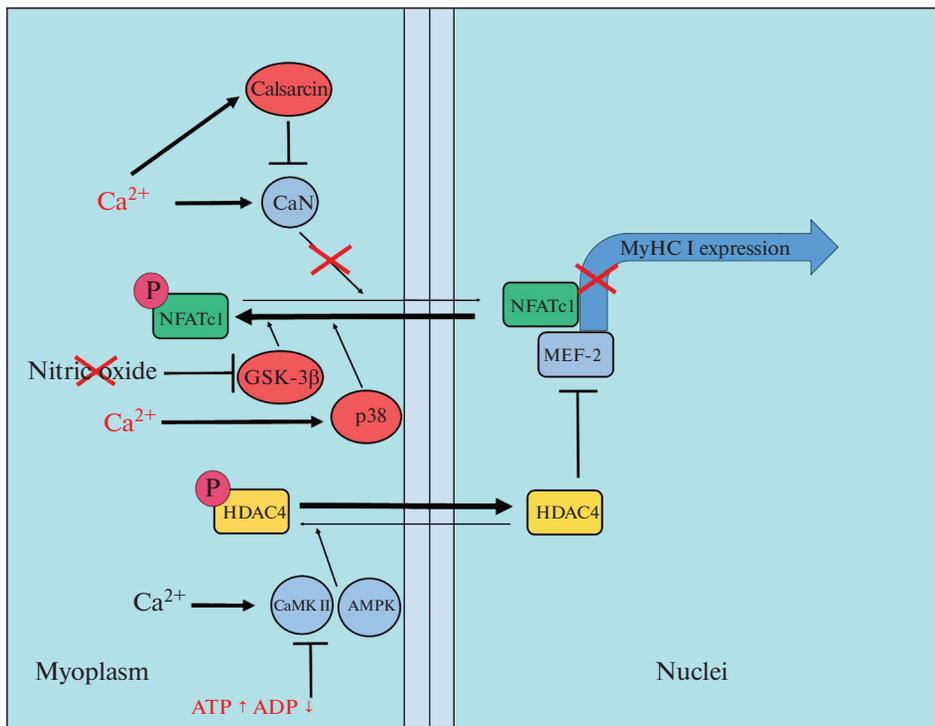


Рис. 2. Схема регуляции экспрессии медленной изоформы тяжелых цепей миозина в условиях функциональной разгрузки.

CaN – кальцинейрин, NFATc1 – ядерный фактор активации Т-лимфоцитов, цитоплазматический 1, MEF-2 – миогенный регуляторный фактор, HDAC4 – гистондеацетилаза 4, CaMK II – кальций-кальмодулин-зависимая киназа II, AMPK – АМФ-зависимая протеинкиназа, MyHC I – изоформа тяжелых цепей миозина I, GSK-3 β – киназа гликогенсинтазы β , p38 – МАП-киназа p38, calsarcin – кальсарцин-2, P – фосфорилирование, Ac – ацетилирование, nitric oxide – оксид азота.

7-ми суток вывешивания, причем в этот процесс вовлечен как сигнальный путь NO/GSK-3/NFATc1, так и эпигенетические регуляторные механизмы [97]. Тем не менее, маловероятно, что данные механизмы играют ключевую роль в подавлении кальций-зависимого реванша, поскольку падение уровня оксида азота, как и активация киназы GSK-3 β , наблюдается уже после первых суток вывешивания [85].

В нашей лаборатории ранее было показано, что применение нифедипина на фоне вывешивания, но при более продолжительных сроках воздействия, приводит к предотвращению трансформации медленных волокон в быстрые [98]. Эти данные свидетельствуют о том, что накопление ионов кальция может привести не только к активации сигнального пути кальцинейрин/NFATc1 и к временной реактивации экспрессии медленного миозина, но и к активации протеинкиназ, фосфорилирующих NFATc1, и тем самым способствующих его изгнанию из ядер и к блокированию экспрессии медленного миозина. К сожалению, мы еще далеки от понимания механизмов этих процессов.

Накопление ионов кальция в мышечном волокне в условиях разгрузки внешне напоминает компенсаторное событие, возвращающее волокно к его нормальному гомеостатическому состоянию. Однако это событие, по-видимому, слишком сильно

влияет на сигнальные процессы, которые не приходят в равновесное состояние, а наоборот, в еще большей степени подталкивают смещение миозинового фенотипа.

5. ВТОРАЯ НЕДЕЛЯ. ВСЕ РЕГУЛЯТОРЫ В ЯДРЕ. ИНАКТИВАЦИЯ NFATc1

На данный момент мы имеем некоторое представление о регуляции экспрессии медленной изоформы тяжелой цепи миозина на сверххранних (1-е сутки), ранних и средних (3–7-е сутки) сроках вывешивания. Полученные экспериментальные данные убедительно показывают, что трансформация миозинового фенотипа в процессе функциональной разгрузки происходит нелинейно и определяется действием всех трех ключевых регуляторов (ионов кальция, оксида азота, соотношением АТФ к АДФ), причем их относительный вклад меняется в зависимости от стадии разгрузки. Исследование более поздних сроков функциональной разгрузки (14 сут) также свидетельствует о нелинейности процессов и об очередной смене механизмов контроля экспрессии медленного миозина на данном этапе: после 14-ти сут вывешивания содержание в мышечных ядрах всех ключевых транскрипционных регуляторов медленного миозина (NFATc1, MEF-2D, гистондеацетилазы 4) соответствует контрольным значениям, однако несмотря на это как экспрессия медленного миозина, так и NFAT-зависимая транскрипция (мРНК MСIP1.4) остается пониженной [86]. Контрольное (или даже повышенное) содержание NFATc1 в мышечных ядрах после 14-ти суток вывешивания на фоне пониженной экспрессии медленного миозина наблюдалось и другими авторами [99, 100]. Таким образом, после 14-ти суток функциональной разгрузки (и, возможно, на более поздних сроках) некие молекулярные механизмы супрессируют транскрипционную активность NFATc1 внутри ядра – и поиск этих механизмов представляет актуальную научную задачу.

В 2010 г. было показано, что внутриядерный NFATc1 может локализоваться в гетерохроматине, не взаимодействуя с промоторными участками медленной изоформы MYHC и с другими транскрипционными регуляторами экспрессии миозина [101]. Следовательно, наличие NFATc1 в мышечном ядре может являться необходимым, но не достаточным условием активации NFATc1-зависимой транскрипции, что подтверждается нашими данными о несоответствии содержания NFAT в ядре и его активности после 14-ти суток вывешивания. Причины скопления NFATc1 в гетерохроматиновых областях, как и механизмы, с помощью которых происходит перемещение внутриядерного NFATc1 к промоторным участкам медленной изоформы MYHC, до сих пор остаются неизученными. Тем не менее, к настоящему времени известно, что, помимо регуляции транскрипционной активности NFATc1 за счет ядерно-цитоплазматического траффика, существуют механизмы, регулирующие транскрипционную активность внутриядерного NFATc1 с помощью посттрансляционных модификаций. В частности, было показано, что ацетилирование двух консервативных участков молекулы NFATc1 ацетилтрансферазой p300 усиливает связывание NFATc1 с промотором медленной изоформы MYHC, не влияя при этом на распределение NFATc1 между ядром и цитоплазмой мышечных волокон [102]. Активность p300 в свою очередь регулируется ее фосфорилированием протеинкиназами ERK1/2 [103]. Таким образом, сигнальный путь Erk/p300 может определять внутриядерную активность NFATc1 и уровень экспрессии медленного миозина на поздних сроках функциональной разгрузки.

Другим механизмом регуляции экспрессии гена медленного миозина может быть деацетилирование гистонов в области промотора данного гена: в результате такой модификации внутриядерный NFATc1 не сможет связываться с промотором и активировать транскрипцию медленного миозина. Показано, что после 10 дней

вывешивания гистоны на промоторе гена медленной изоформы МУНС деацетилированы [104]; возможно, именно деацетилирование гистонов является лимитирующим фактором для экспрессии NFAT-зависимых генов, включая ген медленного миозина, после 10-ти дней вывешивания и позднее. Особое внимание стоит обратить на сам механизм работы гистондеацетилаз: гистондеацетилазы класса Па, к которым относится гистондеацетилаза 4, не связываются с ДНК напрямую, поэтому считается, что сайт-специфичность деацетилирования гистонов, связанных с промоторами тех или иных генов, достигается за счет взаимодействия с сиквенс-специфичными транскрипционными факторами [105]. Типичным примером такого функционирования является взаимодействие гистондеацетилаз класса Па и транскрипционных факторов семейства MEF-2. Факторы семейства MEF-2 в ряде тканей способны выступать как в качестве активаторов транскрипции, так и в качестве репрессоров, в зависимости от их взаимодействия со специализированными факторами модификации хроматина [106, 107]. Поскольку MEF-2 способны напрямую взаимодействовать с HDAC класса Па, и при этом данное взаимодействие не нарушает способность MEF-2 связываться с ДНК [108], можно предположить, что MEF-2 способны обеспечивать сайт-специфичность деацетилирования хроматина и точечную репрессию MEF-2 зависимой транскрипции [105]. В нашей лаборатории было обнаружено, что содержание транскрипционного фактора MEF-2D в мышечных ядрах вывешенных животных снижено после 3-х и 7-ми суток вывешивания, однако к 14-ти суткам его ядерное содержание возвращается к контрольному уровню [86]: таким образом, возвращение MEF-2D в мышечные ядра может способствовать усилению сайт-специфичного деацетилирования гистонов на промоторе гена медленного миозина и блокированию его экспрессии.

Стоит отметить, что в нашей лаборатории было показано: введение L-аргинина в течение двух недель вывешивания предотвращает снижение экспрессии медленной изоформы МУНС [78], однако из данных, полученных в этой работе, следует, что такой эффект L-аргинина на данном сроке не может объясняться исключительно его влиянием на содержание NFATc1 в ядре (которое является ключевым для эффектов L-аргинина на 7-е сутки вывешивания), так как после двух недель вывешивания содержания NFATc1 в ядрах камбаловидных мышц животных не ниже контрольного уровня. Вполне возможно, что увеличение уровня оксида азота при вывешивании регулирует экспрессию медленной изоформы МУНС через посттрансляционные модификации и/или эпигенетические эффекты: оксид азота является ингибитором различных гистондеацетилаз, включая p300, и активатором гистонацетилтрансфераз в тканях млекопитающих [109, 110].

6. РЕГУЛЯЦИЯ ЭКСПРЕССИИ *МУН7* И “МЕДЛЕННО”-ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ ОРКЕСТР. ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ПОСЛЕДСТВИЯ

К настоящему моменту известно, что уровень экспрессии медленного миозина в волокне скелетной мышцы определяет фенотип данного волокна и его сократительные свойства, и трансформация волокна из одного типа в другой осуществляется за счет изменения паттерна экспрессии миозиновых генов. Тем не менее, реализация медленного, окислительного фенотипа мышечного волокна невозможна без скоординированной экспрессии “генов медленного фенотипа”, определяющих окислительный тип метаболизма волокна и особенности его структуры. В последние годы было обнаружено, что сама по себе экспрессия мРНК медленной изоформы миозина является регуляторным сигналом, координирующим экспрессию генов медленного фенотипа волокна. По-видимому, ключевую роль в данном процессе играют микро-РНК. Оверэкспрессия микро-РНК 499 в миотубах C2C12 приводит к усилению экспрессии медленной изоформы тропонина *tnn1*, миоглобина и

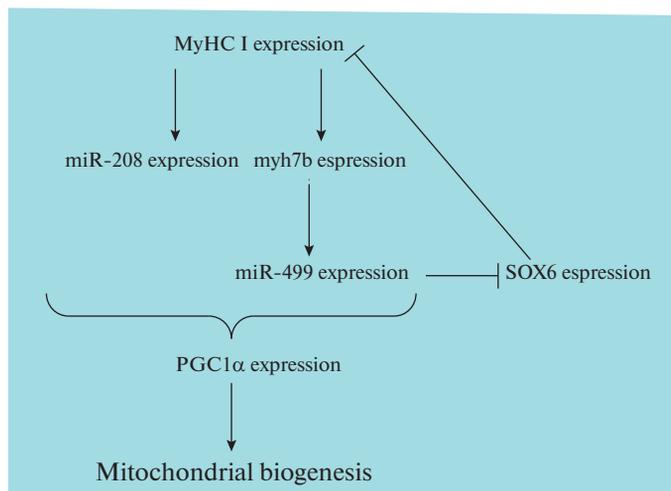


Рис. 3. Схема микро-РНК – зависимой регуляции экспрессии генов с участием медленной изоформы тяжелых цепей миозина.

MyHC I – изоформа тяжелых цепей миозина I, miR-208 – микро-РНК 208, miR-499 – микро-РНК 499, myh7b – медленная тоническая изоформа миозина 7b, SOX6 – SRY-бокс транскрипционный фактор 6, PGC1α – коактиватор гамма-рецептора, активируемого пролифератором пероксисом 1-альфа, mitochondrial biogenesis – митохондриальный биогенез.

PGC1α, таким образом данная микро-РНК играет важную роль в реализации окислительного фенотипа мышечного волокна [57]. Микро-РНК 208b также способна активировать биогенез митохондрий путем экспрессии микроРНК miR-208b, ингибирующей активность белка Fnr1p, что приводит к активации сигнального пути AMPK/PGC1α и активации окислительного метаболизма [111]. PGC-1α, в свою очередь, может являться коактиватором транскрипции NFAT-зависимых генов; более того, иммуногистохимический анализ мышц мышей, нокаутных по PGC-1α, показал значительное снижение процентного содержания изоформ MYHC I и IIa в скелетных мышцах: таким образом, PGC-1α и микро-РНК 499 взаимно усиливают эффекты друг друга [112, 113]. В нашей лаборатории было показано, что восстановление уровня оксида азота в скелетных мышцах вывешенных животных приводит к предотвращению снижения уровня экспрессии медленного миозина, а также экспрессии *myh7b* (мРНК-предшественника микро-РНК 499) и экспрессии PGC-1α, а также предотвращает рост мРНК репрессора генов медленного фенотипа SOX6 [89]. Ингибирование GSK-3β на фоне 7-суточного вывешивания также предотвращает снижение и уровня экспрессии медленного миозина, и PGC1α [114, 115]. Тем не менее, GSK-3β может регулировать экспрессию PGC1α через транскрипционный фактор TFEВ – если такой механизм является ключевым для изменений, происходящих при вывешивании, корегуляция миозиновых и митохондриальных генов и формирование медленного, окислительного фенотипа мышечного волокна осуществляется за счет регуляции активности киназы GSK-3β [116]. Так или иначе, скоординированная экспрессия генов, определяющих “медленный”, окислительный и устойчивый к утомлению фенотип мышечного волокна, необходима для нормального функционирования тонической мышечной системы.

7. ЗАКЛЮЧЕНИЕ. В ПОИСКАХ ФИЗИОЛОГИЧЕСКОГО СМЫСЛА МИОЗИНОВОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ

Анализ литературы показывает, что снижение экспрессии медленного миозина и, как правило, увеличение интенсивности экспрессии быстрых изоформ тяжелых цепей миозина наблюдается в большинстве случаев снижения или прекращения сократительной активности постуральной мышцы [см. обзор [16]]. Очевидно, постоянная экспрессия медленного миозина, контролируемая тонической активностью, в свою очередь является необходимым условием поддержания такой активности медленного волокна. Когда такая активность значительно снижается или прекращается, то исчезают метаболические и, возможно, механические стимулы, запускающие сигнальные пути, обеспечивающие постоянную экспрессию гена *myh7*. Именно этот феномен и был предметом обсуждения в настоящей работе. При этом взаимозависимость тонической активности и интенсивности экспрессии медленного миозина столь велика, а соответствующие сигнальные пути столь чувствительны к малейшим изменениям сократительного режима, что, вероятно, даже небольшие, сколько-нибудь продолжительные колебания сократительной активности должны сказываться на экспрессии миозиновых генов [90]. При рассмотрении этой ситуации возникает естественный вопрос о приспособительном значении трансформации части медленных волокон в быстрые при уменьшении и прекращении сократительной активности. При относительно кратковременном снижении мышечной активности в обычных условиях наземного существования (при физиологическом покое) снижение экспрессии NFATc1-зависимых генов можно считать вполне целесообразным, т.к. при этом осуществляется режим экономии энергетических и иных ресурсов мышечного волокна, что необходимо для полноценного перехода к фазе двигательной активности. При более длительном “отключении” мышечной активности обычно наблюдается не только снижение экспрессии медленного миозина, но и увеличение экспрессии быстрых изоформ тяжелых цепей миозина, не приспособленных к многочасовой генерации субмаксимальных усилий. В этой ситуации трудно оценивать биологическую целесообразность трансформации миозинового фенотипа. Очевидно, что в состоянии длительной инактивации биологическая приспособленность особей с трансформированным фенотипом не превышает таковую без него. Таким образом, мы наблюдаем всего лишь отключение функционально-зависимых сигнальных механизмов, определяющих экспрессию медленного миозина.

В настоящем обзоре мы проанализировали как хорошо изученные, так и гипотетические сигнальные механизмы, связывающие характер тонической сократительной активности, присущей мышечным волокнам медленного типа с интенсивностью экспрессии медленной изоформы тяжелых цепей миозина, которая, являясь центральным звеном так называемого “медленно-окислительного” оркестра, обеспечивает возможность длительного поддержания такой активности. Ее устранение приводит к изменению абсолютного и относительного содержания пусковых метаболических стимулов (АТФ, ионы кальция, оксид азота), последовательно нейтрализующих работу нескольких сигнальных путей, обеспечивающих экспрессию гена медленного миозина. В результате этих сложных и не до конца понятных процессов часть медленных волокон претерпевает глубокие фенотипические изменения, превращаясь в волокна быстрого типа. Таким образом, мы имеем редкую возможность наблюдать, как изменения механической активности, влияя на экспрессию ключевого гена (и его кооперацию), преобразуют целостную структуру мышечного волокна.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа поддержана грантом Российского научного Фонда № 18-15-00107.

ВКЛАД АВТОРОВ

Оба автора в равной степени принимали участие в написании данной работы.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Козловская ИБ* (2017) Гравитация и позно-тоническая мышечная система. *Авиакосм и экол мед* 51: 1021–1025 [*Kozlovskaya IB* (2017) Gravitatsiya i pozno-tonicheskaya myshechnaya sistema. *Aviakosm i Ekol Med* 51: 1021–1025 (In Russ)].
2. *Шепкин ДВ, Набиев С, Кубасова НА, Бершицкий СЮ, Копылова ГВ* (2020) Сравнение функциональных характеристик миозина быстрой и медленной скелетных мышц. *Бюл эксп биол мед* 169: 113–119 [*Shepkin DV, Nabiyeв S, Kubasova NA, Bershitskiy SYU, Kopylova GV* (2020) Sravneniye funktsional'nykh kharakteristik miozina bystroy i medlennoy skeletnykh myshts. *Buul Eksp Biol Med* 169: 113–119 (In Russ)].
3. *Hodgson JA, Roy RR, Higuchi N, Monti RJ, Zhong H, Grossman E, Edgerton VR* (2005) Does daily activity level determine muscle phenotype? *J Exp Biol* 208 (Pt 19): 3761–3770. <https://doi.org/10.1242/jeb.01825>
4. *Наследов ГА* (1981) Тоническая мышечная система позвоночных СпБ. Наука [*Nasledov GA* (1981) Tonicheskaya myshechnaya sistema pozvonochnykh. SpB Nauka (In Russ)].
5. *Shenkman BS* (2016) From Slow to Fast: Hypogravity-Induced Remodeling of Muscle Fiber Myosin Phenotype. *Acta Naturae* 8: 47–59. <https://doi.org/10.32607/20758251-2016-8-4-47-59>
6. *Desplanches D, Mayet MH, Ilyina-Kakueva EI, Frutoso J, Flandrois R* (1991) Structural and metabolic properties of rat muscle exposed to weightlessness aboard Cosmos 1887. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 63 :288–292. <https://doi.org/10.1007/BF00233864>
7. *Shenkman BS, Kozlovskaya IB, Kuznetsov SL, Nemirovskaya TL, Desplanches D* (1994) Plasticity of skeletal muscle fibres in space-flown primates. *J Gravit Physiol* 1: 64–66. <https://doi.org/10.1023/A:1024473126643>
8. *Martin TP, Edgerton VR, Grindeland RE* (1988) Influence of spaceflight on rat skeletal muscle. *J Appl Physiol* 65: 2318–2325. <https://doi.org/10.1152/jappl.1988.65.5.2318>
9. *Ohira Y, Yoshinaga T, Ohara M, Nonaka I, Yoshioka T, Yamashita-Goto K, Shenkman BS, Kozlovskaya IB, Roy RR, Edgerton VR* (1999) Myonuclear domain and myosin phenotype in human soleus after bed rest with or without loading. *J Appl Physiol* 87: 1776–1785. <https://doi.org/10.1152/jappl.1999.87.5.1776>
10. *Shenkman BS, Podlubnaya ZA, Vikhlyantsev IM, Litvinova KS, Udaltsov SN, Nemirovskaya TL* (2004) Contractile characteristics and sarcomeric cytoskeletal proteins of human soleus fibers in muscle unloading: role of mechanical stimulation from the support surface. *Biophysics* 49: 807–815.
11. *Desplanches D, Mayet MH, Sempore B, Flandrois R* (1987) Structural and functional responses to prolonged hindlimb suspension in rat muscle. *J Appl Physiol* 63: 558–563.
12. *Templeton GH, Sweeney HL, Timson BF, Padalino M, Dudenhoefter GA* (1988) Changes in fiber composition of soleus muscle during rat hindlimb suspension. *J Appl Physiol* 65: 1191–1195. <https://doi.org/10.1152/jappl.1988.65.3.1191>
13. *Baldwin KM, Haddad F, Pandorf CE, Roy RR, Edgerton VR* (2013) Alterations in muscle mass and contractile phenotype in response to unloading models: role of transcriptional/pretranslational mechanisms. *Front Physiol* 4: 284. <https://doi.org/10.3389/fphys.2013.00284>
14. *Ranvier L* (1873) De quelques faits relatifs a l'histologie et a la physiologie des muscles striaes. *Arch Physiol Norm Pathol* (Paris) 1: 5–15.
15. *Pette D, Staron RS* (2000) Myosin isoforms, muscle fiber types, and transitions. *Microsc Res Tech* 50: 500–509. [https://doi.org/10.1002/1097-0029\(20000915\)50:6<500::AID-JEMT7>3.0.CO;2-7](https://doi.org/10.1002/1097-0029(20000915)50:6<500::AID-JEMT7>3.0.CO;2-7)

16. *Schiaffino S, Reggiani C* (2011) Fiber types in mammalian skeletal muscles. *Physiol Rev* 1447–1531.
<https://doi.org/10.1152/physrev.00031.2010>
17. *Schiaffino S, Mammucari C* (2011) Regulation of skeletal muscle growth by the IGF1-Akt/PKB pathway: insights from genetic models. *Skelet Musc* 1: 4.
<https://doi.org/10.1186/2044-5040-1-4>
18. *Delp MD, Duan C* (1996) Composition and size of type I, IIA, IID/X, and IIB fibers and citrate synthase activity of rat muscle. *J Appl Physiol* (1985) 80: 261–270.
<https://doi.org/10.1152/jappl.1996.80.1.261>
19. *Baldwin KM, Valdez V, Schrader LF, Herrick RE* (1981) Effect of functional overload on substrate oxidation capacity of skeletal muscle. *J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol* 50: 1272–1276.
<https://doi.org/10.1152/jappl.1981.50.6.1272>
20. *Conjard A, Peuker H, Pette D* (1998) Energy state and myosin heavy chain isoforms in single fibres of normal and transforming rabbit muscles. *Pflugers Arch* 436(6): 962–969.
<https://doi.org/10.1007/s004240050730>
21. *Ausoni S, Gorza L, Schiaffino S, Gundersen K, Lomo T* (1990) Expression of myosin heavy chain isoforms in stimulated fast and slow rat muscles. *J Neurosci* 10: 153–160.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI10-01-00153.1990>
22. *Kubis HP, Scheibe RJ, Meissner JD, Hornung G, Gros G* (2002) Fast-to-slow transformation and nuclear import/export kinetics of the transcription factor NFATc1 during electrostimulation of rabbit muscle cells in culture. *J Physiol* 541: 835–847.
23. *Shishmarev D* (2020) Excitation-contraction coupling in skeletal muscle: recent progress and unanswered questions. *Biophys Rev* 12: 143–153.
<https://doi.org/10.1007/s12551-020-00610-x>
24. *Everts ME, Lomo T, Clausen T* (1993) Changes in K⁺, Na⁺ and calcium contents during in vivo stimulation of rat skeletal muscle. *Acta Physiol Scand* 147: 357–368.
<https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.1993.tb09512.x>
25. *Carroll S, Nicotera P, Pette D* (1999) Calcium transients in single fibers of low-frequency stimulated fast-twitch muscle of rat. *Am J Physiol* 277: C1122–C1129.
<https://doi.org/10.1152/ajpcell.1999.277.6.C1122>
26. *Ohlendieck K, Fromming GR, Murray BE, Maguire PB, Leisner E, Traub I, Pette D* (1999) Effects of chronic low-frequency stimulation on Ca²⁺-regulatory membrane proteins in rabbit fast muscle. *Pflugers Arch* 438: 700–708.
<https://doi.org/10.1007/s004249900115>
27. *Casas M, Buvinic S, Jaimovich E* (2014) ATP signaling in skeletal muscle: from fiber plasticity to regulation of metabolism. *Exerc Sport Sci Rev* 42: 110–116.
<https://doi.org/10.1249/JES.0000000000000017>
28. *Crabtree GR* (1999) Generic signals and specific outcomes: signaling through Ca²⁺, calcineurin, and NFAT. *Cell* 96 (5): 611–614.
[https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80571-1](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80571-1)
29. *Chin ER, Olson EN, Richardson JA, Yang Q, Humphries C, Shelton JM, Wu H, Zhu W, Bassel-Duby R, Williams RS* (1998) A calcineurin-dependent transcriptional pathway controls skeletal muscle fiber type. *Genes Dev* 12: 2499–2509.
<https://doi.org/10.1101/gad.12.16.2499>
30. *McCullagh KJ, Calabria E, Pallafacchina G, Ciciliot S, Serrano AL, Argentini C, Kalthovde JM, Lomo T, Schiaffino S* (2004) NFAT is a nerve activity sensor in skeletal muscle and controls activity-dependent myosin switching. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 10590–10595.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0308035101>
31. *Tothova J, Blaauw B, Pallafacchina G, Rudolf R, Argentini C, Reggiani C, Schiaffino S* (2006) NFATc1 nucleocytoplasmic shuttling is controlled by nerve activity in skeletal muscle. *J Cell Sci* 119: 1604–1611.
<https://doi.org/10.1242/jcs.02875>
32. *Calabria E, Ciciliot S, Moretti I, Garcia M, Picard A, Dyar KA, Pallafacchina G, Tothova J, Schiaffino S, Murgia M* (2009) NFAT isoforms control activity-dependent muscle fiber type specification. *Proc Natl Acad Sci USA* 106: 13335–13340.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0812911106>
33. *Eilers W, Jaspers RT, de Haan A, Ferrie C, Valdivieso P, Fluck M* (2014) CaMKII content affects contractile, but not mitochondrial, characteristics in regenerating skeletal muscle. *BMC Physiol* 14: 7.
<https://doi.org/10.1186/s12899-014-0007-z>

34. *Chin ER* (2004) The role of calcium and calcium/calmodulin-dependent kinases in skeletal muscle plasticity and mitochondrial biogenesis. *Proc Nutr Soc* 63: 279–286.
<https://doi.org/10.1079/PNS2004335>
35. *Mu X, Brown LD, Liu Y, Schneider MF* (2007) Roles of the calcineurin and CaMK signaling pathways in fast-to-slow fiber type transformation of cultured adult mouse skeletal muscle fibers. *Physiol Genomics* 30: 300–312.
<https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00286.2006>
36. *Miska EA, Karlsson C, Langley E, Nielsen SJ, Pines J, Kouzarides T* (1999) HDAC4 deacetylase associates with and Represses the MEF2 transcription factor. *EMBO J* 18: 5099–5107.
<https://doi.org/10.1093/emboj/18.18.5099>
37. *Cohen TJ, Choi MC, Kapur M, Lira VA, Yan Z, Yao TP* (2015) HDAC4 regulates muscle fiber type-specific gene expression programs. *Mol Cells* 38: 343–348.
<https://doi.org/10.14348/molcells.2015.2278>
38. *Wu H, Rothermel B, Kanatous S, Rosenberg P, Naya FJ, Shelton JM, Hutcheson KA, DiMaio JM, Olson EN, Bassel-Duby R, Williams RS* (2001) Activation of MEF2 by muscle activity is mediated through a calcineurin-dependent pathway. *EMBO J* 20: 6414–6423.
<https://doi.org/10.1093/emboj/20.22.6414>
39. *Li J, Vargas MA, Kapiloff MS, Dodge-Kafka KL* (2013) Regulation of MEF2 transcriptional activity by calcineurin/mAKAP complexes. *Exp Cell Res* 319: 447–454.
<https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2012.12.016>
40. *Lynch J, Guo L, Gelebart P, Chilibeck K, Xu J, Molkentin JD, Agellon LB, Michalak M* (2005) Calcineurin signals upstream of calcineurin and MEF2C in a critical Ca(2⁺)-dependent signaling cascade. *J Cell Biol* 170 (1): 37–47.
<https://doi.org/10.1083/jcb.200412156>
41. *McKinsey TA, Zhang CL, Olson EN* (2001) Control of muscle development by dueling HATs and HDACs. *Curr Opin Genet Dev* 11: 497–504.
42. *Grozier CM, Schreiber SL* (2000) Regulation of histone deacetylase 4 and 5 and transcriptional activity by 14-3-3-dependent cellular localization. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 7835–7840.
<https://doi.org/10.1073/pnas.140199597>
43. *Liu Y, Randall WR, Schneider MF* (2005) Activity-dependent and -independent nuclear fluxes of HDAC4 mediated by different kinases in adult skeletal muscle. *J Cell Biol* 168: 887–897.
<https://doi.org/10.1083/jcb.200408128>
44. *Zong H, Ren JM, Young LH, Pypaert M, Mu J, Birnbaum MJ, Shulman GI* (2002) AMP kinase is required for mitochondrial biogenesis in skeletal muscle in response to chronic energy deprivation. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 15983–15987.
<https://doi.org/10.1073/pnas.252625599>
45. *Henriksson J, Salmons S, Chi MY, Hintz CS, Lowry OH* (1988) Chronic stimulation of mammalian muscle: changes in metabolite concentrations in individual fibers. *Am J Physiol* 255: 543–551.
<https://doi.org/10.1152/ajpcell.1988.255.4.C543>
46. *Green HJ, Pette D* (1997) Early metabolic adaptations of rabbit fast-twitch muscle to chronic low-frequency stimulation. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 75: 418–424.
<https://doi.org/10.1007/s004210050182>
47. *Putman CT, Gallo M, Martins KJ, MacLean IM, Jendral MJ, Gordon T, Syrotuik DG, Dixon WT* (2015) Creatine loading elevates the intracellular phosphorylation potential and alters adaptive responses of rat fast-twitch muscle to chronic low-frequency stimulation. *Appl Physiol Nutr Metab* 40: 671–682.
<https://doi.org/10.1139/apnm-2014-0300>
48. *Drenning JA, Lira VA, Simmons CG, Soltow QA, Sellman JE, Criswell DS* (2008) Nitric oxide facilitates NFAT-dependent transcription in mouse myotubes. *Am J Physiol Cell Physiol* 294: C1088–C1095.
<https://doi.org/10.1152/ajpcell.00523.2007>
49. *Reiser PJ, Kline WO, Vaghy PL* (1997) Induction of neuronal type nitric oxide synthase in skeletal muscle by chronic electrical stimulation *in vivo*. *J Appl Physiol* (1985)82: 1250–1255.
<https://doi.org/10.1152/jappl.1997.82.4.1250>
50. *Tidball JG, Lavergne E, Lau KS, Spencer MJ, Stull JT, Wehling M* (1998) Mechanical loading regulates NOS expression and activity in developing and adult skeletal muscle. *Am J Physiol* 275: 260–266.
<https://doi.org/10.1152/ajpcell.1998.275.1.C260>
51. *Pearson T, McArdle A, Jackson MJ* (2015) Nitric oxide availability is increased in contracting skeletal muscle from aged mice, but does not differentially decrease muscle superoxide. *Free Radic Biol Med* 78: 82–88.
<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2014.10.505>

52. *Shen T, Cseresnyes Z, Liu Y, Randall WR, Schneider MF* (2007) Regulation of the nuclear export of the transcription factor NFATc1 by protein kinases after slow fibre type electrical stimulation of adult mouse skeletal muscle fibres. *J Physiol* 579: 535–551.
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.2006.120048>
53. *Martins KJ, St-Louis M, Murdoch GK, MacLean IM, McDonald P, Dixon WT, Putman CT, Michel RN* (2012) Nitric oxide synthase inhibition prevents activity-induced calcineurin-NFATc1 signalling and fast-to-slow skeletal muscle fibre type conversions. *J Physiol* 590(6): 1427–1442.
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.2011.223370>
54. *van Rooij E, Quiat D, Johnson BA, Sutherland LB, Qi X, Richardson JA, Kelm RJ, Jr, Olson EN* (2009) A family of microRNAs encoded by myosin genes governs myosin expression and muscle performance. *Dev Cell* 17: 662–673.
<https://doi.org/10.1016/j.devcel.2009.10.013>
55. *McCarthy JJ, Esser KA, Peterson CA, Dupont-Versteegden EE* (2009) Evidence of MyomiR network regulation of beta-myosin heavy chain gene expression during skeletal muscle atrophy. *Physiol Genomics* 39: 219–226.
<https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00042.2009>
56. *Ji J, Tsika GL, Rindt H, Schreiber KL, McCarthy JJ, Kelm RJ, Jr, Tsika R* (2007) Puralpha and Purbeta collaborate with Sp3 to negatively regulate beta-myosin heavy chain gene expression during skeletal muscle inactivity. *Mol Cell Biol* 27: 1531–1543.
<https://doi.org/10.1128/MCB.00629-06>
57. *Xu M, Chen X, Chen D, Yu B, Li M, He J, Huang Z* (2018) MicroRNA-499-5p regulates skeletal myofiber specification via NFATc1/MEF2C pathway and Thrap1/MEF2C axis. *Life Sci* 215: 236–245.
<https://doi.org/10.1016/j.lfs.2018.11.020>
58. *Huang S, Jin L, Shen J, Shang P, Jiang X, Wang X* (2016) Electrical stimulation influences chronic intermittent hypoxia-hypercapnia induction of muscle fibre transformation by regulating the microRNA/Sox6 pathway. *Sci Rep* 6: 26415.
<https://doi.org/10.1038/sRep26415>
59. *Fitts RH, Trappe SW, Costill DL, Gallagher PM, Creer AC, Colloton PA, Peters JR, Romatowski JG, Bain JL, Riley DA* (2010) Prolonged space flight-induced alterations in the structure and function of human skeletal muscle fibres. *J Physiol* 588: 3567–3592.
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.2010.188508>
60. *Goswami N* (2017) Falls and Fall-Prevention in Older Persons: Geriatrics Meets Spaceflight! *Front. Physiol* 8: 603.
<https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00603>
61. *Russomano T, Gustavo D, Falcao F* (2008) The Effects of Hypergravity and Microgravity on Biomedical Experiments. *Biomed Eng* 77.
<https://doi.org/10.2200/S00105ED1V01Y200801BME018>
62. *Шульженко ЕБ, Виль-Вильямс ИФ* (1976) Возможность проведения длительной водной иммерсии методом “сухого” погружения. *Косм биол авиакосм мед* 10: 82–84 [*Shulzhenko EB, Wil-Williams IF* (1976) Possibility of long-term water immersion by the “dry” immersion method. *Cosm Biol Aviacosm Med* 10: 82–84 (In Russ)].
63. *Morey-Holton ER, Globus RK* (2002) Hindlimb unloading rodent model: technical aspects. *J Appl Physiol* 92: 1367–1377.
<https://doi.org/10.1152/japplphysiol.00969.2001>
64. *Ilin EA, Novikov VE* (1980) Stand for modelling the physiological effects of weightlessness in laboratory experiments with rats. *Kosm Biol Aviakosm Med* 14: 79–80.
65. *Alford EK, Roy RR, Hodgson JA, Edgerton VR* (1987) Electromyography of rat soleus, medial gastrocnemius, and tibialis anterior during hind limb suspension. *Exp Neurol* 96 (3): 635–649.
[https://doi.org/10.1016/0014-4886\(87\)90225-1](https://doi.org/10.1016/0014-4886(87)90225-1)
66. *Fitts RH, Riley DR, Widrick JJ* (2001) Functional and structural adaptations of skeletal muscle to microgravity. *J Exp Biol* 204: 3201–3208.
67. *Shenkman BS, Nemirovskaya TL* (2008) Calcium-dependent signaling mechanisms and soleus fiber remodeling under gravitational unloading. *J Muscle Res Cell Motil* 29: 221–230.
<https://doi.org/10.1007/s10974-008-9164-7>
68. *Gazenko OG, Grigoriev AI, Kozlovskaya IB* (1987) Mechanisms of acute and chronic effects of microgravity. *Physiologist* 30 (1 Suppl): S1–S5.
69. *Kozlovskaya IB, Shenkman BS* (2019) Cellular Responses of Human Postural Muscle to Dry Immersion. *Front Physiol* 10: 187.
<https://doi.org/10.3389/fphys.2019.00187>
70. *Kawano F* (2004) The mechanisms underlying neuromuscular changes in microgravity environment. *Biol Sci Space* 18(3): 104–105.

71. *De-Doncker L, Kasri M, Picquet F, Falempin M* (2005) Physiologically adaptive changes of the L5 afferent neurogram and of the rat soleus EMG activity during 14 days of hindlimb unloading and recovery. *J Exp Biol* 208: 4585–4592.
<https://doi.org/10.1242/jeb.01931>
72. *Giger JM, Bodell PW, Zeng M, Baldwin KM, Haddad F* (2009) Rapid muscle atrophy response to unloading: pretranslational processes involving MHC and actin. *J Appl Physiol* (1985): 1204–1212.
<https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00344.2009>
73. *Vilchinskaya NA, Mochalova EP, Nemirovskaya TL, Mirzoev TM, Turtikova OV, Shenkman BS* (2017) Rapid decline in MyHC I(beta) mRNA expression in rat soleus during hindlimb unloading is associated with AMPK dephosphorylation. *J Physiol* 595: 7123–7134.
<https://doi.org/10.1113/JP275184>
74. *Desaphy JF, Pierno S, Liantonio A, De Luca A, Didonna MP, Frigeri A, Nicchia GP, Svelto M, Camerino C, Zallone A, Camerino DC* (2005) Recovery of the soleus muscle after short- and long-term disuse induced by hindlimb unloading: effects on the electrical properties and myosin heavy chain profile. *Neurobiol Dis* 18: 356–365.
<https://doi.org/10.1016/j.nbd.2004.09.016>
75. *Lomonosova YN, Turtikova OV, Shenkman BS* (2016) Reduced expression of MyHC slow isoform in rat soleus during unloading is accompanied by alterations of endogenous inhibitors of calcineurin/NFAT signaling pathway. *J Muscle Res Cell Motil* 37: 7–16.
<https://doi.org/10.1007/s10974-015-9428-y>
76. *Stevens L, Gohlsch B, Mounier Y, Pette D* (1999) Changes in myosin heavy chain mRNA and protein isoforms in single fibers of unloaded rat soleus muscle. *FEBS Letters* 463: 15–18.
[https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(99\)01596-3](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(99)01596-3)
77. *Stevens L, Sultan KR, Peuker H, Gohlsch B, Mounier Y, Pette D* (1999) Time-dependent changes in myosin heavy chain mRNA and protein isoforms in unloaded soleus muscle of rat. *Am J Physiol* 277: 1044–1049.
<https://doi.org/10.1152/ajpcell.1999.277.6.C1044>
78. *Lomonosova YN, Kalamkarov GR, Bugrova AE, Shevchenko TF, Kartashkina NL, Lysenko EA, Shvets VI, Nemirovskaya TL* (2011) Protective effect of L-Arginine administration on proteins of unloaded m. soleus. *Biochemistry (Mosc)* 76(5): 571–580.
<https://doi.org/10.1134/S0006297911050075>
79. *Mirzoev T, Tyganov S, Vilchinskaya N, Lomonosova Y, Shenkman B* (2016) 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* 39: 1011–1020.
<https://doi.org/10.1159/000447808>
80. *Ohira Y, Yasui W, Kariya F, Wakatsuki T, Nakamura K, Asakura T, Edgerton VR* (1994) Metabolic adaptation of skeletal muscles to gravitational unloading. *Acta Astronaut* 33: 113–117.
[https://doi.org/10.1016/0094-5765\(94\)90115-5](https://doi.org/10.1016/0094-5765(94)90115-5)
81. *McBride A, Ghilagaber S, Nikolaev A, Hardie DG* (2009) The glycogen-binding domain on the AMPK beta subunit allows the kinase to act as a glycogen sensor. *Cell Metab* 9: 23–34.
<https://doi.org/10.1016/j.cmet.2008.11.008>
82. *Henriksen EJ, Tischler ME* (1988) Time course of the response of carbohydrate metabolism to unloading of the soleus. *Metabolism* 37: 201–208.
[https://doi.org/10.1016/0026-0495\(88\)90096-0](https://doi.org/10.1016/0026-0495(88)90096-0)
83. *Wakatsuki T, Ohira Y, Yasui W, Nakamura K, Asakura T, Ohno H, Yamamoto M* (1994) Responses of contractile properties in rat soleus to high-energy phosphates and/or unloading. *Jpn J Physiol* 44: 193–204.
<https://doi.org/10.2170/jjphysiol.44.193>
84. *Matoba T, Watabe Y, Ohira Y* (1993) β -Guanidinopropionic acid suppresses suspension-induced changes in myosin expression in rat skeletal muscle. *Med Sci Sports Exerc* 25: 157.
85. *Sharlo K, Paramonova I, Turtikova O, Tyganov S, Shenkman B* (2019) Plantar mechanical stimulation prevents calcineurin-NFATc1 inactivation and slow-to-fast fiber type shift in rat soleus muscle under hindlimb unloading. *J Appl Physiol* 126: 1769–1781.
<https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00029.2019>
86. *Paramonova II, Sharlo KA, Vilchinskaya NA, Shenkman BS* (2020) The Time Course of Muscle Nuclear Content of Transcription Factors Regulating the MyHC I(β) Expression in the Rat Soleus Muscle under Gravitational Unloading. *Biol Membr* 37: 126–133.
<https://doi.org/10.31857/S0233475520020097>
87. *Ingalls CP, Wenke JC, Armstrong RB* (2001) Time course changes in [Ca²⁺]_i, force, and protein content in hindlimb-suspended mouse soleus muscles. *Aviat Space Environ Med* 72: 471–476.

88. *Sharlo K, Paramonova I, Turtikova O, Tyganov S, Shenkman B* (2019) Plantar mechanical stimulation prevents calcineurin/NFATc1 inactivation and slow-to-fast fiber-type shift in rat soleus muscle under hindlimb unloading. *J Appl Physiol* 126: 1769–1781.
<https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00029.2019>
89. *Sharlo KA, Paramonova II, Lvova ID, Vilchinskaya NA, Bugrova AE, Shevchenko TF, Kalamkarov GR, Shenkman BS* (2020) NO-Dependent Mechanisms of Myosin Heavy Chain Transcription Regulation in Rat Soleus Muscle After 7-Days Hindlimb Unloading. *Front Physiol* 11: 814.
<https://doi.org/10.3389/fphys.2020.00814>
90. *Dyar KA, Ciciliot S, Tagliazucchi GM, Pallafacchina G, Tothova J, Argentini C, Agatea L, Abraham R, Ahdesmaki M, Forcato M, Bicciato S, Schiaffino S, Blaauw B* (2015) The calcineurin-NFAT pathway controls activity-dependent circadian gene expression in slow skeletal muscle. *Mol Metab* 4: 823–833.
<https://doi.org/10.1016/j.molmet.2015.09.004>
91. *Shenkman BS* (2020) How Postural Muscle Senses Disuse? Early Signs and Signals. *Int J Mol Sci* 21(14): 5037.
<https://doi.org/10.3390/ijms1145037>
92. *Ingalls CP, Warren GL, Armstrong RB* (1999) Intracellular Ca²⁺ transients in mouse soleus muscle after hindlimb unloading and reloading. *J Appl Physiol* (1985)87: 386–390.
<https://doi.org/10.1152/jappl.1999.87.1.386>
93. *Arutyunyan RS, Kozlovskaya IB, Nasledov GA, Nemirovskaya TL, Radzyukevitch TL, Shenkman BS* (1995) The contraction of unweighted fast and slow rat muscles in calcium-free solution. *Basic Appl Myol* 5: 169–175.
94. *Lvova ID, Sharlo KA, Paramonova II, Shenkman BS* (2021) Transient activation of slow myosin expression after 3 days of rat hindlimb unloading is caused by calcium ions accumulation. *Aviakosm Ekol Med In Press*.
95. *Sharlo KA, Mochalova EP, Belova SP, Lvova ID, Nemirovskaya TL, Shenkman BS* (2020) The role of MAP-kinase p38 in the m. soleus slow myosin mRNA transcription regulation during short-term functional unloading. *Archiv Biochem Biophys* 695: 108–622.
<https://doi.org/10.1016/j.abb.2020.108622>
96. *Wright DC, Geiger PC, Han DH, Jones TE, Holloszy JO* (2007) Calcium induces increases in peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1alpha and mitochondrial biogenesis by a pathway leading to p38 mitogen-activated protein kinase activation. *J Biol Chem* 282: 18793–18799.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M611252200>
97. *Sharlo KA, Paramonova II, Lvova ID, Mochalova EP, Kalashnikov VE, Vilchinskaya NA, Tyganov SA, Konstantinova TS, Shevchenko TF, Kalamkarov GR, Shenkman BS* (2021) Plantar Mechanical Stimulation Maintains Slow Myosin Expression in Disused Rat Soleus Muscle via NO-Dependent Signaling. *Int J Mol Sci* 22: 10.
<https://doi.org/3390/ijms22031372>
98. *Мухина АМ, Алтаева ЭГ, Немировская ТЛ, Шенкман БС* (2006) Роль кальциевых каналов L-типа в накоплении Ca²⁺ в волокнах *m. soleus* крысы и изменении соотношения изоформ миозина и SERCA при гравитационной разгрузке. *Рос физиол журн* 92: 1285–1295. [*Mukhina AM, Altayeva EG, Nemirovskaya TL, Shenkman BS* (2006) Role of L-type Ca channels in Ca²⁺ accumulation and changes in distribution of myosin heavy chain and SERCA isoforms in rat *M. soleus* under gravitational unloading. *Russ J Physiol* 92(11): 1285–1295 (In Russ)].
99. *Xia L, Cheung KK, Yeung SS, Yeung EW* (2016) The involvement of transient receptor potential canonical type 1 in skeletal muscle regrowth after unloading-induced atrophy. *J Physiol* 594: 3111–3126.
<https://doi.org/10.1113/JP271705>
100. *Dupont-Versteegden EE, Knox M, Gurley CM, Houle JD, Peterson CA* (2002) Maintenance of muscle mass is not dependent on the calcineurin-NFAT pathway. *Am J Physiol Cell Physiol* 282: 1387–1395.
<https://doi.org/10.1152/ajpcell.00424.2001>
101. *Shen T, Liu Y, Contreras M, Hernandez-Ochoa EO, Randall WR, Schneider MF* (2010) DNA binding sites target nuclear NFATc1 to heterochromatin regions in adult skeletal muscle fibers. *Histochem Cell Biol* 134: 387–402.
<https://doi.org/10.1007/s00418-010-0744-4>
102. *Meissner JD, Freund R, Krone D, Umeda PK, Chang KC, Gros G, Scheibe RJ* (2011) Extracellular signal-regulated kinase 1/2-mediated phosphorylation of p300 enhances myosin heavy chain I/beta gene expression via acetylation of nuclear factor of activated T cells c1. *Nucleic*

- Acids Res 39: 5907–5925.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkr162>
103. *Chen YJ, Wang YN, Chang WC* (2007) ERK2-mediated C-terminal serine phosphorylation of p300 is vital to the regulation of epidermal growth factor-induced keratin 16 gene expression. *J Biol Chem* 282: 27215–27228.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M700264200>
 104. *Pandorf CE, Haddad F, Wright C, Bodell PW, Baldwin KM* (2009) Differential epigenetic modifications of histones at the myosin heavy chain genes in fast and slow skeletal muscle fibers and in response to muscle unloading. *Am J Physiol Cell Physiol* 297: 6–16.
<https://doi.org/10.1152/ajpcell.00075.2009>
 105. *Martin M, Kettmann R, Dequiedt F* (2007) Class IIa histone deacetylases: regulating the regulators. *Oncogene* 26: 5450–5467.
<https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210613>
 106. *Youn HD, Grozinger CM, Liu JO* (2000) Calcium regulates transcriptional Repression of myocyte enhancer factor 2 by histone deacetylase 4. *J Biol Chem* 275: 22563–22567.
<https://doi.org/10.1074/jbc.C000304200>
 107. *McKinsey TA, Zhang CL, Olson EN* (2001) Identification of a signal-responsive nuclear export sequence in class II histone deacetylases. *Mol Cell Biol* 21(18): 6312–6321.
 108. *Lu J, McKinsey TA, Zhang CL, Olson EN* (2000) Regulation of skeletal myogenesis by association of the MEF2 transcription factor with class II histone deacetylases. *Mol Cell* 6: 233–244.
 109. *Socco S, Bovee RC, Palczewski MB, Hickok JR, Thomas DD* (2017) Epigenetics: The third pillar of nitric oxide signaling. *Pharmacol Res* 52–58.
<https://doi.org/10.1016/j.phrs.2017.04.011>
 110. *Nott A, Riccio A* (2009) Nitric oxide-mediated epigenetic mechanisms in developing neurons. *Cell Cycle* 8: 725–730.
<https://doi.org/10.4161/cc.8.5.7805>
 111. *Liu J, Liang X, Zhou D, Lai L, Xiao L, Liu L, Fu T, Kong Y, Zhou Q, Vega RB, Zhu MS, Kelly DP, Gao X, Gan Z* (2016) Coupling of mitochondrial function and skeletal muscle fiber type by a miR-499/Fnrl1/AMPK circuit. *EMBO Mol Med* 8: 1212–1228.
<https://doi.org/10.15252/emmm.201606372>
 112. *Handschin C, Chin S, Li P, Liu F, Maratos-Flier E, Lebrasseur NK, Yan Z, Spiegelman BM* (2007) Skeletal muscle fiber-type switching, exercise intolerance, and myopathy in PGC-1 α muscle-specific knock-out animals. *J Biol Chem* 282: 30014–30021.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M704817200>
 113. *Lin J, Wu H, Tarr PT, Zhang CY, Wu Z, Boss O, Michael LF, Puigserver P, Isotani E, Olson EN, Lowell BB, Bassel-Duby R, Spiegelman BM* (2002) Transcriptional co-activator PGC-1 α drives the formation of slow-twitch muscle fibres. *Nature* 418: 797–801.
<https://doi.org/10.1038/nature00904>
 114. *Sharlo K, Lomonosova Y, Turtikova O, Mitrofanova O, Kalamkarov G, Bugrova A, Shevchenko T, Shenkman B* (2018) The Role of GSK-3 β Phosphorylation in the Regulation of Slow Myosin Expression in Soleus Muscle during Functional Unloading. *Biochemistry (Moscow), Supplement Series A: Membrane and Cell Biology* 12: 85–91.
<https://doi.org/10.1134/S1990747818010099>
 115. *Theeuwes WF, Gosker HR, Langen RCJ, Verhees KJP, Pansters NAM, Schols A, Remels AHV* (2017) Inactivation of glycogen synthase kinase-3 β (GSK-3 β) enhances skeletal muscle oxidative metabolism. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* 1863: 3075–3086.
<https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2017.09.018>
 116. *Theeuwes WF, Gosker HR, Schols A, Langen RCJ, Remels AHV* (2020) Regulation of PGC-1 α expression by a GSK-3 β -TFEB signaling axis in skeletal muscle. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* 1867: 118610.
<https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2019.118610>

How Muscle Activity Controls Slow Myosin Expression

B. S. Shenkman^{a,*} and K. A. Sharlo^a

^aState Scientific Center – Institute of Biomedical Problems RAS, Moscow, Russia

*e-mail: bshenkman@mail.ru

One of the main gravitationally determined functions of the locomotor system is maintaining a vertical pose. These functions, according to the school of Professor I.B. Kozlovskoy are provided by the tonic muscular system. Under the term “tonic

system” I.B. Kozlovskaya understood all structures and regulatory mechanisms capable of maintaining basal mechanical tension (tone) for a long time. In mammals, she attributed slow fibers as fibers with a predominant expression of the slow isoform of myosin heavy chains type I(β) – MyHC I(β) and all the neural mechanisms controlling them to the tonic system. It is clear that the muscle’s ability to maintain tonic tension for a long time depends on the intensity of slow myosin expression. Therefore, it would not be a great exaggeration if we call the slow myosin gene *myh7* the true muscle tone gene. In recent years, it has generally become clear how, against the background of prolonged increased muscle contractile activity, an increase in the expression of the slow isoform of myosin heavy chains, MyHC I(β), and a decrease in the expression of its fast isoforms are triggered. Much less is known about the mechanisms of the decrease in the expression of MyHC I(β) caused by a decrease in muscle contractile activity. This phenomenon was observed after exposure to real weightlessness, after bedrest, “dry” immersion, and also when using the standard model of rodent hindlimb suspension. Numerous studies of the plasticity of the myosin phenotype, as a rule, are focused on the search for mechanisms that link changes in the expression of myosin genes with the pattern of the contractile activity of muscle fibers. The data discussed in the review indicate that constant expression of slow myosin is controlled by tonic activity and, in turn, is a necessary condition for maintaining such activity. When this activity is significantly reduced or stopped, also stop the metabolic and mechanical stimuli that trigger the signaling pathways activating expression of the *myh7* gene. It is this phenomenon that was the subject of discussion in this work.

Keywords: functional unloading, gene expression, slow myosin, skeletal muscle

ОБЗОРНЫЕ
И ПРОБЛЕМНЫЕ СТАТЬИ

МОЛЕКУЛЯРНАЯ И ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ГЕТЕРОГЕННОСТЬ
Na,K-АТФазы В СКЕЛЕТНОЙ МЫШЦЕ

© 2021 г. В. В. Кравцова¹, И. И. Кривой¹, *

¹Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

*E-mail: iikrivoi@gmail.com

Поступила в редакцию 12.03.2021 г.

После доработки 21.03.2021 г.

Принята к публикации 28.03.2021 г.

Активность Na,K-АТФазы критически важна для поддержания электрогенеза, сократительной функции и работоспособности скелетных мышц. Данный обзор посвящен анализу результатов исследований последних лет в области молекулярного и функционального разнообразия Na,K-АТФазы в скелетных мышцах, ко-экспрессирующих $\alpha 1$ - и $\alpha 2$ -изоформы каталитической и транспортной α -субъединицы Na,K-АТФазы. Рассмотрены проблемы, которые представляются наиболее перспективными с точки зрения их дальнейшего развития. Накопленные факты свидетельствуют, что в отличие от $\alpha 1$ -изоформы, демонстрирующей функциональную стабильность, $\alpha 2$ -изоформа отличается высокой степенью пластичности, которая обусловлена ее специфической мембранной локализацией, функциональными и молекулярными взаимодействиями с белковым и липидным окружением, а также особенностями регуляции различными факторами. Функциональные нарушения $\alpha 2$ -изоформы Na,K-АТФазы относятся к наиболее общим признакам, характерным как для хронических, так и для кратковременных форм двигательной дисфункции.

Ключевые слова: Na,K-АТФаза, изоформы, никотиновый холинорецептор, липидные микродомены, кардиотонические стероиды, сигнальная функция, двигательная активность

DOI: 10.31857/S0869813921060066

I. ПРОБЛЕМЫ ИЗУЧЕНИЯ Na,K-АТФазы СКЕЛЕТНЫХ МЫШЦ

При интенсивной двигательной активности, обеспечиваемой скелетной мускулатурой, происходит снижение трансмембранных градиентов Na^+ и K^+ . Наиболее функционально значимо снижение калиевого градиента, поскольку сопутствующая деполяризация плазматической мембраны способна привести к инактивации потенциал-зависимых Na^+ -каналов и снижению возбудимости, и, как следствие, к нарушению механизма генерации потенциалов действия и функционирования системы электромеханического сопряжения [1–5]. Накопление K^+ в синаптических щелях с ограниченной диффузией может привести также к нарушениям в пресинаптическом механизме квантовой секреции медиатора [6]. Среди механизмов поддержания электрогенеза, сократительной функции и работоспособности скелетных мышц важнейшую роль играет активность Na,K-АТФазы. Эта транспортная система, открытая Skou [7], представляет собой интегральный белок, поддерживаю-

щий трансмембранные градиенты Na^+ и K^+ за счет их активного транспорта. Активность Na, K-ATФазы обеспечивает не только электрогенез и возбудимость, но также ряд сопряженных транспортных механизмов клетки [1–4]. Необходимо отметить, что плотность распределения Na, K-ATФазы в сарколемме составляет порядка $1000/\text{мкм}^2$, благодаря чему в скелетных мышцах содержится один из основных пулов Na, K-ATФазы , что важно для поддержания калиевого гомеостаза всего организма в целом [2].

Na, K-ATФаза состоит из двух основных субъединиц α и β . Каталитическую и транспортную функции выполняет α -субъединица, тогда как β -субъединица в основном функционирует в качестве шаперона. С функциональным комплексом α/β ассоциирован также белок семейства FXyD , являющийся модулятором активности фермента [8–12]. Важной особенностью α -субъединицы Na, K-ATФазы является наличие внеклеточных участков, которые формируют специфический сайт связывания (рецептор) для кардиотонических стероидов (КТС). Эти лиганды растительного и животного происхождения в высоких концентрациях являются ингибиторами Na, K-ATФазы и имеют эндогенные циркулирующие структурные аналоги [9, 10, 13–15]. Na, K-ATФаза , как и многие другие функциональные белки, экспрессируется в различных молекулярных формах. Для млекопитающих известны четыре изоформы α -субъединицы ($\alpha 1$ – $\alpha 4$), три изоформы β -субъединицы Na, K-ATФазы , а также семь белков семейства FXyD [8, 9, 11, 12, 16]. Экспрессия этих изоформ носит тканеспецифический характер, а различные их сочетания обеспечивают широкое молекулярное и функциональное разнообразие Na, K-ATФазы . Изоформа $\alpha 1$, экспрессируемая клетками всех тканей, предположительно выполняет основную функцию поддержания ионных градиентов. В большинстве случаев (кроме эритроцитов, почки и некоторых других клеток и тканей) $\alpha 1$ -изоформа коэкспрессируется с одной из изоформ $\alpha 2$ – $\alpha 4$, которые выполняют специфические для данной клетки функции [8, 9, 15, 16].

Важно, что помимо молекулярного разнообразия, на функциональную гетерогенность Na, K-ATФазы важное влияние оказывают и другие факторы. Прежде всего, это факторы, обусловленные специфической мембранной локализацией, особенностями регуляции, а также молекулярным и функциональным взаимодействием с белковым и липидным окружением [15, 16]. В частности, наличие у Na, K-ATФазы ряда структурных доменов позволяет этому белку участвовать в качестве скаффолда в формировании функциональных мультимолекулярных комплексов. Благодаря этим особенностям достигается не только модуляция самой Na, K-ATФазы , но и ее вовлечение в реализацию разнообразных сигнальных внутриклеточных путей [17–21].

В скелетных мышцах коэкспрессируются $\alpha 1$ - и $\alpha 2$ -изоформы Na, K-ATФазы [22, 23], в мышцах человека экспрессируется также $\alpha 3$ -изоформа [24]. Физиологическая роль, особенности локализации и функционирования различных молекулярных форм Na, K-ATФазы являются предметом интенсивного изучения [5, 22, 23, 25–27].

Данный обзор посвящен анализу результатов исследований последних лет, в которых авторы обзора принимали непосредственное участие и которые представляются наиболее перспективными с точки зрения их дальнейшего развития.

Одна из проблем обусловлена неоднородностью распределения $\alpha 1$ - и $\alpha 2$ -изоформ Na, K-ATФазы в сарколемме. Изоформа $\alpha 1$ распределена относительно рав-

номерно. Фракция $\alpha 2$ -изоформы доминирует и достигает 87% от общего количества Na,K-АТФазы в скелетной мышце [22, 23]. Вместе с тем, эта изоформа в покое малоактивна и базовую насосную функцию в основном выполняет $\alpha 1$ -изоформа [28–30]. Важно, что $\alpha 2$ -изоформа Na,K-АТФазы распределена в сарколемме в виде двух основных пулов. Большая часть $\alpha 2$ -изоформы локализована в Т-системе, где участвует в поддержании работоспособности мышцы при накоплении K^+ в Т-системе в условиях интенсивной двигательной нагрузки [5, 25]. Меньший пул $\alpha 2$ -изоформы локализован в постсинаптической области мембраны (концевая пластинка) [26, 30]. Особенности локализации, межмолекулярных взаимодействий, функционирования и регуляции этого пула $\alpha 2$ -изоформы исследованы в меньшей степени. Лишь отдельные работы свидетельствуют о существенных различиях в функционировании и регуляции этих двух пулов $\alpha 2$ -изоформы Na,K-АТФазы [26, 31]. Одна из причин такого различия может заключаться в функциональном и молекулярном взаимодействии между $\alpha 2$ -изоформой и никотиновыми холинорецепторами (нХР) в области концевой пластинки, механизмы и изоформ-специфичность которых во многом остаются неясными [16, 30]. Учитывая существенное влияние, которое оказывает холестерин на функционирование Na,K-АТФазы [32] и ионных каналов [33], роль липидного окружения во взаимодействии нХР/Na,K-АТФаза также заслуживает особого изучения [34].

Другая проблема обусловлена немногочисленностью данных об изоформ-специфичности влияния двигательной активности в отношении Na,K-АТФазы скелетных мышц. Вместе с тем данные о серьезных нарушениях функционирования Na,K-АТФазы с возрастом и при травмах [3, 35], при различных видах миодистрофии [36], в скелетных мышцах гибернирующих животных [37], а также в условиях гравитационной разгрузки [38, 39], настоятельно требуют подобных исследований. Необходимо отметить, что особый интерес представляет начальный этап двигательной разгрузки, который важен для понимания механизмов ранних сигнальных событий, предшествующих развитию атрофии, и который изучен недостаточно [39, 40].

Наконец, достаточно хорошо изучена специфичность регуляции $\alpha 2$ -изоформы Na,K-АТФазы сердечной и гладкой мышц КТС, включая их циркулирующие эндогенные аналоги [15, 41]. Однако лишь относительно немногие исследования посвящены изучению эффектов КТС в скелетных мышцах [31, 42–45].

II. МОЛЕКУЛЯРНЫЙ КОМПЛЕКС НИКОТИНОВОГО ХОЛИНОРЕЦЕПТОРА И Na,K-АТФазы

То, что функциональные и молекулярные взаимодействия между Na,K-АТФазой и разнообразными белками (рецепторы нейромедиаторов, транспортеры и др.) вовлечены в регуляцию синаптической функции, уже не вызывает сомнений [46–50].

Одной из первых была выявлена функциональная и молекулярная связь между Na,K-АТФазой и нХР [16, 30, 51]. В основе этих исследований лежали следующие предпосылки. Общеизвестно, что активация нХР ацетилхолином (АХ), освобождающимся в виде квантов (в микромолярных концентрациях), приводит к открыванию ионных каналов рецепторов и кратковременной деполяризации мембраны концевой пластинки. Однако АХ в наномолярных концентрациях, соответствующих уровню негидролизованного АХ в синаптической щели (преимущественно освобождаемый в неквантовой форме), способен вызывать противоположный эф-

Рис. 1. Гипотетическая схема молекулярного комплекса никотинового холинорецептора (нХР) и Na,K-АТФазы.

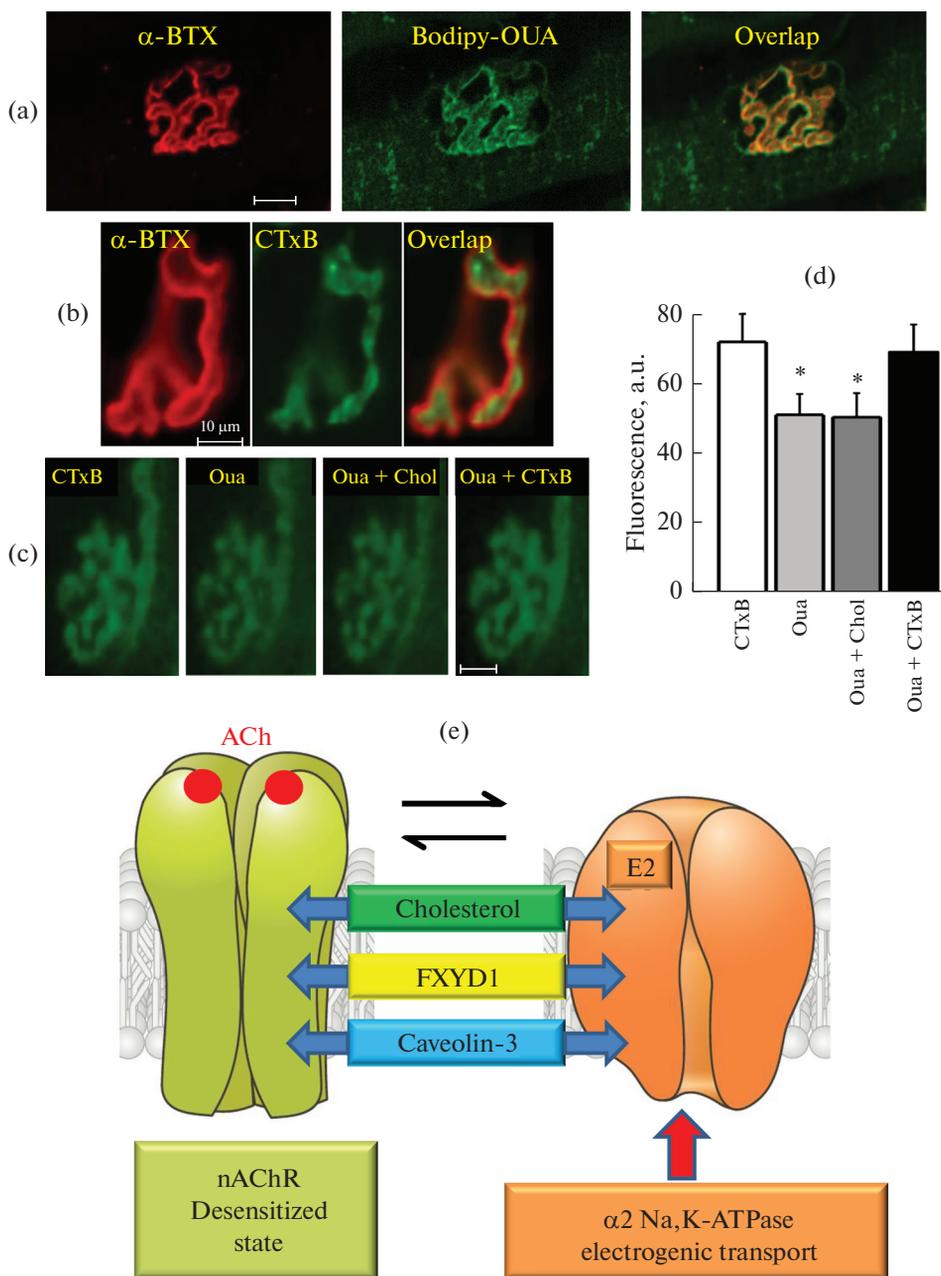
(а) – распределение нХР, меченных α -бунгаротоксином (α -ВТХ, красный канал), и $\alpha 2$ -изоформы Na,K-АТФазы, меченной Bodipy-Ouabain (Bodipy-OUA, зеленый канал), в концевых пластинках диафрагмы мыши C57Bl/6. (b) – распределение нХР и липидных плотиков, меченных субъединицей В холерного токсина (СТхВ, зеленый канал), в концевых пластинках камбаловидной мышцы крысы. (c) и (d) – дестабилизация липидных плотиков в концевой пластинке камбаловидной мышцы крысы убаином (1 мкМ) и их восстановление с помощью комплекса М β ЦД/холестерин. Показаны изображения (c) и уровень флуоресценции (d) после начального окрашивания СТхВ (СТхВ), через 15 мин действия убаина (Oua); через 15 мин после добавления комплекса М β ЦД/холестерин (Oua + Chol) и после повторного окрашивания СТхВ (Oua + СТхВ). Масштаб: 10 мкМ. (e) – гипотетическая схема мультимолекулярного комплекса нХР/ $\alpha 2$ Na,K-АТФаза/FXYD1/кавеолин-3/холестерин. Пояснения в тексте. Данные авторов [34, 36, 56] с изменениями.

фект – гиперполяризацию мембраны [28, 51–54]. Работами акад. Е.Е. Никольского и соавт. было установлено, что этот эффект обусловлен активацией электрогенного Na,K-насоса некантовым АХ и лежит в основе локальной гиперполяризации мембраны в области концевой пластинки (surplus polarization) [52–54]. Обсуждается физиологическое значение этой локальной гиперполяризации, в частности, при формировании синаптического контакта, а также с точки зрения поддержания постсинаптического электрогенеза [54].

Последующие опыты на мембранных препаратах электрического органа *Torpedo* показали существование реципрокного функционального и молекулярного взаимодействия между нХР и α -субъединицей Na,K-АТФазы [30, 51]. Было установлено также, что АХ в наномолярных концентрациях вызывает гиперполяризацию мембраны за счет специфического увеличения электрогенной активности именно $\alpha 2$ -изоформы Na,K-АТФазы [28, 51]. Наконец, было установлено, что в скелетной мышце часть пула $\alpha 2$ -изоформы Na,K-АТФазы сконцентрирована в области концевой пластинки, где ко-локализована с нХР (рис. 1a) и продемонстрирована коиммунопреципитация между нХР, Na,K-АТФазой, фосфолемманом (субъединица FXYD1) и кавеолином-3 (маркер кавеол в мышечных клетках) [30, 55]. Участие холестерина в качестве молекулярного компонента этого комплекса [34, 56] (рис. 1b–d) рассмотрено ниже в части III данного обзора. Эти данные позволили предположить, что некоторая фракция нХР и $\alpha 2$ -изоформы Na,K-АТФазы образуют функциональный комплекс нХР/ $\alpha 2$ Na,K-АТФаза/FXYD1/кавеолин-3 (рис. 1e), участвующий в модуляции и поддержании постсинаптического электрогенеза и нервно-мышечной передачи [16, 30, 34]. Предположительно, этот комплекс локализован в кавеолах, что подтверждается также данными об участии кавеолина-3 в агрин-индуцируемой кластеризации нХР [57].

Участие белков цитоскелета дистрофина, спектринов, анкиринов и других возможных молекулярных партнеров в организации комплекса нХР/ $\alpha 2$ Na,K-АТФаза остается во многом неясным и нуждается в дальнейшем анализе.

Как и другие лиганд-управляемые каналы, нХР осуществляют постоянные конформационные переходы между закрытым, открытым и десенситизированным состояниями. Здесь важно отметить, что в состоянии десенситизации аффинность нХР к АХ лежит в наномолярном диапазоне, то есть на несколько порядков выше по сравнению с другими конформационными состояниями [58, 59]. Опыты с применением лигандов, сдвигающих равновесие между закрытым и десенситизированным состояниями, позволили предположить, что модуляция $\alpha 2$ -изоформы



Na,K-ATФазы обусловлена связыванием АХ с фракцией нХР, находящихся в состоянии десенситизации. Сами по себе конформационные сдвиги при переходе нХР в десенситизированное состояние также могут служить модулирующим сигналом [30]. Для Na,K-ATФазы принципиальным для осуществления взаимодействия с нХР, предположительно, является конформационный переход E1–E2 [16, 30].

Данные о функциональной связи между нХР и $\alpha 2$ -изоформой Na,K-АТФазы предполагают возможность модуляции Na,K-АТФазы в скелетной мышце циркулирующими холинергическими лигандами. В частности, никотином, концентрация которого в крови при курении табака составляет порядка 100 нМ [60, 61]. Лишь в сравнительно немногих работах изучается влияние циркулирующего никотина на скелетную мускулатуру [62–64], хотя известно, что в этих условиях происходит переход части нХР в состояние десенситизации [65]. Перераспределение между различными конформационными состояниями нХР может действовать как модулирующий Na,K-АТФазу сигнал. Это подтверждается изменением функционирования $\alpha 2$ -изоформы Na,K-АТФазы в сосудах гемато-энцефалического барьера и в мозге [66], а также в диафрагмальной мышце [55] крыс в условиях хронического повышения уровня циркулирующего никотина в крови.

Действует ли подобный механизм в условиях применения ингибиторов ацетилхолинэстеразы, когда повышается уровень циркулирующего негидролизованного эндогенного АХ, неизвестно, и это требует специального анализа. Учитывая применение антихолинэстеразных препаратов в клинике, проведение такого анализа может быть полезным для более глубокого понимания механизмов их побочного действия, а также при отравлении подобными веществами.

Необходимо отметить, что сравнительно недавно функциональная и молекулярная реципрокная связь с Na,K-АТФазой была также показана для нХР нейронального типа у насекомых [67], что позволяет предположить возможность подобного принципа регуляции не только в скелетной мышце, но и в ЦНС.

III. Na,K-АТФаза И ЛИПИДНОЕ ОКРУЖЕНИЕ

Если участие липидов мембраны и холестерина в регуляции пресинаптической квантовой секреции медиатора из моторных нервных окончаний изучено достаточно подробно [34], то данные о роли холестерина в структурно-функциональной организации концевой пластинки сравнительно немногочисленны. Хорошо известно, что все мембранные белки взаимодействуют с липидным окружением [33]. В частности, нХР имеют многочисленные сайты связывания с холестерином, который необходим для нормального функционирования нХР и их встраивания в мембрану концевой пластинки. Установлено, что липидные плотники являются платформой для кластеризации нХР, которая нарушается в случае частичного удаления мембранного холестерина с помощью метил- β -циклодекстрина (М β ЦД) [68–70].

Хорошо известно, что липидное окружение оказывает существенное влияние на функционирование Na,K-АТФазы [32, 70–73]. Однако данные об изоформ-специфичности взаимодействия между Na,K-АТФазой и холестерином весьма противоречивы. Так, в опытах на клеточных линиях и клеточных культурах показаны реципрокные взаимодействия между холестерином и Na,K-АТФазой, в которых сама Na,K-АТФаза может влиять на синтез холестерина и его трафик [74]. Ряд данных свидетельствует об уникальности в этой регуляции $\alpha 1$ -изоформы Na,K-АТФазы, которая осуществляется с участием молекулярного комплекса Na,K-АТФаза/Src/кавеолин-1 [73].

Однако в работах с использованием *Pichia pastoris* в качестве экспрессионной системы в условиях применения таких дестабилизирующих факторов, как нагревание и детергенты, было показано, что липиды, включая холестерин, специфически отвечают за встраивание в плазматическую мембрану $\alpha 2$ -изоформы Na,K-АТФазы

[75, 76]. Предположительно, специфика взаимодействия $\alpha 2$ -изоформы с фосфолипидами мембраны обусловлена особенностями ее трансмембранных доменов M8, M9 и M10, а также более слабой ассоциацией с белком FXVD1 [76].

Перечисленные выше противоречивые данные были получены при исследовании клеточных линий и клеточных культур. Данные об изоформ-специфичности взаимодействия между Na,K-АТФазой и холестерином в скелетной мышце весьма немногочисленны.

В частности, установлено, что удаление части мембранного холестерина с помощью МВЦД специфически снижает электрогенную активность $\alpha 2$ -изоформы Na,K-АТФазы в диафрагме крысы [77]. Другая серия экспериментов [56] показала, что липидные плотки, локализованные в мембране концевой пластинки (рис. 1b), отвечают дестабилизацией при блокировании $\alpha 2$ -изоформы Na,K-АТФазы с помощью 1 мкМ уабаина (рис. 1c), причем эта дестабилизация имеет такой же характер, как и при действии МВЦД. Дестабилизация обусловлена снижением уровня мембранного холестерина, поскольку была обратимой при встраивании в плазматическую мембрану экзогенного холестерина (рис. 1d). Эти данные позволяют предположить реципрокность взаимодействия между холестерином и $\alpha 2$ -изоформой Na,K-АТФазы. Поскольку эффекты МВЦД и уабаина были наиболее выражены в постсинаптической области сарколеммы, взаимодействие между холестерином и $\alpha 2$ -изоформой может быть наиболее функционально значимым для области концевой пластинки. В совокупности полученные данные легли в основу гипотетической схемы мультимолекулярного комплекса nXP/ $\alpha 2$ Na,K-АТФаза/FXYD1/кавеолин-3/холестерин (рис. 1e), локализованного в мембране концевой пластинки и служащего физиологическим механизмом поддержания мышечного электрогенеза и гарантийного фактора нервно-мышечной передачи [34, 56]. Полностью этот механизм остается неизвестным, однако наиболее вероятным с точки зрения взаимодействия с холестерином является переход Na,K-АТФазы в конформационное состояние E2 [56, 72].

IV. Na,K-АТФаза И ДВИГАТЕЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ

Хорошо известно, что не только двигательная активность зависит от функционирования Na,K-АТФазы, но существует и обратная зависимость. Усиление двигательной активности характеризуется увеличением общего количества Na,K-АТФазы в сарколемме, длительное ослабление активности вызывает противоположный эффект [3]. Изоформ-специфичность этих изменений Na,K-АТФазы изучена недостаточно, и имеющиеся данные получены в основном при изучении нарушений хронического характера при травмах [78, 79] и возрастных изменениях [35]. В опытах на мышцах линий mdx (модель миодистрофии Дюшенна) и Bla/J (модель дисферлинопатии) выявлено, что эти различные по молекулярным механизмам и степени деструкции концевых пластинок модели миодистрофии характеризуются схожими нарушениями электрогенной активности и мембранной локализации $\alpha 2$ -изоформы Na,K-АТФазы. Эти нарушения не зависят от функциональной специализации мышц (диафрагмальная или камбаловидная) и, предположительно, являются результатом их адаптивного ремоделирования при хронической моторной дисфункции [36, 80, 81].

Длительная функциональная разгрузка приводит к потере мышечной массы, ослаблению сократительной функции и, в конечном счете, к атрофии скелетной

мышцы. Обсуждаемые механизмы атрофических процессов, обусловленных двигательной дисфункцией, весьма многочисленны и во многом остаются неясными [39, 40, 82–84]. При этом с точки зрения поиска ключевых сигнальных событий, запускающих атрофическую программу, наиболее интересны механизмы ранних этапов, предшествующих развитию мышечной атрофии. Это относится и к вопросу изоформ-специфичности нарушений Na,K-АТФазы в таких условиях.

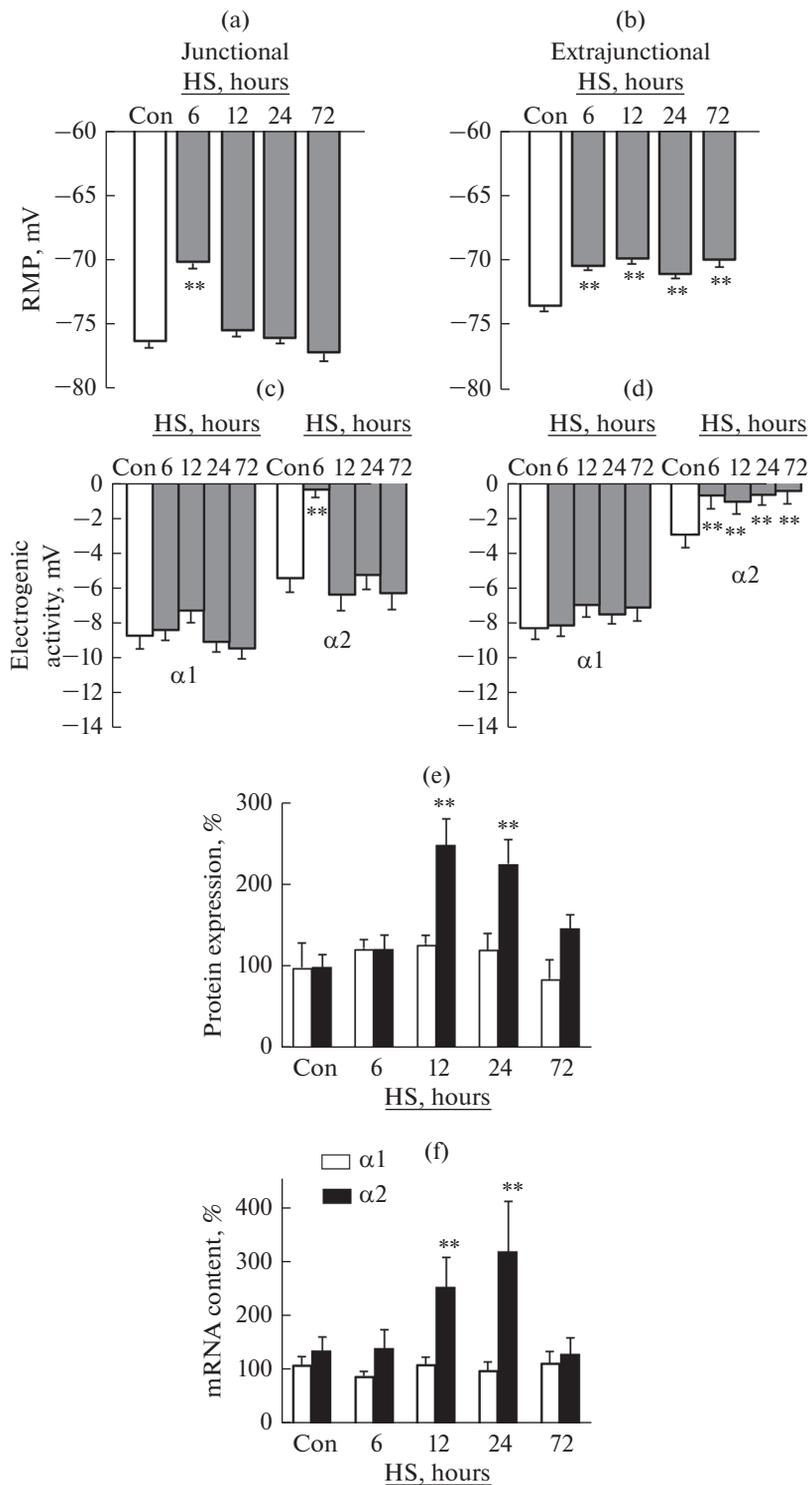
Изучение ранних (6–72 ч) этапов двигательной разгрузки камбаловидной мышцы с использованием метода антиортостатического вывешивания задних конечностей крысы (*hindlimb suspension*, HS) выявило деполяризацию и снижение возбудимости сарколеммы за счет специфического снижения электрогенной активности $\alpha 2$ -изоформы Na,K-АТФазы [26, 85] (рис. 2). При этом был установлен адаптационный характер этих изменений, а также изменений экспрессии мРНК и количества $\alpha 2$ -изоформы Na,K-АТФазы. Более того, функционирование $\alpha 2$ -изоформы по-разному изменялось в разных районах сарколеммы. В период 12–24 ч HS наблюдалось усиление экспрессии мРНК и количества $\alpha 2$ -изоформы; при этом в области концевой пластинки наблюдалось восстановление активности постсинаптического пула $\alpha 2$ -изоформы и соответственно величины мембранного потенциала покоя. Напротив, во внесинаптическом районе сарколеммы, где локализован основной пул $\alpha 2$ -изоформы, ее электрогенная активность и мембранный потенциал покоя были устойчиво снижены в течение всего периода HS (рис. 2). Механизм этого снижения неясен, но предположительно может быть обусловлен увеличением количества белка FX γ YD1 и усилением его ассоциации с $\alpha 2$ -субъединицей Na,K-АТФазы, что должно тормозить каталитическую активность фермента [26]. Важно, что даже при кратковременной стимуляции двигательного нерва наблюдалось восстановление электрогенной активности $\alpha 2$ -изоформы Na,K-АТФазы в обоих районах сарколеммы [26], что показывает прямую зависимость функционирования $\alpha 2$ -изоформы от двигательной активности независимо от локализации.

Было установлено также, что даже кратковременная (6 ч) двигательная разгрузка в условиях HS сопровождается такими же нарушениями липид-упорядоченной фазы сарколеммы, как и в случае блокирования $\alpha 2$ -изоформы Na,K-АТФазы с помощью 1 мкМ уабаина [56]. Дестабилизация липидных плотиков в обоих случаях была наиболее выражена в постсинаптическом районе мембраны, и кратковременная двигательная нагрузка, вызванная стимуляцией двигательного нерва, приводила к частичному восстановлению плотиков. Нарушения плотиков были также обратимы при встраивании в мембрану экзогенного холестерина, что указывает на частичную потерю мембранного холестерина в условиях HS.

В связи с этими наблюдениями важно отметить, что специфическое снижение электрогенной активности и плотности распределения $\alpha 2$ -изоформы Na,K-АТФазы в сарколемме мышц линий mdx и Vla/J, различающихся молекулярными механизмами двигательной дисфункции, также сопровождалось перераспределением

Рис. 2. Вывешивание задних конечностей (*hindlimb suspension*, HS) в течение 6–72 ч специфически влияет на $\alpha 2$ -изоформу Na,K-АТФазы в камбаловидной мышце крысы.

(а) и (б) – изменение величины мембранного потенциала покоя (RMP). (с) и (д) – изменение электрогенной активности $\alpha 1$ - и $\alpha 2$ -изоформ Na,K-АТФазы. (а, с) и (б, д) – постсинаптический и внесинаптический районы сарколеммы соответственно. (е) – количество белка, (ф) – уровень мРНК $\alpha 1$ - и $\alpha 2$ -изоформ Na,K-АТФазы в общем гомогенате мышц. Пояснения в тексте. Данные авторов [26, 85] с изменениями.



мембранного холестерина [36]. Помимо холестерина, в механизмах ранних нарушений, вызываемых двигательной дисфункцией, показано участие церамидов (основная молекула сфинголипидов), которые накапливаются в мышце при двигательной разгрузке [86].

Ультраструктура нервно-мышечного соединения весьма пластична и существенно зависит от двигательной активности. Такие нарушения структуры концевой пластинки, как изменение ее площади и усиление фрагментации в распределении нХР, наблюдаются при снижении двигательной активности: при возрастных изменениях, после денервации, при миодистрофии и других формах мышечной патологии. Молекулярные механизмы, лежащие в основе таких нарушений, интенсивно исследуются, но во многом продолжают оставаться неясными [87–89].

Важно отметить, что даже кратковременная двигательная разгрузка (6–12 ч HS), вызывающая нарушения функционирования $\alpha 2$ -изоформы Na,K-АТФазы и дестабилизацию липидных плотиков, сопровождается также изменением структуры концевой пластинки [90]. Перечисленные структурно-функциональные нарушения, вызванные двигательной дисфункцией, относятся к наиболее ранним событиям, предшествующим развитию мышечной атрофии. Механизмы этих нарушений остаются предметом дальнейших исследований, однако ряд фактов позволяет предположить, что одним из ключевых факторов является АМФ-активируемая протеинкиназа (АМРК) [39, 40, 83, 91].

В скелетной мышце АМРК является метаболическим сенсором, зависящим от внутриклеточного соотношения АМФ/АТФ. При возрастании потребления энергии клеткой в условиях интенсивной сократительной деятельности, когда увеличивается соотношение АМФ/АТФ, наблюдается активация АМРК. Напротив, при снижении двигательной активности должен наблюдаться противоположный эффект, что подтверждается данными о снижении уровня фосфорилирования АМРК в камбаловидной мышце крысы через 6–24 ч HS [83, 90]. При этом наблюдается также усиление аутофагии [90], которая вовлечена в регуляцию структуры нервно-мышечного соединения и является АМРК-зависимым фактором [92].

К настоящему времени накоплены многочисленные доказательства того, что АМРК в скелетных мышцах является не только регулятором процессов метаболизма, транскрипции, аутофагии и др., но играет также важную роль в поддержания структурно-функциональной организации нервно-мышечного соединения [92–94]. Эксперименты с превентивным введением АICAR (5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide, активатор АМРК) позволяют рассматривать АМРК в качестве фармакологической мишени, обладающей терапевтическим потенциалом и препятствующей структурным нарушениям концевой пластинки и развитию симптомов мышечной атрофии [83, 93, 94]. АМРК известен также как важный фактор липидного метаболизма, участвующий в скелетной мышце в регуляции уровня мембранного холестерина [95].

Кроме того, по ряду данных, АМРК обладает способностью активировать Na,K-АТФазу в скелетной мышце [91]. Показано, что при превентивном введении АICAR отсутствует деполяризация сарколеммы камбаловидной мышцы крысы, характерная для HS и обусловленная дисфункцией Na,K-АТФазы [96]. Помимо АМРК, можно рассматривать и другие потенциальные регуляторы Na,K-АТФазы, в частности, оксид азота (NO) [11, 97], являющийся важным сигнальным фактором в условиях функциональной разгрузки скелетной мышцы [98, 99]. Наконец, можно рассматривать β -катенин, ключевой компонент Wnt-зависимого сигнального пути, кото-

рый играет важную роль в формировании нервно-мышечного соединения и за счет взаимодействия с $\alpha 2$ -изоформой Na,K-АТФазы модулирует ее количество, активность и электрогенез скелетных мышечных клеток [100]. Функциональное значение перечисленных регуляторов Na,K-АТФазы в условиях сниженной двигательной активности еще предстоит выяснить.

V. Na,K-АТФаза И КАРДИОТОНИЧЕСКИЕ СТЕРОИДЫ

Внеклеточные участки α -субъединицы Na,K-АТФазы формируют специфический рецептор для ряда лигандов растительного (уабаин, строфантин, дигоксин, дигитоксин и др.), и животного (маринобуфагенин) происхождения [9, 10, 13–15, 18, 101]. Эти лиганды являются специфическими ингибиторами Na,K-АТФазы и в высоких дозах чрезвычайно токсичны. Однако в низких дозах эти лиганды (строфантин, дигоксин) оказывают положительное инотропное действие, благодаря чему широко применяются в клинике сердечно-сосудистых заболеваний. В настоящее время, учитывая сходную стероидную структуру, эти лиганды обычно называют кардиотоническими стероидами (КТС).

По ряду данных, основную роль в реализации положительного инотропного действия КТС в сердечной и гладкой мышцах играет $\alpha 2$ -изоформа Na,K-АТФазы. Предполагается, что это обусловлено особенностями локализации $\alpha 2$ -изоформы в местах тесного прилегания плазматической мембраны к саркоплазматическому ретикулуму, где формируются субклеточные компартменты (микродомены) с ограниченной диффузией [41, 102]. В этих участках $\alpha 2$ -изоформа Na,K-АТФазы тесно компартментализована с Na^+ , Ca^{2+} -обменником, различными Ca^{2+} -каналами и Ca^{2+} -АТФазами. Благодаря этому, при связывании молекул КТС с этим пулом $\alpha 2$ -изоформы за счет ингибирования фермента происходит локальное накопление внутриклеточного Na^+ и сопряженное с ним накопление Ca^{2+} в результате изменения работы Na^+ , Ca^{2+} -обменника. За счет работы SERCA происходит увеличение концентрации Ca^{2+} в саркоплазматическом ретикулуме, что приводит к усилению выброса Ca^{2+} из ретикулума в ответ на приходящий потенциал действия и соответственно к усилению мышечного сокращения. Помимо SERCA в регуляции кальциевого баланса в этих компартментах также могут принимать участие потенциал- и депо-зависимые Ca^{2+} -каналы плазматической мембраны, рианодиновые и IP_3 рецепторы саркоплазматического ретикулума [18, 41, 102].

Хотя способность КТС усиливать сокращения скелетной мышцы также установлена [23, 42], механизм этого эффекта до сих пор остается неизвестным. Однако есть основания предполагать некоторую аналогию с механизмом положительного инотропного действия КТС в сердечной и гладкой мышцах. Действительно, в скелетной мышце триадное соединение между Т-тубулами и концевыми цистернами саркоплазматического ретикулума, где локализованы дигидропиридиновые и рианодиновые рецепторы, Na^+ , Ca^{2+} -обменник, SERCA [103, 104], а также значительный пул $\alpha 2$ -изоформы Na,K-АТФазы [5], можно считать определенным аналогом “PLasmERosome”.

Важно особо отметить, что хотя уабаин является специфическим ингибитором Na,K-АТФазы, ряд данных свидетельствует о способности уабаина в сверхнизких концентрациях активировать Na,K-АТФазу. В течение уже весьма длительного времени обсуждаются самые различные причины этого феномена [105–108], одна-

ко его механизм до сих пор остается неясным. В частности, предполагается, что эффекты убаина, включая активацию $\alpha 1$ -изоформы Na,K-АТФазы, могут быть обусловлены изменением соотношения внутриклеточных концентраций Na^+ и K^+ [108, 109]. Насколько значим такой механизм для мышечных клеток, в которых убаин в наномолярных концентрациях специфически активирует $\alpha 2$ -изоформу Na,K-АТФазы [31, 105], неизвестно. Однако, если предположить, что локальное повышение внутриклеточной концентрации Na^+ в микродомене около молекулы Na,K-АТФазы, оккупированной молекулой КТС, способно активировать расположенные поблизости свободные молекулы Na,K-АТФазы, это могло бы быть механизмом активирующего действия КТС. Для реализации этого эффекта как раз и необходимы условия специфической субклеточной локализации $\alpha 2$ -изоформы Na,K-АТФазы, которые обсуждались выше.

Чувствительность различных изоформ α -субъединицы Na,K-АТФазы к КТС может различаться, но у грызунов это различие выражено в наибольшей степени. У этих животных $\alpha 1$ -изоформа мало чувствительна к убаину (константа блокирования составляет десятки и сотни мкМ), напротив, изоформы $\alpha 2$ - и $\alpha 3$ - высокочувствительны к убаину (константа блокирования составляет десятки и сотни нМ). У других млекопитающих, включая человека, чувствительность $\alpha 1$ -изоформы к убаину лежит в наномолярном диапазоне концентраций [8, 9, 14, 24, 110].

Специфический рецептор к КТС формируют несколько экстраклеточных участков α -субъединицы Na,K-АТФазы [9, 10, 14]. Участок между трансмембранными доменами M1–M2 определяет чувствительность к убаину. Замены аминокислот в позициях 111 и 122 на этом участке позволяют получать генетически модифицированных мышей с измененной чувствительностью к убаину у $\alpha 1$ - и $\alpha 2$ -изоформ Na,K-АТФазы. Таких животных широко используют для изучения функциональной специализации этих изоформ [14], в частности, при изучении их роли в адаптации скелетной мышцы к физической нагрузке [44].

Поскольку α -субъединица Na,K-АТФазы является специфическим рецептором для КТС, было высказано предположение о существовании эндогенных лигандов к этому рецептору. К настоящему времени выделен ряд эндогенных аналогов КТС, также имеющих стероидную структуру, из которых наиболее изучены эндогенные аналоги убаина и маринобуфагенина. Эти циркулирующие лиганды предположительно синтезируются в коре надпочечников, гипоталамусе и гипофизе [8, 9, 13, 15, 18, 101], и их концентрация в крови и цереброспинальной жидкости в норме лежит в субнаномолярном диапазоне. Однако при различных физиологических и патологических процессах [14, 15, 18, 110, 111], в частности, при интенсивной физической активности [44, 112], концентрация этих лигандов может существенно возрастать.

Хотя роль эндогенных КТС в сердечно-сосудистой системе, ЦНС, почках и других органах в норме и патологии интенсивно исследуется [10, 18, 41, 47, 113–116], сравнительно мало известно об их возможной функции в скелетных мышцах, содержащих один из самых больших пулов Na,K-АТФазы. К настоящему времени продемонстрирована способность убаина в наномолярных концентрациях стимулировать синтез гликогена, что предполагает возможность такого механизма регуляции в скелетной мышце [11, 43]. В опытах на культуре скелетных мышечных клеток человека была показана регуляция наномолярными концентрациями убаина секреции IL-6, а также модуляция IL-6/STAT3-сигнальных путей, осуществляемая

через убаин-чувствительную $\alpha 1$ -изоформу Na,K-АТФазы [45]. В опытах с применением антител, связывающих циркулирующие КТС, было показано, что физиологическая роль эндогенного убаина и $\alpha 2$ -изоформы Na,K-АТФазы может заключаться в динамической адаптации скелетной мышцы к физической нагрузке [44]. Опыты с хроническим введением крысам убаина, вдвое повышающим уровень убаина в крови, показали, что циркулирующий убаин способен модулировать электрогенез диафрагмальной мышцы через активацию $\alpha 2$ -изоформы Na,K-АТФазы, и эффект может развиваться без каких-либо экспрессионных изменений данного белка. Предположительно, такая модуляция может иметь протективное значение в условиях нарушения мышечного электрогенеза при двигательной дисфункции [31, 96].

В настоящее время интенсивно изучается участие эндогенных КТС в механизмах регуляции, реализуемых через так называемую сигнальную функцию Na,K-АТФазы. Предполагается существование двух пулов Na,K-АТФазы, один из которых функционирует как ионный насос. Другой пул, преимущественно локализованный в кавеолах, образует молекулярный комплекс с EGFR и Src-киназой [17, 20] и участвует в мембранной и внутриклеточной сигнальной трансдукции. Выявлен участок α -субъединицы (так называемая NaKtide последовательность), отвечающий за реализацию сигнальной функции Na,K-АТФазы и предположительно специфичный для $\alpha 1$ -изоформы Na,K-АТФазы [20]. Предполагается, что связывание молекулы КТС с комплексом $\alpha 1$ Na,K-АТФаза/Src вызывает конформационные изменения, которые запускают ряд сигнальных внутриклеточных каскадов (ERK1/2 и др.), влияющих на процессы апоптоза, пролиферацию, синтез белка, сократительные свойства, оказывающих нейропротекторное действие и др. [9, 17, 18, 20, 114]. Роль Src-киназы в скелетной мышце изучена недостаточно. В опытах на скелетных мышечных клетках человека показана возможность Src-зависимой регуляции синтеза гликогена наномолярными концентрациями убаина [11, 43] и обсуждается участие Src-киназы в реализации сигнальной функции убаин-чувствительной $\alpha 1$ -изоформы Na,K-АТФазы [45]. Участие $\alpha 2$ - и $\alpha 3$ -изоформ в сигнальной трансдукции поддается сомнению [20, 21].

VI. ПЕРСПЕКТИВЫ

Проведенный нами анализ позволяет высказать некоторые предположения относительно перспектив дальнейших исследований функциональной пластичности $\alpha 2$ -изоформы Na,K-АТФазы. В опытах на экспериментальных моделях миодистрофии Дюшенна и дисферлинопатии, а также в условиях моделирования гравитационной разгрузки, различающихся молекулярными механизмами двигательной дисфункции, выявлены специфические нарушения функционирования $\alpha 2$ -изоформы Na,K-АТФазы, сопровождающиеся перераспределением мембранного холестерина [26, 36, 56]. Перспективным представляется продолжение этих исследований с использованием других моделей нарушений двигательной активности. В частности, модели бокового амиотрофического склероза (Amyotrophic Lateral Sclerosis, ALS) – заболевания, характеризующегося дегенерацией и гибелью мотонейронов, что приводит к денервации и атрофии скелетных мышц. Изоформ-специфичность функционирования Na,K-АТФазы и состояние липид-упорядоченной фазы плазматической мембраны при ALS не исследованы. Одной из моделей ALS может служить линия трансгенных мышей FUS1-513 с эктопной нейроспецифической экспрессией укороченного гена FUS человека [117].

Известно, что нарушение функционирования Na,K-АТФазы является одним из самых ранних ответов на гипоксию [118]. В скелетной мышце гипоксия также вызывает существенные функциональные нарушения [119]. Хотя и имеются данные о деполяризации мышечных волокон при гипоксии, предположительно обусловленные нарушением функции Na,K-АТФазы [120], изоформ-специфичность этих нарушений до сих пор не исследована. Новейшие данные свидетельствуют о терапевтическом потенциале циркулирующих КТС [31, 115, 116]. Эндогенный убаин, повышение уровня которого выявлено при экспериментальной гипоксии у крыс [121], а также Na,K-АТФаза рассматриваются в качестве возможных факторов адаптации к высокогорью и гипоксии [13, 122]. В связи с вышесказанным использование модели гипоксии представляется перспективным для дальнейшего анализа функциональной пластичности $\alpha 2$ -изоформы Na,K-АТФазы.

Нарушение гомеостаза глюкозы, при котором уровень глюкозы в крови превышает нормальный (гипергликемия), является преддиабетическим состоянием. Это происходит в результате нарушения стимулируемой инсулином утилизации глюкозы. Существует корреляция между количеством/активностью Na,K-АТФазы, экспрессируемой скелетными мышцами, и уровнем глюкозы, механизм которой не вполне ясен [123]. Вовлечение $\alpha 2$ -изоформы Na,K-АТФазы в метаболизм глюкозы, связанный с ожирением, остается предметом изучения [124]. Дальнейшее исследование взаимосвязи между функционированием $\alpha 2$ -изоформы Na,K-АТФазы скелетных мышц и уровнем глюкозы также представляется весьма перспективным.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 18-15-00043).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы – В.В.К. и И.И.К., написание и редактирование манускрипта – В.В.К. и И.И.К.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Sejersted OM, Sjogaard G* (2000) Dynamics and consequences of potassium shifts in skeletal muscle and heart during exercise. *Physiol Rev* 80: 1411–1481. <https://doi.org/10.1152/physrev.2000.80.4.1411>
2. *Clausen T* (2003) Na^+ – K^+ pump regulation and skeletal muscle contractility. *Physiol Rev* 83: 1269–1324. <https://doi.org/10.1152/physrev.00011.2003>
3. *Clausen T* (2013) Quantification of Na^+ , K^+ pumps and their transport rate in skeletal muscle: Functional significance. *J Gen Physiol* 142: 327–345. <https://doi.org/10.1085/jgp.201310980>
4. *Clausen T* (2015) Excitation of skeletal muscle is a self-limiting process, due to run-down of Na^+ , K^+ gradients, recoverable by stimulation of the Na^+ , K^+ pumps. *Physiol Rep* 3(4): e12373. <https://doi.org/10.14814/phy2.12373>
5. *DiFranco M, Hakimjavadi H, Lingrel JB, Heiny JA* (2015) Na,K-ATPase $\alpha 2$ activity in mammalian skeletal muscle T-tubules is acutely stimulated by extracellular K^+ . *J Gen Physiol* 146: 281–294. <https://doi.org/10.1085/jgp.201511407>
6. *Matyushkin DP, Krivoi II, Drabkina TM* (1995) Synaptic feed-backs mediated by potassium ions. *Gen Physiol Biophys* 14: 369–381.

7. Skou JC (1957) The influence of some cations on an adenosine triphosphatase from peripheral nerves. *Biochim Biophys Acta* 23: 394–401.
[https://doi.org/10.1016/0006-3002\(57\)90343-8](https://doi.org/10.1016/0006-3002(57)90343-8)
8. Blanco G, Mercer RW (1998) Isozymes of the Na-K-ATPase: Heterogeneity in structure, diversity in function. *Am J Physiol* 275: F633–F655.
<https://doi.org/10.1152/ajprenal.1998.275.5.F633>
9. Mijatovic T, Van Quaquebeke E, Delest B, Debeir O, Darro F, Kiss R (2007) Cardiotonic steroids on the road to anti-cancer therapy. *Biochim Biophys Acta* 1776: 32–57.
<https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2007.06.002>
10. Bagrov AY, Shapiro JJ, Fedorova OV (2009) Endogenous cardiotonic steroids: Physiology, pharmacology, and novel therapeutic targets. *Pharmacol Rev* 61: 9–38.
<https://doi.org/10.1124/pr.108.000711>
11. Pirkmajer S, Chibalin AV (2016) Na,K-ATPase regulation in skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 311(1): E1–E31.
<https://doi.org/10.1152/ajpendo.00539.2015>
12. Clausen MV, Hilbers F, Poulsen H (2017) The Structure and Function of the Na,K-ATPase Isoforms in Health and Disease. *Front Physiol* 8: 371.
<https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00371>
13. Blaustein MP (1993) Physiological effects of endogenous ouabain: control of intracellular Ca^{2+} stores and cell responsiveness. *Am J Physiol Cell Physiol* 264: C1367–C1387.
<https://doi.org/10.1152/ajpcell.1993.264.6.C1367>
14. Lingrel JB (2010) The physiological significance of the cardiotonic steroid/ouabain-binding site of the Na,K-ATPase. *Annu Rev Physiol* 72: 395–412.
<https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-021909-135725>
15. Blaustein MP, Hamlyn JM (2020) Ouabain, Endogenous Ouabain and Ouabain-like Factors: The Na^{+} Pump/Ouabain Receptor, its linkage to NCX, and its Myriad Functions. *Cell Calcium* 102159.
<https://doi.org/10.1016/j.ceca.2020.102159>
16. Matchkov VV, Krivoi II (2016) Specialized functional diversity and interactions of the Na,K-ATPase. *Front Physiol* 7: 179.
<https://doi.org/10.3389/fphys.2016.00179>
17. Xie Z, Askari A (2002) Na^{+}/K^{+} -ATPase as a signal transducer. *Eur J Biochem* 269: 2434–2439.
<https://doi.org/10.1046/j.1432-1033.2002.02910.x>
18. Schoner W, Scheiner-Bobis G (2007) Endogenous and exogenous cardiac glycosides and their mechanisms of action. *Am J Cardiovasc Drugs* 7: 173–189.
<https://doi.org/10.2165/00129784-200707030-00004>
19. Reinhard L, Tidow H, Clausen MJ, Nissen P (2013) Na^{+},K^{+} -ATPase as a docking station: protein-protein complexes of the Na^{+},K^{+} -ATPase. *Cell Mol Life Sci* 70: 205–222.
<https://doi.org/10.1007/s00018-012-1039-9>
20. Cui X, Xie Z (2017) Protein Interaction and Na/K-ATPase-Mediated Signal Transduction. *Molecules* 22: 990.
<https://doi.org/10.3390/molecules22060990>
21. Yu H, Cui X, Zhang J, Xie JX, Banerjee M, Pierre SV, Xie Z (2018) Heterogeneity of signal transduction by Na-K-ATPase alpha-isoforms: role of Src interaction. *Am J Physiol Cell Physiol* 314: C202–C210.
<https://doi.org/10.1152/ajpcell.00124.2017>
22. Orłowski J, Lingrel JB (1988) Tissue-specific and developmental regulation of rat Na,K-ATPase catalytic α isoform and β subunit mRNAs. *J Biol Chem* 263: 10436–10442.
[https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)81535-1](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)81535-1)
23. He S, Shelly DA, Moseley AE, James PF, James JH, Paul RJ, Lingrel JB (2001) The $\alpha 1$ - and $\alpha 2$ -isoforms of Na-K-ATPase play different roles in skeletal muscle contractility. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 281: R917–R925.
<https://doi.org/10.1152/ajpregu.2001.281.3.R917>
24. Cherniavsky Lev M, Karlish SJ, Garty H (2015) Cardiac glycosides induced toxicity in human cells expressing $\alpha 1$ -, $\alpha 2$ -, or $\alpha 3$ -isoforms of Na-K-ATPase. *Am J Physiol Cell Physiol* 309: C126–C135.
<https://doi.org/10.1152/ajpcell.00089.2015>
25. Radzyukevich TL, Neumann JC, Rindler TN, Oshiro N, Goldhamer DJ, Lingrel JB, Heiny JA (2013) Tissue-specific role of the Na,K-ATPase $\alpha 2$ isozyme in skeletal muscle. *J Biol Chem* 288: 1226–1237.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M112.424663>
26. Kravtsova VV, Petrov AM, Matchkov VV, Bouzinova EV, Vasiliev AN, Benziane B, Zefirov AL, Chibalin AV, Heiny JA, Krivoi II (2016) Distinct $\alpha 2$ Na,K-ATPase membrane pools are differently

- involved in early skeletal muscle remodeling during disuse. *J Gen Physiol* 147: 175–188.
<https://doi.org/10.1085/jgp.201511494>
27. *Kutz LC, Mukherji ST, Wang X, Bryant A, Larre I, Heiny JA, Lingrel JB, Pierre SV, Xie Z* (2018) Isoform-specific role of Na/K-ATPase $\alpha 1$ in skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 314(6): E620–E629.
<https://doi.org/10.1152/ajpendo.00275.2017>
 28. *Krivoi I, Vasiliev A, Kravtsova V, Dobretsov M, Mandel F* (2003) Porcine kidney extract contains factor(s) that inhibit the ouabain-sensitive isoform of Na,K-ATPase ($\alpha 2$) in rat skeletal muscle: A convenient electrophysiological assay. *Ann NY Acad Sci* 986: 639–641.
<https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2003.tb07272.x>
 29. *Radzyukevich TL, Moseley AE, Shelly DA, Redden GA, Behbehani MM, Lingrel JB, Paul RJ, Heiny JA* (2004) The Na,K-ATPase $\alpha 2$ subunit isoform modulates contractility in the perinatal mouse diaphragm. *Am J Physiol Cell Physiol* 287: C1300–C1310.
<https://doi.org/10.1152/ajpcell.00231.2004>
 30. *Heiny JA, Kravtsova VV, Mandel F, Radzyukevich TL, Benziane B, Prokofiev AV, Pedersen SE, Chibalin AV, Krivoi II* (2010) The nicotinic acetylcholine receptor and the Na,K-ATPase $\alpha 2$ isoform interact to regulate membrane electrogenesis in skeletal muscle. *J Biol Chem* 285: 28614–28626.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M110.150961>
 31. *Kravtsova VV, Bouzinova EV, Matchkov VV, Krivoi II* (2020) Skeletal Muscle Na,K-ATPase as a Target for Circulating Ouabain. *Int J Mol Sci* 21: 2875.
<https://doi.org/10.3390/ijms21082875>
 32. *Cornelius F, Habeck M, Kanai R, Toyoshima C, Karlsh SJ* (2015) General and specific lipid-protein interactions in Na,K-ATPase. *Biochim Biophys Acta* 1848: 1729–1743.
<https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2015.03.012>
 33. *Levitan I, Singh DK, Rosenhouse-Dantsker A* (2014) Cholesterol binding to ion channels. *Front Physiol* 5: 65.
<https://doi.org/10.3389/fphys.2014.00065>
 34. *Krivoi II, Petrov AM* (2019) Cholesterol and the Safety Factor for Neuromuscular Transmission. *Int J Mol Sci* 20: 1046.
<https://doi.org/10.3390/ijms20051046>
 35. *Wyckelsma VL, McKenna MJ* (2016) Effects of Age on Na⁺,K⁺-ATPase Expression in Human and Rodent Skeletal Muscle. *Front Physiol* 7: 316.
<https://doi.org/10.3389/fphys.2016.00316>
 36. *Kravtsova VV, Bouzinova EV, Chibalin AV, Matchkov VV, Krivoi II* (2020) Isoform-Specific Na,K-ATPase and Membrane Cholesterol Remodeling in the Motor Endplates in Distinct Mouse Models of Myodystrophy. *Am J Physiol Cell Physiol* 318: C1030–C1041.
<https://doi.org/10.1152/ajpcell.00453.2019>
 37. *Guo Q, Mi X, Sun X, Li X, Fu W, Xu S, Wang Q, Arfat Y, Wang H, Chang H, Gao Y* (2017) Remarkable plasticity of Na⁺,K⁺-ATPase, Ca²⁺-ATPase and SERCA contributes to muscle disuse atrophy resistance in hibernating Daurian ground squirrels. *Sci Rep* 7: 10509.
<https://doi.org/10.1038/s41598-017-10829-6>
 38. *Shenkman BS, Kozlovskaya IB* (2019) Cellular Responses of Human Postural Muscle to Dry Immersion. *Front Physiol* 10: 187.
<https://doi.org/10.3389/fphys.2019.00187>
 39. *Shenkman BS* (2020) How Postural Muscle Senses Disuse? Early Signs and Signals. *Int J Mol Sci* 21: 5037.
<https://doi.org/10.3390/ijms21145037>
 40. *Vilchinskaya NA, Krivoi II, Shenkman BS* (2018) AMP-Activated Protein Kinase as a Key Trigger for the Disuse-Induced Skeletal Muscle Remodeling. *Int J Mol Sci* 19: 3558.
<https://doi.org/10.3390/ijms19113558>
 41. *Blaustein MP, Chen L, Hamlyn JM, Leenen FH, Lingrel JB, Wier WG, Zhang J* (2016) Pivotal role of $\alpha 2$ Na⁺ pumps and their high affinity ouabain binding site in cardiovascular health and disease. *J Physiol* 594: 6079–6103.
<https://doi.org/10.1113/JP272419>
 42. *Krivoi II, Drabkina TM, Kravtsova VV, Vasiliev AN, Vashchinkina EV, Prokofiev AV, Kubasov IV* (2006) Role of the Na⁺,K⁺-ATPase $\alpha 2$ isoform in the positive inotropic effect of ouabain and marinobufagenin in the rat diaphragm. *Biophysics* 51: 799–804.
<https://doi.org/10.1134/S0006350906050228>
 43. *Kotova O, Al-Khalili L, Talia S, Hooke C, Fedorova OV, Bagrov AY, Chibalin AV* (2006) Cardio-tonic steroids stimulate glycogen synthesis in human skeletal muscle cells via a Src- and ERK1/2-dependent mechanism. *J Biol Chem* 281: 20085–20094.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M601577200>

44. *Radzyukevich TL, Lingrel JB, Heiny JA* (2009) The cardiac glycoside binding site on the Na,K-ATPase $\alpha 2$ isoform plays a role in the dynamic regulation of active transport in skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci USA* 106: 2565–2570.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0804150106>
45. *Pirkmajer S, Bezjak K, Matkovic U, Dolinar K, Jiang LQ, Miš K, Gros K, Milovanova K, Pirkmajer KP, Marš T, Kapilevich L, Chibalin AV* (2020) Ouabain Suppresses IL-6/STAT3 Signaling and Promotes Cytokine Secretion in Cultured Skeletal Muscle Cells. *Front Physiol* 11: 566584.
<https://doi.org/10.3389/fphys.2020.566584>
46. *Hazelwood L, Free RB, Cabrera DM, Skinbjerg M, Sibley DR* (2008) Reciprocal modulation of function between the D1 and D2 dopamine receptors and the Na⁺,K⁺-ATPase. *J Biol Chem* 283(52): 36441–36453.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M805520200>
47. *Sibarov DA, Bolshakov AE, Abushik PA, Krivoi II, Antonov SM* (2012) Na⁺,K⁺-ATPase functionally interacts with the plasma membrane Na⁺,Ca²⁺ exchanger to prevent Ca²⁺ overload and neuronal apoptosis in excitotoxic stress. *J Pharmacol Exp Ther* 343: 596–607.
<https://doi.org/10.1124/jpet.112.198341>
48. *Matos M, Augusto E, Agostinho P, Cunha RA, Chen J-F* (2013) Interaction between adenosine A2A receptors and $\alpha 2$ Na,K-ATPase controlling glutamate uptake in astrocytes. *J Neurosci* 33(47): 18492–18502.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1828-13.2013>
49. *Illarionava NB, Brismar H, Aperia A, Gunnarson E* (2014) Role of Na,K-ATPase $\alpha 1$ and $\alpha 2$ isoforms in the support of astrocyte glutamate uptake. *PLoS One* 9(6): e98469.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0098469>
50. *Akkuratov EE, Westin L, Vazquez-Juarez E, de Marothy M, Melnikova AK, Blom H, Lindskog M, Brismar H, Aperia A* (2020) Ouabain Modulates the Functional Interaction Between Na,K-ATPase and NMDA Receptor. *Mol Neurobiol* 57(10): 4018–4030.
<https://doi.org/10.1007/s12035-020-01984-5>
51. *Krivoi II, Drabkina TM, Kravtsova VV, Vasiliev AN, Eaton MJ, Skatchkov SN, Mandel F* (2006) On the functional interaction between nicotinic acetylcholine receptor and Na⁺,K⁺-ATPase. *Pflugers Arch* 452: 756–765.
<https://doi.org/10.1007/s00424-006-0081-6>
52. *Yskocil F, Nikolsky E, Edwards C* (1983) An analysis of the mechanisms underlying the non-quantal release of acetylcholine at the mouse neuromuscular junction. *Neuroscience* 9(2): 429–435.
[https://doi.org/10.1016/0306-4522\(83\)90305-6](https://doi.org/10.1016/0306-4522(83)90305-6)
53. *Nikolsky EE, Zemkova H, Voronin VA, Yskocil F* (1994) Role of non-quantal acetylcholine release in surplus polarization of mouse diaphragm fibres at the endplate zone. *J Physiol* 477: 497–502.
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.1994.sp020210>
54. *Yskocil F, Malomouzh AI, Nikolsky EE* (2009) Non-quantal acetylcholine release at the neuromuscular junction. *Physiol Res* 58: 763–784.
55. *Chibalin AV, Heiny JA, Benziane B, Prokofiev AV, Vasiliev AN, Kravtsova VV, Krivoi II* (2012) Chronic nicotine exposure modifies skeletal muscle Na,K-ATPase activity through its interaction with the nicotinic acetylcholine receptor and phospholemman. *PLoS One* 7: e33719.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033719>
56. *Petrov AM, Kravtsova VV, Matchkov VV, Vasiliev AN, Zefirov AL, Chibalin AV, Heiny JA, Krivoi II* (2017) Membrane lipid rafts are disturbed in the response of rat skeletal muscle to short-term disuse. *Am J Physiol Cell Physiol* 312: C627–C637.
<https://doi.org/10.1152/ajpcell.00365.2016>
57. *Hezel M, de Groat WC, Galbiati F* (2010) Caveolin-3 promotes nicotinic acetylcholine receptor clustering and regulates neuromuscular junction activity. *Mol Biol Cell* 21(2): 302–310.
<https://doi.org/10.1091/mbc.E09-05-0381>
58. *Prince RJ, Sine SM* (1999) Acetylcholine and epibatidine binding to muscle acetylcholine receptors distinguish between concerted and uncoupled models. *J Biol Chem* 274: 19623–19629.
<https://doi.org/10.1074/jbc.274.28.19623>
59. *Mouroi A, Rodrigo J, Kotzyba-Hibert F, Bertrand S, Bertrand D, Goeldner M* (2006) Probing the Reorganization of the Nicotinic Acetylcholine Receptor during Desensitization by Time-Resolved Covalent Labeling Using [³H]AC₅, a Photoactivatable Agonist. *Mol Pharmacol* 69: 452–461.
<https://doi.org/10.1124/mol.105.017566>
60. *Lester RA, Dani JA* (1995) Acetylcholine receptor desensitization induced by nicotine in rat medial habenula neurons. *J Neurophysiol* 74: 195–206.
<https://doi.org/10.1152/jn.1995.74.1.195>

61. Benowitz NL, Zevin S, Jacob P (1997) Sources of variability in nicotine and cotinine levels with use of nicotine nasal spray, transdermal nicotine, and cigarette smoking. *Br J Clin Pharmacol* 43: 259–267.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2125.1997.00566.x>
62. Larsson L, Orlander J, Ansved T, Edstrom L (1988) Effects of chronic nicotine exposure on contractile enzyme-histochemical and biochemical properties of fast- and slow-twitch muscles in the rat. *Acta Physiol Scand* 134: 519–527.
<https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.1998.tb08526.x>
63. Nakatani T, Nakashima T, Kita T, Ishihara A (2003) Effects of exposure to cigarette smoke at different dose levels on extensor digitorum longus muscle fibres in Wistar-Kyoto and spontaneously hypertensive rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 30: 671–677.
<https://doi.org/10.1046/j.1440-1681.2003.03898.x>
64. Degens H, Gayan-Ramirez G, van Hees HWH (2015) Smoking-induced Skeletal Muscle Dysfunction. From Evidence to Mechanisms. *Am J Respir Crit Care Med* 191(6): 620–625.
<https://doi.org/10.1164/rccm.201410-1830pp>
65. Wang H, Sun X (2005) Desensitized nicotinic receptors in brain. *Brain Res Rev* 48: 420–437.
<https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2004.09.003>
66. Wang L, McComb JG, Weiss MH, McDonough AA, Zlokovic BV (1994) Nicotine downregulates $\alpha 2$ isoform of Na,K-ATPase at the blood-brain barrier and brain in rats. *Biochem Biophys Res Commun* 199: 1422–1427.
<https://doi.org/10.1006/bbrc.1994.1389>
67. Bao H, Sun H, Xiao Y, Zhang Y, Wang X, Xu X, Liu Z, Fang J, Li Z (2015) Functional interaction of nicotinic acetylcholine receptors and Na^+/K^+ ATPase from *Locusta migratoria manilensis* (Meyen). *Sci Rep* 5: 8849.
<https://doi.org/10.1038/sRep08849>
68. Zhu D, Xiong WC, Mei L (2006) Lipid rafts serve as a signaling platform for nicotinic acetylcholine receptor clustering. *J Neurosci* 26: 4841–4851.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2807-05.2006>
69. Willmann R, Pun S, Stallmach L, Sadasivam G, Santos AF, Caroni P, Fuhrer C (2006) Cholesterol and lipid microdomains stabilize the postsynapse at the neuromuscular junction. *EMBO J* 25: 4050–4060.
<https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601288>
70. Brannigan G, LeBard DN, Henin J, Eckenhoff RG, Klein ML (2010) Multiple binding sites for the general anesthetic isoflurane identified in the nicotinic acetylcholine receptor transmembrane domain. *Proc Natl Acad Sci USA* 107(32): 14122–14127.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1008534107>
71. Haviv H, Habeck M, Kanai R, Toyoshima C, Karlsh SJ (2013) Neutral phospholipids stimulate Na,K-ATPase activity: a specific lipid-protein interaction. *J Biol Chem* 288: 10073–10081.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M112.446997>
72. Habeck M, Kapri-Pardes E, Sharon M, Karlsh SJ (2017) Specific phospholipid binding to Na,K-ATPase at two distinct sites. *Proc Natl Acad Sci USA* 114(11): 2904–2909.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1620799114>
73. Zhang J, Li X, Yu H, Larre J, Dube PR, Kennedy DJ, Tang WHW Westfall K, Pierre SV, Xie Z, Chen Y (2020) Regulation of Na/K-ATPase expression by cholesterol: isoform specificity and the molecular mechanism. *Am J Physiol Cell Physiol* 319: C1107–C1119.
<https://doi.org/10.1152/ajpcell.00083.2020>
74. Chen Y, Li X, Ye Q, Tian J, Jing R, Xie Z (2011) Regulation of $\alpha 1$ Na/K-ATPase expression by cholesterol. *J Biol Chem* 286: 15517–15524.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M110.204396>
75. Lijshitz Y, Petrovich E, Haviv H, Goldshleger R, Tal DM, Garty H, Karlsh SJD (2007) Purification of the human $\alpha 2$ isoform of Na,K-ATPase expressed in *Pichia pastoris*. Stabilization by lipids and FXYD1. *Biochemistry* 46: 14937–14950.
<https://doi.org/10.1021/bi701812c>
76. Kapri-Pardes E, Katz A, Haviv H, Mahmoud Y, Ilan M, Khalfin-Penigel I, Carmeli S, Yarden O, Karlsh SJD (2011) Stabilization of the $\alpha 2$ isoform of Na,K-ATPase by mutations in a phospholipid binding pocket. *J Biol Chem* 286: 42888–42899.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M111.293852>
77. Kravtsova VV, Petrov AM, Vasiliev AN, Zefirov AL, Krivoi II (2015) Role of cholesterol in the maintenance of endplate electrogenesis in rat diaphragm. *Bull Exp Biol Med* 158: 298–300.
<https://doi.org/10.1007/s10517-015-2745-8>
78. Boon H, Kostovski E, Pirkmajer S, Song M, Lubarski Iversen PO, Hjeltnes N, Widgren U, Chibalin AV (2012) Influence of chronic and acute spinal cord injury on skeletal muscle Na^+/K^+ -ATPase and phospholemman expression in humans. *Am J Physiol Endocrinol Me-*

- tab 302: E864–E871.
<https://doi.org/10.1152/ajpendo.00625.2011>
79. Perry BD, Levinger P, Morris HG, Petersen AC, Garnham AP, Levinger I, McKenna MJ (2015) The effects of knee injury on skeletal muscle function, Na⁺,K⁺-ATPase content, and isoform abundance. *Physiol Rep* 3: e12294.
<https://doi.org/10.14814/phy2.12294>
80. Kravtsova VV, Timonina NA, Zakir'yanova GF, Sokolova AV, Mikhailov VM, Zefirov AL, Krivoi II (2018) The Structural and Functional Characteristics of the Motor End Plates of Dysferlin-Deficient Mice. *Neurochem J* 12: 305–310.
<https://doi.org/10.1134/S1819712418040049>
81. Kravtsova VV, Bouzjinova EV, Machkov VV, Timonina NA, Zakyrganova GF, Zefirov AL, Krivoi II (2019) Abnormal membrane localization of $\alpha 2$ isoform of Na,K-ATPase in m. soleus of dysferlin-deficient mice. *Bull Exp Biol Med* 166: 593–597.
<https://doi.org/10.1007/s10517-019-04398-z>
82. Bodine SC, Baehr LM (2014) Skeletal muscle atrophy and the E3 ubiquitin ligases MuRF-1 and MAFbx/Atrogin-1. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 307: E469–E484.
<https://doi.org/10.1152/ajpendo.00204.2014>
83. Vilchinskaya NA, Mochalova EP, Nemirovskaya TL, Mirzoev TM, Turtikova OV, Shenkman BS (2017) Rapid decline in MyHC I(β) mRNA expression in rat soleus during hindlimb unloading is associated with AMPK dephosphorylation. *J Physiol* 595: 7123–7134.
<https://doi.org/10.1113/JP275184>
84. Gorza L, Sorge M, Secli L, Brancaccio M (2021) Master Regulators of Muscle Atrophy: Role of Costamere Components. *Cells* 10: 61.
<https://doi.org/10.3390/cells10010061>
85. Kravtsova VV, Matchkov VV, Bouzjinova EV, Vasiliev AN, Razgovorova IA, Heiny JA, Krivoi II (2015) Isoform-specific Na,K-ATPase alterations precede disuse-induced atrophy of rat soleus muscle. *Biomed Res Int* 720172.
<https://doi.org/10.1155/2015/720172>
86. Bryndina IG, Shalagina MN, Protopopov VA, Sekunov AV, Zefirov AL, Zakirjanova GF, Petrov AM (2021) Early Lipid Raft-Related Changes: Interplay between Unilateral Denervation and Hindlimb Suspension. *Int J Mol Sci* 22: 2239.
<https://doi.org/10.3390/ijms22052239>
87. Rudolf R, Khan MM, Labeit S, Deschenes MR (2014) Degeneration of neuromuscular junction in age and dystrophy. *Front Aging Neuroci* 6: 99.
<https://doi.org/10.3389/fnagi.2014.00099>
88. Tintignac LA, Brenner HR, Rüegg MA (2015) Mechanisms regulating neuromuscular junction development and function and causes of muscle wasting. *Physiol Rev* 95: 809–852.
<https://doi.org/10.1152/physrev.00033.2014>
89. Slater CR (2020) “Fragmentation” of NMJs: a sign of degeneration or regeneration? A long journey with many junctions. *Neuroscience* 439: 28–40.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2019.05.017>
90. Chibalin AV, Benziane B, Zakyrganova GF, Kravtsova VV, Krivoi II (2018) Early endplate remodeling and skeletal muscle signaling events following rat hindlimb suspension. *J Cell Physiol* 233: 6329–6336.
<https://doi.org/10.1002/jcp.26594>
91. Pirkmajer S, Petric M, Chibalin AV (2021) The role of AMPK in regulation of Na⁺,K⁺-ATPase in skeletal muscle: does the gauge always plug the sink? *J Muscle Res Cell Motil* 42(1): 77–97.
<https://doi.org/10.1007/s10974-020-09594-3>
92. Carnio S, LoVerso F, Baraibar MA, Longa E, Khan MM, Maffei M, Reischl M, Canepari M, Loeffler S, Kern H, Blaauw B, Friguat B, Bottinelli R, Rudolf R, Sandri M (2014) Autophagy impairment in muscle induces neuromuscular junction degeneration and precocious aging. *Cell Rep* 8: 1509–1521.
<https://doi.org/10.1016/j.celRep.2014.07.061>
93. Cervero C, Montull N, Tarabal O, Piedrafita L, Esquerda JE, Calderó J (2016) Chronic treatment with the AMPK agonist AICAR prevents skeletal muscle pathology but fails to improve clinical outcome in a mouse model of severe spinal muscular atrophy. *Neurotherapeutics* 13: 198–216.
<https://doi.org/10.1007/s13311-015-0399-x>
94. Dial AG, Ng SY, Manta A, Ljubicic V (2018) The Role of AMPK in Neuromuscular Biology and Disease. *Trends Endocrinol Metab* 29: 300–312.
<https://doi.org/10.1016/j.tem.2018.02.010>
95. Ambery AG, Tackett L, Penque BA, Brozinick JT, Elmendorf JS (2017) Exercise training prevents skeletal muscle plasma membrane cholesterol accumulation, cortical actin filament loss, and

- insulin resistance in C57BL/6J mice fed a western-style high-fat diet. *Physiol Rep* 5: e13363. <https://doi.org/10.14814/phy2.13363>
96. *Kravtsova VV, Vilchinskaya NA, Rozlomie VL, Shenkman BS, Krivoi II* (2019) Low Ouabain Doses and AMP-Activated Protein Kinase as Factors Supporting Electrogenesis in Skeletal Muscle. *Biochemistry (Moscow)* 84: 1085–1092. <https://doi.org/10.1134/S0006297919090116>
97. *Juel C* (2016) Nitric oxide and Na,K-ATPase activity in rat skeletal muscle. *Acta Physiol (Oxf)* 216(4): 447–453. <https://doi.org/10.1111/apha.12617>
98. *Vitadello M, Sorge M, Percivalle E, Germinario E, Danieli-Betto D, Turco E, Tarone G, Brancaccio M, Gorza L* (2020) Loss of melusin is a novel, neuronal NO synthase/FoxO3-independent master switch of unloading-induced muscle atrophy. *J Cachexia Sarcopenia Muscle* 11: 802–819. <https://doi.org/10.1002/jcsm.12546>
99. *Sharlo KA, Paramonova II, Lvova ID, Mochalova EP, Kalashnikov VE, Vilchinskaya NA, Tyganov SA, Konstantinova TS, Shevchenko TF, Kalamkarov GR, Shenkman BS* (2021) Plantar Mechanical Stimulation Maintains Slow Myosin Expression in Disused Rat Soleus Muscle via NO-Dependent Signaling. *Int J Mol Sci* 22: 1372. <https://doi.org/10.3390/ijms22031372>
100. *Zhao C, Yu Y, Zhang Y, Shen J, Jiang L, Sheng G, Zhang W, Xu L, Jiang K, Mao S, Jiang P, Gao F* (2019) β -Catenin Controls the Electrophysiologic Properties of Skeletal Muscle Cells by Regulating the $\alpha 2$ Isoform of Na^+/K^+ -ATPase. *Front Neuroci* 13: 831. <https://doi.org/10.3389/fnins.2019.00831>
101. *Doris PA, Bagrov AY* (1998) Endogenous sodium pump inhibitors and blood pressure regulation: an update on recent progress. *Proc Soc Exp Biol Med* 218: 156–167. <https://doi.org/10.3181/00379727-218-44283>
102. *Blaustein MP, Golovina VA* (2001) Structural complexity and functional diversity of endoplasmic reticulum Ca^{2+} stores. *Trends Neurosci* 24: 602–608. [https://doi.org/10.1016/S0166-2236\(00\)01891-9](https://doi.org/10.1016/S0166-2236(00)01891-9)
103. *Sacchetto R, Margreth A, Pelosi M, Carafoli E* (1996) Colocalization of the dihydropyridine receptor, the plasma-membrane calcium ATPase isoform 1 and the sodium/calcium exchanger to the junctional membrane domain of transverse tubules of rabbit skeletal muscle. *Eur J Biochem* 237: 483–488.
104. *Altamirano F, Eltit JM, Robin G, Linares N, Ding X, Pessah IN, Allen PD, López JR* (2014) Ca^{2+} influx via the $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger is enhanced in malignant hyperthermia skeletal muscle. *J Biol Chem* 289: 19180–19190. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.550764>
105. *Gao J, Wymore RS, Wang Y, Gaudette GR, Krukenkamp IB, Cohen IS, Mathias RT* (2002) Isoform-specific stimulation of cardiac Na/K pumps by nanomolar concentrations of glycosides. *J Gen Physiol* 119: 297–312. <https://doi.org/10.1085/jgp.20028501>
106. *Holthouser KA, Mandal A, Merchant ML, Schelling JR, Delamere NA, Valdes RR Jr, Tyagi SC, Lederer ED, Khundmiri SJ* (2010) Ouabain stimulates Na-K-ATPase through a sodium/hydrogen exchanger-1 (NHE-1)-dependent mechanism in human kidney proximal tubule cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 299: F77–F90. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00581.2009>
107. *Ketchem CJ, Conner CD, Murray RD, DuPlessis M, Lederer ED, Wilkey D, Merchant M, Khundmiri SJ* (2016) Low dose ouabain stimulates Na-K ATPase $\alpha 1$ subunit association with angiotensin II type 1 receptor in renal proximal tubule cells. *Biochim Biophys Acta* 1863: 2624–2636. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2016.07.008>
108. *Tverskoi AM, Sidorenko SV, Klimanova EA, Akimova OA, Smolyaninova LV, Lopina OD, Orlov SN* (2016) Effects of ouabain on proliferation of human endothelial cells correlate with Na^+/K^+ -ATPase activity and intracellular ratio of Na^+ and K^+ . *Biochemistry (Moscow)* 81: 876–883. <https://doi.org/10.1134/S0006297916080083>
109. *Orlov SN, Klimanova EA, Tverskoi AM, Vladychenskaya EA, Smolyaninova LV, Lopina OD* (2017) Na^+/K^+ -Dependent and -Independent Signaling Triggered by Cardiotoxic Steroids: Facts and Artifacts. *Molecules* 22: 635. <https://doi.org/10.3390/molecules22040635>
110. *Dobretsov M, Stimers JR* (2005) Neuronal function and alpha3 isoform of the Na/K-ATPase. *Front Biosci* 10: 2373–2396. <https://doi.org/10.2741/1704>
111. *Khalaf FK, Dube P, Mohamed A, Tian J, Malhotra D, Haller ST, Kennedy DJ* (2018) Cardio-tonic steroids and the sodium trade balance: new insights into trade-off mechanisms mediated

- by the Na^+/K^+ -ATPase. *Int J Mol Sci* 19: 2576.
<https://doi.org/10.3390/ijms19092576>
112. *Bauer N, Müller-Ehmsen J, Krämer U, Hambarchian N, Zobel C, Schwinger RH Neu H, Kirch U, Grünbaum EG, Schoner W* (2005) Ouabain-like compound changes rapidly on physical exercise in humans and dogs: Effects of β -blockade and angiotensin-converting enzyme inhibition. *Hypertension* 45: 1024–1028.
<https://doi.org/10.1161/01.HYP.0000165024.47728.f7>
 113. *Hamlyn JM, Manunta P* (2015) Endogenous cardiotoxic steroids in kidney failure: A review and an hypothesis. *Adv Chronic Kidney Dis* 22: 232–244.
<https://doi.org/10.1053/j.ackd.2014.12.005>
 114. *Lichtstein D, Ilani A, Rosen H, Horesh N, Singh SV, Buzaglo N, Hodes A* (2018) Na^+/K^+ -ATPase Signaling and Bipolar Disorder. *Int J Mol Sci* 19: 2314.
<https://doi.org/10.3390/ijms19082314>
 115. *Markov AG, Fedorova AA, Kravtsova VV, Bikmurzina AE, Okorokova LS, Matchkov VV, Corneliu V, Amasheh S, Krivoi I I* (2020) Circulating Ouabain Modulates Expression of Claudins in Rat Intestine and Cerebral Blood Vessels. *Int J Mol Sci* 21: 5067.
<https://doi.org/10.3390/ijms21145067>
 116. *Agalakova NI, Kolodkin NI, Adair CD, Trashkov AP, Bagrov AY* (2021) Preeclampsia: Cardio-tonic Steroids, Fibrosis, Fli1 and Hint to Carcinogenesis. *Int J Mol Sci* 22: 1941.
<https://doi.org/10.3390/ijms22041941>
 117. *Shelkovnikova TA, Peters OM, Deykin AV, Connor-Robson N, Robinson H, Ustyugov AA, Bachurin SO, Ermolkevich TG, Goldman IL, Saadchikova ER, Kovrazhkina EA, Skvortsova VI, Ling SC, Da Cruz S, Parone PA, Buchman VL, Ninkina NN* (2013) Fused in sarcoma (FUS) protein lacking nuclear localization signal (NLS) and major RNA binding motifs triggers proteinopathy and severe motor phenotype in transgenic mice. *J Biol Chem* 288: 25266–25274.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M113.492017>
 118. *Bogdanova A, Petrushanko IY, Hernansanz-Agustin P, Martínez-Ruiz A* (2016) “Oxygen Sensing” by Na^+/K^+ -ATPase: These Miraculous Thiols. *Front Physiol* 7: 314.
<https://doi.org/10.3389/fphys.2016.00314>
 119. *Chuang C-C, Zhou T, Olfert IM, Zuo L* (2018) Hypoxic Preconditioning Attenuates Reoxygenation-Induced Skeletal Muscle Dysfunction in Aged Pulmonary TNF- α Overexpressing Mice. *Front Physiol* 9: 1720.
<https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01720>
 120. *Yskocil F, Di Gregorio F, Gorio A* (1985) The facilitating effect of gangliosides on the electrogenic (Na^+/K^+) pump and on the resistance of the membrane potential to hypoxia in neuromuscular repair. *Pflugers Arch* 403: 1–6.
<https://doi.org/10.1007/BF00583273>
 121. *De Angelis C, Hauptert GT Jr* (1998) Hypoxia triggers release of an endogenous inhibitor of Na^+/K^+ -ATPase from midbrain and adrenal. *Am J Physiol* 274: F182–F188.
<https://doi.org/10.1152/ajprenal.1998.274.1.F182>
 122. *Lewis P, O'Halloran KD* (2016) Diaphragm Muscle Adaptation to Sustained Hypoxia: Lessons from Animal Models with Relevance to High Altitude and Chronic Respiratory Diseases. *Front Physiol* 7: 623.
<https://doi.org/10.3389/fphys.2016.00623>
 123. *Iannello S, Milazzo P, Belfiore F* (2007) Animal and human tissue Na^+/K^+ -ATPase in normal and insulin-resistant states: regulation, behaviour and interpretative hypothesis on NEFA effects. *Obes Rev* 8: 231–251.
<https://doi.org/10.1111/j.1467-789X.2006.00276.x>
 124. *Kawakami K, Onaka T, Iwase M, Homma I, Ikeda K* (2005) Hyperphagia and obesity in Na^+/K^+ -ATPase $\alpha 2$ subunit-defective mice. *Obes Res* 13: 1661–1671.
<https://doi.org/10.1038/oby.2005.204>

Molecular and Functional Heterogeneity of Na^+/K^+ -ATPase in the Skeletal Muscle

V. V. Kravtsova^a and I. I. Krivoi^{a,*}

^aSt. Petersburg State University, St. Petersburg, Russia

*e-mail: iikrivoi@gmail.com

Na^+/K^+ -ATPase activity is critical for maintaining electrogenesis, contractile function and skeletal muscle performance. This review is devoted to the analysis of the results of

recent studies in the field of molecular and functional diversity of Na,K-ATPase in skeletal muscle, co-expressing $\alpha 1$ and $\alpha 2$ isoforms of the catalytic and transport α subunit of Na,K-ATPase. The problems that seem to be the most promising from the point of view of their further development are considered. The accumulated facts indicate that, in contrast to the $\alpha 1$ isoform, which demonstrates functional stability, the $\alpha 2$ isoform is distinguished by a high degree of plasticity, which is due to its specific membrane localization, functional and molecular interactions with the protein and lipid environment, as well as the peculiarities of regulation by various factors. Functional disorders of the $\alpha 2$ isoform of Na,K-ATPase are among the most common signs characteristic of both chronic and short-term forms of motor dysfunction.

Keywords: Na,K-ATPase, isoforms, nicotinic acetylcholine receptor, lipid microdomains, cardiotonic steroids, signaling function, motor activity

ОБЗОРНЫЕ
И ПРОБЛЕМНЫЕ СТАТЬИ

**САТЕЛЛИТНЫЕ КЛЕТКИ СКЕЛЕТНЫХ МЫШЦ
В УСЛОВИЯХ ГРАВИТАЦИОННОЙ РАЗГРУЗКИ**

© 2021 г. Н. А. Вильчинская¹*, Б. С. Шенкман¹

¹*Институт медико-биологических проблем РАН, Москва, Россия*

**E-mail: Vilchinskayanatalia@gmail.com*

Поступила в редакцию 15.02.2021 г.

После доработки 11.03.2021 г.

Принята к публикации 14.03.2021 г.

Как известно, скелетная мышца обладает высокой степенью пластичности. Гравитационная разгрузка оказывает глубокое влияние на структурно-функциональную организацию постуральных мышц. Скелетные мышцы обладают уникальной способностью восстанавливаться при повреждении. Восстановление мышц (регенерация) осуществляется с помощью сателлитных клеток. Миосателлиты – это покоящиеся одноядерные клетки (фаза G0 клеточного цикла), расположенные на периферии мышечного волокна. При повреждении мышц происходит активация сателлитных клеток, они вступают в пролиферацию и дают начало новым сателлитным клеткам и миообластам. Дифференцированные миообласты могут сливаться с мышечными волокнами при гипертрофии и регенерации мышечной ткани и друг с другом, формируя новые мышечные волокна. Исследования влияния гравитационной разгрузки на состояние мышечных сателлитных клеток малочисленны. В настоящем обзоре рассматривается влияние гравитационной разгрузки на механизмы регенерации скелетных мышц при их повреждении и состояние пула мышечных сателлитных клеток. На основе данных литературы авторы обнаружили, что механизмы, лежащие в основе изменения регенераторного потенциала мышц при действии гравитационной разгрузки, мало изучены. Авторы подчеркивают необходимость дальнейших исследований регенераторного потенциала сателлитных клеток в условиях микрогравитации.

Ключевые слова: сателлитные клетки мышц, гравитационная разгрузка, регенерация

DOI: 10.31857/S0869813921060145

Скелетные мышцы составляют примерно 40% массы тела взрослого человека и состоят из многоядерных сократительных клеток – мышечных волокон. Их формирование происходит в процессе эмбриогенеза путем слияния мезодермальных клеток предшественников. Пополнение пула миофибрилл продолжается в течение всей жизни путем их дифференцировки из сателлитных клеток [1–4]. Скелетная мышца обладает уникальным свойством восстанавливаться после повреждения. Регенерация мышцы возможна благодаря наличию мышечных сателлитных клеток [5–7]. Миосателлиты составляют около 2–5% от всех ядер скелетных мышц. Миосателлиты – маленькие одноядерные клетки, расположенные на периферии мышечного волокна. Сателлитные клетки находятся в фазе G0 клеточного цикла до момента активации. При активации сателлитные клетки вступают в пролиферацию и дают начало новым сателлитным клеткам и миообластам. При гипертрофии и регенерации мышечной ткани дифференцированные миообласты сливаются с мы-

щечными волокнами (являясь необходимым источником миоядер в постэмбриональном развитии) [8] и/или друг с другом, формируя новые мышечные волокна [9]. Миосателлиты являются основным источником регенерации поперечнополосатой мышечной ткани.

Скелетные мышцы являются одним из наиболее пластичных органов, который способен менять структуру и метаболизм в зависимости от предлагаемого режима сократительной активности. При действии гравитационной разгрузки происходит перестройка структуры и функции волокон постуральных мышц [10]. В частности, наблюдается снижение интенсивности синтеза белка, активация протеолитических процессов, что приводит к уменьшению белковой массы и снижению размеров мышечных волокон [11, 12]. При повреждении мышц в условиях гравитационной разгрузки происходит ослабление их регенеративного потенциала и замедляется процесс восстановления [13].

На сегодняшний день чрезвычайно мало известно о механизмах, лежащих в основе снижения регенеративного потенциала мышц в условиях гравитационной разгрузки. В настоящем обзоре будут рассматриваться механизмы регенерации скелетных мышц при их повреждении и состояние пула мышечных сателлитных клеток при действии гравитационной разгрузки.

САТЕЛЛИТНЫЕ КЛЕТКИ МЫШЦ. РАСПРОСТРАНЕНИЕ МИОСАТЕЛЛИТОВ В РАЗЛИЧНЫХ ТИПАХ МЫШЦ

Около 60 лет назад с помощью электронного микроскопа впервые была описана особая популяция одноядерных клеток в мышечном волокне лягушки. Из-за своего расположения на границе базальной мембраны мышечного волокна и окружающего его внеклеточного матрикса эти клетки были названы сателлитными [14].

На начальном этапе исследований сателлитные клетки определяли и характеризовали только с применением электронной микроскопии на основе их расположения между сарколеммой и базальной мембраной зрелого мышечного волокна, присущего этим клеткам увеличения объема ядер относительно цитоплазмы и повышенного содержания гетерохроматина [14, 15]. За последние 20 лет был идентифицирован широкий круг специфических молекулярных маркеров, позволяющий определять сателлитные клетки [16, 17]. Часть этих маркеров располагается внутри клетки и представляют собой транскрипционные факторы, такие как *PAX7*, *PAX3*, *Barx2*, *Myf5* и белки ядерной мембраны *lamin A/C (LMNA)* и *emerin (EMD)*. Другие маркеры локализованы на поверхности клеточной мембраны: синдекан 3 и 4, мышечный М-кадгерин, рецептор *c-Met*, *a7-* и *b1-*интегрины, *NCAM1*, *VCAM1* и *CD34* [7, 16–18].

Скелетные мышцы отличаются по количеству содержащихся в них сателлитных клеток [3, 19–22]. Ранее показали, что в медленных мышечных волокнах содержится большее количество сателлитных клеток по сравнению с быстрыми. В камбаловидной мышце крыс и мышей содержится в 2–3 раза больше сателлитных клеток, чем в быстрых *m. tibialis anterior* и *m. extensor digitorum longus* [16, 23]. Количество сателлитных клеток в мышцах меняется на протяжении жизни. В исследованиях на мышцах было показано, что наиболее высокие концентрации сателлитных клеток наблюдаются сразу после рождения, а через 2 месяца их количество значительно снижено [3].

ГЕТЕРОГЕННОСТЬ ПОПУЛЯЦИИ САТЕЛЛИТНЫХ КЛЕТОК

Изначально считалось, что сателлитные клетки представляют собой однородную популяцию комитированных клеток предшественников – миобластов [24]. Более поздние исследования показали, что популяция сателлитных клеток неоднородна, сателлитные клетки различаются по набору экспрессируемых генов, по способности к немиогенной дифференцировке, по наличию признаков стволовых клеток (т.е. способности давать начало новым сателлитным клеткам и комитированным прогениторным клеткам).

Известно, что сателлитные клетки обладают некоторой пластичностью и потенциально могут дифференцироваться в мультипотентные мезенхимальные клетки-предшественники. При культивировании *in vitro* сателлитных клеток, выделенных из одиночных мышечных волокон, наблюдается их спонтанная дифференцировка в миоциты, адипоциты и остециты [16]. В работах *in vitro* на клетках C2C12 и сателлитных клетках мышц мышей было показано, что применение специфических химических агентов приводит к дифференцировке этих клеток в остециты или адипоциты [25–27].

Белки PAX3 и PAX7 экспрессируются в ядрах сателлитных клеток. В миосателлитах взрослых животных постоянно экспрессируется PAX7 в то время, как только небольшая популяция сателлитных клеток экспрессирует Pax3 [28, 29]. Сателлитные клетки, экспрессирующие Pax3, обнаруживаются только в определенных типах скелетных мышц (диафрагме), при этом экспрессия Pax3 никак не коррелирует с эмбриональным происхождением этих мышц, типом мышечных волокон в их составе и иннервирующими их мотонейронами.

Исследование экспрессии маркеров сателлитных клеток CD34, M-cadherin и Myf5 с помощью методов иммунофлуоресцентного окрашивания показало наличие субпопуляции сателлитных клеток не экспрессирующих эти маркеры [30]. В сателлитных клетках человека наблюдается неоднородность экспрессии Pax7, молекул адгезии нейрональных клеток (NCAM), c-Met и Dlk1 [31].

В одном из исследований была обнаружена небольшая популяция сателлитных клеток, характеризующихся экспрессией поверхностных маркеров Sca-1 и CD-45, которые обычно не экспрессируются в миосателлитах [32]. Пул этих клеток был назван клетками сторонней популяции, он образуется от некоммитированных мезенхимальных клеток-предшественников костного мозга. Клетки сторонней популяции вовлечены в процессы регенерации мышцы после повреждения и трансплантации, участвуют в формировании миоцитов и пополнении пула сателлитных клеток [5, 33, 34].

В 2017 г. был обнаружен особый тип прогениторных клеток, присущий быстрым мышечным волокнам. Это мезенхимальные клетки-предшественники, экспрессирующие транскрипционный фактор Twist2 (Tw2) и расположенные снаружи мышечного волокна. Клетки Tw2⁺ обнаруживаются только в волокнах с быстрым миозиновым фенотипом. Как показывают данные *in vitro*, активированные мезенхимальные клетки-предшественники, экспрессирующие Tw2, сначала выключают экспрессию Tw2 и начинают временно экспрессировать Pax7. На сегодняшний день не определено, сливаются ли такие клетки с волокнами напрямую или сначала проходят под базальной мембраной, как вновь образованные клетки Pax7⁺, внося вклад в пул сателлитных клеток мышечных волокон Пх и Пб [35].

В недавних исследованиях было выявлено, что только небольшой процент миосателлитов является “настоящими” сателлитными клетками, т.е. обладают способностью давать начало миогенным клеткам-предшественникам и пополнять

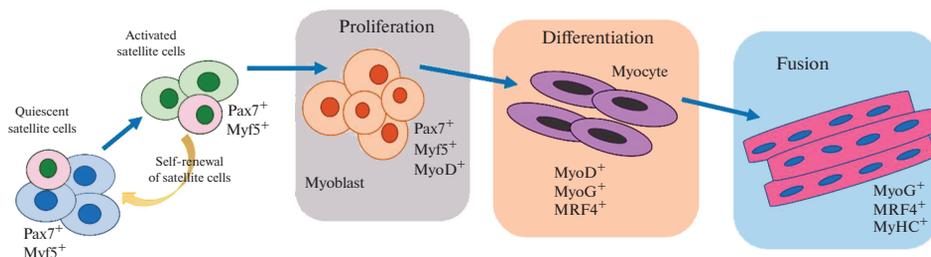


Рис. 1. Этапы развития сателлитных клеток мышц при регенерации.

пул сателлитных клеток [36–38]. Для таких сателлитных клеток характерно наличие ассиметричного деления, необходимого для поддержания и обновления пула сателлитных клеток. Ассиметричное деление было выявлено лишь у небольшой части сателлитных клеток мышц [36, 38, 39].

РОЛЬ САТЕЛЛИТНЫХ КЛЕТОК В РЕГЕНЕРАЦИИ МЫШЦ

Миосателлиты являются основным источником регенерации поперечнополосатой мышечной ткани. В исследованиях на животных было показано, что удаление пула мышечных сателлитных клеток приводит к потере регенеративных способностей мышц [40]. Мыши нокауты по гену *Pax7* имеют маленькие миофибриллы при рождении и не способны сформировать функциональный пул сателлитных клеток, что приводит к быстрой гибели в пределах несколько недель жизни [41]. При нокауте гена *Pax7* у взрослых мышей было показано значительное снижение регенеративного потенциала скелетных мышц, т.е. *Pax7* необходим для нормального функционирования сателлитных клеток [42, 43]. Однако потеря сателлитных клеток не оказывает влияния на способность неповрежденных мышц к гипертрофии [44].

Процесс регенерации мышц включает в себя три последовательные, частично перекрывающиеся стадии: 1) воспалительная реакция; 2) активация, дифференцировка и слияние сателлитных клеток (рис. 1); 3) формирование новых мышечных волокон (рис.1).

В регуляции регенеративных процессов скелетных мышц задействовано множество сигнальных путей, в том числе сигнальные пути, инициированные воспалительными цитокинами, ростовыми факторами и эволюционно консервативными сигнальными путями Notch, Wnt и Sonic Hedgehog (Shh) [39, 45–49]. Воспалительные цитокины IL-4, LIF, TGF- β , IL-6 и TNF участвуют в регуляции начальных этапов регенерации поврежденной мышцы [49].

В поврежденной мышце продуцируются хемоаттрактанты для макрофагов и моноцитов [50–52], при блокировании инфильтрации макрофагов происходит ослабление регенеративных процессов вследствие снижения содержания продуцируемых ими факторов, индуцирующих пролиферацию миобластов [45, 53, 54]. В поврежденной мышце происходит высвобождение ростовых факторов [46], связанных с белками внеклеточного матрикса, происходит активация металлопротеиназ, играющих важную роль при восстановлении мышцы [55]. При повреждении мышцы мгновенно начинает продуцироваться оксид азота. В экспериментах с ингибированием NO-синтазы наблюдалось снижение немедленного ответа сателлитных клеток на повреждение мышцы [56]. NO стимулирует экспрессию ме-

таллопротеиназ и способствует высвобождению факторов роста из внеклеточного матрикса [57].

Хорошо изученные факторы роста участвуют в регенерации мышц: FGF, HGF, IGF-1 и миостатин [45, 46, 58–60]. FGF-2 и HGF способствуют пролиферации миогенных клеток-предшественников и ослабляют их дифференцировку, частично подавляя экспрессию миогенных регуляторных факторов, таких как MyoD [60, 61]. Протеогликаны синдеканы (syndecans-1, -2, -3, -4) вовлечены в работу сигнального пути FGF при восстановлении поврежденной мышцы. Синдекан-3 необходим для поддержания сателлитных клеток в неактивном состоянии [62]. Фактор роста гепатоцитов является ключевым активатором сателлитных клеток на ранних стадиях регенерации поврежденной мышцы [16]. Инсулин-зависимые ростовые факторы IGF-1 и IGF-2 играют важную роль в регуляции активности сателлитных клеток. IGF-1 способствует пролиферации и миогенной дифференцировке сателлитных клеток при повреждении мышц, усиливает синтез белка в дифференцированных миофибриллах и ингибирует процессы апоптоза [58]. IGF-2 необходим для дифференцировки миобластов [45, 63, 64].

Миогенин (GDF-8), специфичный для мышц ростовой фактор из семейства белков TGF- β (transforming growth factor- β) влияет на рост и развитие клеток миогенного ряда на ранних этапах формирования мышц, экспрессируется и во взрослых сателлитных клетках. В ходе регенерации мышц миогенин ингибирует пролиферацию сателлитных клеток [45, 65–68].

Сигнальный путь Notch поддерживает миосателлиты в состоянии покоя, ингибирует их пролиферацию и дифференцировку, способствует обновлению пула сателлитных клеток [69]. Также было показано, что сигнальный путь Notch в присутствии фактора FGF-2 направляет сателлитные клетки по пути миогенной дифференцировки [70]. Было обнаружено увеличение экспрессии мРНК и содержания белка сигнального пути Shh, активного в эмбриогенезе, при регенерации поврежденных мышц [47].

ВЛИЯНИЕ ГРАВИТАЦИОННОЙ РАЗГРУЗКИ НА САТЕЛЛИТНЫЕ КЛЕТКИ МЫШЦ

Постуральные мышцы подвержены негативным изменениям при воздействии реальной или моделируемой невесомости [71, 72]. На сегодняшний день в литературе представлено большое количество работ, демонстрирующих изменение общего числа и активности мышечных сателлитных клеток в ответ на разные виды мышечных атрофий от бездействия [5, 73–75]. Однако регенераторный потенциал сателлитных клеток мышц при действии гравитационной разгрузки до сих пор плохо изучен, и в литературе встречается ограниченное количество работ, освещающих этот процесс.

В работах ряда авторов было показано, что при действии гравитационной разгрузки снижается общее число сателлитных клеток в скелетных мышцах [17, 76].

После трех дней вывешивания происходит уменьшение количества сателлитных клеток в мышцах молодых крыс [9, 77]. Было показано, что после 7-ми суток моделируемой гравитационной разгрузки в камбаловидной мышце крыс обнаружено уменьшение числа сателлитных клеток на 30 и на 50% после 14-ти суток по сравнению с контрольным уровнем [5]. В камбаловидной мышце крыс было обнаружено снижение содержания сателлитных клеток после 14-суточного антиортостатического вывешивания [18].

После 2-недельного антиортостатического вывешивания мышей было выявлено снижение общего количества сателлитных клеток в камбаловидной мышце [7, 13]. Сниженное количество сателлитных клеток было выявлено в *m. gastrocnemius* и *m. plantaris* мышцы после 14-суточного вывешивания по сравнению с мышцами контрольных животных и мышцами животных, подвергшихся восстановлению после вывешивания [7].

В исследованиях на добровольцах было показано, что уже после 5 дней гипокинезии наблюдается снижение количества сателлитных клеток в медленных мышечных волокнах *m. vastus lateralis* [78]. Также снижение содержания сателлитных клеток в *m. vastus lateralis* человека было выявлено после 14-суточной гипокинезии (бедрест) [73].

При применении модели иммобилизации мышц наблюдалось снижение общего числа миосателлитов. После 7-суточной иммобилизации у мышей выявлено значительное снижение содержания мышечных сателлитных клеток как в быстрых, так и в медленных мышцах [79].

Снижение числа сателлитных клеток мышц при денервации происходит в результате активации апоптопических процессов [51]. В ответ на атрофию мышц увеличивается экспрессия фактора TNF α , что способствует усилению апоптоза миообластов [80, 81]. После 2-х суток гравитационной разгрузки наблюдается большое число апоптотических ядер в волокнах *m. soleus* [82].

Митотическая активность мышечных сателлитных клеток снижена при действии гравитационной разгрузки [76, 77]. Ранее показали, что уже на 1-х сутках вывешивания в *m. soleus* начинает снижаться митотическая активность сателлитных клеток и полностью прекращается к 3–5-му дню вывешивания. Морфологические признаки атрофии развиваются через 48 ч [9]. В *m. soleus* и в *m. extensor digitorum longus* молодых крыс после 3-суточного вывешивания (по результатам включения BrdU) наблюдалось уменьшение их пролиферативного потенциала [9, 77]. В мышечном волокне после вывешивания было снижено количество покоящихся и митотически активных сателлитов на 57% по сравнению с контрольной группой [83].

После 14-суточного антиортостатического вывешивания крыс у животных наблюдалось снижение содержания как пролиферирующих сателлитных клеток (Pax7 +/MyoD+), так и миогенин-позитивных дифференцирующихся клеток [18]. У мышей на фоне 2-недельного антиортостатического вывешивания показано снижение способности сателлитных клеток к пролиферации и дифференцировке при повреждении мышцы, т.е. наблюдалось снижение их регенеративного потенциала [13].

Важно отметить, что наряду с данными о снижении активации и пролиферации сателлитных клеток мышц, есть данные об усилении процессов пролиферации в *m. gastrocnemius* мышей на начальных этапах гравитационной разгрузки [84].

Во время 30-суточного космического полета в мышцах мышей происходила активация и дифференцировка сателлитных клеток, т.е. инициировались и поддерживались регенераторные процессы мышц. Однако образующиеся в этих условиях, мышечные волокна имели ненормальный вид и сразу же начинали деградировать в условиях микрогравитации [75].

При иммобилизации мышц на фоне снижения общего числа сателлитных клеток мышц наблюдалось увеличение экспрессии Pax7 и MyoD. Таким образом, миосателлиты не находились в фазе клеточного цикла G₀, а экспрессировали MyoD, т.е. находились на стадии миогенных клеток-предшественников [79].

При исследованиях *in vitro* было показано, что рост мышечных сателлитных клеток, выделенных из атрофированной мышцы после 14-ти суток вывешивания, наблюдался только на 3–4-й день после их изоляции, а сателлитные клетки, выделенные из контрольных мышц и мышц после восстановления, начинали активно расти уже на 1–2-й день после изоляции. Морфологические признаки дифференцировки сателлитных клеток в группе контроля и восстановления наблюдались к 3-м суткам культивирования *in vitro*, а после вывешивания только к 5-м. Миосателлиты, изолированные из контрольной и восстановленной мышцы, формировали полноценные большие миотубы к 5-му дню культивирования, а сателлитные клетки из атрофированной мышцы сформировали редкие небольшие миотубы лишь к 7-му дню. Таким образом, сателлитные клетки, выделенные из камбаловидной мышцы мышей после 2-недельного вывешивания, не способны нормально активироваться, пролиферировать и дифференцироваться. Интересно, что в активации, пролиферации и дифференцировке сателлитных клеток, выделенных из камбаловидной мышцы мышей, подвергшейся восстановлению после 2-недельного вывешивания, достоверных отличий от контроля не выявили [7].

Недавно, при исследовании адаптивного ответа мышц на нагрузку было установлено, что отсутствие сателлитных клеток не предотвращает рост мышцы, но значительно снижает его по сравнению с нормальной мышцей. Выявлено, что отсутствие сателлитных клеток сказывается на организации внеклеточного матрикса и негативно регулирует пути окислительного фосфорилирования и биогенез митохондрий [85]. На сегодняшний день абсолютно не изучено, влияет ли снижение содержания сателлитных клеток мышц при действии гравитационной разгрузки на компоненты внеклеточного матрикса мышц и различные метаболические пути.

Несмотря на большой интерес к проблеме механизмов атрофии скелетных мышц от бездействия, исследования регенеративных процессов атрофированной мышцы малочисленны. Регенераторный потенциал сателлитных клеток скелетных мышц при действии гравитационной разгрузки изучен недостаточно. Становится очевидным, что требуются дальнейшие исследования для выявления фундаментальных механизмов, лежащих в основе наблюдаемых изменений, и поиска путей поддержания восстановительных процессов поврежденных мышцах при действии микрогравитации.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 20-75-10080.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы Ш.Б.С. и В.Н.А., написание манускрипта В.Н.А., редактирование Ш.Б.С. и В.Н.А.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Seale P, Asakura A, Rudnicki MA (2001) The potential of muscle stem cells. *Dev Cell* 1(3): 333–342.
[https://doi.org/10.1016/s1534-5807\(01\)00049-1](https://doi.org/10.1016/s1534-5807(01)00049-1)

2. *Seale P, Sabourin LA, Girgis-Gabardo A, Mansouri A, Gruss P, Rudnicki MA* (2000) Pax7 is required for the specification of myogenic satellite cells. *Cell* 102(6): 777–786.
[https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)00066-0](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)00066-0)
3. *Charge SB, Rudnicki MA* (2004) Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *Physiol Rev* 84(1): 209–238.
<https://doi.org/10.1152/physrev.00019.2003>
4. *Bailey P, Holowacz T, Lassar AB* (2001) The origin of skeletal muscle stem cells in the embryo and the adult. *Curr Opin Cell Biol* 13(6): 679–689.
[https://doi.org/10.1016/s0955-0674\(00\)00271-4](https://doi.org/10.1016/s0955-0674(00)00271-4)
5. *Шенкман БС, Туртикова ОВ, Немировская ТЛ, Григорьев АИ* (2010) Сократительная активность скелетной мышцы и судьба mioядер. *Acta naturae* 2(5): 62–69. [*Shenkman BS, Turtikova OV, Nemirovskaya TL, Grigor'ev AI* (2010) Skeletal muscle contractile activity and the fate of myonucle. *Acta Natyrae* 2(5): 62–69 (In Russ)].
6. *Гаин ЮМ, Кулинич СС, Зафранская ММ, Шахрай СВ, Гаин МЮ* (2014) Морфо-фенотипическая характеристика mioгенных клеток-предшественников поперечнополосатой мышечной ткани. *Военная медицина* (4): 80–84. [*Gain YUM, Kulinich SS, Zafranskaya MM, Shakhray SV, Gain MYU* (2014) Morpho-phenotypic characteristics of myogenic progenitor cells of striated muscle tissue. *Voyennaya meditsina* (4): 80–84 (In Russ)].
7. *Mitchell PO, Pavlath GK* (2004) Skeletal muscle atrophy leads to loss and dysfunction of muscle precursor cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 287(6): C1753–1762.
<https://doi.org/10.1152/ajpcell.00292.2004>
8. *Hikida RS, Van Nostran S, Murray JD, Staron RS, Gordon SE, Kraemer WJ* (1997) Myonuclear loss in atrophied soleus muscle fibers. *Anat Rec* 247(3): 350–354.
[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0185\(199703\)247:3<350::AID-AR6>3.0.CO;2-Y](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0185(199703)247:3<350::AID-AR6>3.0.CO;2-Y)
9. *Schultz E, McCormick KM* (1994) Skeletal muscle satellite cells. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 123: 213–257.
<https://doi.org/10.1007/BFb0030904>
10. *Ohira Y, Yoshinaga T, Nomura T, Kawano F, Ishihara A, Nonaka I, Roy RR, Edgerton VR* (2002) Gravitational unloading effects on muscle fiber size, phenotype and myonuclear number. *Adv Space Res* 30(4): 777–781.
[https://doi.org/10.1016/s0273-1177\(02\)00395-2](https://doi.org/10.1016/s0273-1177(02)00395-2)
11. *Thomason DB, Biggs RB, Booth FW* (1989) Protein metabolism and beta-myosin heavy-chain mRNA in unweighted soleus muscle. *Am J Physiol* 257(2 Pt 2): R300–305.
<https://doi.org/10.1152/ajpregu.1989.257.2.R300>
12. *Goldspink DF, Morton AJ, Loughna P, Goldspink G* (1986) The effect of hypokinesia and hypodynamia on protein turnover and the growth of four skeletal muscles of the rat. *Pflugers Archiv: Eur J Physiol* 407(3): 333–340.
<https://doi.org/10.1007/BF00585311>
13. *Matsuba Y, Goto K, Morioka S, Naito T, Akema T, Hashimoto N, Sugiura T, Ohira Y, Beppu M, Yoshioka T* (2009) Gravitational unloading inhibits the regenerative potential of atrophied soleus muscle in mice. *Acta Physiol* 196(3): 329–339.
<https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.2008.01943.x>
14. *Mauro A* (1961) Satellite cell of skeletal muscle fibers. *J Biophys Biochem Cytol* 9: 493–495.
<https://doi.org/10.1083/jcb.9.2.493>
15. *Katz B* (1961) The terminations of the afferent nerve fibre in the muscle spindle of the frog. *Philos Trans Royal Soc Lond [Biol]* 243: 221–240.
16. *Yin H, Price F, Rudnicki MA* (2013) Satellite cells and the muscle stem cell niche. *Physiol Rev* 93(1): 23–67.
<https://doi.org/10.1152/physrev.00043.2011>
17. *Wang XD, Kawano F, Matsuoka Y, Fukunaga K, Terada M, Sudoh M, Ishihara A, Ohira Y* (2006) Mechanical load-dependent regulation of satellite cell and fiber size in rat soleus muscle. *Am J Physiol Cell Physiol* 290 (4): C981–989.
<https://doi.org/10.1152/ajpcell.00298.2005>
18. *Nakanishi R, Hirayama Y, Tanaka M, Maeshige N, Kondo H, Ishihara A, Roy RR, Fujino H* (2016) Nucleoprotein supplementation enhances the recovery of rat soleus mass with reloading after hindlimb unloading-induced atrophy via myonuclei accretion and increased protein synthesis. *Nutr Res* 36(12): 1335–1344.
<https://doi.org/10.1016/j.nutres.2016.10.007>
19. *Schmalbruch H, Hellhammer U* (1977) The number of nuclei in adult rat muscles with special reference to satellite cells. *Anat Rec* 189(2): 169–175.
<https://doi.org/10.1002/ar.1091890204>

20. *Snow MH* (1983) A quantitative ultrastructural analysis of satellite cells in denervated fast and slow muscles of the mouse. *Anat Rec* 207(4): 593–604.
<https://doi.org/10.1002/ar.1092070407>
21. *Gibson MC, Schultz E* (1983) Age-related differences in absolute numbers of skeletal muscle satellite cells. *Muscle & Nerve* 6(8): 574–580.
<https://doi.org/10.1002/mus.880060807>
22. *Charge SB, Brack AS, Hughes SM* (2002) Aging-related satellite cell differentiation defect occurs prematurely after Ski-induced muscle hypertrophy. *Am J Physiol Cell Physiol* 283(4): C1228–1241.
<https://doi.org/10.1152/ajpcell.00206.2002>
23. *Murach KA, Fry CS, Kirby TJ, Jackson JR, Lee JD, White SH, Dupont-Versteegden EE, McCarthy JJ, Peterson CA* (2018) Starring or Supporting Role? Satellite Cells and Skeletal Muscle Fiber Size Regulation. *Physiology* 33(1): 26–38.
<https://doi.org/10.1152/physiol.00019.2017>
24. *Bischoff R, Heintz C* (1994) Enhancement of skeletal muscle regeneration. *Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists* 201(1): 41–54.
<https://doi.org/10.1002/aja.1002010105>
25. *Katagiri T, Yamaguchi A, Komaki M, Abe E, Takahashi N, Ikeda T, Rosen V, Wozney JM, Fujisawa-Sehara A, Suda T* (1994) Bone morphogenetic protein-2 converts the differentiation pathway of C2C12 myoblasts into the osteoblast lineage. *J Cell Biol* 127(6 Pt 1): 1755–1766.
<https://doi.org/10.1083/jcb.127.6.1755>
26. *Teboul L, Gaillard D, Staccini L, Inadera H, Amri EZ, Grimaldi PA* (1995) Thiazolidinediones and fatty acids convert myogenic cells into adipose-like cells. *J Biol Chem* 270(47): 28183–28187.
<https://doi.org/10.1074/jbc.270.47.28183>
27. *Озернюк НД, Балан ОВ* (2007) Сателлитные клетки мышечной системы и регуляция восстановительного потенциала мышцы. *Известия РАН Серия биол* (6): 650–660 [*Ozernyuk ND, Balan OV* (2007) Satellite cells of the muscular system and the regulation of the regenerative potential of the muscle. *Izvestiya RAN Seriya Biol* (6): 650–660 (In Russ)].
28. *Montarras D, Morgan J, Collins C, Relaix F, Zaffran S, Cumano A, Partridge T, Buckingham M* (2005) Direct isolation of satellite cells for skeletal muscle regeneration. *Science* 309(5743): 2064–2067.
<https://doi.org/10.1126/science.1114758>
29. *Relaix F, Montarras D, Zaffran S, Gayraud-Morel B, Rocancourt D, Tajbakhsh S, Mansouri A, Cumano A, Buckingham M* (2006) Pax3 and Pax7 have distinct and overlapping functions in adult muscle progenitor cells. *J Cell Biol* 172(1): 91–102.
<https://doi.org/10.1083/jcb.200508044>
30. *Beauchamp JR, Heslop L, Yu DS, Tajbakhsh S, Kelly RG, Wernig A, Buckingham ME, Partridge TA, Zammit PS* (2000) Expression of CD34 and Myf5 defines the majority of quiescent adult skeletal muscle satellite cells. *J Cell Biol* 151(6): 1221–1234.
<https://doi.org/10.1083/jcb.151.6.1221>
31. *Lindstrom M, Pedrosa-Domellof F, Thornell LE* (2010) Satellite cell heterogeneity with respect to expression of MyoD, myogenin, Dlk1 and c-Met in human skeletal muscle: application to a cohort of power lifters and sedentary men. *Histochem Cell Biol* 134(4): 371–385.
<https://doi.org/10.1007/s00418-010-0743-5>
32. *Tanaka KK, Hall JK, Troy AA, Cornelison DD, Majka SM, Olwin BB* (2009) Syndecan-4-expressing muscle progenitor cells in the SP engraft as satellite cells during muscle regeneration. *Cell Stem Cell* 4(3): 217–225.
<https://doi.org/10.1016/j.stem.2009.01.016>
33. *Parise G, O'Reilly CE, Rudnicki MA* (2006) Molecular regulation of myogenic progenitor populations. *Appl Physiol Nutr Metab* 31(6): 773–781.
<https://doi.org/10.1139/h06-055>
34. *Asakura A, Seale P, Girgis-Gabardo A, Rudnicki MA* (2002) Myogenic specification of side population cells in skeletal muscle. *J Cell Biol* 159(1): 123–134.
<https://doi.org/10.1083/jcb.200202092>
35. *Goloviznina NA, Kyba M* (2017) Twist of fate for skeletal muscle mesenchymal cells. *Nat Cell Biol* 19(3): 153–154.
<https://doi.org/10.1038/ncb3482>
36. *Conboy MJ, Karasov AO, Rando TA* (2007) High incidence of non-random template strand segregation and asymmetric fate determination in dividing stem cells and their progeny. *PLoS Biol* 5(5): e102.
<https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0050102>

37. *Kuang S, Kuroda K, Le Grand F, Rudnicki MA* (2007) Asymmetric self-renewal and commitment of satellite stem cells in muscle. *Cell* 129(5): 999–1010.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.03.044>
38. *Shinin V, Gayraud-Morel B, Gomes D, Tajbakhsh S* (2006) Asymmetric division and cosegregation of template DNA strands in adult muscle satellite cells. *Nat Cell Biol* 8(7): 677–687.
<https://doi.org/10.1038/ncb1425>
39. *Conboy IM, Rando TA* (2002) The regulation of Notch signaling controls satellite cell activation and cell fate determination in postnatal myogenesis. *Dev Cell* 3(3): 397–409.
[https://doi.org/10.1016/s1534-5807\(02\)00254-x](https://doi.org/10.1016/s1534-5807(02)00254-x)
40. *Dumont NA, Bentzinger CF, Sincennes MC, Rudnicki MA* (2015) Satellite Cells and Skeletal Muscle Regeneration. *Compar Physiol* 5(3): 1027–1059.
<https://doi.org/10.1002/cphy.c140068>
41. *Kuang S, Charge SB, Seale P, Huh M, Rudnicki MA* (2006) Distinct roles for Pax7 and Pax3 in adult regenerative myogenesis. *J Cell Biol* 172(1): 103–113.
<https://doi.org/10.1083/jcb.200508001>
42. *Gunther S, Kim J, Kostin S, Lepper C, Fan CM, Braun T* (2013) Myf5-positive satellite cells contribute to Pax7-dependent long-term maintenance of adult muscle stem cells. *Cell Stem Cell* 13(5): 590–601.
<https://doi.org/10.1016/j.stem.2013.07.016>
43. *von Maltzahn J, Jones AE, Parks RJ, Rudnicki MA* (2013) Pax7 is critical for the normal function of satellite cells in adult skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci USA* 110(41): 16474–16479.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1307680110>
44. *McCarthy JJ, Mula J, Miyazaki M, Erfani R, Garrison K, Farooqui AB, Srikuea R, Lawson BA, Grimes B, Keller C, Van Zant G, Campbell KS, Esser KA, Dupont-Versteegden EE, Peterson CA* (2011) Effective fiber hypertrophy in satellite cell-depleted skeletal muscle. *Development* 138(17): 3657–3666.
<https://doi.org/10.1242/dev.068858>
45. *Wagers AJ, Conboy IM* (2005) Cellular and molecular signatures of muscle regeneration: current concepts and controversies in adult myogenesis. *Cell* 122(5): 659–667.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.08.021>
46. *Husmann I, Soulet L, Gautron J, Martelly I, Barritault D* (1996) Growth factors in skeletal muscle regeneration. *CYTOKINE GROWTH F R* 7(3): 249–258.
[https://doi.org/10.1016/s1359-6101\(96\)00029-9](https://doi.org/10.1016/s1359-6101(96)00029-9)
47. *Pola R, Ling LE, Aprahamian TR, Barban E, Bosch-Marce M, Curry C, Corbley M, Kearney M, Isner JM, Losordo DW* (2003) Postnatal recapitulation of embryonic hedgehog pathway in response to skeletal muscle ischemia. *Circulation* 108(4): 479–485.
<https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000080338.60981.FA>
48. *Polesskaya A, Seale P, Rudnicki MA* (2003) Wnt signaling induces the myogenic specification of resident CD45+ adult stem cells during muscle regeneration. *Cell* 113(7): 841–852.
[https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(03\)00437-9](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(03)00437-9)
49. *Tidball JG* (2005) Inflammatory processes in muscle injury and Repair. *Am J Physiol Regul Integr Compar Physiol* 288(2): R345–R353.
<https://doi.org/10.1152/ajpregu.00454.2004>
50. *Chazaud B, Sonnet C, Lafuste P, Bassez G, Rimaniol AC, Poron F, Authier FJ, Dreyfus PA, Gherardi RK* (2003) Satellite cells attract monocytes and use macrophages as a support to escape apoptosis and enhance muscle growth. *J Cell Biol* 163(5): 1133–1143.
<https://doi.org/10.1083/jcb.200212046>
51. *Jejurikar SS, Kuzon WM, Jr* (2003) Satellite cell depletion in degenerative skeletal muscle. *Apoptosis* 8(6): 573–578.
<https://doi.org/10.1023/A:1026127307457>
52. *Lescaudron L, Peltikian E, Fontaine-Perus J, Paulin D, Zampieri M, Garcia L, Parrish E* (1999) Blood borne macrophages are essential for the triggering of muscle regeneration following muscle transplant. *Neuromuscul Disord* 9(2): 72–80.
[https://doi.org/10.1016/s0960-8966\(98\)00111-4](https://doi.org/10.1016/s0960-8966(98)00111-4)
53. *Bondesen BA, Mills ST, Kegley KM, Pavlath GK* (2004) The COX-2 pathway is essential during early stages of skeletal muscle regeneration. *Am J Physiol Cell Physiol* 287(2): C475–C483.
<https://doi.org/10.1152/ajpcell.00088.2004>
54. *Robertson TA, Maley MA, Grounds MD, Papadimitriou JM* (1993) The role of macrophages in skeletal muscle regeneration with particular reference to chemotaxis. *Exp Cell Res* 207(2): 321–331.
<https://doi.org/10.1006/excr.1993.1199>
55. *Carmeli E, Moas M, Reznick AZ, Coleman R* (2004) Matrix metalloproteinases and skeletal muscle: a brief review. *Muscle & Nerve* 29(2): 191–197.
<https://doi.org/10.1002/mus.10529>

56. *Anderson JE* (2000) A role for nitric oxide in muscle Repair: nitric oxide-mediated activation of muscle satellite cells. *Mol Biol Cell* 11(5): 1859–1874.
<https://doi.org/10.1091/mbc.11.5.1859>
57. *Tatsumi R* (2010) Mechano-biology of skeletal muscle hypertrophy and regeneration: possible mechanism of stretch-induced activation of resident myogenic stem cells. *Anim Sci J* 81(1): 11–20.
<https://doi.org/10.1111/j.1740-0929.2009.00712.x>
58. *Heszele MF, Price SR* (2004) Insulin-like growth factor I: the yin and yang of muscle atrophy. *Endocrinology* 145(11): 4803–4805.
<https://doi.org/10.1210/en.2004-1037>
59. *Lee SJ* (2004) Regulation of muscle mass by myostatin. *Annu Rev Cell Dev Biol* 20(61–86).
<https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.20.012103.135836>
60. *Miller KJ, Thaloor D, Matteson S, Pavlath GK* (2000) Hepatocyte growth factor affects satellite cell activation and differentiation in regenerating skeletal muscle. *Am J Physiol Cell Physiol* 278(1): C174–C181.
<https://doi.org/10.1152/ajpcell.2000.278.1.C174>
61. *Maley MA, Fan Y, Beilharz MW, Grounds MD* (1994) Intrinsic differences in MyoD and myogenin expression between primary cultures of SJL/J and BALB/C skeletal muscle. *Exp Cell Res* 211(1): 99–107.
<https://doi.org/10.1006/excr.1994.1064>
62. *Pisconti A, Cornelison DD, Olguin HC, Antwine TL, Olwin BB* (2010) Syndecan-3 and Notch cooperate in regulating adult myogenesis. *J Cell Biol* 190(3): 427–441.
<https://doi.org/10.1083/jcb.201003081>
63. *Downward J* (2004) PI 3-kinase, Akt and cell survival. *Semin Cell Dev Biol* 15(2): 177–182.
<https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2004.01.002>
64. *Lawlor MA, Rotwein P* (2000) Coordinate control of muscle cell survival by distinct insulin-like growth factor activated signaling pathways. *J Cell Biol* 151(6): 1131–1140.
<https://doi.org/10.1083/jcb.151.6.1131>
65. *McCroskery S, Thomas M, Maxwell L, Sharma M, Kambadur R* (2003) Myostatin negatively regulates satellite cell activation and self-renewal. *J Cell Biol* 162(6): 1135–1147.
<https://doi.org/10.1083/jcb.200207056>
66. *Zimmers TA, Davies MV, Koniaris LG, Haynes P, Esquela AF, Tomkinson KN, McPherron AC, Wolfman NM, Lee SJ* (2002) Induction of cachexia in mice by systemically administered myostatin. *Science* 296(5572): 1486–1488.
<https://doi.org/10.1126/science.1069525>
67. *McPherron AC, Lawler AM, Lee SJ* (1997) Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-beta superfamily member. *Nature* 387(6628): 83–90.
<https://doi.org/10.1038/387083a0>
68. *Thomas M, Langley B, Berry C, Sharma M, Kirk S, Bass J, Kambadur R* (2000) Myostatin, a negative regulator of muscle growth, functions by inhibiting myoblast proliferation. *J Biol Chem* 275(51): 40235–40243.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M004356200>
69. *Wen Y, Bi P, Liu W, Asakura A, Keller C, Kuang S* (2012) Constitutive Notch activation upregulates Pax7 and promotes the self-renewal of skeletal muscle satellite cells. *Mol Cell Biol* 32(12): 2300–2311.
<https://doi.org/10.1128/MCB.06753-11>
70. *Dezawa M, Ishikawa H, Itokazu Y, Yoshihara T, Hoshino M, Takeda S, Ide C, Nabeshima Y* (2005) Bone marrow stromal cells generate muscle cells and Repair muscle degeneration. *Science* 309(5732): 314–317.
<https://doi.org/10.1126/science.1110364>
71. *Козловская ИБ, Григорьева ЛС, Гевлич ГИ* (1984) Сравнительный анализ влияния невесомости и ее моделей на скоростно-силовые свойства и тонус скелетных мышц человека. *Косм биол и авиакосм мед* 18(6): 22–26. [*Kozlovskaya IB, Grigor'yeva LC, Gevlich GI* (1984) Comparative analysis of the influence of weightlessness and its models on the speed-power properties and tone of human skeletal muscles. *Kosm Biol i Aviakosm Med* 18(6): 22–26 (In Russ)].
72. *Оганов ВС, Скуратова СА, Мурашко ЛМ* (1988) Влияние кратковременных космических полетов на физиологические свойства и состав миофибриллярных белков скелетных мышц крыс. *Косм биол и авиакосм мед* 4(4): 50–54. [*Oganov BC, Skuratova SA, Murashko LM* (1988) Influence of short-term space flights on physiological properties and composition of myofibrillar proteins of skeletal muscles of rats. *Kosm Biol i Aviakosm Med* 4(4): 50–54 (In Russ)].
73. *Arentson-Lantz EJ, English KL, Paddon-Jones D, Fry CS* (2016) Fourteen days of bed rest induces a decline in satellite cell content and robust atrophy of skeletal muscle fibers in middle-aged adults. *J Appl Physiol* 120(8): 965–975
<https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00799.2015>

74. Suetta C, Frandsen U, Mackey AL, Jensen L, Hvid LG, Bayer ML, Petersson SJ, Schroder HD, Andersen JL, Aagaard P, Schjerling P, Kjaer M (2013) Ageing is associated with diminished muscle re-growth and myogenic precursor cell expansion early after immobility-induced atrophy in human skeletal muscle. *J Physiol* 591(15): 3789–3804.
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.2013.257121>
75. Radugina EA, Almeida EAC, Blaber E, Poplinskaya VA, Markitantova YV, Grigoryan EN (2018) Exposure to microgravity for 30 days onboard Bion M1 caused muscle atrophy and impaired re-generation in murine femoral Quadriceps. *Life Sci Space Res* 16: 18–25.
<https://doi.org/10.1016/j.lssr.2017.08.005>
76. Mozdziak PE, Truong Q, Macius A, Schultz E (1998) Hindlimb suspension reduces muscle re-generation. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 78(2): 136–140.
<https://doi.org/10.1007/s004210050398>
77. Mozdziak PE, Pulvermacher PM, Schultz E (2001) Muscle regeneration during hindlimb un-loading results in a reduction in muscle size after reloading. *J Appl Physiol* 91(1): 183–190.
<https://doi.org/10.1152/jappl.2001.91.1.183>
78. Reidy PT, McKenzie AI, Brunner P, Nelson DS, Barrows KM, Supiano M, LaStayo PC, Drummond MJ (2017) Neuromuscular Electrical Stimulation Combined with Protein Ingestion Pre-serves Thigh Muscle Mass But. Not Muscle Function in Healthy Older Adults During 5 Days of Bed Rest Rejuvenation *Res* 20(6): 449–461.
<https://doi.org/10.1089/rej.2017.1942>
79. Guitart M, Lloreta J, Manas-Garcia L, Barreiro E (2018) Muscle regeneration potential and sat-ellite cell activation profile during recovery following hindlimb immobilization in mice. *J Cell Physiol* 233(5): 4360–4372.
<https://doi.org/10.1002/jcp.26282>
80. Dalla Libera L, Sabbadini R, Renken C, Ravara B, Sandri M, Betto R, Angelini A, Vecovo G (2001) Apoptosis in the skeletal muscle of rats with heart failure is associated with increased serum levels of TNF-alpha and sphingosine. *J Mol Cell Cardiol* 33(10): 1871–1878.
<https://doi.org/10.1006/jmcc.2001.1453>
81. Stewart CE, Newcomb PV, Holly JM (2004) Multifaceted roles of TNF-alpha. *Physiol* 198(2): 237–247.
<https://doi.org/10.1002/jcp.10387>
82. Smith HK, Maxwell L, Martyn JA, Bass JJ (2000) Nuclear DNA fragmentation and morpholog-ical alterations in adult rabbit skeletal muscle after short-term immobilization. *Cell Tissue Res* 302(2): 235–241.
<https://doi.org/10.1007/s004410000280>
83. Bruusgaard JC, Gundersen K (2008) In vivo time-lapse microscopy reveals no loss of murine myonuclei during weeks of muscle atrophy. *J Clin Invest* 118(4): 1450–1457.
<https://doi.org/10.1172/JCI34022>
84. Ferreira R, Neuparth MJ, Ascensao A, Magalhaes J, Vitorino R, Duarte JA, Amado F (2006) Skel-etral muscle atrophy increases cell proliferation in mice gastrocnemius during the first week of hindlimb suspension. *Eur J Appl Physiol* 97(3): 340–346.
<https://doi.org/10.1007/s00421-006-0197-6>
85. Englund DA, Figueiredo VC, Dungan CM, Murach KA, Peck BD, Petrosino JM, Brightwell CR, Dupont AM, Neal AC, Fry CS, Accornero F, McCarthy JJ, Peterson CA (2021) Satellite Cell De-pletion Disrupts Transcriptional Coordination and Muscle Adaptation to Exercise. *Function* 2(1): zqaa033.
<https://doi.org/10.1093/function/zqaa033>

Myosatellite Cells under Gravitational Unloading Conditions

N. A. Vilchinskaya^a, * and B. S. Shenkman^a

^a*Institute of Biomedical Problems RAS, Moscow, Russia*

*e-mail: vilchinskayanatalia@gmail.com

It is known that skeletal muscles have a high degree of plasticity. Gravitational unloading has a strong impact on the structural and functional organization of the postural mus-cles. Skeletal muscle has a unique ability to Repair damage. Recovery (regeneration) of muscles is carried out by satellite cells. Myosatellites are quiescent mononuclear cells (G0 phase of the cell cycle) located at the periphery of the muscle fiber. When muscles are damaged, satellite cells are activated, they participate in proliferation and give rise to

new satellite cells and myoblasts. Differentiated myoblasts can fuse with muscle fibers during muscle hypertrophy and regeneration, as well as with each other to form new muscle fibers. Studies of the effect of gravitational unloading on muscle satellite cells are few. This review to consider of the influence of gravitational unloading on the pool of muscle satellite cells and the mechanisms of skeletal muscle regeneration after injury. Based on the literature data, the authors found, that the mechanisms underlying the change in the regenerative potential of muscles under gravitational unloading conditions are poorly understood. The authors highlight the need for further studies of the regenerative potential of satellite cells under microgravity conditions.

Keywords: muscle satellite cells, gravitational unloading, regeneration

ОБЗОРНЫЕ
И ПРОБЛЕМНЫЕ СТАТЬИ

ОСОБЕННОСТИ БЕЛКОВОГО МЕТАБОЛИЗМА
В СКЕЛЕТНЫХ МЫШЦАХ КОСТИСТЫХ РЫБ

© 2021 г. Н. Н. Немова¹, Н. П. Канцерова¹, Л. А. Лысенко^{1, *}

¹Институт биологии Карельского научного центра РАН, Петрозаводск, Россия

*E-mail: l-lysenko@yandex.ru

Поступила в редакцию 24.02.2021 г.

После доработки 26.03.2021 г.

Принята к публикации 28.03.2021 г.

В обзоре обобщены данные литературы и материалы собственных исследований об особенностях структуры, функций и белкового метаболизма скелетных мышц костистых рыб (кл. Teleostei). Несмотря на консервативность основных механизмов мышечного роста (миогенеза) и деградации у позвоночных животных, рыбам свойственны уникальные черты, связанные с их пойкилотермностью, недетерминированным ростом и особой функцией скелетных мышц как депо пластических и энергетических субстратов. Скелетные мышцы рыб обладают высокой пластичностью, под которой подразумевается их способность к выраженным анаболическим и катаболическим изменениям при действии факторов внешней среды, включая температуру, фотопериод, доступность пищи и другие. В оптимальных (анаболических) условиях мышечная ткань рыб растет по путям гипертрофии и гиперплазии с чрезвычайно высокой скоростью, а в периоды онтогенеза, связанные с высокими энергозатратами — миграции, голодания, созревания половых продуктов — временно преобладает катаболизм скелетно-мышечных белков. Однако деградация мышечной ткани может быть настолько глубокой, что превышает ее регенеративную способность; по такому сценарию могут реализовываться генетические программы и ответные реакции на действие внешних факторов избыточной силы и продолжительности. Крайним и показательным примером мобилизации белковых резервов мышц и расходования результирующих аминокислот в процессах энергопродукции и синтеза стадиспецифичных белков половых продуктов являются тихоокеанские лососи, степень истощения которых во время нереста настолько велика, что приводит к гибели особей. В обзоре также рассматриваются миопатии рыб и потенциал рыбных объектов для моделирования заболеваний человека.

Ключевые слова: костистые рыбы, скелетные мышцы, анаболизм, катаболизм, пластичность, миогенез, белковая деградация

DOI: 10.31857/S0869813921060091

Список сокращений: Akt — серин/треониновая протеинкиназа B, AMPK — 5'-AMP-активируемая протеинкиназа, GH — гормон роста (от англ. growth hormone), GHR — рецептор гормона роста (от англ. growth hormone receptor), hsp — белок теплового шока (от англ. heat shock protein), Igf — инсулиноподобный фактор роста (от англ. insulin-like growth factor), Igfbp — Igf-связывающий белок (от англ. Igf-binding protein), Igf-IR — рецептор инсулиноподобного фактора роста I, MPC — миогенная прогениторная клетка (от англ. myogenic progenitor cell), MRF — миогенный регуляторный фактор, Mhc — тяжелая цепь миозина (от англ. myosin heavy chain), Mylc — легкая цепь миозина (от англ. myosin light chain), myoD — фактор дифференцировки миобластов (от англ. myoblast determination factor), myoG — миогенин, NF-κB — ядерный фактор κB (от англ. nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells), Pi3K — фосфатидилинозитол-3киназа, TGF-β — трансформирующий ростовой фактор β, TNFα — фактор некроза опухоли α (от англ. tumor necrosis factor α), TOR — мишень рапамицина (от англ. target of rapamycin), TSC — белковый комплекс туберозного склероза (от англ. tuberous sclerosis complex), UPS — убиквитин-протеасомная система (от англ. ubiquitin-proteasome system), WGD — полногеномая дупликация (от англ. whole-genome duplication).

Согласно имеющимся сведениям об особенностях роста костистых рыб (кл. Teleostei) и их скелетных мышц [1–4], можно судить об уникальности их физиологии и принципиальных отличиях от других позвоночных животных. Во-первых, рыбы растут на протяжении всей жизни (за немногими исключениями), то есть большинству видов свойственен недетерминированный рост, а поскольку до 70% живого веса рыбы составляет ее мышечная ткань, то общий прирост происходит в решающей мере за счет увеличения объема мышц. Во-вторых, рост скелетных мышц рыб в течение всей жизни обеспечивается двумя механизмами – гипертрофии и гиперплазии – с постепенным снижением вклада последнего, тогда как у прочих позвоночных этот механизм функционирует только на пренатальном этапе. В-третьих, скелетные мышцы рыб являются депо энергетических и пластических субстратов и способны как к быстрому росту, так и к обратимой потере значительного объема в ситуациях, когда энергетические затраты велики (продолжительные миграции, конкуренция, формирование гонад) и(или) их восполнение извне недостаточно (голодание). Все указанные особенности роста рыб тем или иным образом связаны с развитием, функциональной активностью скелетных мышц и интенсивностью обмена мышечных белков.

Размер рыбы и тесно связанный с ним объем ее скелетных мышц, богатых белком (до 30% массы), увеличиваются в течение всей жизни, но не линейно: прирост особенно интенсивен на первом году жизни и постепенно снижается с возрастом, при этом баланс синтеза белка и его деградации всегда остается положительным. Однако в жизненном цикле периоды роста прерываются эпизодами с преобладанием катаболизма белков и истощения их резервов. Такие эпизоды могут быть более или менее регулярными (зимовальное голодание у рыб умеренных широт, нерестовая миграция, многократная у большинства видов, однократная у тихоокеанских лососей) или спорадическими (при заболеваниях, в неблагоприятных условиях). Рыбам присуща способность к массовому гидролизу белка скелетных мышц, который является расходным материалом для обеспечения энергетических затрат путем включения аминокислот в цикл трикарбоновых кислот и глюконеогенез. При этом рыба может обратимо терять до половины массы скелетных мышц, недостающий объем которых (для поддержания формы тела) замещается водой [5], а при снятии повреждающего воздействия или смене этапа годового цикла – регенерирует.

Сигналами к смене этапа годового/жизненного цикла рыб и направленности метаболических процессов служат экзогенные переменные – температура, фотопериод, соленость, доступность пищи, поскольку физиология пойкилотермных животных гораздо в большей степени зависима от условий среды их обитания [2, 6]. Триггеры – внешние сигналы – воспринимаются и трансформируются эндокринной, нейроэндокринной и иммунной системами в метаболические ответные реакции анаболической или катаболической направленности. Основными регуляторами путей, ведущих к преобладанию ростовых процессов в мышечной ткани, служат гормон роста (GH) и инсулиноподобный фактор роста (Igf-I), их выработку можно искусственно стимулировать диетой с высоким содержанием белка/аминокислот [7]. Гормон роста влияет на пищевое поведение, метаболизм, иммунные реакции и осморегуляцию [1]. Катаболическую направленность приобретают обменные процессы при действии эстрогенов, медиаторов воспаления, стресс-гормонов; в эксперименте эти ситуации моделируются введением дексаметазона, интерлейкинов, аминокислотной депривацией [7, 8].

Отмеченные выше особенности физиологии костистых рыб и белкового обмена в их скелетных мышцах предполагают, что им свойственны также более тонкие от-

личия в молекулярных механизмах регуляции пластичности мышечной ткани. Изучение процессов накопления и расходования мышечной массы и регулирующих их факторов у рыб важно не только для фундаментального естествознания, но и имеет прикладное значение для разработки стратегий интенсивного выращивания аквакультурных видов рыб, улучшения качественного состава продуктов товарного рыбоводства.

СТРУКТУРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ И БЕЛКОВЫЙ СОСТАВ

У рыб, в отличие от млекопитающих, мышечные волокна разных типов – “быстрые” гликолитические и “медленные” окислительные – не смешаны, а формируют дискретные слои. Белые мышцы – “быстрые”, с преобладающим анаэробным метаболизмом (гликолиз, гидролиз фосфокреатина) – обеспечивают внезапные быстрые движения, необходимые для бегства от хищника или ловли добычи. Их волокна толще, в составе больше белка и меньше липидов, гемоглобина и гликогена по сравнению с красными. Красные (темные) мышцы – “медленные”, с преимущественно аэробным типом окислительного фосфорилирования – предназначены для продолжительного плавания и составляют менее 5 (у редких видов до 20) % от количества белых [9]. Имеют темную окраску из-за обилия железосодержащих белков (гемоглобина и миоглобина), в них больше митохондрий, легкоокисляемых субстратов (липидов, гликогена) и превращающих их ферментов – цикла трикарбоновых кислот, пентозофосфатного шунта, электрон-транспортной цепи, синтеза гликогена, липолиза [9]. Наиболее крупная белая мышца – большая боковая, *m. lateralis magnus* – представлена двумя продольными тяжами от головы до хвоста, имеющими метамерную организацию, в которой множественные (до сотни и более, по количеству позвонков) миотомы разделены соединительнотканными миомерами. Мышечная клетка (или мышечное волокно) – многоядерное образование – окружена сарколеммой и включает многочисленные, до двух тысяч, миофибриллы. Каждая миофибрилла делится по длине на множественные идентичные саркомеры, которые содержат молекулы основных сократительных белков актина (тонкие филаменты) и миозина (толстые филаменты), минорных белков тропонина и тропомиозина, ассоциированных ферментов и других. Сборка саркомеров контролируется белком теплового шока hsp90a, а толстых филаментов – транскрипционными факторами миоцитов *mef2d* и *mef2c* [3].

Белки мышц позвоночных традиционно подразделяются на три группы в зависимости от их растворимости, при этом для рыб характерно особое их соотношение: (1) растворимые в солевых растворах с низкой ионной силой (0.15) – саркоплазматические белки, включая миоген, миоглобин, глобулины, миоальбумин, различные метаболические ферменты; составляют около 30% от общего мышечного белка рыб против 35–40% у млекопитающих; (2) растворимые в растворах высокой ионной силы (0.5) – миофибриллярные, или сократительные белки, включая актин, миозин, актомиозин, тропомиозин, тропонин и другие; составляют около 60–65% белков мышц рыб против 40–45% у млекопитающих; (3) нерастворимые в нейтральных солевых растворах или в разбавленных кислотах или щелочах – белки стромы или соединительной ткани, включая коллаген, небулин; составляют лишь 2–5% от общего количества белка у костистых рыб при очень высоком их содержании в мышцах млекопитающих. Низким содержанием соединительнотканых белков обусловлена характерная текстура мышц рыб. В составе мышечных белков костистых рыб обнаруживаются все незаменимые аминокислоты, среди которых выше содержание лизина и ниже – триптофана в сравнении с белками млекопитающих.

Мышечная ткань рыб обогащена небелковыми азотсодержащими веществами (до 10–15% от количества белков): свободными аминокислотами, пептидами, нуклеотидами, триметиламиноксидом, аммиаком [9].

Сложность белкового состава мышечной ткани рыб определяется синтезом многих белков, структурных и регуляторных, в нескольких вариантах – генетических (кодируемых копиями гена) или сплайсинговых. Так, при помощи транскриптомного анализа белых мышц морского леща *Sparus aurata* [7] были выявлены множественные варианты саркомерных белков: в двух вариантах – филамин (α , γ), легкая цепь миозина (Mylc2, Mylc3), миозин-связывающий белок (Mybp-c, Mybp-h), небулин (-1, -2), актин (α , β), титин (α , β), миозенин, тропонин С, в трех – актинин, тропомиозин, миомезин, тропомодулин, в четырех – актин-блокирующий белок, в пяти – тяжелая цепь миозина. Компоненты сигнального пути Pi3K, Akt, TOR также обнаруживались в транскриптоме в двух близких копиях, а кальпаин-3 и миопалладин-подобный белок – в двух сплайс-вариантах. Происхождение генных копий, кодирующих белковые паралоги, берет начало в эволюционной истории кл. Teleostei, а именно в полногеномной дупликации (WGD), имевшей место 300–250 млн лет назад, в момент выделения надкласса лучеперых рыб Actinopterygii (включающего кл. костистых рыб, Teleostei) от общей ветви с другими позвоночными, включая Tetrapoda. На более позднем (95 млн лет назад) этапе эволюции лососевых рыб (сем. Salmonidae) произошел второй раунд полиплоидизации генома (современные лососевые – тетраплоиды; [10]), который привел к еще большему усложнению их белкового репертуара. Судьба образовавшихся копий генов различна: одни закрепились в геноме, другие элиминировались, часть паралогичных последовательностей сохранила предковую функцию (и тогда организм способен производить бóльшие количества определенного белка), другие, дивергентно развиваясь, приобрели новую или, как псевдогены, стали нефункциональны [10]. Помимо структурных и функциональных различий, паралоги саркомерных и регуляторных белков могут по-разному отвечать на действие онтогенетических и средовых факторов. Например, гены Igf-связывающих белков, *igfbp*, присутствующие у *S. salar* в 19 вариантах, дифференциально экспрессируются при действии множественных анаболических и катаболических сигналов [7], легкие цепи миозина и тропонина I тилапии – в ответ на температурный фактор, три паралога миогенного транскрипционного фактора *myoD1 S. salar* – в разных типах волокон, на разных этапах миогенеза и при разном фотопериоде [11, 12].

ГОРМОНАЛЬНАЯ РЕГУЛЯЦИЯ РОСТА

Основным регулятором ростовых процессов в мышечной ткани служит сигнальная система, включающая гормон роста (GH)–Igf-I–Pi3K–Akt/протеинкиназу B–TOR [1, 3, 13, 14] (схематично компоненты сигнального каскада и оказываемые ими эффекты представлены на рис. 1).

GH может действовать как через специфичный трансмембранный рецептор сарколеммы (GHR1), так и опосредованно, путем инициации продукции Igf-I. На многих примерах доказана сильная положительная корреляция между плазматическими уровнями GH и Igf-I, а также уровнем Igf-I и скоростью роста рыб. Циркулирующий Igf-I регулирует секрецию GH по принципу отрицательной обратной связи, кроме того, активность Igf-I зависит от плотности рецепторов Igf-IR и уровня Igf-связывающего белка (Igfbp1b), ингибирующего взаимодействие Igf-I с его рецептором [7]. Синтез большинства ключевых регуляторов роста, включая Igf-I, Igf-II, Igfbp, GHR1, происходит в печени, кроме того, GH и Igfs могут активировать

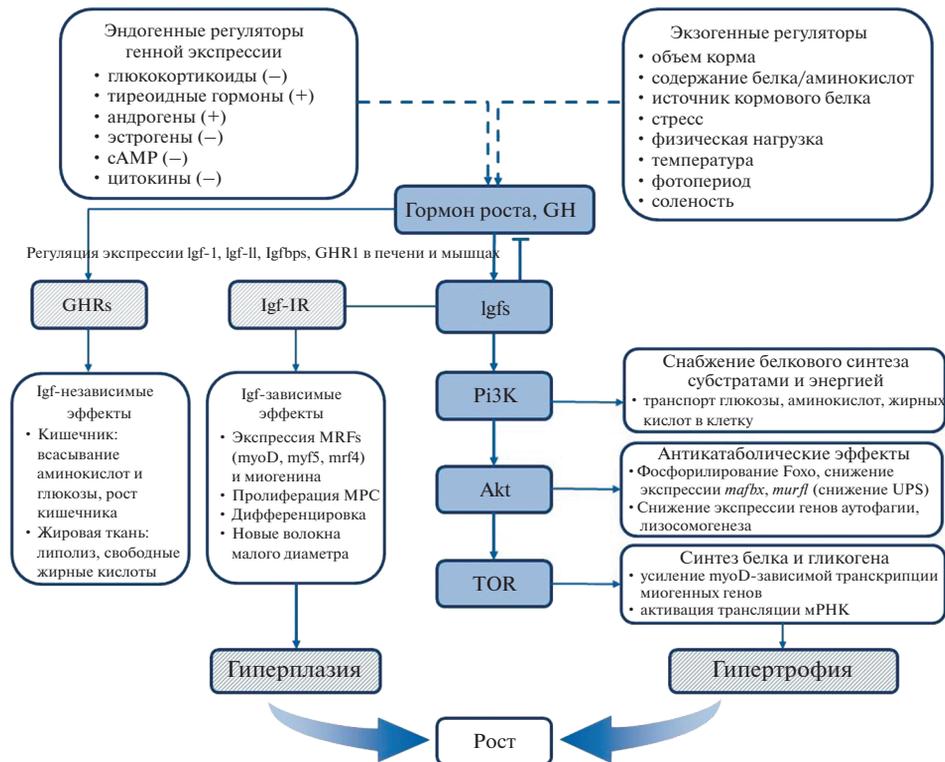


Рис. 1. Центральная гормональная система регуляции роста скелетных мышц у рыб. Система гормон роста/инсулиноподобный фактор роста (GH/Igf) регулирует выработку Igf-I, Igf-II и Igf-связывающих белков (Igfbps). Активация сигнального каскада фосфорилирования инициирует синтез регуляторов клеточной пролиферации и дифференцировки (MRFs), активацию метаболических и регуляторных путей белкового синтеза, подавление протеолитических процессов, то есть активирует мышечный рост по механизмам гиперплазии и гипертрофии. Снижение GH/Igf сигнализации приводит к обратным эффектам: снижению клеточной пролиферации и белкового синтеза, активации протеолиза и в целом снижению скорости роста.

экспрессию гена Igf-I в скелетных мышцах [15]. Более тонкая и стадиейспецифичная настройка регуляции скорости роста скелетных мышц возможна при совместном действии ее основных регуляторов, GH и Igf-I, и других гормонов — инсулина, тиреоидных, стероидных, в большинстве случаев усиливающих анаболическое действие центральной гормональной системы, с некоторыми исключениями для половых гормонов (обсуждаются ниже) [13] (рис. 1). В отличие от млекопитающих, плотность инсулиновой сигнализации в мышцах рыб значительно слабее Igf-I-зависимой, о чем свидетельствуют более низкие плотность рецепторов инсулина и их сродство к лиганду [14]; также отмечена передача части метаболических функций инсулина системе Igf-I. Эффективность Igf-I также значительно превосходит таковую Igf-II (как и у млекопитающих), однако на определенной стадии клеточного цикла (пролиферации миобластов) и в период компенсаторного роста (при выходе из катаболического состояния) их метаболическая роль сопоставима [15, 16]. Ана-



Рис. 2. Активация сигнального пути АМПК в ответ на дефицит энергии (повышение соотношения АМР/АТР) в клетке, вызванный голоданием или другими факторами, приводит к усилению катаболических путей и ингибированию анаболических. Супрессия трансляции и белкового синтеза происходит по пути АМПК-зависимой активации комплекса TSC1–TSC2, ингибитора TOR.

болический эффект Igf-I в скелетных мышцах рыб связан со стимуляцией как миогенеза (гиперплазии), так и метаболизма (гипертрофии). Метаболические функции Igf-I направлены на снабжение миоцитов метаболитами (глюкозой, аминокислотами, азотистыми основаниями, жирными кислотами), синтез гликогена и белков, окисление жирных кислот (в меньшей степени – глюкозы), и в целом имеют антикатаболическую направленность (рис. 1).

Катаболизм белков мышечной ткани напрямую не зависит от уровней GH или Igf-I; он стимулируется инактивацией конечных эффекторов этой сигнальной системы, Akt и TOR, под действием полового стероида 17β -эстрадиола, медиаторов воспаления, стресс-гормонов (преимущественно кортизола); в эксперименте эти ситуации моделируются введением дексаметазона, TNF α , интерлейкина 1β , аминокислотной депривацией [7, 8]. Гормон-зависимым образом снижая уровень циркулирующего Igf-I, Igfbr и(или) Igf-IR, эти биологические регуляторы подавляют фосфорилирование Akt и TOR, что приводит к повышению синтеза и(или) посттрансляционной модификации протеиназ, включая апоптотические, аутофагические, субъединицы протеасом, катепсин L, каталитические субъединицы μ - и m -кальпаинов (*capn1* и *capn2*), и снижение уровней их регуляторов, включая убиквитинлигазы, изоформы кальпастина (*cast-L*, *cast-S*) [7, 8]. Киназа TOR является ключевым сенсором обеспечения клетки энергией, нутриентами (аминокислотами) и ростовыми факторами. Фосфорилированный TOR – положительный регулятор пролиферации и биосинтеза и отрицательный – аутофагии. В зависимости от иницирующего фактора к TOR ведут разные сигнальные пути: (а) энергетический

баланс (соотношение AMP/АТФ): AMPK–TSC1/TSC2–TOR, (б) уровень аминокислот: Akt–TOR; (в) факторы роста: PI3K–Akt–PDK1–TSC1/TSC2–TOR. На схеме (рис. 2) приведен сигнальный путь AMP-активируемой протеинкиназы (AMPK), активация которого в условиях дефицита энергии способствует выживаемости клетки, в том числе за счет ингибирующего влияния на TOR.

МЕХАНИЗМЫ РОСТА СКЕЛЕТНЫХ МЫШЦ

Неограниченный потенциал к росту – наверное, самое яркое отличие мышечной ткани рыб. Механизм роста скелетной мускулатуры у всех позвоночных возможен по двум путям: за счет увеличения количества волокон (гиперплазии) и роста мышечных волокон в объеме (гипертрофии). У млекопитающих гиперпластический рост наблюдается только в эмбриональном развитии, и гипертрофия – единственный способ прироста мышечной массы в постнатальный период. У рыб, напротив, способность к образованию новых волокон сохраняется в течение всей жизни.

Поскольку скелетная мышца представляет собой многоядерную, терминально дифференцированную ткань, для постэмбрионального *гиперпластического роста* необходим источник пролиферации – миогенные прогениторные клетки (MPC). Регуляция активности MPC в эмбриональном и постэмбриональном развитии детально освещена в обзорах [4, 17–19]. На эмбриональном этапе адаксиальные и задние сомитные клетки дают начало двум морфофункциональным типам мышц, формирующим первичный миотом. В позднем эмбриогенезе и у ранних личинок новые мышечные волокна образуются зонально (*стратифицированная гиперплазия*), среди дискретных слоев белых и красных мышц выделяется промежуточный тип – с высокой гликолитической и средней аэробной способностью [18]. Принадлежность клеток к одному из типов определяется специфическими миогенными регуляторными факторами (MRF), среди которых *myoD*, *myf5* и *mrf4* служат регуляторами транскрипции и относятся к семейству транскрипционных факторов bHLH, а миогенин (*myoG*) в сложном взаимодействии с *myoD* вызывает дифференцировку миобластов и инициацию в них генной экспрессии по мышечному типу [3, 20]. Ключевой негативный регулятор миогенеза, миостатин (*mstn*; член семейства TGF-β), способен подавлять пролиферацию и дифференцировку миоцитов у рыб, снижая пролиферативный эффект Igf-I у рыб и млекопитающих [21]. Регуляция экспрессии паралога MRFs может быть дифференциальной, например, паралоги *myoD* регулируют разные стадии миогенеза: *myoD1b* и *myoD1c* – клеточный цикл, а *myoD1a* – терминальную дифференцировку [20]. На личиночном и постличиночном (до конца жизни) этапах рост быстрых мышечных волокон происходит по пути *мозаичной гиперплазии* – MPC сливаются с образованием новых мышечных трубок на поверхности уже существующих мышечных волокон, так что по мере роста рыбы в ее мышцах обнаруживаются волокна разного диаметра [1, 20, 22]. Вместе с новыми MPC в мышечное волокно включаются и дополнительные ядра, оно увеличивается в длину и в диаметре [22]; с возрастом также увеличивается толщина соединительнотканых миосепт. Особенно активен процесс мозаичной гиперплазии в мышцах рыб до достижения ими 40–50% максимальной длины тела [3], затем этот процесс прогрессивно снижается; тем не менее, в любом возрасте миогенез включает стадии пролиферации, миграции, элонгации, слияния миобластов, терминальной дифференцировки и сборки саркомеров. Регуляция роста мышц, включая транскрипционные факторы и сигнальные молекулы, и соотношение процессов гиперплазии и гипертрофии на всех стадиях жизненного цикла изучены в деталях [1, 4, 20, 23]. Следует подчеркнуть, что гиперпластический рост, включающий

стимуляцию экспрессии MRF, клеточную пролиферацию и миогенную дифференцировку, также находится под контролем гормональной системы GH/Igf.

Другое, не менее важное значение центральной гормональной системы мышечного роста GH/Igf – метаболическое – определяет интенсивность *гипертрофии*. В условиях, благоприятствующих росту, наблюдается Igf-зависимый приток метаболитов в миоциты, их использование для синтеза гликогена и белков, окисление жирных кислот и глюкозы. Конечный эффектор системы – TOR – консервативный анаболический регулятор, координирующий сигналы от ростовых факторов и нутриентов (главным образом, аминокислот) и определяющий интенсивность белкового синтеза. Высокая трансляционная и синтетическая активность на пролиферативном этапе миогенеза зависит от фосфорилирования и генной экспрессии TOR, которые индуцируются Igf-II (его присутствие подтверждено не у всех видов рыб) и аминокислотами [15]. На более поздних этапах миогенной дифференцировки решающую роль в активации TOR и регуляции синтеза миофибриллярных белков, включая тяжелую цепь миозина (*Myhc*), играет Igf-I [13, 14]. Уровень генной экспрессии *Myhc*, наиболее многочисленного в составе миофибрилл полипептида, признан маркером мышечного роста [24, 25]. В целом гипертрофия мышц и белковый синтез у личинок и взрослых особей рыб регулируются по сходным с млекопитающими механизмам и положительно взаимосвязаны со скоростью роста, поступлением белка с пищей, объемом рациона, температурой.

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МОДИФИКАЦИИ МИОГЕНЕЗА РЫБ

Скорость роста рыб, включая накопление массы скелетных мышц, решающим образом зависит от условий окружающей среды, однако в эксперименте получены генетические варианты, различающиеся скоростью роста. Триплоидные особи коммерчески ценных видов, например, атлантического лосося *S. salar*, имеют ряд преимуществ над диплоидными, но генетические различия не затрагивают плазматические концентрации GH и Igf-I и не отражаются значимо на скорости их роста [26]. Одним из первых достижений по ускорению роста аквакультурных видов путем генетических манипуляций и первым трансгенным животным на рынке продуктов питания человека стал атлантический лосось, известный под коммерческим названием AquaBounty fish. Благодаря генному конструкту *opAFP-GHc2*, включающему последовательности гормона роста чавычи, который продуцируется круглогодично, а не только в летний нагульный период, как у других лососевых [27], и промотора белка-антифриза угревидной бельдюги, трансгенный лосось достигает товарной массы 3.0 кг за 18 мес., быстрее на год. Миогенные регуляторные факторы также становятся объектом генетических манипуляций, пока менее успешных в практическом отношении, чем в случае гормона роста. Так, при попытке получить “double-muscle” фенотип радужной форели за счет подавления действия миостатина, был получен генетический вариант с измененным рецептором активина ПВ типа *acvr2bδ*, связывающимся на поверхности клеток с ростовыми факторами семейства TGF-β, включая миостатин. Вопреки ожиданиям, сниженное сродство рецептора к миостатину привело не к стимуляции миогенеза, а к нарушению закладки мускулатуры (в виде локализованных скоплений) и асимметричному росту мышц в латеральной плоскости [28].

Несмотря на различия физиологии мышечной ткани у рыб и млекопитающих, рыбные объекты пригодны для моделирования заболеваний человека. Так, нуле-

вой по дистрофину *sarje* мутант *Danio rerio* может служить моделью мышечной дистрофии Дюшенна [29], наряду с более изученным объектом — мышцами линии *mdx*. Сходным образом у разных видов в отсутствие дистрофина нарушается проницаемость сарколеммы, и в клетку поступает избыток Ca^{2+} (до 200–500 нМ), что указывает на дисрегуляцию Ca^{2+} -зависимых процессов (в частности, активности кальпаинов) как причину атрофических изменений [30]. Нарушения гомеостаза Ca^{2+} разной степени выраженности сопровождают развитие всех двадцати описанных видов мышечных дистрофий человека.

ПУТИ БЕЛКОВОЙ ДЕГРАДАЦИИ

В скелетных мышцах рыб присутствуют разнообразные протеиназы, протеолитические комплексы и многочисленные пептидазы, консервативные у позвоночных. Состав деградомы (совокупности протеиназ, их регуляторов и лигандов) рыб более сложен, поскольку некоторые последовательности (в силу описанных выше причин) синтезируются в двух копиях, а у лососевых рыб — до четырех [10]. Основные белок-деградирующие системы мышц — Ca^{2+} -зависимая (кальпаины), лизосомально-аутофагическая (катепсины) и убиквитин-протеасомная (UPS, 20S и 26S протеасомы) [4, 5, 31–33]. В мышцах млекопитающих в валовом отношении (по количеству продуцируемых пептидов и аминокислот) преобладают UPS и лизосомальный пути [34], а у рыб — лизосомальный и кальпаиновый [35, 36], преимущества которых для пойкилотермных животных заключаются в их энергонезависимости [32, 36]. Помимо отличного от млекопитающих соотношения вклада указанных протеолитических систем в тотальную белковую деградацию, назначение протеиназ рыб более широкое. В ответ на изменение фенотипа скелетных мышц в ситуациях, связанных с повышенными энергозатратами (созревания половых продуктов, нерестовых миграций, голодания), внутриклеточные протеиназы, помимо их роли в базовом обмене клеточных белков, гидролизуют структурные белки скелетных мышц, за счет которых поддерживается жизнеспособность особей [5, 33, 35].

Кальцийзависимые протеиназы семейства кальпаинов и их эндогенный ингибитор, кальпаастатин, функционируют как единая регулируемая протеолитическая система [31, 32]. В саркомере кальпаины обнаруживаются в ассоциации с миофибриллами (кальпаин 3, специфичный для скелетных мышц) или растворены в саркоплазме (μ - и m -кальпаины, дифференцирующиеся по уровню активирующего Ca^{2+} , и кальпаин 11) совместно с кальпастатином. Кальпаины по многим механизмам формируют и поддерживают структуру миофибрилл, участвуя в слиянии миобластов, реорганизации их цитоскелета, физиологическом обмене миофибрилярных белков и их деструкции [32]. Локализованные вблизи Z-дисков саркомера, кальпаины активируются на самых ранних этапах деструкции миофибрилл [31]. Иницируя ограниченный гидролиз структурообразующих белков, например, титина или небулина, кальпаины освобождают миофибрилярные белки для их процессинга протеасомами или катепсинами [31, 33]. В сравнении с кальпаинами млекопитающих, кальпаины рыб гидролизуют более широкий спектр саркомерных белков, включая титин, $\text{Myh}c$, тропомиозин, α -актинин, тропонины T и I, десмин [33]. Патологические процессы в мышечной ткани животных обычно сопровождаются нарушениями гомеостаза Ca^{2+} с последующей активацией кальпаинов [30, 32].

Лизосомальные протеиназы, катепсины, гидролизуют белки, белковые агрегаты, дефектные органеллы клетки при низких значениях pH внутри везикул — аутофаголизосом [34, 37]. У рыб обнаружены более десяти различных катепсинов четырех

каталитических типов с наиболее высокой гидролизующей способностью катепсина D, второстепенной – катепсинов В, Н и L [5, 38]. Субстратами катепсина D среди миофибриллярных белков являются Myhc, актин, тропомиозин [38]. В мышцах рыб аутофагический путь угнетается эндогенными ингибиторами (цистатинами) и избытком свободных аминокислот, а активируется вследствие дефосфорилирования или ингибирования TOR при голодании, оксидативном стрессе и инфекциях [37, 39]. По лизосомальному пути в мышцах млекопитающих и рыб гидролизуются сходное количество белков – около 40% [36]. Недостаточность аутофагии в мышцах нарушает их функции – наблюдается атрофия, сниженная сократительная способность [34].

Убиквитин-протеасомная система (UPS) включает 20S и 26S протеасомные комплексы, в полости которых расщепляются любые полипептиды. Селективность протеасомной белковой деградации достигается АТФ-зависимым мечением субстрата полиубиквитином [40] при участии E3 убиквитинлигаз, среди которых *murfl*, участвующая в гидролизе миофибриллярных белков (включая Myhc), и *mafbx*, определяющая скорость белкового синтеза за счет регуляции транскрипционных факторов, таких как *myoD* [41]. Основное назначение протеасом в клетке – контроль клеточного цикла и качества синтезируемых клеткой белков, элиминация стадие-специфичных, избыточных и дефектных. В большинстве тканей млекопитающих это доминирующий путь белковой деградации (до 90% от общей), несколько ниже его активность в скелетных мышцах (до 62%), что связано с труднодоступностью миофибриллярных белков [36, 41]. Протеасомы преимущественно расщепляют мономерные полипептиды [41], поэтому гидролизу в протеасомах должны предшествовать дополнительные протеолитические этапы, например, с участием кальпаинов или каспазы-3, повышающие доступность субстратных белков [31]. В мышцах рыб содержание компонентов протеасом значительно ниже, чем в других органах (например, гонадах и печени; [36]), а их гидролизующая способность составляет менее 4% тотального протеолиза. Преобладание UPS-зависимой деградации белка как в базовом белковом обмене, так и при атрофии (вызванной заболеваниями, голоданием, кортикостероидами и др.) – отличительная черта скелетных мышц млекопитающих [41], а у рыб ведущую роль в атрофии белых мышц играет лизосомальная аутофагия. Тем не менее, млекопитающих и рыб связывают консервативные пути регуляции UPS-зависимой мышечной атрофии, например, ее снижение в период активного роста, когда циркулирующий IGF активирует каскад фосфорилирования Akt и Foxo, а последний подавляет экспрессию генов убиквитинлигаз *murfl* и *mafbx* (рис. 1), и, напротив, стимуляция при действии провоспалительных агентов, например цитокина TNF- α , активирующих NF- κ B путь и экспрессию его генов-мишеней, включая *murfl* [7, 42]. По некоторым данным функциональная активность сигнального пути регуляции протеасомного протеолиза Akt/Foxo, основного в мышцах млекопитающих, у рыб снижена [42].

Любой белок имеет ограниченный срок существования (период полужизни), определяющийся скоростью накопления конформационных изменений, делающих белок более доступным (и узнаваемым) для протеиназ; растворимые белки цитоплазмы чаще короткоживущие, а белки миофибрилл – долгоживущие. Утративший нативную конформацию и нефункциональный белок подлежит замене, даже если он является компонентом такого сложного белкового ансамбля, как миофибрилла. Миофиламенты скелетных мышц рыб короче и менее компактно организованы, чем у млекопитающих, поэтому легче подвергаются “разборке” протеиназами. Клеточные протеиназы участвуют не только в базовом обмене мышечных белков, но и при соответствующих активирующих сигналах способны

вызвать обширный протеолиз в белых (но не красных) скелетных мышцах, приводящий к обратимым или необратимым деструктивным (атрофическим) изменениям ткани. Вслед за повреждением, мышцы рыб регенерируют путем восстановления пула утраченных белков миофибрилл и синтеза новых волокон, то есть по механизмам гипертрофии и гиперплазии. В связи с этим выделяют модель *компенсаторного роста* – ответной реакции на снятие вызвавшего катаболизм фактора, например, смену голодания кормлением; для него характерна очень высокая скорость [3]. У млекопитающих регенеративные способности мышечной ткани ниже, и атрофия с большей вероятностью приводит к фиброзу, то есть замещению разрушенных и не подлежащих регенерации тканей соединительнотканными элементами.

ПЛАСТИЧНОСТЬ МЫШЦ

В силу генетической детерминированности, рост млекопитающих лишь незначительно варьирует при изменении условий окружающей среды и по достижении половой зрелости обычно выходит на плато [43]. Напротив, рост рыб гораздо в большей степени зависит от внешних условий – температуры, конкуренции, обилия пищи – и у абсолютного большинства видов продолжается в течение всей жизни [1, 4, 6]; однако из этого правила есть исключения: например, популярный модельный вид *Danio rerio* имеет дефинитивный размер (представитель того же рода, *D. aequipinnatus* – нет). По мере роста рыб и на разных этапах их жизненного цикла скелетные мышцы претерпевают значительные модификации для обеспечения метаболических потребностей и плавательной способности – основной своей функции. Высокая пластичность сократительного и метаболического фенотипа мышц обеспечивается всеми компонентами миотомов: наиболее многочисленными в их составе мышечными волокнами, а также МРС, нервными волокнами, соединительной тканью, фибробластами, скелетными остеоцитами, адипоцитами, клетками эндотелия капилляров.

Начиная с эмбрионального этапа, ростовые процессы (экспрессия MRF) регулируются внешними факторами, прежде всего, *температурой* [20, 44], при этом температурный режим эмбриогенеза сказывается на всей последующей жизни рыбы, поскольку именно он определяет модель роста, включая дефинитивное количество и размер мышечных волокон, и, в конечном счете, текстуру мышц [17, 22, 23]. На постэмбриональном этапе скорость миогенеза также регулируется MRF, экспрессия которых зависит от температуры, доступности корма, фотопериода [12, 45].

Трофический фактор признан ведущим в регуляции экспрессии и синтеза гормонов системы GH/Igf-I, при этом самостоятельным значением обладают количество потребляемого корма, содержание и источник кормового белка, его аминокислотный состав, смена голодания насыщением [4, 46]. При достаточном и сбалансированном по макронутриентам питании, помимо Igf-I, вырабатывается Notch-2, который, как полагают, стимулирует пролиферацию миобластов и ингибирует их дифференцировку посредством ингибитора Numb [47]. Активация генной экспрессии Notch-2 и метаболических ферментов (например, глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы) может указывать на более высокую скорость метаболизма и активность миобластов у рыб, растущих в оптимальных условиях.

Помимо температурного и алиментарного факторов, для регуляции ростовых процессов в мышцах важен *фотопериод*. Продолжительность светового дня часто сигнализирует о близких изменениях температурного режима и влияет на скорость роста, включая активность МРС [45]. При увеличении фотопериода, в белых мыш-

цах *S. salar* значительно увеличивается количество волокон “быстрого” типа и миофибрилл небольшого диаметра, то есть происходит избирательная активация гиперплазии (но не гипертрофии) [45]. Увеличение фотопериода в искусственных условиях приводит к стимуляции углеводного обмена, миогенеза [12] и снижению активности протеиназ [48] в скелетных мышцах; наиболее выраженный анаболический эффект оказывает круглосуточная освещенность [12]. При длительном освещении у атлантического лосося *S. salar* увеличивается уровень ГН [49], что ведет к увеличению длительности активного плавания и питания, а большая доля энергетических ресурсов направляется на рост, а не другие метаболические пути. Сочетанное повышение температуры (в пределах оптимального диапазона для вида) и длительности светового дня относительно естественных, приводят к ускорению роста особей, однако более высокая температура (но не фотопериод) негативно сказывается на текстуре мышц рыб, вызывая их размягчение [49]. Искусственно изменяя средовые факторы – температуру, фотопериод – можно обратить действие гормональных сигналов, что указывает на приоритет экзогенных влияний над эндогенными. Так, у рыб умеренных широт снижение длительности светового дня служит сигналом к началу репродуктивного цикла, но этот процесс можно затормозить постоянным освещением, а полного угнетения половых циклов можно добиться сочетанным влиянием постоянной освещенности и пониженной температуры [50]. Сезонное увеличение длительности фотопериода, наряду с повышением температуры воды, служит для анадромных рыб (сем. Salmonidae) сигналом к смолтификации – подготовке к миграции из пресной воды в морскую. Готовность особей к миграции в море зависит от достижения ими пороговой массы, поэтому в период, предшествующий смолтификации, в их скелетных мышцах сильны анаболические процессы [51, 52]. Перестройка ионорегуляции у рыб в период смолтификации регулируется гормональным взаимодействием кортизола и системы ГН/Igf-I [51, 52], и при переносе в морскую воду метаболизм перестраивается по катаболическому типу: в плазме снижается уровень Igf-I, формируется фенотип с задержкой роста. Гормон-зависимая депрессия роста не связана с регуляцией синтеза Igf-I, Igfbp1b, рецептора GR 1 и катепсина L (ctsL), но сопровождается повышенной активностью ctsL, служащей маркером смолтификации [53, 54].

Экзогенные *стресс-факторы*, включая голодание, критические температуры, гипоксию, истощающую двигательную нагрузку и специфичные для рыб смолтификацию и смену солености среды, повышают продукцию глюкокортикоидов, в основном кортизола, у рыб. Кортизол вызывает перераспределение энергетических ресурсов на стимуляцию одних процессов, главным образом, глюконеогенеза, в ущерб другим – синтезу гликогена, пищеварению, иммунным реакциям. Его действие существенно изменяет метаболизм и фенотип белых скелетных мышц: подавляется ГН/Igf-зависимая сигнализация за счет повышенного синтеза Igfbp-1, усиливаются катаболические пути, поставляющие субстраты для окисления в цикле Кребса в мышцах и глюконеогенеза (преимущественно аланин) в печени, и развивается ростовая депрессия [21]. У млекопитающих задержка мышечного роста при стрессе объясняется повышенным синтезом миостатина, однако у рыб корреляция уровней глюкокортикоидов и миостатина не так однозначна [5, 21].

Влияние внешних факторов на нейроэндокринную систему рыб и далее активацию/депрессию белкового метаболизма касается не отдельных молекул, а целых путей и детально описано в исследовании транскриптома тканей морского леща *Sparus aurata* [7]. Например, в ответ на высокотемпературное (повреждающее) воздействие, повышается уровень шаперонов hsp90 и hsp70 и белков,

предотвращающих агрегацию развернутых белков и обеспечивающих целостность структуры цитоскелета. При остром холодовом стрессе рыбы утрачивают аппетит, и наблюдаемая депрессия синтеза и метаболизма белка аналогична той, что вызывается фактором голодания; исходя из этого был сделан вывод, что специфические ответные реакции на температурное воздействие и голодание могут маскировать друг друга.

Действие множественных про-катаболических факторов на рыб, например, в период нереста, может быть синергическим. В результате повышения уровня половых стероидов в ответ на сезонные изменения факторов (температуры, фотопериода) и возросшей потребности в пластическом материале (необходимого для формирования гонад), а также стресс-гормонов как реакции на условия нереста, который может сопровождаться сменой солености, голоданием, истощающей двигательной нагрузкой, наблюдается атрофия белых скелетных мышц разной (видоспецифичной) степени выраженности.

СООТНОШЕНИЕ АНАБОЛИЗМА И КАТАБОЛИЗМА БЕЛКОВ СКЕЛЕТНЫХ МЫШЦ В РАЗНЫЕ ПЕРИОДЫ ЖИЗНЕННОГО ЦИКЛА РЫБ

У всех позвоночных животных для обеспечения энергозатрат и нормального функционирования жизненно важных органов, таких как мозг, в первую очередь утилизируются углеводные компоненты, являющиеся для млекопитающих основным источником энергии. Однако у рыб запасы гликозы незначительны (в силу особенностей рациона) и требуют постоянного восполнения за счет глюконеогенеза. Глюконеогенез осуществляется в печени ферментами гликолитического пути, синтез которых не прекращается даже при сильном истощении, а субстратом являются поступающие из мышц свободные аминокислоты, преимущественно аланин [5]. Энергетическая роль продуктов протеолитической реакции, аминокислот, которые, наряду с липидами, служат массовыми субстратами окисления в цикле трикарбоновых кислот, интермедиатами для окислительного фосфорилирования и предшественниками для глюконеогенеза в периоды с преобладанием катаболических процессов – уникальная особенность метаболизма белых мышц рыб [1, 5, 35].

Ювенильный период. Миогенная дифференцировка и синтетические процессы в миоцитах уравновешены протеолитическими процессами: чем активнее белковый синтез, тем выше скорость белкового обмена, включающего гидролиз синтезированных белков в ходе контроля их качества, замещения нефункциональных/поврежденных, обновления, перестройки цитоскелета при слиянии миобластов. У активно растущих ювенильных особей баланс синтеза и распада белка резко положительный, при том, что максимальной скорости роста соответствует очень высокая активность протеиназ; наиболее четкая зависимость с темпом роста установлена для катепсина В и кальпаинов [32, 55]. У молоди рыб стимуляции роста способствуют половые стероиды, активирующие белковый синтез и всасывание аминокислот в кишечнике [56]. Снижение темпов роста с возрастом касается не только пролиферативных и синтетических процессов, но и белковой деградации [1, 19, 55].

Половое созревание. Половые стероиды, эстрогены и андрогены, оказывают противоположное действие на соматический рост у рыб [57], в то время как хорошо известен их сходный анаболический эффект у млекопитающих. Консервативно для позвоночных основным половым гормоном самок является 17β -эстрадиол, а основными андрогенами – 11-кетотестостерон у рыб и тестостерон и 5α -дигидротестостерон у млекопитающих [56]. В репродуктивный период эстрадиол и тестостерон регулируют синтез компонентов системы GH, Igf-I и Igfbr в печени по раз-

ным путям [57]. Катаболическое действие 17β -эстрадиола (и, вероятно, стероидов, индуцирующих созревание яйцеклеток, например, $17\alpha,20\beta$ -дигидрокси-4-прген-3-она, уникальных для рыб [56]) направлено на снижение экспрессии и синтеза Igf-I и усиление протеолиза, а анаболический эффект 11 -кетотестостерона выражается в повышении чувствительности печени к ГН и стимуляции выработки Igf-I. Стероид-зависимая депрессия роста рыб приводит к ухудшению качества их скелетных мышц за счет расходования запасов жиров и белков. Однако на ранних стадиях полового созревания, параллельно с повышением уровня половых стероидов в плазме и началом (возобновлением) гаметогенеза, скорость соматического роста рыб обоих полов часто бывает выше, чем у незрелых особей, в том числе в силу повышенного аппетита и потребления корма [58]. Фаза ускоренного роста с прекращением питания созревающих особей сменяется его депрессией, и соматический вес начинает снижаться параллельно с быстрым ростом гонад и приближением нереста [58].

Формирование гонад. Рыбы, в сравнении с другими позвоночными, тратят гораздо большую долю энергии на воспроизводство. Благодаря недетерминированному росту, ресурсы для созревания гонад у рыб с возрастом повышаются. Сигналом к половому созреванию самок, оогенезу и увеличению массы их гонад является повышение уровня циркулирующих половых стероидов, главным образом, 17β -эстрадиола [59], и гонадотропинов гипофиза (лютеинизирующего и фолликулостимулирующего гормонов). На стадии трофоплазматического роста ооцитов в гепатоцитах самок происходит массовый синтез вителлогенинов (консервативных гликолипофосфопротеинов, в составе которых доминирует белковая часть – 79%). Энергия и пластические вещества, необходимые для роста гонад, синтеза белков желтка (вителлогенинов) и липидных депо ооцитов, имеют преимущественно эндогенное происхождение, для чего расходуются висцеральные липиды и мышечные белки [60]. Результирующие аминокислоты расходуются прежде всего как строительные блоки для синтеза белков *de novo*, причем не только вителлогенинов, но и самих протеиназ, белков плазмы, транспортирующих аминокислоты в печень, а вителлогенины – в яичники, и ферментов белкового синтеза и процессинга промежуточных соединений, включая гликолитические. Эстрадиол ускоряет катаболизм белков мышечной ткани по механизму эстроген-зависимого снижения уровня Igf-I в плазме [8]. При введении экзогенного эстрадиола атлантическому лососю *S. salar* были получены доказательства избирательной активации лизосомальных (преимущественно катепсина D), но не нейтральных протеиназ, и усиления гидролиза тяжелой цепи миозина (Myhc) [61]. Помимо катепсина D, в мышцах и висцеральных органах фертильных рыб повышается экспрессия генов и активность катепсинов B, L, кальпаинов и, в меньшей степени, протеасомы и каспаз [35]. Активации катепсинов в ходе созревания половых продуктов также способствует одновременное снижение уровня их эндогенных ингибиторов (показано на айю *P. altivelis*; [62]). Динамика протеолитической активности в органах лососевых в ходе оогенеза [32] свидетельствует о максимальной активности протеиназ в печени и белых мышцах самок на этапе трофоплазматического роста ооцитов, то есть в период наиболее активного синтеза и транспортировки резервных веществ в ооциты. По окончании оогенеза масса яичников достигает 20–25% массы рыбы, а в последующий период овуляции составляет около 1%.

Плавательная нагрузка. Высокая двигательная активность мигрирующих рыб сопровождается выбросом в кровь тестостерона, к моменту достижения рыбами нерестилищ его уровень падает. Повреждающая нагрузка является причиной не только механического стресса всех задействованных структур тела, но и оксидативного

стресса, приводящего к образованию перекисей липидов и окисленных белков [63]. Повышенные потребности в гидролизе белков и утилизации их окисленных форм приводят к активации кислых и нейтральных протеиназ. Выявлен высокий коэффициент корреляции уровня половых стероидов, особенно андрогенов, и активности кальпаинов в мышцах рыб, с активностью катепсинов эта связь не такая четкая. Тем не менее, именно активация катепсина D, совместно с другими лизосомальными катепсинами – катепсином L и катепсин-L-подобными ферментами [64] – вызывают наибольшие деструктивные изменения. Эффект физической нагрузки у радужной форели был изучен в эксперименте по вынужденному длительному плаванию в зимний период [32]; наблюдаемая стресс-реакция и снижение выживаемости рыб объяснялись прогрессирующей атрофией мышц, включая сердечную.

Ограничение диеты и голодание. Алиментарный дефицит, голодание, несбалансированный состав корма оказывают негативное влияние на состав и скорость роста мышечной ткани рыб. Количественное содержание белка и его источник важны для регуляции роста, особенно рыбадных видов (включая лососевых), поскольку только белок животного происхождения гидролизует в достаточной степени ферментами их желудочно-кишечного тракта и имеет полноценный аминокислотный состав для обеспечения роста [26, 65]. У теплокровных метаболизм при голодании изменяется аналогично длительному стрессу, с повышением уровня кортикостероидов в крови, снижением скорости роста и белкового синтеза, повышением экспрессии/активности протеиназ и экскреции конечного продукта обмена мышечных белков, 3-метилгистидина; возобновление питания приводит к развитию обратных процессов [66]. Сходство ответной реакции теплокровных и рыб на голодание включает, во-первых, снижение скорости белкового синтеза и, во-вторых, усиленную деградацию мышечных белков, при непродолжительном голодании – саркоплазматических, затем – миофибриллярных [65, 67]. Вместе с тем, для рыб голодание – естественный и продолжительный (до 6 мес. у рыб умеренных широт) этап годового цикла, и можно ожидать выраженные отличия в его механизмах. С использованием ДНК-микрочипов выявлены около 200 дифференциально экспрессирующихся белок-кодирующих генов в атрофированных мышцах *O. mykiss* [68]. Регулируемое снижение скорости белкового синтеза происходит за счет снижения активности генов рибосомальных белков и позволяет сократить расход аминокислот и АТФ в условиях их дефицита [67] (рис. 2), о котором свидетельствует увеличение активности аденилаткиназы-1 – показателя энергетического баланса в тканях [69]. Пищевая депривация вызывает тотальную супрессию белкового синтеза в печени и мышцах рыб, включая гены ферментов углеводного метаболизма, особенно гликолитических, белков саркомеров, внеклеточного матрикса, биосинтеза белков и липидов, а также гены протеиназ (μ -кальпаина *capn1*, малой субъединицы кальпаинов *cpns*, субъединиц протеасом $\alpha 5$, $\beta 3$, N3, регуляторной субъединицы) и их регуляторов (полиубиквитина, кальпастатина *cast-L*) [67]. Белковый состав мышечных волокон изменяется в направлении “медленного” фенотипа путем активации экспрессии генов трех саркомерных белков – *Myh3b*, медленных вариантов *Myhc2* и тропонина 2 [67]. Этот паттерн генной экспрессии хорошо коррелирует с фенотипическими характеристиками мышечной атрофии – массой, содержанием белка, развиваемым усилием [68]. Вместе с тем наблюдается повышение экспрессии катептических и коллагенолитических ферментов и активация всех протеолитических путей; это означает, что активность протеиназ при голодании регулируется в основном на посттрансляционном этапе, например, за счет активации ранее синтезированных проферментов и сниженного уровня их эндогенных ингибиторов [70]. Кроме того, возможно избирательное участие специ-

фичных протеиназ в мобилизации тканевых белков в условиях голодания, о чем свидетельствует повышенная экспрессия m-кальпаина (*capn2*) в мышцах форели [67]. Транскриптомный анализ атрофированных мышц половозрелой *O. mykiss* показал [71], что, как и у млекопитающих, в развитии атрофии значима роль UPS. При восстановлении питания активность кальпаинов и генная экспрессия некоторых белков UPS снижаются [70]. Степень воздействия голодания определяется его продолжительностью и тяжестью сопутствующих неблагоприятных факторов – низких или высоких температур, энергетического дефицита. Реакция на голодание у немигрирующих видов приводит к более быстрому истощению эндогенных резервов, в частности, содержание мышечных белков у *Ictalurus punctatus* достигает минимума уже при 35-суточном голодании [72], а у видов, не переходящих в преднерестовый период на эндогенное питание, например, у сиговых (сем. Coregonidae), активация тканевых протеиназ и расход мышечных белков незначительны [32]. Переход на эндогенное питание приводит на первом этапе к истощению углеводных и липидных запасов и более позднему (начиная с середины периода низких температур при зимовальном голодании) расходованию белковых резервов. Глубокая степень истощения приводит к гидролизу белков жизненно важных органов – печени, жабр и других, соединительнотканых элементов скелетных мышц, сердечной и гладких мышц сосудов, неспособных или ограниченно способных к регенерации.

Смолтификация. Анадромные рыбы (сем. Salmonidae) на стадии смолтификации претерпевают физиологические изменения для миграции из пресной воды в морскую. У атлантического лосося *S. salar* готовность к такой миграции определяется достижением определенной массы, поэтому в предшествующий период особи активно питаются и растут по путям активации белкового синтеза и депрессии белкового катаболизма [51, 54, 73]. Достаточная масса резервных веществ необходима особям *S. salar* для успеха в конкуренции за пищевые ресурсы и перестройки осморегуляции при смене солёности среды обитания. Это энергозатратный процесс, зависимый от гидролиза мышечных белков и направленный на увеличение количества хлоридных клеток в жабрах и синтез изоформ Na,K-АТФазы ($nka\alpha 1b$) и $NaK^+/2Cl^-$ -котранспортера 1a ($nkcc1a$), обеспечивающих повышенную способность жабр к секреции солей морской воды [52]. Смолты кумжи *S. trutta* к моменту ската в море часто не обладают ни достаточной массой, ни сформированной системой осморегуляции. В этих условиях их выживание поддерживается частной адаптивной стратегией, основанной на осмотической активности аминокислот, которыми обогащаются ткани за счет протеолиза эндогенных белков [54, 74]. Этот способ поддержания осмолярности клеток роднит анадромных рыб с более примитивными организмами, обитающими в водоемах с неустойчивым солёностным режимом [74]. Оба упомянутых вида в период смолтификации перестраивают метаболизм по катаболическому типу за счет сниженного уровня Igf-I в плазме, но избыток аминокислот у *S. trutta* служит осмотической устойчивости, а *S. salar* – энергозатратному процессу осморегуляции [51, 52, 54]. Виды также различаются протеолитическими путями, активирующимися при смолтификации: у кумжи преимущественно активируются кальпаины, а у лосося – катепсин L [54, 73].

Нерест. Степень деструкции белых скелетных мышц и пути расходования гидролизованных белков могут различаться у разных видов рыб в зависимости от продолжительности и сложности нерестовой миграции. Эти изменения у большинства видов обратимы и компенсируются в нагульный период; однако при любом сценарии нерест является причиной истощения рыб и их высокой смертности. Так, производители трехиглой колюшки *G. aculeatus* (сем. Gasterosteidae), мигрирующие из

открытого моря на мелководные морские нерестилища, не испытывают необходимости в адаптации к новой среде обитания и продолжают питаться, частично возмещая потери вещества и энергии. Однако при этом особи теряют до четверти массы тела, а в их мышцах обнаруживается на 70% меньше белка, как за счет его гидролиза, так и гидратации скелетных мышц [75]. Гибель колюшки в ходе нереста высока, особенно среди самцов, затрачивающих ресурсы, помимо прочего, на конкуренцию за лучшие местообитания и заботу о потомстве [76]. Анадромные рыбы сем. Лососевые, в ходе нереста мигрирующие из морей в пресные водотоки, испытывают более выраженное истощение, до половины массы тела, в силу анорексии, высокой продолжительности миграционного пути, необходимости в перестройке осморегуляции. У атлантических лососей рода *Salmo*, способных к неоднократной миграции в течение жизни, изменения в скелетных мышцах обратимы, а у немигрирующего подвида атлантического лосося *S. salar* гидролиз мышечных белков вообще ограничивается их саркоплазматической фракцией и не затрагивает миофибриллярную [5]. Однако нерест тихоокеанских лососей рода *Oncorhynchus* представляет собой квинтэссенцию энергетических затрат и белкового истощения мышц. Именно тихоокеанские лососи оказались идеальной экспериментальной моделью для анализа механизмов срочной мобилизации белков и метаболизма результирующих аминокислот [5]. Их нерест включает тысячекилометровую миграцию из морской воды в пресную, с передвижением против течения, а значит, и все энергозатратные составляющие — истощающую двигательную нагрузку, голодание, формирование гонад, гипоосмотическую адаптацию — при этом деструктивные процессы достигают “точки невозврата” с невозможностью дальнейшей регенерации и оканчиваются гибелью производителей. Так, у кеты *O. keta* во время подхода к нерестилищам относительная масса костей увеличивается в 1.5 раза, кожа — в 2.5 раза, содержание сухого вещества в мышцах снижается более чем в два раза, почти полностью расходуются липиды (на 98.4%) и азотистые вещества (на 57%). В белых мышцах нерки *O. nerka*, кеты *O. keta* [64], айю *P. altivelis* [62] по ходу миграции десятикратно возрастает протеолитическая активность катепсина D и в меньшей степени — карбоксипептидазы A и других лизосомальных ферментов [5], причем активация происходит за счет избирательного усиления их синтеза, а не по другим механизмам. Ведущая роль катепсина D в атрофии скелетных мышц специфична для рыб (у млекопитающих мышечная атрофия катепсин D-независима). Эти результаты подчеркивают силу стресса, связанного с нерестом, и указывают на роль гормонов стресса, в частности, кортизола, в регуляции активности лизосомальной аутофагии [5]. Вероятно, фатальные последствия имеет генерализованный характер протеолиза у нерестящихся рыб, затрагивающий, помимо скелетных, сердечную и гладкие мышцы, а также внутримышечную соединительную ткань. Так, в мышцах тихоокеанских лососей айю *P. altivelis* и радужной форели *O. mykiss* отмечена дезинтеграция межклеточной соединительной ткани и деградация коллагена I типа матриксной металлопротеиназой 13 [77]. Однако решающее значение для выживания и успешного выхода из катаболического состояния, по-видимому, имеют эволюционно детерминированные программы жизненного цикла. В случае тихоокеанских лососей — это семелпарная стратегия размножения, приводящая к посленерестовой гибели производителей даже у немигрирующих подвидов, например, озерной красной нерки *O. nerka kennerlyi*, затраты ресурсов у которых невысоки и направлены лишь на формирование гонад [5].

Старение. Благодаря недетерминированности роста и, как следствие, отсутствию возрастных деструктивных изменений в мышечной ткани, рыбы являются уникальной моделью в поиске путей борьбы с саркопенией и могут составить

конкуренцию модельным грызунам с ускоренным (линии SAM) или замедленным (линии Snell, Ames, питающихся с ограничением калорий) старением, возрастные изменения у которых при любых экспериментальных манипуляциях неизбежны и могут идти только по путям, свойственным млекопитающим [19]. Лишь у тех немногих видов рыб, рост которых детерминирован, таких как данио *D. rerio*, можно говорить о возрастной дегенерации мышц. Саркопения у рыб и млекопитающих имеет сходные гистоморфологические и биохимические проявления, включающие фиброз, возрастную динамику активности β -галактозидазы, накопление окисленных белков. Критические дегенеративные изменения мышц у нерестящихся тихоокеанских лососей имеют сходную с ускоренным старением морфологию, но отражают, прежде всего, семелпарную стратегию их размножения [78].

Патологии мышечной ткани. Специфические, генетически обусловленные заболевания мышечной ткани у рыб природных популяций не описаны, вероятно, в силу летальности таких фенотипов. Путем генетических модификаций, направленных на изучение роли отдельных белков, миогенных регуляторов и рецепторов в физиологии мышцы, были получены экспериментальные модели с нарушенным миогенезом, функциональными дефектами, атрофией, ускоренным синтезом белков мышечной ткани [19, 79]. Миопатии у рыб могут иметь вторичный характер и развиваться при системном действии повреждающих факторов, таких как токсиранты или патогены. При экспериментальном моделировании алкогольной миопатии у *D. rerio* наблюдались уменьшение диаметра мышечных волокон, р53-независимое повреждение мышц, дестабилизация сарколеммы, разобщение волокон, NF- κ B-индуцируемое воспаление [80]. Среди аквакультурных лососевых рыб распространено вирус-ассоциированное заболевание – воспаление сердечной и скелетных мышц (ВССМ), развивающееся вследствие избыточного цитотоксического ответа в клетках-мишенях – миоцитах, эритроцитах, макрофагах [81]. Инфильтрация скелетных мышц меланомacroфагами приводит к появлению меланизированных участков, ухудшающих товарное качество рыбы. Специфическая природно-очаговая миопатия – расслоение мышц – было описано у осетровых рыб (родов *Acipenser*, *Huso*) Волго-Каспийского бассейна в конце 80-х гг. прошлого века. Диагностированный “кумулятивный токсикоз с мультисистемным поражением” свидетельствует о ведущей роли загрязнителей среды в развитии заболевания. Пораженные особи, преимущественно самки старших возрастных групп, сохраняли двигательную активность, при том, что при вскрытии в их мышцах (в большей степени, в белых) обнаруживались деструктивные изменения – от разволокнения и лизиса отдельных миофибрилл до прогрессирующего разрушения Z-дисков саркомеров и полного распада всех волокон, образования клеточного детрита, ингибирования энергообмена и синтеза белка. На продвинутых стадиях отмечались гибель целых групп мышц, образование на их месте лакун, мышечная дисфункция вплоть до потери подвижности, летальная для рыб. Биохимические изменения включали активацию множественных протеолитических путей, более выраженную – кальпаинов, менее – лизосомальных протеиназ, причем не только в скелетных мышцах, но и в других органах, что подчеркивает генерализованный характер заболевания [82]. Выживание рыб в неблагоприятных условиях за счет расходования мышечных белков обычно оканчивается этапом восстановления белковых резервов, однако продолжительное воздействие токсикантов может ограничить регенеративные способности мышечной ткани и привести к необратимой ее деструкции.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Данные литературы и собственные наблюдения свидетельствуют о высокой пластичности скелетно-мышечной ткани у костистых рыб. Она проявляется изменчивостью фенотипа мышц в ответ на воздействие внешних факторов среды и трофики, изменяющихся в ходе годового и жизненного цикла. Вариабельность мышечного фенотипа скелетных мышц рыб – способность к быстрому росту, массовой белковой деградации и последующей регенерации – значительно превосходит таковую других позвоночных. Особенности структуры, функций и метаболизма скелетных мышц рыб сформировались в ходе исторического развития этой линии позвоночных животных – пойкилотермных, обитающих в специфической водной среде, имеющих неограниченный потенциал к росту. При всей консервативности сигнальных и метаболических путей анаболизма и катаболизма у позвоночных, белковый состав рыб богаче и сложнее за счет одного или двух раундов полиплоидизации генома, имевших место в эволюции Teleostei или Salmonidae соответственно. Скелетные мышцы и составляющие их белки у рыб служат более широкому кругу функций: помимо движения, это источник вещества и энергии для синтеза белков *de novo* (стадиеспецифичных), глюконеогенеза, окисления.

Уникальные механизмы роста и пластичность скелетных мышц позволяют рассматривать рыб, особенно виды с хорошо изученным геномом, например, *D. rerio*, в качестве моделей в биомедицинских исследованиях и в поиске естественных путей терапии заболеваний человека. Интерес к изучению фундаментальных основ роста и состава скелетных мышц рыб также подкрепляется высокой практической значимостью рыбного сырья в пищевой и кормовой индустрии. На современном этапе генетические и молекулярные основы роста и пластичности мышц рыб все более активно изучаются с применением геномных и постгеномных технологий. С их помощью можно вести поиск генетических полиморфизмов, связанных с хозяйственно ценными признаками (скоростью роста, качества филе, устойчивостью к инфекциям), вести селекционную работу, тестировать биоактивные кормовые компоненты. Тем самым можно добиться повышения эффективности выращивания аквакультурных видов рыб и снижения воздействия рыбохозяйственной деятельности на окружающую среду.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Анализ литературы выполнялся в рамках государственного задания по теме 0218-2019-0076 ИБ КарНЦ РАН, использованные собственные данные по аквакультурным видам получены при поддержке гранта РФФИ № 17-74-20098.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы, редактирование манускрипта (Н.Н.Н.), анализ данных, написание драфта манускрипта (Л.А.Л.), поиск литературы (Н.П.К.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Mommsen TP* (2001) Paradigms of growth in fish. *Comp Biochem Physiol B* 129: 207–219. [https://doi.org/10.1016/s1096-4959\(01\)00312-8](https://doi.org/10.1016/s1096-4959(01)00312-8)

2. Johnston IA (2006) Environment and plasticity of myogenesis in teleost fish. *J Exp Biol* 209: 2249–2264.
<https://doi.org/10.1242/jeb.02153>
3. Johnston IA, Bower NI, Macqueen DJ (2011) Growth and the regulation of myotomal muscle mass in teleost fish. *J Exp Biol* 214 :1617–1628.
<https://doi.org/10.1242/jeb.038620>
4. Valente LMP, Moutou KA, Conceicao LEC, Engrola S, Fernandes JMO, Johnston IA (2013) What determines growth potential and juvenile quality of farmed fish species? *Rev Aquacult* 5(S1): S168–S193.
<https://doi.org/10.1111/raq.12020>
5. Mommsen TP (2004) Salmon spawning migration and muscle protein metabolism: the August Krogh principle at work. *Comp Biochem Physiol B* 139(3): 383–400.
<https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2004.09.018>
6. Hochachka PW, Somero GN (2002) Biochemical adaptation: mechanism and process in physiological evolution. New York: Oxford Univer Press.
7. Garcia de la serrana D, Estévez A, Andree K, Johnston IA (2012) Fast skeletal muscle transcriptome of the Gilthead sea bream (*Sparus aurata*) determined by next generation sequencing. *BMC Genomics* 13: 181.
<https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-181>
8. Cleveland BM, Weber GM (2011) Effects of sex steroids on indices of protein turnover in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) white muscle. *Gen Comp Endocrinol* 174: 132–142.
9. Venugopal V, Shahidi F (1996) Structure and composition of fish muscle. *Food Rev Int* 12(2): 175–197.
<https://doi.org/10.1080/87559129609541074>
10. Macqueen DJ, Johnston IA (2014) A well-constrained estimate for the timing of the salmonid whole genome duplication reveals major decoupling from species diversification. *Proc R Soc B* 281: 20132881.
<https://doi.org/10.1098/rspb.2013.2881>
11. Macqueen DJ, Johnston IA (2006) A novel salmonid myoD gene is distinctly regulated during development and probably arose by duplication after the genome tetraploidization. *FEBS Lett* 580(21): 4996–5002.
<https://doi.org/10.1016/j.febslet.2006.08.016>
12. Churova M, Shulgina N, Kuritsyn A, Krupnova M, Nemova N (2020) Muscle-specific gene expression and metabolic enzyme activities in Atlantic salmon *Salmo salar* L. fry reared under different photoperiod regimes. *Comp Biochem Physiol B* 239: 110330.
<https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2019.110330>
13. Vélez EJ, Lutfi E, Azizi Sh, Perelló M, Salmerón C, Riera-Codina M, Ibarz A, Fernández-Borrás J, Blasco J, Capilla E, Navarro I, Gutiérrez J (2017) Understanding fish muscle growth regulation to optimize Aquaculture production. *Aquaculture* 467: 28–40.
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.07.004>
14. Vélez EJ, Lutfi E, Azizi Sh, Montserrat N, Riera-Codina M, Capilla E, Navarro I, Gutiérrez J (2016) Contribution of in vitro myocytes studies to understanding fish muscle physiology. *Comp Biochem Physiol B* 199: 67–73.
<https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2015.12.003>
15. Azizi Sh, Nematollahi MA, Mojazi Amiri B, Vélez EJ, Salmerón C, Chan SJ, Navarro I, Capilla E, Gutiérrez J (2016) IGF-I and IGF-II effects on local IGF system and signaling pathways in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) cultured myocytes. *Gen Comp Endocrinol* 232: 7–16.
<https://doi.org/10.1016/j.ygen.2015.11.011>
16. Caldwell LK, Pierce AL, Nagler JJ (2013) Metabolic endocrine factors involved in spawning recovery and rematuration of iteroparous female rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Gen Comp Endocrinol* 194: 124–132.
<https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2013.09.005>
17. Steinbacher P, Marschallinger J, Obermayer A, Neuhofer A, Sängler AM, Stoiber W (2011) Temperature-dependent modification of muscle precursor cell behaviour is an underlying reason for lasting effects on muscle cellularity and body growth of teleost fish. *J Exp Biol* 214: 1791–1801.
<https://doi.org/10.1242/jeb.050096>
18. Rowlerson A, Veggetti A (2001) Cellular mechanism of post-embryonic muscle growth in Aquaculture species. In: *Fish Physiology: Muscle development and growth*, 18: 103–132.
19. Froehlich JM, Fowler ZG, Galt NJ, Smith Jr DL, Biga PR (2013) Sarcopenia and piscines: The case for indeterminate-growing fish as unique genetic model organisms in aging and longevity research. *Front Genet* 4: 159.
<https://doi.org/10.3389/fgene.2013.00159>

20. Koganti P, Yao J, Cleveland BM (2021) Molecular mechanisms regulating muscle plasticity in fish. *Animals* 11: 61.
<https://doi.org/10.3390/ani11010061>
21. Gabillard J-C, Biga PR, Rescan P-Y, Seiliez I (2013) Revisiting the paradigm of myostatin in vertebrates: Insights from fishes. *Gen Comp Endocrinol* 194: 45–54.
<https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2013.08.012>
22. Johnston IA, Manthri S, Alderson R, Smart A, Campbell P, Nickell D, Robertson B, Paxton CG, Burt ML (2003) Freshwater environment affects growth rate and muscle fibre recruitment in seawater stages of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *J Exp Biol* 206: 1337–1351.
<https://doi.org/10.1242/jeb.00262>
23. Johnston IA, Lee HT, Macqueen DJ, Paranthaman K, Kawashima C, Anwar A, Kinghorn JR, Dalmay T (2009) Embryonic temperature affects muscle fibre recruitment in adult zebrafish: genome-wide changes in gene and microRNA expression associated with the transition from hyperplastic to hypertrophic growth phenotypes. *J Exp Biol* 212: 1781–1793.
<https://doi.org/10.1242/jeb.029918>
24. Hevroy EM, Jordal A-EO, Hordvik I, Espe M, Hemre G-I, Olsvik PA (2006) Myosin heavy chain mRNA expression correlates higher with muscle protein accretion than growth in Atlantic salmon, *Salmo salar*. *Aquaculture* 252: 453–461.
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.07.003>
25. Imsland AK, Le François NR, Lammare SG, Ditlecadet D, Sigurðsson S, Foss A (2011) Myosin expression levels and enzyme activity in juvenile spotted wolffish (*Anarhichas minor*) muscle: a method for monitoring growth rates. *Can J Fish Aquat Sci* 63: 1959–1967.
<https://doi.org/10.1139/f06-091>
26. Peruzzi S, Puvanendran V, Riesen G, Seim RR, Hagen Ø, Martínez-Llorens S, Falk-Petersen I-B, Fernandes JMO, Jobling M (2018) Growth and development of skeletal anomalies in diploid and triploid Atlantic salmon (*Salmo salar*) fed phosphorus-rich diets with fish meal and hydrolyzed fish protein. *PLoS One* 13(3): e0194340.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0194340>
27. Du SJ, Gong ZY, Fletcher GL, Shears MA, King MJ, Idler DR, Hew CL (1992) Growth enhancement in transgenic Atlantic salmon by the use of an “all fish” chimeric growth hormone gene construct. *Biotechnology (NY)* 10(2): 176–181.
<https://doi.org/10.1038/nbt0292-176>
28. Phelps MP, Jaffe IM, Bradley TM (2013) Muscle growth in teleost fish is regulated by factors utilizing the activin II B receptor. *J Exp Biol* 216: 3742–3750.
<https://doi.org/10.1242/jeb.086660>
29. Bassett D, Currie PD (2004) Identification of a zebrafish model of muscular dystrophy. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 31(8): 537–540.
<https://doi.org/10.1111/j.1440-1681.2004.04030.x>
30. Spencer MJ, Tidball JG (1992) Calpain concentration is elevated although net calcium-dependent proteolysis is suppressed in dystrophin-deficient muscle. *Exp Cell Res* 203: 107–114.
[https://doi.org/10.1016/0014-4827\(92\)90045-a](https://doi.org/10.1016/0014-4827(92)90045-a)
31. Goll DE, Neti G, Mares SW, Thompson VF (2008) Myofibrillar protein turnover: the proteasome and the calpains. *J Anim Sci* 86: E19–E35.
<https://doi.org/10.2527/jas.2007-0395>
32. Nemova NN, Lysenko LA, Kantserova NP (2010) Proteases of the calpain family: structure and functions. *Russ J Dev Biol* 41(5): 318–325.
<https://doi.org/10.1134/S1062360410050073>
33. Salmerón C, García de la serrana D, Jiménez-Amilburu V, Fontanillas R, Navarro I, Johnston IA, Gutiérrez J, Capilla E (2013) Characterisation and expression of calpain family members in relation to nutritional status, diet composition and flesh texture in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *PLoS One* 8(9): e75349.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0075349>
34. Sandri M (2013) Protein breakdown in muscle wasting: role of autophagy-lysosome and ubiquitin-proteasome. *Int J Biochem Cell Biol* 45(10): 2121–2129.
<https://doi.org/10.1016/j.biocel.2013.04.023>
35. Salem M, Kenney PB, Rexroad CE, Yao J (2006) Molecular characterization of muscle atrophy and proteolysis associated with spawning in rainbow trout. *Comp Biochem Physiol D* 1(2): 227–237.
<https://doi.org/10.1016/j.cbd.2005.12.003>
36. Seiliez I, Dias K, Cleveland BM (2014) Contribution of the autophagy-lysosomal and ubiquitin-proteasomal proteolytic systems to total proteolysis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) myotubes. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 307: R1330–R1337.
<https://doi.org/10.1152/ajpregu.00370.2014>

37. *Chen Y, Klionsky DJ* (2011) The regulation of autophagy – unanswered questions. *J Cell Sci* 124: 161–170.
<https://doi.org/10.1242/jcs.064576>
38. *Nielsen LB, Nielsen HH* (2001) Purification and characterization of cathepsin D from herring muscle (*Clupea harengus*). *Comp Biochem Physiol B* 128: 351–363.
[https://doi.org/10.1016/s1096-4959\(00\)00332-8](https://doi.org/10.1016/s1096-4959(00)00332-8)
39. *Seilliez I, Gabillard JC, Rifflade M, Sadoul B, Dias K, Avérous J, Tesseraud S, Skiba S, Panserat S* (2012) Amino acids downregulate the expression of several autophagy-related genes in rainbow trout myoblasts. *Autophagy* 8: 364–375.
<https://doi.org/10.4161/auto.18863>
40. *Ardley HC, Robinson PA* (2005) E3 ubiquitin ligases. The ubiquitin-proteasome system. *Essays Biochem* 41: 15–30.
<https://doi.org/10.1042/EB0410015>
41. *Lecker SH, Jagoe RT, Gilbert A, Gomes M, Baracos V, Bailey J, Price SR, Mitch WE, Goldberg AL* (2004) Multiple types of skeletal muscle atrophy involve a common program of changes in gene expression. *FASEB J* 18(1): 39–51.
<https://doi.org/10.1096/fj.03-0610>
42. *Cleveland BM, Evenhuis JP* (2010) Molecular characterization of atrogin-1/Fbx protein-32 (FBXO32) and F-box protein-25 (FBXO25) in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): expression across tissues in response to feed deprivation. *Comp Biochem Physiol B* 157: 248–257.
<https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2010.06.010>
43. *Lui JC, Baron J* (2011) Mechanisms limiting body growth in mammals. *Endocr Rev* 32(3): 422–40.
<https://doi.org/10.1210/er.2011-0001>
44. *Macqueen DJ, Robb D, Johnston IA* (2007) Temperature influences the coordinated expression of myogenic regulatory factors during embryonic myogenesis in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *J Exp Biol* 210: 2781–2794.
<https://doi.org/10.1242/jeb.006981>
45. *Johnston IA, Manthri S, Smart A, Campbell P, Nickell D, Alderson R* (2003) Plasticity of muscle fibre number in seawater stages of Atlantic salmon in response to photoperiod manipulation. *J Exp Biol* 206: 3425–3435.
<https://doi.org/10.1242/jeb.00577>
46. *Rolland M, Dalsgaard J, Holm J, Gómez-Requeni P, Skov PV* (2015) Dietary methionine level affects growth performance and hepatic gene expression of GH–IGF system and protein turnover regulators in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed plant protein-based diets. *Comp Biochem Physiol B* 181 :33–41.
<https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2014.11.009>
47. *Buas MF, Kadesch T* (2010) Regulation of skeletal myogenesis by Notch. *Exp Cell Res* 18: 3028–3033.
<https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2010.05.002>
48. *Kantserova N, Lysenko L, Nemova N* (2018) Relationship of growth rate and muscle protein turnover in Atlantic salmon *Salmo salar* L. under natural and artificial photoperiods. *FEBS Open Bio* 8(S1): 407.
<https://doi.org/10.1002/2211-5463.12453>
49. *Imsland AKD, Roth B, Døskeland I, Fjellidal PG, Stefansson SO, Handeland S, Mikalsen B* (2019) Flesh quality of Atlantic salmon smolts reared at different temperatures and photoperiods. *Aquacult Res* 1–7.
<https://doi.org/10.1111/are.14058>
50. *Hermelink B, Wuertz S, Trubiroha A, Rennert B, Kloas W, Schulz C* (2011) Influence of temperature on puberty and maturation of pikeperch, *Sander lucioperca*. *Gen Comp Endocrinol* 172: 282–292.
<https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2011.03.013>
51. *Morro B, Balseiro P, Albalat A, Pedrosa C, Mackenzie S, Nakamura C, Shimizu M, Nilsen TO, Sveier H, Ebbesson LO, Handeland SO* (2019) Effects of different photoperiod regimes on the smoltification and seawater adaptation of seawater-farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Insights from Na⁺, K⁺-ATPase activity and transcription of osmoregulation and growth regulation genes. *Aquaculture* 507: 282–292.
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.04.039>
52. *McCormick SD, Björnsson BTh, Sheridan M, Eilertson C, Carey JB, O’Dea M* (1995) Increased daylength stimulates plasma growth hormone and gill Na⁺, K⁺-ATPase in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *J Comp Physiol B* 165: 245–254.
53. *Kendall NW, McMillan JR, Sloat MR, Buehrens TW, Quinn TP, Pess GR, Kuzishchin KV, McClure MM, Zabel RW* (2015) Anadromy and residency in steelhead and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): a

- review of the processes and patterns. *Can J Fish Aquat Sci* 72(3): 319–342.
<https://doi.org/10.1139/cjfas-2014-0192>
54. *Kantserova NP, Lysenko LA, Veselov AE, Nemova NN* (2017) Protein degradation systems in the skeletal muscles of parr and smolt Atlantic salmon *Salmo salar* L. and brown trout *Salmo trutta* L. *Fish Physiol Biochem* 43(4): 1187–1194.
<https://doi.org/10.1007/s10695-017-0364-1>
 55. *Lysenko LA, Kantserova NP, Kaivarainen HI, Krupnova MJ, Nemova NN* (2017) Skeletal muscle protease activities in the early growth and development of wild Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Comp Biochem Physiol B* 211C: 22–28.
<https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2017.05.001>
 56. *Tokarz J, Möller G, Hrabě de Angelis M, Adamski J* (2015) Steroids in teleost fishes: A functional point of view. *Steroids* 103:123–144.
<https://doi.org/10.1016/j.steroids.2015.06.011>
 57. *Cleveland BM, Weber GM* (2016) Effects of steroid treatment on growth, nutrient partitioning, and expression of genes related to growth and nutrient metabolism in adult triploid rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Domest Anim Endocrinol* 56: 1–12.
<https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2016.01.001>
 58. *Youngson AF, McLay HA, Wright RS, Johnstone R* (1988) Steroid hormone levels and patterns of growth in the early part of the Reproductive cycle of adult Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture* 69: 145–152.
[https://doi.org/10.1016/0044-8486\(88\)90193-7](https://doi.org/10.1016/0044-8486(88)90193-7)
 59. *Lubzens E, Young G, Bobe J, Cerda J* (2010) Oogenesis in teleosts: how eggs are formed. *Gen Comp Endocrinol* 165: 367–389.
<https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2009.05.022>
 60. *Manor M, Weber GM, Salem M, Yao J, Aussanasuwannakul A, Kenney B* (2012) Effect of sexual maturation and triploidy on chemical composition and fatty acid content of energy stores in female rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture* 364–365: 312–321.
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.08.012>
 61. *Olin T, Nazar DS, von der Decken A* (1991) Response of epaxial muscle and liver to 17- β estradiol in fed and starved Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture* 99: 179–191.
[https://doi.org/10.1016/0044-8486\(91\)90297-K](https://doi.org/10.1016/0044-8486(91)90297-K)
 62. *Toyohara H, Ito K, Ando M, Kinoshita M, Shimizu Y, Sakaguchi M* (1991) Effect of maturation on activities of various proteases and protease inhibitors in the muscle of ayu (*Plecoglossus altivelis*). *Comp Biochem Physiol B* 99(2): 419–424.
[https://doi.org/10.1016/0305-0491\(91\)90064-k](https://doi.org/10.1016/0305-0491(91)90064-k)
 63. *Silva LA, Silveira PCL, Ronsani MM, Souza PS, Scheffer D, Vieira LC, Benetti M, De Souza CT, Pinho RA* (2011) Taurine supplementation decreases oxidative stress in skeletal muscle after eccentric exercise. *Cell Biochem Funct* 29: 43–49.
<https://doi.org/10.1002/cbf.1716>
 64. *Yamashita M, Konagaya S* (1992) Differentiation and localization of catheptic proteinases responsible for extensive autolysis of mature chum salmon muscle (*Oncorhynchus keta*). *Comp Biochem Physiol B* 103(4): 999–1003.
[https://doi.org/10.1016/0305-0491\(92\)90229-K](https://doi.org/10.1016/0305-0491(92)90229-K)
 65. *Alami-Durante H, Médale F, Cluzeaud M, Kaushik SJ* (2010) Skeletal muscle growth dynamics and expression of related genes in white and red muscles of rainbow trout fed diets with graded levels of a mixture of plant protein sources as substitutes for fishmeal. *Aquaculture* 303: 50–58.
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.03.012>
 66. *Nakashima K, Komatsu T, Yamazaki M, Abe H* (2005) Effects of fasting and refeeding on expression of proteolytic-related genes in skeletal muscle of chicks. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 51(4): 248–253.
<https://doi.org/10.3177/jnsv.51.248>
 67. *Salem M, Silverstein J, Rexroad CE III, Yao J* (2007) Effect of starvation on global gene expression and proteolysis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *BMC Genomics* 8: 328.
<https://doi.org/10.1186/1471-2164-8-328>
 68. *Salem M, Kenney PB, Rexroad CE, Yao J* (2006) Microarray gene expression analysis in atrophying rainbow trout muscle: a unique nonmammalian muscle degradation model. *Physiol Genomics* 28: 33–45.
<https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00114.2006>
 69. *Dzeja P, Terzic A* (2009) Adenylate kinase and AMP signalling networks: metabolic monitoring, signal communication and body energy sensing. *Int J Mol Sci* 10: 1729–1772.
<https://doi.org/10.3390/ijms10041729>
 70. *Preziosa E, Liu S, Terova G, Gao X, Liu H, Kucuktas H, Terhune J, Liu Z* (2013) Effect of nutrient restriction and re-feeding on calpain family genes in skeletal muscle of channel catfish (*Ictal-*

- urus punctatus*). PLoS One 8(3): e59404.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0059404>
71. *Paneru B, Ali A, Al-Tobasei R, Kenney B, Salem M* (2018) Crosstalk among lncRNAs, microRNAs and mRNAs in the muscle 'degradome' of rainbow trout. *Scient Rep* 8: 8416.
<https://doi.org/10.1038/s41598-018-26753-2>
 72. *Tripathi G, Verma P* (2003) Starvation-induced impairment of metabolism in a freshwater catfish. *Z Naturforsch C J Biosci* 58(5–6): 446–451.
<https://doi.org/10.1515/znc-2003-5-626>
 73. *Seear PJ, Carmichael SN, Talbot R, Taggart JB, Bron JE, Sweeney GE* (2010) Differential gene expression during smoltification of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.): a first large-scale microarray study. *Mar Biotechnol* 12: 126–140.
<https://doi.org/10.1007/s10126-009-9218-x>
 74. *Somero GN, Yancey PH* (2011) Osmolytes and cell-volume regulation: physiological and evolutionary principles. In: *Comprehensive Physiology*. Suppl. 31. Handbook of Physiology, Cell Physiology John Wiley & Sons, Inc 441–484.
<https://doi.org/10.1002/cphy.cp140110>
 75. *Lajus DL, Lysenko LA, Kantserova NP, Tushina ED, Ivanova TS, Nemova NN* (2020) Spatial heterogeneity and temporal dynamics of protein-degrading activity and life-history traits in the threespine stickleback *Gasterosteus aculeatus*. *Int Aquat Res* 12: 161–170.
<https://doi.org/10.22034/IAR.2020.1894323.1019>
 76. *Golovin PV, Bakhalova AE, Ivanov MV, Smirnova KA, Lajus DL* (2019) Sex-biased mortality of marine threespine stickleback *Gasterosteus aculeatus* L. during their spawning period in the White Sea. *Evol Ecol Res* 20: 279–295.
 77. *Saito M, Sato K, Kunisaki N, Kimura S* (2000) Characterization of a rainbow trout matrix metalloproteinase capable of degrading type I collagen. *Eur J Biochem* 267: 6943–6950.
<https://doi.org/10.1046/j.1432-1033.2000.01807.x>
 78. *Crespi BJ, Teo R* (2002) Comparative phylogenetic analysis of the evolution of semelparity and life history in salmonid fishes. *Evolution* 56(5): 1008–1020.
<https://doi.org/10.1111/j.0014-3820.2002.tb01412.x>
 79. *Bassett D, Currie PD* (2004) Identification of a zebrafish model of muscular dystrophy. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 31(8): 537–540.
<https://doi.org/10.1111/j.1440-1681.2004.04030.x>
 80. *Coffey EC, Pasquarella ME, Goody MF, Henry CA* (2018) Ethanol exposure causes muscle degeneration in zebrafish. *J Dev Biol* 6(7).
<https://doi.org/10.3390/jdb6010007>
 81. *Kongtorp RT, Kjerstad A, Taksdal T, Gutvik A, Falk K* (2004) Heart and skeletal muscle inflammation in Atlantic salmon, *Salmo salar* L: a new infectious disease. *J Fish Dis* 27(6): 351–358.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2004.00549.x>
 82. *Kuz'min EV, Kuz'mina OYu* (2001) Activities of lactate and malate dehydrogenase of the sterlet and Russian sturgeon under conditions of massive spread of muscle pathology. *J Evol Biochem Physiol* 37(1): 35–42.

The Traits of Protein Metabolism in the Skeletal Muscle of the Teleost Fish

N. N. Nemova^a, N. P. Kantserova^a, and L. A. Lysenko^{a, *}

^a*Institute of Biology, Karelian Research Centre of the Russian Academy of Sciences, Petrozavodsk, Russia*

**e-mail: l-lysenko@yandex.ru*

The review summarizes the literature and the data of own research on the traits of the structure, functions, and protein metabolism in the skeletal muscle of teleost fish (Teleostei). Despite the conservative fundamental mechanisms of muscle growth (myogenesis) and degradation in vertebrates, fish are characterized by unique features related to their poikilothermy, indeterminate growth, and a unique role of the muscle as a depot of plastic and energetic substrates. The skeletal muscle of fish reveals high plasticity defined as their ability to substantial anabolic or catabolic changes in response to environmental variables, such as temperature, photoperiod, and food availability. Under optimal (anabolic) conditions, the muscle tissue of fish grows at an extremely high rate due to both hypertrophy and hyperplasia ways, while at the periods of high energy demand, includ-

ing migration, starvation, and gonad maturation, the skeletal muscle protein catabolism temporarily prevails. However, the muscle degradation could be deep enough to exceed their regenerative capacity; according to this scenario, both genetically determined programs and responses to exogenous signals of excessive strength and duration can be realized. An extreme and illustrative example of muscle protein reserve mobilization and resulting amino acid consumption in the processes of energy production and the synthesis of stage-specific gonad proteins are pacific salmonids which exhaustion at the spawning is so great to result in the death of individuals. The myopathies in fish and the potential of fish objects for modeling human diseases are also considered.

Keywords: teleost fish, skeletal muscle, anabolism, catabolism, plasticity, myogenesis, protein degradation

ОБЗОРНЫЕ
И ПРОБЛЕМНЫЕ СТАТЬИ

МЕХАНИЗМЫ УВЕЛИЧЕНИЯ МЫШЕЧНОЙ МАССЫ И СИЛЫ
ПРИ РЕГУЛЯРНЫХ СИЛОВЫХ ТРЕНИРОВКАХ

© 2021 г. Е. А. Лысенко^{1, 2, *}, О. Л. Виноградова^{1, 2}, Д. В. Попов^{1, 2}

¹Институт медико-биологических проблем РАН, Москва, Россия

²Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

*E-mail: e.a.lysenko@gmail.com

Поступила в редакцию 28.01.2021 г.

После доработки 20.02.2021 г.

Принята к публикации 21.02.2021 г.

Наиболее эффективным средством для поддержания или увеличения мышечной массы и силы являются регулярные силовые тренировки. Силовые упражнения используются во время реабилитации после травм и длительной гипокинезии, для профилактики развития старческой саркопении, профилактики развития метаболического синдрома и сахарного диабета 2 типа, профилактики развития сердечно-сосудистых заболеваний. Также силовые упражнения широко используются спортсменами различной специализации. Эффективность регулярных силовых тренировок существенно варьирует в зависимости от индивидуальных особенностей, питания и используемой тренировочной схемы. В последние годы достигнут существенный прогресс в понимании механизмов адаптации скелетной мышцы в ответ на регулярные силовые тренировки. В обзоре описаны наиболее важные механизмы увеличения мышечной массы и силы, соответствующие актуальным представлениям современной литературы по данному вопросу. Рассмотрена роль регуляции механизмов управления мышечным сокращением, а также сигнальных процессов, обуславливающих увеличение скорости синтеза белка в мышце, в развитии изменений в ответ на регулярные силовые тренировки. На этой основе проанализированы ключевые переменные, определяющие эффективность регулярных силовых тренировок, такие как величина нагрузки, объем выполняемой работы и скорость выполнения тренировочных движений. Знание механизмов, обуславливающих эффективность тренировочного процесса, позволит читателю сформировать представление о наиболее существенных аспектах силовых тренировок.

Ключевые слова: силовая тренировка, скелетная мышца, адаптация механизмов управления мышечным сокращением, скорость синтеза белка, mTORC1, мышечное волокно

DOI: 10.31857/S0869813921060078

Силовой тренировкой, как правило, называют упражнения с внешним отягощением или с использованием инерции/веса собственного тела, выполняемые до выраженного утомления работающей мышечной группы в одном или нескольких подходах. При регулярном выполнении силовых тренировок они разделяются периодами отдыха (от одного до нескольких дней), необходимыми для восстановления энергетических ресурсов (в первую очередь, запасов гликогена), восстановления повреждений структуры мышечных волокон (МВ). Регулярные силовые тре-

нировки оказывают мощное воздействие на все системы и органы человека, но наиболее заметные изменения связаны с адаптацией механизмов управления мышечным сокращением и тренируемой мышцы, приводящей к прогрессивному увеличению мышечной массы и силы.

Хорошо известно, что однократная силовая тренировка приводит к увеличению скорости синтеза белка в скелетной мышце [1], в частности, увеличивается скорость синтеза миофибриллярных белков [2]. Скорость распада белка либо не меняется, либо увеличивается в меньшей степени, что приводит к изменению баланса белкового обмена [3], увеличению объема сократительного аппарата и площади поперечного сечения МВ, следствием чего является увеличение мышечной массы [4]. Известно, что увеличение мышечной силы после продолжительного периода регулярных силовых тренировок (более 3 мес.) хорошо коррелирует с увеличением мышечной массы [5, 6]. С другой стороны, в первые недели (до 1 мес.) силовых тренировок увеличение мышечной массы обусловлено, главным образом, отеком, возникающим из-за многочисленных повреждений структуры МВ и воспалительного процесса. При этом увеличение скорости синтеза белка, наблюдаемое после однократных силовых тренировок, обеспечивает восстановление этих повреждений [7, 8]. Неоднократно было показано, что увеличение мышечной силы в первые недели (до 1 мес.) силовых тренировок может наблюдаться при отсутствии значимого увеличения мышечной массы [9–11]. Кроме того, известно, что использование силовых тренировок с околорексимальными нагрузками у тренированных людей может вызывать увеличение силы без увеличения мышечной массы [12]. Подобные наблюдения привели к развитию представления о важной роли адаптации механизмов управления мышечным сокращением в увеличении мышечной силы при регулярных силовых тренировках.

Силовые упражнения широко используются спортсменами различной специализации. Помимо этого, силовые упражнения используются во время реабилитации после травм и длительной гипокинезии, для поддержания мышечной массы и силы при саркопении, снижения риска развития заболеваний, таких как метаболический синдром, сахарный диабет 2 типа, артериальная гипертензия, при гипермобильности суставов, для снижения риска возникновения переломов и травм, для сохранения подвижности и поддержания качества жизни у пожилых людей [13–19]. Понимание механизмов адаптации скелетной мышцы к различным типам сократительной активности, в том числе к силовым тренировкам, необходимо для создания оптимальных подходов к тренировочному процессу и может использоваться в спорте, при реабилитации, для профилактики различных заболеваний. В обзоре рассмотрены наиболее важные механизмы адаптации скелетной мышцы к регулярным силовым тренировкам. Проанализирована роль ключевых параметров, характеризующих силовую тренировку, таких как величина нагрузки, объем работы, а также скорость выполнения движений, в увеличении мышечной массы и силы. Вклад адаптации механизмов управления мышечным сокращением и активации анаболических процессов в увеличение мышечной массы и силы, а также их взаимное влияние, в доступной авторам литературе ранее не рассматривались.

МЕХАНИЗМЫ АДАПТАЦИИ К СИЛОВЫМ ТРЕНИРОВКАМ

Управление мышечным сокращением

За управление движениями отвечает первичная моторная кора [20]. Это участок фронтальной коры, электрическая стимуляция которого приводит к активации или торможению движений. Сигнал от пирамидальных нейронов, расположенных

в 5-м слое моторной коры, передается по аксонам в составе пирамидального тракта на нейроны ствола головного мозга и вставочные нейроны спинного мозга. Иннервация мотонейронов осуществляется либо посредством вставочных нейронов, либо моносинаптическим способом, как в случае с мотонейронами, иннервирующими мелкие мышцы кисти у приматов [21]. Мотонейроны принято разделять в зависимости от их электрической активности. Мотонейроны с низкой частотой импульсации обладают меньшими размерами тела нейрона и меньшим входным сопротивлением, меньшим диаметром аксона и скоростью проведения импульса, иннервируют меньшее количество мышечных волокон, их принято называть низкопороговыми мотонейронами. Мотонейроны с высокой частотой импульсации обладают большими размерами тела нейрона и большим входным сопротивлением, большим диаметром аксона и скоростью проведения импульса, иннервируют большее количество МВ, их принято называть высокопороговыми мотонейронами. В скелетных мышцах человека различают 3 типа МВ в зависимости от изоформ тяжелых цепей миозина, которые они экспрессируют. Низкопороговые мотонейроны иннервируют МВ, экспрессирующие тяжелые цепи миозина I типа (МНСI). Высокопороговые мотонейроны иннервируют МВ, экспрессирующие тяжелые цепи миозина IIa и IId/x типов (МНСIIa, МНСIId/x). МНСI обладают наименьшей, а МНСIId/x – наибольшей скоростью гидролиза АТФ (пропорциональной скорости генерации силы), при этом МВ, экспрессирующие МНСI, наиболее устойчивы, а МНСIId/x – наименее устойчивы к утомлению. МВ, экспрессирующие МНСIIa, занимают в этом ряду промежуточное положение [22]. Один мотонейрон может иннервировать от нескольких сотен до тысяч МВ, мотонейрон и группу мышечных волокон, иннервируемых им, принято называть двигательной единицей (ДЕ). При различных видах сократительной активности ДЕ задействованы в работе в разной степени. Еще в середине прошлого века при регистрации от нерва активности отдельных мотонейронов было показано, что при небольших нагрузках регистрируются потенциалы малой амплитуды, характерные для низкопороговых ДЕ с малыми мотонейронами, тогда как при увеличении нагрузки регистрируются потенциалы большей амплитуды, характерные для высокопороговых ДЕ с большими мотонейронами [23]. На основе этих наблюдений было сформулировано так называемое правило Хеннемана: при мышечном сокращении ДЕ рекрутируются (активируются) в определенной последовательности в соответствии с размером тела мотонейрона (сначала мотонейроны с меньшим размером тела нейрона, затем с большим размером тела нейрона), обеспечивая тем самым развитие усилия, необходимого для выполнения поставленной задачи [23]. Это правило легло в основу представлений о рекрутировании ДЕ при мышечных сокращениях различной интенсивности.

Наиболее часто адаптацию механизмов управления мышечным сокращением при регулярных силовых тренировках оценивают по увеличению амплитуды сигнала, полученного с помощью поверхностной электромиографии (ЭМГ), при максимальном произвольном усилии или при фиксированной относительной нагрузке [24]. Из увеличения амплитуды ЭМГ делается вывод об увеличении нисходящего нервного драйва (суммарное количество нервных импульсов, приходящих от верхних отделов ЦНС) и вовлечении более высокопороговых ДЕ в работу. Однако на результаты, получаемые с помощью данного метода, могут влиять воспроизведение места наложения электродов до и после периода регулярных силовых тренировок, толщина подкожно-жировой клетчатки, смещение кожи при мышечном сокращении и другие факторы [25].

Для оценки возбудимости пула мотонейронов и нисходящего драйва к ним используются методы, исследующие изменение амплитуды ЭМГ при стимуляции

смешанного нерва, иннервирующего мышцу, такие как Н-рефлекс и V-волна (стимуляция нерва осуществляется на фоне произвольного усилия). В ряде исследований было показано увеличение амплитуды V-волны после периода регулярных силовых тренировок [26, 27], из чего можно сделать вывод об увеличении нисходящего драйва к пулу мотонейронов.

С развитием метода транскраниальной магнитной стимуляции, когда катушка накладывается на голову в области моторной коры и осуществляется импульсная стимуляция нейронов моторной коры, появилась возможность оценить вклад центральных механизмов в адаптивные изменения, наблюдаемые при регулярных силовых тренировках. В частности, с помощью этого метода было показано, что после периода регулярных силовых тренировок увеличиваются кортикоспинальная возбудимость и возбудимость моторной коры, снижается кортикоспинальное и интракортикальное торможение. Эти изменения приводят к большей активации мотонейронов, увеличению нисходящего драйва, а, следовательно, вносят вклад в увеличение мышечной силы при регулярных силовых тренировках [26, 27].

Значительный прогресс в понимании механизмов возникновения адаптивных изменений при регулярных силовых тренировках был достигнут благодаря использованию нового метода регистрации и обработки электрической активности мышцы во время работы [28]. Этот метод предусматривает регистрацию активности мышцы с помощью 128-ми электродов, равномерно распределенных на поверхности кожи над мышцей. Из записанного таким образом сигнала в дальнейшем извлекаются потенциалы действия отдельных мотонейронов с характерным паттерном сигнала. Такой подход позволил выявить порог рекрутирования (нагрузку, при которой активируется ДЕ) для отдельных ДЕ при изометрическом напряжении передней большеберцовой мышцы с нагрузкой 35, 50 и 70% от максимальной произвольной силы (МПС). Было показано снижение порога рекрутирования и увеличение средней частоты импульсации мотонейронов после 4-х недель силовых тренировок [28]. Позднее другая группа авторов с помощью аналогичного подхода также показала снижение порога рекрутирования ДЕ латеральной головки четырехглавой мышцы бедра после 8-ми недель силовых тренировок [29]. В этой работе было показано, что увеличение средней частоты импульсации мотонейронов после периода силовых тренировок было вызвано рекрутированием высокопороговых мотонейронов на меньших нагрузках. Известно, что частота импульсации высокопороговых мотонейронов выше по сравнению с низкопороговыми [22].

Еще одним доказательством роли адаптации механизмов управления мышечным сокращением в увеличении мышечной силы после регулярных силовых тренировок является эффект контралатерального переноса. Известно, что при тренировке одной конечности силовые показатели увеличиваются как в тренирующейся, так и в контралатеральной (не тренирующейся) конечностях [30, 31]. Интересен этот феномен тем, что увеличение силовых показателей в контралатеральной конечности, в отличие от тренирующейся, наблюдается при отсутствии гипертрофических изменений. В настоящий момент известно, что изменения силовых показателей контралатеральной конечности связаны с адаптационными изменениями на кортикальном и спинальном уровнях и с увеличением нервного драйва к мышцам контралатеральной конечности [32].

Таким образом, на ранних этапах регулярных силовых тренировок (до 1 мес.) увеличение силовых показателей связано с изменением соотношения процессов возбуждения и торможения в моторной коре, снижением порога рекрутирования высокопороговых мотонейронов и, вероятно, вовлечением большего количества ДЕ и иннервируемых ими мышечных волокон в работу во время максимального

усилия. Роль этих механизмов на более поздних этапах регулярных силовых тренировок также может быть существенной.

Увеличение мышечной массы

Ключевыми механизмами увеличения мышечной массы при регулярных силовых тренировках являются временное увеличение скорости синтеза белка после однократной тренировки и увеличение базальной скорости синтеза белка [33]. Увеличение скорости синтеза белка после однократной силовой тренировки регулируется на уровне инициации и элонгации трансляции за счет активации ключевого регулятора этих процессов – комплекса mTORC1 (mammalian/mechanistic target of rapamycin complex 1) [34]. С помощью специфического ингибитора mTORC1 – рапамицина было показано, что увеличение скорости синтеза белка в мышце после однократной силовой тренировки обусловлено активацией именно этого комплекса [35]. Также была обнаружена корреляция между активацией mTORC1 после однократной силовой тренировки и увеличением мышечной массы при регулярных силовых тренировках [36].

mTORC1 активируется в ответ на увеличение содержания аминокислот в клетке, при активации сигналинга инсулинового рецептора и при активации механо-зависимого сигналинга [34]. Однократный прием аминокислот приводит к активации mTORC1 и увеличению скорости синтеза белка в мышце [37]. Прием аминокислот после однократной силовой тренировки приводит к более выраженной активации mTORC1 и увеличению скорости синтеза белка в мышце по сравнению с эффектом силовой тренировки как таковой [38]. Активация инсулинового сигналинга может вызывать активацию mTORC1 в различных клеточных линиях [39]. В скелетных мышцах человека после однократной силовой тренировки при уровне инсулина 5 mU L^{-1} (соответствует уровню инсулина в крови натощак) может наблюдаться менее выраженная активация mTORC1 по сравнению с тренировкой, выполняемой при уровне инсулина от 30 mU L^{-1} (соответствует уровню инсулина в крови после легкого приема пищи). Дальнейшее увеличение уровня инсулина в крови не приводит к более выраженной активации mTORC1 после силовой тренировки [40]. Роль механо-зависимого сигналинга была показана в опытах с электростимуляцией и растяжением мышц мышей. С помощью блокатора механо-зависимого сигналинга 1-бутанола было показано, что активация mTORC1 при эксцентрических мышечных сокращениях осуществляется благодаря активации этого механизма [41].

К настоящему времени сложилось представление о ключевой роли механо-зависимого механизма активации mTORC1 после однократной силовой тренировки [42, 43]. В связи с этим можно предположить, что увеличение нагрузки на мышцу (внешнего отягощения или механического стимула) приведет к более выраженной активации mTORC1. Экспериментальные данные говорят об обратном. Неоднократно было показано, что активация комплекса mTORC1 в большей степени зависит от объема выполненной работы, чем от используемой нагрузки [2, 44, 45].

Неизвестно, зависит ли механическая нагрузка, приходящаяся на одно МВ во время однократной силовой тренировки, от используемого внешнего отягощения. При выполнении движения с отягощением в работе участвует необходимое для успешного выполнения движения количество двигательных единиц, а значит и МВ. Т.е. при выполнении движения с меньшим отягощением в работе будет задействовано меньшее количество МВ и, предположительно, механическая нагрузка, приходящаяся на одно МВ, будет сопоставимой с нагрузкой при выполнении движения с большим отягощением. В связи с этим при выполнении упражнений с разли-

чающимися нагрузками в работавших МВ предположительно будет наблюдаться сопоставимая активация mTORC1, а различаться будет доля работавших МВ в целой мышце, а значит и активация mTORC1, наблюдаемая в мышце, состоящей из рекрутированных и не рекрутированных МВ. Эти предположения подтверждаются исследованием, в котором была показана зависимая от нагрузки активация mTORC1 и увеличение скорости синтеза белка в биопсихических пробах мышечной ткани, состоящих из рекрутированных и не рекрутированных МВ, после тренировок с различным отягощением, выровненных по объему работы [46].

Противоположная картина наблюдается в исследованиях, в которых сопоставлялись эффекты тренировок с различающимися нагрузками, выполняемыми до отказа в каждом подходе. При регистрации активности отдельных мотонейронов было показано, что выполнение упражнений с небольшой постоянной нагрузкой сопровождается переключением между и вовлечением новых ДЕ по мере их утомления [47], благодаря чему количество МВ, задействованных при выполнении упражнений с различающимися нагрузками до отказа, может быть сопоставимым [48]. Эти предположения подтверждаются исследованием, в котором были показаны сопоставимое расходование гликогена быстрыми и медленными МВ (мера вовлечения МВ в работу) и сопоставимая активация mTORC1 после однократной тренировки с нагрузками 30 и 90% от МПС при условии выполнения подходов до отказа [49].

Таким образом, механо-зависимая активация mTORC1 является ключевым (но не единственным) механизмом увеличения скорости синтеза белка после силовой тренировки, тем не менее, выраженность анаболического эффекта тренировки на уровне целой мышцы, вероятно, определяется эффективностью рекрутирования МВ при выполнении упражнений.

Возможным механизмом активации скорости синтеза белка после однократной силовой тренировки может быть накопление метаболитов в работающей мышце. Японскими авторами был разработан подход к силовой тренировке, ориентированный в первую очередь на людей со сниженными физическими возможностями, предусматривающий выполнение упражнений с малыми нагрузками (менее 50% от МПС) на фоне окклюзии работающей конечности (для ограничения венозного оттока). Такая тренировка позволяет добиться выраженного увеличения скорости синтеза белка в работающей мышце и увеличения мышечной массы после периода силовых тренировок даже при использовании относительно низких нагрузок (20–50% от МПС). При этом выровненные по объему выполненной работы тренировки, осуществляемые без наложения манжеты, не приводят к подобным результатам [50, 51]. Ограничения кровотока в работающей мышце также можно добиться при выполнении движения без расслабления этой мышцы. Силовые тренировки, выполняемые без расслабления работающей мышцы с нагрузкой 50% от МПС, приводили к выраженному увеличению мышечной массы [52]. При этом после однократной тренировки, выполняемой без расслабления работающей мышцы (с нагрузкой 50% от МПС), в отличие от силовой тренировки, выполняемой в обычном режиме (74% от МПС), наблюдалась активации MEK–ERK1/2 сигнального каскада [53], предположительно, из-за активации фактора, индуцируемого гипоксией – HIF1. В недавнем исследовании было показано, что тренировки с нагрузкой 30% от МПС и наложением окклюзионной манжеты либо без наложения манжеты приводят к сопоставимому увеличению мышечной массы и силы при условии выполнения подходов до отказа. Также было показано, что использование окклюзионной манжеты способствует более быстрому развитию мышечного утомления [54]. Таким образом, потенциальными механизмами, запускающими увеличение мы-

шечной массы при силовых тренировках с ограничением кровотока работающей мышцы, могут быть как метаболический стимул, так и более быстрое развитие утомления работающей мышцы, способствующее включению в работу наибольшего числа МВ.

Увеличение скорости синтеза белка после однократной силовой тренировки часто ассоциируют с увеличением концентрации анаболических гормонов в системном кровотоке. Действительно, после однократной силовой тренировки может увеличиваться содержание таких гормонов как тестостерон, гормон роста и инсулиноподобный фактор роста-1 (ИФР-1) [55]. Однако эти изменения либо краткосрочные, как в случае с тестостероном и гормоном роста, либо, как в случае с ИФР-1, наблюдаются после пика в увеличении скорости синтеза белка [56]. Следует отметить, что непродолжительное (до 1 ч в случае с тестостероном и гормоном роста) увеличение содержания анаболических гормонов после однократной нагрузки не превышает суточные колебания этих гормонов и не коррелирует с увеличением скорости синтеза белка после однократной тренировки и увеличением мышечной массы при регулярных силовых тренировках [56].

Регулярные силовые тренировки могут приводить к увеличению базального содержания тестостерона, гормона роста и ИФР-1 в крови [55]. Известно, что содержание анаболических гормонов в системном кровотоке коррелирует с максимальными силовыми показателями спортсменов при регулярных силовых тренировках [57, 58]. Данные о влиянии уровня анаболических гормонов в покое на мышечную массу весьма противоречивы. Однако согласно недавнему исследованию Morton с соавт., изменения содержания тестостерона, гормона роста и ИФР-1 не коррелируют [59], в то время как содержание андрогенного рецептора в скелетной мышце позитивно коррелирует с увеличением мышечной массы при регулярных силовых тренировках [59, 60]. При этом известно, что андрогенный рецептор, связываясь с лигандом и транслоцируясь в ядро, регулирует экспрессию генов, ответственных за рост и дифференцировку мышечной ткани [61].

Регулярные силовые тренировки приводят к увеличению экспрессии рибосомальных РНК в мышце в покое. Эти изменения могут быть опосредованы активацией mTORC1- и Wnt/ β -катенин–сМус-зависимого сигналинга [62]. Кроме того, было показано, что при регулярных силовых тренировках наблюдается увеличение содержания рибосом в скелетной мышце, а это увеличение хорошо коррелирует с увеличением скорости синтеза белка в покое [63] и увеличением мышечной массы [64]. Таким образом, увеличение количества рибосом, по-видимому, является наиболее вероятной причиной увеличения базальной скорости синтеза белка при регулярных силовых тренировках.

Увеличение объема МВ предположительно может приводить к увеличению ядерного домена (объема саркоплазмы, приходящегося на одно мышечное ядро). Такие изменения могли бы привести к снижению содержания генетического материала, приходящегося на единицу объема МВ, и снижению транскрипционной активности (содержания мРНК) в мышце. С другой стороны, можно предположить, что снижение ядерного домена могло бы привести к увеличению транскрипционной активности и скорости синтеза белка. Принято считать, что увеличение количества мышечных ядер при увеличении объема МВ, вызванного регулярными силовыми тренировками, происходит за счет пролиферации и слияния с ним сателлитных клеток. Эти представления подтверждаются, с одной стороны, положительной взаимосвязью между числом пролиферирующих сателлитных клеток после однократной силовой тренировки и увеличением мышечной массы при регулярных силовых тренировках [65], с другой стороны, позитивной корреляцией между увеличением

мышечной массы и увеличением числа мышечных ядер (при поддержании размера ядерного домена) [66, 67].

Как отмечалось выше, уже через 4 нед. силовых тренировок наблюдается снижение порога рекрутирования ДЕ [28]. В связи с этим можно предположить, что увеличение количества двигательных единиц, задействованных при выполнении упражнения до отказа, приведет к тому, что в работе будет задействовано большее количество мышечных волокон, и в большем количестве волокон активируется анаболический сигнальный ответ. Таким образом, адаптация механизмов управления мышечным сокращением потенциально может привести к большей скорости увеличения мышечной массы. Это предположение подкрепляется исследованием, в котором было показано, что активация mTORC1-зависимого сигнального ответа после однократной силовой тренировки позитивно коррелирует с расходом гликогена мышечными волокнами, которое можно рассматривать в качестве показателя вовлеченности МВ в работу [49]. В другом исследовании проводились тренировки одной конечности (10 нед.) с последующими периодом отдыха (20 нед.) и тренировками другой конечности (5 нед.). Было показано, что развитие механизмов управления мышцами в нетренирующейся (контралатеральной) конечности привело к большей скорости увеличения мышечной массы при ее тренировке [67]. Таким образом, адаптация механизмов управления мышечным сокращением может играть важную роль в увеличении мышечной массы при силовых тренировках, тем не менее, этот вопрос нуждается в дальнейшем изучении.

ПАРАМЕТРЫ СИЛОВОЙ ТРЕНИРОВКИ

Нагрузка

Нагрузка, используемая при выполнении упражнений, является одним из ключевых параметров, необходимых для построения тренировочных программ. Под нагрузкой при тренировке силы принято понимать используемое отягощение, выраженное в процентах от максимального отягощения, с которым человек может выполнить движение один раз (МПС). В соответствии с правилом Henneman [23] использование больших нагрузок должно приводить к рекрутированию большего числа ДЕ, в том числе, высокопороговых ДЕ. Исходя из этого, можно предположить, что увеличение нагрузки во время однократной силовой тренировки приведет к активации анаболического ответа в большем количестве мышечных волокон и, в конечном счете, к увеличению эффективности регулярных тренировок. Это предположение подтверждается исследованием, в котором была показана зависимость от нагрузки активация синтеза белка после силовой тренировки с использованием различных внешних нагрузок, уравненных по объему выполненной работы [46]. С другой стороны, закрепилось представление о том, что использование больших внешних нагрузок (приводящих к отказу от работы после 1–5 повторений) направлено на развитие механизмов управления движением и силы, тогда как использование умеренных нагрузок (приводящих к отказу от работы после 6–12 повторений) преимущественно стимулирует анаболические процессы в тренируемой мышце и вызывает рост мышечной массы [68].

При выполнении упражнений с умеренными нагрузками в первую очередь активируется пул ДЕ с низким порогом рекрутирования. По мере утомления работающих мышечных волокон для поддержания силы происходит рекрутирование высокопороговых ДЕ [69]. Таким образом, выполнение упражнений с большими и умеренными нагрузками до отказа может приводить к рекрутированию как высокопороговых, так и низкопороговых ДЕ [47] и приводить к развитию выраженного утомления и

расходуванию энергетических запасов рекрутируемых МВ, т.е. способствовать выравниванию физиологической стоимости тренировок с различающимися нагрузками. Действительно, было показано, что однократная тренировка с нагрузками 80 или 30% от МПС, при выполнении подходов до отказа, приводит к сопоставимому снижению уровня гликогена в медленных (иннервируемых низкопороговыми мотонейронами) и быстрых (иннервируемых высокопороговыми мотонейронами) МВ [49], а однократная тренировка с нагрузками 30, либо 90% от МПС до отказа в каждом тренировочном подходе приводит к сопоставимому увеличению скорости синтеза миофибриллярных белков [2]. Также было показано, что после 12 нед. тренировок с использованием больших (75–90%) и умеренных (30–50%) нагрузок, когда все рабочие подходы выполнялись до отказа, наблюдалось сопоставимое увеличение силовых показателей и площади поперечного сечения быстрых и медленных МВ [70].

В работе Schoenfeld с соав. [71] был проведен мета-анализ для сопоставления эффективности силовых тренировок с использованием больших (> 60%) и умеренных (\leq 60%) нагрузок для развития силы и увеличения мышечной массы. Анализировались работы, в которых упражнения с большими и умеренными нагрузками выполнялись до отказа в каждом рабочем подходе. Было показано, что оба типа нагрузок приводили к значительному увеличению силовых показателей (размер эффекта 1.69 и 1.32 для больших и умеренных нагрузок соответственно), при этом размер эффекта для регулярных тренировок с большими нагрузками был достоверно выше. При анализе работ, в которых принимали участие только адаптированные к регулярным силовым тренировкам добровольцы, разница между нагрузками была еще более ощутимая, что говорит о возрастании роли больших нагрузок в развитии силы по мере адаптации к регулярным силовым тренировкам. С другой стороны, скорость увеличения мышечной массы не зависела от величины используемых нагрузок (размер эффекта 0.53 и 0.42 для больших и умеренных нагрузок соответственно).

В известной авторам литературе нет работ, в которых бы напрямую сравнивались показатели, отражающие адаптацию механизмов управления мышечным сокращением после тренировок с различающимися нагрузками. Тем не менее, большая скорость развития силовых показателей после регулярных высокоинтенсивных тренировок [71], а также увеличение силовых показателей при отсутствии увеличения мышечной массы у тренированных добровольцев после длительной тренировки с эксцентрическими нагрузками (120% от МПС в концентрическом движении) [12], свидетельствуют о более выраженном влиянии больших нагрузок, в сравнении с умеренными, на механизмы управления мышечным сокращением. При этом нагрузки с большим и умеренным отягощением в равной степени увеличивают мышечную массу, при выполнении тренировочных подходов до отказа [71].

Объем работы

Объем работы при однократной силовой тренировке рассчитывается путем перемножения используемой нагрузки (выраженной в кг для вычисления абсолютного объема работы, или выраженной в процентах от МПС для вычисления относительного объема работы) на количество повторений, выполненных за всю тренировку. Объем работы при регулярных силовых тренировках можно увеличить как за счет увеличения объема работы, выполняемого за одну тренировку, так и за счет увеличения частоты тренировок.

Активация ключевого регулятора трансляции mTORC1 после однократной силовой тренировки в большей степени зависит от объема выполненной работы, а не от используемой нагрузки [2, 44, 45]. Также известно, что увеличение скорости синтеза миофибриллярных белков после работы большего объема может быть более длительным, чем после работы меньшего объема [2]. Был проведен мета-анализ влияния количества выполняемых подходов во время однократной силовой тренировки (показателя, тесно связанного с объемом работы) на развитие мышечной массы и силы после регулярных силовых тренировок [72]. Было показано, что наибольший размер эффекта как для мышечной силы, так и для мышечной массы наблюдается при выполнении 4–6 подходов, а наименьший размер эффекта для 1 тренировочного подхода. В другом исследовании был проведен мета-анализ, оценивающий влияние количества тренировочных подходов, выполняемых за неделю, на развитие мышечной силы [73]. Было показано, что выполнение 5 и более подходов в неделю более эффективно увеличивает мышечную силу, чем 1–4 подхода. Таким образом, увеличение объема работы, по крайней мере в исследованных пределах, приводило к увеличению скорости прироста мышечной массы и силы после периода регулярных силовых тренировок.

Ранее было показано, что продолжительность увеличения скорости синтеза белка после однократной силовой тренировки у тренированных и нетренированных людей не превышает 28 ч [1]. Исходя из этого, можно предположить, что увеличение частоты тренировок может привести к увеличению прироста мышечной массы. Был проведен мета-анализ, оценивающий влияние количества тренировок, выполняемых за одну неделю, на развитие мышечной массы [74]. Было показано, что выполнение трех тренировок в неделю вызывало больший прирост мышечной массы в сравнении с одной тренировкой. Таким образом, увеличение частоты тренировок действительно эффективно для увеличения мышечной массы при регулярных силовых тренировках.

Скорость развития усилия

При взрывном типе выполнения движения быстрое рекрутирование ДЕ приводит к развитию максимальной силы в короткий промежуток времени [75]. Известно, что при регулярных силовых тренировках с взрывным типом движений, в отличие от тренировок с меньшей скоростью выполнения движений, в большей степени увеличивается градиент нарастания силы в первые 200 мс после начала выполнения движения и максимальный градиент нарастания силы, при этом наибольшие изменения наблюдаются уже после двух недель силовых тренировок [76]. В связи с этим можно предположить, что силовая тренировка с взрывным типом движений влияет в первую очередь на механизмы управления мышечным сокращением, что приводит к увеличению скорости рекрутирования ДЕ и частоты импульсации мотонейронов при данном типе мышечных сокращений (рис. 1). Известно, что эти показатели позитивно коррелируют с градиентом нарастания силы [75].

При взрывном типе выполнения движения снижается время, которое мышца находится в нагруженном состоянии. При этом известно, что этот показатель может влиять на выраженность анаболического ответа, возникающего в мышце после однократной силовой тренировки [77]. Таким образом, выполнение упражнений с взрывным типом выполнения движений предположительно может приводить к развитию менее выраженного анаболического ответа в скелетной мышце. Действительно, после тренировок с высокой скоростью выполнения движений, когда воздействия выравнялись по объему выполненной работы, наблюдалось мень-

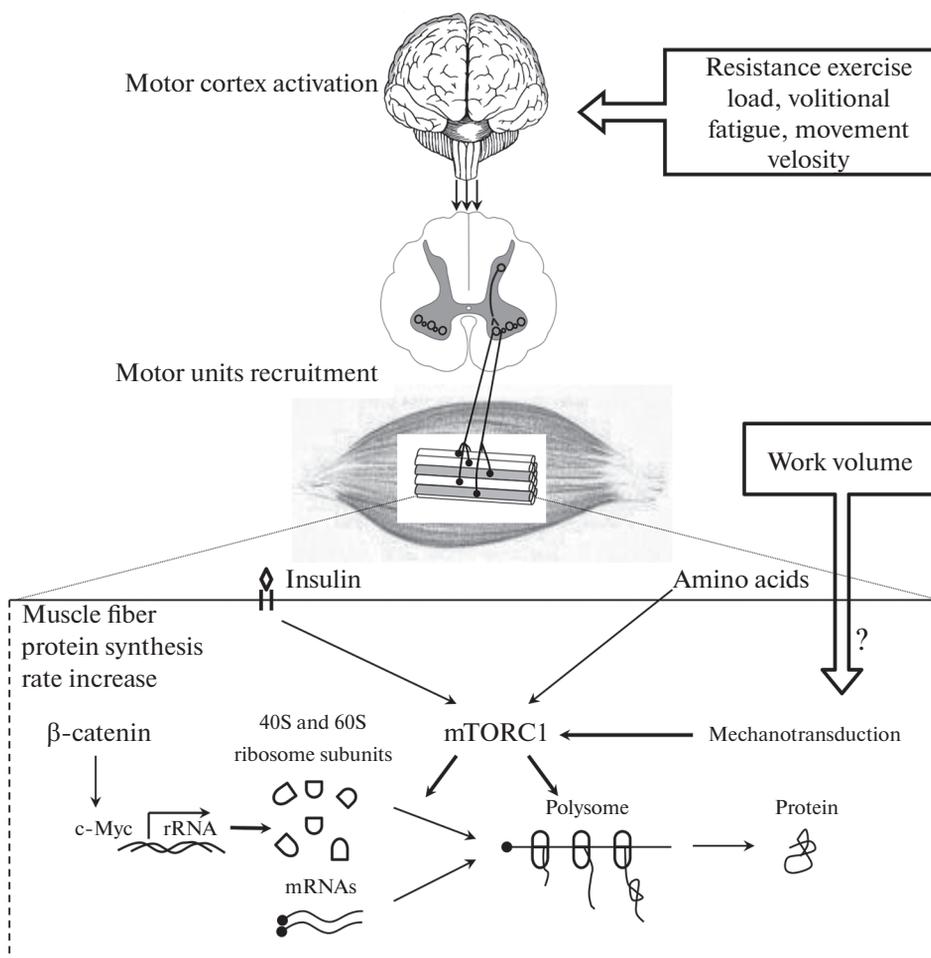


Рис. 1. Механизмы увеличения мышечной массы и силы при регулярных силовых тренировках. Схематично изображены стадии развития произвольного мышечного сокращения от активации первичной моторной коры и α -мотонейронов до иннервируемых ими МВ. Показаны сигнальные механизмы, запускающие увеличение скорости синтеза белка в мышце после однократной силовой тренировки (mTORC1) и при регулярных силовых тренировках (β -catenin–c-Myc). Обозначены наиболее важные переменные силовых тренировок и механизмы, чувствительные к их изменению.

шее увеличение мышечной массы в сравнении с тренировками с меньшей скоростью выполнения движений [78]. С другой стороны, при выполнении упражнений с разной скоростью до отказа в каждом подходе наблюдалось сопоставимое снижение содержания гликогена в МВ и сопоставимая активация mTORC1-зависимого анаболического сигналинга [49]. После периода регулярных силовых тренировок, когда тренировочные движения выполнялись с разной скоростью (длительностью от 0.5 до 8 с) до отказа в каждом подходе, наблюдалось сопоставимое увеличению мышечной массы [79]. Таким образом, если рабочие подходы во время тренировки выполняются до отказа, скорость выполнения движения при силовой тренировке не влияет на скорость увеличения мышечной массы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

При регулярных силовых тренировках происходит адаптация механизмов управления мышечным сокращением, увеличение мышечной массы и силы. Она заключается в увеличении кортикоспинальной возбудимости, возбудимости моторной коры, снижении кортикоспинального и интракортикального торможения, а также в снижении порога рекрутирования ДЕ тренируемой мышцы. В настоящий момент нет прямых доказательств того, что эти изменения способствуют рекрутированию большего числа МВ во время выполнения упражнений и того, что эти адаптационные изменения могут влиять на активацию анаболических процессов в мышце. Исследования последних лет убедительно показали, что увеличение мышечной массы наблюдается благодаря увеличению скорости синтеза белка после однократных силовых тренировок (в значительной мере эта активация обусловлена mTORC1-зависимым механизмом), а также благодаря увеличению базальной скорости синтеза белка, предположительно, за счет увеличения количества рибосом. Тем не менее, мнение о преимущественно механозависимой активации mTORC1 при силовых тренировках нуждается в подтверждении в экспериментах на скелетной мышце человека. Кроме того, до сих пор остается неизвестным механочувствительный сенсор, запускающий активацию сигналинга, и особенности его активации при силовых тренировках. Было установлено, что эффекты регулярных силовых тренировок могут отличаться в зависимости от используемых нагрузок, объема выполняемой работы, скорости выполнения тренировочных движений и других параметров силовой тренировки. Предположительно, все перечисленные эффекты обусловлены различиями в рекрутировании и утомлении ДЕ при выполнении упражнений. Дальнейшие исследования, которые позволили бы напрямую оценить вовлеченность МВ в работу при максимальном усилии, при выполнении упражнений с различающимися нагрузками до отказа и без, а также при различающихся скоростях выполнения тренировочных движений, могли бы, по крайней мере, отчасти объяснить различия в эффективности тех или иных подходов к тренировочному процессу. Обобщая вышесказанное, регулярные силовые тренировки являются эффективным средством для увеличения мышечной массы и силы. При этом методические подходы, используемые при организации силовых тренировок, должны зависеть от поставленных задач (увеличение мышечной массы, силы, скорости выполнения движения и др.), учитывать уровень тренированности человека и возможные риски получения травм.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 20-315-70034 “Стабильность”.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы статьи подтверждают отсутствие финансовой или какой-либо иной заинтересованности в предвзятом освещении материала.

ВКЛАД АВТОРОВ

Л.Е.А. — написание, редактирование и подготовка материала к публикации; В.О.Л. — консультации по научным вопросам, редактирование рукописи; П.Д.В. — консультация по научным вопросам, редактирование рукописи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Tang E, Perco JG, Moore DR, Wilkinson SB, Phillips SM* (2008) Resistance training alters the response of fed state mixed muscle protein synthesis in young men. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 294(1): 172–178.
<https://doi.org/10.1152/ajpregu.00636.2007>
2. *Burd NA, West DWD, Staples AW, Atherton PJ, Baker JM, Daniel R Holwerda AM, Parise G, Rennie MJ, Baker SK Phillips SM* (2010) Low-Load High Volume Resistance Exercise Stimulates Muscle Protein Synthesis More Than High-Load Low Volume Resistance Exercise in Young Men. *PLoS One* 5(8): e12033.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012033>
3. *Phillips SM, Parise G, Roy B, Tipton R, Wolfe R, Tarnopolsky MA* (2002) Resistance-training-induced adaptations in skeletal muscle protein turnover in the fed state. *Can J Physiol Pharmacol* 80(11): 1045–1053.
<https://doi.org/10.1139/y02-134>
4. *Aagaard P, Andersen JL, Dyhre-Poulsen P, Leffers AM, Wagner A, Peter Magnusson S, Halkjær-Kristensen J, Simonsen EB* (2001) A mechanism for increased contractile strength of human pennate muscle in response to strength training: Changes in muscle architecture. *J Physiol* 534(2): 613–623.
<https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.2001.t01-1-00613.x>
5. *Balshaw TG, Massey GJ, Maden-Wilkinson TM, Lanza MB, Folland JP* (2019) Neural adaptations after 4 years vs 12 weeks of resistance training vs untrained. *Scand J Med Sci Sport* 29(3): 348–359.
<https://doi.org/10.1111/sms.13331>
6. *Balshaw TG, Massey GJ, Maden-Wilkinson TM, Morales-Artacho AJ, McKeown A, Appleby CL, Folland JP* (2017) Changes in agonist neural drive, hypertrophy and pre-training strength all contribute to the individual strength gains after resistance training. *Eur J Appl Physiol* 117(4): 631–640.
<https://doi.org/10.1007/s00421-017-3560-x>
7. *Damas F, Libardi CA, Ugrinowitsch C* (2017) The development of skeletal muscle hypertrophy through resistance training: the role of muscle damage and muscle protein synthesis. *Eur J Appl Physiol* 118(3): 485–500.
<https://doi.org/10.1007/s00421-017-3792-9>
8. *Damas F, Phillips SM, Libardi CA, Vechin FC, Lixandrão ME, Jannig R, Costa LAR, Bacurau AV, Snijders T, Parise G, Tricoli V, Roschel H, Ugrinowitsch C* (2016) Muscle protein synthesis, hypertrophy, and muscle damage in humans. *J Physiol* 594(18): 5209–5222.
<https://doi.org/10.1113/JP272472>
9. *Blazevich AJ, Gill ND, Deans N, Zhou S* (2007) Lack of human muscle architectural adaptation after short-term strength training. *Muscle and Nerve* 35(1): 78–86.
<https://doi.org/10.1002/mus.20666>
10. *Seynnes OR, De Boer M, Narici MV* (2007) Early skeletal muscle hypertrophy and architectural changes in response to high-intensity resistance training. *J Appl Physiol* 102(1): 368–373.
<https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00789.2006>
11. *Weier AT, Pearce AJ, Kidgell DJ* (2012) Strength training reduces intracortical inhibition. *Acta Physiol* 206(2): 109–119.
<https://doi.org/10.1016/j.juro.2017.04.076>
12. *Hakkinen K, Alen M, Komi PV* (1985) Changes in isometric force- and relaxation-time, electromyographic and muscle fibre characteristics of human skeletal muscle during strength training and detraining. *Acta Physiol Scand* 125(4): 573–585.
<https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.1985.tb07760.x>
13. *Seguin R, Nelson ME* (2003) The benefits of strength training for older adults. *Am J Prev Med* 25(3): 141–149.
[https://doi.org/10.1016/s0749-3797\(03\)00177-6](https://doi.org/10.1016/s0749-3797(03)00177-6)
14. *Lynch GS* (2004) Tackling Australia's future health problems: Developing strategies to combat sarcopenia – Age-related muscle wasting and weakness. *Intern Med J* 34(5): 294–296.
<https://doi.org/10.1111/j.1444-0903.2004.00568.x>
15. *Srikanthan P, Karlamangla AS* (2011) Relative muscle mass is inversely associated with insulin resistance and prediabetes. Findings from the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *J Clin Endocrinol Metab* 96(9): 2898–2903.
<https://doi.org/10.1210/jc.2011-0435>
16. *Srikanthan P, Karlamangla AS* (2014) Muscle Mass Index as a Predictor of Longevity in Older-Adults. *Perit Dial Int* 127(6): 547–553.
<https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2014.02.007>

17. *Figueroa A, Okamoto T, Jaime SJ, Fahs CA* (2019) Impact of high- and low-intensity resistance training on arterial stiffness and blood pressure in adults across the lifespan: a review. *Eur J Physiol* 471(3): 467–478.
<https://doi.org/10.1007/s00424-018-2235-8>
18. *Myers AM, Beam NW, Fakhoury JD* (2017) Resistance training for children and adolescents. *Transl Pediatr* 6(3): 137–143.
<https://doi.org/10.21037/tp.2017.04.01>
19. *Legerlotz K* (2018) The Effects of Resistance Training on Health of Children and Adolescents With Disabilities. *Am J Lifestyle Med* 14(4): 382–396.
<https://doi.org/10.1177/1559827618759640>
20. *Penfield W, Rasmussen T* (1950) The cerebral cortex of man; a clinical study of localization of function. *JAMA* 144(16): 1412.
<https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2005.04098.x>
21. *Ebbesen CL, Brecht M* (2017) Motor cortex—To act or not to act? *Nat Rev Neurosci* 18(11): 694–705.
<https://doi.org/10.1038/nrn.2017.119>
22. *Schiaffino S, Reggiani C* (2011) Fiber types in mammalian skeletal muscles. *Physiol Rev* 91(4): 1447–1531.
<https://doi.org/10.1152/physrev.00031.2010>
23. *Henneman E, Somjen G, Carpenter D* (1965) Functional significance of cell size in spinal motoneurons. *J Neurophysiol* 28: 560–580.
<https://doi.org/10.1152/jn.1965.28.3.560>
24. *Aagaard P* (2003) Training-induced changes in neural function. *Exerc Sport Sci Rev* 31(2): 61–67.
<https://doi.org/10.1097/00003677-200304000-00002>
25. *Vigotsky AD, Halperin I, Lehman GJ, Trajano GS, Vieira TM* (2018) Interpreting signal amplitudes in surface electromyography studies in sport and rehabilitation sciences. *Front Physiol* 8: 985.
<https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00985>
26. *Kidgell DJ, Bonanno DR, Frazer AK, Howatson G, Pearce AJ* (2017) Corticospinal responses following strength training: a systematic review and meta-analysis. *Eur J Neurosci* 46(11): 2648–2661.
<https://doi.org/10.1111/ejn.13710>
27. *Siddique U, Rahman S, Frazer AK, Pearce AJ, Howatson G, Kidgell DJ* (2020) Determining the Sites of Neural Adaptations to Resistance Training: A Systematic Review and Meta-analysis. *Sport Med* 50(6): 1107–1128.
<https://doi.org/10.1007/s40279-020-01258-z>
28. *Del Vecchio A, Casolo A, Negro F, Scorcelletti M, Bazzucchi I, Enoka R, Felici F, Farina D* (2019) The increase in muscle force after 4 weeks of strength training is mediated by adaptations in motor unit recruitment and rate coding. *J Physiol* 597(7): 1873–1887.
<https://doi.org/10.1113/JP277250>
29. *Sterczala AJ, Miller JD, Dimmick HL, Wray ME, Trevino MA, Herda TJ* (2020) Eight weeks of resistance training increases strength, muscle cross-sectional area and motor unit size, but does not alter firing rates in the vastus lateralis. *Eur J Appl Physiol* 120(1): 281–294.
<https://doi.org/10.1007/s00421-019-04273-9>
30. *Scripture EW, Smith TL, Brown EM* (1984) On the education of muscular control and power. *StudYale Psychol Lab* 2: 114–119.
31. *Нетреба АИ, Бравый ЯР, Макаров ВА, Устюжанин ДВ, Виноградова ОЛ* (2011) Оценка эффективности тренировки, направленной на увеличение максимальной произвольной силы без развития гипертрофии мышц. *Физиология человека* 37(6): 1–9. [*Netreba AI, Bravyi IR, Makarov VA, Ustiuzhanin DV, Vinogradova OL* (2011) Evaluation of training efficacy for improving maximal voluntary contraction without noticeable hypertrophy. *Hum Physiol* 37(6): 89–97. (In Russ)].
32. *Ruddy KL, Carson RG* (2013) Neural pathways mediating cross education of motor function. *Front Hum Neurosci* 7: 1–22.
<https://doi.org/10.3389/fnhum.2013.00397>
33. *Phillips SM, Tipton KD, Ferrando AA, Wolfe RR* (1999) Resistance training reduces the acute exercise-induced increase in muscle protein turnover. *Am J Physiol* 276(1): 118–124.
<https://doi.org/10.1152/ajpendo.1999.276.1.E118>
34. *Goodman CA* (2014) The Role of mTORC1 in Regulating Protein Synthesis and Skeletal Muscle Mass in Response to Various Mechanical Stimuli. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 166: 43–95.
https://doi.org/10.1007/112_2013_17
35. *Drummond MJ, Fry CS, Glynn EL, Dreyer HC, Dhanani S, Timmerman KL, Volpi E, Rasmussen BB* (2009) Rapamycin administration in humans blocks the contraction-induced increase in skel-

- etal muscle protein synthesis. *J Physiol* 587(7): 1535–1546.
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.2008.163816>
36. *Terzis G, Georgiadis G, Stratakos G, Vogiatzis I, Kavouras S, Manta P, Mascher H, Blomstrand E* (2008) Resistance exercise-induced increase in muscle mass correlates with p70S6 kinase phosphorylation in human subjects. *Eur J Appl Physiol* 102(2): 145–152.
<https://doi.org/10.1007/s00421-007-0564-y>
 37. *Mitchell WK, Wilkinson DJ, Phillips BE, Lund JN, Smith K, Atherton PJ* (2016) Human Skeletal Muscle Protein Metabolism Responses to Amino Acid Nutrition. *Adv Nutr* 7(4): 828S–838S.
<https://doi.org/10.3945/an.115.011650>
 38. *Burd NA, Tang JE, Moore DR, Phillips SM* (2009) Exercise training and protein metabolism: influences of contraction, protein intake, and sex-based differences. *J Appl Physiol* 106(5): 1692–1701.
<https://doi.org/10.1152/jappphysiol.91351.2008>
 39. *Proud CG* (2007) Signalling to translation: how signal transduction pathways control the protein synthetic machinery. *Biochem J* 403(2): 217–234.
<https://doi.org/10.1042/BJ20070024>
 40. *Greenhaff PL, Karagounis LG, Peirce N, Simpson EJ, Hazell M, Layfield R, Wackerhage H, Smith K, Atherton P, Selby A, Rennie MJ* (2008) Disassociation between the effects of amino acids and insulin on signaling, ubiquitin ligases, and protein turnover in human muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 295(3): 595–604.
<https://doi.org/10.1152/ajpendo.90411.2008>
 41. *O'Neil TK, Duffy LR, Frey JW, Hornberger TA* (2009) The role of phosphoinositide 3-kinase and phosphatidic acid in the regulation of mammalian target of rapamycin following eccentric contractions. *J Physiol* 587(14): 3691–3701.
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.2009.173609>
 42. *Wackerhage H, Schoenfeld BJ, Hamilton DL, Lehti M, Hulmi JJ* Stimuli and sensors that initiate skeletal muscle hypertrophy following resistance exercise. *J Appl Physiol* 126(1): 30–43.
<https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00685.2018>
 43. *Goodman CA* (2019) Role of mTORC1 in mechanically induced increases in translation and skeletal muscle mass. *J Appl Physiol* 127(2): 581–590.
<https://doi.org/10.1152/jappphysiol.01011.2018>
 44. *Lysenko EA, Popov DV, Vepkhvadze TF, Sharova AP, Vinogradova OL* (2019) Signaling responses to high and moderate moderate load strength exercise in trained muscle. *Physiol Rep* 7(9): 1–9.
<https://doi.org/10.14814/phy2.14100>
 45. *Terzis G, Spengos K, Mascher H, Georgiadis G, Manta P, Blomstrand E* (2010) The degree of p70 S6k and S6 phosphorylation in human skeletal muscle in response to resistance exercise depends on the training volume. *Eur J Appl Physiol* 110(4): 835–843.
<https://doi.org/10.1007/s00421-010-1527-2>
 46. *Kumar V, Selby A, Rankin D, Patel R, Atherton P, Hildebrandt W, Williams J, Seynnes O, Hiscock N, Rennie MJ* (2009) Age-related differences in the dose-response relationship of muscle protein synthesis to resistance exercise in young and old men. *J Physiol* 587(1): 211–217.
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.2008.164483>
 47. *Westad C, Westgaard RH, De Luca CJ* (2003) Motor unit recruitment and derecruitment induced by brief increase in contraction amplitude of the human trapezius muscle. *J Physiol* 552(2): 645–656.
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.2003.044990>
 48. *Dankel SJ, Jessee MB, Mattocks KT, Mouser JG, Counts BR, Buckner SL, Loenneke JP* (2016) Training to Fatigue: The Answer for Standardization When Assessing Muscle Hypertrophy? *Sport Med* 47(6): 1021–1027.
<https://doi.org/10.1007/s40279-016-0633-7>
 49. *Morton RW, Sonne MW, Zuniga AF, Mohammad IYZ, Jones A, McGlory C, Keir PJ, Potvin JR, Phillips SM* (2019) Muscle fibre activation is unaffected by load and Repetition duration when resistance exercise is performed to task failure. *J Physiol* 597(17): 4601–4613.
<https://doi.org/10.1113/JP278056>
 50. *Fujita S, Abe T, Drummond MJ, Cadenas JG, Dreyer HC, Sato Y, Volpi E, Rasmussen BB* (2007) Blood flow restriction during low-intensity resistance exercise increases S6K1 phosphorylation and muscle protein synthesis. *J Appl Physiol* 103(3): 903–910.
<https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00195.2007>
 51. *Takarada Y, Takazawa H, Sato Y, Takebayashi S, Tanaka Y, Ishii N* (2000) Effects of resistance exercise combined with moderate vascular occlusion on muscular function in humans. *J Appl Physiol* 88(6): 2097–2106.
<https://doi.org/10.1152/jappphysiol.2000.88.6.2097>

52. Попов ДВ, Цвирукун ДВ, Нетреба АИ, Тарасова ОС, Простова АБ, Ларина ИМ, Боровик АС, Виноградова ОЛ (2006) Увеличение мышечной массы и силы при низкоинтенсивной силовой тренировке без расслабления связано с гормональной адаптацией. Физиология человека 32(5): 121–127. [Popov DV, Tsvirkun DV, Netreba AI, Tarasova OS, Prostova AB, Larina IM, Borovik AS, Vinogradova OL (2006) Hormonal adaptation determines the increase in muscle mass and strength during low-intensity strength training without relaxation. Hum Physiol 32(5): 121–127. (In Russ)].
53. Popov DV, Lysenko EA, Bachinin AV, Miller TF, Kurochkina NS, Kravchenko IV, Furalyov VA, Vinogradova OL (2014) Influence of resistance exercise intensity and metabolic stress on anabolic signaling and expression of myogenic genes in skeletal muscle. Muscle Nerve 51(3): 434–442.
<https://doi.org/10.1002/mus.24314>
54. Gavanda S, Isenmann E, Schlöder Y, Roth R, Freiwald J, Schiffer T, Geisler S, Behringer M (2020) Low-intensity blood flow restriction calf muscle training leads to similar functional and structural adaptations than conventional low-load strength training : A randomized controlled trial. PLoS One 15(6): e0235377.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0235377>
55. Kraemer WJ, Ratamess NA (2005) Hormonal Responses and Adaptations to Resistance Exercise and Training. Sport Med 35(4): 339–361.
<https://doi.org/10.2165/00007256-200535040-00004>
56. Fink J, Schoenfeld BJ, Nakazato K (2018) The role of hormones in muscle hypertrophy. Phys Sport Med 46(1): 129–134.
<https://doi.org/10.1080/00913847.2018.1406778>
57. Hakkinen K, Pakarinen A, Alen M, Kauhanen H, Komi PV (1988) Neuromuscular and hormonal adaptations in athletes to strength training in two years. J Appl Physiol 65(6): 2406–2412.
<https://doi.org/10.1152/jappl.1988.65.6.2406>
58. Häkkinen K, Pakarinen A, Alén M, Komi PV (1985) Serum hormones during prolonged training of neuromuscular performance. Eur J Appl Physiol Occup Physiol 53(4): 287–293.
<https://doi.org/10.1007/BF00422840>
59. Morton RW, Sato K, Gallagher MPB, Oikawa SY, McNicholas PD, Fujita S, Phillips SM (2018) Muscle androgen receptor content but not systemic hormones is associated with resistance training induced skeletal muscle hypertrophy in healthy, young men. Front Physiol 9: 1373.
<https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01373>
60. Phillips SM, Baker SK, Churchward-Venne TA, Parise G, Bellamy L, Mitchell CJ (2013) Muscular and Systemic Correlates of Resistance Training-Induced Muscle Hypertrophy. PLoS One 8(10): e78636.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0078636>
61. Wyce A, Bai Y, Nagpal S, Thompson CC (2010) Research resource: The androgen receptor modulates expression of genes with critical roles in muscle development and function. Mol Endocrinol 24(8): 1665–1674.
<https://doi.org/10.1210/me.2010-0138>
62. Chaillou T, Kirby TJ, McCarthy JJ (2014) Ribosome Biogenesis: Emerging Evidence for a Central Role in the Regulation of Skeletal Muscle Mass. J Cell Physiol 229(11): 1584–1594.
<https://doi.org/10.1002/jcp.24604>
63. Brook MS, Wilkinson DJ, Mitchell WK, Lund JL, Phillips BE, Szewczyk NJ, Kainulainen H, Lensu S, Koch LG, Britton SL, Greenhaff PL, Smith K, Atherton PJ (2017) A novel D2O tracer method to quantify RNA turnover as a biomarker of de novo ribosomal biogenesis, in vitro, in animal models, and in human skeletal muscle. Am J Physiol – Endocrinol Metab 313(6): E681–E689.
<https://doi.org/10.1152/ajpendo.00157.2017>
64. Mobley CB, Haun CT, Robertson PA, Mumford PW, Kephart WC, Romero MA, Osburn SC, Vann CG, Young KC, Beck DT, Martin JS, Lockwood CM, Roberts MD (2018) Biomarkers associated with low, moderate, and high vastus lateralis muscle hypertrophy following 12 weeks of resistance training. PLoS One 13(4): 1–20.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0195203>
65. Reidy PT, Fry CS, Igbini S, Deer RR, Jennings K, Cope MB, Mukherjee R, Volpi E, Rasmussen BB (2017) Protein Supplementation Does Not Affect Myogenic Adaptations to Resistance Training. Med Sci Sports Exerc 49(6): 1197–1208.
<https://doi.org/10.1249/MSS.0000000000001224>
66. Hikida RS, Staron RS, Hagerman FC, Walsh S, Kaiser E, Shell S, Hervey S (2000) Effects of High-Intensity Resistance Training on and Nucleo-Cytoplasmic Relationships. Sport Med 55(7): 347–354.
<https://doi.org/10.1093/gerona/55.7.b347>

67. *Psilander N, Eftestøl E, Cumming KT, Juvkam I, Ekblom MM, Sunding K, Wernbom M, Holmberg HC, Ekblom B, Bruusgaard JC, Raastad T, Gundersen K* (2019) Effects of training, detraining, and retraining on strength, hypertrophy, and myonuclear number in human skeletal muscle. *Carbohydr Polym* 6(1): 5–10.
<https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00917.2018>
68. *Baechle T, Earle R* (2008) *Essentials of Strength Training and Conditioning*. Human Kinetics.
69. *Fisher J, Steele J, Smith D* (2017) High- and Low-Load Resistance Training: Interpretation and Practical Application of Current Research Findings. *Sport Med* 47(3): 393–400.
<https://doi.org/10.1007/s40279-016-0602-1>
70. *Morton RW, Oikawa SY, Wavell CG, Mazara N, McGlory C, Quadrilatero J, Baechler BL, Baker SK, Phillips SM* (2016) Neither load nor systemic hormones determine resistance training-mediated hypertrophy or strength gains in resistance-trained young men. *J Appl Physiol* 121(1): 129–138.
<https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00154.2016>
71. *Schoenfeld BJ, Grgic J, Ogborn D, Krieger JW* (2017) Strength and hypertrophy adaptations between low-versus high-load resistance training: A systematic review and meta-analysis. *J Strength Cond Res* 48(2): 361–378.
<https://doi.org/10.1519/JSC.0000000000002200>
72. *Krieger JW* (2010) Single vs. multiple sets of resistance exercise for muscle hypertrophy: a meta-analysis. *J Strength Cond Res* 24(4): 1150–1159.
<https://doi.org/10.1519/JSC.0b013e3181d4d436>
73. *Ralston GW, Kilgore L, Wyatt FB, Baker JS* (2017) The Effect of Weekly Set Volume on Strength Gain: A Meta-Analysis. *Sport Med* 47(12): 2585–2601.
<https://doi.org/10.1007/s40279-017-0762-7>
74. *Schoenfeld BJ, Ogborn D, Krieger JW* (2016) Effects of Resistance Training Frequency on Measures of Muscle Hypertrophy: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Sport Med* 46(11): 1689–1697.
<https://doi.org/10.1007/s40279-016-0543-8>
75. *Del Vecchio A, Negro F, Holobar A, Casolo A, Folland JP, Felici F, Farina D* (2019) You are as fast as your motor neurons: speed of recruitment and maximal discharge of motor neurons determine the maximal rate of force development in humans. *J Physiol* 597(9): 2445–2456.
<https://doi.org/10.1113/JP277396>
76. *Blazevich AJ, Wilson CJ, Alcaraz PE, Rubio-Arias JA* (2020) Effects of Resistance Training Movement Pattern and Velocity on Isometric Muscular Rate of Force Development: A Systematic Review with Meta-analysis and Meta-regression. *Sport Med* 50(5): 943–963.
<https://doi.org/10.1007/s40279-019-01239-x>
77. *Burd NA, Andrews RJ, West DW, Little JP, Cochran AJ, Hector AJ, Cashaback JG, Gibala MJ, Potvin JR, Baker SK, Phillips SM* (2012) Muscle time under tension during resistance exercise stimulates differential muscle protein sub-fractional synthetic responses in men. *J Physiol* 590(2): 351–362.
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.2011.221200>
78. *Hackett DA, Davies TB, Orr R, Kuang K, Halaki M* (2018) Effect of movement velocity during resistance training on muscle-specific hypertrophy: A systematic review. *Eur J Sport Sci* 18(4): 473–482.
<https://doi.org/10.1080/17461391.2018.1434563>
79. *Schoenfeld B, Ogborn D, Krieger J* (2015) Effect of Repetition Duration During Resistance Training on Muscle Hypertrophy: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Sport Med* 45: 577–585.
<https://doi.org/10.1007/s40279-015-0304-0>

The Mechanisms of Muscle Mass and Strength Increase during Strength Training

E. A. Lysenko^{a, b, *}, O. L. Vinogradova^{a, b}, and D. V. Popov^{a, b}

^a*Institute of Biomedical Problems of RAS, Moscow, Russia*

^b*Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia*

*e-mail: e.a.lysenko@gmail.com

Strength training remains the most effective way to maintain or increase muscle mass and strength. Strength training is used during rehabilitation after injuries and prolonged hypokinesia, to prevent the development of sarcopenia, metabolic syndrome and type 2 diabetes, cardiovascular diseases. Also, strength training is widely used by athletes of var-

ious specializations. The effectiveness of strength training varies depending on the individual features, the diet and the training scheme used. In recent years, significant progress has been made in understanding the mechanisms of adaptation of skeletal muscle in response to strength training. The review describes the most important mechanisms for increasing muscle mass and strength, which correspond to the current understanding of the problem in the modern literature. The role of neuromuscular adaptation, as well as the role of signaling processes that cause an increase in the rate of protein synthesis in muscle, in the development of adaptive changes in response to regular strength training, is considered. Based on the knowledge of these mechanisms, key variables of strength training were analyzed, such as the loads used, the amount of work performed, and the speed of the training movements. The knowledge of the mechanisms that determine the effectiveness of the training process, will allow the reader to note the most important aspects of strength training.

Keywords: strength training, skeletal muscle, neuromuscular adaptation, protein synthesis rate, mTORC1, muscle fiber

ОБЗОРНЫЕ
И ПРОБЛЕМНЫЕ СТАТЬИ

РОЛЬ ГИСТОНДЕАЦЕТИЛАЗ I И IIa (HDAC1, HDAC4/5)
И СИГНАЛЬНОГО ПУТИ МАРК38 В РЕГУЛЯЦИИ
АТРОФИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ
ПРИ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ РАЗГРУЗКЕ СКЕЛЕТНЫХ МЫШЦ

© 2021 г. Т. Л. Немировская*

Институт медико-биологических проблем РАН, Москва, Россия

**E-mail: Nemirovskaya@bk.ru*

Поступила в редакцию 02.02.2021 г.

После доработки 10.03.2021 г.

Принята к публикации 11.03.2021 г.

Различные формы функциональной разгрузки мышц можно обнаружить у больных при длительном постельном режиме, при инсультах и спинальных поражениях, во время иммобилизации мышц в травматологии, в условиях невесомости и т.п. В основном при разгрузке страдают постуральные мышцы (например, камбаловидная мышца – *m. soleus*). В основе перестройки скелетных мышц при функциональной разгрузке лежит их атрофия из-за увеличения протеолиза и падения интенсивности белкового синтеза [1, 2]. Обзор посвящен исследованию роли гистондеацетилаз I и IIa (HDAC1, HDAC4/5), а также сигнального пути МАРК38 в активации транскрипционных факторов FOXO и миогенина, которые участвуют в экспрессии генов E3 убиквитинлигаз atrogin-1, MuRF-1 при функциональной разгрузке скелетных мышц.

Ключевые слова: скелетные мышцы, функциональная разгрузка мышц, E3-лигазы, HDAC1, HDAC4/5, p38МАРК

DOI: 10.31857/S086981392106008X

Скелетные мышцы обладают высокой степенью пластичности и могут отвечать на состояние функциональной разгрузки (при иммобилизации мышц в травматологии, при гравитационной разгрузке, у больных, помещенных в условия длительного постельного режима, во время инсультов и спинальных поражений, повреждений нерва и др.) атрофией [3–5]. Постуральная мышца *m. soleus* подвержена при этом наибольшим изменениям. Не так много работ исследует триггерные механизмы белковой деградации мышц во время ранних сроков (от нескольких часов до 3 дней) их функциональной разгрузки. Показано, что атрофия, вызванная функциональной разгрузкой, обусловлена не только снижением скорости анаболических процессов, но и резким ускорением протеолиза [1, 2, 6, 7], в результате чего уменьшается содержание сократительных и цитоскелетных белков. Распад мышечных белков контролирует 4 протеолитические системы: кальпаиновая, убиквитин-протеасомная, лизосомальная (аутофаги/лизосомы), каспазная. Степень вовлечения каждой из этих систем в развитие атрофии при различных ее моделях (кахексия, сепсис, денервация, иммобилизация, вывешивание) разная. Вклад убиквитин-протеасомной системы в деградацию белков *m. soleus* особенно велик, т.к. она отвечает за 80–90% круговорота цитоплазматического белка, до-

ступного для протеолиза [8]. Особое внимание этой мышце уделяется потому, что она наиболее задействована в удержании позы (прямостояние) у человека, и даже при стоянии (т.е. при отсутствии движения) ЭМГ от этой мышцы фиксирует максимальную активность. Около 70% от объема мышечного волокна занимают сократительные белки, и эта фракция при атрофии снижается быстрее, чем многие другие [9]. Протеолиз миофибриллярных белков осуществляется преимущественно под действием убиквитин-протеасомной системы [10], в результате чего исследование триггерных механизмов, запускающих экспрессию E3 лигаз, является актуальной задачей.

В мышце убиквитин-протеасомная система выполняет задачу удаления саркомерных белков при изменении двигательной активности. Специфичность E3-лигаз для определенных групп белков обеспечивает высокую избирательность для их деградации. Из известных в настоящее время E2- и E3-лигаз синтез только некоторых из них увеличивается при снижении мышечной массы. Это свидетельствует о том, что мышечная атрофия – это активный процесс, который контролируется специфическими сигнальными путями и транскрипционными программами. Только несколько из множества известных убиквитин-лигаз активируется при атрофических процессах, вызванных функциональной разгрузкой мышц [1]. Хорошо известны экспрессирующиеся в большом количестве при атрофии E3-лигазы атроген-1 (MAFbx) и MuRF1. MuRF-1 участвует в расщеплении миофибриллярных белков [11], в то время как атроген-1 (MAFbx) контролирует как расщепление цитоскелетных белков, так и процессы, связанные с синтезом белка [12]. Мыши, у которых не синтезируются атроген-1 и MuRF1, устойчивы к мышечной атрофии, вызванной денервацией [13]. Не так давно установлено, что достоверное увеличение экспрессии MuRF1 и MAFbx наблюдается уже в первые сутки гравитационной разгрузки мышц, а к третьим суткам достигает своего пика [14]. Именно ранние этапы развития атрофии изучены хуже всего. До последнего времени основное внимание исследователи обращали на возможность фосфорилирования/дефосфорилирования транскрипционного фактора FOXO1/3 для регуляции экспрессии генов атрогина-1/MAFbx и MuRF-1 во время функциональной разгрузки мышц (рис. 1), т.к. именно FOXO1/3 контролирует их экспрессию [15].

Однако не так давно мы показали, что фосфорилирование транскрипционного фактора FOXO3 и транскрипционных факторов сигнального пути NF-κB не всегда предотвращало повышение экспрессии E3-лигазы MuRF-1 разгруженной мышцы [16, 17]. Так, при введении препаратов, снижающих степень атрофии *m. soleus*, уровень pFOXO3 был таким же, как у контрольных крыс, а экспрессия MuRF-1 у них оставалась высокой. Ингибирование фосфорилирования транскрипционных факторов сигнального пути NF-κB при функциональной разгрузке крыс в нашем эксперименте также не приводило к снижению экспрессии MuRF-1. Мало того, экспрессия MuRF-1 при ингибировании NF-κB была выше, чем у вывешенных без препарата животных. Эти результаты привели к предположению, что во всех этих случаях в мышце мог активно работать другой механизм, контролирующей работу генов атрогина-1/MAFbx и MuRF-1, вероятно, не связанный с фосфорилированием/дефосфорилированием их транскрипционных факторов. В настоящее время обсуждается участие HDACs (гистондеацетилаз) 1; 4/5, а также p38 MAPK (p38 митогенактивируемой протеинкиназы) в регуляции метаболизма скелетных мышц [18–20].

Обзор посвящен выявлению их роли в регуляции экспрессии E3-лигаз при функциональной разгрузке мышц.

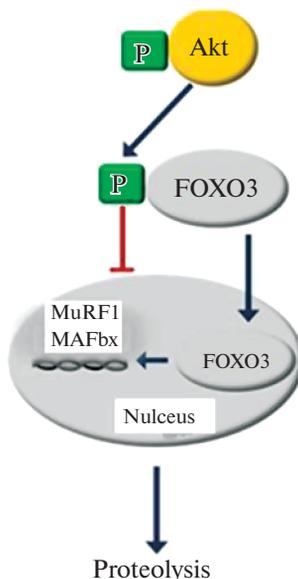


Рис. 1. Схема регуляции экспрессии E3-лигаз MAFbx/MuRF1 сигналингом Akt/FOXO3. pAkt фосфорилирует транскрипционный фактор FOXO3. Нефосфорилированный FOXO3 способен проникать в ядро и активировать экспрессию MAFbx и MuRF1.

1. РОЛЬ HDAC В РЕГУЛЯЦИИ ЭКСПРЕССИИ УБИКВИТИНЛИГАЗ ПРИ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ РАЗГРУЗКЕ МЫШЦ

Ферменты HDACs класса IIa рассматриваются как основные транскрипционные репрессоры. Фосфорилирование этих ферментов приводит к их выходу из ядра, что, в свою очередь, сопровождается активацией транскрипционных факторов и увеличению синтеза белка [21]. Известен кальций-зависимый механизм фосфорилирования/дефосфорилирования гистондеацетилаз (HDAC) класса IIa и их ядерно-цитоплазматическое перемещение, позволяющее ядерным HDAC блокировать экспрессию ряда генов [22]. Учитывая эти данные, можно ожидать дефосфорилирование HDACs и накопление их в ядерной фракции *m. soleus* крыс при функциональной разгрузке, т.к. при разгрузке мышц наблюдается накопление ионов кальция в цитоплазме волокон [23]. Роль HDAC в регуляции экспрессии убиквитинлигаз при функциональной разгрузке мышц изучена слабо, особенно возможность их активизации на ранних этапах разгрузки. Как мы уже упоминали, стимуляция экспрессии E3-убиквитинлигаз MuRF1 и atrogen-1/MAFbx осуществляется посредством сигнального пути Akt/FOXO3-1 (рис. 1) [24]. В последние годы выявлены и другие механизмы регуляции их экспрессии: через гистондеацетилазу 4, миогенин, HDAC1 [25, 26]. В то же время, работа этих регуляторных механизмов в условиях функциональной разгрузки изучена недостаточно. В дополнение к регулированию транскрипции гена посредством ацетилирования гистонов, каталитическая активность HAT и HDAC регулирует экспрессию гена путем изменения статуса ацетилирования и функции транскрипционных факторов, в частности, и FoxO. В настоящее время имеется ограниченные сведения о конкретных HDAC, которые регулируют статус ацетилирования FoxO в скелетных мышцах при нормальных условиях и тех, которые способствуют снижению ацетилирования и акти-

вазии FoxO во время катаболических состояний. В последнее время мы провели ряд исследований, в которых изучили возможность работы альтернативного механизма, контролирующего работу генов E3-лигаз, связанного с деацетилазной активностью различных HDAC. Особое внимание в них было уделено выявлению роли гистондеацетилаз (HDAC1, HDAC4/5) в активации транскрипционных факторов FOXO3 и миогенина при функциональной разгрузке мышц в экспрессии генов atrogen-1 и MuRF-1. Для этого применяли метод селективного ингибирования HDACs (HDAC1, HDAC4 и HDAC5) на ранних этапах функциональной разгрузки мышц.

2. ФУНКЦИЯ И МЕХАНИЗМ КОНТРОЛЯ HDAC1 ЭКСПРЕССИИ E3-ЛИГАЗ ПРИ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ РАЗГРУЗКЕ МЫШЦ

В работе Beharry и соавт. показано, что FoxO3 активирует HDAC1 [25]. Авторы ингибировали работу различных гистондеацетилаз в культуре клеток и обнаружили, что HDAC1 является ключевым регулятором FOXO3 и запускает мышечную программу атрофии. Это связано с деацетилазной активностью HDAC1, т.к. для активации экспрессии MuRF-1 и atrogen-1/MAFbx требуется деацетилирование FOXO3a [27]. Активность FoxO3a репрессируется в базальных условиях посредством обратимого ацетилирования лизина ацетилтрансферазой (НАТ), которая начинает работать во время катаболических состояний [27]. Снижение активности НАТ в скелетной мышце индуцировало транскрипционную активность FoxO3, в то время как увеличение активности НАТ предотвращало ядерную локализацию FoxO3, убирая ее транскрипционную активность по отношению к генам-мишеням.

Где и каким образом в клетке могут происходить эти процессы ацетилирования/деацетилирования FOXO?

Мы предположили, что ядерно-цитоплазматический транспорт HDAC и НАТ может контролировать способность к блокированию активности промоторов генов, кодирующих E3-убиквитинлигазы *in vivo* при функциональной разгрузке мышц. Для проверки гипотезы мы провели эксперимент с ингибированием HDAC1 при трехдневной функциональной разгрузке у крыс (модель вывешивания). Ингибирование HDAC1 при разгрузке специфическим ингибитором снизило степень атрофии *m. soleus* и экспрессию в ней atrogen-1/MAFbx (но не MuRF1) по сравнению с вывешенными без ингибитора животными [28]. Снижение экспрессии атрогена-1 не было связано с различиями в фосфорилировании Akt и FOXO3 между вывешенными группами. Очевидно, что в данном случае работает другой механизм, регулирующий экспрессию атрогена-1 (не связанный с фосфорилированной/ дефосфорилированной формой FOXO3a). Мы обнаружили также, что у вывешенных животных в ядерной фракции *m. soleus* уровень HDAC1 существенно повышен, а уровень гистонацетилтрансферазы P300 (НАТ) существенно понижен ($p < 0.05$) относительно уровня контроля. Ингибирование HDAC1 предотвращало эти изменения. Ранее Senf и соавт. отмечали, что снижение активности P300 связано с увеличением экспрессии MAFbx/Atrogen-1 при атрофии, вызванной денервацией [29]. Мы обнаружили также резкое увеличение содержания гистона Ac-H3 в *m. soleus* только в группе с ингибированием HDAC1 при вывешивании крыс [28]. Связь ДНК с гистонами приводит к плотной упаковке хроматина, которая ограничивает связывание белков, участвующих в транскрипции генов, с ДНК. Итак, мы показали, что экспрессия E3-лигазы atrogen-1/MAFbx связана с активностью HDAC1 следующим образом. При функциональной разгрузке *m. soleus* HDAC1 дефосфорилируется и поступает в ядро, НАС P300 в ядре перестает ацетилировать лизин на FOXO3a, что позволяет ему запустить экспрессию atrogen-1, так как гистон H3 в это

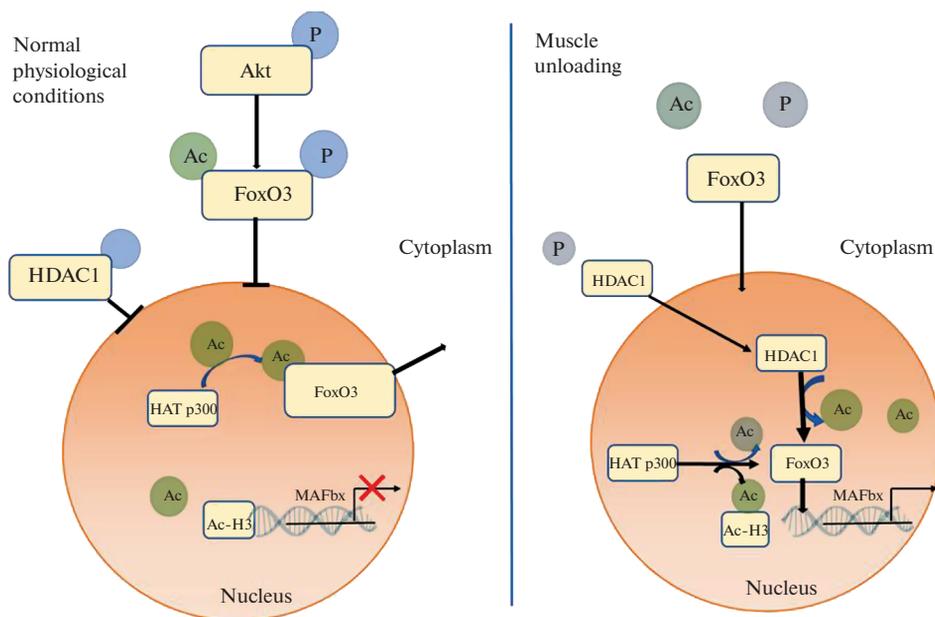


Рис. 2. Схема предполагаемой регуляции экспрессии E3-лигаз с помощью HDAC1. К увеличению экспрессии E3-убиквитинлигаз может вести накопление HDAC в ядре. В нормальном состоянии фосфорилированный и ацетилированный FOXO3 а также фосфорилированная HDAC1 не поступают в ядро. При дефосфорилировании они проникают в ядро, HDAC1 деацетилюет FOXO3. HAT P300 (гистонацетилтрансфераза P300) в ядре перестает ацетилировать лизин на FOXO3а, что позволяет ему запустить экспрессию atrogen-1, так как гистон H3 в это время перестает плотно связывать место контакта FOXO3а с ДНК.

время перестает плотно связывать место контакта FOXO3а с ДНК. Схема регуляции HDAC1 экспрессии atrogen-1 приведена на рис. 2.

Итак, HDAC1 контролирует экспрессию E3-лигазы atrogen-1/MAFbx при функциональной разгрузке мышц. Вероятно, контроль экспрессии atrogen-1 (наряду с фосфорилированием/дефосфорилированием сайта FOXO3а) осуществляется с помощью его ацетилирования/деацетилирования.

3. ФУНКЦИЯ И МЕХАНИЗМ КОНТРОЛЯ HDAC4/5 ЭКСПРЕССИИ E3-ЛИГАЗ ПРИ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ РАЗГРУЗКЕ МЫШЦ

Ферменты класса IIa HDAC (например, HDAC4/5) также участвуют в реакциях со специфическими транскрипционными факторами и оказывают влияние на регуляцию генов в скелетных мышцах. Не так много работ, в которых бы исследовали их роль в экспрессии E3-лигаз при функциональной разгрузке мышц. Четыре гистондеацетилазы класса IIa (HDAC4,5,7 и 9) являются тканеспецифическими и принимают участие в регуляции метаболизма скелетных и сердечной мышц [20, 21]. Из них HDAC4,5 известны как возможные регуляторы экспрессии генов MuRF-1 и atrogen-1. HDAC класса II (HDAC4 и HDAC5) способствуют нейрогенной атрофии через их транскрипционную репрессию Dach2, которая обычно действует для подавления миогенин-зависимой индукции генов, связанных с атрофией MuRF-1 и atrogen-1/MAFbx [30]. В настоящее время не так много сведений о регуляции его работы в мышце при разгрузке. Миогенин – мышечно специфичный транскрип-

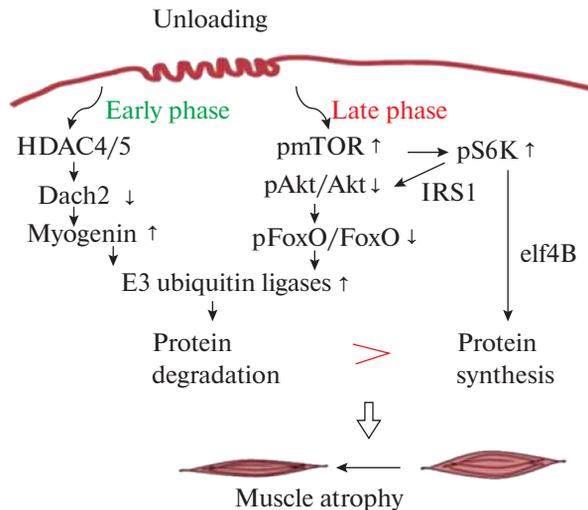


Рис. 3. Временная регуляция сигнальных каскадов при разгрузке мышц. Иллюстрация гипотезы о том, что атрофия мышц является результатом активации ряда сигнальных каскадов, одни из которых активируются на ранних этапах, другие на более поздних этапах разгрузки. На ранней стадии процесс атрофии может запускаться HDAC4/5. Она способна активировать экспрессию гена транскрипционного фактора миогенина, который поступает в ядро и приводит к экспрессии MuRF-1. На более поздних сроках разгрузки мышц включается сигнальный путь mTORC1, который активирует дальнейшую экспрессию E3-лигаз, запуская каскад Akt-FoxO (модифицированный рисунок Н. Tang и соавт. [31]).

ционный фактор, вовлеченный в координацию развития скелетной мышцы, миогенез и ее восстановление. Однако имеется сообщение о том, что удаление миогенина у взрослой мыши также снижает экспрессию MuRF-1 и atrogin-1 в мышце при денервации и способствует увеличению ее устойчивости к атрофии [30]. На рис. 3 представлена схема работы миогенина при денервации мышцы [31]. Авторы предположили, что на ранней стадии процесс атрофии может запускаться HDAC4/5. Она способна активировать работу гена транскрипционного фактора миогенина, который поступает в ядро и приводит к экспрессии MuRF-1. На более поздних сроках разгрузки мышц включается сигнальный путь mTORC1, который активирует дальнейшую экспрессию E3-лигаз, запуская каскад Akt-FoxO (рис. 3).

Вероятно, противоречия в результатах об активировании экспрессии E3 лигаз в разных работах связаны с тем, что эти события изучались в некоторых случаях на ранних, а в некоторых – на поздних сроках разгрузки мышц, когда уже запускаются другие сигнальные механизмы, регулирующие экспрессию генов E3-убиквитинлигаз. В недавней работе S. Dupré-Aucouturier и соавт. [32] обнаружено снижение степени атрофии *m. soleus* при ингибировании активности HDAC4/5 во время 14-дневного вывешивания крыс с введением трихостатина. Трихостатин – неспецифический ингибитор HDAC4/5, который влияет также и на некоторые другие сигнальные пути клетки. Авторы удивились тому факту, что экспрессия MuRF-1 у этих крыс была снижена без какого-либо влияния на него транскрипционного фактора Foxo3. Они отметили, что механизм действия препарата им остался неясным. Содержание миогенина в этой работе исследовано не было.

Мы предположили, что ингибирование HDAC4/5 в ней могло предотвратить увеличение содержания миогенина в мышце, что сделало невозможным активацию экспрессии E3-лигаз. Мы проверили эту гипотезу, применив ингибитор

HDAC4 и 5, и обнаружили, что при 3-дневной разгрузке *m. soleus* HDAC4/5 регулирует экспрессию миогенина и мРНК MAFbx/Atrogin-1. Ингибирование одной только HDAC4 специфическим ингибитором (Tq-, Tasquinimod) показало, что при разгрузке она не контролирует экспрессию всех этих белков [33].

Итак, большее значение в регуляции экспрессии миогенина и MAFbx при разгрузке имеет HDAC5, но не HDAC4 [33]. Можно отметить также, что при 3-дневной разгрузке *m. soleus* HDAC5 регулирует экспрессию atrogin-1, но не MuRF-1. Вполне вероятно, что на более позднем этапе разгрузки к регуляции HDAC5 присоединяется механизм mTORC1, который активирует дальнейшую экспрессию E3-лигаз, запуская каскад Akt-FoxO (рис. 3).

С помощью какого механизма HDAC5 может влиять на экспрессию E3 лигаз?

P. Du Bois с соавт. предположили, что PKD1 (протеинкиназа D) создает в HDAC5 мотивы распознавания фосфо-14-3-3, которые рекрутируют белки шаперона 14-3-3, что в конечном итоге приводит к экспорту HDAC5 из ядра [34]. Это предполагаемый механизм транспорта HDAC5 из ядра. Когда HDAC5 находится в ядре (как в нашем эксперименте с ингибированием HDAC5 [33]), экспрессия MAFbx блокируется. Происходит это при участии транскрипционного фактора миогенина.

Итак, при функциональной разгрузке мышц меняется ядерно-цитоплазматический обмен HDAC1 и HDAC5, что позволяет им регулировать экспрессию atrogin-1 (но не MuRF1): HDAC1 импортируется в ядро, а HDAC5 экспортируется из ядра. Контроль экспрессии MAFbx осуществляется при участии миогенина, а также с помощью ацетилирования/деацетилирования сайта FOXO3 (наряду с его фосфорилированием/ дефосфорилированием).

4. РОЛЬ P38 MAPK В ЭКСПРЕССИИ MURF-1 И ATROGIN-1/MAFBX ПРИ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ РАЗГРУЗКЕ МЫШЦ

p38 MAPK – (митоген-активированная протеинкиназа) принадлежит к MAP-киназному пути. В клетке известны три основные MAP-киназы, которые активируются фосфорилированием: это p38 MAPK, ERK (extracellular signal-related kinase) и JNK (c-Jun NH2-terminal kinase) (рис. 4).

В целом известно, что p38 MAP-киназный сигнальный путь запускает процессы транскрипции и регулирует клеточную подвижность, и этот сигнальный путь участвует в регуляции мышечной массы. Его поведение при функциональной разгрузке мышц исследовали мало. Активацию p38 MAPK наряду с атрофией мышц при вывешивании крыс отмечали T. L. Hilder и соавт., E. Dupont и соавт. [36, 37]. Последние отмечали, что увеличение активности MAPK в клетке ведет к фосфорилированию цитоплазматических и/или ядерных белков, а MAP-киназный путь частично ответственен за регуляцию процессов пролиферации и дифференциации модулированием генной экспрессии. Эти авторы полагали, что увеличение фосфорилирования p38 MAPK после 14-дневного вывешивания крыс может быть связано с изменением миозинового фенотипа и регулированием экспрессии тяжелых цепей миозина. Мы подтвердили эту гипотезу, показав, что ингибирование p38 MAPK при разгрузке *m. soleus* препятствует увеличению экспрессии быстрых изоформ тяжелых цепей миозина из-за активации сигнального каскада кальцинейрин/NFAT [38]. Но этим функция p38 MAPK не исчерпывается. Y. Liu и соавт. в 2005 г. обнаружили, что ингибирование p38 в культуре миотуб C2C12 с помощью SB203580 или куркумина вело к снижению убиквитин-конъюгатной активности [22]. Таким образом, p38 MAPK способна регулировать активность убиквитин-протеасомного сигнального пути, однако эта ее функция *in vivo* при разгрузке мышц не изучалась.

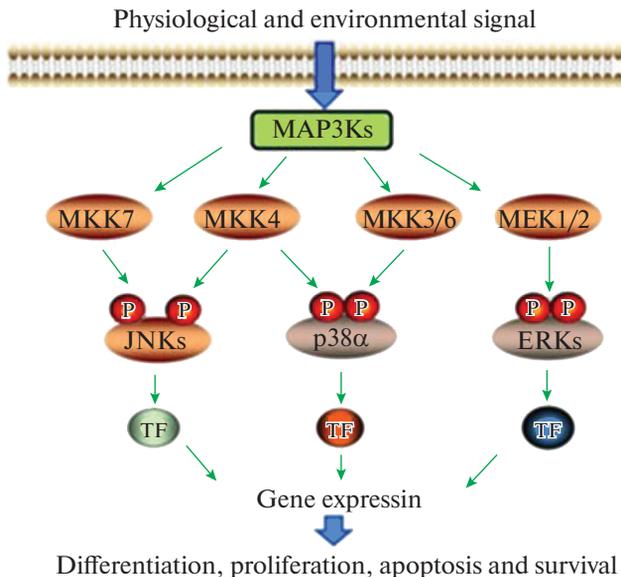


Рис. 4. Сигнальные пути, регулируемые митогенактивируемыми протеинкиназами. p38 MAPK (p38- митогенактивируемая протеинкиназа), ERK (extracellular signal-related kinase) и JNK (c-Jun NH2-terminal kinase). Модифицированная схема из [35].

Ранее мы обнаружили, что пик экспрессии E3-лигаз наблюдается к 3-му дню вывешивания крыс [14, 39]. В то же время содержание p38 MAPK во всех предыдущих работах исследовали на более поздних этапах развития атрофии и не ассоциировали с регуляцией работы убиквитин-протеасомной системы. Исключение составляет одна работа, в которой обнаружили повышение уровня фосфорилированной p38 MAPK в *m. soleus* крыс через 6 ч после иммобилизации конечности [40]. Экспрессию E3-лигаз в этой работе не тестировали.

Мы предположили, что p38MAPK может принимать участие в регуляции экспрессии MuRF-1 и атрогена-1, и, соответственно, атрофических процессов в мышце при ее функциональной разгрузке. Для проверки гипотезы мы ингибировали фосфорилирование p38MAPK специфическим селективным ингибитором VX 745 в *m. soleus* крыс линии Вистар в течение 3-суточного вывешивания крыс. Мы обнаружили, что ингибирование p38 MAP-киназы предотвращает атрофию *m. soleus* крыс, вызванную разгрузкой. Происходило это за счет снижения экспрессии кальпаина-1, E3-лигазы MuRF1 (но не atrogen-1/MAFbx), а также снижения убиквитинирования белков [39]. Механизм влияния p38 MAP-киназы на экспрессию E3-лигазы MuRF1 может быть следующим. Как упоминалось выше, индуцированная разгрузкой экспрессия MuRF1 и MAFbx контролируется транскрипционным фактором FoxO [15]. Уровень фосфорилирования FOXO3 был снижен только в *m. soleus* крыс, вывешенных без ингибирования p38 MAP-киназы, а там, где вводили ингибитор, он не отличался от группы контроля. Т.к. только нефосфорилированная форма FOXO3 способна проникать в ядро и активировать экспрессию MuRF1, можно предположить, что ингибирование p38 MAP-киназы при вывешивании крыс препятствовало снижению уровня pFOXO3 и экспрессии MuRF1 в этой группе. Наши данные коррелируют с предыдущими исследованиями, показывающими, что активность FoxO3 может регулироваться с помощью передачи сигналов киназы p38α MAP.

Например, транскрипционная активность FoxO3 снижалась в мышцах мышей с мышечно-специфическим удалением киназы p38 α MAP [41]. Передача сигналов киназы p38 MAP также регулирует ядерную транслокацию и транскрипционную активность FoxO3 в миоцитах [42]. На маркеры процессов трансляции и элонгации белков ингибирование p38 MAP-киназы при вывешивании никакого дополнительного влияния в нашем эксперименте не оказывало [39]. Мы показали также, что в эту регуляцию вовлечены IL-6 и PGC-1 α .

Наше исследование впервые показало, что p38 MAP-киназа принимает участие в регуляции экспрессии MuRF1 (но не MAFbx), при функциональной разгрузке *m. soleus*.

Механизм, активирующий работу гена MuRF-1 может быть связан с фосфорилированием/дефосфорилированием транскрипционного фактора FOXO3.

Итак, 1. на раннем этапе функциональной разгрузки (3 дня) HDAC1, HDAC4/5 контролируют экспрессию E3-лигазы atrogen-1/MAFbx, но не MuRF-1 в *m. soleus*. 2. Контроль экспрессии атрогена-1 (наряду с фосфорилированием/дефосфорилированием сайта FOXO3a) осуществляется с помощью его ацетилирования/деацетилирования. 3. HDAC4/5 осуществляет контроль над экспрессией atrogen-1/MAFbx также и с помощью миогенина. 4. При этом изменяется внутриклеточная локализация гистондеацетилаз: HDAC1 при функциональной разгрузке *m. soleus* поступает в ядро, HDAC5 экспортируется из ядра.

Можно заключить, что на раннем этапе функциональной разгрузки мышц влияние на экспрессию E3-убиквитинлигаз осуществляется комплексно (со стороны нескольких сигнальных путей). Кроме известного пути Akt/mTORC1, сигнальные пути, регулируемые HDAC1 и HDAC4/5 контролируют экспрессию atrogen-1, а внутриклеточный путь p38 MAPK контролирует экспрессию MuRF1. Ранее мы не обнаружили взаимосвязи между регуляцией NF- κ B сигнального пути (IKKbeta) и экспрессией MAFbx и MuRF1 на раннем этапе функциональной разгрузки. Знания о ранней активации убиквитин-протеасомной системы мышц приводят к выводу о том, что применение систем профилактики при возникновении условий для функциональной разгрузки мышц не должно быть отставленным. В настоящее время фармакологическая коррекция таких состояний начинается использоваться только после появления явных признаков дисфункции мышц. Определение механизмов, контролирующих протеолиз мышечных белков при функциональной разгрузке, поможет разработать систему фармакологической коррекции атрофических процессов в мышце.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ № 20-015-00138 и РНФ № 18-15-00062.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Автор декларирует отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией данной статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bodine SC, Baehr LM (2014) Skeletal muscle atrophy and the E3 ubiquitin ligases MuRF1 and MAFbx/atrogen-1. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 307 (6): E469–484. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00204.2014>
2. Baehr LM, West DWD, Marshall AG, Marcotte GR, Baar K, Bodine SC (2017) Muscle-specific and age-related changes in protein synthesis and protein degradation in response to hindlimb unloading in rats. *J Appl Physiol* 122 (5): 1336–1350. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00703.2016>

3. Baldwin KM, Haddad F (2002) Skeletal muscle plasticity: cellular and molecular responses to altered physical activity paradigms. *Am J Phys Med Rehabil* 81 (11 Suppl): S40–S51. <https://doi.org/10.1097/01.PHM.0000029723.36419.0D>
4. Fitts RH, Riley DR, Widrick JJ (2000) Physiology of a microgravity environment invited review: microgravity and skeletal muscle. *J Appl Physiol* 89 (2): 823–839. <https://doi.org/10.1152/jappl.2000.89.2.823>
5. Fluck M, Hoppeler H (2003) Molecular basis of skeletal muscle plasticity—from gene to form and function. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 146: 159–216. <https://doi.org/10.1007/s10254-002-0004-7>
6. Glass DJ (2003) Signalling pathways that mediate skeletal muscle hypertrophy and atrophy. *Nat Cell Biol* 5(2): 87–90. <https://doi.org/10.1038/ncb0203-87>
7. Jackman RW, Kandarian SC (2004) The molecular basis of skeletal muscle atrophy. *Am J Physiol Cell Physiol* 287(4): C834–C843. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00579.2003>
8. Cohen S, Brault JJ, Gygi SP, Glass DJ, Valenzuela DM, Gartner C, Latres E, Goldberg AL (2009) During muscle atrophy, thick, but not thin, filament components are degraded by MuRF1-dependent ubiquitylation. *J Cell Biol* 185(6): 1083–1095. <https://doi.org/10.1083/jcb.200901052>
9. Baldwin KM, Herrick RE, Ilyina-Kakueva E, Oganov VS (1990) Effects of zero gravity on myofibril content and isomyosin distribution in rodent skeletal muscle. *FASEB J* 4(1): 79–83. <https://doi.org/10.1096/fasebj.4.1.2136840>
10. Solomon V, Goldberg AL (1996) Importance of the ATP-ubiquitin-proteasome pathway in the degradation of soluble and myofibrillar proteins in rabbit muscle extracts. *J Biol Chem* 271(43): 26690–26697. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.43.26690>
11. Clarke BA, Drujan D, Willis MS, Murphy LO, Corpina RA, Burova E, Rakhilin SV, Stitt TN, Patterson C, Latres E, Glass DJ (2007) The E3 Ligase MuRF1 degrades myosin heavy chain protein in dexamethasone-treated skeletal muscle. *Cell Metab* 6(5): 376–385. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2007.09.009>
12. Attaix D, Baracos VE (2010) MAFbx/Atrogin-1 expression is a poor index of muscle proteolysis. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 13(3): 223–224. <https://doi.org/10.1097/MCO.0b013e328338b9a6>
13. Bodine SC, Latres E, Baumhueter S, Lai VK, Nunez L, Clarke BA, Poueymirou WT, Panaro FJ, Na E, Dharmarajan K, Pan ZQ, Valenzuela DM, DeChiara TM, Stitt TN, Yancopoulos GD, Glass DJ (2001) Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. *Science* 294(5547): 1704–1708. <https://doi.org/10.1126/science.1065874>
14. Kachaeva EV, Shenkman BS (2012) Various jobs of proteolytic enzymes in skeletal muscle during unloading: facts and speculations. *J Biomed Biotechnol* 2012: 493618. <https://doi.org/10.1155/2012/493618>
15. Sandri M, Sandri C, Gilbert A, Skurk C, Calabria E, Picard A, Walsh K, Schiaffino S, Lecker SH, Goldberg AL (2004) Foxo transcription factors induce the atrophy-related ubiquitin ligase atrogin-1 and cause skeletal muscle atrophy. *Cell* 117(3): 399–412. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(04\)00400-3](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(04)00400-3)
16. Shenkman BS, Belova SP, Lomonosova YN, Kostrominova TY, Nemirovskaya TL (2015) Calpain-dependent regulation of the skeletal muscle atrophy following unloading. *Arch Biochem Biophys* 584: 36–41. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2015.07.011>
17. Belova SP, Shenkman BS, Kostrominova TY, Nemirovskaya TL (2017) Paradoxical effect of IKK-beta inhibition on the expression of E3 ubiquitin ligases and unloading-induced skeletal muscle atrophy. *Physiol Rep* 5(16): e13291. <https://doi.org/10.14814/phy2.13291>
18. McGee SL, Hargreaves M (2010) Histone modifications and skeletal muscle metabolic gene expression. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 37(3): 392–396. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1681.2009.05311.x>
19. Gaur V, Connor T, Sanigorski A, Martin SD, Bruce CR, Henstridge DC, Bond ST, McEwen KA, Kerr-Bayles L, Ashton TD, Fleming C, Wu M, Pike Winer LS, Chen D, Hudson GM, Schwabe JWR, Baar K, Febbraio MA, Gregorevic P, Pfeiffer FM, Walder KR, Hargreaves M, McGee SL (2016) Disruption of the Class IIa HDAC CoRepressor Complex Increases Energy Expenditure and Lipid Oxidation. *Cell Rep* 16 (11): 2802–2810. <https://doi.org/10.1016/j.celRep.2016.08.005>
20. Астратенкова ИВ, Rogozkin VA (2016) Сигнальные пути, участвующие в регуляции метаболизма белков скелетных мышц. *Рос физиол журн им ИМ Сеченова* 102 (7): 753–772. [Astratenkova IV, Rogozkin VA (2016) Signaling Pathways Involved in the Regulation of Protein Metabolism in Skeletal Muscle. *Russ J Physiol* 102(7): 753–772. (In Russ).]

21. *Astratenkova IB, Rogozkin VA* (2017) Роль ацетилирования/деацетилирования гистонов и транскрипционных факторов в регуляции метаболизма в скелетных мышцах. *Рос физиол журн им ИМ Сеченова* 103(6): 593–605. [*Astratenkova IV, Rogozkin VA* (2017) The role of acetylation /deacetylation of histones and transcription factors in the regulation of skeletal muscle metabolism. *Russ J Physiol* 103(6): 593–605. (In Russ)].
22. *Liu Y, Shen T, Randall WR, Schneider MF* (2005) Signaling pathways in activity-dependent fiber type plasticity in adult skeletal muscle. *J Muscle Res Cell Motil* 26(1): 13–21. <https://doi.org/10.1007/s10974-005-9002-0>
23. *Shenkman BS, Nemirovskaya TL* (2008) Calcium-dependent signaling mechanisms and soleus fiber remodeling under gravitational unloading. *J Muscle Res Cell Motil* 29(6–8): 221–230. <https://doi.org/10.1007/s10974-008-9164-7>
24. *Brocca L, Toniolo L, Reggiani C, Bottinelli R, Sandri M, Pellegrino MA* (2017) FoxO-dependent atrogenes vary among catabolic conditions and play a key role in muscle atrophy induced by hindlimb suspension. *J Physiol* 595(4): 1143–1158. <https://doi.org/10.1113/JP273097>
25. *Beharry AW, Sandesara PB, Roberts BM, Ferreira LF, Senf SM, Judge AR* (2014) HDAC1 activates FoxO and is both sufficient and required for skeletal muscle atrophy. *J Cell Sci* 127 (Pt 7): 1441–1453. <https://doi.org/10.1242/jcs.136390>
26. *Peris-Moreno D, Taillandier D, Polge C* (2020) MuRF1/TRIM63, Master Regulator of Muscle Mass. *Int J Mol Sci* 21(18): 6663. <https://doi.org/10.3390/ijms21186663>
27. *Bertaggia E, Coletto L, Sandri M* (2012) Posttranslational modifications control FoxO3 activity during denervation. *Am J Physiol Cell Physiol* 302(3): C587–C596. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00142.2011>
28. *Mochalova EP, Belova SP, Mirzoev TM, Shenkman BS, Nemirovskaya TL* (2019) Atrogin-1/MAFbx mRNA expression is regulated by histone deacetylase 1 in rat soleus muscle under hindlimb unloading. *Sci Rep* 9(1): 10263. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-46753-0>
29. *Senf SM, Sandesara PB, Reed SA, Judge AR* (2011) p300 Acetyltransferase activity differentially regulates the localization and activity of the FOXO homologues in skeletal muscle. *Am J Physiol Cell Physiol* 300(6): C1490–C1501. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00255.2010>
30. *Moresi V, Williams AH, Meadows E, Flynn JM, Pothoff MJ, McAnally J, Shelton JM, Backs J, Klein WH, Richardson JA, Bassel-Duby R, Olson EN* (2010) Myogenin and class II HDACs control neurogenic muscle atrophy by inducing E3 ubiquitin ligases. *Cell* 143(1): 35–45. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.09.004>
31. *Tang H, Inoki K, Lee M, Wright E, Khuong A, Khuong A, Sugiarto S, Garner M, Paik J, DePinho RA, Goldman D, Guan KL, Shragar JB* (2014) mTORC1 promotes denervation-induced muscle atrophy through a mechanism involving the activation of FoxO and E3 ubiquitin ligases. *Sci Signal* 7(314): ra18. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2004809>
32. *Dupre-Aucouturier S, Castells J, Freyssenet D, Desplanches D* (2015) Trichostatin A, a histone deacetylase inhibitor, modulates unloaded-induced skeletal muscle atrophy. *J Appl Physiol* 119(4): 342–351. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.01031.2014>
33. *Mochalova EP, Belova SP, Kostrominova TY, Shenkman BS, Nemirovskaya TL* (2020) Differences in the Role of HDACs 4 and 5 in the Modulation of Processes Regulating MAFbx and MuRF1 Expression during Muscle Unloading. *Int J Mol Sci* 21(13): 4815. <https://doi.org/10.3390/ijms21134815>
34. *Du Bois P, Pablo Tortola C, Lodka D, Kny M, Schmidt F, Song K, Schmidt S, Bassel-Duby R, Olson EN, Fielitz J* (2015) Angiotensin II Induces Skeletal Muscle Atrophy by Activating TFEB-Mediated MuRF1 Expression. *Circ Res* 117(5): 424–436. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.114.305393>
35. *Wang J, Xia Y* (2012) Assessing developmental roles of MKK4 and MKK7 in vitro. *Commun Integr Biol* 5(4): 319–324. <https://doi.org/10.4161/cib.20216>
36. *Hilder TL, Baer LA, Fuller PM, Fuller CA, Grindeland RE, Wade CE, Graves LM* (2005) Insulin-independent pathways mediating glucose uptake in hindlimb-suspended skeletal muscle. *J Appl Physiol* 99(6): 2181–2188. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00743.2005>
37. *Dupont E, Cieniewski-Bernard C, Bastide B, Stevens L* (2011) Electrostimulation during hindlimb unloading modulates PI3K-AKT downstream targets without preventing soleus atrophy and restores slow phenotype through ERK. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 300(2): R408–R417. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00793.2009>

38. *Sharlo KA, Mochalova EP, Belova SP, Lyova ID, Nemirovskaya TL, Shenkman BS* (2020) The role of MAP-kinase p38 in the m. soleus slow myosin mRNA transcription regulation during short-term functional unloading. *Arch Biochem Biophys* 695: 108622.
<https://doi.org/10.1016/j.abb.2020.108622>
39. *Belova SP, Mochalova EP, Kostrominova TY, Shenkman BS, Nemirovskaya TL* (2020) P38alpha-MAPK Signaling Inhibition Attenuates Soleus Atrophy during Early Stages of Muscle Unloading. *Int J Mol Sci* 21(8): 2756.
<https://doi.org/10.3390/ijms21082756>
40. *Kawamoto E, Koshinaka K, Yoshimura T, Masuda H, Kawanaka K* (2016) Immobilization rapidly induces muscle insulin resistance together with the activation of MAPKs (JNK and p38) and impairment of AS160 phosphorylation. *Physiol Rep* 4(15): e12876.
<https://doi.org/10.14814/phy2.12876>
41. *Yuasa K, Okubo K, Yoda M, Otsu K, Ishii Y, Nakamura M, Itoh Y, Horiuchi K* (2018) Targeted ablation of p38alpha MAPK suppresses denervation-induced muscle atrophy. *Sci Rep* 8(1): 9037.
<https://doi.org/10.1038/s41598-018-26632-w>
42. *Clavel S, Siffroi-Fernandez S, Coldefy AS, Boulukos K, Pisani DF, Derijard B* (2010) Regulation of the intracellular localization of Foxo3a by stress-activated protein kinase signaling pathways in skeletal muscle cells. *Mol Cell Biol* 30 (2): 470–480.
<https://doi.org/10.1128/MCB.00666-09>

**The Role of Histone Deacetylases I and IIa (HDAC1, HDAC4/5)
and the MAPK38 Signaling Pathway in the Regulation of Atrophic Processes
under Unloading of Skeletal Muscles**

T. L. Nemirovskaya*

Institute of Biomedical Problems, RAS, Moscow, Russia

**e-mail: nemirovskaya@bk.ru*

Various forms of muscle unloading can be found in patients with prolonged bed rest, with strokes and spinal lesions, during muscle immobilization in traumatology, in zero gravity, etc. During unloading, basically, postural muscles (for example, soleus) are affected. The rearrangement of skeletal muscles during unloading is based on their atrophy due to an increase in proteolysis and a decrease in the intensity of protein synthesis [1, 2]. The review is devoted to the study of the histone deacetylases I and IIa (HDAC1, HDAC4/5) role, as well as the MAPK38 signaling pathway in the activation of transcription factors FOXO and myogenin, which are involved in the expression of E3 ubiquitin ligases genes atrogen-1 and MuRF-1 under skeletal muscle unloading.

Keywords: skeletal muscle, muscle unloading, E3 ligases, HDAC1, HDAC4/5, p38MAPK

ОБЗОРНЫЕ
И ПРОБЛЕМНЫЕ СТАТЬИ

ОТЛИЧИТЕЛЬНЫЕ ОСОБЕННОСТИ РЕГУЛЯТОРНОЙ ФУНКЦИИ
ТРОПОМИОЗИНА ПРИ РАЗЛИЧНЫХ ВАРИАНТАХ
НАСЛЕДСТВЕННОЙ МИОПАТИИ

© 2021 г. О. Е. Карпичева*

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

** E-mail: olexiyab@ya.ru*

Поступила в редакцию 19.02.2021 г.

После доработки 23.03.2021 г.

Принята к публикации 04.04.2021 г.

Наследственные миопатии – это группа редких клинически и генетически гетерогенных заболеваний, которые объединены первичным поражением скелетных мышц и характеризуются медленно прогрессирующей мышечной слабостью и гипотонией, а также морфологическими изменениями в мышечной ткани. Спектр вариантов наследственных миопатий довольно широк, а признаки неоднородны, поэтому постановка диагноза часто затруднена. До сих пор не существует эффективной терапии миопатий – применяется лишь симптоматическое лечение, направленное на улучшение метаболизма и микроциркуляции крови в мышцах. Вместе с тем, многие из этих заболеваний существенно снижают качество и продолжительность жизни человека. Накопление знаний, необходимых для ранней и точной диагностики наследственных миопатий и для разработки подходов эффективного лечения заболеваний дисфункции мышечной ткани является одной из актуальных задач биологии и медицины. В самое последнее время появилась серия работ, в которых делается попытка охарактеризовать молекулярные механизмы возникновения и развития ряда миопатий, вызванных генными мутациями мышечных белков тропомиозина, тропонина, небулина, актина и некоторых других. Представляется крайне важным проанализировать опубликованные данные и на основании этого выделить критические изменения структурно-функциональных свойств белков мышечного волокна, которые можно использовать в качестве тестов для дифференциальной диагностики миопатий, и определить молекулярные мишени для терапевтического воздействия. Кроме того, одной из задач обзора является анализ и обобщение литературных и оригинальных, полученных методом поляризационной микрофлуориметрии, данных о молекулярных механизмах регуляции мышечного сокращения мутантными формами тропомиозина, появляющимися в мышечной ткани при нескольких скелетно-мышечных заболеваниях человека.

Ключевые слова: наследственная миопатия, мутации генов тропомиозина, молекулярные механизмы регуляции мышечного сокращения, актин-миозиновое взаимодействие, терапевтические мишени, этиотропное лечение

DOI: 10.31857/S0869813921060054

Известно, что мутации в генах различных мышечных белков инициируют возникновение тяжелых заболеваний скелетно-мышечной ткани человека, характеризующихся мышечной слабостью и гипотонией. Клинические симптомы наследственных миопатий, как правило, проявляются с самого рождения или в раннем

детском возрасте. Осложнения, вызванные дисфункцией скелетных мышц, варьируют от ортопедических деформаций и задержки развития двигательных функций до трудностей в передвижении и дыхательной недостаточности. Для решения респираторных проблем в ряде случаев возникает необходимость в регулярном мониторинге дыхательной недостаточности, назначении неинвазивной и инвазивной вентиляции легких, трахеостомии. Прогрессирование деформаций скелета может вызвать тяжелую сердечную недостаточность. Пациентам со средней и тяжелой формами миопатии может требоваться операция по исправлению сколиоза, а также терапия, направленная на предупреждение сердечной недостаточности. Самыми распространенными причинами смерти пациентов, страдающих наследственными миопатиями, являются сердечно-легочный коллапс, скелетные деформации и злокачественная гипертермия. Отсутствие ранней дифференциальной диагностики миопатий и недостаточность данных о молекулярных механизмах мышечной дисфункции приводят к тому, что эффективной терапии наследственных миопатий пока не существует.

Есть основания полагать, что точная диагностика конкретного патологического варианта наследственной миопатии должна быть основана не только на генетике, гистопатологии и клинических симптомах, но и на информации о молекулярных механизмах нарушения сократительной функции саркомера. Именно наличие такой информации позволит соотнести мутации, возникающие в генах различных мышечных белков, с конкретным вариантом миопатии и выявить единые или, наоборот, отличные друг от друга механизмы мышечной дисфункции. Поскольку мутации в генах различных белков могут приводить к одному клиническому фенотипу, то, по-видимому, существуют определенные молекулярные механизмы для каждого варианта миопатии, вне зависимости от белка, в гене которого произошла мутация. Одной из генетических причин появления мышечной слабости являются мутации в генах *TRP2* и *TRP3*, кодирующих скелетный мышечный тропомиозин. На примере мутаций в тропомиозине можно проследить характерные структурно-функциональные особенности белков скелетных мышц при нескольких вариантах скелетно-мышечной патологии, таких как врожденная диспропорция типов мышечных волокон (CFTD), немалиновая миопатия, кэп-миопатия, дистальный артрогрипоз.

В последние годы были опубликованы обзоры, посвященные описанию изменений некоторых структурно-функциональных свойств мутантных форм тропомиозина, связанных с наследственными заболеваниями сердечной и скелетных мышц [1, 2]. Также в литературе представлено несколько обзоров, сфокусированных на обсуждении клинических признаков различных вариантов скелетно-мышечных заболеваний и генетических причин, их вызывающих [3–5]. Целью настоящего обзора является описание последствий мутаций в тропомиозине для функционирования сократительной системы и выявление взаимосвязей между критическими изменениями свойств мутантных тропомиозинов и патологическими процессами, происходящими в мышечном волокне, при нескольких вариантах дисфункции скелетных мышц. Одной из задач обзора является обсуждение молекулярных мишеней для устранения негативных эффектов мутаций, а также описание данных о механизмах действия известных химических соединений, перспективных для коррекции нарушений сократительной функции.

Обзор разделен на 4 основных раздела. Первый раздел посвящен анализу данных литературы о вариантах наследственных заболеваний скелетных мышц и способах их диагностики. Затем рассмотрены результаты исследования влияния ряда мутаций в генах скелетного мышечного тропомиозина на структурно-функцио-

нальные свойства этого регуляторного белка. В третьем разделе приведены обобщенные результаты исследования патогенной роли ряда аминокислотных замен и делеции в тропомиозине, связанных с различными миопатиями, в регуляции актин-миозинового взаимодействия в мышечном волокне, которые были получены с помощью метода поляризационной флуоресцентной микроскопии. В заключительном разделе проведен обзор потенциальных лекарственных препаратов для коррекции сократительной функции при наследственных миопатиях.

1. ВАРИАНТЫ НАСЛЕДСТВЕННЫХ МИОПАТИЙ И ИХ ДИАГНОСТИКА

Наследственные миопатии определяются как клинически и генетически гетерогенные заболевания скелетной мускулатуры, которые обычно проявляются в раннем детском возрасте в виде мышечной слабости и гипотонии, медленно прогрессирующими с течением времени [6]. Как правило, это редкие заболевания (встречаются у одного из 10000–20000 детей [7]), однако в некоторых случаях частота заболевания может достигать 1 : 500 и 1 : 40, как это происходит соответственно в субэтнических группах Амишей с делецией в гене тропонина T1, вызывающей делецию Glu180 [8], и Ашкеназы с делецией экзона 55 в гене небулина [9], приводящих к немалиновой миопатии.

Понятие наследственной миопатии (congenital myopathy) было введено в 1950-е годы для описания группы скелетных мышечных заболеваний, характеризующихся слабостью мышц [10]. Морфологические изменения в мышечных волокнах в виде нерегулярно расположенных нитеобразных фрагментов были впервые обнаружены при описании немалиновой миопатии (“нема” – от греческого слова нить, [11]). Позже выяснилось, что генетической причиной являлась точечная мутация в гене α -актина [12]. В настоящее время известны мутации в 32-х генах, связанные с развитием различных вариантов наследственной миопатии; количество генетических причин стремительно увеличивается (см. обзор [5]). Назрела явная необходимость разработки четких критериев классификации мутаций и диагностики вариантов миопатий.

Согласно современной классификации, выделяют несколько форм наследственной миопатии: немалиновую, центроядерную, CFTD, стержневую и миопатию с накоплением миозина [5]. Де-факто ряд миопатий включает в себя также кэп-миопатию, ядерно-стержневую болезнь, миопатию зебра-тел, болезнь центрального стержня, мультиминистержневую миопатию, миотубулярную миопатию, дистальный артрогрипоз (иногда рассматриваемый именно как миопатия), актиновую миопатию, миопатию внутриядерного стержня, дистальную миопатию, миофибриллярную миопатию и некоторые другие менее известные заболевания, относимые авторами к разным общим патологическим вариантам. Терминология в клинической практике России пока не устоялась, и перевод названий заболеваний с английского языка на русский в разных источниках зачастую является весьма произвольным. Варианты наследственных миопатий (табл. 1) регистрируются в международном реестре больных с мышечными заболеваниями (CMDIR, см. сайт cmdir.org), в котором также можно получить информацию о проходящих клинических исследованиях.

Современные методы диагностики предполагают проведение генетического тестирования сразу после составления истории болезни пациента и первичного диагностического обследования. Знание генетической причины заболевания позволяет в некоторой степени спрогнозировать развитие клинических симптомов, как

Таблица 1. Наследственные заболевания скелетных мышц, зарегистрированные в базе данных Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM), и их генетические причины [13]

Вариант наследственной миопатии	Номер MIM	Название гена и белка
Немалиновая миопатия, кэп-миопатия	161800	<i>ACTA1</i> (Актин, α , скелетный мышечный)
	256030	<i>NEB</i> (Небулин)
	605355	<i>TNNT1</i> (Тропонин Т, медленный скелетный мышечный)
	609284	<i>TPM3</i> (Тропомозион-3, γ -цепь)
	609285	<i>TPM2</i> (Тропомозион-2, β -цепь)
	609273	<i>KBVB13</i> (Белок 13, содержащий Кельч-повтор и ВТВ/POZ-домен)
	610687	<i>CFL2</i> (Кофилин 2, мышечный)
	615348	<i>KLHL40</i> (Кельч-подобный белок 40)
	615731	<i>KLHL41</i> (Кельч-подобный белок 41)
	616165	<i>LMOD3</i> (Лейомодин 3)
617336	<i>MYPN</i> (Миопалладин)	
Врожденная диспропорция типов мышечных волокон (CFTD)	255310	<i>ACTA1</i> (Актин, α , скелетный мышечный) <i>SELENON</i> (Селенопротеин N) <i>TPM3</i> (Тропомозион-3, γ -цепь) <i>RYR1</i> (Рианодиновый рецептор 1) <i>MYH7</i> (Миозин 7, тяжелая цепь, сердечный, медленный скелетный мышечный) <i>MYL2</i> (Миозин, регуляторная легкая цепь 2)
	617760	<i>ZAK</i> (Киназа, содержащая лейциновую застезку и стерильный α -мотив)
Дистальный артрогрипоз	108120	<i>TPM2</i> (Тропомозион-2, β -цепь)
	601680	<i>TNNT2</i> (Тропонин I, быстрый скелетный мышечный)
	108145, 114300	<i>PIEZO2</i> (Компонент 1 механочувствительного ионного канала пьезо-типа)
	618435	<i>TNNT3</i> (Тропонин T3, быстрый скелетный мышечный)
	618436, 193700	<i>MYH3</i> (Миозин 3, тяжелая цепь, скелетный мышечный, эмбриональный)
	158300	<i>MYBPC1</i> (Миозин-связывающий белок C, медленный скелетный мышечный)
	614335	<i>MYH8</i> (Миозин 8, тяжелая цепь, скелетный мышечный, перинатальный) и др.
Болезнь центрального стержня	117000	<i>RYR1</i> (Рианодиновый рецептор 1)
Миотубулярная миопатия	310400	<i>MTM1</i> (Миотубуларин)
Миофибриллярная миопатия	601419	<i>DES</i> (Десмин)
	608810	<i>CRYAB</i> (γ -В кристаллин)
	182920	<i>MYOT</i> (Миотилин)
	609524	<i>FLNC</i> (Филамин C)
	603689	<i>TTN</i> (Титин)
	617258	<i>PYROXD1</i> (Пиридиннуклеотид-дисульфид оксидоредуктазный домен-содержащий белок 1) и др.

Таблица 1. Окончание

Вариант наследственной миопатии	Номер MIM	Название гена и белка
Центроядерная миопатия	160 150	<i>DNM2</i> (Динамин 2)
	255 200	<i>BIN1</i> (Мостиковый интегратор 1, амфилизин)
	614807	<i>CCDC78</i> (Кодирующий белок 78, содержащий домен суперспирали)
	615959	<i>SPEG</i> (Белковая киназа, преимущественно экспрессирующаяся в поперечно-полосатых мышцах)
	617760	<i>ZAK</i> (Киназа, содержащая лейциновую застежку и стерильный α -мотив) <i>RYR1</i> (Рианодиновый рецептор 1)
Дистальная миопатия	160 500	<i>MYH7</i> (Миозин 7, тяжелая цепь, сердечный, медленный скелетный мышечный)
	614065	<i>FLNC</i> (Филамин С)
	618655	<i>ACTN2</i> (α -Актинин 2)
	600 334	<i>TTN</i> (Титин) и др.
Миопатия с накоплением миозина	608 358, 255 160	<i>MYH7</i> (Миозин 7, тяжелая цепь, сердечный, медленный скелетный мышечный)

это происходит в случае актинопатий, миозинопатий и рианодин-рецептор-связанных миопатий [5]. Однако в основном такой подход оказывается неэффективным, поскольку обнаружено, что генетические причины одного и того же варианта наследственной миопатии неоднородны. Широкий спектр генетических дефектов может являться причиной схожих клинических фенотипов. Например, причиной немалиновой миопатии могут быть мутации в генах скелетного актина, β - и γ -тропомиозинов, тропонина Т, небулина, кофилина-2, и Келч-подобного и ВТВ(POZ)-домен-содержащего белка 13, что предполагает единый патологический механизм нарушения функционирования тонких нитей саркомера. Также одна и та же генетическая мутация может быть связана с несколькими различными заболеваниями скелетных мышц или с неуточненным вариантом миопатии [14–16].

Одним из наиболее информативных способов диагностики является гистологический анализ биоптата мышечной ткани и обнаружение ультраструктурных особенностей. Результаты биопсии скелетных мышц, пораженных при наследственной миопатии, показывают различные гистологические изменения, включая немалиновые тельца, кэп-структуры, различные стержни, волокна с центральными ядрами, гипотрофию волокон с определенным процентом диспропорции, области фокального уменьшения окислительного окрашивания (“cores”), жировую инфилтрацию, и другие аномалии. Внутриклеточные включения отличаются по локализации внутри саркомера и по своему составу. Так, немалиновые тельца представляют собой четкие палочковидные включения в саркоплазме, состоящие из актина, миотилина, небулина, тропомиозина, γ -филамина, кофилина, телетонина и α -актинина [17]. Кэп-структуры – четко очерченные шапочковидные включения непосредственно под сарколеммой мышечного волокна, в состав которых входит актин, миотилин, кластеры небулина и десмина, тропомиозин, тропонин Т и SERCA [18]. В некоторых случаях определение типа внутриклеточных включений в мышечной биопсии вызывает противоречия между авторами [19]. Гистологические критерии пересекаются друг с другом. Признак CFTD – гипотрофия во-

локон 1 типа — часто встречается у пациентов с немалиновой миопатией и кэп-миопатией [17]. Тем не менее, в клинической практике CFTD выделяют в отдельную группу заболеваний. Описаны случаи обнаружения в саркомере как немалиновых телец, так и кэп-структур одновременно [20]. Видимо, по этой причине кэп-миопатию зачастую рассматривают как подтип немалиновой миопатии [3, 5, 17].

Молекулярные механизмы появления аномальных белковых агрегатов в саркомере остаются все еще неизвестными. Есть основания предполагать, что изменения в структуре мышечных волокон вызваны некими компенсаторными процессами в мышечном волокне, которые запускаются вследствие изменения структурных и функциональных свойств мышечных белков. Это предположение подтверждается фактом, что внутриклеточные включения появляются в мышечном волокне после развития других клинических доказательств заболевания. Возможно, мутантные актин-связывающие белки покидают тонкие нити и инициируют образование белковых агрегатов — немалиновых телец, кэп-структур, стержней, а также изменения структуры саркомера. Также высказано предположение, что возникновение немалиновых телец может быть последствием метаболического стресса вследствие истощения запасов АТФ.

Таким образом, границы между различными миопатиями весьма условны, а разработанные критерии недостаточны для точной диагностики варианта миопатии. Классификация мутаций и диагностика варианта миопатии затруднена ввиду неоднородности генетических и клинических критериев заболеваний и перекрывания этих критериев внутри самой группы наследственных миопатий и за ее пределами с нейромышечными заболеваниями, а также противоречивостью гистологического анализа образцов биопсии мышечной ткани пациентов. Вместе с тем, постановка правильного диагноза критически важна для возможности прогнозирования заболевания и для принятия решения о стратегии лечения. По-видимому, идеальная система диагностики должна быть основана не только на генетических, гистопатологических и клинических признаках, но и на информации о первичных нарушениях сократительной функции саркомера вследствие мутаций на молекулярном уровне.

Следует отметить, что до сих пор не выявлены те характерные особенности, которые лежат в основе патогенеза различных вариантов наследственной миопатии. Согласно современным представлениям, сократительная функция скелетных мышц при наследственных миопатиях может нарушаться в результате дисфункции белков саркомера, таких как актин, тропомиозин, небулин, тропонин Т, тропонин И, миозин (тяжелые и легкие цепи), кофилин, миопалладин, лейомодин, динамин и некоторых других, и последующих компенсаторных процессов в мышцах. Действительно, ряд мутантных мышечных белков принимает непосредственное участие в поддержании структуры саркомера и мышечном сокращении. Вследствие мутаций в генах этих белков либо происходит неправильная сборка актиновой нити, либо расстраивается динамическое взаимодействие миозиновых и актиновых нитей друг с другом. Функция других же мутантных белков связана с регуляцией уровня Ca^{2+} в саркоплазматическом ретикулуме и клеточным ответом на окислительный стресс.

При изучении молекулярных механизмов мышечной дисфункции было обнаружено, что мутации в тропомиозине, тропонине и других компонентах саркомера могут приводить к изменению чувствительности сократительной системы к концентрации ионов Ca^{2+} и развитию первичной миопатии. Некоторые из известных миопатий на ранних стадиях развития демонстрируют ослабление сократительной

способности и уменьшение чувствительности мышечных волокон к ионам Ca^{2+} (гипосократительный фенотип) [21]. Другие миопатии сопровождаются усилением сократимости мышечной ткани и повышением ее чувствительности к ионам Ca^{2+} (гиперсократительный фенотип). Таким образом, одним из критериев классификации мутаций на молекулярном уровне может являться изменение Ca^{2+} -чувствительности тонких нитей саркомера. Причиной увеличения Ca^{2+} -чувствительности тонкой нити может являться либо изменение взаимодействия между миозином и актином, либо нарушение передачи Ca^{2+} -сигнала с тропонин-тропомиозинового комплекса на актин. В обоих случаях миозиновые головки в некоторой степени теряют способность “выключать” актиновые мономеры в условиях деактивации (т.е. переводить мономеры в конформационное состояние, при котором они больше не активируют АТФазу миозина). Очевидно, что нельзя рассматривать изменение Ca^{2+} -чувствительности в качестве единственного критерия для классификации мутаций.

Другими словами, необходимо описать весь патологический механизм действия мутации, что позволит не только классифицировать мутации, но и определить мишени для терапевтического воздействия. В случае, если при изменении Ca^{2+} -чувствительности нарушена функция тропонина, мишенью для восстановления сократимости может служить именно механизм активации тропонина. Так, например, эффективность использования активатора тропонина СК-2066260 в скелетных мышцах была успешно показана в мышечных волокнах модельных мышей с немалиновой миопатией, связанной с мутациями гена небулина [22]. Нецелесообразно будет использовать активатор тропонина, если поломка не затрагивает функцию тропонина активировать актиновые нити, как это происходит при некоторых мутациях гена тропомиозина.

2. МУТАЦИИ В ГЕНАХ ТРОПОМИОЗИНА ПРИ МИОПАТИЯХ

Тропомиозин в комплексе с тропонином играет ключевую роль в регуляции сокращения поперечнополосатых мышц, связанной с тонкими нитями, запуская генерацию силы и, что не менее важно, обеспечивая расслабление мышцы [23]. В основе этой регуляции лежит как стерическое закрытие и открытие сайтов связывания миозина на актине Ca^{2+} -зависимым образом [24], так и аллостерические механизмы – конформационные перестройки актина, тропомиозина и тропонина [25]. Тропонин служит сенсором концентрации Ca^{2+} в саркоплазме, тогда как передачу Ca^{2+} -активирующего сигнала на актиновые нити обеспечивают димеры тропомиозина, которые связываются друг с другом по принципу “голова к хвосту” и обвиваются вокруг Ф-актина с двух сторон в виде длинных тяжей. Динамическое смещение тропомиозина относительно сайтов связывания миозина на актине от внешних к внутренним доменам актиновых мономеров в тонкой нити возможно благодаря электростатической природе взаимодействия и гибкости актина и тропомиозина. Гибкость и персистентная длина актина и тропомиозина изменяются во время генерации силы, вызывая азимутальный сдвиг тяжей тропомиозина [26, 27]. Считается, что тропомиозин может занимать три равновесных позиции на актине – блокирующую, закрытую и открытую [28]. При низких концентрациях Ca^{2+} мономеры актина переходят в выключенное состояние, в котором они не способны активировать АТФазу миозина. Тропомиозин находится у внешних доменов актина в позиции, блокирующей связывание миозина. Блокирующая позиция тропомиози-

на считается энергетически наиболее выгодной, поскольку обусловлена минимальным значением энергии электростатического взаимодействия, что позволяет установлению между тропомиозином и актином наибольшего количества электростатических взаимодействий (около 30, [29]). Повышение концентрации Ca^{2+} в саркоплазме вызывает изменение конформации тропонина и запускает каскад конформационных перестроек, приводящих к уменьшению персистентной длины актина и увеличению персистентной длины тропомиозина, изменению пространственного расположения тропомиозина, “включению” актиновых мономеров (переходу в состояние, при котором актин активирует гидролиз АТФ в миозине) и взаимодействию миозина с актином, сначала слабому, а затем сильному, стереоспецифическому. Тропомиозин смещается при активации нити от внешних доменов актина к внутренним. Включенные мономеры актина стимулируют высвобождение АДФ и неорганического фосфата из активного центра миозина, значительные конформационные перестройки в миозине и генерацию силы. Связывание АТФ с миозином ослабляет взаимодействие миозина с актином, обеспечивая расслабление. Тропомиозин возвращается в блокирующую позицию, ингибирует связывание миозина с актином, и цикл возобновляется.

В разных типах мышц тропомиозин представлен несколькими изоформами. В геноме человека 4 различных гена *TPM1*, *TPM2*, *TPM3* и *TPM4* отвечают за экспрессию тропомиозинов α , β , γ и δ соответственно. Очевидно, что в сердечной мышце доминирует α -изоформа тропомиозина. В медленных скелетных мышцах (типа 1) тропомиозин присутствует в виде $\gamma\beta$ -гетеродимеров и $\gamma\gamma$ -гомодимеров. В быстрых скелетных мышцах (типа 2) экспрессируются α - и β -изоформы, формирующие $\alpha\beta$ -гетеродимеры и $\alpha\alpha$ -гомодимеры. Более высокий уровень экспрессии β -изоформы обнаружен в мышечных волокнах, обладающих высокой окислительной способностью (типа 1 и 2A), по сравнению с гликолитическими мышечными волокнами (типа 2B). Изоформа δ -тропомиозина в мышечной ткани экспрессируется слабо, и, вероятно, не входит в состав тонких нитей саркомера [30].

Структура тропомиозина хорошо изучена. Практически на всем своем протяжении каждая из субъединиц димера этого белка имеет α -спиральную структуру. Две субъединицы тропомиозина закручены в суперспираль благодаря повторяющейся последовательности аминокислотных остатков с неполярными (гидрофобными) и сильно заряженными остатками [31]. Гидрофобные аминокислотные остатки упакованы в гидрофобное ядро. Сильно заряженные поверхностные остатки участвуют в образовании солевых мостиков между двумя субъединицами димера, которые стабилизируют молекулу, а также взаимодействуют с белками-партнерами. Тропомиозин условно разделен на 7 областей псевдо-повторов, которые в свою очередь разделены на α - и β -области [32]. Считается, что 7 α -областей тропомиозина связываются с 7 мономерами актина. Структура тропомиозина, его гибкость и поверхностный заряд могут изменяться при аминокислотных заменах, делециях, дупликациях, обнаруженных при нескольких вариантах миопатии.

Идентифицировано несколько десятков мутаций в генах *TPM2* и *TPM3*, кодирующих скелетный мышечный тропомиозин (табл. 2). Большинство мутаций, обнаруженных при миопатиях, приводит к заменам аминокислотных остатков в α -областях первых пяти псевдо-повторов тропомиозина. Известен целый ряд мутаций в тропомиозине, относимых сразу к нескольким различным мышечным заболеваниям или к не определенному варианту миопатии. Подавляющая часть мутаций тропомиозина все еще недостаточно охарактеризована.

Таблица 2. Разнообразие точечных аминокислотных замен и некоторых других структурных дефектов β- и γ-тропомозинов, связанных с различными вариантами наследственной миопатии

Обозначение псевдоповтора и номера остатка Trp	1α 1–27	1β 28–46	2α 47–66	2β 67–86	3α 87–105	3β 106–125	4α 126–145	4β 146–164	5α 165–184	5β 185–204	6α 205–223	6β 224–243	7α 244–263	7β 264–284
Немалиновая миопатия	β	D2V A3G K7X D14V	E4IK	K49X G52dup		E117K	R133W E139X L143P		E181K		Q210Stop			
	γ	M8R	Q31X		S87F			A155T	R167H R167C					X285S X285N
Кэлл-миопатия	β		E4IK	K49X G52dup				Q147P		N202K				
	γ				S87F			L149I E150A A155V	R167H R167C					
CFTD	β			S61P		E117K	K128E R133W R133P E139X L143P	L148P E150G						
	γ	A3V D20H			R90P L99M L99V			A155V	R167C R167H R167G K168E E173A R178G			E240K	R244G R244I	X285S
Дистальный арт-рогрипоз	β	K7X			R91G E97K D100G Q103R R105P	E117K	R133W E145K		E181K				Y261C	
	γ													
Неуточненный диатноз	β				Q93H Q93R	E122K								
	γ				R90C						E218del	E224del	T252K	

Жирным шрифтом выделены мутации, идентифицированные при двух и более заболеваниях скелетных мышц.

2.1. Влияние мутаций в тропомиозине на белок-белковые взаимодействия

Тропомиозин относится к группе актин-связывающих белков, и основной белок-партнер тропомиозина — актин. Считается, что структура актиновой нити и тяжелой тропомиозина комплементарны [29]. Тропомиозин связывается с актином, а также с тропонином и миозином за счет электростатических взаимодействий. Активирующий Ca^{2+} -сигнал вызывает конформационные перестройки белков саркомера и значительные изменения в электростатических взаимодействиях внутри комплекса актин—тропомиозин—тропонин—миозин [33].

Локальные и глобальные изменения структуры или конформации тропомиозина и его поверхностного заряда вследствие мутаций в той или иной степени могут отразиться на связывании тропомиозина с актином. Замещение гидрофобного остатка (например, Ala155Thr) может повредить гидрофобное ядро, изменить изгиб цепей тропомиозина [34] и его позицию на актине и вызвать нарушение механизмов регуляции тропомиозином актин-миозинового взаимодействия [35]. Мутации, приводящие к замене заряженных аминокислотных остатков на нейтральный или противоположно заряженный остаток (например, Glu41Lys, Arg91Gly, Glu117Lys), могут изменить энергетический ландшафт тропомиозина [33]. При этом может ослабевать или усиливаться электростатическое взаимодействие тропомиозина с актином или тропонином [36] и, возможно, также с миозином. Даже локальные изменения в структуре тропомиозина способны изменить характер белок-белкового взаимодействия в комплексе актин—тропомиозин—тропонин—миозин и нарушить согласованные механизмы функционирования актин-миозинового мотора [37–39]. Помимо нарушения взаимодействия основных сократительных белков, могут происходить нарушения в работе некоторых других белков, которые взаимодействуют с тропомиозином и актином, в частности, тропомодулина, небулина, лейомодина, кофилина [40–43].

Среди мутаций в тропомиозине можно выделить целый ряд мутаций, которые снижают сродство тропомиозина к актину (Lys7del, Met8Arg, Arg90Pro, Arg91Pro, Glu139del, Gln147Pro, Ala155Thr). Поскольку в состав немалиновых телец и кэп-структур входит тропомиозин, то можно предполагать, что именно мутантные белки со сниженным сродством к актину покидают тонкие нити и дают начало образованию аномальных белковых агрегатов. Несомненно, механизмы образования аномальных структур при миопатиях намного более сложные, поскольку состав этих структур не ограничивается мутантным тропомиозином. Несмотря на снижение сродства, показанного при высокоскоростном со-осаждении тропомиозина и актина, вполне вероятно, что мутантные тропомиозины встраиваются в компартмент тонких нитей в мышечных волокнах и могут функционировать там как токсичные белки, приводя к нарушению работы мышц. Полимеризация тропомиозина на актине — процесс высоко кооперативный [44, 45]. На ранних стадиях сборки тонких нитей происходит связывание отдельных молекул тропомиозина с актином, и такая связь достаточно слабая. При созревании нитей и образовании непрерывных тяжей тропомиозина промежутки устраняются, и тропомиозин связывается с актином гораздо сильнее. Показано, что даже несмотря на то, что сродство некоторых мутантных форм тропомиозина к актину резко снижается в растворе, как это происходит в присутствии замены Gln147Pro (в 6–7 раз) и делеции Glu139 (в 5 раз) [37], содержание мутантного тропомиозина, связанного с актином в структурированной системе мышечных волокон отличается от контроля не так существенно — в 1.7 раз для Gln147Pro и только в 1.2 раз для Glu139del-мутантного тропомиозина [46, 47]. По-видимому, во время сборки тонких нитей в мышечном волокне, в от-

личие от раствора белков, мутантный тропомиозин остается связанным с тонкими нитями вследствие многократного оборота непрерывных тяжей вокруг Ф-актина. В случае гетеродимера тропомиозина вторая, неповрежденная субъединица тропомиозина способна компенсировать слабое связывание мутантной формы с актином [48, 49]. Кроме того, миозин и тропонин значительно усиливают сродство тропомиозина к актину.

Ослабление связывания некоторых мутантных тропомиозинов с актином может вызывать изменение позиционирования тропомиозиновых тяжей на актине. Обнаружено, что такие мутантные формы тропомиозина располагаются ближе к внутренним доменам актина (в так называемой открытой позиции), что приводит к преждевременной активации актина и увеличению популяции миозиновых головок в сильной форме связывания с актином [46, 47, 50]. В открытой позиции тропомиозина количество электростатических контактов с актином значительно меньше [29], что создает благоприятные условия для диссоциации от актина молекул тропомиозина с поврежденной структурой, и, следовательно, делает более вероятным образование белковых агрегатов в мышечных волокнах.

Изменения в последовательности тропомиозина могут отражаться на его связывании с тропонином и тем самым ингибировать Ca^{2+} -активацию тонких нитей. Мутации в тропомиозине могут как ингибировать напрямую связывание тропонина с тропомиозином и актином, так и нарушать конформацию областей тропомиозина, примыкающих к тропонин-связывающим сайтам 1 и 2 [51]. Чем ближе расположена мутация в тропомиозине к месту связывания с центральным доменом тропонина, тем существеннее может страдать активация тонких нитей [52].

Следующим важным партнером тропомиозина является тропомодулин — белок, регулирующий длину Ф-актина путем ингибирования удлинения тонких нитей. Мутации в тропомиозине могут влиять на взаимодействие тропомиозина с тропомодулином (например, мутация Arg90Cys, [40]), вызывая изменения в структуре и стабильности актиновых нитей. Известно, что актин входит в состав немалиновых телец и кэп-структур. Нарушение функции тропомодулина, высвобождение мономеров актина и их агрегация могут лежать в основе появления аномальных гистологических включений, обнаруживаемых при миопатиях.

Мутации в тропомиозине способны вызывать нарушение во взаимодействии с гигантским мышечным белком небулином (например, замена Glu41Lys в β -тропомиозине). Небулин играет важную структурную роль, определяя длину тонких нитей, оптимизирует глубину перекрытия тонких и толстых нитей друг относительно друга и модулирует генерацию силы саркомера. Стоит отметить, что генетические дефекты небулина являются частой причиной типичной формы немалиновой миопатии [53]. Нарушение взаимодействия между небулином и мутантным тропомиозином можно также рассматривать как одну из причин возникновения мышечной слабости при наследственных миопатиях. Данных о влиянии мутаций на связывание тропомиозина с лейомодином, кофилином и другими белками в литературе до сих пор не представлено.

2.2. Изменение Ca^{2+} -чувствительности тонких нитей в присутствии мутаций в тропомиозине

Известно, что мутации в тропомиозине, тропонине и других белках саркомера могут приводить к изменению чувствительности сократительной системы к концентрации Ca^{2+} [40]. Большинство известных миопатий на ранних стадиях своего

развития демонстрируют ослабление сократительной способности и уменьшение чувствительности мышечных волокон к Ca^{2+} (гипсосократительный фенотип). Такой фенотип может быть вызван более чем 50-ю мутациями в разных изоформах тропомиозина. Часть мутаций приводит к усилению сократимости мышечной ткани и повышению ее чувствительности к Ca^{2+} (гиперсократительный фенотип). Молекулярные механизмы, лежащие в основе появления гипо- и гиперсократимости мышечной ткани в процессе развития наследственных миопатий практически неизвестны. Была предпринята попытка обобщить результаты изучения влияния разных мутаций в тропомиозине и других белках на чувствительность тропонин-тропомиозинового комплекса к Ca^{2+} [54] и выявить закономерности развития сократительной дисфункции [21]. На основании известных данных предложено рассматривать изменение Ca^{2+} -чувствительности миофиламента как критерий классификации и даже диагностики мутаций. Кроме того, определено максимальное отклонение Ca^{2+} -чувствительности миофиламента в присутствии мутаций в тропомиозине, актине, тропонине, миозине, миозин-связывающем белке С от нормальной величины в пределах $1.5-3.0 \times \text{EC}_{50}$ (где EC_{50} – концентрация Ca^{2+} , обеспечивающая 50% от максимальной активации актином АТФазы миозина). Определенный лимит изменений, вероятно, зависит от возможностей сократительной системы к активации – при выходе за пределы лимита поперечнополосатые мышцы попросту не смогут функционировать [54]. При выявлении значительного влияния мутаций в тропомиозине на Ca^{2+} -чувствительность тропонин-тропомиозиновой системы можно рассматривать возможность использования активаторов или ингибиторов тропонина для восстановления сократительной функции.

Можно выделить и те мутации в тропомиозине, которые незначительно влияют на Ca^{2+} -чувствительность миофиламента и на функцию тропонина (например, мутации Ala155Thr [35, 55], Arg90Pro [56]). Механизм действия таких мутаций, по-видимому, заключается в прямом изменении равновесного состояния сократительной системы в сторону активированного или деактивированного состояния. Мутантный тропомиозин может терять способность активировать (например, замены остатков тропомиозина Arg167 и Lys168 [38]) или ингибировать (замена Arg168Cys) АТФазную активность миозина. В случае появления таких мутантных белков в саркомере с целью реабилитации дисфункции мышцы будет целесообразно применять не эффекторы тропонина, а активаторы или ингибиторы миозина.

3. КОНФОРМАЦИОННЫЕ ПЕРЕСТРОЙКИ БЕЛКОВ МЫШЕЧНОГО ВОЛОКНА, СОДЕРЖАЩЕГО МУТАНТНЫЕ ФОРМЫ ТРОПОМИОЗИНА

Известно, что конформационные перестройки актин-миозинового комплекса играют ключевую роль в мышечном сокращении. С помощью метода поляризационной микрофлуориметрии в мышечном волокне показано, что в цикле гидролиза АТФ прослеживается типичная и повторяющаяся картина конформационных перестроек актина и миозина и изменения локализации тропомиозина. При сильном связывании миозина с актином в молекуле актина происходят характерные изменения конформации, сопровождаемые изменением расположения субдомена I актина и наклоном моторного домена миозина или по крайней мере SH1-спирали. При высокой концентрации Ca^{2+} тропонин-тропомиозиновый комплекс увеличивает количество включенных мономеров актина, таким образом активируя образование сильного связывания головок миозина с актином. В противоположность

этому, при низкой концентрации Ca^{2+} тропонин и тропомиозин ингибируют сильное связывание миозина с актином, выключая мономеры актина. При моделировании ряда последовательных стадий АТФазного цикла оказалось, что изменения в ориентации и подвижности субдомена 1 актина и SH1-спирали миозина коррелируют между собой по характеру и степени выраженности. Согласованность этих изменений, очевидно, определяет эффективность работы актомиозинового мотора. Персистентная длина актина и тропомиозина изменяется во время генерации силы, как правило, противоположным образом [27, 47], что, вероятно, является одной из причин азимутального сдвига тяжей тропомиозина, который происходит при изменении концентрации Ca^{2+} и генерации силы поперечными миозиновыми мостиками. Охарактеризованные конформационные перестройки актина, миозина и тропомиозина в АТФазном цикле свидетельствуют об аллостерической природе регуляторного процесса мышечного сокращения и могут быть использованы в качестве контрольных изменений для выяснения механизмов мышечной дисфункции в присутствии в мышечном волокне тропомиозина с дефектами, обнаруженными при наследственных миопатиях.

Мутантные формы β - и γ -тропомиозина, появляющиеся в мышцах при наследственной миопатии, способны изменять характер актин-миозинового взаимодействия в АТФазном цикле и локализацию тропомиозина на актине и вызывать первичные нарушения сократительной функции. Показано, что мутантные тропомиозины в той или иной мере сохраняют способность встраиваться в мышечное волокно (несмотря на сниженное сродство некоторых тропомиозинов к актину в растворе), ингибировать и активировать АТФазную активность актомиозина и передавать Ca^{2+} -сигнал с комплекса тропонина на актиновые нити. Оказалось, что мутантные формы тропомиозина, вызывающие повышение Ca^{2+} -чувствительности (Arg90Pro, Glu139del, Gln147Pro, Glu150Ala, Glu173Ala, Glu240Lys и Arg244Gly), обладают высокой гибкостью тропомиозинового тяжа. Высокая гибкость, по-видимому, затрудняет блокирование тропомиозином сайтов связывания миозина на актине, поскольку в таких случаях наблюдается “замораживание” тропомиозина ближе к открытой позиции (благоприятной для образования сильного связывания между актином и миозином). Действительно, в присутствии перечисленных замен количество головок миозина, сильно связанных с актином (поперечных миозиновых мостиков в конформациях, соответствующих стадиям АМ и АМ · ADP), существенно увеличивается при моделировании практически всех стадий АТФазного цикла. В присутствии мутантных форм тропомиозина Arg90Pro, Glu139del, Gln147Pro, Glu150Ala и Glu173Ala относительное количество включенных мономеров актина уменьшается при низких концентрациях Ca^{2+} так же, как и для контрольного тропомиозина, т.е. мономеры актина выключаются тропонин-тропомиозиновым комплексом.

Некоторые мутации, которые повышают Ca^{2+} -чувствительность, при высоких концентрациях Ca^{2+} снижают или не изменяют количество головок миозина в сильной форме связывания с актином, а при низких концентрациях Ca^{2+} повышают количество таких головок (Glu139del, Gln147Pro, Ala155Thr, Lys168Glu). Кроме того, в присутствии замен Gln147Pro и Ala155Thr в тропомиозине происходит ингибирование способности тропонина выключать мономеры актина при низких концентрациях Ca^{2+} [35, 50], что также может быть причиной появления высокой Ca^{2+} -чувствительности тонких нитей.

Реже мутантные формы тропомиозина уменьшают Ca^{2+} -чувствительность тонких нитей (замены Glu41Lys, Glu117Lys), или незначительно влияют на нее (замены Arg167His, Arg91Gly). Оказалось, что в присутствии Glu41Lys-мутантной формы β -тропомиозина, ассоциированной с немалиновой миопатией, типичным является увеличение количества сильно связанных с актином головок миозина при низких концентрациях Ca^{2+} без заметного изменения количества таких головок при высоких концентрациях. Мутантный тропомиозин занимает позицию ближе к блокирующей, что приводит к ингибированию включения мономеров актина и образования сильной формы связывания между актином и миозином при высоких концентрациях Ca^{2+} [57]. Замены Glu117Lys в β -тропомиозине и Arg167His в α - и γ -тропомиозинах вызывают похожий эффект [58, 59]. Интересно отметить, что в присутствии замены в соседнем аминокислотном остатке Lys168Glu появляется аномальное количество сильно связанных с актином головок миозина в цикле гидролиза АТФ [60]. Похожие патологические механизмы лежат в основе нарушения сократительной функции в присутствии замены Arg133Trp. Обнаружено, что при высоких концентрациях Ca^{2+} замена Arg133Trp в β -субъединице $\alpha\beta$ -гетеродимера и $\beta\beta$ -гомодимера тропомиозина, идентифицированная при различных вариантах наследственной миопатии – CFTD, немалиновой миопатии и дистальном артрогрипозе – уменьшает относительное количество головок миозина, сильно связанных с Φ -актином, и деактивирует мономеры актина. Эта мутация также препятствует смещению тяжей тропомиозина в открытую позицию в тонких нитях и уменьшает эффективность работы миозиновых поперечных мостиков. При низких концентрациях Ca^{2+} количество головок миозина в сильно связанной с актином конформации также уменьшается по сравнению с контрольным тропомиозином, что может приводить к понижению чувствительности миофиламентов к Ca^{2+} в присутствии замены Arg133Trp.

Учитывая вышеизложенные данные о критических изменениях в структурных перестройках актина, миозина и тропомиозина, можно заключить, что в основе ослабления сократительной способности мышечной ткани, обнаруженной в мышечных волокнах, содержащих мутантные формы тропомиозина, могут лежать различные патологические механизмы. Данные, полученные методом поляризационной микрофлуориметрии, позволяют предположить, что критическое значение для определения характера развития дисфункции мышечной ткани имеет аномальное поведение тропомиозина в цикле гидролиза АТФ: “замораживание” мутантного тропомиозина недалеко от открытой позиции вызывает появление высокой Ca^{2+} -чувствительности тонких нитей, и наоборот, “фиксация” тропомиозина недалеко от выключенной позиции инициирует понижение Ca^{2+} -чувствительности нити. Дальнейший характер развития дисфункции мышечной ткани может зависеть от поведения поперечных миозиновых мостиков в цикле гидролиза АТФ. Например, появление аномально высокого количества поперечных миозиновых мостиков, находящихся в сильной форме связывания с актином, а также появление ригорных мостиков при моделировании расслабленного состояния мышечной ткани, может привести не только к падению сократительной способности мышечной ткани, но и к появлению разрывов миофибрилл и морфологических изменений мышечной ткани. Наоборот, уменьшение количества поперечных миозиновых мостиков будет вызывать ослабление сократительной функции без появления существенных нарушений морфологической картины в мышечной ткани.

Выявленные типичные изменения конформации белков, инициированные точечными мутациями тропомиозина, позволили разделить все исследованные мутации на группы, условно отнесенные к CFTD, немалиновой миопатии, кэп-миопатии и дистальному артрогрипозу [61]. Для CFTD (замены Arg90Pro и Glu173Ala в γ -тропомиозине) и дистального артрогрипоза (замена Arg91Gly в β -тропомиозине) было типичным “замораживание” тропомиозина в открытой позиции и резкое увеличение количества поперечных миозиновых мостиков, сильно связанных с актином и включенных мономеров актина. Немалиновая миопатия (замены Glu41Lys, Glu117Lys, Arg133Trp в β -тропомиозине и Arg167His в γ -тропомиозине) характеризовалась, наоборот, смещением тропомиозина и/или “замораживанием” тропомиозина в блокирующей позиции и резким уменьшением количества включенных мономеров актина и поперечных миозиновых мостиков в сильно-связанной конформации. При этом мутантные формы тропомиозина, ассоциированные с кэп-миопатией (делеция Glu139 и замена Gln147Pro в β -тропомиозине), не вызывали значительного ингибирования образования сильной формы связывания миозина с актином при высоких концентрациях Ca^{2+} . Здесь стоит отметить, что некоторые исследователи считают кэп-миопатию разновидностью немалиновой миопатии (см. обзор [5]) несмотря на то, что кэп-структуры и немалиновые тельца значительно отличаются по составу и локализации в саркомере. Результаты проведенной нами работы указывают на различия в механизмах проявления последствий этих мутаций в мышечной ткани. Действительно, механизмы развития немалиновой и кэп-миопатий близки друг к другу, и, по-видимому, только на молекулярном уровне можно объяснить тонкие различия в этих механизмах. Неудивительно, что в литературе периодически публикуются данные о спорных диагнозах, согласно которым авторы соотносят одну и ту же мутацию с различными вариантами миопатии [19, 62].

Таким образом, относительное количество головок миозина, способных образовывать с актином сильную, существенную для генерации усилия форму связывания можно использовать в качестве одного из важнейших диагностических критериев миопатии на молекулярном уровне. Согласно предложенному нами критерию, замену Glu150Ala в γ -тропомиозине (диагностирована при кэп-миопатии) следует отнести к мутациям, обнаруженным при CFTD, а замену Ala155Thr (диагностирована при немалиновой миопатии) и Lys168Glu (ассоциирована с CFTD) в γ -тропомиозине — к мутациям, обнаруженным при кэп-миопатии [35, 55, 61].

На основании полученных данных можно предложить возможные пути для реабилитации сократительной способности мышечной ткани для некоторых миопатий. Например, если замена Glu41Lys в β -тропомиозине вызывает уменьшение Ca^{2+} -чувствительности, которое, однако, сопровождается увеличением количества включенных мономеров актина при низкой концентрации Ca^{2+} , то использование реагентов, увеличивающих способность тропомина активировать включение мономеров, будет неприемлемым для лечения миопатии, ассоциированной с этой мутацией. Для таких мутаций (Glu41Lys, Glu117Lys, Arg133Trp) представляется целесообразным использовать агенты, активирующие работу миозина. Показано, что замена Arg90Pro в γ -тропомиозине, связанная с CFTD, вызывает увеличение Ca^{2+} -чувствительности тонкой нити, но эта мутация ингибирует способность тропомина включать момеры актина при высоких концентрациях Ca^{2+} . Поэтому использование агентов, которые ингибируют активацию мономеров актина при высоких концентрациях Ca^{2+} , может быть недостаточным для лечения миопатии, связанной с этой

мутацией, и необходимо использовать ингибиторы миозина. Использование ингибиторов тропонина является также неадекватным подходом в лечении тех миопатий, при которых обнаруживается появление высокой Ca^{2+} -чувствительности тонкой нити, если мутация не препятствует способности тропонина выключать мономеры актина при низких концентрациях Ca^{2+} (мутации Glu139del, Lys168Glu).

4. ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ ЛЕКАРСТВЕННЫЕ ПРЕПАРАТЫ

Если для лечения кардиомиопатий предложен целый ряд лекарственных препаратов, которые уже применяются или находятся на разных стадиях клинических испытаний (исследования Cytokinetics, MyoKardia, Novartis), то для наследственных миопатий до сих пор не существует этиотропного лечения. Не существует никаких терапевтических подходов к устранению мышечной слабости и восстановлению сократительной функции скелетных мышц на молекулярном уровне кроме симптоматической терапии, которой явно недостаточно для поддержания нормального качества жизни пациентов. К настоящему времени опубликовано чрезвычайно мало работ, посвященных молекулярным механизмам восстановления сократительной функции сердечной мышцы, и практически отсутствуют исследования, посвященные молекулярным механизмам действия потенциальных лекарственных препаратов при наследственных миопатиях. Для лечения заболеваний скелетных мышц требуется найти и охарактеризовать такие химические соединения, которые обладают потенциалом восстановления работы сократительной системы и не оказывают существенного влияния на сократимость сердечной мышцы. Обзор литературных данных привел нас к обнаружению двух основных групп потенциальных лекарственных препаратов, нацеленных на этиотропное лечение наследственных миопатий (табл. 3). Это так называемая группа активаторов быстрого скелетного тропонина (FSTA – fast skeletal troponin activators) и группа ингибиторов быстрого скелетного миозина. Яркими перспективными примерами группы FSTA являются релдесемтив (СК-2127107) и тирасемтив (СК-2017357), разрабатываемые компанией Cytokinetics Inc. в сотрудничестве с компанией Astellas, которые проходят клинические испытания для лечения бокового амиотрофического склероза и некоторых других заболеваний, связанных с мышечной слабостью и/или усталостью скелетных мышц [63–65]. Связываясь с тропонином, релдесемтив и тирасемтив замедляют скорость освобождения Ca^{2+} , что повышает чувствительность саркомера к Ca^{2+} и способствует активации миозина и увеличению сократительной способности скелетных мышц. Перспективным ингибитором миозина для лечения миопатий, сопровождающихся мышечными контрактурами и ингибированием мышечного расслабления, является BTS, специфичный к миозину быстрых скелетных мышц [66, 67]. Было показано, что BTS снижает скорость АТФазной активности миозина, скорость освобождения фосфата из активного центра и скорость диссоциации от актина головок миозина, связанных с АДФ. Как результат, это соединение может препятствовать развитию контрактур. Предполагается, что BTS не влияет на связывание ионов кальция к тропонину и последующее за ним смещение тропомиозина на актине.

Некоторые соединения не обладают специфичностью связывания к изоформам скелетных мышечных белков, как, например, аналоги блебистатина и ВДМ, ингибитор тропонина W7, активатор тропонина бепридил, а также активаторы миозина EMD 57033 и омекамтив мекарбила [73, 74, 81], которые способны связываться также с сердечным миозином. В виду перспективности их применения они могут быть

Таблица 3. Перспективные потенциальные лекарственные препараты для нормализации сократительной функции при наследственных миопатиях

<p>Группа активаторов быстрого скелетного тропонина (FSTA)</p>	<ul style="list-style-type: none"> • СК-2066260 [68, 69], преclinical исследования Cytokinetics • СК-2127107 (Релдесемтив) [63], клинические исследования Cytokinetics (фаза I, II лечения спинальной мышечной атрофии, бокового амиотрофического склероза и хронического обструктивного заболевания легких) • СК-2017357 (Тирасемтив) [64, 65], клинические исследования Cytokinetics (фаза IIb лечения бокового амиотрофического склероза и перемежающейся хромоты при болезни периферических артерий) • СК-1909178 [70, 71], начальная стадия исследования Cytokinetics
<p>Группа ингибиторов быстрого скелетного миозина</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Аналоги блебистатина [72, 73], начальная стадия исследования • BDM (2,3-Бутандион моноксим) [74], начальная стадия исследования • BTS (N-Бензил-p-толуол сульфонамид) [66, 67], начальная стадия исследования
<p>Реагенты другого типа действия, обладающие потенциальным терапевтическим эффектом</p>	<ul style="list-style-type: none"> • W7 (n-(6-Аминогексил)5-хлор-1-нафталенсульфонамид) [75, 76] – ингибитор сердечного, медленного и быстрого скелетного тропонина, антагонист кальмодулина, начальная стадия исследования • Бепридил [77, 78] – активатор сердечного, медленного и быстрого скелетного тропонина, антагонист кальмодулина, антиангинальный, антиаритмический препарат, применяется для лечения хронической устойчивой стенокардии • EMD 57033 [71, 79, 80], преclinical исследования Merck • СК-1827452 (Омекамтив мекарбил) [81], клинические исследования Cytokinetics (фаза III лечения сердечной недостаточности, обусловленной левожелудочковой дисфункцией)

Информация о химических соединениях получена из базы данных <https://www.drugbank.ca>, сайта Cytokinetics <https://cytokinetics.com/> и научных публикаций.

усовершенствованы для получения аналогов, специфичных к скелетному мышечному миозину. Бепридил и W7 обратимо связываются с тропонином C в различных сайтах, изменяя его конформацию и чувствительность тонких нитей к ионам кальция [75, 77]. Действие активатора миозина EMD 57033 также реализуется посредством связывания с тропонином C, однако при этом он не влияет на связывание Ca²⁺ с тропонином, а действует, как возможно предположить, путем смещения тропомиозина к внутренним доменам актина, активации сильного связывания миозина с актином и укорочения саркомера [79].

Объем знаний о механизмах действия представленных в табл. 3 соединений различный, однако несомненно, что данных о молекулярных механизмах их действия в сократительной системе саркомера скелетных мышц недостаточно. Опубликовано всего несколько работ, в которых проведено тестирование этих соединений для коррекции сократительной функции. Цель подобных исследований состоит в создании

научной основы для разработки дифференциальных терапевтических подходов, направленных на восстановление сократимости.

Так, проведено исследование влияния активатора тропонина СК-1909178 и активатора миозина EMD 57033 на параметры Ca^{2+} -чувствительности и генерации силы в одиночных демембранизированных мышечных волокнах, полученных путем биопсии у пациентов, несущих мутации *TPM2*-null, *TPM3*-Arg167His или *TPM2*-Glu181Lys, связанных с немалиновой миопатией [71]. Было обнаружено, что активаторы СК-1909178 и EMD 57033 увеличивают Ca^{2+} -чувствительность мышечного сокращения при мутациях *TPM2*-null и *TPM3*-Arg167His. Также в одной работе доктора Д. Ochala было выполнено изучение влияния активатора миозина EMD 57033 на параметры Ca^{2+} -чувствительности и генерации силы при мутации *TPM2*-Glu41Lys [82], также связанной с немалиновой миопатией.

Показана потенциальная эффективность активатора тропонина СК-2066260 для лечения немалиновой миопатии, связанной с мутациями гена небулина [68]. Было обнаружено, что СК-2066260 значительно повышает Ca^{2+} -чувствительность генерации силы, но не влияет на кооперативность активации тонких нитей. Используя в качестве модели немалиновой миопатии мышей с нокаутом гена небулина, приводящим к выраженной скелетной мышечной слабости, было обнаружено, что СК-2066260 сдвигает кривую зависимости мышечной силы от pCa влево, с наибольшим увеличением силы при низких и средних концентрациях Ca^{2+} , увеличивает силу сокращения при pCa 6.0 и значительно увеличивает константу скорости развития силы при быстром укорочении мышцы [22].

Немногочисленность научных групп, изучающих молекулярные механизмы восстановления сократительной функции скелетных мышц, объясняется прежде всего тем, что большинство исследований посвящены изучению действия потенциальных лекарственных препаратов на функцию сердечной мышцы [83–85]. Ряд исследований инициируется Центром преคลินิกеских исследований компании Cytokinetics. В перспективе научных исследований необходимо выявить и охарактеризовать неизвестные до настоящего времени конформационные изменения сократительных и регуляторных белков, происходящие при использовании агентов, обладающих потенциальной способностью восстановления сократимости мышечной ткани, ассоциированной с наследственными заболеваниями скелетных мышц человека. В частности, важно получить информацию о конформационных изменениях тропомиозина, актина и миозина, происходящих в присутствии химических соединений (ингибиторов или активаторов работы тропонина и миозина), способных нормализовать Ca^{2+} -чувствительность и АТФазную активность миозина.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Поскольку наследственная миопатия проявляется, как правило, с самого рождения или в раннем детском возрасте, то своевременно начатое этиотропное лечение заболевания критически важно для предотвращения или замедления прогрессирования мышечной слабости и гипотонии, проявления компенсаторных процессов, в том числе в виде появления внутриклеточных включений, и дальнейших последствий нарушения сократительной функции, таких как дыхательная и сердечная недостаточность. Существует острая необходимость в изучении молекулярных механизмов дисфункции сократимости мышечной ткани, содержащей мутантные белки, и в подборе и тестировании химических агентов для реабилитации наследственных заболеваний скелетных мышц. Особенности функционирования сократительной

системы в присутствии различных мутаций в тропомиозине можно использовать на пути к поиску адекватной классификации мутаций, способствующей ранней и точной диагностике варианта миопатии, и поиску мишеней для нормализации сократительной функции. Имеющиеся данные позволяют предполагать, что, используя в качестве мишени актин-миозиновое взаимодействие и систему тропонин-тропомиозиновой регуляции, можно с помощью активаторов и ингибиторов функции тропонина и миозина скорректировать аномальную работу сократительной системы при скелетно-мышечных патологиях. Содержание современной научной литературы в области миологии отражает стремление научного сообщества восполнить недостаток данных о молекулярных механизмах заболеваний скелетных мышц и их терапии. Дальнейшие исследования молекулярных механизмов мышечной дисфункции позволят получить приоритетные данные о возможностях реабилитации на молекулярном уровне сократительной функции скелетных мышц, нарушенной при наследственных миопатиях, отобрать и протестировать наиболее эффективные фармакологические агенты, способные отменить или частично скомпенсировать негативные последствия мутаций в генах тропомиозина и других белков, ответственных за развитие немалиновой миопатии, кэп-миопатии, CFTD, дистального артрогрипоза и других заболеваний скелетной мускулатуры человека.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 20-04-00523).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Автор данной статьи сообщает об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Matyushenko AM, Levitsky DI* (2020) Molecular Mechanisms of Pathologies of Skeletal and Cardiac Muscles Caused by Point Mutations in the Tropomyosin Genes. *Biochemistry (Mosc)* 85(Suppl 1): S20S33.
<https://doi.org/10.1134/S0006297920140023>
2. *Moraczewska J* (2020) Thin filament dysfunctions caused by mutations in tropomyosin Tpm3.12 and Tpm1.1. *J Muscle Res Cell Motil* 41(1): 3953.
<https://doi.org/10.1007/s10974-019-09532-y>
3. *Jungbluth H, Treves S, Zorzato F, Sarkozy A, Ochala J, Sewry C, Phadke R, Gautel M, Muntoni F* (2018) Congenital myopathies: disorders of excitation-contraction coupling and muscle contraction. *Nat Rev Neurol* 14: 151–167.
<https://doi.org/10.1038/nrneurol.2017.191>
4. *Ravenscroft G, Bryson-Richardson RJ, Nowak KJ, Laing NG* (2018) Recent advances in understanding congenital myopathies. *F1000Res* 7: F1000 Faculty Rev-1921.
<https://doi.org/10.12688/f1000research.16422.1>
5. *Gonorazky HD, Bonnemann CG, Dowling JJ* (2018) The genetics of congenital myopathies. *Handb Clin Neurol* 148: 549–564.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64076-5.00036-3>
6. *Nance JR, Dowling JJ, Gibbs EM, Bonnemann CG* (2012) Congenital myopathies: An update. *Curr Neurol Neurosci Rep* 12: 165–174.
<https://doi.org/10.1007/s11910-012-0255-x>
7. *Amburgey K, McNamara N, Bennett LR, McCormick ME, Acsadi G, Dowling JJ* (2011) Prevalence of congenital myopathies in a Representative pediatric united states population. *Ann Neurol* 2011 70(4): 662–665.
<https://doi.org/10.1002/ana.22510>

8. Johnston JJ, Kelley RI, Crawford TO, Morton DH, Agarwala R, Koch T, Schäffer AA, Francomano CA, Biesecker LG (2000) A novel nemaline myopathy in the Amish caused by a mutation in troponin T1. *Am J Hum Genet* 67(4): 814–821.
<https://doi.org/10.1086/303089>
9. Lehtokari VL, Kiiski K, Sandaradura SA, Laporte J, Repo P, Frey JA, Donner K, Marttila M, Saunders C, Barth PG, den Dunnen JT, Beggs AH, Clarke NF, North KN, Laing NG, Romero NB, Winder TL, Pelin K, Wallgren-Petersson C (2014) Mutation update: the spectra of nemalin variants and associated myopathies. *Hum Mutat* 35(12): 1418–1426.
<https://doi.org/10.1002/humu.22693>
10. Shy GM, Magee KR (1956) A new congenital non-progressive myopathy. *Brain* 79(4): 610–21.
<https://doi.org/10.1093/brain/79.4.610>
11. Adams RD, Denny-Brown D, Pearson CM (1962) Diseases of muscle. A study in pathology, 2nd ed. New York: Harper and Brothers, 268–270.
12. Schnell C, Kan A, North KN (2000) “An artefact gone awry”: identification of the first case of nemaline myopathy by Dr RDK Reye. *Neuromuscul Disord* 10(4–5): 307–312.
[https://doi.org/10.1016/s0960-8966\(99\)00123-6](https://doi.org/10.1016/s0960-8966(99)00123-6)
13. Benarroch L, Bonne G, Rivier F, Hamroun D (2021) The 2021 version of the gene table of neuromuscular disorders (nuclear genome). *Neuromuscul Disord* 30(12): 1008–1048.
<https://doi.org/10.1016/j.nmd.2020.11.009>
14. Davidson AE, Siddiqui FM, Lopez MA, Lunt P, Carlson HA, Moore BE, Love S, Born DE, Roper H, Majumdar A, Jayadev S, Underhill HR, Smith CO, von der Hagen M, Hubner A, Jardine P, Morrison A, Curtis E, Cullup T, Jungbluth H, Cox MO, Winder TL, Abdel Salam H, Li JZ, Moore SA, Dowling JJ (2013) Novel deletion of lysine 7 expands the clinical, histopathological and genetic spectrum of TPM2-related myopathies. *Brain* 136: 508–521.
<https://doi.org/10.1093/brain/aws344>
15. Tajsharghi H, Ohlsson M, Palm L, Oldfors A (2012) Myopathies associated with β -tropomyosin mutations. *Neuromuscul Disord* 22: 923–933.
<https://doi.org/10.1016/j.nmd.2012.05.018>
16. Clarke NF, Kolski H, Dye DE, Lim E, Smith RL, Patel R, Fahey MC, Bellance R, Romero NB, Johnson ES, Labarre-Vila A, Monnier N, Laing NG, North KN (2008) Mutations in TPM3 are a common cause of congenital fiber type disproportion. *Ann Neurol* 63: 329–337.
<https://doi.org/10.1002/ana.21308>
17. Sewry CA, Laitila JM, Wallgren-Petersson C (2019) Nemaline myopathies: a current view. *J Muscle Res Cell Motil* 40(2): 111–126.
<https://doi.org/10.1007/s10974-019-09519-9>
18. Lehtokari VL, Ceuterick-de Groote C, de Jonghe P, Marttila M, Laing NG, Pelin K, Wallgren-Petersson C (2007) Cap disease caused by heterozygous deletion of the beta-tropomyosin gene TPM2. *Neuromuscul Disord* 17: 433–442.
<https://doi.org/10.1016/j.nmd.2007.02.015>
19. Brandis A, Aronica E, Goebel HH (2008) TPM2 mutation. *Neuromuscular disorders: NMD*. *England* 18: 1005.
20. Malfatti E, Schaeffer U, Chapon F, Yang Y, Eymard B, Xu R, Laporte J, Romero NB (2013) Combined cap disease and nemaline myopathy in the same patient caused by an autosomal dominant mutation in the TPM3 gene. *Neuromuscul Disord* 23(12): 992–997.
<https://doi.org/10.1016/j.nmd.2013.07.003>
21. Marston S, Memo M, Messer A, Papadaki M, Nowak K, McNamara E, Ong R, El-Mezgueldi M, Li X, Lehman W (2013) Mutations in Repeating structural motifs of TM cause gain of function in skeletal muscle myopathy patients. *Hum Mol Genet* 22: 4978–4987.
<https://doi.org/10.1093/hmg/ddt345>
22. Lee E-J, De Winter JM, Buck D, Jasper JR, Malik FI, Labeit S, Ottenheijm CA, Granzier H (2013) Fast skeletal muscle troponin activation increases force of mouse fast skeletal muscle and ameliorates weakness due to nemalin-deficiency. *PLoS One* 8(2): e55861.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0055861>
23. Boussof SE, Geeves MA (2007) Tropomyosin and troponin cooperativity on the thin filament. *Adv Exp Med Biol* 592: 99–109.
https://doi.org/10.1007/978-4-431-38453-3_10
24. Geeves MA, Lehrer SS, Lehman W (2019) The mechanism of thin filament regulation: Models in conflict? *J Gen Physiol* 151(11): 1265–1271.
<https://doi.org/10.1085/jgp.201912446>
25. Borovikov YS, Karpicheva OE, Avrova SV, Redwood CS (2009) Modulation of the effects of tropomyosin on actin and myosin conformational changes by troponin and Ca^{2+} . *Biochim Biophys Acta* 1794(7): 985–994.
<https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2008.11.014>

26. *Li XE, Lehman W, Fischer S* (2010) The relationship between curvature, flexibility and persistence length in the tropomyosin coiled-coil. *J Struct Biol* 170: 313–318.
<https://doi.org/10.1016/j.jsb.2010.01.016>
27. *Borovikov YS, Simonyan AO, Avrova SV, Sirenko VV, Redwood CS, Karpicheva OE* (2020) Molecular Mechanisms of Muscle Weakness Associated with E173A Mutation in Tpm3.12. Tropomyosin Ca²⁺ Sensitivity Inhibitor W7 Can Reduce the Damaging Effect of This Mutation. *Int J Mol Sci* 21(12): 4421.
<https://doi.org/10.3390/ijms21124421>
28. *Craig R, Lehman W* (2001) Crossbridge and tropomyosin positions observed in native, interacting thick and thin filaments. *J Mol Biol* 311(5): 1027–1036.
<https://doi.org/10.1006/jmbs.2001.4897>
29. *Lehman W, Orzechowski M, Li XE, Fischer S, Raunser S* (2013) Gestalt-Binding of tropomyosin on actin during thin filament activation. *J Muscle Res Cell Motil* 34: 155–163.
<https://doi.org/10.1007/s10974-013-9342-0>
30. *Gunning P* (Ed) (2008) Tropomyosin. *Advances in Experimental Medicine and Biology*.
<https://doi.org/10.1007/978-0-387-85766-4>
31. *Mason JM, Arndt KM* (2004) Coiled coil domains: stability, specificity, and biological implications. *ChemBiochem* 5(2): 170–176.
<https://doi.org/10.1002/cbic.200300781>
32. *McLachlan AD, Stewart M* (1976) The 14-fold periodicity in alpha-tropomyosin and the interaction with actin. *J Mol Biol* 103(2): 271–298.
[https://doi.org/10.1016/0022-2836\(76\)90313-2](https://doi.org/10.1016/0022-2836(76)90313-2)
33. *Orzechowski M, Li XE, Fischer S, Lehman W* (2014) An atomic model of the tropomyosin cable on F-actin. *Biophys J* 107(3): 694–699.
<https://doi.org/10.1016/j.bpj.2014.06.034>
34. *Brown JH, Zhou Z, Reshetnikova L, Robinson H, Yammani RD, Tobacman LS, Cohen C* (2005) Structure of the mid-region of tropomyosin: bending and binding sites for actin. *Proc Natl Acad Sci USA* 102 18878–18883.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0509269102>
35. *Avrova SV, Karpicheva OE, Simonyan AO, Sirenko VV, Redwood CS, Borovikov YS* (2019) The molecular mechanisms of a high Ca²⁺-sensitivity and muscle weakness associated with the Ala155Thr substitution in Tpm3.12. *Biochem Biophys Res Commun* 515(2): 372–377.
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.05.146>
36. *Hitchcock-DeGregori SE, Barua B* (2017) Tropomyosin Structure, Function, and Interactions: A Dynamic Regulator Subcell Biochem 82: 253–284.
https://doi.org/10.1007/978-3-319-49674-0_9
37. *Marttila M, Lemola E, Wallefeld W, Memo M, Donner K, Laing NG, Marston S, Grönholm M, Wallgren-Petersson C* (2012) Abnormal actin binding of aberrant β -tropomyosins is a molecular cause of muscle weakness in *TPM2*-related nemaline and cap myopathy. *Biochem J* 442(1): 231–239.
<https://doi.org/10.1042/BJ20111030>
38. *Robaszkiewicz K, Dudek E, Kasprzak AA, Moraczewska J* (2012) Functional effects of congenital myopathy-related mutations in gamma-tropomyosin gene. *Biochim Biophys Acta* 1822(10): 1562–1569.
<https://doi.org/10.1016/j.bbdis.2012.06.009>
39. *Zheng W, Hitchcock-DeGregori SE, Barua B* (2016) Investigating the effects of tropomyosin mutations on its flexibility and interactions with filamentous actin using molecular dynamics simulation. *J Muscle Res Cell Motil* 37(4–5): 131–147.
<https://doi.org/10.1007/s10974-016-9447-3>
40. *Moraczewska J, Robaszkiewicz K, Śliwiska M, Czajkowska M, Ly T, Kostyukova A, Wen H, Zheng W* (2019) Congenital myopathy-related mutations in tropomyosin disrupt regulatory function through altered actin affinity and tropomodulin binding. *FEBS J* 286: 1877–1893.
<https://doi.org/10.1111/febs.14787>
41. *Marttila M, Hanif M, Lemola E, Nowak KJ, Laitila J, Grönholm M, Wallgren-Petersson C, Pelin K* (2014) Nebulin interactions with actin and tropomyosin are altered by disease-causing mutations. *Skelet Muscle* 4: 1–5.
<https://doi.org/10.1186/2044-5040-4-15>
42. *Ly T, Moroz N, Pappas CT, Novak SM, Tolkatchev D, Wooldridge D, Mayfield RM, Helms G, Gregorio CC, Kostyukova AS* (2016) The N-terminal tropomyosin- and actin-binding sites are important for leiomodulin 2's function. *Mol Biol Cell* 27: 2565–2575.
<https://doi.org/10.1091/mbc.E16-03-0200>
43. *Robaszkiewicz K, Ostrowska Z, Marchlewicz K, Moraczewska J* (2016) Tropomyosin isoforms differentially modulate the regulation of actin filament polymerization and depolymerization by

- cofilins. FEBS J 283: 723–737.
<https://doi.org/10.1111/febs.13626>
44. Fischer S, Rynkiewicz MJ, Moore JR, Lehman W (2016) Tropomyosin diffusion over actin subunits facilitates thin filament assembly. *Struct Dyn* 3(1): 012002.
<https://doi.org/10.1063/1.4940223>
45. Vilfan A (2001) The binding dynamics of tropomyosin on actin. *Biophys J* 81: 3146–3155.
[https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(01\)75951-6](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(01)75951-6)
46. Karpicheva OE, Simonyan AO, Kuleva NV, Redwood CS, Borovikov YS (2016) Myopathy-causing Q147P *TPM2* mutation shifts tropomyosin strands further towards the open position and increases the proportion of strong-binding cross-bridges during the ATPase cycle. *Biochim Biophys Acta* 1864(3): 260–267.
<https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2015.12.004>
47. Borovikov YS, Rysev N.A, Karpicheva OE, Sirenko VV, Avrova SV, Piers A, Redwood CS (2017) Molecular mechanisms of dysfunction of muscle fibres associated with Glu139 deletion in *TPM2* gene. *Sci Rep.* 7(1): 16797.
<https://doi.org/10.1038/s41598-017-17076-9>
48. Janco M, Kalyva A, Scellini B, Piroddi N, Tesi C, Poggessi C, Geeves MA (2012) alpha-Tropomyosin with a D175N or E180G mutation in only one chain differs from tropomyosin with mutations in both chains. *Biochemistry* 51(49): 9880–9890.
<https://doi.org/10.1021/bi301323n>
49. Matyushenko AM, Shchepkin DV, Susorov DS, Nefedova VV, Kopylova GV, Berg VY, Klyemenov SY, Levitsky DI (2019) Structural and functional properties of $\alpha\beta$ -heterodimers of tropomyosin with myopathic mutations Q147P and K49del in the β -chain. *Biochem Biophys Res Commun* 508(3): 934–939.
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.12.019>
50. Karpicheva OE, Simonyan AO, Rysev NA, Redwood CS, Borovikov YS (2020) Looking for Targets to Restore the Contractile Function in Congenital Myopathy Caused by Gln147Pro Tropomyosin. *Int J Mol Sci* 21(20): 7590.
<https://doi.org/10.3390/ijms21207590>
51. Jin JP, Chong SM (2010) Localization of the two tropomyosin-binding sites of troponin T. *Arch Biochem Biophys* 500: 144–150.
<https://doi.org/10.1016/j.abb.2010.06.001>
52. Robaszkiewicz K, Ostrowska Z, Cyranka-Czaja A, Moraczewska J (2015) Impaired tropomyosin-troponin interactions reduce activation of the actin thin filament. *Biochim Biophys Acta* 1854: 381–390.
<https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2015.01.004>
53. Lindqvist J, Ma W, Li F, Hernandez Y, Kolb J, Kiss B, Tonino P, van der Pijl R, Karimi E, Gong H, Strom J, Hourani Z, Smith JE 3rd, Ottenheijm C, Irving T, Granzier H (2020) Triggering typical nemaline myopathy with compound heterozygous nebulin mutations reveals myofibrillar structural changes as pathomechanism. *Nat Commun* 11(1): 2699.
<https://doi.org/10.1038/s41467-020-16526-9>
54. Marston SB (2016) Why Is there a Limit to the Changes in Myofibrillar Ca^{2+} -Sensitivity Associated with Myopathy Causing Mutations? *Front Physiol* 7: 415.
<https://doi.org/10.3389/fphys.2016.00415>
55. Karpicheva OE, Sirenko VV, Rysev NA, Simonyan AO, Borys D, Moraczewska J, Borovikov YS (2017) Deviations in conformational rearrangements of thin filaments and myosin caused by the Ala155Thr substitution in hydrophobic core of tropomyosin. *Biochim Biophys Acta – Proteins Proteomics* 1865: 1790–1799.
<https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2017.09.008>
56. Borovikov YS, Simonyan AO, Karpicheva OE, Avrova SV, Rysev NA, Sirenko VV, Piers A, Redwood CS (2017) The reason for a high Ca^{2+} -sensitivity associated with Arg91Gly substitution in *TPM2* gene is the abnormal behavior and high flexibility of tropomyosin during the ATPase cycle. *Biochem Biophys Res Commun* 494(3–4): 681–686.
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.10.161>
57. Avrova SV, Karpicheva OE, Rysev NA, Simonyan AO, Sirenko VV, Redwood CS, Borovikov YS (2018) The reason for the low Ca^{2+} -sensitivity of thin filaments associated with the Glu41Lys mutation in the *TPM2* gene is “freezing” of tropomyosin near the outer domain of actin and inhibition of actin monomer switching off during the ATPase cycle. *Biochem Biophys Res Commun* 502(2): 209–214.
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.05.145>
58. Karpicheva OE, Robinson P, Piers A, Borovikov YS, Redwood CS (2013) The nemaline myopathy-causing E117K mutation in β -tropomyosin reduces thin filament activation. *Arch Biochem*

- Biophys 536(1): 25–30.
<https://doi.org/10.1016/j.abb.2013.05.001>
59. Borovikov YS, Rysev NA, Avrova SV, Karpicheva OE, Borys D, Moraczewska J (2017) Molecular mechanisms of deregulation of the thin filament associated with the R167H and K168E substitutions in tropomyosin Tpm1.1. Arch Biochem Biophys 614: 28–40.
<https://doi.org/10.1016/j.abb.2016.12.004>
60. Borovikov YS, Rysev NA, Chernev AA, Avrova SV, Karpicheva OE, Borys D, Śliwińska M, Moraczewska J (2016) Abnormal movement of tropomyosin and response of myosin heads and actin during the ATPase cycle caused by the Arg167His, Arg167Gly and Lys168Glu mutations in *TPM1* gene. Arch Biochem Biophys 606: 157–166.
<https://doi.org/10.1016/j.abb.2016.07.022>
61. Borovikov YS, Karpicheva OE, Simonyan AO, Avrova SV, Rogozovets EA, Sirenko VV, Redwood CS (2018) The Primary Causes of Muscle Dysfunction Associated with the Point Mutations in Tpm3.12; Conformational Analysis of Mutant Proteins as a Tool for Classification of Myopathies. Int J Mol Sci 19(12): 3975.
<https://doi.org/10.3390/ijms19123975>
62. Donner K, Ollikainen M, Ridanpää M, Christen HJ, Goebel HH, de Visser M, Pelin K, Wallgren-Pettersson C (2002) Mutations in the beta-tropomyosin (*TPM2*) gene—a rare cause of nemaline myopathy. Neuromuscul Disord 12(2): 151–158.
[https://doi.org/10.1016/s0960-8966\(01\)00252-8](https://doi.org/10.1016/s0960-8966(01)00252-8)
63. Andrews JA, Miller TM, Vijayakumar V, Stoltz R, James JK, Meng L, Wolff AA, Malik FI (2018) CK-2127107 amplifies skeletal muscle response to nerve activation in humans. Muscle Nerve 57(5): 729–734.
<https://doi.org/10.1002/mus.26017>
64. Collibee SE, Bergnes G, Muci A, Browne WF 4th, Garard M, Hinken AC, Russell AJ, Suehiro I, Hartman J, Kawas R, Lu PP, Lee KH, Marquez D, Tomlinson M, Xu D, Kennedy A, Hwee D, Schaletzky J, Leung K, Malik FI, Morgans DJ Jr, Morgan BP (2018) Discovery of Tirasemtiv, the First Direct Fast Skeletal Muscle Troponin Activator. ACS Med Chem Lett 9(4): 354–358.
<https://doi.org/10.1021/acsmchemlett.7b00546>
65. Shefner JM, Cudkowicz ME, Hardiman O, Cockcroft BM, Lee JH, Malik FI, Meng L, Rudnicki SA, Wolff AA, Andrews JA; VITALITY-ALS Study Group (2019) A phase III trial of tirasemtiv as a potential treatment for amyotrophic lateral sclerosis. Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener 0(0): 1–11.
<https://doi.org/10.1080/21678421.2019.1612922>
66. Pinniger GJ, Bruton JD, Westerblad H, Ranatunga KW (2005) Effects of a myosin-II inhibitor (N-benzyl-p-toluene sulphonamide, BTS) on contractile characteristics of intact fast-twitch mammalian muscle fibres. J Muscle Res Cell Motil 26(2–3): 135–141.
<https://doi.org/10.1007/s10974-005-2679-2>
67. Shaw MA, Ostap EM, Goldman YE (2003) Mechanism of inhibition of skeletal muscle actomyosin by N-benzyl-p-toluenesulfonamide. Biochemistry 42(20): 6128–6135.
<https://doi.org/10.1021/bi026964f>
68. de Winter JM, Buck D, Hidalgo C, Jasper JR, Malik FI, Clarke NF, Stienen GJ, Lawlor MW, Beggs AH, Ottenheijm CA, Granzier H (2013) Troponin activator augments muscle force in nemaline myopathy patients with nebulin mutations. J Med Genet 2013; 50(6): 383–92.
<https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2012-101470>
69. Cheng AJ, Hwee DT, Kim LH, Durham N, Yang HT, Hinken AC, Kennedy AR, Terjung RL, Jasper JR, Malik FI, Westerblad H (2019) Fast skeletal muscle troponin activator CK-2066260 increases fatigue resistance by reducing the energetic cost of muscle contraction. J Physiol 597(17): 4615–4625.
<https://doi.org/10.1113/JP278235>
70. Ochala J (2010) Ca²⁺ sensitizers: An emerging class of agents for counterbalancing weakness in skeletal muscle diseases? Neuromuscul Disord 20(2): 98–101.
<https://doi.org/10.1016/j.nmd.2009.11.010>
71. Ochala J, Gokhin DS, Pénişon-Besnier I, Quijano-Roy S, Monnier N, Lunardi J, Romero NB, Fowler VM (2012) Congenital myopathy-causing tropomyosin mutations induce thin filament dysfunction via distinct physiological mechanisms. Hum Mol Genet 21(20): 4473–4485.
<https://doi.org/10.1093/hmg/dds289>
72. Limouze J, Straight AF, Mitchison T, Sellers JR (2004) Specificity of blebbistatin, an inhibitor of myosin II. J Muscle Res Cell Motil 25(4–5): 337–341.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M405319200>
73. Rauscher AA, Gyimesi M, Kovacs M, Malnasi-Csizmadia A (2018) Targeting Myosin by Blebbistatin Derivatives: Optimization and Pharmacological Potential. Trends Biochem Sci 43(9): 700–713.
<https://doi.org/10.1016/j.tibs.2018.06.006>

74. *McKillop DF, Fortune NS, Ranatunga KW, Geeves MA* (1994) The influence of 2,3-butanedione 2-monoxime (BDM) on the interaction between actin and myosin in solution and in skinned muscle fibres. *J Muscle Res Cell Motil* 15(3): 309–318.
<https://doi.org/10.1007/BF00123483>
75. *Oleszczuk M, Robertson IM, Li MX, Sykes BD* (2010) Solution structure of the regulatory domain of human cardiac troponin C in complex with the switch region of cardiac troponin I and W7: the basis of W7 as an inhibitor of cardiac muscle contraction. *J Mol Cell Cardiol* 48(5): 925–933.
<https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2010.01.016>
76. *Adhikari BB, Wang K* (2004) Interplay of troponin- and Myosin-based pathways of calcium activation in skeletal and cardiac muscle: the use of W7 as an inhibitor of thin filament activation. *Biophys J* 86(1): 359–370.
[https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(04\)74112-0](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(04)74112-0)
77. *Kischel P, Bastide B, Potter JD, Mounier Y* (2000) The role of the Ca²⁺ regulatory sites of skeletal troponin C in modulating muscle fibre reactivity to the Ca²⁺ sensitizer bepridil. *Br J Pharmacol* 131(7): 1496–1502.
<https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0703727>
78. *Wahr PA, Metzger JM* (1999) Role of Ca²⁺ and cross-bridges in skeletal muscle thin filament activation probed with Ca²⁺ sensitizers. *Biophys J* 76(4): 2166–2176.
[https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(99\)77371-6](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(99)77371-6)
79. *Lipscomb S, Preston LC, Robinson P, Redwood CS, Mulligan IP, Ashley CC* (2005) Effects of troponin C isoform on the action of the cardiotoxic agent EMD 57033. *Biochem J* 388 (Pt 3): 905–912.
<https://doi.org/10.1042/BJ20041841>
80. *Kraft T, Brenner B* (1997) Force enhancement without changes in cross-bridge turnover kinetics: the effect of EMD 57033. *Biophys J* 72(1): 272–281.
[https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(97\)78666-1](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(97)78666-1)
81. *Malik FI, Hartman JJ, Elias KA, Morgan BP, Rodriguez H, Brejc K, Anderson RL, Sueoka SH, Lee KH, Finer JT, Sakowicz R, Baliga R, Cox DR, Garard M, Godinez G, Kawas R, Kraynack E, Lenzi D, Lu PP, Muci A, Niu C, Qian X, Pierce DW, Pokrovskii M, Suehiro I, Sylvester S, Tochimoto T, Valdez C, Wang W, Katori T, Kass DA, Shen YT, Vatner SF, Morgans DJ* (2011) Cardiac myosin activation: a potential therapeutic approach for systolic heart failure. *Science* 331(6023): 1439–1443.
<https://doi.org/10.1126/science.1200113>
82. *Ochala J, Li M, Ohlsson M, Oldfors A, Larsson L* (2008) Defective regulation of contractile function in muscle fibres carrying an E41K beta-tropomyosin mutation. *J Physiol* 586 (Pt 12): 2993–3004.
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.2008.153650>
83. *Solaro RJ, Gambassi G, Warshaw DM, Keller MR, Spurgeon HA, Beier N, Lakatta EG* (1993) Stereoselective actions of thiazolidinones on canine cardiac myocytes and myofilaments. *Circ Res* 73(6): 981–990.
<https://doi.org/10.1161/01.res.73.6.981>
84. *Kopylova GV, Shchepkin DV, Nabiev SR, Matyushenko AM, Koubassova NA, Levitsky DI, Bershtitsky SY* (2019) Cardiomyopathy-associated mutations in tropomyosin differently affect actin-myosin interaction at single-molecule and ensemble levels. *J Muscle Res Cell Motil* 40(3–4): 299–308.
<https://doi.org/10.1007/s10974-019-09560-8>
85. *Shchepkin DV, Nabiev SR, Nikitina LV, Kochurova AM, Berg VY, Bershtitsky SY, Kopylova GV* (2020) Myosin from the ventricle is more sensitive to omecamtiv mecarbil than myosin from the atrium. *Biochem Biophys Res Commun* 528(4): 658–663.
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.05.108>

Hallmark Features of the Tropomyosin Regulatory Function in Several Variants of Congenital Myopathy

O. E. Karpicheva*

Institute of Cytology of the Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia

**e-mail: olexiya6@ya.ru*

Congenital myopathies are a group of clinically and genetically heterogeneous diseases, which are united by primary lesions of skeletal muscles and are characterized by progres-

sive muscle weakness and hypotension, as well as morphological changes in muscle tissue. The range of variants of congenital myopathies is quite wide, and the signs are heterogeneous, therefore, the diagnosis is often difficult. Until now, there is no effective therapy for myopathies - only symptomatic treatment is used to improve metabolism and blood microcirculation in the muscles. At the same time, many of these diseases significantly reduce the quality and duration of human life. The accumulation of scientific knowledge necessary for the early diagnosis of congenital myopathies of human and for the development of approaches to effective treatment of diseases of muscle tissue dysfunction is one of the urgent tasks of biology and medicine. Most recently, a series of works has appeared in which an attempt is made to characterize the molecular mechanisms of the onset and development of a number of myopathies caused by gene mutations. It seems extremely important to analyze the published data and, on the basis of this, highlight critical changes in the conformational state of muscle proteins that can be used as tests for the differential diagnosis of myopathies and to identify molecular targets for the therapeutic effects. This review article is devoted to the analysis and generalization of literature and original data obtained by the method of polarized microfluorimetry on the molecular mechanisms of muscle contraction regulation by mutant tropomyosins appearing in muscle tissue in various human musculoskeletal diseases.

Keywords: congenital myopathy, tropomyosin genes mutations, molecular mechanisms of muscle contraction regulation, actin-myosin interaction, polarized fluorescence technique, targets for therapy, ethiotropic treatment

ОБЗОРНЫЕ
И ПРОБЛЕМНЫЕ СТАТЬИ

АУТОФАГИЯ КАК ЗВЕНО ПАТОГЕНЕЗА И МИШЕНЬ ДЛЯ ТЕРАПИИ
ЗАБОЛЕВАНИЙ СКЕЛЕТНО-МЫШЕЧНОЙ СИСТЕМЫ

© 2021 г. К. К. Калугина^{1, 2, *}, К. С. Сухарева¹, А. И. Чуркина¹, А. А. Костарева¹

¹Национальный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова,
Санкт-Петербург, Россия

²Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

*E-mail: bagr97@mail.ru

Поступила в редакцию 01.02.2021 г.

После доработки 18.03.2021 г.

Принята к публикации 30.03.2021 г.

Аутофагия – консервативный процесс деградации внутриклеточных структур лизосомальными ферментами в специализированных компартментах – аутофаголизосомах играет роль во многих процессах, таких как дифференцировка, поддержание энергетического баланса и защита клеток при наличии деструктивных изменений. Аутофагия имеет особенное значение для функционирования скелетной и сердечной мускулатуры, а именно, для поддержания структурной и физиологической целостности саркомера при мышечном сокращении, а также при патологических изменениях в мышечном волокне. Активация процесса аутофагии происходит в ответ на разнообразные стрессовые стимулы, например, повреждение мышцы при интенсивной нагрузке, результатом чего является репарация ткани, в том числе за счет активации сателлитных клеток. В этом обзоре аутофагия рассматривается как защитный процесс, у которого выделяют несколько типов, различающихся по своим механизмам. В обзоре будут освещены молекулярные основы процесса аутофагии, ее роль в жизнедеятельности и функционировании клеток, а также терапевтический потенциал активаторов аутофагии в лечении тяжелых заболеваний человека, связанных с нарушениями скелетной и сердечной мускулатуры. Особое внимание будет уделено описанию фармакологических препаратов, способных усиливать активность аутофагии, а также механизмам их действия.

Ключевые слова: аутофагия, белковые агрегаты, миокард, скелетная мускулатура, терапевтическое влияние аутофагии

DOI: 10.31857/S0869813921060042

В настоящее время аутофагия активно изучается в контексте многих внутриклеточных событий в норме и при патологии [1]. Этот процесс обеспечивает деградацию цитоплазматических компонентов в специализированных клеточных компартментах – аутофаголизосомах. В зависимости от типа аутофагии, неправильно свернутые белки или поврежденные органеллы оказываются внутри аутофагосо-

Список сокращений: АК – аминокислоты, АФК – активные формы кислорода, МДД – миодистрофия Дюшенна, АМПК – 5'-активированная аденозинмонофосфат-протеинкиназа, Atg – гены, связанные с аутофагией, CASA – шаперон-зависимая селективная аутофагия (chaperon-assisted selective autophagy), CMA – шаперон-опосредованная аутофагия, HSP – белки теплового шока, mTOR – мишень рапамицина млекопитающих, ULK1 – инициирующая аутофагию киназа 1, LC3 – легкая цепь 3 ассоциированного с микротрубочками белка 1.

мы, которая формируется либо случайным образом, либо направленно образуется вокруг мишени. Аутофагия необходима для поддержания внутриклеточного гомеостаза и структурного гомеостаза в условиях стресса [2]. Это особенно актуально для скелетной и сердечной мускулатуры, постоянно испытывающей механическую нагрузку различной силы [3].

В клетке существует несколько независимых путей деградации цитоплазматических компонентов, основными являются убиквитин-протеасомная деградация и аутофагия. Недавние исследования продемонстрировали, что протеасомная деградация активируется преимущественно на ранних этапах индуцируемого стресса, а аутофагия более активна при длительном воздействии стрессовых факторов [4].

Базальный уровень аутофагии может различаться в разных типах мышц. Так, было показано, что экспрессия маркерных белков аутофагии, таких как LC3, Beclin-1 и ATG7, была выше в окислительных мышечных волокнах, чем в гликолитических или смешанных [5]. Таким образом, мышцы, испытывающие постоянное тоническое напряжение, характеризуются более высоким уровнем аутофагии, что объясняется необходимостью удаления долгоживущих белков и поврежденных органелл [6]. В процессе мышечного сокращения происходят нарушения конформационной структуры белков, находящихся под постоянным механическим воздействием, в частности, белков Z-диска и белков саркомера. Поврежденные белки приобретают неправильную, агрегированную конформацию и тем самым дестабилизируют структурную и физиологическую целостность миофибрилл и нарушают процесс мышечного сокращения [7]. Кроме того, нарушение процесса аутофагии может приводить к серьезным патологическим изменениям или усиливать другие патологические процессы. Так, при саркопении вследствие старения мышечных волокон наблюдается снижение активности аутофагии. С возрастом в мышцах происходит накопление дисфункциональных митохондрий и увеличение содержания активных форм кислорода (АФК), что приводит к повреждению сократительных белков и апоптозу. Поэтому снижение активности аутофагии, в частности митофагии, является одним из факторов возрастной атрофии мышц [8, 9]. Участие аутофагии в регенерации поврежденных мышц также было отмечено многими исследованиями [10].

В основе многих заболеваний сердца и скелетных мышц лежит нарушение пространственной структуры белков. Такие патологические состояния характеризуются скоплением белковых агрегатов, негативно влияющих на структуру, морфологию и физиологию мышечных клеток [11]. В мышечных тканях существует несколько причин нарушения процесса фолдинга белков, главными из которых являются мутации в генах белков, входящих в состав обнаруженных агрегатов (десмин, филламин), а также дисфункция белков-шаперонов и ко-шаперонов, принимающих непосредственное участие в правильной пространственной укладке белковых молекул (HSPA8, HSPB8, BAG3) [12]. Индукторы аутофагии могут потенциально использоваться при терапии тяжелых миофибрилярных миопатий для удаления поврежденных белков сократительного аппарата, агрегированная структура которых негативно влияет на функционирование мышечного волокна. Помимо этого, при многих миопатиях обнаруживается накопление дисфункциональных митохондрий, служащих источником цитохрома C, индуцирующего процесс апоптоза. Таким образом, избыток поврежденных митохондрий может служить причиной разрушения мышечных волокон и следующей за этим мышечной атрофии [13]. Именно поэтому на сегодняшний день поиск и изучение фармакологических агентов, увеличивающих активность аутофагии, имеет особую значимость для достижения позитивной динамики в лечении многих заболеваний скелетной и сердечной мускулатуры [14].

Целью данного обзора является описание процесса аутофагии и ее роли в физиологии и морфологии мышц, а также обобщение современных сведений о модуляции аутофагии как терапевтической мишени в лечении миопатий.

ОСНОВНЫЕ ВИДЫ АУТОФАГИИ В МЫШЕЧНЫХ КЛЕТКАХ

Аутофагия – это система лизосомальной деградации цитоплазматических компонентов, которая служит для поддержания энергетического и физиологического гомеостаза. Аутофагия вовлечена в различные клеточные процессы, например, утилизацию дефектных белков и поврежденных органелл, поддержку гомеостаза и протеостаза клетки при стрессовом голодании, а также в элиминацию патогенов [15]. Механизмы аутофагии консервативны для всех клеток, в том числе, и мышечных.

В зависимости от способа поступления элиминируемого материала в лизосому, аутофагия подразделяется на три вида – макроаутофагия, микроаутофагия и аутофагия, опосредованная шаперонами.

Макроаутофагия характеризуется образованием аутофагосомы – двумембранной везикулы, доставляющей цитоплазматический материал в лизосому, где он деградирует под действием лизосомальных кислых гидролаз. Как правило, под термином “аутофагия” подразумевается именно макроаутофагия. Отмечено, что именно макроаутофагия значительно активируется в ответ на физическую нагрузку в скелетных мышцах [16]. Микроаутофагия отличается тем, что деградируемый материал поглощается лизосомой в результате инвагинации ее мембраны без образования изолированной мембранной структуры – посредника [17]. Роль этого типа аутофагии в мышечных клетках недостаточно изучена [18]. Шаперон-опосредованная аутофагия (chaperon-mediated autophagy – CMA), как и микроаутофагия, происходит без предварительного образования аутофагосомы, но ключевую роль в ее реализации играют белки-шапероны, связывающие цитоплазматический материал и направляющие его в лизосому. Белковый субстрат для CMA должен содержать в своей аминокислотной последовательности KFERQ-подобный пентапептид, который будет распознаваться шапероном – белком теплового шока 70 кДа (hsp70). Этот шаперон-белковый комплекс распознается и связывается с ассоциированным с лизосомами мембранным белком типа 2A (LAMP-2A). После связывания субстратные белки подвергаются конформационным изменениям, опосредованным другими вспомогательными белками, такими как hip, hor и HSP40. Через транслокационный комплекс, образованный LAMP-2A, с помощью Hsc70 и Hsc90 белок переносится в лизосому, где деградирует [19]. Некоторые исследования подтверждают увеличение уровня белка LAMP-2A при однократных физических упражнениях [20].

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ МАКРОАУТОФАГИИ

Наиболее распространенным типом аутофагии является макроаутофагия, при которой происходит образование двумембранных везикул – аутофагосом, которые поглощают поврежденные и нефункциональные органеллы или неправильно свернутые белки. После этого аутофагосомы сливаются с лизосомами для последующей деградации содержимого посредством лизосомальных ферментов. В зависимости от субстрата, макроаутофагия может быть классифицирована на митофагию, липофагию, пексофагию, рибофагию и другие [21].

Аутофагия является эволюционно консервативным процессом [22]. Большинство генов, ответственных за аутофагию, были описаны в клетках дрожжей и названы *Atg* генами (autophagy-related genes). Белковые продукты этих генов участвуют в образовании аутофагосом. У млекопитающих есть гомологичные *Atg* гены. В процессе аутофагии выделяют пять этапов: 1) зарождение фагофора; 2) конъюгация ATG5–ATG12 и

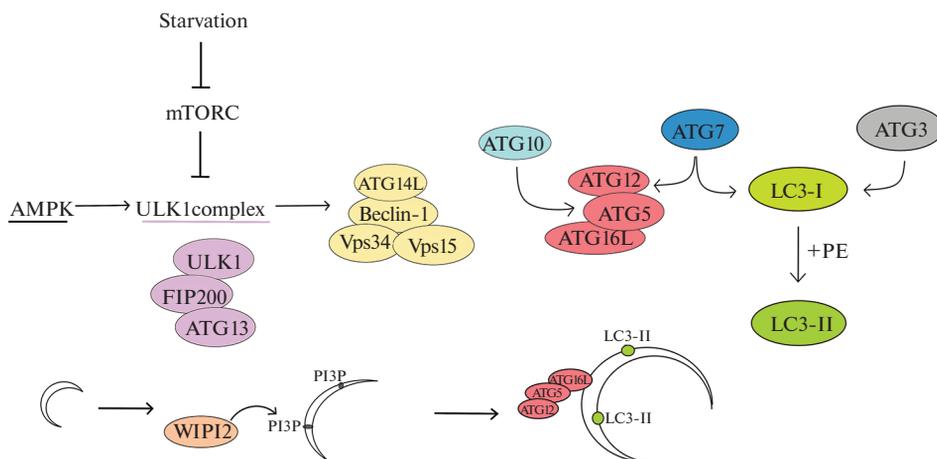


Рис. 1. Процесс формирования аутофагосомы. AMPK – 5'АМФ-активируемая протеинкиназа, mTORC1 – мишень рапамицина млекопитающих; ULK1 – инициирующая аутофагию киназа 1, FIP200 – фокальная адгезионная киназа 200 кДа, ATG – белковый продукт гена, связанного с аутофагией, Beclin-1 – беклин-1, vps 15\34 – вакуолярный белок – сортировщик 15\34, PI3P – фосфатидилинозитол-3-фосфат, WIPI2 – белок 2, взаимодействующий с WD-повторным доменом PI, LC3 – легкая цепь 3 ассоциированного с микротрубочками белка-1, PE – фосфатидилэтаноламин.

их взаимодействие с ATG16L и удлинение фагофора; 3) процессинг белка LC3 и вставка в расширяющуюся мембрану фагофора; 4) случайный или селективный захват мишеней аутофагии; 5) слияние аутофагосомы с лизосомой и деградация захваченных компонентов в образовавшейся аутофаголизосоме [23].

Источником мембраны для фагофора может служить эндоплазматический ретикулум, аппарат Гольджи, митохондрии или плазматическая мембрана. Так, было показано, что во внешней и внутренней мембранах фагосомы присутствуют белки шероховатого эндоплазматического ретикулума [24]. Формирование фагофора в клетках млекопитающих инициируется ULK1-комплексом, состоящим из инициирующей аутофагию киназы ULK1/2, FIP200 и ATG13 (рис. 1). Он активируется 5'-активированной аденозинмонофосфатпротеинкиназой – AMPK. Этот комплекс может образовываться независимо от условий и функционировать в богатой питательными веществами среде. У млекопитающих существует мишень рапамицина mTORC1, которая ингибирует процесс зарождения фагофора. mTORC1 фосфорилирует ULK1/2, нарушая взаимодействие последнего с AMPK. При недостатке белковых субстратов, в частности при голодании, mTORC1 ингибируется, что приводит к его диссоциации от комплекса ULK1 с последующим дефосфорилированием и активацией ULK1 [25].

ULK1 фосфорилирует и таким образом активирует белок Beclin-1 (гомологичный ATG6 дрожжей), который в свою очередь взаимодействует с ATG14L и фосфатидилинозитол-3-фосфат-киназами Vps34 и Vps15. Этот комплекс белков индуцирует образование фосфатидилинозитол-3-фосфата (PI3P) в мембране зарождающегося фагофора [26], который в свою очередь способствует привлечению дополнительных специфичных для аутофагии эффекторов PI3P, таких как белок 2, взаимодействующий с WD-повторным доменом PI (WIPI2). Впоследствии WIPI2 рекрутирует комплекс конъюгации ATG12–ATG16L [27].

Удлинение фагофора осуществляется двумя убиквитин-подобными системами. Первый комплекс ATG12–ATG5–ATG16L1 ассоциируется с мембраной будущей

фагосомы. ATG12 активируется ATG7 – E1-подобным убиквитин-активирующим ферментом с гидролизом АТФ. На следующем этапе ATG12 конъюгирует с ATG5 посредством его активации ATG10 (E2 фермент). С ATG12–ATG5 взаимодействует ATG16L1. Образовавшийся комплекс ATG12–ATG5–ATG16L1 участвует в удлинении фагофора, а после завершения его формирования компоненты комплекса отделяются и возвращаются в цитоплазму [28].

Второй убиквитин-подобный комплекс образуется путем модификации белка LC3 [29]. Цитоплазматический LC3-I связывается с фосфатидилэтаноламином (PE) с помощью ATG7 и ATG3 с последующим отщеплением аминокислотного остатка и переходом в липидизированную форму LC3-II. Липидизированный LC3-II избирательно включается в формирующуюся аутофагосомальную мембрану и остается связанным с аутофагосомой до ее слияния с лизосомой, когда LC3-II, связанный с внешней мембраной, диссоциирует и рециркулирует, а LC3-II, связанный с внутренней мембраной, разлагается лизосомальными протеиназами вместе с аутофагосомным грузом. Именно поэтому изоформа LC3-II является маркером активации процесса аутофагии. Таким образом, детекция процесса аутофагии и его интенсивности может осуществляться посредством биохимической оценки перехода LC3-I в LC3-II форму, или микроскопически, путем наблюдения паттерна локализации флуоресцентно-меченного LC3-II [30].

Процесс образования аутофаголизосом скоординирован способностью аутофагосомы взаимодействовать с цитоскелетом клетки, в частности, с микротрубочками. Показано, что мембранная форма LC3-II способна связываться с моторным белком динеином [31]. Кроме того, LC3-II может напрямую связываться с микротрубочками через его N-концевой домен. Сборка аутофагосом происходит преимущественно на периферии клетки, и для образования аутофаголизосом они движутся вдоль микротрубочек к центру организации микротрубочек – ЦОМТ, вблизи которого локализованы лизосомы [32]. В дополнении к этому, в процессе аутофагии может участвовать и актиновый цитоскелет. Участие актина было отмечено в формировании аутофагосом в процессе митофагии [33], а также в слиянии лизосом во время деградации белковых агрегатов [34] или бактерий [35].

ШАПЕРОН-АССИСТИРОВАННАЯ СЕЛЕКТИВНАЯ АУТОФАГИЯ (CASA) В МЫШЕЧНЫХ КЛЕТКАХ

Первоначально аутофагия считалась неселективным путем деградации цитоплазматических компонентов в лизосомах. В дальнейшем был описан селективный вариант этого процесса. При достаточном уровне питательных веществ в клетках базальный уровень аутофагии служит системой контроля, обеспечивающей удаление дефектных белковых агрегатов и поврежденных органелл. Избирательность аутофагии обусловлена скоординированной работой белков шаперонов и ко-шаперонов, способных направлять убиквитинированные белки в аутофагосомы [36]. Шаперон-зависимая селективная аутофагия (chaperon-assisted selective autophagy – CASA) особенно важна для работы скелетных миоцитов и кардиомиоцитов с низким уровнем тканевого обновления и испытывающих постоянное механическое напряжение. В отличие от СМА, при которой цитоплазматический материал попадает в лизосому при помощи шаперонов и без образования везикулярного посредника, в CASA работа шаперонов направлена на селективное направление груза в формирующуюся аутофагосому. Нарушение данного процесса ассоциировано с развитием скелетных миопатий и кардиомиопатий. В комплекс белков, участвующих в CASA, входят шапероны HSPA8 и HSPB8, ко-шапероны BAG3 (ассоциированный с Bcl2 атаноген 3) и STUB1. HSPA8 и HSPB8 входят в семейство малых белков теплового шока (sHSP) массой 15–30 кДа и характеризуются

одним консервативным доменом из приблизительно 80 остатков, известным как домен α -кристаллина. Они экспрессируются с начала эмбрионального периода и в течение всей жизни, имея несколько разные механизмы и область действия. Недавно было показано, что они являются составной частью защитных механизмов при многих патологических состояниях. Часть шаперонов sHSP встречается повсеместно в разных тканях, однако существуют и тканеспецифичные представители этих белков. Например, *HSPB7* на высоком уровне экспрессируется в мышечных клетках, особенно в миокарде. Заболевания, ассоциированные с мутациями в генах *sHSP*, входят в группу патологий, связанных с образованием токсичных белковых агрегатов, могут поражать мышечную ткань [37]. Мутации, выявленные в гене *HSPB7*, напрямую связаны с развитием кардиомиопатий [38]. Повышение экспрессии *HSPB7* является ранним биомаркером инфаркта миокарда и текущего острого коронарного синдрома. Исследования на модели *Danio rerio* показали, что снижение экспрессии *HSPB7* нарушает формирование левой и правой осей сердца и влияет на его морфогенез [39], а генетические варианты в генах белков-шаперонов миокарда (частые однонуклеотидные полиморфизмы) ассоциированы с развитием хронической сердечной недостаточности и неблагоприятным ремоделированием сердца [40, 41].

CASA играет важную роль в поддержке структуры Z-диска в мышечных клетках [42]. Такой тип аутофагии опосредует деградацию актин-связывающего белка филamina, если в процессе сокращения мышечной клетки происходит дефект его вторичной и третичной структуры. Однако были проведены исследования, демонстрирующие, что нарушение фолдинга филamina, его накопление в виде агрегатов и накопление самих аутофагосом наблюдалось преимущественно в окислительных мышцах. Это может свидетельствовать о том, что эффективный контроль структуры белков необходим для тонических мышц [43]. Белок филамин является структурным компонентом Z-дисков и его участие показано при многих процессах в миокарде и скелетных мышцах. Постоянно возрастает количество заболеваний и патологий, ассоциированных с мутациями в гене филamina [44]. При нарушении фолдинга филamina он распознается комплексом шаперонов CASA HSPA8 и HSPB8, который связан с белком BAG3. BAG3 взаимодействует с HSPA8-ассоциированной убиквитинлигазой STUB1/CHIP и ее партнером UBE2D (убиквитин-конъюгирующий фермент E2D) в убиквитинировании связанного с шапероном FLNC [45]. Это дает сигнал для рекрутирования белка p62 (SQSTM1). При CASA BAG3 параллельно контактирует с комплексом белков VPS и SNARE, участвующих в слиянии мембран при образовании аутофаголизосомы [46].

p62 – адаптерный белок, который, обладая убиквитин-связывающим доменом (UBA), способен связываться с полиубиквитинированными белками. Доставляя такие белковые агрегаты в аутофагосомы, он связывается с мембранным липидизированным белком LC3-II, что в конечном итоге приводит к деградации этих компонентов в аутофаголизосоме [47]. Показано, что уровень p62 путем обратной связи коррелирует с активностью аутофагии. При мутациях в генах *Atg* или при нарушении процесса связывания аутофагосомы и лизосомы, происходит накопление p62-позитивных агрегатов [48]. Таким образом, процесс CASA представляет собой последовательные этапы связывания полиубиквитинированных белковых агрегатов с комплексом шаперонов, направляющих их в формирующуюся аутофагосому.

РОЛЬ АУТОФАГИИ В РЕГУЛЯЦИИ ЖИЗНЕДЕЯТЕЛЬНОСТИ КЛЕТКИ В НОРМЕ И ПРИ ПАТОЛОГИЧЕСКИХ СОСТОЯНИЯХ

Аутофагия представляет собой уникальный адаптивный катаболический механизм, который активируется при голодании, истощении факторов роста, гипо-

ксии, экспансии чужеродных агентов. В процессе деградации белков посредством аутофагии генерируются свободные аминокислоты (АК) и жирные кислоты, которые участвуют в синтезе белка *de novo* или могут быть включены в цикл трикарбоновых кислот для продуцирования АТФ. Так, показано, что добавление метилпирувата (мембранопроницаемое производное пирувата) при дефиците факторов роста в клетках с нарушенным процессом аутофагии способствует поддержанию выработки АТФ и выживанию клеток [49].

Аутофагия может являться участником иммунного ответа. У позвоночных в противовирусной защите участвуют интерфероны, однако до развития системы интерферонов у эукариотических организмов был ограниченный набор защитных механизмов [50]. В связи с этим ранние эукариотические предки могли использовать аутофагию для борьбы с внутриклеточными патогенами. Аутофагия и белки АТГ играют важную роль в деградации попавших в клетку бактериальных и паразитических патогенов, что подтверждено у *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster* и *Mus musculus*. Этот механизм играет основную роль в противовирусной защите в системах, в которых отсутствуют другие иммунные механизмы [51]. Элиминация бактериальных и вирусных патогенов осуществляется как путем непосредственного ферментативного расщепления в лизосомах, так и путем выработки провоспалительных цитокинов IL-1 β , IL-18, INF- α в результате взаимодействия цитоплазматических рецепторов PRR (pattern recognition receptors) с молекулярными паттернами патогенов – PAMPs (pathogen-associated molecular patterns). Кроме того, аутофагия обеспечивает презентацию антигена в комплексе с молекулами МНС II класса, посредством транспорта процессированных патогенов на клеточную мембрану, индуцируя адаптивный иммунный ответ [52]. В ходе эволюции некоторые инфекционные агенты приобрели способность регулировать процесс аутофагии с целью обеспечения внутриклеточного выживания. Такие патогенные бактерии как *M. tuberculosis*, шигеллы, иерсинии, сальмонеллы и др. ингибируют формирование аутофагосомы, а также ее слияние с лизосомой, что является значимым механизмом избегания ксенофагии [53]. Также показано, что РНК-содержащие вирусы способны использовать аутофагию для образования репликационных мембранных органелл, которые, подобно аутофагосомам, происходят из эндоплазматического ретикулума [54]. Таким образом, аутофагия является древней и эволюционно консервативной формой защиты от внутриклеточных патогенов [54–56].

РОЛЬ АУТОФАГИИ В ФУНКЦИОНИРОВАНИИ СКЕЛЕТНОЙ МУСКУЛАТУРЫ И МИОКАРДА

Все больше данных свидетельствуют о том, что аутофагия необходима для поддержания мышечной массы, нормального функционирования мышечных клеток и целостности миофибрилл. Скелетные мышцы в течение всей жизни подвергаются нагрузкам различной степени силы и активности, находясь в постоянном состоянии ремоделирования. Такая мышечная пластичность позволяет мускулатуре адаптировать свои структурные и функциональные свойства под изменяющиеся условия среды, нередко приводя к видимым фенотипическим модификациям при определенной механической нагрузке [57].

Известно, что сокращение мышц при физической активности вызывает увеличение производства АФК [58]. Во время физических упражнений число свободных радикалов в митохондриях неуклонно растет и служит причиной нарушения окислительно-восстановительного гомеостаза, окисление мтДНК и белков комплекса дыхательной цепи, ведет к накоплению дефектных митохондрий [59, 60]. В процессе удаления поврежденных белков и дисфункциональных органелл из мышечной клетки задействован процесс аутофагии, особенно избирательной митофагии.

Поврежденные митохондрии накапливают на внешней мембране белок PINK1 (PTEN-индуцированная киназа), что приводит к рекрутированию и фосфорилированию белка паркина – убиквитинлигазы E3. В результате димеризации и активации, паркин убиквитинирует белки внешней мембраны, благодаря чему происходит привлечение адаптерных белков LC3 к митохондриям и их деградация посредством митофагии [61].

В том случае, когда процесс аутофагии не может поддерживаться на необходимом уровне, в клетке начинают происходить патологические изменения. Так, тканеспецифичная делеция генов аутофагии, таких как *Atg7* и *Atg5*, приводит к скелетно-мышечной атрофии [62, 63].

Многочисленные исследования выявили особую значимость аутофагии в правильном физиологическом и структурном гомеостазе миокарда, поскольку основной объем его клеточной массы представлен непролиферирующими клетками – кардиомиоцитами. По аналогии со скелетно-мышечным поражением, накопление белковых агрегатов и дисфункциональных органелл наблюдается при многих сердечно-сосудистых заболеваниях, включая ишемическое повреждение при инфаркте и генетически-обусловленные кардиомиопатии [64]. Поэтому стимуляция аутофагии в терапевтических целях может стать перспективным направлением в устранении патологических изменений в сердце [65].

Так, с использованием модельного объекта *Drosophila melanogaster* были проведены эксперименты, направленные на оверэкспрессию транскрипционных факторов FoxO [66]. Семейство транскрипционных факторов forkhead box O отвечает за усиление экспрессии генов аутофагии и вследствие этого повышает общий уровень процессов аутофагии в клетках. Оверэкспрессия дикого типа FOXO сохраняла стойкий базальный уровень аутофагии на протяжении всей жизни *Drosophila melanogaster*, стимулируя экспрессию генов белков, участвующих в образовании аутофагосом, и снижение концентрации которых отмечается в процессе старения. В результате поддержания базального уровня аутофагии обеспечивалась защита скелетной мускулатуры мух от возрастной дисфункции и увеличивалась продолжительность их жизни [67]. Нарушение процесса аутофагии в стареющих скелетных мышцах наблюдается и у человека, являясь одной из причин развития саркопении [66]. Особенными биохимическими и физиологическими характеристиками отличается процесс старения миокарда. Так, с возрастом в миокарде наблюдается увеличение уровней апоптоза и некроза, рост объема миоцитов и накопление соединительной ткани [68]. Во время инфаркта в кардиомиоцитах отмечается сниженный уровень синтеза белков теплового шока, что в совокупности с возрастными изменениями в сердце способствует накоплению белковых агрегатов. Кроме того, в кардиомиоцитах отмечено накопление липофусцина, который негативно влияет на структуру миокарда [69]. Липидные гранулы и токсичные белковые агрегаты элиминируются благодаря аутофагии, тем самым снижается уровень воспаления и апоптоза при возрастных изменениях в сердце. Поскольку накопление липофусцина может препятствовать течению аутофагии, усиливающие ее химические агенты будут перспективны в борьбе с возрастными патологическими изменениями в сердце [70].

В отличие от миокарда, скелетные мышцы обладают развитой регенеративной способностью благодаря резидентным столовым клеткам, мышечным сателлитным клеткам. Поэтому в сочетании с работой макрофагов, удаляющих фрагменты поврежденных клеток, возможно полное восстановление морфологии мышц после травм. Аутофагия в данном случае необходима для успешной дифференцировки миоцитов и имеет протективное влияние в отношении развития процесса апоптоза [71]. Относительно разреженная цитоплазма и митохондрии сателлитных клеток не могут обеспечить клетку достаточным количеством энергии при выходе из состояния по-

коя [72]. Благодаря аутофагии, клетки способны получить дополнительный источник энергии для активации, выхода из состояния покоя и пролиферации.

Ингибирование процесса аутофагии при травмах приводило к накоплению фрагментов поврежденного саркомера, что препятствовало правильному восстановлению саркомера во время регенерации [73]. Так, было показано, что при обработке кардиотоксином в волокнах со сниженной активностью аутофагии восстановление целостности сарколеммы не происходило. Исследования проводились на гипоморфной мышшиной модели *Atg16L1*, характеризующейся сниженной экспрессией гена *Atg16L*, белковый продукт которого ответственен за формирование аутофагосом. В данной модели наблюдалось снижение уровня аутофагического потока, и в совокупности с обработкой кардиотоксином, в мышечных волокнах отмечались мембранные повреждения, что послужило причиной активной инфильтрации циркулирующими иммуноглобулинами, а также резкому повышению уровня внутриклеточного кальция. Таким образом, была выдвинута идея об участии аутофагии в поддержании целостности сарколеммы в ответ на повреждающие стимулы [74].

Кроме того, стареющие мышечные сателлитные клетки демонстрируют снижение уровня активности аутофагии и при повреждении подвержены апоптозу в большей степени, чем молодые клетки-сателлиты [75].

ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ МОДУЛЯЦИИ АУТОФАГИИ ПРИ ЗАБОЛЕВАНИЯХ СКЕЛЕТНО-МЫШЕЧНОЙ СИСТЕМЫ И МИОКАРДА

Как неоднократно указывалось, различные патологические изменения в мышечных клетках нередко сопровождаются полным или частичным нарушением процесса аутофагии [76]. Поэтому использование веществ, направленных на реактивацию аутофагии или повышение ее базального уровня, может служить перспективным терапевтическим подходом к лечению патологий скелетной и сердечной мускулатуры разного генеза.

Так, одной из главных групп лекарственных препаратов, применяемых при мышечных патологиях, является группа ингибиторов mTORC1. Они блокируют ингибирующее воздействие mTORC1 на комплекс ULK1, тем самым иницируя процесс аутофагии. Однако mTORC1 регулирует ряд клеточных процессов, связанных с метаболизмом и ростом клетки, таких как гликолиз и биосинтез белка. Несмотря на то, что использование ингибиторов mTORC1 может замедлить анаболические процессы в мышечном волокне, стимуляция аутофагии для удаления дефектных и поврежденных элементов стратегически более оправдано [77].

Наиболее известными блокаторами mTORC1 являются рапамицин и его аналоги. При миофибрилярных кардиомиопатиях, в том числе вызванных белковыми агрегатами десмина, было отмечено положительное влияние pp242 – селективного АТФ-конкурентного ингибитора mTORC1 [78]. В эксперименте было показано, что рапамицин может использоваться в лечении миодистрофии Дюшенна (МДД). Показано, что МДД сопровождается нарушением уровня аутофагии в поврежденных мышцах, что вносит существенный вклад в течение этого заболевания [79]. Рапамицин не предназначен для длительного лечения МДД у человека, так как блокирует рост и регенерацию мышц и обладает собственной токсичностью [80, 81]. В качестве аналога может рассматриваться использование акадезина (5-аминоимидазол-4-карбоксамид-1- β -D-рибофуранозид), который стимулирует AMPK, повышая уровень аутофагии, что способствует значительному улучшению мышечной структуры [82]. При МДД-ассоциированной кардиомиопатии также может использоваться ресвератрол – активатор экспрессии *SIRT1*. Сиртуин1, обладающий деацетилазной активностью, стимулирует аутофагию, предотвращая ацетилирова-

ние белков, участвующих в процессе аутофагии, таких как ATG5, ATG7 и LC3. Кроме того, сиртуин активирует транскрипционные факторы семейства FOXO млекопитающих, которые индуцируют экспрессию генов, связанных с аутофагией. Благодаря этим механизмам, в кардиомиоцитах происходит снижение уровня АФК путем эффективного удаления поврежденных митохондрий [83].

При диабетической кардиомиопатии также отмечен положительный эффект индукторов аутофагии. Метаболические нарушения при сахарном диабете и метаболическом синдроме, такие как гипергликемия и дислипидемия, могут быть токсичны для миокарда, приводя к апоптозу кардиомиоцитов. Увеличение апоптотической гибели клеток миокарда может в конечном итоге привести к нарушению структуры и функции сердца из-за ограниченной регенераторной способности кардиомиоцитов. Поэтому ингибирование апоптоза является важной стратегией лечения и профилактики диабетической кардиомиопатии. Одновременно с этим при сахарном диабете в кардиомиоцитах наблюдается нарушение процесса аутофагии. Использование полифенолов, таких как куркумин, благотворно влияет на состояние сердца при диабете. Куркумин восстанавливает уровень аутофагии и подавляет апоптоз, нарушая взаимодействие между Beclin1, Bcl-2 и Vim, что способствует улучшению функционирования миокарда [84]. Добавление куркумина ингибировало взаимодействие между beclin1 и Bcl-2 или Vim, тем самым высвобождая beclin1 для стимуляции аутофагии. Кроме того, связывание Vim с Bcl-2 также было нарушено под действием куркумина. Таким образом, нарушение взаимодействия между Beclin1, Bcl-2 и Vim может лежать в основе протективного действия куркумина, способствующего аутофагии и подавлению апоптоза в клетках сердца при сахарном диабете.

Важную роль аутофагия играет при наследственных заболеваниях, связанных с дефицитом коллагена VI (ColVI). Этот белок является одним из основных компонентов внеклеточного матрикса мышц. Он обеспечивает структурную и механическую стабильность мышечной ткани, а также обладает широким спектром цитопротективных свойств, таких как защита от апоптоза и окислительного повреждения, регуляция процесса аутофагии и дифференцировки клеток [85]. Критическая роль ColVI в скелетных мышцах определяется тем, что мутации в генах, ответственных за кодирование ColVI, вызывают заболевания, влияющие на сократительную функцию мышц, включая врожденную мышечную дистрофию Ульриха и миопатию Бетлема. Данные патологии сопровождаются нарушением аутофагии, приводят к накоплению дефектных митохондрий и деградациии миофибрилл. Индукция аутофагии с помощью фармакологических агентов при данных патологиях приводит к удалению поврежденных органелл и восстановлению функций мышечных волокон [86]. Так, показано, что лечение спермидином, естественным нетоксичным индуктором аутофагии, приводило к улучшению физиологического состояния пораженных мышц. Благоприятные эффекты спермидина, а также простота в его применении и отсутствие явных побочных эффектов могут дать возможность его использования для лечения мышечных заболеваний, характеризующихся нарушением процесса аутофагии [87]. Показано, что спермидин также эффективен при саркопении. Путем активации АМПК-зависимого пути аутофагии, спермидин способствует уменьшению атрофии мышц в процессе старения [88].

Исследования в области лечения саркопении демонстрируют, что мириканол – растительный вторичный метаболит, способен активировать SIRT1, который способствует уменьшению деградациии мышечных белков и усилению активности аутофагии. Использование мириканола может стать потенциальным терапевтическим подходом для предотвращения или ослабления возрастной мышечной атрофии [89].

При боковом амиотрофическом склерозе (БАС) – быстропрогрессирующем заболевании с неблагоприятным прогнозом – происходит поражение мотонейронов,

приводящее к параличу и последующей атрофии мышц. Патологическим признаком БАС является наличие цитоплазматических убиквитин-положительных белковых агрегатов в пораженных двигательных нейронах, которые могут содержать неправильно свернутые формы белков SOD1 (супероксиддисмутаза-1), TARDBP (TAR ДНК-связывающего белка), FUS (ДНК/РНК-связывающего белка, вовлеченного в процессы репарации ДНК, регуляции транскрипции, сплайсинга, транспорта РНК и локальной трансляции) [90]. Кроме того, в клетках были обнаружены белковые включения, содержащие SQSTM1, а также накопление аутофагосом, что может указывать на участие аутофагии в патологическом процессе [91, 92]. Возможным терапевтическим подходом при БАС может выступать mTOR-независимый активатор аутофагии трегалоза, которая обладает нейропротективными свойствами. Показано увеличение интенсивности деградации белковых агрегатов и уменьшение агрегации SOD1 и SQSTM1/p62 при ее применении, что способствовало повышению выживаемости мотонейронов [93]. Использование трегалозы возможно и при спинально-бульбарной мышечной атрофии. Это заболевание из группы болезней мотонейронов обусловлено наличием мутаций в гене рецептора андрогена AR, которые приводят к увеличению количества триплетов CAG, что проявляется аномально длинной полиглутаминовой последовательностью в молекуле белка – polyQ. В этом случае направленное действие на аутофагию также является эффективной стратегией для снижения аномальных скоплений ARpolyQ. Трегалоза не только активирует основной процесс аутофагии (например, за счет активации транскрипционного фактора TFEB, который усиливает экспрессию SQSTM1/p62 и LC3), но также повышает экспрессию ключевых факторов CASA, такого как HSPB8, который помогает распознавать выбранный субстрат, избегая неконтролируемой деградации каждого внутриклеточного элемента [94].

Таким образом, на сегодняшний день определены несколько терапевтических стратегий лечения миопатий, связанных со стимуляцией аутофагии. К основным из них относятся ингибиторы mTORC1, такие как рапамицин и его аналоги, или активаторы AMPK, такого как 5-аминоимидазол-4-карбоксамид рибонуклеотид, обеспечивающие защиту и восстановление функциональной и структурной целостности клеток при различных патологических состояниях скелетных мышц и миокарда. Природные соединения, такие как спермидин, трегалоза, полифенолы – ресвератрол и куркумин – также могут считаться возможными вариантами терапии из-за их более низкой токсичности. Однако часть из перечисленных средств, стимулирующих аутофагию, параллельно влияют и на другие сигнальные пути, что может приводить к нежелательным побочным эффектам. В связи с этим разработка более специфичных индукторов аутофагии является важной целью будущих исследований.

ВЫВОДЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ

Аутофагия играет важную роль в поддержании гомеостаза в скелетных миоцитах и кардиомиоцитах. Благодаря своей катаболической функции, этот процесс помогает клетке выжить в условиях дефицита питательных веществ, обеспечивая клетку дополнительными аминокислотами, образующимися в результате деградации клеточных структур. По пути аутофагии утилизируются поврежденные в ходе мышечных сокращений белки Z-диска и саркомера, а также поврежденные действием активно вырабатывающихся АФК клеточные структуры, в том числе митохондрии, обладающие про-апоптотическим действием. Аутофагия способствует поддержанию мышечной пластичности, снижению уровня апоптоза миоцитов, регенерации мышечных волокон и предотвращению клеточного старения. Снижение уровня аутофагии или полное ее нивелирование может выступать триггером или неблагоприятным фоном развития различных заболеваний, включая нейро-мышечные.

Исходя из этого, выявление механизмов, способных восстановить аутофагический баланс, крайне важно для разработки способов ослабления или полной элиминации патологических процессов в клетке, а фармакологические агенты, направленные на активацию аутофагии, могут служить перспективными методами лечения многих заболеваний, в число которых входят патологии скелетной мускулатуры и миокарда.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФ 20-15-00271

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявили об отсутствии потенциального конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

Написание текста рукописи – К.К.К., Ч.А.И., обзор публикаций по теме статьи – К.К.К., С.К.С., редактирование – К.А.А.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Condello M, Pellegrini E, Caraglia M, Meschini S* (2019) Targeting autophagy to overcome human diseases. *Int J Mol Sci* 20(3) 725.
<https://doi.org/10.3390/ijms20030725>
2. *Kirkin V, Rogov VV* (2019) A Diversity of Selective Autophagy Receptors Determines the Specificity of the Autophagy Pathway. *Mol Cell* 76: 268–285.
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.09.005>
3. *Wu NN, Tian H, Chen P, Wang D, Ren J, Zhang Y* (2019) Physical Exercise and Selective Autophagy: Benefit and Risk on Cardiovascular Health. *Cells* 8(11): 1436.
<https://doi.org/10.3390/cells8111436>
4. *Valenzuela CA, Ponce C, Zuloaga R, González P, Avendaño-Herrera R, Valdés JA, Molina A* (2020) Effects of crowding on the three main proteolytic mechanisms of skeletal muscle in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *BMC Vet Res* 16: 294.
<https://doi.org/10.1186/s12917-020-02518-w>
5. *Lira VA, Okutsu M, Zhang M, Greene NP, Laker RC, Breen DS, Hoehn KL, Yan Z* (2013) Autophagy is required for exercise training-induced skeletal muscle adaptation and improvement of physical performance. *FASEB J* 27: 4184–4193.
<https://doi.org/10.1096/fj.13-228486>
6. *Jokl EJ, Blanco G* (2016) Disrupted autophagy undermines skeletal muscle adaptation and integrity. *Mamm Genome* 27(11): 525–537.
<https://doi.org/10.1007/s00335-016-9659-2>
7. *Bell RA, Al-Khalaf M, Megeney LA* (2016) The beneficial role of proteolysis in skeletal muscle growth and stress adaptation. *Skelet Muscle* 6: 16.
<https://doi.org/10.1186/s13395-016-0086-6>
8. *Jiao J, Demontis F* (2017) Skeletal muscle autophagy and its role in sarcopenia and organismal aging. *Curr Opin Pharmacol* 34: 1–6.
<https://doi.org/10.1016/j.coph.2017.03.009>
9. *Mammucari C, Rizzuto R* (2010) Signaling pathways in mitochondrial dysfunction and aging. *Mech Ageing Dev* 131: 536–543.
<https://doi.org/10.1016/j.mad.2010.07.003>
10. *Lee D, Bareja A, Bartlett D, White J* (2019) Autophagy as a Therapeutic Target to Enhance Aged Muscle Regeneration. *Cells* 8: 183.
<https://doi.org/10.3390/cells8020183>
11. *Dorsch LM, Schuldt M, Knežević D, Wiersma M, Kuster DWD, van der Velden J, Brundel BJJM* (2019) Untying the knot: protein quality control in inherited cardiomyopathies. *Pflugers Arch Eur J Physiol* 471: 795–806.
<https://doi.org/10.1007/s00424-018-2194-0>

12. Vincent AE, Grady JP, Rocha MC, Alston CL, Rygiel KA, Barresi R, Taylor RW, Turnbull DM (2016) Mitochondrial dysfunction in myofibrillar myopathy. *Neuromuscul Disord* 26: 691–701. <https://doi.org/10.1016/j.nmd.2016.08.004>
13. Masiero E, Agatea L, Mammucari C, Blaauw B, Loro E, Komatsu M, Metzger D, Reggiani C, Schiaffino S, Sandri M (2009) Autophagy Is Required to Maintain Muscle Mass. *Cell Metab* 10: 507–515. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2009.10.008>
14. Levine B, Packer M, Codogno P (2015) Development of autophagy inducers in clinical medicine. *J Clin Invest* 125: 14–24. <https://doi.org/10.1172/JCI173938>
15. Glick D, Barth S, Macleod KF (2010) Autophagy: Cellular and molecular mechanisms. *J Pathol* 221: 3–12. <https://doi.org/10.1002/path.2697>
16. Parousis A, Carter HN, Tran C, Erlich AT, Mesbah Moosavi ZS, Pauly M, Hood DA (2018) Contractile activity attenuates autophagy suppression and reverses mitochondrial defects in skeletal muscle cells. *Autophagy* 14: 1886–1897. <https://doi.org/10.1080/15548627.2018.1491488>
17. Levine B, Kroemer G (2019) Biological Functions of Autophagy Genes: A Disease Perspective. *Cell* 176: 11–42. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.09.048>
18. Rodney GG, Pal R, Abo-Zahrah R (2016) Redox regulation of autophagy in skeletal muscle. *Free Radic Biol Med* 98: 103–112. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.05.010>
19. Parzych KR, Klionsky DJ (2014) An overview of autophagy: Morphology, mechanism, and regulation. *Antioxidants Redox Signal* 20: 460–473. <https://doi.org/10.1089/ars.2013.5371>
20. Kim YA, Kim YS, Song W (2012) Autophagic response to a single bout of moderate exercise in murine skeletal muscle. *J Physiol Biochem* 68: 229–235. <https://doi.org/10.1007/s13105-011-0135-x>
21. Kaludercic N, Maiuri MC, Kaushik S, Fernández ÁF, De Bruijn J, Castoldi F, Chen Y, Ito J, Mukai R, Murakawa T, Nah J, Pietrocola F, Saito T, Sebt S, Semenzato M, Tsansizi L, Sciarretta S, Madrigal-Matute J (2020) Comprehensive autophagy evaluation in cardiac disease models. *Cardiovasc Res* 116: 483–504. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvz233>
22. Kirkin V (2020) History of the Selective Autophagy Research: How Did It Begin and Where Does It Stand Today? *J Mol Biol* 432: 3–27. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2019.05.010>
23. Hale AN, Ledbetter DJ, Gawriluk TR, Rucker EB (2013) Autophagy: Regulation and role in development. *Autophagy* 9: 951–972. <https://doi.org/10.4161/auto.24273>
24. Reggiori F, Klionsky DJ (2013) Autophagic processes in yeast: Mechanism, machinery and regulation. *Genetics* 194: 341–361. <https://doi.org/10.1534/genetics.112.149013>
25. Feng Y, He D, Yao Z, Klionsky DJ (2014) The machinery of macroautophagy. *Cell Res* 24: 24–41. <https://doi.org/10.1038/cr.2013.168>
26. Zhang J (2015) Teaching the basics of autophagy and mitophagy to redox biologists—Mechanisms and experimental approaches. *Redox Biol* 4: 242–259. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2015.01.003>
27. Dooley HC, Razi M, Polson HEJ, Girardin SE, Wilson MI, Tooze SA (2014) WIPI2 Links LC3 Conjugation with PI3P, Autophagosome Formation, and Pathogen Clearance by Recruiting Atg12-5-16L1. *Mol Cell* 55(2): 238–252. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.05.021>
28. Walczak M, Martens S (2013) Dissecting the role of the Atg12-Atg5-Atg16 complex during autophagosome formation. *Autophagy* 9: 424–425. <https://doi.org/10.4161/auto.22931>
29. Wei Y, Liu M, Li X, Liu J, Li H (2018) Origin of the Autophagosome Membrane in Mammals. *Biomed Res Int* 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/1012789>
30. Tanida I, Ueno T, Kominami E (2008) LC3 and autophagy. *Methods Mol Biol* 445: 77–88. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-157-4_4

31. Kimura S, Noda T, Yoshimori T (2008) Dynein-dependent movement of autophagosomes mediates efficient encounters with lysosomes. *Cell Struct Funct* 33:109–122.
<https://doi.org/10.1247/csf.08005>
32. Monastyrska I, Rieter E, Klionsky DJ, Reggiori F (2009) Multiple roles of the cytoskeleton in autophagy. *Biol Rev* 84: 431–448.
<https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.2009.00082.x>
33. Tang D, Kang R, Zeh HJ, Lotze MT (2011) High-mobility group box 1, oxidative stress, and disease. *Antioxidants Redox Signal* 14: 1315–1335.
<https://doi.org/10.1089/ars.2010.3356>
34. Lee J-Y, Koga H, Kawaguchi Y, Tang W, Wong E, Gao Y-S, Pandey UB, Kaushik S, Tresse E, Lu J, Taylor JP, Cuervo AM, Yao T-P (2010) HDAC6 controls autophagosome maturation essential for ubiquitin-selective quality-control autophagy. *EMBO J* 29: 969–980.
<https://doi.org/10.1038/emboj.2009.405>
35. Mostowy S (2014) Multiple Roles of the Cytoskeleton in Bacterial Autophagy. *PLoS Pathog* 10: e1004409.
<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004409>
36. Shaid S, Brandts CH, Serve H, Dikic I (2013) Ubiquitination and selective autophagy. *Cell Death Differ* 20: 21–30.
<https://doi.org/10.1038/cdd.2012.72>
37. Mercer EJ, Lin YF, Cohen-Gould L, Evans T (2018) Hspb7 is a cardioprotective chaperone facilitating sarcomeric proteostasis. *Dev Biol* 435: 41–55.
<https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2018.01.005>
38. Matkovich SJ, Van Booven DJ, Hindes A, Kang MY, Druley TE, Vallania FLM, Mitra RD, Reilly MP, Cappola TP, Dorn GW (2010) Cardiac signaling genes exhibit unexpected sequence diversity in sporadic cardiomyopathy, revealing HSPB7 polymorphisms associated with disease. *J Clin Invest* 120: 280–289.
<https://doi.org/10.1172/JCI39085>
39. Lahvic JL, Ji Y, Marin P, Zuflacht JP, Springel MW, Wosen JE, Davis L, Hutson LD, Amack JD, Marvin MJ (2013) Small heat shock proteins are necessary for heart migration and laterality determination in zebrafish. *Dev Biol* 384: 166–180.
<https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2013.10.009>
40. Hong KW, Lim JE, Kim JW, Tabara Y, Ueshima H, Miki T, Matsuda F, Cho YS, Kim Y, Oh B (2014) Identification of three novel genetic variations associated with electrocardiographic traits (QRS duration and PR interval) in East Asian. *Human Mol Genetics* 23(24): 6659–6667.
<https://doi.org/10.1093/hmg/ddu374>
41. Ranek MJ, Stachowski MJ, Kirk JA, Willis MS (2018) The role of heat shock proteins and co-chaperones in heart failure. *Philos Trans R Soc B Biol Sci* 373(1738): 20160530.
<https://doi.org/10.1093/hmg/ddu374>
42. Ulbricht A, Höhfeld J (2013) Tension-induced autophagy: May the chaperone be with you. *Autophagy* 9: 920–922.
<https://doi.org/10.4161/auto.24213>
43. Schuld J, Orfanos Z, Chevessier F, Eggers B, Heil L, Uszkoreit J, Unger A, Kirfel G, Van Der Ven PFM, Marcus K, Linke WA, Clemen CS, Schröder R, Fürst DO (2020) Homozygous expression of the myofibrillar myopathy-associated p.W2710X filamin C variant reveals major pathomechanisms of sarcomeric lesion formation. *Acta Neuropathol Commun* 8.
<https://doi.org/10.1186/s40478-020-01001-9>
44. Verdonschot JAJ, Vanhoutte EK, Claes GRF, Helderma-van den Enden ATJM, Hoeijmakers JGJ, Hellebrekers DMEI, de Haan A, Christiaans I, Lekanne Deprez RH, Boen HM, van Craenenbroeck EM, Loeys BL, Hoedemaekers YM, Marcelis C, Kempers M, Brusse E, van Waning JI, Baas AF, Dooijes D, Asselbergs FW, Barge-Schaapveld DQCM, Koopman P, van den Wijngaard A, Heymans SRB, Krapels IPC, Brunner HG (2020) A mutation update for the FLNC gene in myopathies and cardiomyopathies. *Hum Mutat* 41: 1091–1111.
<https://doi.org/10.1002/humu.24004>
45. Arndt V, Dick N, Tawo R, Dreiseidler M, Wenzel D, Hesse M, Fürst DO, Safiüg P, Saint R, Fleischmann BK, Hoch M, Höhfeld J (2010) Chaperone-Assisted Selective Autophagy Is Essential for Muscle Maintenance. *Curr Biol* 20:143–148.
<https://doi.org/10.1016/j.cub.2009.11.022>
46. Ulbricht A, Gehlert S, Leciejewski B, Schiffer T, Bloch W, Höhfeld J (2015) Induction and adaptation of chaperone-assisted selective autophagy CASA in response to resistance exercise in human skeletal muscle. *Autophagy* 11: 538–546.
<https://doi.org/10.1080/15548627.2015.1017186>
47. Bjørkøy G, Lamark T, Brech A, Outzen H, Perander M, Øvervatn A, Stenmark H, Johansen T (2005) p62/SQSTM1 forms protein aggregates degraded by autophagy and has a protective effect on

- huntingtin-induced cell death. *J Cell Biol* 171: 603–614.
<https://doi.org/10.1083/jcb.200507002>
48. *Bartlett BJ, Isakson P, Lewerenz J, Sanchez H, Kotzebue RW, Cumming R, Harris GL, Nezis IP, Schubert D, Simonsen A, Finley KD* (2011) p62, Ref(2)P and ubiquitinated proteins are conserved markers of neuronal aging, aggregate formation and progressive autophagic defects. *Autophagy* 7: 572–583.
<https://doi.org/10.4161/auto.7.6.14943>
 49. *Lum JJ, Bauer DE, Kong M, Harris MH, Li C, Lindsten T, Thompson CB* (2005) Growth factor regulation of autophagy and cell survival in the absence of apoptosis. *Cell* 120: 237–248.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.11.046>
 50. *Mehrbod P, Ande SR, Alizadeh J, Rahimizadeh S, Shariati A, Malek H, Hashemi M, Glover KKM, Sher AA, Coombs KM, Ghavami S* (2019) The roles of apoptosis, autophagy and unfolded protein response in arbovirus, influenza virus, and HIV infections. *Virulence* 10: 376–413.
<https://doi.org/10.1080/21505594.2019.1605803>
 51. *Yordy B, Iwasaki A* (2011) Autophagy in the control and pathogenesis of viral infection. *Curr Opin Virol* 1: 196–203.
<https://doi.org/10.1016/j.coviro.2011.05.016>
 52. *Levine B, Mizushima N, Virgin HW* (2011) Autophagy in immunity and inflammation. *Nature* 469: 323–335.
<https://doi.org/10.1038/nature09782>
 53. *Deretic V, Levine B* (2009) Autophagy, Immunity, and Microbial Adaptations. *Cell Host Microbe* 5: 527–549. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2009.05.016>
 54. *Wong HH, Sanyal S* (2020) Manipulation of autophagy by (+) RNA viruses. *Semin Cell Dev Biol* 101: 3–11.
<https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2019.07.013>
 55. *Nakagawa I, Amano A, Mizushima N, Yamamoto A, Yamaguchi H, Kamimoto T, Nara A, Funao J, Nakata M, Tsuda K, Hamada S, Yoshimori T* (2004) Autophagy defends cells against invading group A *Streptococcus*. *Science* 306: 1037–1040.
<https://doi.org/10.1126/science.1103966>
 56. *Ogawa M, Yoshimori T, Suzuki T, Sagara H, Mizushima N, Sasakawa C* (2005) Escape of intracellular *Shigella* from autophagy. *Science* 307: 727–731.
<https://doi.org/10.1126/science.1106036>
 57. *Gransee HM, Mantilla CB, Sieck GC* (2012) Respiratory muscle plasticity. *Compr Physiol* 2: 1441–1462.
<https://doi.org/10.1002/cphy.c110050>
 58. *Lazarou M, Sliter DA, Kane LA, Sarraf SA, Wang C, Burman JL, Sideris DP, Fogel AI, Youle RJ* (2015) The ubiquitin kinase PINK1 recruits autophagy receptors to induce mitophagy. *Nature* 524: 309–314.
<https://doi.org/10.1038/nature14893>
 59. *Moylan JS, Reid MB* (2007) Oxidative stress, chronic disease, and muscle wasting. *Muscle and Nerve* 35: 411–429.
<https://doi.org/10.1002/mus.20743>
 60. *Di Meo S, Napolitano G, Venditti P* (2019) Mediators of physical activity protection against roslinked skeletal muscle damage. *Int J Mol Sci* 20(12): 3024.
<https://doi.org/10.3390/ijms20123024>
 61. *Laker RC, Drake JC, Wilson RJ, Lira VA, Lewellen BM, Ryall KA, Fisher CC, Zhang M, Saucerman JJ, Goodyear LJ, Kundu M, Yan Z* (2017) Ampk phosphorylation of Ulk1 is required for targeting of mitochondria to lysosomes in exercise-induced mitophagy. *Nat Commun* 8: 1–13.
<https://doi.org/10.1038/s41467-017-00520-9>
 62. *He C, Bassik MC, Moresi V, Sun K, Wei Y, Zou Z, An Z, Loh J, Fisher J, Sun Q, Korsmeyer S, Packer M, May HI, Hill JA, Virgin HW, Gilpin C, Xiao G, Bassel-Duby R, Scherer PE, Levine B* (2012) Exercise-induced BCL2-regulated autophagy is required for muscle glucose homeostasis. *Nature* 481: 511–515.
<https://doi.org/10.1038/nature10758>
 63. *Masiero E, Agatea L, Mammucari C, Blaauw B, Loro E, Komatsu M, Metzger D, Reggiani C, Schiavino S, Sandri M* (2009) Autophagy Is Required to Maintain Muscle Mass *Cell Metab* 10: 507–515.
<https://doi.org/10.1016/j.cmet.2009.10.008>
 64. *Maejima Y, Isobe M, Sadoshima J* (2016) Regulation of autophagy by Beclin 1 in the heart. *J Mol Cell Cardiol* 95: 19–25.
<https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2015.10.032>

65. *Tannous P, Zhu H, Johnstone JL, Shelton JM, Rajasekaran NS, Benjamin IJ, Nguyen L, Gerard RD, Levine B, Rothmel BA, Hill JA* (2008) Autophagy is an adaptive response in desmin-related cardiomyopathy. *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 9745–9750.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0706802105>
66. *Jiao J, Demontis F* (2017) Skeletal muscle autophagy and its role in sarcopenia and organismal aging. *Curr Opin Pharmacol* 34: 1–6.
<https://doi.org/10.1016/j.coph.2017.03.009>
67. *Demontis F, Perrimon N* (2010) FOXO/4E-BP signaling in *Drosophila* muscles regulates organism-wide proteostasis during aging. *Cell* 143: 813–825.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.10.007>
68. *Shirakabe A, Ikeda Y, Sciarretta S, Zablocki DK, Sadoshima J* (2016) Aging and Autophagy in the Heart. *Circ Res* 118: 1563–1576.
<https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.307474>
69. *Kakimoto Y, Okada C, Kawabe N, Sasaki A, Tsukamoto H, Nagao R, Osawa M* (2019) Myocardial lipofuscin accumulation in ageing and sudden cardiac death. *Sci Rep* 9: 1–8.
<https://doi.org/10.1038/s41598-019-40250-0>
70. *De Meyer GRY, Martinet W* (2009) Autophagy in the cardiovascular system. *Biochim Biophys Acta – Mol Cell Res* 1793: 1485–1495.
<https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2008.12.011>
71. *McMillan EM, Quadrilatero J* (2014) Autophagy is required and protects against apoptosis during myoblast differentiation. *Biochem J* 462: 267–277.
<https://doi.org/10.1042/BJ20140312>
72. *Ryall JG* (2017) Simultaneous measurement of mitochondrial and glycolytic activity in quiescent muscle stem cells. In: *Methods in Molecular Biology*. Humana Press Inc 1556: 245–253.
https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6771-1_13
73. *Perrotta C, Cattaneo MG, Molteni R, De Palma C* (2020) Autophagy in the Regulation of Tissue Differentiation and Homeostasis. *Front Cell Dev Biol* 8: 1563.
<https://doi.org/10.3389/fcell.2020.602901>
74. *Paolini A, Omairi S, Mitchell R, Vaughan D, Matsakas A, Vaiyapuri S, Ricketts T, Rubinsztein DC, Patel K* (2018) Attenuation of autophagy impacts on muscle fibre development, starvation induced stress and fibre regeneration following acute injury. *Sci Rep* 8.
<https://doi.org/10.1038/s41598-018-27429-7>
75. *Lee DE, Bareja A, Bartlett DB, White JP* (2019) Autophagy as a Therapeutic Target to Enhance Aged Muscle Regeneration. *Cells* 8(2): 183.
<https://doi.org/10.3390/cells8020183>
76. *Xie Z, Lau K, Eby B, Lozano P, He C, Pennington B, Li H, Rathi S, Dong Y, Tian R, Kem D, Zou MH* (2011) Improvement of cardiac functions by chronic metformin treatment is associated with enhanced cardiac autophagy in diabetic OVE26 mice. *Diabetes* 60: 1770–1778.
<https://doi.org/10.2337/db10-0351>
77. *Bibee KP, Cheng YJ, Ching JK, Marsh JN, Li AJ, Keeling RM, Connolly AM, Golumbek PT, Myerson JW, Hu G, Chen J, Shannon WD, Lanza GM, Weihl CC, Wickline SA* (2014) Rapamycin nanoparticles target defective autophagy in muscular dystrophy to enhance both strength and cardiac function. *FASEB J* 28: 2047–2061.
<https://doi.org/10.1096/fj.13-237388>
78. *Cabet E, Batonnet-Pichon S, Delort F, Gausserès B, Vicart P, Lilienbaum A* (2015) Antioxidant Treatment and Induction of Autophagy Cooperate to Reduce Desmin Aggregation in a Cellular Model of Desminopathy. *PLoS One* 10: e0137009.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0137009>
79. *De Palma C, Morisi F, Cheli S, Pambianco S, Cappello V, Vezzoli M, Rovere-Querini P, Moggio M, Ripolone M, Francolini M, Sandri M, Clementi E* (2012) Autophagy as a new therapeutic target in Duchenne muscular dystrophy. *Cell Death Dis* 3.
<https://doi.org/10.1038/cddis.2012.159>
80. *Pallafacchina G, Calabria E, Serrano AL, Kalthovde JM, Schiaffino S* (2002) A protein kinase B-dependent and rapamycin-sensitive pathway controls skeletal muscle growth but not fiber type specification. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 9213–9218.
<https://doi.org/10.1073/pnas.142166599>
81. *Barlow AD, Nicholson ML, Herbert TP* (2013) Evidence for rapamycin toxicity in pancreatic β -Cells and a review of the underlying molecular mechanisms. *Diabetes* 62: 2674–2682.
<https://doi.org/10.2337/db13-0106>
82. *Pauly M, Daussin F, Burelle Y, Li T, Godin R, Fauconnier J, Koechlin-Ramonatxo C, Hugon G, Lacampagne A, Coisy-Quivy M, Liang F, Hussain S, Matecki S, Petrof BJ* (2012) AMPK activation stimulates autophagy and ameliorates muscular dystrophy in the mdx mouse diaphragm. *Am J*

- Pathol 181: 583–592.
<https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2012.04.004>
83. Kuno A, Hosoda R, Sebori R, Hayashi T, Sakuragi H, Tanabe M, Horio Y (2018) Resveratrol Ameliorates Mitophagy Disturbance and Improves Cardiac Pathophysiology of Dystrophin-deficient mdx Mice. *Sci Rep* 8: 1–12.
<https://doi.org/10.1038/s41598-018-33930-w>
 84. Yao Q, Ke Z qiang, Guo S, Yang X song, Zhang F xue, Liu X fen, Chen X, Chen H guang, Ke H ya, Liu C (2018) Curcumin protects against diabetic cardiomyopathy by promoting autophagy and alleviating apoptosis. *J Mol Cell Cardiol* 124: 26–34.
<https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2018.10.004>
 85. Cescon M, Gattazzo F, Chen P, Bonaldo P (2015) Collagen VI at a glance. *J Cell Sci* 128: 3525–353.
<https://doi.org/10.1242/jcs.169748>
 86. Allamand V, Briñas L, Richard P, Stojkovic T, Quijano-Roy S, Bonne G (2011) ColVI myopathies: where do we stand, where do we go? *Skelet Muscle* 1: 30.
<https://doi.org/10.1186/2044-5040-1-30>
 87. Chrisam M, Pirozzi M, Castagnaro S, Blaauw B, Polishchuck R, Cecconi F, Grumati P, Bonaldo P (2015) Reactivation of autophagy by spermidine ameliorates the myopathic defects of collagen VI-null mice. *Autophagy* 11: 2142–2152.
<https://doi.org/10.1080/15548627.2015.1108508>
 88. Fan J, Yang X, Li J, Shu Z, Dai J, Liu X, Li B, Jia S, Kou X, Yang Y, Chen N (2017) Spermidine coupled with exercise rescues skeletal muscle atrophy from D-gal-induced aging rats through enhanced autophagy and reduced apoptosis via AMPK-FOXO3a signal pathway. *Oncotarget* 8(11): 17475–17490.
<https://doi.org/10.18632/oncotarget.15728>
 89. Shen S, Liao Q, Liu J, Pan R, Lee SMY, Lin L (2019) Myricanol rescues dexamethasone-induced muscle dysfunction via a sirtuin 1-dependent mechanism. *J Cachexia Sarcopenia Muscle* 10(2): 429–444.
<https://doi.org/10.1002/jcsm.12393>
 90. Blokhuis AM, Groen E J N, Koppers M, Van Den Berg L H, Pasterkamp R J (2013) Protein aggregation in amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol* 125: 777–794.
<https://doi.org/10.1007/s00401-013-1125-6>
 91. Gal J, Ström A-L, Kilty R, Zhang F, Zhu H (2007) p62 Accumulates and Enhances Aggregate Formation in Model Systems of Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis. *J Biol Chem* 282: 11068–11077.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M608787200>
 92. Sasaki S (2011) Autophagy in spinal cord motor neurons in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol* 70: 349–359.
<https://doi.org/10.1097/NEN.0b013e3182160690>
 93. Li Y, Guo Y, Wang X, Yu X, Duan W, Hong K, Wang J, Han H, Li C (2015) Trehalose decreases mutant SOD1 expression and alleviates motor deficiency in early but not end-stage amyotrophic lateral sclerosis in a SOD1-G93A mouse model. *Neuroscience* 298: 12–25.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.03.061>
 94. Cicardi ME, Cristofani R, Crippa V, Ferrari V, Tedesco B, Casarotto E, Chierichetti M, Galbiati M, Piccolella M, Messi E, Carra S, Pennuto M, Rusmini P, Poletti A (2019) Autophagic and proteasomal mediated removal of mutant androgen receptor in muscle models of spinal and bulbar muscular atrophy. *Front Endocrinol (Lausanne)* 10: 569.
<https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00569>

Autophagy as a Link in Pathogenesis and a Target for Therapy in Diseases of the Musculoskeletal System

K. K. Kalugina^{a, b, *}, K. S. Sukhareva^a, A. I. Churkina^a, and A. A. Kostareva^a

^aAlmazov National Medical Research Centre, Saint Petersburg, Russia

^bSaint Petersburg University, Saint Petersburg, Russia

*e-mail: bagr97@mail.ru

Autophagy is a conservative process of degradation of intracellular structures by lysosomal enzymes in specialized compartments such as autophagolysosomes plays a role in many processes, such as differentiation, maintenance of energy homeostasis, and protection of cells in the presence of destructive changes. Autophagy is of particular impor-

tance for the functioning of skeletal and cardiac muscles, namely, to maintain the structural and physiological integrity of the sarcomere during muscle contraction, as well as for pathological changes in the muscle fiber. Activation of the autophagy process occurs in response to a variety of stressful stimuli, such as muscle damage during intense exercise, resulting in tissue Repair, including through the activation of satellite cells. In this review, autophagy is considered as a protective process, in which several types are distinguished, differing in their mechanisms. The review will cover the molecular basis of the autophagy process, its role in the vital activity and functioning of cells, as well as the therapeutic potential of autophagy activators in the treatment of severe human diseases associated with disorders of skeletal and cardiac muscles. Special attention will be paid to the description of pharmacological drugs that can enhance the activity of autophagy, as well as the mechanisms of their action.

Keywords: autophagy, myocardium, protein aggregates, skeletal muscles, therapeutic effect of autophagy

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

СТАБИЛЬНЫЙ УРОВЕНЬ ГИГАНТСКИХ БЕЛКОВ
САРКОМЕРНОГО ЦИТОСКЕЛЕТА В ПОПЕРЕЧНОПОЛОСАТЫХ МЫШЦАХ
СОНИ-ПОЛЧКА *GLIS GLIS* ПРИ ГИБЕРНАЦИИ

© 2021 г. С. С. Попова¹, Д. А. Юршенас¹, Г. З. Михайлова¹, Л. Г. Бобылёва¹,
Н. Н. Салмов¹, О. В. Тяпкина^{2, 3}, Л. Ф. Нуруллин^{2, 3}, Г. Р. Газизова⁴,
И. Р. Нигметзянов⁴, О. А. Гусев⁴, Н. М. Захарова⁵, И. М. Вихлянцев^{1, *}

¹Институт теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук,
Пушино, Россия

²Казанский институт биохимии и биофизики Российской академии наук,
Казань, Россия

³Казанский государственный медицинский университет, Казань, Россия

⁴Казанский Федеральный Университет, Институт фундаментальной медицины и биологии,
Казань, Россия

⁵Институт биофизики клетки Российской академии наук, Пушино, Россия

*E-mail: ivanvikhlyantsev@gmail.com

Поступила в редакцию 18.01.2021 г.

После доработки 23.02.2021 г.

Принята к публикации 23.02.2021 г.

Исследованы изменения содержания гигантских белков саркомерного цитоскелета титина (м.м. 3000–3700 кДа) и небулина (м.м. 770 кДа) в скелетных мышцах (*m. soleus*, *m. gastrocnemius*), титина в миокарде левого желудочка сердца, а также белка примембранного цитоскелета дистрофина (м.м. 427 кДа) в *m. soleus* и *m. extensor digitorum longus* сони-полчка (*Glis glis*) двух экспериментальных групп: “Летняя активность” и “Гипотермия” (спячка). Обнаружено, что развитие атрофических изменений в скелетных мышцах сони-полчка при гибернации сопровождается уменьшением содержания дистрофина. В частности, интенсивность флуоресценции на поперечных срезах скелетных мышц, окрашенных первичными антителами к дистрофину и вторичными антителами, конъюгированными с флуорохромом Alexa488, уменьшилась в 2.7 раза ($p < 0.05$) и в 2.0 раза ($p < 0.05$) в *m. soleus* и *m. EDL* соответственно у животных группы “Гипотермия”. ДСН-электрофорез белков в крупнопористом 2.2%-ном полиакриламидном геле, укрепленном агарозой, выявил незначительное уменьшение (на 15%, $p \leq 0.01$) содержания титина по отношению к содержанию тяжелых цепей миозина в *m. gastrocnemius* животных группы “Гипотермия”. Содержание титина в *m. soleus* и сердечной мышце, а также содержание небулина в исследованных скелетных мышцах не уменьшалось в период гибернации. Эти результаты согласуются с полученными нами ранее данными для других гибернантов: длиннохвостого суслика, бурого и гималайского медведей. Можно предположить, что в процессе эволюции у зимнеящих животных были выработаны молекулярные механизмы, отвечающие за поддержание стабильного уровня гигантских белков саркомерного цитоскелета в период гибернации.

Ключевые слова: гибернация, *m. soleus*, *m. extensor digitorum longus*, *m. gastrocnemius*, титин, небулин, миозин, дистрофин, соня-полчок, *Glis glis*

DOI: 10.31857/S0869813921060108

Гибернация (зимняя спячка) — это эволюционно закрепленная способность у некоторых млекопитающих выживать в экстремальных условиях (при низких температурах и отсутствии пищи) за счет обратимого подавления метаболизма, сопровождающегося снижением температуры тела. Соня-полчок (*Glis glis*, семейство Gliridae) — гибернант, обитающий в широколиственных и смешанных лесах Европы. Активный период у этих животных составляет всего 4–5 мес. в году. С сентября по ноябрь сони начинают залегать в спячку, которая длится до конца мая—начала июня [1, 2]. Эти животные интересны и тем, что способны впадать в спячку не только зимой, но и летом [3]. Баут зимней спячки (т.е., период пребывания в состоянии гипотермии) у этих животных длится от 3–4 сут (39 ч в лабораторных условиях) до двух–трех недель, прерываясь периодами активности (эутермии) [3, 4]. Температура тела у сони-полчка во время зимней спячки не опускается ниже 0°C [3, 5]. Это является отличительной особенностью сони-полчка в сравнении с другими гибернантами, например, длиннохвостым сусликом (*Urocyon undulatus*), температура тела у которого в период спячки снижается до –2°C [6]. Другой отличительной особенностью сони-полчка является то, что, несмотря на значительную потерю (до 30%) массы тела за время гибернации, уровень атрофических изменений в мышцах этих животных менее выраженный, чем у других гибернантов [7]. В связи с этим соня-полчок является интересным объектом для изучения не только молекулярных механизмов развития мышечной атрофии, но и механизмов, лежащих в основе поддержания мышечной массы у гибернантов.

Показано, что развитие мышечной атрофии как вследствие пребывания в условиях моделируемой [8] или реальной [9] невесомости, так и в период зимней спячки [10] сопровождается уменьшением содержания полноразмерных (интактных) молекул титина (T1) [11], перекрывающих расстояние от М-линии до Z-диска в саркомерах поперечнополосатых мышц позвоночных. В частности, в ряде скелетных мышц, а также в сердечной мышце длиннохвостого суслика в период спячки (гипотермии) наблюдалось уменьшение в 1.2–1.3 раза содержания T1 относительно содержания тяжелых цепей миозина [11–13] — белка, формирующего толстые нити и взаимодействующего в А-зоне саркомера с титином. В периоды эутермии между баутами спячки (когда температура тела суслика поднимается до нормальной) наблюдалось восстановление содержания T1 в сердечной и скелетных мышцах [12, 13]. При этом содержание небулина (белка тонких нитей скелетных мышц) относительно содержания ТЦМ не изменялось в период гибернации [12, 13], что свидетельствует о поддержании стабильного уровня этого белка в мышцах длиннохвостого суслика. Поддержание константного соотношения T1/ТЦМ и небулин/ТЦМ наблюдалось в поперечнополосатых мышцах и трех видов медведей в период зимнего сна [14, 15].

В доступной нам литературе данных об изменении содержания дистрофина в мышцах зимнеспящих животных мы не обнаружили. Однако известны данные об уменьшении содержания этого белка у крыс в скелетной мышце *m. soleus* при развитии атрофии, индуцируемой гравитационной разгрузкой [16].

В данной работе исследованы изменения содержания гигантских белков саркомерного цитоскелета титина и небулина в скелетных мышцах (*m. soleus*, *m. gastroc-*

Список сокращений: T1 — интактный титин (полноразмерные молекулы, перекрывающие расстояние от М-линии до Z-диска в саркомерах поперечнополосатых мышц позвоночных), T2 — протеолитические фрагменты титина (располагаются вдоль миозиновых нитей в М-зоне и А-диске саркомера), ТЦМ — тяжелые цепи миозина (формируют миозиновую нить), ППС — площадь поперечного сечения, *m. EDL* — *musculus extensor digitorum longus*.

nemius), титина в миокарде левого желудочка сердца, а также белка примембранного цитоскелета дистрофина в *m. soleus* и *m. extensor digitorum longus* сони-полчка двух экспериментальных групп: “Летняя активность” и “Гипотермия”. Рабочая гипотеза была следующей: на фоне развития атрофии поперечнополосатых мышц сони-полчка в период гибернации не будет наблюдаться уменьшение содержания трех вышеуказанных цитоскелетных белков.

Поскольку в мышцах гибернантов в период спячки наблюдается увеличение доли мышечных волокон, экспрессирующих “медленную” изоформу I ТЦМ [10], отдельной нашей задачей было выяснение изменений изоформного состава ТЦМ в *m. soleus* и *m. gastrocnemius* сони-полчка двух экспериментальных групп. Подобных исследований на этих мышцах для данного вида животных не проводилось.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектом исследования были сони-полчки (*Glis glis*), отловленные в период с 3 по 15 августа 2015 г. в Волгоградской области (приобретены у ООО “Зоо-ЭКЗО”, Волгоград, РФ). Животных содержали по 3–4 особи в клетках размером 260 × 476 × 203 мм с пластиковым поддоном. В качестве подстилки использовали древесные пеллеты. В клетки животным ставили картонные коробочки размером 20 × 10 × 15 см, которые служили укрытием для животных. Животных содержали в условиях вивария Казанского государственного медицинского университета. Корм (Padovan Grandmix Sticeti для хомяков и мышей) и воду животные получали *ad libitum*. В рацион питания также входили семена подсолнечника, орехи (лесные, грецкие), арахис, яблоки, морковь, бананы, мясной фарш и вареное яйцо. Все процедуры с животными проводили в соответствии с международными биоэтическими нормами (протокол № 319 от 4.04.2013 г., принятый Физиологической секцией Российского национального комитета по биологической этике). Эксперименты на животных были одобрены Локальным этическим комитетом федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования Казанский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения Российской Федерации (выписка из протокола заседания № 10 от 22 декабря 2020 г.).

В экспериментах исследовали животных обоих полов, находящихся в состоянии активности (группа “Летняя активность”, июнь–июль 2015 г., средняя масса животных 122.5 ± 3.2 г, $n = 4$) и в состоянии спячки (группа “Гипотермия”, январь–февраль 2016 г., средняя масса животных 111.0 ± 12.5 г, $n = 4$). Животных группы “Летняя активность” содержали в клетках в условиях вивария при температуре окружающей среды 21–25°C и искусственном освещении (свет/темнота) – 12 ч/12 ч. Животных группы “Гипотермия” (рис. 1) содержали в специальном помещении, где поддерживали температуру окружающей среды 4–5°C. В помещении также поддерживали режим искусственного освещения (свет/темнота) – 12ч/12ч. Продолжительность спячки животных составляла 14 сут. Температуру тела животных измеряли в области лба бесконтактным инфракрасным термометром В. Well WF-5000 (В. Well Swiss, Швейцария). Температура тела животных группы “Летняя активность” составляла 35–36°C, животных группы “Гипотермия” – 7–9°C.

Животных обеих групп под глубоким ингаляционным эфирным наркозом декапитировали и проводили экстирпацию мышц. Были взяты следующие образцы мышечных тканей: миокард левого желудочка сердца, *m. soleus*, *m. extensor digitorum* и обе головки *m. gastrocnemius*. Скелетные мышцы были взяты с обеих конечностей. Мышцы замораживали в жидком азоте и хранили при температуре –75°C в лабора-



Рис. 1. Соня-полчок (*Glis glis*) в состоянии гибернации. У животного отсутствует реакция на внешние раздражители во время глубокой спячки.

тории экстремальной биологии Казанского федерального университета. Для исследований содержания и изоформного состава титина, небулина и ТЦМ образцы мышц в жидком азоте были транспортированы в Пущино в Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН и в Институт биофизики клетки РАН.

Для измерения площади поперечного сечения мышечных волокон, а также содержания дистрофина образцы мышц *m. soleus* и *m. EDL* (целая мышца от одного сухожильного конца до другого сухожильного конца) в течение 12 ч фиксировали в 4%-ном растворе параформальдегида (рН 7.2), приготовленного на 0.1 М фосфатном буфере (PBS, Sigma, США). Для криопротекции фиксированные ткани мышц помещали на 24 ч в 30%-ный раствор сахарозы (Хеликон, Россия), приготовленный на фосфатно-солевом буфере (Биолот, Россия) с добавлением 0.1% азида натрия (Sigma, США). Затем мышцы погружали в специальную водорастворимую среду (Tissue-Tek, Нидерланды) и замораживали для изготовления поперечных срезов на криостате HM 560 Cryo-Star (Carl Zeiss, Германия). Поперечные серийные срезы мышц толщиной 9 мкм монтировали на предметные стекла с полилизинным покрытием (Thermo Fisher Scientific, США). Серийные срезы окрашивали первичными поликлональными антителами к дистрофину (1 : 250, ab15277, Abcam Plc, Великобритания) в течение 12 ч при температуре 4°C. Затем использовали вторичные антитела (IgG козьиные против кролика, 1 : 1000, Invitrogen, США), конъюгированные с флуорохромом Alexa488. Изображения микропрепаратов получали на конфокальном сканирующем микроскопе Leica TCS SP5 MP с помощью фотоэлектронного умножителя (Leica Microsystems, Германия). Использовали масляный иммерсионный объектив 10× и 63×. На полученных изображениях поперечных срезов мышц анализировали интенсивность флуоресцентного свечения, полученную после проведения иммунной реакции, а также площади поперечного сечения отдельных мышечных волокон, попавших в поле зрения с применением программы ImageJ (NIH, США). При одинаковых условиях приготовления препаратов интенсивность иммунофлуоресценции в саркомере мышцы оценивали по интенсивности свечения с учетом базового фона.

ДСН-гель-электрофорез высокомолекулярных N2B, N2BA, N2A и NT-изоформ интактного титина-1 (T1, м.м. ~3000–3700 кДа), протеолитических T2-фрагментов (м.м. ~2100–2200 кДа) этого белка в исследуемых поперечнополосатых мышцах, а также небулина (м.м. ~770 кДа) в скелетных мышцах проводили по методу [17] с нашими модификациями [18]. В частности, мы использовали крупнопористый 2.2%-ный полиакриламидный гель с содержанием агарозы 0.5%. Подготовку проб проводили в соответствии с нашими рекомендациями, исключая нагревание проб выше 40°C с целью предотвращения разрушения титина под действием более высоких температур. Для электрофоретического разделения изоформ I и IIa ТЦМ использовали 7%-ный полиакриламидный гель, приготовленный по методу [19]. Экстракцию белков из мышечной ткани проводили в лизирующем буфере (12 мМ трис-НСl, 1.2% ДСН, 5 мМ ЭГТА, 10% глицерина, 2% β-меркаптоэтанола, 5 мгк/мл леупептина и E64, рН 7.0). Концентрацию общего белка перед проведением гель-электрофореза определяли спектрофотометрическим методом, используя NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, США). На дорожки в геле нанесли одинаковое количество общего белка. Электрофорез проводили в аппаратах с вертикальным расположением геля (ООО Хеликон, Россия), размер пластинки геля 8 × 10 см, толщина геля 1 мм. Для разделения титина и небулина электрофорез проводили в течение 1.5–2 ч при силе тока 3–8 мА, для разделения ТЦМ – в течение 6–8 ч при силе тока 10–12 мА. Гели, окрашенные Coomassie Brilliant Blue G-250 и R-250, смешанными в пропорции 1 : 1, оцифровывали, а затем проводили денситометрический анализ сканов с помощью компьютерной программы Total Lab v1.11 (Newcastle Upon Tyne, Великобритания). Содержание титина и небулина оценивали по отношению к содержанию ТЦМ (крупнопористые гели, укрепленные агарозой). Данный способ оценки содержания титина и небулина широко используется и является более точным, чем способ оценки содержания этих белков по отношению к содержанию общего белка в пробе. Содержание изоформ тяжелых цепей миозина (7%-ные полиакриламидные гели) оценивали в процентах от общего содержания ТЦМ.

Статистический анализ изменений площадей поперечного сечения мышечных волокон, а также интенсивности флуоресценции при определении содержания дистрофина проводили с помощью программы Origin 7.5. Результаты представлены как среднее значение ± стандартная ошибка. Достоверность различий оценивали с помощью *t*-критерия Стьюдента; значимыми считали различия при $p < 0.05$. Статистический анализ изменений массы тела и массы сердца животных, а также изменений содержания титина, небулина и ТЦМ проводили с использованием непараметрического *U*-критерия Манна–Уитни. Этот критерий предназначен для оценки количественных различий признака между двумя малыми выборками, когда выборка 1 и выборка 2 равны трем или больше значениям *n*, или выборка 1 равна двум, а выборка 2 равна пяти или больше значениям *n*. Таким образом, при отсутствии резких отклонений тестируемых показателей в выборках *U*-критерий Манна–Уитни позволяет выявить статистически значимые различия между двумя малыми выборками. В нашей работе значимыми считали различия при $p \leq 0.05$.

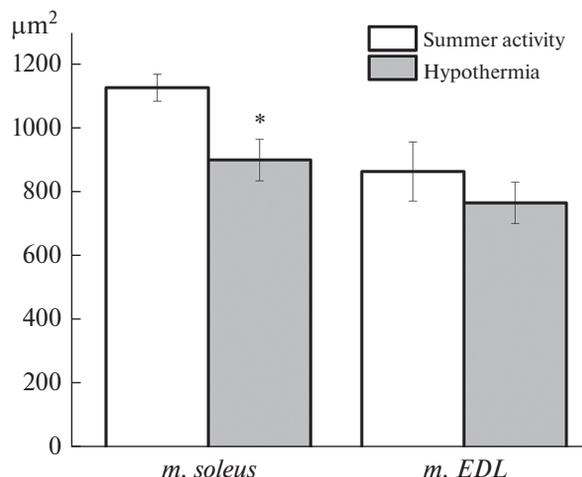


Рис. 2. Площадь поперечного сечения (ППС) мышечных волокон *m. soleus* и *m. EDL* сонь-полчков из групп “Летняя активность” и “Гипотермия”.

Среднее значение ППС мышечных волокон составило: в *m. soleus* 1123 ± 42 мкм² (“Летняя активность”, $n = 100$) против; 898 ± 65 мкм² (“Гипотермия”, $n = 100$); в *m. EDL* 862 ± 91 мкм² (“Летняя активность”, $n = 100$) против 764 ± 26 мкм² (“Гипотермия”, $n = 100$). * $p \leq 0.05$ в сравнении с группой “Летняя активность”.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Определение уровня атрофических изменений в поперечнополосатых мышцах сони-полчка в период спячки

В табл. 1 представлены данные о массе сердца, массе тела животных, а также соотношение вышеуказанных масс, указывающее на развитие атрофических (при уменьшении соотношения) или гипертрофических (при увеличении соотношения) изменений. Не выявлено статистически значимых различий в параметре “отношение массы сердца к массе тела животного” у сонь двух групп. Однако наблюдалась выраженная тенденция к увеличению этого параметра в группе “Гипотермия”, что свидетельствует о тенденции к развитию гипертрофии миокарда у сони-полчка в период гибернации.

На рис. 2 показаны данные, свидетельствующие об уменьшении площади поперечного сечения (ППС) мышечных волокон *m. soleus* и *m. EDL* у сонь-полчков из группы “Гипотермия”. В частности, статистический анализ результатов показал достоверное уменьшение (в 1.25 раза, $p < 0.05$) ППС в *m. soleus*, а также тенденцию

Таблица 1. Отношение массы сердца к массе тела животных

Группа	Масса тела животного, г	Масса сердца, мг	Отношение массы сердца к массе тела, мг/г
Летняя активность, $n = 4$	122.5 ± 3.2	471.5 ± 32.0	3.80 ± 0.18
Гипотермия, $n = 4$	111.0 ± 12.5	$585.3 \pm 55.2^*$	5.37 ± 1.03

* $p \leq 0.05$.

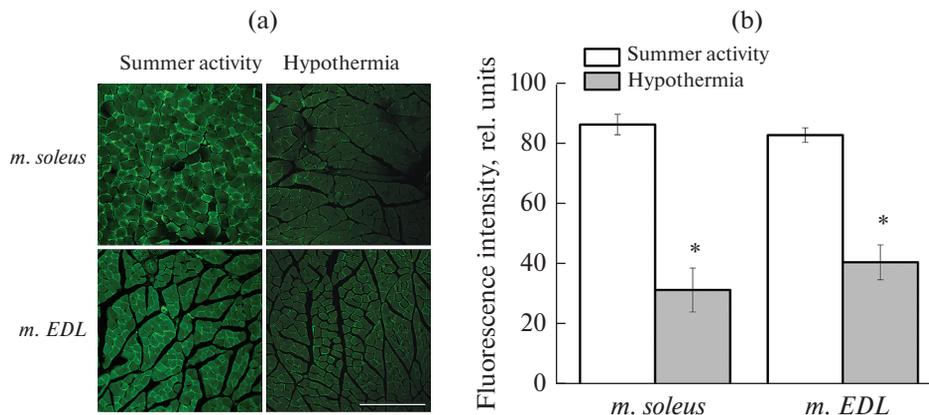


Рис. 3. Интенсивность флуоресценции на поперечных срезах мышц, окрашенных антителами к дистрофину.

(a) – поперечные срезы *m. soleus* и *m. EDL*, окрашенные антителами к дистрофину, сонь-полчков из групп “Летняя активность” и “Гипотермия” (масштабный отрезок 250 мкм). (b) – средние значения интенсивности флуоресценции после окраски поперечных серийных срезов антителами к дистрофину. Анализировали по 3 произвольно выбранных области размером 1024×1024 пикселей на одном срезе и по 3–4 среза для каждого животного. Интенсивность свечения оценивали относительно базового уровня. Количество измерений для каждой мышцы составляло не менее 48. * $p \leq 0.05$ в сравнении с группой “Летняя активность”.

к уменьшению (в 1.13 раза, $p > 0.05$) ППС в *m. EDL* животных группы “Гипотермия”. Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о развитии атрофических изменений в *m. soleus* и *m. EDL* у сонь-полчков в период гибернации.

Уменьшение содержания дистрофина в скелетных мышцах сонь-полчка при гибернации

На рис. 3 показаны данные, свидетельствующие об уменьшении интенсивности флуоресценции на поперечных срезах *m. soleus* и *m. EDL*, окрашенных первичными антителами к дистрофину и вторичными антителами, конъюгированными с флуорохромом Alexa488, у животных группы “Гипотермия”. В частности, среднее значение флуоресценции для *m. soleus* животных группы “Летняя активность” составило 86.8 ± 27.5 отн. ед., для *m. soleus* животных группы “Гипотермия” – 31.8 ± 7.3 отн. ед. ($p < 0.05$) (рис. 3). Для *m. EDL* эти значения составили 83.3 ± 2.4 и 41.0 ± 5.8 отн. ед. ($p < 0.05$) соответственно. Полученные результаты свидетельствуют об уменьшении содержания дистрофина в *m. soleus* и *m. EDL* сонь-полчка при гибернации.

Содержание титина и небулина в поперечнополосатых мышцах сонь-полчка при гибернации

Статистически значимых различий в содержании изоформ интактного T1 (NT, N2A, N2BA, N2B), а также в содержании протеолитических T2-фрагментов титина в миокарде и *m. soleus* животных двух экспериментальных групп обнаружено не было (рис. 4). Также не обнаружено различий в содержании небулина в скелетных мышцах (*m. soleus*, *m. gastrocnemius*) сонь-полчков из двух исследуемых групп (рис. 4).

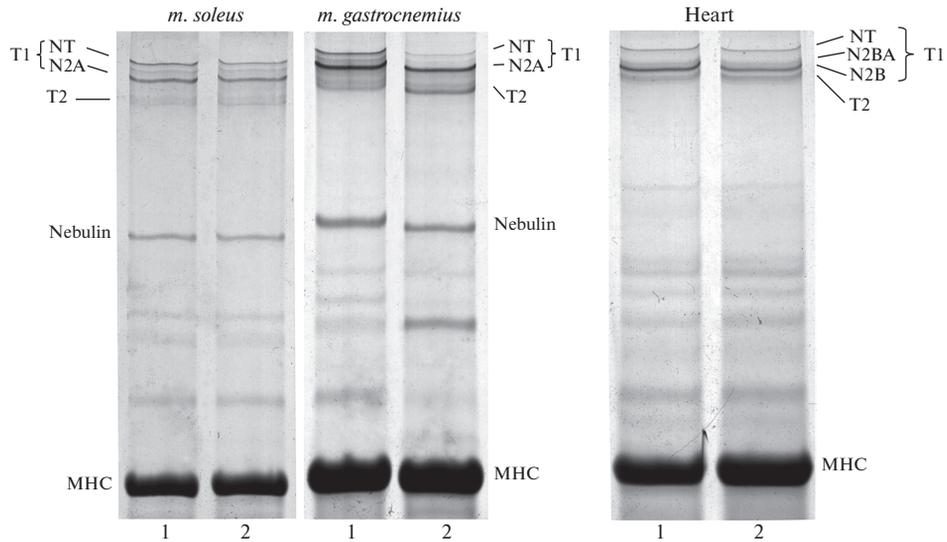


Рис. 4. Содержание титина и небулина в поперечнополосатых мышцах сони-полчка.

1 – “Летняя активность”, 2 – “Гипотермия”. Указаны полосы NT, N2A, N2BA и N2B изоформа интактного титина-1 (T1), протеолитических T2-фрагментов, небулина и тяжелых цепей миозина (MHC). Электрофорез проведен в 2.2%-ном полиакриламидном геле, укрепленном агарозой. Обнаружено уменьшение в 1.17 раза (на ~15%, $p \leq 0.01$) содержания T1 и увеличение в 1.51 раза ($p \leq 0.01$) содержания T2-фрагментов относительно содержания ТЦМ в *m. gastrocnemius* сонь группы “Гипотермия”. В частности, соотношения T1/ТЦМ и T2/ТЦМ составили: 0.187 ± 0.007 и 0.078 ± 0.011 соответственно в группе “Летняя активность”, 0.160 ± 0.012 и 0.118 ± 0.014 соответственно в группе “Гипотермия”. Статистически значимых различий в содержании небулина в икроножной мышце, а также исследуемых белков в *m. soleus* и миокарде сони-полчка двух экспериментальных групп не выявлено (данные не показаны).

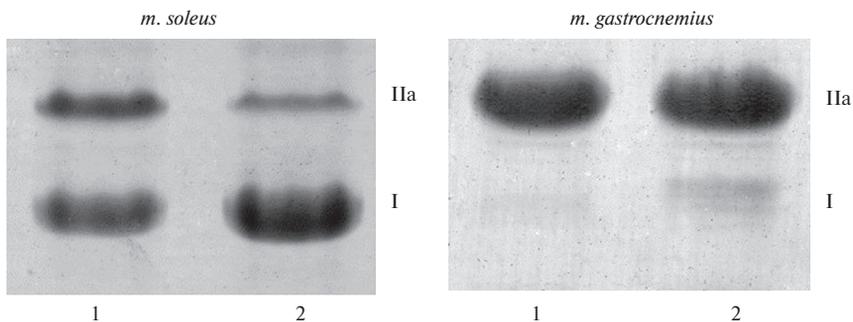


Рис. 5. Изоформный состав ТЦМ в *m. soleus* и *m. gastrocnemius* сони-полчка.

1 – “Летняя активность”, 2 – “Гипотермия”. Указаны полосы I и Pa изоформ ТЦМ. Электрофорез проведен в 7%-ном полиакриламидном геле. Обнаружено достоверное увеличение (с 56.9 до 81.0% и с 6.3 до 12.6%, $p \leq 0.01$) доли “медленной” изоформы I ТЦМ и уменьшение доли “быстрой” Pa изоформы ТЦМ в *m. soleus* и *m. gastrocnemius* соответственно у животных группы “Гипотермия”.

Статистически значимое уменьшение (на ~15%, $p \leq 0.01$) содержания Т1 относительно содержания ТЦМ зарегистрировано в *m. gastrocnemius* животных группы “Гипотермия” (рис. 4). При этом наблюдалось увеличение в 1.51 раза ($p \leq 0.01$) содержания Т2-фрагментов, что свидетельствует о повышенной протеолитической деградации интактных молекул Т1 в этой мышце в период гибернации.

Изменения изоформного состава тяжелых цепей миозина в скелетных мышцах сони-полчка при гибернации

Обнаружено статистически значимое ($p \leq 0.01$) увеличение доли “медленной” изоформы I ТЦМ и уменьшение доли “быстрой” изоформы IIa ТЦМ в двух скелетных мышцах животных группы “Гипотермия” (рис. 5). В частности, содержание изоформы I ТЦМ выросло с 56.9 ± 3.3 до $81.0 \pm 2.4\%$ в *m. soleus* и с 6.3 ± 1.4 до $12.6 \pm 1.1\%$ в *m. gastrocnemius* животных в период гибернации.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Известно, что длительное пребывание гибернанта в состоянии оцепенения в период спячки приводит к атрофии скелетных мышц [10, 13]. Проведенные нами ранее исследования [11–13] показали, что развитие атрофических изменений в скелетных мышцах длиннохвостого суслика сопровождается уменьшением в 1.2–1.3 раза содержания интактного Т1 относительно содержания тяжелых цепей миозина — белка толстых нитей с которым взаимодействуют молекулы титина в А-диске саркомера. Уменьшение (в 1.2–1.25 раза) соотношения Т1/ТЦМ мы наблюдали и в сердечной мышце длиннохвостого суслика в период гипотермии, несмотря на тенденцию к развитию гипертрофии миокарда [13]. Титин — субстрат для кальций-активируемых протеаз кальпаинов [13]. Уменьшение содержания Т1 в период гипотермии, по всей вероятности, является следствием протеолиза титина этими ферментами, для которых миозин не является субстратом. В периоды эутермии (зимней активности между баутами спячки) содержание Т1 в поперечнополосатых мышцах суслика восстанавливалось [12, 13]. При этом нерадиоактивным методом измерения скорости синтеза белка (SUnSET) мы показали, что на фоне снижения синтеза общего белка наблюдается преимущественный синтез гигантских белков саркомерного цитоскелета титина и небулина [13]. Полученные результаты позволили сделать заключение о поддержании константного уровня этих гигантских белков в поперечнополосатых мышцах длиннохвостого суслика в период гибернации. Поддержание стабильного уровня титина и небулина мы также наблюдали в миокарде и скелетных мышцах (*m. longissimus dorsi*, *m. gastrocnemius*, *m. biceps*) бурого (*Ursus arctos*) и гималайского (*Ursus thibetanus ussuricus*) медведей в период зимнего сна [15].

Учитывая вышеуказанные данные, мы предположили, что адаптационная особенность, заключающаяся в поддержании стабильного уровня белков саркомерного цитоскелета, присуща всем гибернантам и может распространяться и на другие цитоскелетные белки. Для проверки этого предположения мы исследовали изменение содержания титина и небулина, а также дистрофина — структурного белка ко-стамера (дистрофин-ассоциированного гликопротеинового комплекса) в поперечнополосатых мышцах сони-полчка в период спячки. Предполагалось обнаружить константное содержание вышеуказанных белков или незначительное уменьшение их содержания в мышцах сони-полчка в период гибернации. Экспериментальные исследования подтвердили не все наши ожидания.

Атрофические изменения в *m. soleus* и *m. EDL* животных в период гибернации сопровождались значительным уменьшением содержания дистрофина (рис. 3). При этом в *m. soleus* не наблюдалось уменьшения содержания небулина и Т1 (рис. 4). Стабильное содержание Т1 наблюдалось и в миокарде сонь-полчков двух исследуемых групп. В икроножной мышце содержание небулина не изменялось при гибернации, однако наблюдалось уменьшение на ~15% содержания Т1 относительно содержания ТЦМ (рис. 4). Увеличенное (в 1.51 раза) содержание Т2-фрагментов титина свидетельствует о повышенной протеолитической деградации интактных молекул Т1 в *m. gastrocnemius* сони-полчка в период гибернации.

Известно, что полноразмерные молекулы Т1, перекрывающие расстояние от М-линии до Z-диска, участвуют в поддержании высокоупорядоченной саркомерной структуры, а также регуляции актин-миозинового взаимодействия. Предполагается, что на одну миозиновую нить в половине А-диска саркомера приходится шесть молекул титина. Обнаруженное нами 15%-ное уменьшение содержания Т1 может соответствовать гипотетическому уменьшению количества интактных молекул титина с 6 до 5 на миозиновую нить. Будут ли подобные изменения приводить к негативным последствиям для мышцы, в частности, сопровождаться нарушениями саркомерной структуры и, вследствие этого, ухудшением сократительной способности мышцы? Можно предположить, что нет, учитывая полученные нами ранее результаты. Аналогичное уменьшение содержания Т1 не приводило к нарушению саркомерной структуры в *m. gastrocnemius* мышцей после 30-суточного космического полета [9], а также в миокарде длиннохвостого суслика в период гибернации [13]. Можно предположить, что обнаруженное нами относительно незначительное уменьшение содержания Т1 в *m. gastrocnemius* сони-полчка во время спячки не будет иметь выраженных негативных последствий.

Значительное уменьшение содержания дистрофина (который, как и титин, является субстратом кальпаинов [20]), напротив, может иметь негативные последствия для мышцы. По последним данным дистрофин и связанные с ним белки дистрофинового гликопротеинового комплекса участвуют не только в формировании примембранного цитоскелета, но и в регуляции активности ионных каналов, а также процессов внутриклеточной сигнализации [21]. Известны результаты исследований о снижении электрогенеза мышечных волокон диафрагмы мышцей *mdx* (экспериментальной модели миодистрофии Дюшенна) [22]. Авторы предположили, что это снижение может быть из-за повреждения сарколеммальной мембраны вследствие дефицита полноразмерных молекул этого белка. Учитывая вышеуказанные данные, можно предположить, что обнаруженное нами уменьшение содержания дистрофина будет сопровождаться снижением электрогенеза и ухудшением сократительной активности мышечных волокон скелетных мышц сони-полчка после выхода из спячки. Однако в случае быстрого восстановления содержания дистрофина в период эутермии, как это наблюдается в случае с титином в мышцах длиннохвостого суслика [13], предполагаемые нарушения в значительной мере могут быть нивелированы.

Таким образом, в поперечнополосатых мышцах сони-полчка, как и у других видов гибернантов (длиннохвостого суслика, бурого и гималайского медведей), в период гибернации наблюдается поддержание стабильного уровня гигантских белков саркомерного цитоскелета титина и небулина. Можно предположить, что в процессе эволюции у зимне спящих животных были выработаны соответствующие молекулярные механизмы, отвечающие как за уменьшение протеолиза вышеуказанных белков при спячке/зимнем сне, так и за преимущественный синтез этих бел-

ков в периоды эутермии. Анализируя полученные данные, можно предположить, что сохранение стабильного уровня белков саркомерного цитоскелета более значимо для поддержания структуры саркомеров и мышечных волокон, а также для функционирования мышцы в целом, чем сохранение других цитоскелетных мышечных белков, например, дистрофина. В поддержку этого предположения можно привести следующие данные. Общеизвестно, что одним из признаков выраженной атрофии мышц является изменение формы мышечных волокон с ортогональной на округлую, что выявляется на поперечных срезах. Подобные морфологические изменения могут быть следствием значительных нарушений структуры атрофированного мышечного волокна. В наших исследованиях на поперечных срезах *m. soleus* и *m. EDL* животных группы “Гипотермия”, несмотря на уменьшение содержания дистрофина, наблюдалось сохранение ортогональной формы мышечных волокон (данные не показаны).

Обсуждая результаты по изменению изоформного состава ТЦМ в мышцах сониполчка, необходимо отметить следующее. В скелетных мышцах млекопитающих синтезируются четыре изоформы тяжелых цепей миозина: Па, Пб, Пх/d и I [23, 24]. Показано, что величина миофибриллярной АТФ-азной активности уменьшается в ряду изоформ ТЦМ следующим образом: Пб > Пх/d > Па > I [23, 24]. Мышечные волокна, содержащие миозин с высокой активностью АТФ-азы, называют “быстрыми” (гликолитическими, окислительно-гликолитическими – изоформы II ТЦМ), а те волокна, которые содержат миозин с более низкой активностью АТФ-азы, – “медленными” (окислительными – изоформа I ТЦМ). Известно, что в скелетных мышцах гибернантов в период зимней спячки наблюдается увеличение доли волокон, экспрессирующих “медленную” изоформу I ТЦМ [10, 25]. Аналогичные изменения изоформного состава ТЦМ были обнаружены и в скелетных мышцах сониполчка в период спячки (рис. 5). Увеличение доли “медленных” мышечных волокон, более выносливых и энергетически более выгодных, чем “быстрые” волокна, по-видимому, также является эволюционно закрепленной адаптационной особенностью у гибернирующих животных, способствующей экономии энергетических ресурсов и выживанию животного в суровых условиях.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена с использованием оборудования ЦКП-САЦ ФИЦ КазНЦ РАН, Регионального Пушкинского центра коллективного пользования “Структурно-функциональные исследования биосистем” Института теоретической и экспериментальной биофизики РАН и Сектора электронной микроскопии ЦКП ПНЦБИ РАН при финансовой поддержке РФФИ (гранты №№ 14-04-92116 ЯФ_a, 17-00-00243 КОМФИ, 20-04-00204).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

Концепция исследования и дизайн – В.И.М., З.Н.М., Г.О.А. Получение экспериментальных данных и обработка материала – П.С.С., Ю.Д.А., Б.Л.Г., С.Н.Н., Т.О.В.; Н.Л.Ф., Г.Г.Р., Н.И.Р. Анализ данных и интерпретация – В.И.М., З.Н.М., Г.О.А., Т.О.В., М.Г.З. Написание текста – В.И.М., Т.О.В., М.Г.З.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Ruf T, Bieber C* (2020) Physiological, behavioral, and life-history adaptations to environmental fluctuations in the edible dormouse. *Front Physiol* 11: 423.
<https://doi.org/10.3389/fphys.2020.00423>
2. *Vogel P* (1997) Hibernation of recently captured *Muscardinus*, *Eliomys* and *Myoxus*: a comparative study. *Nat Croat* 6(2): 217–231.
3. *Wiltz M, Heldmaier G* (2000) Comparison of hibernation, estivation and daily torpor in the edible dormouse, *Glis glis*. *J Compar Physiol B* 170: 511–521.
<https://doi.org/10.1007/s003600000129>
4. *French AR* (1982) Effects of temperature on the duration of arousal episodes during hibernation. *J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol* 52(1): 216–220.
<https://doi.org/10.1152/jappl.1982.52.1.216>
5. *Bieber C, Lebl K, Stalder G, Geiser F, Ruf T* (2014) Body mass dependent use of hibernation: why not prolong the active season, if they can? *Funct Ecol* 28: 167–177.
<https://doi.org/10.1111/1365-2435.12173>
6. *Ануфриев АИ, Охлопков ИМ* (2015) Зимняя спячка трех видов *Sciuridae* в Якутии с температурой тела ниже нуля. *Экология* 2: 125–133. [*Anufriev AI, Okhlopov IM* (2015) Hibernation of three species of the *Sciuridae* family in Yakutia with a body temperature below zero. *Russ J Ecol* 46(2): 167–174. (In Russ)].
<https://doi.org/10.1134/S1067413615010026>
7. *Malatesta M, Perdoni F, Battistelli S, Muller S, Zancanaro C* (2009) The cell nuclei of skeletal muscle cells are transcriptionally active in hibernating edible dormice. *BMC Cell Biology* 10: 19.
<https://doi.org/10.1186/1471-2121-10-19>
8. *Belova SP, Mochalova EP, Kostrominova TY, Shenkman BS, Nemirovskaya TL* (2020) P38 α -MAPK signaling inhibition attenuates soleus atrophy during early stages of muscle unloading. *Int J Mol Sci* 21(8): 2756.
<https://doi.org/10.3390/ijms21082756>
9. *Ulanova A, Gritsyna Y, Vikhlyantsev I, Salmov N, Bobylev A, Abdusalomova Z, Rogachevsky V, Shenkman B, Podlubnaya S* (2015) Isoform composition and gene expression of thick and thin filament proteins in striated muscles of mice after 30-day space flight. *Biomed Res Int Article ID* 104735.
<https://doi.org/10.1155/2015/104735>
10. *Cotton C* (2016) Skeletal muscle mass and composition during mammalian hibernation. *J Exp Biol* 219: 226–234.
<https://doi.org/10.1242/jeb.125401>
11. *Vikhlyantsev IM, Podlubnaya ZA* (2012) New titin (connectin) isoforms and their functional role in striated muscles of mammals: facts and suppositions. *Biochemistry (Moscow)* 77(13): 1515–1535.
<https://doi.org/10.1134/S0006297912130093>
12. *Vikhlyantsev IM, Karaduleva EV, Podlubnaya ZA* (2008) Seasonal changes in the composition of titin isoforms in muscles of hibernating ground squirrels. *Biophysics* 53: 598–603.
<https://doi.org/10.1134/S0006350908060249>
13. *Popova S, Ulanova A, Gritsyna Yu, Salmov N, Rogachevsky V, Mikhailova G, Bobylev A, Bobyleva L, Yuyskevich Ya, Morenkov O, Zakharova N, Vikhlyantsev I* (2020) Predominant synthesis of giant myofibrillar proteins in striated muscles of the long-tailed ground squirrel *Spermophilus undulatus* during interbout arousal. *Sci Rep* 10: 15185.
<https://doi.org/10.1038/s41598-020-72127-y>
14. *Nelson OL, Robbins CT, Wu Y, Granzier H* (2008) Titin isoform switching is a major cardiac adaptive response in hibernating grizzly bears. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 295(1): H366–H371.
<https://doi.org/10.1152/ajpheart.00234.2008>
15. *Salmov NN, Vikhlyantsev IM, Ulanova AD, Gritsyna YV, Bobylev AG, Saveljev AP, Makariushchenko VV, Maksudov GY, Podlubnaya ZA* (2015) Seasonal changes in isoform composition of giant proteins of thick and thin filaments and titin (connectin) phosphorylation level in striated muscles of bears (*Ursidae*, *Mammalia*). *Biochemistry (Moscow)* 80(3): 343–355.
<https://doi.org/10.1134/S0006297915030098>
16. *Lomonosova YN, Kalamkarov GR, Bugrova AE, Shevchenko TF, Kartashkina NL, Lysenko EA, Shenkman BS, Nemirovskaya TL* (2012) Role of NO-synthase in regulation of protein metabolism of stretched rat *m. soleus* muscle during functional unloading. *Biochemistry (Moscow)* 77(2): 208–216.
<https://doi.org/10.1134/S0006297912020137>
17. *Tatsumi R, Hattori A* (1995) Detection of giant myofibrillar proteins connectin and nebulin by electrophoresis in 2% polyacrylamide slab gels strengthened with agarose. *Anal Biochem*

- 224(1): 28–31.
<https://doi.org/10.1006/abio.1995.1004>
18. *Vikhlyantsev IM, Podlubnaya ZA* (2017) Nuances of electrophoresis study of titin/connectin. *Biophys Rev* 9(3): 189–199.
<https://doi.org/10.1007/s12551-017-0266-6>
 19. *Tikunov BA, Sweeney HL, Rome LC* (2001) Quantitative electrophoretic analysis of myosin heavy chains in single muscle fibers. *J Appl Physiol* 90(5): 1927–1935.
<https://doi.org/10.1152/jappl.2001.90.5.1927>
 20. *Cottin P, Poussard S, Mornet D, Brustis J, Mohammadpour M, Leger J, Ducastaing A* (1992) *In vitro* digestion of dystrophin by calcium-dependent proteases, calpains I and II. *Biochimie* 74(6): 565–570.
[https://doi.org/10.1016/0300-9084\(92\)90156-9](https://doi.org/10.1016/0300-9084(92)90156-9)
 21. *Dowling P, Gargan S, Murphy S, Zweyer M, Sabir H, Swandulla D, Ohlendieck K* (2021) The Dystrophin Node as Integrator of Cytoskeletal Organization, Lateral Force Transmission, Fiber Stability and Cellular Signaling in Skeletal Muscle. *Proteomes* 9(1): 9.
<https://doi.org/10.3390/proteomes9010009>
 22. *Kravtsova VV, Shenkman BS, Mikhailov VM Nikol'skii EE, Krivoi II* (2010) Effect of functional unloading and the deficit of dystrophin on the local hyperpolarization of the postsynaptic membrane of a skeletal muscle fiber. *Biophysics* 55: 740–744.
<https://doi.org/10.1134/S000635091005009X>
 23. *Bottinelli R, Canepari M, Reggiani C, Stienen GJ* (1994) Myofibrillar ATPase activity during isometric contraction and isomyosin composition in rat single skinned muscle fibres. *J Physiol* 481(3): 663–675.
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.1994.sp020472>
 24. *Sieck GC, Zhan WZ, Prakash YS, Daood MJ, Watchko JF* (1995) SDH and actomyosin ATPase activities of different fiber types in rat diaphragm muscle. *J Appl Physiol* 79(5): 1629–1639.
<https://doi.org/10.1152/jappl.1995.79.5.1629>
 25. *Lazareva MV, Trapeznikova KO, Vikhlyantsev IM, Bobylev AG, Klimov AA, Podlubnaya ZA* (2012) Seasonal changes in the isoform composition of the myosin heavy chains in skeletal muscles of hibernating ground squirrels *Spermophilus undulatus*. *Biophysics* 57(6): 764–768.
<https://doi.org/10.1134/S0006350912060085>

Stable Level of Giant Proteins of Sarcomeric Cytoskeleton in Striated Muscles of Edible Dormouse *Glis glis* during Hibernation

S. S. Popova^a, D. A. Yurshenas^a, G. Z. Mikhailova^a, L. G. Bobyleva^a, N. N. Salmov^a,
 O. V. Tyapkina^{b, c}, L. F. Nurullin^{b, c}, G. R. Gazizova^d, I. R. Nigmatzyanov^d,
 O. A. Gusev^d, N. M. Zakharova^e, and I. M. Vikhlyantsev^{a, *}

^a*Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Russia*

^b*Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics, FRC Kazan Scientific Center, Russian Academy of Sciences, Kazan, Russia*

^c*Kazan State Medical University, Kazan, Russia*

^d*Kazan Federal University, Institute of Fundamental Medicine and Biology, Kazan, Russia*

^e*Institute of Cell Biophysics, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Russia*

*e-mail: ivanvikhlyantsev@gmail.com

The changes in the content of giant proteins of the sarcomeric cytoskeleton titin (3000–3700 kDa) and nebulin (770 kDa) in skeletal muscles (*m. soleus*, *m. gastrocnemius*), titin in the myocardium (left ventricle), as well as membrane cytoskeletal protein dystrophin (427 kDa) in *m. soleus* and *m. extensor digitorum longus* of edible dormouse *Glis glis* during hibernation have been studied. The animals were of two experimental groups: “Summer activity” and “Hypothermia”. It was found that the development of atrophic changes in the skeletal muscles of the animal during hibernation is accompanied by a decrease in the content of dystrophin. In particular, the intensity of fluorescence on cross-sections of skeletal muscles stained with primary antibodies to dystrophin and secondary antibodies conjugated to the Alexa488 fluorochrome decreased 2.7 times ($p < 0.05$) and 2.0 times ($p < 0.05$) in *m. soleus* and *m. EDL*, respectively, in animals of the “Hypother-

mia” group. SDS electrophoresis of proteins in agarose-strengthened macroporous 2.2%-polyacrylamide gel revealed a slight decrease (by 15%, $p \leq 0.01$) in the titin content in relation to the content of myosin heavy chains in *m. gastrocnemius* of animals of the “Hypothermia” group. Titin content in *m. soleus* and cardiac muscle, as well as the nebulin content in the studied skeletal muscles did not decrease during hibernation. These results are consistent with our earlier data for other hibernates: long-tailed ground squirrel, brown and Himalayan black bears. It can be assumed that in the process of evolution in hibernating animals, molecular mechanisms were developed that are responsible for maintaining a stable level of giant proteins of the sarcomeric cytoskeleton during hibernation.

Keywords: hibernation, *m. soleus*, *m. extensor digitorum longus*, *m. gastrocnemius*, titin, nebulin, myosin, dystrophin, edible dormouse *Glis glis*

ОГРАНИЧЕНИЕ ДВИГАТЕЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ И СИНТЕЗ БЕЛКА В ПОСТУРАЛЬНЫХ И ЛОКОМОТОРНЫХ МЫШЦАХ

© 2021 г. С. П. Белова¹,*, С. А. Тыганов¹, Е. П. Мочалова¹, Б. С. Шенкман¹

¹Институт медико-биологических проблем РАН, Москва, Россия

*E-mail: Swetbell@mail.ru

Поступила в редакцию 05.02.2021 г.

После доработки 12.02.2021 г.

Принята к публикации 12.02.2021 г.

В связи с урбанизацией, автоматизацией и механизацией труда, тяжелой эпидемиологической обстановкой и самоизоляцией у современного человека снижается уровень ежедневной физической активности. Цель исследования состояла в изучении влияния ограничения двигательной активности на процессы синтеза белка в постуральных и локомоторных мышцах. Проведен эксперимент с ограничением двигательной активности продолжительностью 21 день на крысах линии Вистар. Интенсивность синтеза белка и анаболические сигнальные пути исследовались на камбаловидной мышце (*m. soleus*), преимущественно состоящей из медленных волокон, и длинном разгибателе пальцев (*m. EDL*), преимущественно состоящим из быстрых волокон. Масса *m. soleus* и *m. EDL* была снижена, а достоверное снижение интенсивности синтеза белка наблюдалось только в *m. EDL*. Также наблюдалось снижение фосфорилирования S6 рибосомального белка только в быстрой мышце. При этом в *m. soleus* наблюдалось достоверное снижение фосфорилирования GSK3 β в отличие от *m. EDL*. Кроме того, были изучены маркеры распада белка. В эксперименте наблюдалось снижение экспрессии MuRF-1 в *m. soleus* и Atrogin-1/MAFbx в *m. EDL*, а также рост экспрессии кальпаинов в *m. soleus*. Таким образом, атрофические процессы при ограничении активности в быстрой и медленной мышце определяются разными сигнальными механизмами.

Ключевые слова: камбаловидная мышца, длинный разгибатель пальцев, ограничение двигательной активности, синтез белка, eEF2, p70S6k

DOI: 10.31857/S0869813921060029

Скелетные мышцы образованы “медленными” (I тип) и “быстрыми” (II тип) волокнами, которые располагаются мозаичным образом и различаются функциональными свойствами [1]. Мышцы с преобладанием медленных волокон активны при работе низкой интенсивности и большой продолжительности, например, при поддержании позы (постуральные мышцы). Быстрые мышцы участвуют в действиях высокой интенсивности и короткой продолжительности (локомоторные мышцы). Недостаток нагрузки на скелетные мышцы при космическом полете или вывешивании (модель функциональной разгрузки постуральных мышц) оказывает значительное влияние на механические, биохимические и морфологические свойства мышц. Длительная разгрузка вызывает атрофию всех типов волокон, в большей степени медленных волокон I типа, сдвиг миозинового фенотипа в сторону быстрых волокон, усиление протеолиза и снижение синтеза белка. Эти эффекты при разгрузке хорошо выражены в медленных мышцах.

Для изучения функциональной разгрузки скелетных мышц существуют также подходы, при которых изучается не полная механическая разгрузка тех или иных групп мышц, а частичное снижение мышечной активности. Так, проводились эксперименты, в которых испытуемые снижают количество ежедневной ходьбы (при этом каждый шаг измеряется с помощью шагомера) до минимальных значений (750–5000 шагов) [2, 3]. Нижний порог количества шагов (~750) примерно соответствует активности амбулаторных больных [4]. Снижение физической активности до таких низких значений не приводит к полной мышечной разгрузке, однако имеет серьезные физиологические последствия [3]. Ограничение подвижности на 91% (с 13054 до 1192 шагов в день) снижает синтез белка в волокнах скелетных мышц на 22% [5]. Физиологические последствия даже коротких периодов снижения активности с помощью модели SR приводят к снижению силы и массы скелетных мышц, а также к снижению инсулиновой чувствительности. Снижение количества шагов до <1500 в день в течение двух недель приводит к снижению максимального потребления кислорода [2], существенному снижению максимальной произвольной силы нижних конечностей [6, 7].

В работе Козловской и соавт. было показано, что макаки-резусы в условиях космического полета при нахождении в капсуле демонстрируют значительное снижение размеров волокон локомоторной мышцы *m. vastus lateralis*, которое также наблюдалось и при нахождении животных в этой капсуле на земле, в то время как размеры волокон медленной *m. soleus* снижались только при полете [8, 9]. Из этого следует, что данный эффект связан не только с невесомостью, но и с ограничением двигательной активности в космической капсуле. При ограничении двигательной активности сохраняется необходимость в поддержании позы, следовательно, медленные мышцы не инактивируются полностью, в то время как работа быстрых мышц минимальна. Проведенные ранее эксперименты показывают, что ограничение двигательной активности безусловно оказывает большое влияние на состояние скелетной мышцы. Однако в литературе отсутствуют данные о молекулярных механизмах, контролирурующих эти изменения. В связи с этим, цель данного исследования заключалась в исследовании особенностей анаболического и катаболического сигналинга постуральных и локомоторных мышц в ответ на ограничение двигательной активности.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Животные и ограничение двигательной активности. Был проведен эксперимент с моделированием ограниченной двигательной активности [10] продолжительностью 21 день на крысах линии Вистар. Для выполнения эксперимента 16 крыс в возрасте 10 нед. и массой 200–220 г были распределены на 2 группы по 8 животных в каждой. Контрольная группа (С) содержалась в индивидуальных клетках (30.0 × 40.0 см, 34 см высотой) в течение 21 сут; группа крыс, двигательная активность которой была ограничена (R), содержалась в маленьких клетках (17.0 × 9.6 см и 13.0 см в высоту) также 21 сут. Величина перемещений животных с ограничением двигательной активности, согласно данным Ishihara, составляет 0.5% от дистанции перемещений крыс, содержащихся в больших клетках [10]. Все животные имели неограниченный доступ к еде и воде на всем протяжении эксперимента. По окончании эксперимента крысы анестезировались внутрибрюшинной инъекцией трибромэтанола (240 мг/кг), затем выделялась камбаловидная мышца (*m. soleus*) и длинный разгибатель пальцев (*m. EDL*). Животных забивали введением летальной дозы трибромэтанола (480 мг/кг). Все процедуры с животными одобрены Комиссией по биомедицинской этике Института медико-биологических проблем РАН (протокол № 508 от 7 мая 2019 г.).

Интенсивность синтеза белка. Для определения общего синтеза белка применялась методика SUnSET [11]. За полчаса до введения наркоза животным вводили внутривенно 500 мкл 0.8%-ного раствора пуромицина, который ингибирует рост полипептидной цепи на рибосоме. При этом содержание пуромицина в скелетной мышце коррелирует с интенсивностью синтеза белка. Включение пуромициновой метки оценивалось с помощью вестерн-блоттинга.

Содержание анаболических маркеров методом вестерн-блоттинга. С каждого образца *m. soleus* и *m. EDL* были сделаны срезы толщиной 20 мкм (10–15 мг) на микротоме и немедленно прогомогенизированы в течение 25 мин в 100 мкл лизирующего буфера RIPA, содержащего (в мМ) 50 Tris (pH 7.4), 150 NaCl, 0.1% Triton X-100, 0.1% SDS, 5 EDTA (pH 8.0) 1 DTT, 1 PMSF, 1 Na₃VO₄, 1 PMSF, апротинин (10 мкг/мл), леупептин (10 мкг/мл), пепстатин А (10 мкг/мл), протеазный ингибиторный коктейль и фосфатазный ингибиторный коктейль. Затем образцы центрифугировали при 12000 g в течение 15 мин. После этого отбирали супернатант и определяли концентрацию белка на планшетном спектрофотометре Epoch (Bio-Tek Instruments, США), измеряя поглощение при длине волны 595 нм.

Для проведения электрофореза с последующим вестерн-блоттингом мышечные лизаты разводили в 2-кратном Laemly буфере для образцов, содержащем 5.4 мМ Tris-HCl (pH 6.8), 4% Ds-Na, 20% глицерина, 10% β-меркаптоэтанола, 0.02% бромфенолового синего. Электрофорез проводили в 5%-ном концентрирующем ПААГ (0.2% метилбисакриламида, 0.1% Ds-Na, 125 мМ Tris-HCl (pH 6.8), 0.05% аммония персульфата, 0.1% TEMED) и в 10%-ном разделяющем полиакриламидном геле (ПААГ) (0.2% метилбисакриламида, 0.1% Ds-Na, 375 мМ Tris-HCl (pH 8.8), 0.05% персульфата аммония, 0.1% TEMED). Для проведения электрофореза использовали трис-глициновый буфер (192 мМ Tris-глицина (pH 8.6), 0.1% Ds-Na). Образцы загружали из расчета 20 мкг общего белка в каждой пробе на дорожку и нормировали относительно уровня Gapdh, содержащегося в той же пробе.

Электрофорез проводили при 15 мА на гель в мини-системе (Bio-Rad Laboratories) при комнатной температуре. Электроперенос белков проводился в буфере (25 мМ Tris (pH 8.3), 192 мМ глицина, 20% этанола, 0.04% Ds-Na) на нитроцеллюлозную мембрану при 100 V и температуре 4°C в течение 2 ч. После электропереноса мембраны инкубировали в течение 5 мин в 0.3%-ном растворе Ponceau Red в 5%-ной уксусной кислоте, затем отмывали в PBS (Биолот) с 0.1%-ным Tween 20 (PBST) до появления четких белковых полос на мембране. Этот этап проводился для контроля эффективности переноса. Мембраны блокировали в 5%-ном растворе сухого молока в PBST при комнатной температуре в течение 1 ч, затем помещали в раствор первичных антител на ночь при 4°C. Для выявления белковых полос использовали первичные антитела против p-Akt(Ser473) (1 : 1000), Akt (1 : 1000), p-GSK-3β (Ser9) (1 : 1000), GSK-3β (1 : 2000), p-eEF2(Thr56) (1 : 1000), eEF2 (1 : 2000), S6-белку (1 : 2000), pS6(Ser240/ Ser244) (1 : 1000) фирмы Cell Signaling (США), p-p70S6K(Thr389) (1 : 1000), p70S6K (1 : 1000) фирмы Santa Cruz Biotechnology (США) и пуромицина фирмы MERCK (США). Затем мембрану отмывали от первичных антител в PBST 3 раза по 5 мин на шейкере и инкубировали 1 ч с вторичными антителами goat-anti-rabbit (1 : 30000; Jackson Immuno Research, США) и goat-anti-mouse (1 : 20000; Bio-Rad Laboratories, США). Далее мембрану отмывали от вторичных антител в PBST 3 раза по 5 мин на шейкере. Выявление проводили с помощью ECL Clarity HRP substrate (Bio-Rad Laboratories, США), хемилюминесцентный сигнал детектировали с помощью сканера C-DiGit Blot Scanner (LI-COR, США). Белковые полосы анализировали с использованием Image Studio Software (LI-COR).

Анализ экспрессии генов. Тотальную РНК выделяли из 6 мг *m. soleus* и *m. EDL* при помощи RNeasy Micro Kit фирмы QIAGEN. Для обратной транскрипции использовали 1 мкг РНК, олиго(dT)15, гексануклеотиды d(N)6, обратную транскриптазу

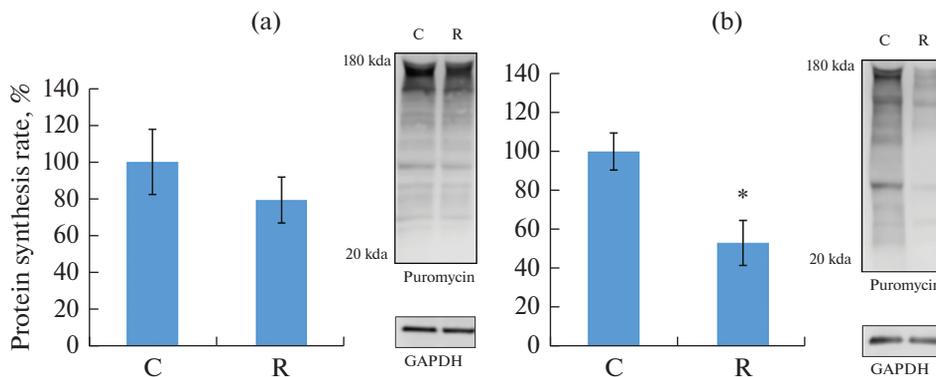


Рис. 1. Интенсивность синтеза белка в *m. soleus* (a) и *m. EDL* (b) при ограничении двигательной активности.

* – достоверное отличие от контроля ($p < 0.05$).

MMLV. Обратную транскрипцию проводили при 37°C в течение 60 мин согласно стандартному протоколу. ПЦР в реальном времени проводили с использованием интеркалирующего красителя SYBR Green I. Использовали следующие праймеры: 5'-gccaatgttgctctttgt-3' и 5'-aaattcagtcctctcccgt-3' для MuRF-1, 5'-ctacgatgttcagccaa-ga-3' и 5'-ggcagtcgagaagtccagtc-3' для Atrogin-1/MAFbx, 5'-catggctaagagcaggaag-3' и 5'-cgaagtctgcaggtctaggg-3' для кальпаина-1.

Статистическая обработка. Достоверность отличий между группами определялась с помощью непараметрического критерия Манна–Уитни. Результаты анализа относительного содержания белков с помощью вестерн-блоттинга представлены в виде среднего значения и ошибки среднего. Рядом с гистограммами содержания белков представлены фрагменты анализируемых изображений, полученных с помощью блот-сканера.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Масса мышц и животных. Масса животных достоверно не различалась между группами (табл. 1). При этом масса *m. soleus* и *m. EDL* достоверно снизилась в группе с ограничением двигательной активности.

Интенсивность синтеза белка. В группе ограничения двигательной активности интенсивность синтеза белка была достоверно снижена на 47% в *m. EDL*, в то время как в медленной *m. soleus* снижение не было статистически значимым (рис. 1).

Маркеры активности анаболических сигнальных путей. Уровень фосфорилирования маркера активности mTORC1 – рибосомальной киназы p70 (p70S6k) – в группе с ограничением двигательной активности достоверно не отличался от контроля ни в *m. soleus*, ни в *m. EDL* (рис. 2), фосфорилирование Akt (Ser473) также не изменя-

Таблица 1. Масса тела животных и масса мышц

Группа	Масса животных	Масса <i>m. soleus</i> , мг	Масса <i>m. EDL</i> , мг
C	291.5 ± 9.3	133.7 ± 3.9	136.1 ± 3.8
R	278.1 ± 5.9	120.5 ± 3.5*	128.1 ± 2.8*

Данные представлены в виде среднего и стандартной ошибки среднего, * – достоверное отличие от контроля ($p < 0.05$).

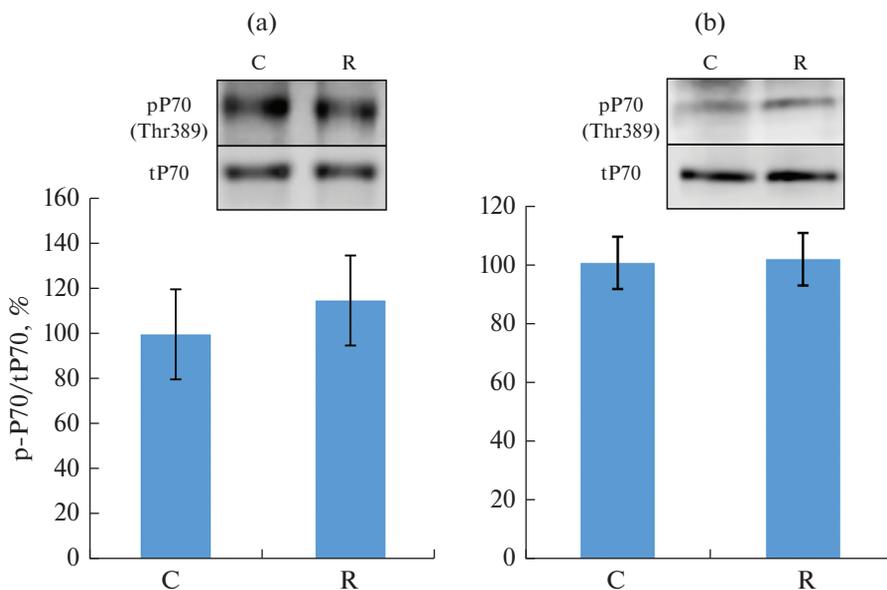


Рис. 2. Уровень фосфорилирования P70 в *m. soleus* (a) и *m. EDL* (b) при ограничении двигательной активности в течение 21 сут.

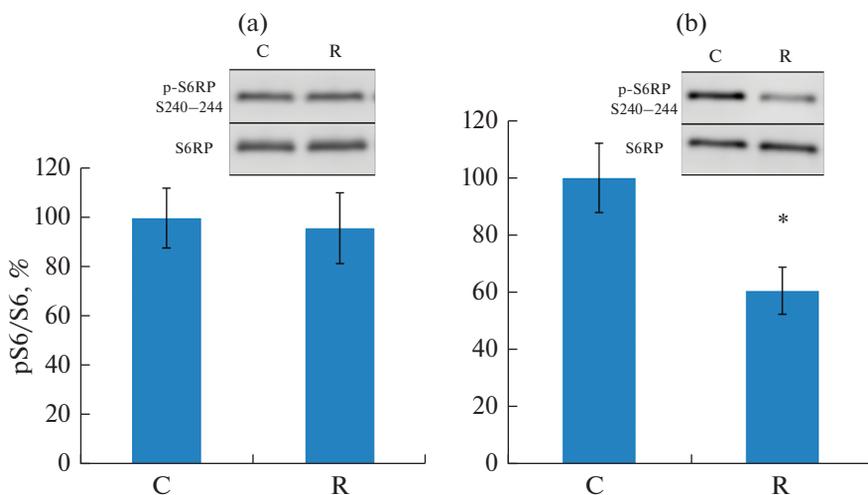


Рис. 3. Уровень фосфорилирования грS6 в *m. soleus* (a) и *m. EDL* (b) при ограничении двигательной активности в течение 21 сут.

* – достоверное отличие от контроля, $p \leq 0.05$.

лось. При этом фосфорилирование по Ser240/244 рибосомального белка S6 (грS6), являющегося субстратом р70S6k, в группе ограничения активности было достоверно снижено только в *m. EDL* (рис. 3).

Несмотря на отсутствие изменений в уровне фосфорилирования Акт, фосфорилирование киназы гликогенсинтазы GSK3 β снижалось при ограничении двига-

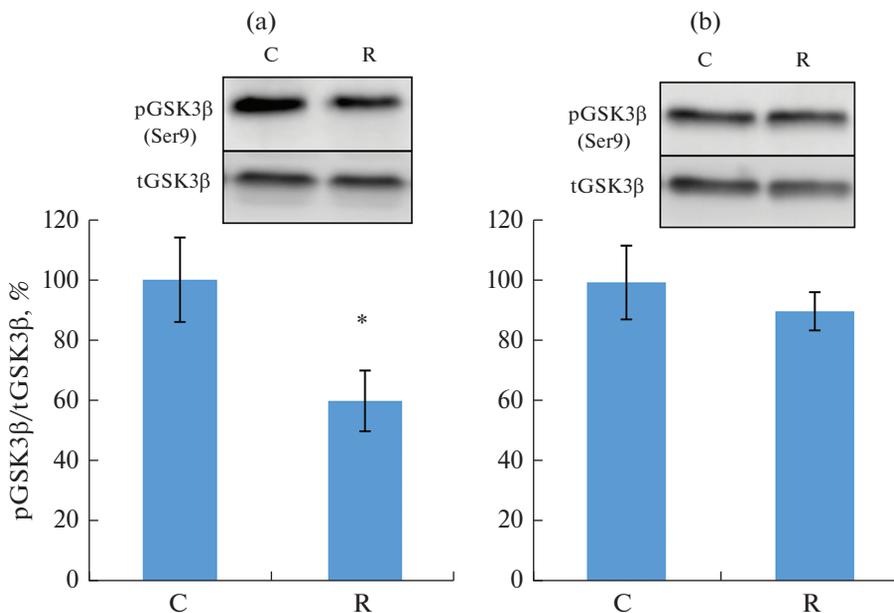


Рис. 4. Уровень фосфорилирования GSK3β в *m. soleus* (a) и *m. EDL* (b) при ограничении двигательной активности в течение 21 сут.

* – достоверное отличие от контроля, $p \leq 0.05$.

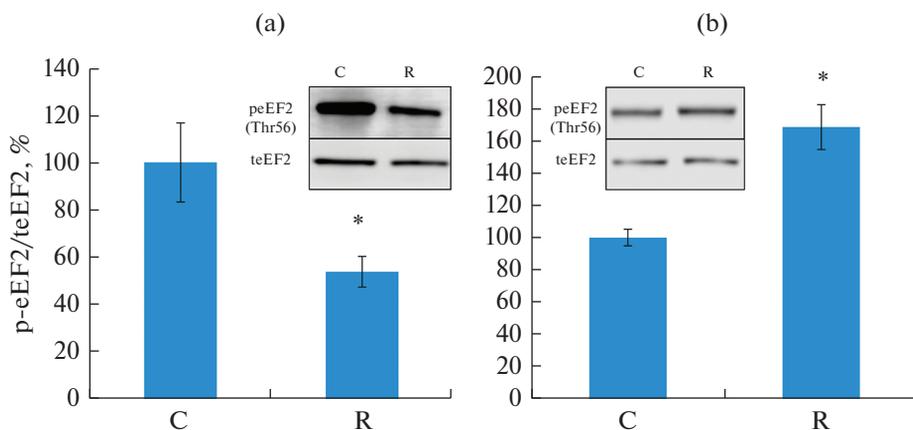


Рис. 5. Уровень фосфорилирования eEF2 в *m. soleus* (a) и *m. EDL* (b) при ограничении двигательной активности в течение 21 сут.

* – достоверное отличие от контроля, $p \leq 0.05$.

тельной активности, причем только в медленной *m. soleus* (рис. 4). Содержание фосфорилированной eEF2 увеличивалось в *m. EDL*, однако в медленной *m. soleus* наблюдалось снижение фосфорилирования eEF2 (рис. 5).

Маркеры катаболических сигнальных путей. Мышечноспецифические E3-убиквитинлигазы MuRF-1 и Atrogin-1/MAFbx являются ключевыми компонентами

Таблица 2. Экспрессия маркеров катаболических сигнальных путей

МАРКЕРЫ	<i>m. soleus</i>		<i>m. EDL</i>	
	C	R	C	R
MuRF-1	100 (90.5–132.1)	83.8 (74.8–85.1)*	100 (88.8–110.8)	91.8 (87.3–98.7)
Atrogin-1/MAFbx	100 (89.3–120.0)	118 (108.1–134.1)	100 (93.7–102.6)	71.1 (64.1–80.6)*
Calpain-1	100 (97.1–108.7)	118.9 (113.5–122.3)*	100 (93.5–111.8)	105.6 (99.4–110.3)

Данные в процентах относительно контроля представлены в виде медианы и интерквартильных разбросов, * – достоверное отличие от контроля ($p < 0.05$).

убиквитин-протеасомной системы, экспрессия которых увеличивается в *m. soleus* уже на первые сутки функциональной разгрузки [12]. В нашем исследовании увеличения экспрессии MuRF-1 и Atrogin-1/MAFbx не наблюдалось, причем MuRF-1 в *m. soleus* и Atrogin-1/MAFbx в *m. EDL* были даже снижены относительно контрольных значений (табл. 2). При этом экспрессия цистеиновой протеазы кальпаина-1 увеличивалась только в *m. soleus* (табл. 2).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Развитие атрофии – сложный многостадийный процесс, на каждом этапе которого одна сигнальная система сменяется или дополняется другой. Целью данного исследования было изучение особенностей анаболического и катаболического сигналинга постуральных и локомоторных мышц в ответ на ограничение двигательной активности.

Различные виды механической разгрузки приводят к различному снижению массы скелетных мышц, в зависимости от снижения нагрузки. Так, в экспериментах с антиортостатическим вывешиванием грызунов снижение массы камбаловидной мышцы на 10–15% наблюдается уже на 3-е сут разгрузки [13]. К 7-м суткам вывешивания снижение массы камбаловидной мышцы уже достигает 32% [14]. После 16-суточного вывешивания абсолютная масса камбаловидной мышцы снижалась на 50 и 65%, а размер волокон на 66% [15]. При использовании гипсовой иммобилизации в течение 7 дней на грызунах также наблюдалось снижение массы камбаловидной мышцы на 34% [16]. В нашем эксперименте использовался метод снижения активности голени животных, при этом не исключалась постуральная, поддерживающая масса тела функция. У крыс, содержащихся в маленьких клетках в течение 21 сут, наблюдалось снижение массы как медленной *m. soleus*, так и быстрой *m. EDL* на 10 и 6% соответственно. Аналогичным образом изменялась масса *m. soleus* после ограничения двигательной активности в работах А. Takemura и соавт. и Е. Marmonti и соавт. [10, 17], масса локомоторной *m. plantaris* снижалась достоверно по данным работы. [10], снижение в *m. EDL* было незначительным в работе [17].

Потеря массы скелетных мышц после снижения активности задних конечностей объясняется увеличением протеолиза и снижением скорости синтеза мышечного белка [18, 19]. После 3-, 4- и 28-суточного антиортостатического вывешивания наблюдалось снижение синтеза белка, измеренного с помощью радиоактивного метода [20–22]. Кроме того, с помощью *in vivo* методики SUnSET, было показано достоверное снижение уровня синтеза белка после 7-ми суточного вывешивания мышцей [23]. В работах нашей лаборатории с помощью SUnSET-методики мы наблюдали достоверное снижение синтеза белка уже к 3-м сут вывешивания крыс, и это снижение прогрессировало к 7-м сут [14, 24]. Интересно, что большую часть всех белковых потерь составляет миофибрилярный белок [25]. После 4-недельного вывешивания миофибрилярный белок в *m. soleus* снижался на 50%, в то время как

в *m. plantaris* (быстрая мышца) снижения не происходило. А после 7-ми дней вывешивания снижение содержания миофибрилярного белка в *m. EDL* было значительно ниже по сравнению с *m. soleus* [26]. Ограничение двигательной активности снижает нагрузку на локомоторные мышцы, тогда как постуральные остаются нагруженными, в связи с чем в данной работе наблюдалось закономерное падение синтеза белка в *m. EDL* при отсутствии значимого снижения в постуральной *m. soleus* (рис. 1). Данных по синтезу белка в условиях разгрузки локомоторных мышц очень мало. В работе Ferrando и др. [27] скорость синтеза белка снижалась в *m. vastus lateralis* человека после 15-ти дней антиортостатической гипокинезии.

Одним из основных сигнальных путей, регулирующих синтез белка в скелетной мышце, является Akt/mTOR/p70S6k. Работа этого сигнального пути хорошо изучена в *m. soleus* при функциональной разгрузке, вызванной вывешиванием или космическим полетом, однако совсем не изучена при ограничении двигательной активности. Отсутствие изменений в уровне фосфорилирования Akt и p70S6k согласуется с имеющимися в литературе данными. Так, в работе Kobayashi и соавт. [28] показано, что содержание крыс в маленьких клетках в течение 28 дней не отражается на фосфорилировании Akt, mTOR и p70S6K в *m. tibialis anterior*. У человека после 24-х дней антиортостатической гипокинезии фосфорилирование Akt и p70S6K также не изменяется [29]. Несмотря на отсутствие изменений фосфорилирования Akt, фосфорилирование GSK3 β после 21-го дня ограничения двигательной активности было снижено (рис. 4), что сопровождалось снижением мышечной массы. В литературе нет данных по изменению GSK3 β в условиях ограничения двигательной активности, однако снижение массы *m. soleus* при функциональной разгрузке часто сопровождается снижением фосфорилирования GSK3 β [12, 30, 31]. Наряду с Akt, активность GSK3 β может регулироваться протеинкиназами A и C, а также P90RSK [32]. Кроме того, на уровень фосфорилирования GSK3 β может оказывать влияние содержание оксида азота в волокне через цГМФ-зависимые протеинкиназы [33]. В *m. soleus* при функциональной разгрузке снижается уровень фосфорилирования P90RSK [34], с этим может быть связано снижение фосфорилирования GSK3 β при ограничении двигательной активности в нашем эксперименте. Данный сигнальный путь, по-видимому, не задействован в *m. EDL*.

В последнее время увеличивается количество работ, посвященных изучению регуляции элонгации трансляции в скелетных мышцах, скорость которой существенно падает при функциональной разгрузке мышц [35–37]. eEF2 (Eukaryotic elongation factor 2) фосфорилируется eEF2-киназой (eEF2k), что приводит к снижению скорости элонгации трансляции [38]. Было показано, что при снижении активности скелетной мышцы происходит быстрое увеличение фосфорилирования eEF2 [36], это может быть причиной снижения белкового синтеза. Мы проанализировали содержание фосфорилированного eEF2 и обнаружили увеличение фосфорилирования eEF2 в *m. EDL*, что действительно соотносится со снижением белкового синтеза, в то время как фосфорилирование eEF2 в медленной *m. soleus* снижалось при отсутствии значимых изменений в белковом синтезе.

Известно, что p70S6K фосфорилирует белки S6, а также ингибирует eEF2k [39]. В нашем эксперименте мы наблюдали снижение фосфорилирования белка S6 и увеличение фосфорилирования eEF2 в *m. EDL* (рис. 2), однако фосфорилирование p70S6K не отличалось от контроля. При функциональной разгрузке *m. soleus*, вызванной вывешиванием, наблюдается сложная динамика фосфорилирования p70S6K [14], в связи с чем возникает предположение, что наблюдаемые изменения могут быть результатом деятельности p70S6K на более ранних этапах ограничения двигательной активности.

Мышечная атрофия является результатом снижения синтеза белка и усиления протеолиза. В нашем эксперименте мы не наблюдаем роста экспрессии ключевых

Е3-убиквитинлигаз MuRF-1 и Atrogin-1/MAFbx. Эти данные согласуются с работой Вросса и соавт. [29]. Кроме того, некоторые авторы указывают на активацию аутофагии при антиорто статической гипокинезии [29, 40], что также может происходить и при ограничении двигательной активности. Атрофические процессы в *m. soleus* при разгрузке сопровождаются увеличением экспрессии кальпаина-1 [34, 41]. Фосфорилирование десмина с помощью GSK3- β предшествует и способствует убиквитинированию при участии Trim32 и деполимеризации десминовых филаментов с помощью кальпаина-1, что в конечном итоге приводит к потере миофибрилл и атрофии [42]. В нашем эксперименте снижение массы *m. soleus* может быть связано с увеличением экспрессии кальпаина-1.

В результате проведенной работы можно сделать выводы: интенсивность синтеза белка снижалась в быстрой *m. EDL*, работа которой минимальна при ограничении двигательной активности, в то время как в *m. soleus* синтез белка не изменялся; изменение массы *m. soleus* предположительно связано с ростом экспрессии кальпаинов; изменение синтеза белка в *m. EDL* связано со снижением фосфорилирования рибосомального белка S6 и увеличением фосфорилирования eEF2.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа поддержана грантом РФФИ № 19-015-00074.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента – Ш.Б.С. и Б.С.П., сбор данных – М.Е.П., Т.С.А., Б.С.П., обработка данных – Т.С.А., Б.С.П., написание и редактирование манускрипта – Б.С.П., Т.С.А., Ш.Б.С.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Shenkman BS* (2020) How Postural Muscle Senses Disuse? Early Signs and Signals. *Int J Mol Sci* 21(14): 10.
<https://doi.org/3390/ijms21145037>
2. *Krogh-Madsen R, Thyfault JP, Broholm C, Mortensen OH, Olsen RH, Mounier R, Plomgaard P, van Hall G, Booth FW, Pedersen BK* (2010) A 2-wk reduction of ambulatory activity attenuates peripheral insulin sensitivity. *J Appl Physiol* 108(5): 1034–1040.
<https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00977.2009>
3. *Oikawa SY, Holloway TM, Phillips SM* (2019) The Impact of Step Reduction on Muscle Health in Aging: Protein and Exercise as Countermeasures. *Front Nutr* 6(75).
<https://doi.org/10.3389/fnut.2019.00075>
4. *Fisher SR, Goodwin JS, Protas EJ, Kuo YF, Graham JE, Ottenbacher KJ, Ostir GV* (2011) Ambulatory activity of older adults hospitalized with acute medical illness. *J Am Geriatr Soc* 59(1): 91–95.
<https://doi.org/10.1111/j.1532-5415.2010.03202.x>
5. *Shad BJ, Thompson JL, Holwerda AM, Stocks B, Elhassan YS, Philp A, van Loon LJC, Wallis GA* (2019) One Week of Step Reduction Lowers Myofibrillar Protein Synthesis Rates in Young Men *Med Sci Sports Exerc* 51(10): 2125–2134.
<https://doi.org/10.1249/MSS.0000000000002034>
6. *Reid KF, Pasha E, Doros G, Clark DJ, Patten C, Phillips EM, Frontera WR, Fielding RA* (2014) Longitudinal decline of lower extremity muscle power in healthy and mobility-limited older adults: influence of muscle mass, strength, composition, neuromuscular activation and single fiber contractile properties. *Eur J Appl Physiol* 114(1): 29–39.
<https://doi.org/10.1007/s00421-013-2728-2>
7. *Devries MC, Breen L, Von Allmen M, MacDonald MJ, Moore DR, Offord EA, Horcajada MN, Breuille D, Phillips SM* (2015) Low-load resistance training during step-reduction attenuates

- declines in muscle mass and strength and enhances anabolic sensitivity in older men. *Physiol Rep* 3(8): e12493.
<https://doi.org/10.14814/phy2.12493>
8. *Belozeroва IN, Nemirovskaya TL, Shenkman BS, Kozlovskaya IB* (2003) Characteristic of changes in the structure and metabolism of the vastus lateralis muscles in monkeys after space flight. *Neurosci Behav Physiol* 33 (7): 735–740.
<https://doi.org/10.1023/a:1024429311622>
 9. *Shenkman BS, Belozeroва IN, Lee P, Nemirovskaya TL, Kozlovskaya IB* (2003) Effects of weightlessness and movement restriction on the structure and metabolism of the soleus muscle in monkeys after space flight. *Neurosci Behav Physiol* 33(7): 717–722.
<https://doi.org/10.1023/a:1024473126643>
 10. *Takemura A, Roy RR, Edgerton VR, Ishihara A* (2016) Biochemical Adaptations in a Slow and a Fast Plantarflexor Muscle of Rats Housed in Small Cages. *Aerospace Med Human Perform* 87(5): 443–448.
<https://doi.org/10.3357/AMHP.4436.2016>
 11. *Goodman CA, Mabrey DM, Frey JW, Miu MH, Schmidt EK, Pierre P, Hornberger TA* (2011) Novel insights into the regulation of skeletal muscle protein synthesis as revealed by a new nonradioactive in vivo technique. *FASEB* 25(3): 1028–1039.
<https://doi.org/10.1096/fj.10-168799>
 12. *Tyganov SA, Mochalova EP, Belova SP, Sharlo KA, Rozhkov SV, Vilchinskaya NA, Paramonova II, Mirzoev TM, Shenkman BS* (2019) Effects of Plantar Mechanical Stimulation on Anabolic and Catabolic Signaling in Rat Postural Muscle Under Short-Term Simulated Gravitational Unloading. *Front Phys* 10: 1252.
<https://doi.org/10.3389/fphys.2019.01252>
 13. *Belova SP, Mochalova EP, Kostrominova TY, Shenkman BS, Nemirovskaya TL* (2020) P38alpha-MAPK Signaling Inhibition Attenuates Soleus Atrophy during Early Stages of Muscle Unloading. *IJMS* 21(8): 2756.
<https://doi.org/10.3390/ijms21082756>
 14. *Mirzoev T, Tyganov S, Vilchinskaya N, Lomonosova Y, Shenkman B* (2016) 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* 39(3): 1011–1020.
<https://doi.org/10.1159/000447808>
 15. *Wang XD, Kawano F, Matsuoka Y, Fukunaga K, Terada M, Sudoh M, Ishihara A, Ohira Y* (2006) Mechanical load-dependent regulation of satellite cell and fiber size in rat soleus muscle. *AJP* 290(4): C. 981–989.
<https://doi.org/10.1152/ajpcell.00298.2005>
 16. *da Silva CA, Guirro RR, Polacow ML, Cancelliero KM, Durigan JL* (2006) Rat hindlimb joint immobilization with acrylic resin orthoses. *Braz J Med Biol Res* 39(7): 979–985.
<https://doi.org/10.1590/s0100-879x2006000700016>
 17. *Marmoriti E, Busquets S, Toledo M, Ricci M, Beltra M, Gudino V, Oliva F, Lopez-Pedrosa JM, Manzano M, Rueda R, Lopez-Soriano FJ, Argiles JM* (2017) A Rat Immobilization Model Based on Cage Volume Reduction: A Physiological Model for Bed Rest? *Front Phys* 8: 184.
<https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00184>
 18. *Phillips SM, Glover EI, Rennie MJ* (2009) Alterations of protein turnover underlying disuse atrophy in human skeletal muscle. *J Appl Phys* 107(3): 645–654.
<https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00452.2009>
 19. *Bodine SC, Baehr LM* (2014) Skeletal muscle atrophy and the E3 ubiquitin ligases MuRF1 and MAFbx/atrogen-1. *Am J Phys Endocrin Metab* 307(6): E469–E484.
<https://doi.org/10.1152/ajpendo.00204.2014>
 20. *Loughna P, Goldspink G, Goldspink DF* (1986) Effect of inactivity and passive stretch on protein turnover in phasic and postural rat muscles. *J Appl Phys* 61(1): 173–179.
<https://doi.org/10.1152/jappl.1986.61.1.173>
 21. *Fluckey JD, Dupont-Versteegden EE, Montague DC, Knox M, Tesch P, Peterson CA, Gaddy-Kurten D* (2002) A rat resistance exercise regimen attenuates losses of musculoskeletal mass during hindlimb suspension. *Acta Phys Scand* 176(4): 293–300.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-201X.2002.01040.x>
 22. *Fluckey JD, Dupont-Versteegden EE, Knox M, Gaddy D, Tesch PA, Peterson CA* (2004) Insulin facilitation of muscle protein synthesis following resistance exercise in hindlimb-suspended rats is independent of a rapamycin-sensitive pathway. *Am J Phys Endocrin Metab* 287(6): E1070–1075.
<https://doi.org/10.1152/ajpendo.00329.2004>
 23. *You JS, Anderson GB, Dooley MS, Hornberger TA* (2015) The role of mTOR signaling in the regulation of protein synthesis and muscle mass during immobilization in mice. *Disease Models Mechanisms* 8(9): 1059–1069.
<https://doi.org/10.1242/dmm.019414>

24. Tyganov SA, Mochalova EP, Belova SP, Sharlo KA, Rozhkov SV, Vilchinskaya NA, Paramonova II, Mirzoev TM, Shenkman BS (2019) Effects of Plantar Mechanical Stimulation on Anabolic and Catabolic Signaling in Rat Postural Muscle Under Short-Term Simulated Gravitational Unloading. *Front Phys* 10: 1252.
<https://doi.org/10.3389/fphys.2019.01252>
25. Munoz KA, Satarug S, Tischler ME (1993) Time course of the response of myofibrillar and sarcoplasmic protein metabolism to unweighting of the soleus muscle. *Metab Clin Exp* 42(8): 1006–1012.
[https://doi.org/10.1016/0026-0495\(93\)90014-f](https://doi.org/10.1016/0026-0495(93)90014-f)
26. Wineski LE, von Deutsch DA, Abukhalaf IK, Pitts SA, Potter DE, Paulsen DF (2002) Muscle-specific effects of hindlimb suspension and clenbuterol in mature male rats. *Cells, Tissues, Organs* 171(2–3): 188–198.
<https://doi.org/10.1159/000063712>
27. Ferrando AA, Lane HW, Stuart CA, Davis-Street J, Wolfe RR (1996) Prolonged bed rest decreases skeletal muscle and whole body protein synthesis. *Am J Phys* 270 (4 Pt 1): E627–E633.
<https://doi.org/10.1152/ajpendo.1996.270.4.E627>
28. Kobayashi Y, Watanabe N, Kitakaze T, Sugimoto K, Izawa T, Kai K, Harada N, Yamaji R (2020) Oleamide rescues tibialis anterior muscle atrophy of mice housed in small cages. *Br J Nutr* 1–35.
<https://doi.org/10.1017/S0007114520004304>
29. Brocca L, Cannavino J, Coletto L, Biolo G, Sandri M, Bottinelli R, Pellegrino MA (2012) The time course of the adaptations of human muscle proteome to bed rest and the underlying mechanisms. *J Phys* 590(20): 5211–5230.
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.2012.240267>
30. Sharlo K, Paramonova I, Turtikova O, Tyganov S, Shenkman B (2019) Plantar mechanical stimulation prevents calcineurin-NFATc1 inactivation and slow-to-fast fiber type shift in rat soleus muscle under hindlimb unloading. *J Appl Phys* 126(6): 1769–1781.
<https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00029.2019>
31. Yokoyama S, Ohno Y, Egawa T, Yasuhara K, Nakai A, Sugiura T, Ohira Y, Yoshioka T, Okita M, Origuchi T, Goto K (2016) Heat shock transcription factor 1-associated expression of slow myosin heavy chain in mouse soleus muscle in response to unloading with or without reloading. *Acta Phys* 217(4): 325–337.
<https://doi.org/10.1111/apha.12692>
32. Jope RS, Johnson GV (2004) The glamour and gloom of glycogen synthase kinase-3. *Trends Biochem Sci* 29(2): 95–102.
<https://doi.org/10.1016/j.tibs.2003.12.004>
33. Drenning JA, Lira VA, Simmons CG, Soltow QA, Sellman JE, Criswell DS (2008) Nitric oxide facilitates NFAT-dependent transcription in mouse myotubes. *Am J Phys* 294(4): C1088–C1095.
<https://doi.org/10.1152/ajpcell.00523.2007>
34. Shenkman BS, Belova SP, Lomonosova YN, Kostrominova TY, Nemirovskaya TL (2015) Calpain-dependent regulation of the skeletal muscle atrophy following unloading. *Arch Biochem Biophys* 584: 36–41.
<https://doi.org/10.1016/j.abb.2015.07.011>
35. Hornberger TA, Hunter RB, Kandarian SC, Esser KA (2001) Regulation of translation factors during hindlimb unloading and denervation of skeletal muscle in rats. *Am J Phys* 281(1): C179–C187.
<https://doi.org/10.1152/ajpcell.2001.281.1.C179>
36. Miranda L, Horman S, De Potter I, Hue L, Jensen J, Rider MH (2008) Effects of contraction and insulin on protein synthesis, AMP-activated protein kinase and phosphorylation state of translation factors in rat skeletal muscle. *Pflugers Arch Eur J Phys* 455(6): 1129–1140.
<https://doi.org/10.1007/s00424-007-0368-2>
37. Lomonosova YN, Belova SP, Mirzoev TM, Kozlovskaya IB, Shenkman BS (2017) Eukaryotic elongation factor 2 kinase activation in M. soleus under 14-day hindlimb unloading of rats. *Dokl Biochem Biophys* 474(1): 165–167.
<https://doi.org/10.1134/S1607672917030048>
38. Carlberg U, Nilsson A, Nygard O (1990) Functional properties of phosphorylated elongation factor 2. *Eur J Biochem* 191(3): 639–645.
<https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1990.tb19169.x>
39. Roux PP, Topisirovic I (2018) Signaling Pathways Involved in the Regulation of mRNA Translation. *Mol Cell Biol* 38(12): e00070–18.
<https://doi.org/10.1128/MCB.00070-18>
40. de Boer MD, Selby A, Atherton P, Smith K, Seynnes OR, Maganaris CN, Maffulli N, Movin T, Narici MV, Rennie MJ (2007) The temporal responses of protein synthesis, gene expression and cell signalling in human quadriceps muscle and patellar tendon to disuse. *J Phys* 585(Pt 1): 241–251.
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.2007.142828>

41. Huang J, Zhu X (2016) The molecular mechanisms of calpains action on skeletal muscle atrophy. *Phys Res* 65(4): 547–560.
<https://doi.org/10.33549/physiolres.933087>
42. Aweida D, Rudesky I, Volodin A, Shimko E, Cohen S (2018) GSK3-beta promotes calpain-1-mediated desmin filament depolymerization and myofibril loss in atrophy. *J Cell Biol* 10: 3698–3714.
<https://doi.org/10.1083/jcb.201802018>

Restricted Activity and Protein Synthesis in Postural and Locomotor Muscles

S. P. Belova^a, *, S. A. Tyganov^a, E. P. Mochalova^a, and B. S. Shenkman^a

^a*Institute of biomedical problems of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia*

**e-mail: Swetbell@mail.ru*

With urbanization, automation and mechanization of labor, a difficult epidemiological situation and self-isolation, the level of daily physical activity in a modern person decreases. The aim of the study was to study the effect of restricted activity on protein synthesis in postural and locomotor muscles. An experiment with restricted activity for 21 days was carried out on Wistar rats. The intensity of protein synthesis and anabolic signaling pathways were studied in the soleus muscle (*m. soleus*), which mainly consists of slow fibers, and the long extensor digitorum of the fingers (*m. EDL*), mainly consists of fast fibers. The mass of *m. soleus* and *m. EDL* was reduced, and a significant decrease in protein synthesis was observed only in *m. EDL*. There was also a decrease in the phosphorylation of S6 ribosomal protein only in the fast muscle. At the same time, a GSK3 β phosphorylation was decreased in *m. soleus*, in contrast to *m. EDL*. Markers of proteolysis have been studied. In the experiment, a decrease in the MuRF-1 expression in *m. soleus* and Atrogin-1/MAFbx expression in *m. EDL* was observed, as well as an increase in the expression of calpains in *m. soleus*. Thus, atrophic processes are associated with restricted activity in fast and slow muscle by different signaling mechanisms.

Keywords: soleus muscle, extensor digitorum longus, restricted activity, protein synthesis, eEF2, p70S6k

**ВЛИЯНИЕ ХРОНИЧЕСКОЙ СВИНЦОВОЙ ИНТОКСИКАЦИИ
НА ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА И ИЗОФОРМНЫЙ СОСТАВ
МИОЗИНА ЛЕВОГО ЖЕЛУДОЧКА СЕРДЦА КРЫС**

© 2021 г. О. П. Герцен¹, *, С. Р. Набиев¹, Л. В. Никитина¹

¹Институт иммунологии и физиологии УрО РАН, Екатеринбург, Россия

*E-mail: o.p.gerzen@gmail.com

Поступила в редакцию 31.01.2021 г.

После доработки 09.03.2021 г.

Принята к публикации 14.03.2021 г.

Модель хронической свинцовой интоксикации была создана на беспородных крысах с помощью внутривенных инъекций ацетата свинца 3 раза в неделю в течение 5 недель. С помощью искусственной подвижной системы было показано, что хроническая интоксикация свинцом вызывала изменения в актин-миозиновом взаимодействии *in vitro*, в частности, падение максимальной скорости скольжения нативных тонких филаментов по миозину, выделенному из миокарда левого желудочка сердца крыс. Не было найдено статистически значимых изменений кальциевой чувствительности и кооперативности кривой “*pCa*–скорость”, характеристик фракции подвижных филаментов и изометрической силы. С использованием электрофоретического разделения белков был найден сдвиг в соотношении тяжелых цепей миозина в сторону увеличения содержания β -цепей с более низкой АТФ-азной активностью.

Ключевые слова: актин-миозиновое взаимодействие, кардиотоксичность, свинец, искусственная подвижная система

DOI: 10.31857/S0869813921060030

Сердечно-сосудистые заболевания – основная причина смертности в мире [1], а влияние тяжелых металлов способствует возникновению и обострению данных патологий [2]. Воздействию тяжелых металлов, загрязняющих воздух производственных помещений и окружающую атмосферу, подвергаются значительные человеческие субпопуляции – работники промышленных предприятий и люди, проживающие в зоне их техногенного влияния [2, 3]. Свинец является наиболее распространенным ксенобиотиком в среде обитания человека. Он присутствует в воздухе, домашней пыли, почве, воде, продуктах питания и других потребительских продуктах. Накопление свинца в среде характеризуется устойчивостью, что создает условия для токсического воздействия на население через много лет после прекращения промышленной эмиссии.

Свинец накапливается в организме человека и животных, в особенности в костях, из которых период его полувыведения составляет десятилетия. Было показано, что нет безопасного уровня содержания свинца в крови, и его токсическое действие присутствует на уровнях, намного меньших, чем предполагалось ранее [2, 4–8].

В литературе имеются данные о токсическом влиянии свинца на все системы организма, включая сердечно-сосудистую [5, 9–17]. Известные опубликованные данные о воздействии свинца на механическую активность миокарда малочислен-

ны, не охватывают все ее аспекты и отчасти противоречивы. Исследования кардиотоксического действия свинца на уровне изолированных белков не проводились, несмотря на то, что есть предположения о влиянии тяжелых металлов непосредственно на белки, принимающие участие в сократительном акте.

В миокарде желудочков существуют три изоформы миозина – V1, V2 и V3 [18]. Известно, что аминокислотная последовательность изоформ V1 и V3 сердечного миозина млекопитающих идентична на $\geq 93\%$ [19]. Изоформы V1 ($\alpha\alpha$) и V3 ($\beta\beta$) – это гомодимеры, включающие две α - или β -ТЦМ соответственно, V2 ($\alpha\beta$) – гетеродимер, включающий одну α - и одну β -тяжелую цепи [20].

В желудочках мелких млекопитающих, например, мышей и крыс α -ТЦМ является преобладающей [21–23]. Однако в сердце может происходить изменение в экспрессии генов изоформ тяжелых цепей миозина в ответ на тиреоидные гормоны щитовидной железы, гемодинамическую нагрузку или различные патологические раздражители, включая застойную сердечную недостаточность, при этом в миокарде грызунов это происходит быстрее и в большей степени, нежели у человека [22].

Известно, что механические характеристики актомиозинового комплекса зависят от изоформ сердечного миозина [20]. С использованием метода искусственной подвижной системы было выявлено, что изоформа V1 передвигает актин в 2–3 раза быстрее, чем изоформа V3 [23–25], так как V1 имеет более высокую скорость циклирования поперечных мостиков [23]. Изометрическая сила, развиваемая головками изомиозинов V1 и V3 зависит от вида животного: у более крупных животных (кроликов и свиней) сила, развиваемая головкой миозина V3 выше, чем у V1, а у небольших млекопитающих (крысы и мыши) силы не отличаются [23, 24, 26].

Для исследования кардиотоксического влияния солей свинца мы изучали функциональные характеристики и изоформный состав миозина, выделенного из левого желудочка крыс. Методом искусственной подвижной системы определяли скорость движения тонких филаментов по миозину, с помощью электрофоретического разделения белков исследовали соотношение тяжелых цепей миозина в миокарде контрольной группы и группы крыс с хронической свинцовой интоксикацией.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Модель интоксикации

Эксперимент проводили на аутбредных белых крысах-самцах в возрасте 4 месяца и массой тела 300 г на начало эксперимента. Все крысы содержались в стандартных условиях, дышали нефильтрованным воздухом и были обеспечены стандартной сбалансированной пищей. Хроническую интоксикацию свинцом (группа “Pb”) моделировали путем внутрибрюшинного введения раствора ацетата свинца 3 раза в неделю в течение 5 нед. (до 15 инъекций). Разовая доза составила 12.5 мг свинца на 1 кг массы тела. Контрольная группа крыс (группа “С”) получала тот же объем стерильной дистиллированной воды по аналогичной схеме [27, 28].

Эксперименты планировали и проводили в соответствии с принципами Базельской декларации и были одобрены Этическим комитетом Института иммунологии и физиологии Уральского отделения Российской академии наук.

Получение белков

Миозин выделяли из левого желудочка сердца крыс по стандартной методике [29]. Актин был получен из скелетных мышц кролика в соответствии со стандартной процедурой [30], и после полимеризации путем добавления 2 мМ АТФ, 4 мМ $MgCl_2$ и 100 мМ KCl был помечен TRITC-фаллоидином (Sigma-Aldrich Co. ООО). Сердечный тропонин выделяли из сердца свиньи, как описано ранее [31]. Рекомбинант-

ный человеческий тропомиозин получали по методике [32]. Использование сократительных и регуляторных белков, выделенных у разных видов, в искусственной подвижной системе является обычной практикой [26, 33]. Регулируемые тонкие филаменты были сконструированы из актина, тропонина и тропомиозина путем смешивания этих белков в следующих концентрациях: 400 нМ F-актина, меченного родамином-фаллоидином, 100 нМ тропонина и 100 нМ тропомиозина при температуре 4°C в буфере, содержащем (в мМ) 25 KCl, 25 имидазола, 4 MgCl₂, 1 EGTA и 10 DTT (pH 7.5). Нативные тонкие филаменты были экстрагированы из левого желудочка крыс в соответствии с протоколом Spiess [34]. Белковый состав реконструированных и нативных тонких филаментов проверяли электрофорезом в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия [35].

Искусственная подвижная система

Метод искусственной подвижной системы (*in vitro* motility assay) был использован для определения скорости движения нативных и реконструированных тонких филаментов, состоящих из актина, тропонина и тропомиозина, по миозинам, экстрагированным из левого желудочка крыс групп “С” и “Рb” при различных концентрациях кальция в растворе. Ионы кальция взаимодействуют с регулируемым тонким филаментом в растворе в проточной камере. Кальций связывается с тропонином С, приводя к конформационным изменениям в тонком филаменте, вследствие чего открываются сайты связывания миозина на глобулах актина. Мы можем судить о механическом взаимодействии актина и миозина по характеристикам того, как филаменты движутся и останавливаются. Изменение этих характеристик в зависимости от концентрации кальция в растворе с регулируемыми тонкими филаментами позволяет изучить механизмы кальциевой регуляции актин-миозинового взаимодействия [33]. Эксперименты в искусственной подвижной системе проводили, как описано ранее [26]. Эксперименты проводили при 30°C. Флуоресцентно меченные актиновые филаменты в экспериментальной проточной камере визуализировали с помощью инвертированного эпифлуоресцентного микроскопа Axiovert 200 (Carl Zeiss), снабженного 100x/1.45 масляным альфа-объективом Plan-Fluar. Движение тонких филаментов по поверхности, покрытой миозином, регистрировали камерой EMCCD iXon-897BV (Andor Technology), а их скорость анализировали с помощью программного обеспечения GMim-Pro [36]. Зависимость скорости скольжения тонких филаментов от концентрации кальция анализировали с помощью уравнения Хилла:

$$V = V_{\max} \left(1 + 10^{h(pCa - pCa_{50})} \right)^{-1}, \quad (1)$$

где V и V_{\max} – скорость и максимальная скорость при насыщающей концентрации кальция, соответственно, pCa_{50} (показатель чувствительности к кальцию) – значение pCa , при котором достигается половина максимальной скорости, а h – коэффициент кооперативности Хилла.

Определение относительной изометрической силы, развиваемой миозином в искусственной подвижной системе

Для определения изометрической силы в искусственной подвижной системе мы использовали “протокол смеси”, при котором исследуемый миозин смешивали с нециклирующим NEM-модифицированным миозином [37]. Нециклирующий NEM-модифицированный миозин, присоединяясь к актину, препятствует движению тонких филаментов и служит в качестве нагрузки. Доля NEM-модифициро-

Таблица 1. Характеристики взаимосвязи “ pCa –скорость” в левом желудочке крыс групп “С” и “Рb”*

	V_{\max} , мкм/с	pCa_{50}	h
С	4.07 ± 0.13	6.63 ± 0.02	2.3 ± 0.3
Рb	$3.27 \pm 0.12^*$	6.58 ± 0.03	2.2 ± 0.3

* V_{\max} – максимальная скорость движения нативных тонких филаментов по миозину левого желудочка, pCa_{50} – кальциевая чувствительность, h – коэффициент кооперативности Хилла. Данные представлены как среднее значение \pm стандартное отклонение. Верхним индексом * обозначены значения, отличные от контрольных ($p < 0.05$ по U-критерию Манна–Уитни).

ванного миозина, необходимая для остановки движения филаментов, является мерой относительной силы, которую может развить исследуемый миозин.

Электрофорез

Изоформы тяжелых цепей миозина миокарда левого желудочка крыс определяли с помощью электрофореза в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия [38]. После завершения электрофореза гель окрашивали кумасси бриллиантовым синим R250, далее отмывали гель от краски и сканировали денситометром (BioRad, США) для определения процентного соотношения α -и β -тяжелых цепей миозина.

Статистический анализ

Статистическая значимость межгрупповых различий между средними значениями всех полученных показателей оценивали с помощью непараметрического U-критерия Манна–Уитни, при этом различия считали статистически значимыми на уровне $p < 0.05$. Все значения выражены как среднее значение \pm стандартное отклонение.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Под влиянием хронической свинцовой интоксикации максимальная скорость скольжения нативных тонких филаментов по миозину левого желудочка падала по сравнению с контрольной группой с 4.07 ± 0.13 до 3.27 ± 0.12 мкм/с (табл. 1), то есть на 20% (рис. 1). Кальциевая чувствительность и коэффициент кооперативности Хилла не имели значимых отличий между группами “С” и “Рb”.

Характеристики зависимости фракции подвижных филаментов от концентрации кальция (максимальное значение фракции, pCa_{50} и коэффициент кооперативности Хилла) значимо не отличались (рис. 1).

Интоксикация свинцом снижает максимальную скорость скольжения нативных тонких филаментов по миозину, но не влияет на кальциевую чувствительность и коэффициент кооперативности Хилла. Кривая зависимости фракции подвижных филаментов от концентрации кальция не имеет значимых отличий по всем показателям, но имеется явная тенденция к снижению фракции при воздействии свинца.

Под влиянием хронической интоксикации свинцом происходил значительный сдвиг в соотношении тяжелых цепей миозина (ТЦМ) в сторону увеличения содержания β -цепей с более низкой АТФ-азной активностью ($55 \pm 10\%$ α -ТЦМ и $45 \pm 10\%$ β -ТЦМ в группе “Рb” и $86 \pm 4\%$ α -ТЦМ и $14 \pm 4\%$ β -ТЦМ в группе “С”).

Для остановки движения реконструированных тонких филаментов по миозину левого желудочка в группах “С” и “Рb” необходимы были $34 \pm 4\%$ и $42 \pm 6\%$ NEM-моди-

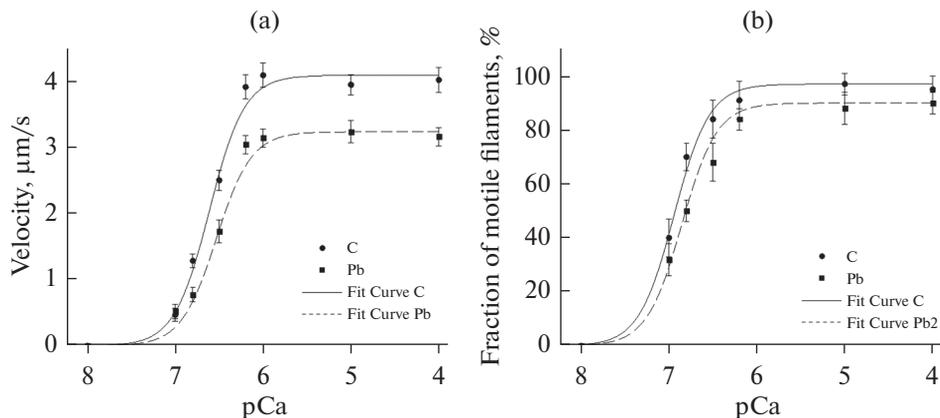


Рис. 1. Зависимость скорости движения нативных тонких филаментов (а) и фракции подвижных филаментов (б) по миозину левого желудочка сердца крыс групп “С” и “Рb” от концентрации кальция в растворе.

$p\text{Ca}$ – отрицательный десятичный логарифм концентрации кальция. Линия регрессии (Fit Curve) соответствует уравнению Хилла. Скорость представлена как среднее значение \pm стандартное отклонение для четырех экспериментов.

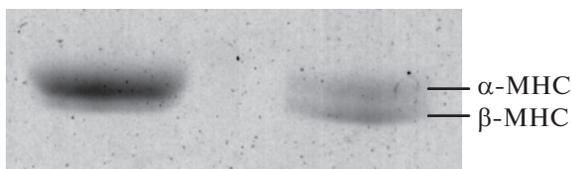


Рис. 2. Репрезентативный пример электрофореграммы, показывающий соотношения α - и β -тяжелых цепей миозина (ТЦМ) в левом желудочке крыс групп “С” (слева) и “Рb” (справа). Группа “С” (слева) – $86 \pm 4\%$ α -ТЦМ и $14 \pm 4\%$ β -ТЦМ. Группа “Рb” (справа) – $55 \pm 10\%$ α -ТЦМ и $45 \pm 10\%$ β -ТЦМ.

фицированного миозина соответственно. Данное различие было статистически незначимым (рис. 3).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Исследования влияния хронической свинцовой интоксикации на изолированные многоклеточные препараты левого желудочка показали, что величина изометрической силы папиллярных мышц не менялась при изменении параметров кальциевого цикла в кардиомиоцитах [39, 40].

Ранее нами были исследованы характеристики актин-миозинового взаимодействия и сокращения многоклеточных препаратов – трабекул и папиллярных мышц – правого желудочка при воздействии ионов свинца. Было показано, что максимальная скорость скольжения реконструированных тонких филаментов по миозину правого желудочка снижалась под влиянием интоксикации свинцом [27] и происходил сдвиг соотношения изоформ тяжелых цепей миозина в сторону более медленных β -цепей [28]. На многоклеточных препаратах правого желудочка тех же самых крыс, которые были использованы в нашем исследовании, был обнаружен рост

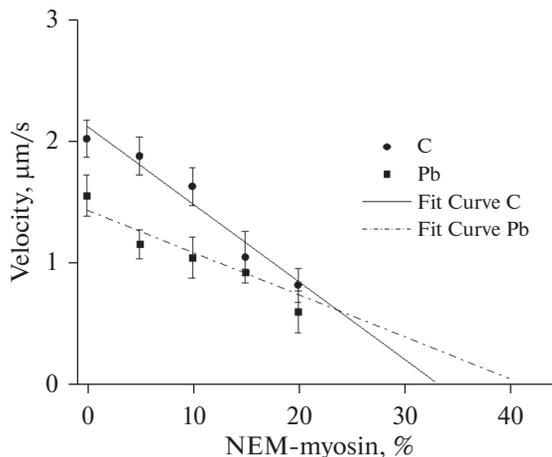


Рис. 3. Зависимость скорости скольжения реконструированных тонких филаментов по миозину левого желудочка сердца крыс групп “С” и “Pb” от концентрации NEM-модифицированного миозина. Скорость представлена как среднее значение \pm стандартное отклонение для четырех экспериментов. Различия в значениях количества необходимого NEM-модифицированного миозина для остановки движения в группах “С” ($34 \pm 4\%$) и “Pb” ($42 \pm 6\%$) были статистически незначимыми.

площади поперечного сечения трабекул и папиллярных мышц, уменьшение пассивного (диастолического) механического напряжения, падение максимальной скорости развития силы изометрических сокращений и скорости изотонического укорочения папиллярных мышц [27].

В наших экспериментах с использованием нативных тонких филаментов и миозина из левого желудочка наблюдалась сходная тенденция — максимальная скорость актин-миозинового взаимодействия под влиянием хронической интоксикации падала на 20% по сравнению с контрольной группой, что объяснялось сдвигом в соотношении α - и β -ТЦМ: происходило увеличение на 31% содержания β -цепей с более низкой АТФ-азной активностью и более низкой скоростью циклирования поперечных мостиков на актине. Такое изменение может быть адаптивным энергосберегающим молекулярным механизмом при патологиях сердца [25, 41]. Характеристики фракции подвижных филаментов значимо не отличались, однако имелась тенденция к снижению этого показателя при интоксикации свинцом.

Различия для групп “С” и “Pb” в количестве NEM-модифицированного миозина, необходимого для полной остановки движения тонких реконструированных филаментов были статистически незначимыми, что можно объяснить отсутствием различий в развиваемой силе для изоформ миозина у небольших млекопитающих (крысы и мыши) [23, 24, 26], хотя имелась небольшая тенденция к повышению изометрической силы у миозина левого желудочка группы “Pb”, возможно этот эффект стоит исследовать более глубоко.

Таким образом, при исследовании функциональных характеристик и изоформного состава миозина левого желудочка крыс при хронической интоксикации свинцом мы выявили снижение скорости актин-миозинового взаимодействия и сдвиг в соотношении тяжелых цепей миозина в сторону β -ТЦМ. Эти результаты вместе с вышперечисленными изменениями в сократительных характеристиках многоклеточных препаратов правого желудочка тех же самых крыс [27, 28] могут быть следствием развития гипертрофии миокарда, вызванной перегрузкой давле-

нием [28, 42, 43]. Предположение о возможной гипертрофии миокарда под влиянием свинцовой интоксикации косвенно подтверждает увеличение относительной массы сердца этих крыс в расчете на 100 г массы тела и амплитуды комплекса QRS на электрокардиограмме [28], а также повышение давления и увеличение толщины кардиомиоцитов левого желудочка крыс при интоксикации более низкими дозами свинца [44]. Таким образом, при профессиональной и экологически обусловленной свинцовой нагрузке на организм возникает повышенный риск сердечно-сосудистой патологии, который может быть связан, в том числе с нарушениями сократительной активности сердечной мышцы на молекулярном уровне.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена в рамках гос. темы ИИФ УрО РАН АААА-А19-119070190064-4 и АААА-А18-118020590135-3 на оборудовании Центра коллективного пользования ИИФ УрО РАН.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента – Н.Л.В., Герцен Г.О.П., сбор и обработка данных – Г.О.П., Н.С.Р., написание и редактирование манускрипта – Г.О.П., Н.Л.В.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. GBD Compare | IHME Viz Hub. <https://vizhub.healthdata.org/gbd-compare/>. Accessed 28 Dec. 2020.
2. Landrigan PJ, Fuller R, Acosta NJR, Adeyi O, Arnold R, Basu N (Nil), Baldé AB, Bertollini R, Bose-O'Reilly S, Boufford JI, Breysse PN, Chiles T, Mahidol C, Coll-Seck AM, Cropper ML, Fobil J, Fuster V, Greenstone M, Haines A, Hanrahan D, Hunter D, Khare M, Krupnick A, Lanphear B, Lohani B, Martin K, Mathiasen KV, McTeer MA, Murray CJL, Ndahimananjara JD, Perera F, Potočnik J, Preker AS, Ramesh J, Rockström J, Salinas C, Samson LD, Sandilya K, Sly PD, Smith KR, Steiner A, Stewart RB, Suk WA, van Schayck OCP, Yadama GN, Yumkella K, Zhong M (2018) The Lancet Commission on pollution and health. *Lancet* 391: 462–512. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)32345-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)32345-0)
3. Kim YD, Eom SY, Yim DH, Kim IS, Won HK, Park CH, Kim GB, Yu SD, Choi BS, Park JD, Kim H (2016) Environmental Exposure to Arsenic, Lead, and Cadmium in People Living near Janghang Copper Smelter in Korea *J Korean Med Sci* 31: 489. <https://doi.org/10.3346/jkms.2016.31.4.489>
4. WHO (2019) Lead poisoning and health. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/lead-poisoning-and-health>. Accessed 9 Jan. 2020.
5. Afridi HI, Kazi TG, Kazi NG, Jamali MK, Arain MB, Sirajuddin, Baig JA, Kandhro GA, Wadhwa SK, Shah AQ (2010) Evaluation of cadmium, lead, nickel and zinc status in biological samples of smokers and nonsmokers hypertensive patients. *J Hum Hypertens* 24: 34–43. <https://doi.org/10.1038/jhh.2009.39>
6. Vainio H, Heseltine E, Partensky CWJ (1993) Meeting of the IARC working group on beryllium, cadmium, mercury and exposures in the glass manufacturing industry. *Scand J Work Environ Health* 19: 360–363.
7. Мухачева СВ (2017) Многолетняя динамика концентрации тяжелых металлов в корме и организме рыжей полевки (*Myodes glareolus*) в период снижения выбросов медеплавильного завода. *Экология* 6: 461–471. [Mukhacheva SV (2017) Long-term dynamics of the concentration of heavy metals in the forage and body of the bank vole (*Myodes glareolus*) during the period of decreasing emissions from the copper smelter. *Ecology* 6: 461–471. (In Russ)]. <https://doi.org/10.7868/s0367059717060087>
8. Mirzaei R (2018) Assessment of Accumulation and Human Health Risk of Trace Elements in the Vicinity of Industrial Estates, Central Iran. *Arch Hyg Sci* 7: 118–125. <https://doi.org/10.29252/archhygsci7.2.118>

9. *Nawrot TS, Thijs L, Den Hond EM, Roels HA, Staessen JA* (2002) An epidemiological re-appraisal of the association between blood pressure and blood lead: A meta-analysis. *J Hum Hypertens* 16: 123–131.
<https://doi.org/10.1038/sj.jhh.1001300>
10. *Kopp SJ, Bárány M, Erlanger M, Perry EF, Perry HM* (1980) The influence of chronic low-level cadmium and/or lead feeding on myocardial contractility related to phosphorylation of cardiac myofibrillar proteins. *Toxicol Appl Pharmacol* 54:48–56.
[https://doi.org/10.1016/0041-008X\(80\)90007-1](https://doi.org/10.1016/0041-008X(80)90007-1)
11. *Prentice RC, Kopp SJ* (1985) Cardiotoxicity of lead at various perfusate calcium concentrations: Functional and metabolic responses of the perfused rat heart. *Toxicol Appl Pharmacol* 81: 491–501.
[https://doi.org/10.1016/0041-008X\(85\)90420-X](https://doi.org/10.1016/0041-008X(85)90420-X)
12. *Alissa EM, Ferns GA* (2011) Heavy metal poisoning and cardiovascular disease. *J Toxicol* 2011.
<https://doi.org/10.1155/2011/870125>
13. *Solenkova NV, Newman JD, Berger JS, Thurston G, Hochman JS, Lamas GA* (2014) Metal pollutants and cardiovascular disease: Mechanisms and consequences of exposure. *Am Heart J* 168: 812–822.
<https://doi.org/10.1016/j.ahj.2014.07.007>
14. *Lamas GA, Navas-Acien A, Mark DB, Lee KL* (2016) Heavy metals, cardiovascular disease, and the unexpected benefits of chelation therapy. *J Am Coll Cardiol* 67: 2411–2418.
<https://doi.org/10.1016/j.jacc.2016.02.066>
15. *Ruiz-Hernandez A, Navas-Acien A, Pastor-Barrusio R, Crainiceanu CM, Redon J, Guallar E, Tellez-Plaza M* (2017) Declining exposures to lead and cadmium contribute to explaining the reduction of cardiovascular mortality in the US population, 1988–2004. *Int J Epidemiol* 46: 1903–1912.
<https://doi.org/10.1093/ije/dyx176>
16. *Chowdhury R, Ramond A, O’Keeffe LM, Shahzad S, Kunutsor SK, Muka T, Gregson J, Willeit P, Warnakula S, Khan H, Chowdhury S, Gobin R, Franco OH, Di Angelantonio E* (2018) Environmental toxic metal contaminants and risk of cardiovascular disease: Systematic review and meta-analysis. *BMJ* 362: 14–16.
<https://doi.org/10.1136/bmj.k3310>
17. *Sevim Ç, Doğan E, Comaklı S* (2020) Cardiovascular disease and toxic metals. *Curr Opin Toxicol* 19: 88–92.
<https://doi.org/10.1016/j.cotox.2020.01.004>
18. *Hoh JF, McGrath PA* (1978) Electrophoretic analysis of multiple forms of rat cardiac myosin: effects of hypophysectomy and thyroxine Replacement. *J Mol Cell Cardiol* 10: 1053–1060.
19. *Alpert NR, Brosseau C, Federico A, Krenz M, Robbins J, Warsaw DM* (2002) Molecular mechanics of mouse cardiac myosin isoforms. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 283: 1446–1454.
<https://doi.org/10.1152/ajpheart.00274.2002>
20. *Shchepkin DV, Kopylova GV, Nikitina LV* (2011) Study of reciprocal effects of cardiac myosin and tropomyosin isoforms on actin-myosin interaction with in vitro motility assay. *Biochem Biophys Res Commun* 415: 104–108.
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.10.022>
21. *Galler S, Puchert E, Gohlsch B, Schmid D, Pette D* (2002) Kinetic properties of cardiac myosin heavy chain isoforms in rat. *Pflugers Arch Eur J Physiol* 445: 218–223.
<https://doi.org/10.1007/s00424-002-0934-6>
22. *Danzi S, Klein S, Klein I* (2008) Differential regulation of the myosin heavy chain genes α and β in rat atria and ventricles: Role of antisense RNA. *Thyroid* 18: 761–768.
<https://doi.org/10.1089/thy.2008.0043>
23. *Nikitina LV, Kopylova GV, Shchepkin DV, Katsnelson LB* (2008) Study of the interaction between rabbit cardiac contractile and regulatory proteins. An *in vitro* motility assay. *Biochem* 73: 178–184.
<https://doi.org/10.1007/s10541-008-2009-6>
24. *Malmqvist UP, Aronshtam A* (2004) Cardiac myosin isoforms from different species have unique enzymatic and mechanical properties. *Biochemistry* 43: 15058–15065.
25. *Hoyer K, Krenz M, Robbins J* (2007) Shifts in the myosin heavy chain isozymes in the mouse heart result in increased energy efficiency. *J Mol Cell Cardiol* 42: 214–221.
<https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2017.03.040>
26. *Nikitina LV, Kopylova GV, Shchepkin DV, Nabiev SR, Bershitsky SY* (2015) Investigations of Molecular Mechanisms of Actin-Myosin Interactions in Cardiac Muscle. *Biochem* 80: 1748–1763.
<https://doi.org/10.1134/S0006297915130106>
27. *Protsenko YL, Katsnelson BA, Klinova SV, Lookin ON, Balakin AA, Nikitina LV, Gerzen OP, Nabiev SR, Minigaliev IA, Privalova LI, Gurvich VB, Sutunkova MP, Katsnelson LB* (2019) Further analysis

- of rat myocardium contractility changes associated with a subchronic lead intoxication. *Food Chem Toxicol* 125: 233–241.
<https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.12.054>
28. *Protsenko YL, Katsnelson BA, Klinova SV, Lookin ON, Balakin AA, Nikitina LV, Gerzen OP, Minigalieva IA, Privalova LI, Gurvich VB, Sutunkova MP, Katsnelson LB* (2018) Effects of subchronic lead intoxication of rats on the myocardium contractility. *Food Chem Toxicol* 120: 378–389.
<https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.07.034>
 29. *Margossian SS, Lowey S* (1982) PReparation of Myosin and Its Subfragments from Rabbit Skeletal Muscle. *Methods. Enzymol.* 85: 55–71.
[https://doi.org/10.1016/0076-6879\(82\)85009-X](https://doi.org/10.1016/0076-6879(82)85009-X)
 30. *Pardee JD, Spudich JA* (1982) Purification of muscle actin. In: *Methods in cell biology Methods.* *Cell Biol* 24: 271–289.
 31. *Potter JD* (1982) PReparation of troponin and its subunits. *Methods Enzymol* 85: 241–263.
 32. *Matyushenko AM, Artemova NV, Shchepkin DV, Kopylova GV, Bershitsky SY, Tsaturyan AK, Sluchanko NN, Levitsky DI* (2014) Structural and functional effects of two stabilizing substitutions, D137L and G126R, in the middle part of α -tropomyosin molecule. *FEBS J* 281: 2004–2016.
<https://doi.org/10.1111/febs.12756>
 33. *Gordon AM, LaMadrid MA, Chen Y, Luo Z, Chase PB* (1997) Calcium regulation of skeletal muscle thin filament motility *in vitro*. *Biophys J* 72: 1295–1307.
[https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(97\)78776-9](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(97)78776-9)
 34. *Spiess M, Steinmetz MO, Mandinova A, Wolpensinger B, Aebi U, Atar D* (1999) Isolation, electron microscopic imaging, and 3-D visualization of native cardiac thin myofilaments. *J Struct Biol* 126: 98–104.
<https://doi.org/10.1006/jsbi.1999.4111>
 35. *Laemmli UK* (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680–685.
 36. *Mashanov GI, Molloy JE* (2007) Automatic detection of single fluorophores in live cells. *Biophys J* 92: 2199–2211.
<https://doi.org/10.1529/biophysj.106.081117>
 37. *Haeberle JR, Hemric ME, Chacko S, Pollack J, Reggiani C* (1995) Are actin filaments moving under unloaded conditions in the *in vitro* motility assay? *Biophys J* 68: 306–310.
 38. *Reiser PJ, Kline WO* (1998) Electrophoretic separation and quantitation of cardiac myosin heavy chain isoforms in eight mammalian species. *Am J Physiol Circ Physiol* 274: H1048–H1053.
[https://doi.org/10.1016/S0165-5876\(00\)00363-3](https://doi.org/10.1016/S0165-5876(00)00363-3)
 39. *Silva MA, de Oliveira TF, Almenara CCP, Broseghini-Filho GB, Vassallo DV, Padilha AS, Silveira EA* (2015) Exposure to a Low Lead Concentration Impairs Contractile Machinery in Rat Cardiac Muscle. *Biol Trace Elem Res* 167: 280–287.
<https://doi.org/10.1007/s12011-015-0300-0>
 40. *Fioresi M, Simões MR, Furieri LB, Broseghini-Filho GB, Vescovi MVA, Stefanon I, Vassallo DV* (2014) Chronic lead exposure increases blood pressure and myocardial contractility in rats. *PLoS One* 9.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0096900>
 41. *Reiser PJ, Portman MA, Ning XH, Moravec CS* (2001) Human cardiac myosin heavy chain isoforms in fetal and failing adult atria and ventricles. *Am J Physiol – Heart Circ Physiol* 280: 1814–1820.
<https://doi.org/10.1152/ajpheart.2001.280.4.h1814>
 42. *Bogaard HJ, Abe K, Noordegrmaf AV, Voelkel NF* (2009) The right ventricle under pressure. *Chest* 135: 794–804.
<https://doi.org/10.1378/chest.08-0492>
 43. *Gupta MP* (2007) Factors controlling cardiac myosin-isoform shift during hypertrophy and heart failure. *J Mol Cell Cardiol* 43: 388–403.
<https://doi.org/10.1038/jid.2014.371>
 44. *Klinova SV, Minigalieva IA, Privalova LI, Valamina IE, Makeyev OH, Shuman EA, Korotkov AA, Panov VG, Sutunkova MP, Ryabova JV, Bushueva TV, Shitin TN, Gurvich VB, Katsnelson BA* (2020) Further verification of some postulates of the combined toxicity theory: New animal experimental data on separate and joint adverse effects of lead and cadmium. *Food Chem Toxicol* 136: 110971.
<https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.110971>

Influence of Chronic Lead Intoxication on Functional Characteristics and Isoform Composition of Left Ventricular Myosin in Rats**O. P. Gerzen^{a, *}, S. R. Nabiev^a, and L. V. Nikitina^a**^a*Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Yekaterinburg, Russia***e-mail: o.p.gerzen@gmail.com*

The chronic lead intoxication was induced by the administration of intraperitoneal injections of lead acetate to outbred rats 3 times a week for 5 weeks. Using an *in vitro* motility assay, it was shown that lead intoxication causes changes in actin-myosin interaction *in vitro*, in particular, a decrease in the maximum sliding velocity of native thin filaments along myosin isolated from the myocardium of the left ventricle of the rat heart. No statistically significant changes were found in the calcium sensitivity and cooperativity of the “*p*Ca-velocity” curve, the characteristics of the fraction of motile filaments and isometric force. Using electrophoretic separation of proteins, a shift in the ratio of myosin heavy chains towards β -chains with slower ATPase activity was found.

Keywords: actin-myosin interaction, cardiotoxicity, lead, *in vitro* motility assay

**ВЛИЯНИЕ ПРИНУДИТЕЛЬНЫХ БЕГОВЫХ НАГРУЗОК
НА СОДЕРЖАНИЕ МИОКИНОВ В СКЕЛЕТНЫХ МЫШЦАХ МЫШЕЙ
С МОДЕЛЬЮ САХАРНОГО ДИАБЕТА II ТИПА**

© 2021 г. А. Н. Захарова¹, Т. А. Кироненко¹, К. Г. Милованова¹, А. А. Орлова¹,
Е. Ю. Дьякова¹, Ю. Г. Калининкова¹, А. В. Чибалин^{1,3}, Л. В. Капилевич^{1,2,*}

¹Национальный исследовательский Томский государственный университет, Томск, Россия

²Сибирский государственный медицинский университет, Томск, Россия

³Департамент молекулярной медицины и хирургии, секция интегративной физиологии
Каролинский институт, Стокгольм, Швеция

*E-mail: kapil@yandex.ru

Поступила в редакцию 16.01.2021 г.

После доработки 23.02.2021 г.

Принята к публикации 03.03.2021 г.

Изучено влияние принудительных беговых нагрузок на содержание некоторых цитокинов в скелетных мышцах мышей с моделью сахарного диабета II типа. Для формирования модели заболевания использовалась высокожировая диета; физические нагрузки в виде принудительного бега проводились в течение 4-х недель. Концентрация миокинов в мышечной ткани *m. gastrocnemius* определялась методом иммуноферментного анализа. Формирование диабета у мышей сопровождалось возрастанием концентрации IL-6 и снижением концентрации IL-15 в мышечной ткани. Принудительные беговые нагрузки по-разному влияли на содержание миокинов в мышечной ткани у здоровых и больных мышей. У здоровых животных наблюдалось снижение концентрации IL-6 и IL-15 и увеличение концентрации лейкомиа-ингибирующего фактора (LIF) в мышечной ткани после 4-х недель регулярного принудительного бега. В то же время у мышей с диабетом концентрации IL-6 и IL-15 после нагрузок возрастала, а LIF – напротив, снижалась. Концентрация NRP3 в мышечной ткани мышей оказалась нечувствительной ни к формированию сахарного диабета, ни к регулярному принудительному бегу.

Ключевые слова: миокины, цитокины, мышцы, беговая нагрузка, сахарный диабет II типа

DOI: 10.31857/S0869813921060157

Скелетные мышцы традиционно рассматривались как важная часть опорно-двигательного аппарата, которая обеспечивает выполнение локомоций, активности за счет потребления энергетических ресурсов [1]. В то же время уже довольно давно появились сведения, что на фоне физической активности повышается содержание в плазме крови ряда цитокинов, в том числе фактора некроза опухолей TNF- α , интерлейкинов IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-15 и лейкомиа-ингибирующего фактора (LIF) [2–5]. В начале 2000-х годов было установлено, что скелетные мышцы способны продуцировать IL-6, с чем связано возрастание его содержания в плазме крови после физической нагрузки [6]. Этот факт подтверждался выявлением транскрипции IL-6 mRNA в ядрах мышечных клеток, выделенных из биоптатов чело-

веческих мышц после выполнения однократного упражнения [7]. В последующее десятилетие сформировалось представление об эндокринной функции скелетных мышц, благодаря которой они способны продуцировать цитокины и другие пептиды [8]. Многие исследователи обозначают эти соединения как миокины, отмечая их способность оказывать различные физиологические эффекты [9–11].

Сахарный диабет II типа (СД II) считают одной из важнейших проблем современности, на него приходится около 90% случаев диабета. Его патогенез связан с резистентностью к инсулину в периферических тканях и, вследствие этого, с возрастанием концентрации глюкозы в крови [12–14]. Несмотря на значительное количество исследований метаболизма глюкозы, молекулярные механизмы его регуляции в норме и патологии остаются недостаточно изученными [15]. Особенно актуальным остается и вопрос немедикаментозного лечения метаболических расстройств, в том числе и при помощи физических нагрузок. Метаболические изменения под влиянием физических нагрузок – очень сложный процесс, который одновременно включает интегративные и адаптивные реакции в нескольких тканях и органах на клеточном и системном уровне [16].

Мышечная ткань является основным потребителем энергии, где химическая энергия жирных кислот и глюкозы преобразуется в механическую [17]. Кроме того, белковые сигнальные молекулы, продуцируемые мышцами при сокращении – миокины – оказывают значительное влияние на обмен глюкозы и механизмы инсулинорезистентности. Спектр вырабатываемых миокинов и их роль в метаболических процессах достаточно разнообразна. Миокины с помощью противовоспалительного воздействия на сами мышцы могут противодействовать резистентности к инсулину [18]. Кроме того, при физических упражнениях экспрессируются белковые молекулы, вовлеченные в процессы гликолиза и метаболизм аминокислот [19]. Следует отметить, что физическая активность оказывает естественное противовоспалительное действие и способствует улучшению метаболизма [20]. Поэтому мышечной ткани может принадлежать значительная роль в коррекции метаболических нарушений. В предыдущих исследованиях нами было доказано, что содержание в крови некоторых цитокинов (IL-6, IL-8, IL-15, LIF) при различных физических нагрузках изменяется неодинаково [21, 22]. Поэтому предполагается, что эндокринные эффекты мышечной ткани также разнообразны в зависимости от режимов мышечного сокращения.

Одной из моделей формирования диабета является содержание животных на высокожировой диете. Питание с высоким содержанием жиров может привести к ожирению, гиперинсулинемии и измененному гомеостазу глюкозы из-за недостаточной компенсации со стороны островков [23]. Поскольку ожирение в этом случае вызвано манипуляциями с питанием, а не с цитотоксическими веществами, считается, что такие модели более сходны с заболеванием у человека.

В связи со всем изложенным целью нашего исследования было изучить влияние физических нагрузок на содержание некоторых цитокинов в скелетных мышцах мышей с моделью сахарного диабета II типа.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В качестве объекта исследования использовались мыши-самцы линии C57bl/6. Мыши были получены из вивария Томского национального исследовательского медицинского центра Российской академии наук, Научно-исследовательского института фармакологии и регенеративной медицины им. Е.Д. Гольдберга. Возраст мышей на момент начала эксперимента составлял 4 нед. Режим содержания жи-

вотных: день/ночь: 12/12 ч., световой день начинался с 6:00, свободный доступ к пище и воде, температура в помещении 24°C.

Исследование проводилось в соответствии с принципами Базельской декларации и было одобрено комиссией по биоэтике Биологического института Томского государственного университета (протокол № 32 от 02.12.2019).

Эксперимент продолжался 16 нед. До 12-й нед. мыши были разделены на 2 группы:

- животные, находившиеся на жировой диете – 14 мышей.
- животные, получавшие стандартный рацион – 14 мышей.

Для формирования модели сахарного диабета II типа (СД II) использовалась высокожировая диета в течение 12 нед., которая была разработана специально для данного эксперимента. Подробно состав и энергетическая ценность корма описаны в нашей предыдущей работе [24].

Первая группа мышей с начала эксперимента питалась специально приготовленным кормом с высокой калорийностью. Вторая группа питалась кормом для лабораторных животных “Прокорм” (ЗАО Биопро, Новосибирск): пшеница, ячмень, отруби, глютен кукурузный, мука рыбная, белковая кормосмесь, масло подсолнечное, шрот соевый; калорийность – 3000 ккал/кг, на долю жиров приходилось 18% калорийности.

Корм для первой группы был приготовлен на основе описанного выше корма “Прокорм” (50%) с включением животного (свиной жир, 20%) и растительного (подсолнечное масло, 10%) жира, сахара (15%), сухого молока (5%); калорийность – 5100 ккал/кг, на долю жиров приходилось 59% калорийности. Продукты измельчались в блендере в гомогенную смесь, после чего масса формировалась в гранулы диаметром до 10 мм и высушивалась в духовом шкафу при 300°C. Корм готовился на 5 дней и хранился при –20°C. В предварительных исследованиях, опубликованных нами ранее [24], было показано, что использование высокожировой диеты у мышей приводит к увеличению массы тела и формированию ожирения, гипергликемии, снижению толерантности к глюкозе и гиперинсулинемии. Все это свидетельствует о высокой степени адекватности разработанной экспериментальной модели заболеванию диабетом II типа.

Начиная с 12-ой нед., каждая группа животных была поделена на две подгруппы – подвергавшихся (основная) и не подвергавшихся (контрольная) принудительным беговым нагрузкам.

Для нормирования нагрузки была использована разработанная по нашему заказу беговая дорожка для мышей BMELAB SID-TM10 [25]. Принуждение к бегу осуществлялось электрическим раздражением, напряжение подавалось на металлическую сетку, расположенную на задней стенке камеры. Дорожка имела тумблер включения ленты, тумблер включения тока, диммер скорости движения ленты и диммер силы тока, рычаг изменения угла наклона ленты. Мыши на дорожке были изолированы друг от друга стенками из оргстекла. Покрытие движущейся ленты имело резиновую шероховатую поверхность. Сверху дорожка закрывалась прозрачной крышкой из оргстекла.

Принудительные беговые нагрузки проводились в течение 4-х нед. 6 раз в нед. в период с 8-00 до 10-00, продолжительность нагрузки постепенно увеличивалась в течение первых 6-ти дней с 10-ти до 60-ти мин (прирост 10 мин в день) и не изменялась больше на протяжении следующих 3-х нед. Каждую неделю изменялся угол подъема полотна беговой дорожки (от 0° до 10°) и скорость ее вращения (от 15 до 18 м/мин). Один раз в неделю нагрузки не выполнялись (на 7-й день).

Умерщвление экспериментальных животных проводилось методом декапитации через 24 ч после последней нагрузки. С обеих задних конечностей отпрепаро-

вывались *m. gastrocnemius*, мышечная ткань очищалась от соединительной и жировой ткани и замораживалась в жидком азоте. Собранные образцы хранились в морозильной камере при температуре -80°C .

Навеска ткани массой 18 мг отделялась на холоде, ткань измельчалась на более мелкие фрагменты и помещалась в пробирку с лизирующим буфером и 3 железными шариками для гомогенизации размером 0.3 мм. Состав лизирующего буфера: (мМ) NaCl – 137, KCl – 2.7, MgCl₂ – 1, трис(гидроксиметил)аминометана pH 7.8–20, этилендиаминтетрауксусная кислота – 1, дитиотриэтол – 1, пиродифосфат натрия – 5, бензмидин – 1, фенолметилсульфонил фторид – 0.2, фторид натрия – 10; Тритон X-100 – 1%, глицерол – 10%, леупептин – 1 мкг/мл.

Гомогенизация образцов проводилась при 2850 об/мин в течение 15 мин с использованием лабораторного гомогенизатора TissueLyser LT (Qiagen, Германия). Затем для более качественного растворения пробирки с образцами, лизирующим раствором и 3 шариками для гомогенизации помещались на качалку и инкубировались (лизировались) в течение 1 ч при 4°C . По истечению указанного времени из пробирки извлекались шарики при помощи магнита. Все процедуры проводились на холоде. Затем пробирки с образцами центрифугировались при 10000 g в течение 5 мин при 4°C .

Для определения общего белка в образце использовали метод Bradford (стандарты готовились в концентрации от 0 до 0.25 мг/мл, хранение готовых образцов осуществлялось при -80°C). Из полученного гомогената готовили разведение в 20 и 40 раз. Затем 10 мкл пробы 20- и 40-кратного разведения в 2-х повторах добавляли в плоскодонную плашку для иммуноферментного анализа (ИФА), добавляли по 200 мкл раствора Bradford и инкубировали 5 мин. Измерение оптической плотности проводили при 620 нм на микропланшетном спектрофотометре (Anthos 2010).

Определение концентрации цитокинов в растворе производили методом ИФА. Были использованы наборы для ИФА с антителами к соответствующим белкам: интерлейкин 6 (IL-6), нейтрофил-активирующий белок 3 (Neutrophil Activating Protein 3 – NAP3, он же хемокиновый лиганд 1 – CXCL-1), лейкозингибирующий фактор (LIF) – Platinum ELISA Kit, (eBioscience, Австрия); интерлейкин 15 (IL-15) – RayBio® IL-15 ELISA Kit (RayBio®, США).

Статистическая обработка данных проводилась с использованием пакета статистического анализа STATISTICA 8.0. Достоверность рассчитывали по Kruskal–Wallis ANOVA test. Данные представлены в виде $\text{Xcp} \pm \text{SE}$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Концентрация IL-6 в мышечной ткани у мышей, питавшихся стандартным кормом, под влиянием хронических принудительных физических нагрузок снижалась более чем в три раза (рис. 1). В то же время у мышей с моделью СД II концентрация IL-6 в мышцах исходно была на 20% выше, чем у интактных животных. Принудительные физические нагрузки у этих мышей потенцировали дальнейший рост концентрации IL-6 в мышцах – она возрастала еще на 15% (рис. 1).

IL-6 относится к числу наиболее известных воспалительных цитокинов. Он синтезируется активированными моноцитами/макрофагами, фибробластами, эндотелиальными клетками при воспалении, травмах, гипоксии, воздействии бактериальных эндотоксинов [26]. Биологическая роль IL-6, в первую очередь, заключается в индукции восстановительных механизмов и активации иммунной защиты. Кроме того, известно угнетающее действие IL-6 на воспалительную реакцию путем торможения синтеза фактора некроза опухоли TNF α [27].

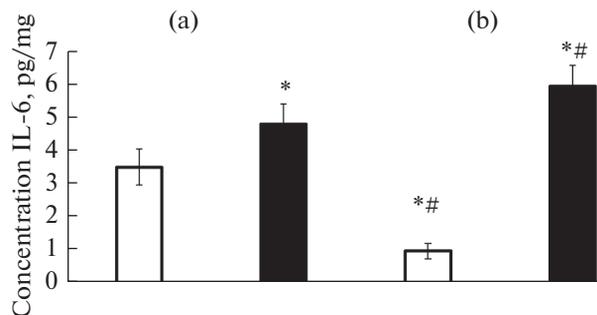


Рис. 1. Концентрация IL-6 в мышечной ткани мышей.

По оси ординат – концентрация цитокина, пг/мг белка.

(a) – контрольная группа (без принудительных нагрузок).

(b) – основная группа (животные, подвергавшиеся принудительному бегу). Светлые столбики – животные, получавшие стандартный рацион, темные столбики – животные, находившиеся на жировой диете.

Данные представлены в виде $\bar{X} \pm SE$.

– достоверность различий между основной и контрольной группой, $p < 0.05$;

* – достоверность различий между группами со стандартным и жировым рационом, $p < 0.05$.

В настоящее время установлена роль IL-6 в регуляции обмена веществ. В жировых клетках IL-6 усиливает окисляцию жира, а также стимулирует секрецию и активность липопротеинлипазы. В клетках печени IL-6 способствует высвобождению глюкозы, стимулирует расщепление гликогена [11].

В мышечных клетках IL-6, наоборот, усиливает эффекты инсулина, стимулирует усвоение глюкозы. При физических упражнениях IL-6 является медиатором продуцирования глюкозы. Также было показано, что IL-6 может активировать АМФ-зависимые протеинкиназы для стимуляции липолиза и окисления жиров [9]. Таким образом, IL-6 оказывает эндокринные эффекты, обеспечивая увеличение производства энергии через увеличение продукции глюкозы в печени и стимуляции липолиза в жировой ткани [28].

Концентрация IL-15 в мышечной ткани у мышей, питавшихся стандартным кормом, под влиянием хронических принудительных физических нагрузок снижалась вдвое (рис. 2). В то же время у мышей с моделью СД II концентрация IL-15 в мышцах исходно была снижена на 30%. Принудительные физические нагрузки у этих мышей, в отличие от питавшихся стандартным кормом, потенцировали повышение концентрации IL-15 в мышцах – она возростала на 10% (рис. 2).

IL-15 называют вездесущим цитокином, так как он активно экспрессируется множеством клеток в различных тканях и органах, участвует в процессах созревания, выживания и дифференцировки не только иммунокомпетентных, но и многих других клеток [29]. Показано, что IL-15 снижает отложение липидов в преадипocyтах и массу белой жировой ткани [30]. Можно предполагать, что увеличение концентрации IL-15 в мышечной ткани мышей с СД II может потенцировать миогенез и энергообмен.

Концентрация LIF в мышечной ткани у мышей, питавшихся стандартным кормом, под влиянием хронических принудительных физических нагрузок возрастала на 15% (рис. 3). В то же время у мышей с моделью СД II концентрация LIF в мышцах исходно не отличалась от интактных животных. Принудительные физические

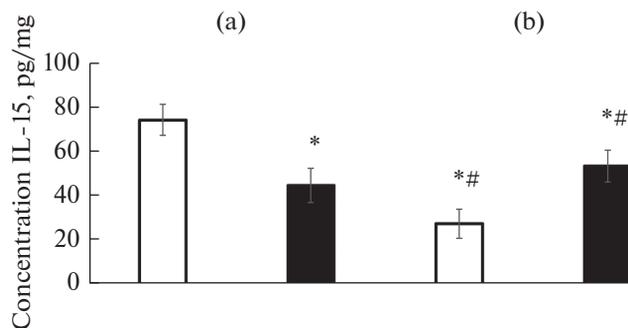


Рис. 2. Концентрация IL-15 в мышечной ткани мышей.

Обозначения те же, что на рис. 1.

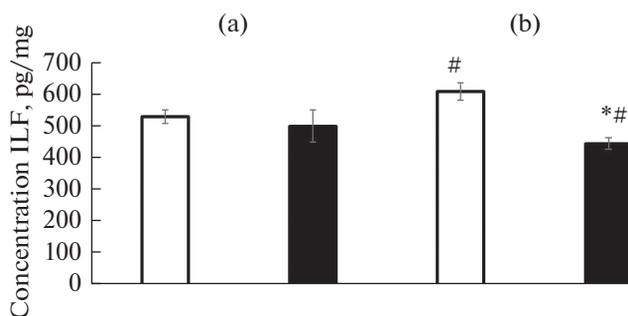


Рис. 3. Концентрация LIF в мышечной ткани мышей.

Обозначения те же, что на рис. 1.

нагрузки у этих мышей потенцировали снижение концентрации LIF в мышцах — она уменьшалась на 10% (рис. 3).

LIF индуцирует пролиферацию клеток, которые считаются необходимыми для гипертрофии и регенерации мышц [31, 32]. В связи с вышеизложенным, в настоящее время широко обсуждается роль интерлейкинов и других миокинов в патогенезе и терапии метаболических нарушений, заболеваний сердечно-сосудистой системы, легких и опорно-двигательного аппарата [9, 33]. Возможно, именно с этими эффектами связаны противоположно направленные изменения концентрации LIF в мышечной ткани здоровых и больных СД II мышей.

Концентрация NAR3 в мышечной ткани у мышей, питавшихся стандартным кормом, и у мышей с моделированием СД II достоверно не различалась, хотя отмечена тенденция к увеличению ее у больных животных. Физические нагрузки также не оказывали достоверного влияния на содержание NAR3 в мышечной ткани (рис. 4).

Существует предположение, что некоторые из хемокинов продуцируются мышечными клетками в процессе сокращения [34]. Выработка CXCL1 мышцами и его содержание в сыворотке крови значительно увеличивается в ответ на однократную физическую нагрузку [35]. Однако, по всей вероятности, указанные эффекты проявляются только при острой однократной физической нагрузке и не регистрируются при длительных хронических воздействиях.

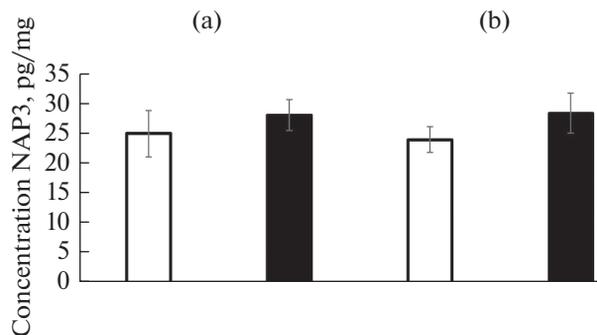


Рис. 4. Концентрация NAP3 в мышечной ткани мышей.

Обозначения те же, что на рис. 1.

Особенности влияния физической нагрузки на содержание миокинов в мышечной ткани у мышей могут быть связаны с различиями в клеточном составе мышц. Скелетная мышца весьма гетерогенна — кроме миоцитов она содержит целый ряд клеток — фибробласты, перициты, адипоциты, чей вклад в общий объем производства цитокинов определен недостаточно [36]. Относительное содержание этих клеток, а также их вовлечение в вызванную физической нагрузкой продукцию цитокинов может отличаться у здоровых животных и у животных с моделью СД II. В дополнение к гетерогенности ткани, было показано, что скелетные миоциты могут быть подразделены на 3 различных фенотипа, каждый из которых имеет свои особенности биоэнергетических механизмов, при СД II преобладают так называемые белые мышечные волокна и снижается доля красных волокон [37].

Еще один механизм, обеспечивающий описанные различия, может быть связан с особенностями транскрипционных механизмов. Показано, что транскрипционные изменения при сокращении мышц наиболее выражены в быстро сокращающихся мышечных волокнах типа IIa [38], доля которых у больных СД II увеличивается, что также, несомненно, отражается на интенсивности продукции миокинов.

Также весьма вероятным является участие в регуляции продукции миокинов диссипации мембранных ионных градиентов. Повышение концентрации внутриклеточного кальция от ~ 0.1 до 1 мкМ при сокращении влияет на экспрессию многих генов, то есть является важным фактором запуска транскрипционных механизмов [39–41]. Введение крысам в камбаловидную мышцу Ca^{2+} -ионофора иономицина в течение одного часа приводит к пятикратному увеличению IL-6 mRNA [42]. Воздействие на C2C12 миобласты Ca^{2+} -ионофором A23187 резко увеличивало транскрипцию IL-6 mRNA [43]. Используя ту же модель упражнений *in vitro*, было показано, что внеклеточный Ca^{2+} -хелатор EGTA снижает в два раза накопление CXL при электрической стимуляции [44].

Возбуждение миоцитов сопровождается изменением трансмембранного градиента одновалентных катионов вследствие притока Na^+ и оттока K^+ через потенциал-зависимые и Ca^{2+} -чувствительные ионные каналы. В мышечных клетках человека и экспериментальных животных длительные упражнения приводят к увеличению $[\text{Na}^+]_i$ в 3–4 раза и снижению $[\text{K}^+]_i$ на 50%, что сопровождается повышением $[\text{K}^+]_o$ в плазме и межклеточной жидкости [45]. Это позволяет предположить, что

увеличение соотношения $[Na^+]_i/[K^+]_i$ является фактором, стимулирующим продукцию миокинов [38, 45]. В некоторых типах клеток повышение соотношения $[Na^+]_i/[K^+]_i$ приводило к экспрессии mRNA ряда цитокинов, в том числе IL-6 [46].

ОГРАНИЧЕНИЯ

Основное ограничение в трактовке результатов данного исследования связано с дифференцировкой источников продукции цитокинов в мышечной ткани. Как мы упоминали в обсуждении, такими источниками могут являться как мышечные клетки, так и другие типы клеток, в том числе, инфильтрирующие мышечную ткань макрофаги или другие иммунные клетки. Однако многочисленные исследования, в том числе и наши собственные исследования на культуре миобластов, ссылки на которые приведены выше, непосредственно подтверждают значительное усиление продукции цитокинов именно мышечными клетками при физической нагрузке. Очевидно, что вклад “мышечной компоненты” в продукцию цитокинов в мышечной ткани значителен.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Подводя итог сказанному, следует отметить, что формирование СД II у мышей сопровождается возрастанием концентрации IL-6 и снижением концентрации IL-15 в мышечной ткани. Физические нагрузки по-разному влияют на содержание миокинов в мышечной ткани у здоровых и больных СД II мышей. У здоровых животных наблюдается снижение концентрации IL-6 и IL-15 и увеличение концентрации LIF в мышечной ткани после 4 нед. регулярного принудительного бега. В то же время у мышей с СД II концентрации IL-6 и IL-15 после нагрузок возрастала, а LIF – напротив, снижалась. Концентрация NAR3 в мышечной ткани мышей оказалась нечувствительной ни к формированию СД II, ни к регулярному принудительному бегу.

Обнаруженные различия могут иметь в своей основе целый ряд механизмов. Клеточный состав скелетных мышц и фенотипические особенности мышечных волокон, изменяясь в результате метаболических нарушений и регулярных тренировок, могут модифицировать процессы продукции миокинов. Важное значение также играют особенности транскрипционных механизмов в мышечных волокнах, среди которых наиболее значимыми являются HIF-1 α , $[Ca^{2+}]_i$, $[Na^+]_i/[K^+]_i$ -зависимые пути внутриклеточной сигнализации. Модификация этих механизмов под влиянием метаболических расстройств и физических нагрузок представляет значительный интерес, так как является перспективным путем воздействия на процессы метаболизма как на клеточном, так и на системном уровне, что весьма актуально для поиска новых путей коррекции метаболических расстройств при СД II.

ВКЛАД АВТОРОВ

З.А.Н., Д.Е.Ю., Ч.А.В. и К.Л.В. внесли вклад в разработку концепции и методологии исследования, анализ результатов, написание статьи и редактирование. К.Т.А., М.К.Г., О.А.А. и К.Ю.Г. принимали непосредственное участие в выполнении экспериментальных исследований.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что исследование проводилось при отсутствии каких-либо коммерческих или финансовых отношений, которые могли бы быть истолкованы как потенциальный конфликт интересов.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено за счет гранта РФФИ № 19-15-00118.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Frontera WR, Ochala J (2015) Skeletal muscle: a brief review of structure and function. *Calcif Tissue Int* 96: 183–195.
<https://doi.org/10.1007/s00223-014-9915-y>
2. Sprenger H, Jacobs C, Nain M, Gressner A, Prinz H, Wesemann W, Gemsa D (1992) Enhanced release of cytokines, interleukin-2 receptors, and neopterin after long-distance running. *Clin Immun Immunopathol* 63: 188–195.
[https://doi.org/10.1016/0090-1229\(92\)90012-d](https://doi.org/10.1016/0090-1229(92)90012-d)
3. Drenth JP, Van Uum SH, van Deuren MG, Pesman J, Van der Ven-Jongekrijg J, Van der Meer JW (1995) Endurance run increases circulation IL-6 and IL-1ra but downregulates *ex vivo* TNF- α and IL-1 α production. *J Appl Physiol* 79: 1497–1503.
<https://doi.org/10.1152/jappl.1995.79.5.1497>
4. Nehlsen-Cannarella SL, Fagoaga OR, Nieman DC, Henson DA, Butterworth DE, Schmitt RL, Bailey EM, Warren BJ, Utter A, Davis JM (1997) Carbohydrate and the cytokine response to 2.5 h of running. *J Appl Physiol* 82: 1662–1667.
<https://doi.org/10.1152/jappl.1997.82.5.1662>
5. Ostrowski K, Ronde T, Asp S, Schjerling P, Pedersen BK (1999) Pro- and anti-inflammatory cytokine balance in strenuous exercise in humans. *J Physiol* 515: 287–291.
<https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.1999.287ad.x>
6. Steensberg A, van Hall G, Osada T, Sacchetti M, Saltin B, Pedersen B (2000) Production of interleukin-6 in contracting human skeletal muscles can account for the exercise-induced increase in plasma interleukin-6. *J Physiol* 529: 237–242.
<https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.2000.00237.x>
7. Keller C, Steensberg A, Pilegaard H, Osada T, Saltin B, Pedersen BK, Neufer PD (2001) Transcriptional activation of the IL-6 gene in human contracting skeletal muscle: influence of muscle glycogen content. *FASEB J* 15: 2748–2750.
<https://doi.org/10.1096/fj.01-0507fje>
8. Капилевич ЛВ, Кабачкова АВ, Захарова АН, Лалаева ГС, Кироненко ТА, Дьякова ЕЮ, Орлов СН (2016) Секреторная функция скелетных мышц: механизмы продукции и физиологические эффекты миокинов. *Успехи физиол наук* 47(2): 7–26. [Kapilevich LV, Kabachkova AV, Zakharova AN, Lalaeva GS, Kironenko TA, Dyakova EYu, Orlov SN (2016) Secretory Function of Skeletal Muscles: Producing Mechanisms and Myokines Physiological Effects. *Uspekhi Fiziol Nauk* 47(2): 7–26. (In Russ)]. PMID: 27530041
9. Pedersen BK, Febbraio MA (2008) Muscle as an endocrine organ: focus on muscle-derived interleukin-6. *Physiol Rev* 88: 1379–1406.
<https://doi.org/10.1152/physrev.90100.2007>
10. Iizuka K, Machida T, Hirafuji M (2014) Skeletal muscle is an endocrine organ. *J Pharmacol Sci* 125: 125–131.
<https://doi.org/10.1254/jphs.14r02cp>
11. Pedersen BK, Febbraio MA (2012) Muscles, exercise and obesity: skeletal muscle as a secretory organ. *Nat Rev Endocrinol* 8: 457–465.
<https://doi.org/10.1038/nrendo.2012.49>
12. Groop LC, Eriksson JG (1992) The etiology and pathogenesis of non-insulin-dependent diabetes. *Ann Med* 24(6): 483–489.
<https://doi.org/10.1002/dmr.5610090503>
13. Fujimaki S, Kuwabara T (2017) Diabetes-induced dysfunction of mitochondria and stem cells in skeletal muscle and the nervous system. *Int J Mol Sci* 18(10): 2147.
<https://doi.org/10.3390/ijms18102147>
14. Højlund K (2014) Metabolism and insulin signaling in common metabolic disorders and inherited insulin resistance. *Dan Med J* 61(7): B4890. PMID: 25123125

15. Nagy C, Einwallner E (2018) Study of In vivo glucose metabolism in high-fat diet-fed mice using oral glucose tolerance test (OGTT) and insulin tolerance test (ITT). *J Vis Exp* 7(131): 1–12. <https://doi.org/10.3791/56672>
16. Huh JY (2018) The role of exercise-induced myokines in regulating metabolism. *Arch Pharm Res* 41(1): 14–29. <https://doi.org/10.1007/s12272-017-0994-y>
17. Meneilly GS (2001) Pathophysiology of diabetes in the elderly. In: *Diabetes in old age*. John Wiley & Sons 155–164. <https://doi.org/10.1002/0470842326.ch2>
18. Brandt C, Pedersen BK (2010) The role of exercise-induced myokines in muscle homeostasis and the defense against chronic diseases. *J Biomed Biotechnol* 520258. <https://doi.org/10.1155/2010/520258>
19. Hansen JS, Zhao X, Irmner M, Liu X, Hoene M, Scheler M, Li Y, Beckers J, Hrab de Angelis M, Häring HU, Pedersen BK, Lehmann R, Xu G, Plomgaard P, Weigert C (2015) Type 2 diabetes alters metabolic and transcriptional signatures of glucose and amino acid metabolism during exercise and recovery. *Diabetologia* 58: 1845–1854. <https://doi.org/10.1007/s00125-015-3584-x>
20. Karstoft K, Pedersen BK (2016) Exercise and type 2 diabetes: focus on metabolism and inflammation. *Immunol Cell Biol* 94: 146–150. <https://doi.org/10.1038/icb.2015.101>
21. Kapilevich L, Zakharova A, Kabachkova A, Kironenko T, Milovanova K, Orlov S (2017) Different impact of physical activity on plasma myokines content in athletes and untrained volunteers. *FEBS J* 284(1): 373–373. WOS:000409918904202
22. Kapilevich LV, Zakharova AN, Kabachkova AV, Kironenko TA, Orlov SN (2017) Dynamic and static exercises differentially affect plasma cytokine content in elite endurance- and strength-trained athletes and untrained volunteers. *Front Physiol* 8: 35. <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00035>
23. Winzell MS, Ahren B (2004) The high-fat diet-fed mouse: a model for studying mechanisms and treatment of impaired glucose tolerance and type 2 diabetes. *Diabetes* 53(3): S215–S219. https://doi.org/10.2337/diabetes.53.suppl_3.s215
24. Kapilevich LV, Zakharova AN, Dyakova EYu, Kalinnikova JG, Chibalin AV (2019) Mice experimental model of diabetes mellitus type ii based on high fat diet. *Bull Siberian Med* 18(3): 53–61. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-3-53-61>
25. Zakharova AN, Kalinnikova Y, Negodenko ES, Orlova AA, Kapilevich LV (2020) Experimental simulation of cyclic training loads. *Teor Prakt Fizich Kult* 10: 26–27.
26. Шварц В (2009) Регуляция метаболических процессов интерлейкином-6. Цитокины и воспаление 3: 3–10 [*Schwartz V* (2009) Regulation of metabolic processes by interleukin-6. *Cytokines and Inflamm* 3:3–10. (In Russ)].
27. Pedersen BK, Steensberg A, Fischer C, Keller C, Keller P, Plomgaard P, Febbraio M, Saltin B (2003) Searching for the exercise factor: is IL-6 a candidate? *J Muscle Res Cell Motil* 24(2–3): 113–119. <https://doi.org/10.1023/a:1026070911202>
28. Pedersen BK, Fischer CP (2007) Beneficial health effects of exercise: the role of IL-6 as a myokine. *Trends Pharmacol Sci* 28: 152–156. : <https://doi.org/10.1016/j.tips.2007.02.002>
29. Малашенкова ИК, Казанова ГВ, Дидковский НА (2014) Интерлейкин-15: строение, сигналинг и роль в иммунной защите. *Молек мед* 3: 9–20. [*Malashenkova IK, Casanova GV, Didkovsky NA* (2014) Interleukin-15: structure, signaling and role in immune defense. *Molec Med* 3: 9–20. (In Russ)].
30. Quinn LS, Strait-Bodey L, Anderson BG, Argilés JM, Havel PJ (2005) Interleukin-15 stimulates adiponectin secretion by 3T3-L1 adipocytes: evidence for a skeletal muscle-to-fat signaling pathway. *Cell Biol Int* 29: 449–457. <https://doi.org/10.1016/j.cellbi.2005.02.005>
31. Broholm C, Pedersen BK (2010) Leukemia inhibitory factor – an exercise-induced myokine. *Exerc Immunol Rev* 16: 77–85. PMID:20839492
32. Srikuea R, Esser KA, Pholpramool C (2011) Lckemia factor is expressed in rat gastrocnemius muscle after confusion and increases proliferation of rat L6 myoblasts via c-Myb signalling. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 38: 501–509. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1681.2011.05537.x>
33. Pedersen BK, Saltin B (2015) Exercise as medicine – evodence for prescribing exercise as therapy in 26 different chronic diseases. *Scand J Med Sci Sports* 25: 1–72. <https://doi.org/10.1111/sms.12581>
34. Pedersen L, Pilegaard H, Hansen J, Brandt C, Adser H, Hidalgo J, Olesen J, Pedersen BK, Hojman P (2011) Exercise-induced liver chemokine CXCL-1 expression is linked to muscle-derived interleu-

- kin-6 expression *J Physiol* 589(6): 1409–1420.
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.2010.200733>
35. Pedersen L, Olsen CH, Pedersen BK, Hojman P (2012) Muscle-derived expression of the chemokine CXCL1 attenuates diet-induced obesity and improves fatty acid oxidation in the muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 302(7): 831–840.
<https://doi.org/10.1152/ajpendo.00339.2011>
 36. Peake JM, Gatta PD, Suzuki K, Nieman DC (2015) Cytokine expression and secretion by skeletal muscle cells: regulatory mechanisms and exercise effects. *Exercise Immunol Rev* 21: 8–25. PMID: 25826432
 37. Fitts RH, Widrick JJ (1996) Muscle mechanics: adaptations with exercise-training. *Exerc Sport Sci Rev* 24: 427–473. PMID: 8744258
 38. Raue U, Trappe TA, Estrem ST, Qian H-R, Helvering LM, Smith RC, Trappe S (2012) Transcriptional signature of resistance exercise adaptations: mixed muscle and fiber type specific profiles in young and old adults. *J Appl Physiol* 112: 1625–1636.
<https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00435.2011>
 39. Gundersen K (2011) Excitation-transcription coupling in skeletal muscle: the molecular pathways of exercise. *Biol Rev* 86: 564–600.
<https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.2010.00161.x>
 40. Kapilevich LV, Kironenko TA, Zaharova AN, Kotelevtsev YV, Dulin NO, Orlov SN (2015) Skeletal muscle as an endocrine organ: role of $[Na^+]_i/[K^+]_i$ -mediated excitation-transcription coupling. *Gen Dis* 2: 328–336.
<https://doi.org/10.1016/j.gendis.2015.10.001>
 41. Ma H, Groth RD, Wheeler DG, Barrett CF, Tsien RW (2011) Excitation-transcription coupling in sympathetic neurons and the molecular mechanism of its initiation. *Neurosci Res* 70: 2–8.
<https://doi.org/10.1016/j.neures.2011.02.004>
 42. Holmes AG, Watt MJ, Carey AL, Febbraio MA (2004) Ionomycin, but not physiological doses of epinephrine, stimulates skeletal muscle interleukin-6 mRNA expression and protein release. *Metabolism* 53: 1492–1495.
<https://doi.org/10.1016/j.metabol.2004.05.015>
 43. Whitham M, Chan MHS, Pal M, Matthews VB, Prelovsek O, Lunke S, El-Osta A, Broenneke H, Alber J, Brüning JC, Wunderlich FT, Lancaster GI, Febbraio MA (2012) Contraction-induced interleukin-6 gene transcription in skeletal muscle is regulated by c-Jun terminal kinase/activator protein-1. *J Biol Chem* 287: 10771–10779.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M111.31058>
 44. Nedachi T, Hatakeyama H, Kono T, Sato M, Kanzaki M (2009) Characterization of contraction-inducible CXC chemokines and their roles in C2C12 myocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 297: E866–E878. :
<https://doi.org/10.1152/ajpendo.00104.2009>
 45. McKenna MJ, Bangsbo J, Renaud JM (2008) Muscle K^+ , Na^+ , and Cl^- disturbances and Na^+ - K^+ pump inactivation: implications for fatigue. *J Appl Physiol* 104: 288–295.
<https://doi.org/10.1152/jappphysiol.01037.2007>
 46. Koltsova SV, Trushina Y, Haloui M, Akimova OA, Tremblay J, Hamet P, Orlov SN (2012) Ubiquitous $[Na^+]_i/[K^+]_i$ -sensitive transcriptome in mammalian cells: evidence for $[Ca^{2+}]_i$ -independent excitation-transcription coupling. *PLoS One* 7: e38032.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038032>

Effect of Treadmill Running Exercise Training on the Content of Myokines in the Skeletal Muscles of Mice with Type II Diabetes Mellitus Model

A. N. Zakharova^a, T. A. Kironenko^a, K. G. Milovanova^a, A. A. Orlova^a, E. Yu. Dyakova^a,
 Yu. G. Kalinnikova^a, A. V. Chibalin^{a, c}, and L. V. Kapilevich^{a, b, *}

^aNational Research Tomsk State University, Tomsk, Russia

^bSiberian State Medical University, Tomsk, Russia

^cDepartment of Molecular Medicine and Surgery, Integrative Physiology, Karolinska Institute, Stockholm, Sweden

*e-mail: kapil@yandex.ru

The effect of treadmill running exercise training on the content of some cytokines in the skeletal muscles of mice with a model of type II diabetes mellitus was studied. To develop a model of the disease, a high fat feeding for 12 weeks was used, physical activity in the form of forced running was carried out for 4 weeks. The concentration of myokines

in the muscle tissue of *m. gastrocnemius* was determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The development of diabetes in mice is accompanied by an increase in the concentration of inflammatory cytokines IL-6 and a decrease in the concentration of IL-15 in skeletal muscle tissue. 4 weeks treadmill running exercise training has a different effect on the content of myokines in healthy and sick mice. In healthy animals, there was a decrease in IL-6 and IL-15 concentration and an increase in LIF concentration in skeletal muscle tissue after 4 weeks of regular forced running. At the same time, in diabetic mice, the concentrations of IL-6 and IL-15 increased after exercise, while LIF, on the contrary, decreased. The concentration of NAP3 in the skeletal muscle tissue of mice was insensitive to either the formation of diabetes mellitus II or to regular treadmill running exercise training.

Keywords: myokines, cytokines, muscles, physical activity, diabetes mellitus

**СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ОБУСЛОВЛЕННЫХ ВОЗРАСТОМ
ИЗМЕНЕНИЙ СТРУКТУРЫ МИТОХОНДРИАЛЬНОГО АППАРАТА
СКЕЛЕТНЫХ МЫШЦ ВИДОВ С РАЗЛИЧНОЙ
ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТЬЮ ЖИЗНИ**

© 2021 г. В. Б. Вайс¹, И. М. Вангели¹, Ч. М. Эльдаров¹, Л. Е. Бакеева¹ *

¹НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, МГУ им. М.В. Ломоносова,
Москва, Россия

*E-mail: bakeeva@belozersky.msu.ru

Поступила в редакцию 28.01.2021 г.

После доработки 23.03.2021 г.

Принята к публикации 24.03.2021 г.

Методами электронной микроскопии и морфометрии проведен сравнительный анализ возрастных изменений ультраструктуры митохондриального аппарата скелетной мышцы у представителей видов с различной программой старения: короткоживущих, хорошо изученных классических видов – мыши (C57BL/6), крысы Вистар; преждевременно стареющих крыс OXYS; а также животных с замедленным старением – голый землекоп (*Heterocephalus glaber*). Показано, что у мышшей обусловленные возрастом преобразования общей организации митохондриального аппарата скелетной мышцы соответствуют изученным ранее для крыс Вистар: митохондриальный ретикулум формируется к 2.5–3-месячному возрасту, к 30-месячному возрасту происходит значительная редукция митохондриального аппарата, в результате снижения числа митохондрий, количество сечений митохондрий в мышечном волокне снижается почти в 2 раза – с 0.45 ± 0.07 до 0.23 ± 0.02 шт на $\mu\text{м}^2$. Деструктивные изменения ультраструктуры митохондрий не обнаружены, в отличие от крыс OXYS, у которых возрастные изменения хондриома затрагивают как общую структуру митохондриального аппарата мышечных волокон, так и внутреннюю ультраструктуру органелл. В то же время у схожего с мышшами по размеру мелкого грызуна *Heterocephalus glaber* к пятилетнему возрасту количество и размер митохондрий в скелетной мышце значительно возрастает, однако митохондриальный ретикулум не формируется. Предполагается, что особая организация митохондриального аппарата скелетной мышцы голого землекопа обеспечивает необходимый уровень окислительно-восстановительных процессов в мышцах, предупреждая снижение работоспособности и развития саркопении, в отличие от мышшей, крыс Вистар и OXYS, где обусловленные возрастом нарушения структурной организации митохондриального аппарата скелетной мышцы могут являться одной из основных причин развития возраст-зависимых патологий и, в частности, саркопении.

Ключевые слова: скелетная мышца, старение, митохондрии, электронная микроскопия

DOI: 10.31857/S0869813921060133

В настоящее время метаболические процессы, развивающиеся с возрастом в скелетных мышцах, достаточно хорошо изучены. Происходящее с возрастом постепенное ослабление мышечной функции (саркопении) связывают, прежде всего,

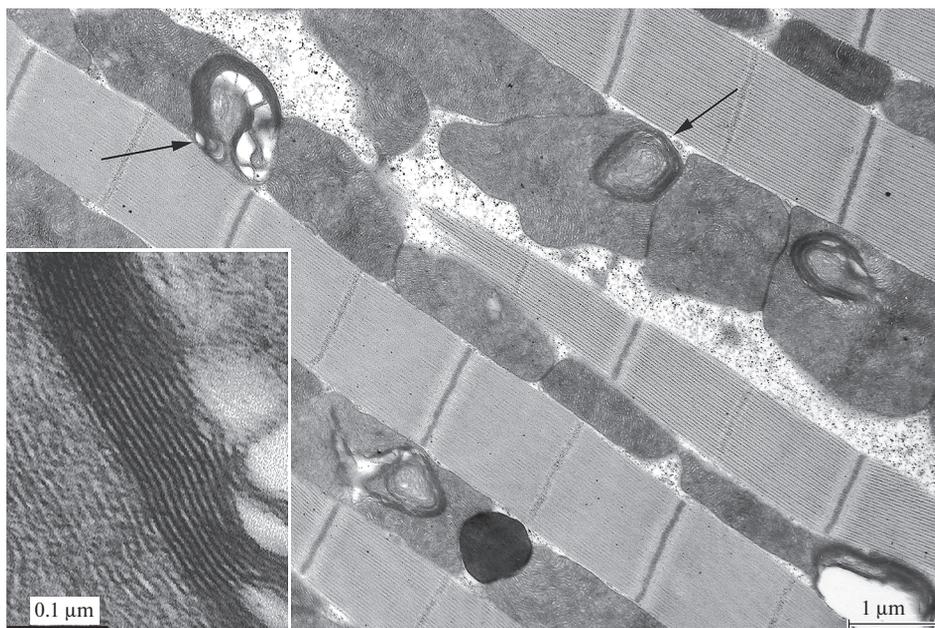


Рис. 1. Участок летательной мышцы *D. melanogaster* (36 суток после рождения). Стрелками показаны миелино-подобные образования внутри митохондрий, детали строения которых представлены на врезке [11].

с функциональными характеристиками митохондрий. Многочисленные исследования показывают, что в скелетных мышцах центральным медиатором развития патологий являются процессы, связанные с митохондриями [1–7]. С возрастом в мышечной ткани происходит общее снижение метаболизма митохондрий и уровня АТФ [8]. Уровень синтеза митохондриальных белков снижается на 40%, функциональная активность белков также снижается [9]. Возрастные изменения мышечной ткани могут быть вызваны, в том числе, и повышением продукции АФК митохондриями, что приводит к увеличению уровня окислительного стресса. В связи с ведущей ролью митохондрий в развитии возрастных изменений мышц, большой интерес представляет состояние ультраструктуры этих органелл, поскольку, как известно, важнейшей особенностью митохондрий является значительная динамичность их морфологии в ответ на различные изменения клеточного метаболизма.

Обусловленные возрастом перестройки ультраструктуры митохондрий в литературе менее известны, чем функциональные. Подробно изучена только одна модель — летательная мышца насекомых, на которой экспериментально показано возникновение уникальных, зависящих от возраста изменений организации митохондрий и установлены факторы, вызывающие эти структурные перестройки [10, 11]. В летательной мышце было обнаружено развитие с возрастом локальной перестройки отдельных зон внутренней митохондриальной мембраны в миелиноподобные структуры, которые с возрастом распространялись на все пространство митохондрий, вызывая разрушение органеллы (рис. 1) [11]. В измененных участках митохондрий цитохромоксидазная активность не выявлялась, в отличие от нативной части, где реакция была положительная.

Очевидно, что эти перестройки ультраструктуры определяют дисфункцию митохондрий, влияющую на снижение летательной активности насекомых с возрастом, которое было показано еще в 1943 г. Williams с соавт. [12]. На *Drosophila* /штамм white¹¹¹⁸/ экспериментально подтверждено воздействие кислородного стресса на формирование в митохондриях возникающих с возрастом структурных перестроек [13]. Так, гипероксия в течение 4-х дней у 3–4-дневных особей дрозофилы вызывала появление в 35% митохондрий летательной мышцы локальные перестройки внутренней митохондриальной мембраны. 7 дней воздействия гипероксии приводило к образованию деструктивных изменений в 62% митохондрий, у контрольных особей такие изменения практически отсутствовали или наблюдались крайне редко. Проведенные нами эксперименты на *D. melanogaster* показали, что антиоксидант SkQ1 поддерживает нативное состояние ультраструктуры митохондрий, снижая количество деструктивных изменений или снижая степень их выраженности и, как следствие, – поддерживает летательную активность [14]. У особей, получавших SkQ1, количество деструктивных изменений митохондрий и степень их проявления ниже, чем у мух, не получавших SkQ1.

Данные литературы об изменениях с возрастом ультраструктуры митохондрий скелетной мышцы однородны: набухание митохондрий, уменьшение числа крист, снижение плотности матрикса, нарушения митохондриальных мембран [15–19]. В проводимых исследованиях состояния ультраструктуры митохондрий скелетных мышц при старении не учитываются особенности общей структурной организации митохондриального аппарата скелетной мышцы. Согласно данным литературы, митохондриальный аппарат скелетных мышц имеет сложную структурную организацию. Еще в одном из первых электронно-микроскопических наблюдений Palade [20] показал, что в скелетных мышцах на уровне I-дисков митохондрии ветвятся между дисками соседних миофибрилл, и описал митохондрии звездчатой формы. Позднее Gauthier и Padykula [21], Bubenzer [22] на основе анализа одиночных срезов диафрагмы крысы предположили, что в скелетной мышце имеется три типа митохондрий: 1) тонкие ветвящиеся, расположенные поперек мышечного волокна; 2) более толстые, овальные, расположенные вдоль мышечного волокна; 3) сферические, расположенные у краев мышечного волокна с ответвлениями, ведущими к центру. На основе многих трехмерных реконструкций было показано, что в скелетных мышцах весь митохондриальный материал посредством специальных межмитохондриальных контактов собран в единую митохондриальную систему, образованную разветвленными гигантскими митохондриями, расположенными по обе стороны Z-линии и соединенными в единый митохондриальный каркас продольными тяжами митохондрий, расположенными вдоль пучков миофибрилл. Эта система была определена как митохондриальный ретикулум (рис. 2) [23, 24]. Методами высоковольтной электронной микроскопии на нативной ткани трех типов скелетной мышцы крыс было продемонстрировано, что митохондриальный ретикулум – это *in vivo* существующая структура, которая не является результатом процесса фиксации или стагнации мышечной ткани [25]. В настоящее время методами современной сканирующей микроскопии наглядно, в объеме продемонстрирована ультраструктура митохондриального ретикулума в скелетных мышцах [26]. В то же время некоторые авторы, обнаруживая на одиночных срезах скелетных мышц разветвленную сеть, образованную протяженными митохондриями, рассматривают ее как результат врожденной миопатии [27] или признак старения [28].

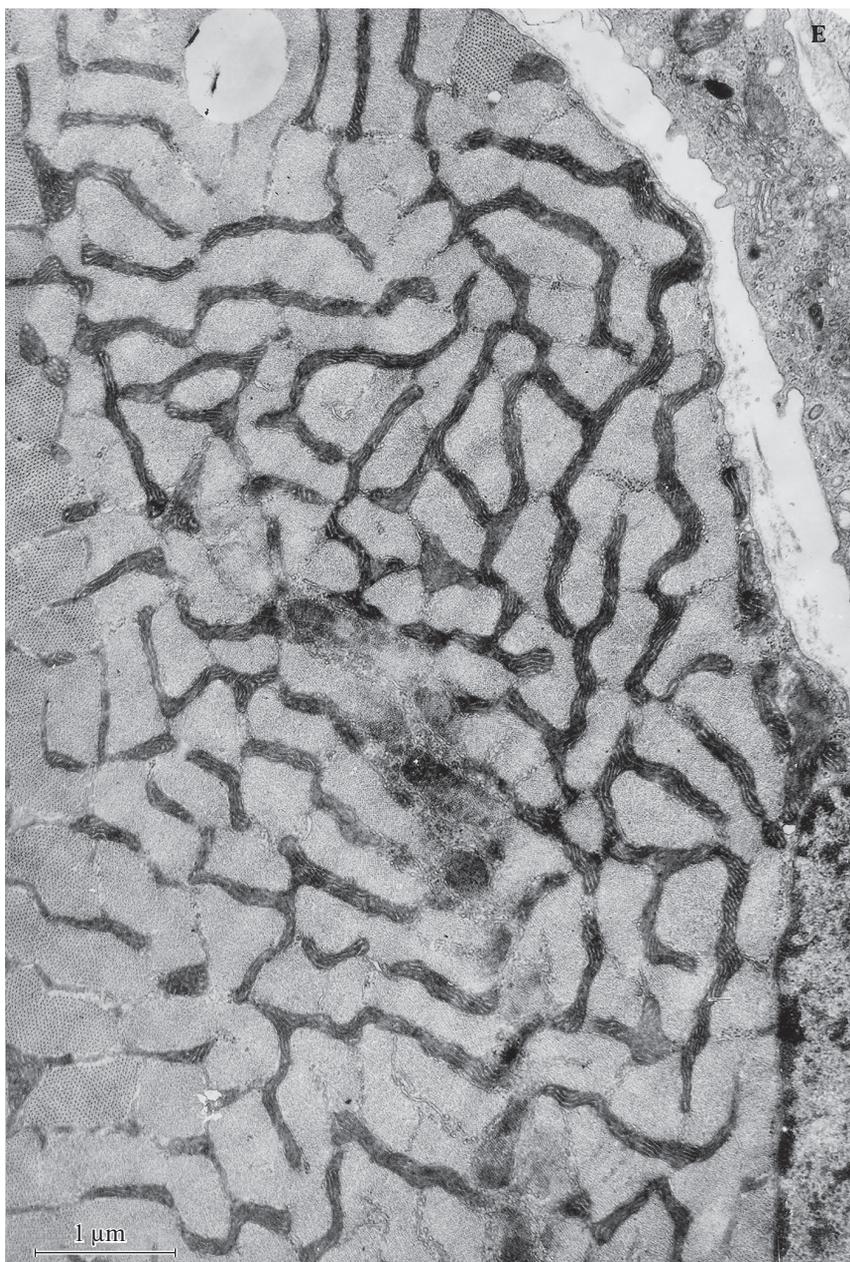


Рис. 2. Ультраструктура митохондриального ретикулума на поперечном срезе изотропной зоны мышечного волокна крысы Вистар [23].

Мы провели сравнительный анализ развития изменений ультраструктуры митохондрий скелетной мышцы с возрастом у представителей видов с различной продолжительностью жизни: мыши (C57BL/6) (продолжительность жизни 2.5–3 года); крысы Вистар (продолжительность жизни до 3 лет); крысы OXYS – модель прежде-

временно стареющих крыс (линия крыс OXYS, выведенная в Институте цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук; характеризуется ранними инволютивными изменениями, повышенной частотой возникновения злокачественных опухолей, кардиомиопатией, нарушениями функций высшей нервной деятельности, характерными для стареющих животных и человека; продолжительность жизни до 2 лет); голый землекоп (*Heterocephalus glaber*) — представитель животных с замедленным старением. Это небольшой грызун, по размерам и массе тела сопоставимый с мышью, однако без шерстяного покрова с эусоциальной организацией. Ареал обитания — засушливые районы Эфиопии, Кении и Сомали. Отличительная черта этого грызуна — экстремально высокая продолжительность жизни по сравнению с ожидаемой для его массы тела. Показано, что в лабораторных условиях голые землекопы живут более 30 лет [29, 30]. У голого землекопа практически отсутствуют такие заболевания, как диабет и рак, а также сердечно-сосудистые и неврологические патологии. Инфекционные патологии крайне редки [29], также характерна высокая устойчивость к гипоксии мозга [31–33].

Полученные ранее и в рамках этого исследования результаты совместно проанализированы и представлены в данной статье.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Мыши C57BL/6 в возрасте 2.5 мес. (группа из 5 самцов) и 2.5 года (группа из 5 самок) содержались при естественном свете, температуре $22 \pm 2^\circ\text{C}$, при свободном доступе к воде и пище (RK-120-1; Laboratorsnab, Россия). Все манипуляции с животными проводились в соответствии с European Union Council Directive 86/609/ЕЕС.

Голые землекопы (*Heterocephalus glaber*) в возрасте 6 мес. (4 рабочих самца) и 5 лет (4 рабочих самца) содержались в колониях в Институте исследований животных в зоопарке и в дикой природе им. Лейбница, в искусственной системе нор с туннелями и плексигласовыми боксами. В системе поддерживалась температура $26\text{--}29^\circ\text{C}$ с высокой относительной влажностью 60–80%. В боксах была деревянная подстилка, мелкие веточки и кусочки необеленой бумаги. Свежая еда была доступна ежедневно без ограничений и включала сладкий картофель, морковь, яблоки, фенхель, крупы с витаминами и минералами и овсяные хлопья. Забор материала был одобрен этической комиссией “Landesamt für Gesundheit und Soziales”, Берлин, Германия (#ZH 156).

Для исследования ультраструктуры митохондриального аппарата скелетной мышцы забирали ткань широких мышц бедра, латеральной, медиальной и промежуточной (*musculus vastus lateralis, -medius, -intermedius*). Для электронно-микроскопического исследования образцы фиксировали 3%-ным раствором глутарового альдегида на фосфатном буфере (pH 7.4) в течение 2 ч при 4°C ; затем дофиксировали 1%-ным раствором четырехоксида осмия в фосфатном буфере в течение 1.5 ч и обезживали в растворах спиртов с возрастающей концентрацией спирта — 50; 60; 70; 96 и 100%. Материал заливали в эпоксидную смолу Эпон 812. Серийные ультратонкие срезы делали алмазным ножом на ультрамикротоме Leica ULTRACUT UCT (Leica, Германия). Срезы контрастировали цитратом свинца. Полученные препараты просматривали и фотографировали в электронном микроскопе JEM-1400 (JEOL, Япония) с помощью цифровой камеры Olympus QUEMESA (Olympus Corporation, Япония).

Для морфометрического исследования хондриома скелетной мышцы было отобрано по 20 фотографий с увеличением $\times 1500$ для каждого животного. На фотогра-

фиях продольных срезов мышечного волокна с помощью графического редактора Adobe® Photoshop®, выделялись все сечения митохондрий на срезе, а также, с помощью инструмента “Счетчик” (Count tool), подсчитывалось количество сечений. Используя полученные данные, а также известный масштаб снимка, с помощью пакета анализа Photoshop были рассчитаны необходимые параметры:

- количество сечений митохондрий на квадратный микрометр мышечного волокна;
- средняя площадь одного сечения митохондрии на срезе;
- соотношение общей площади сечений митохондрий на срезе к общей площади мышечного волокна, которое определяет объемную долю митохондрий в объеме волокна.

Для расчетов статистических показателей использовалась программа STATISTICA® 8. Данные представлены в виде средних значений, погрешности соответствуют стандартной ошибке. Для проверки нормальности распределений использовались критерии Шапиро–Уилкса и Колмогорова–Смирнова. Степень достоверности определялась с помощью критерия Манна–Уитни. При необходимости делалась поправка Бонферрони на множественное сравнение. Достоверным считалось значение $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ОБСУЖДЕНИЕ

Как показали результаты проведенного нами электронно-микроскопического исследования, ультраструктура митохондриального аппарата скелетной мышцы мышей соответствует литературным представлениям, полученным на основе трехмерных реконструкций по ультратонким серийным срезам [23, 24]. На рис. 3 – поперечный срез через изотропную зону мышечного волокна мышцы C57BL/6 в возрасте 2.5 мес. Хорошо видна развитая единая сеть митохондриального ретикулума, которую составляет система нитчатых протяженных митохондрий, расположенных в изотропной области мышечного волокна. Субсарколеммальные митохондрии на уровне изотропной области входят в эту единую систему посредством ответвлений, ведущих к центру мышечного волокна.

На рис. 4 представлена электронно-микроскопическая картина продольного среза скелетной мышцы мыши C57BL/6 в возрасте 2.5 месяцев. Митохондриальный ретикулум, образованный системой разветвленных митохондрий, на продольном сечении мышечного волокна выглядит в виде небольших сферических или эллипсоидных органелл, расположенных попарно в изотропной области по обе стороны Z-дисков (рис. 4). Местами в изотропной зоне параллельно Z-дискам проявляются удлиненные сечения митохондрий (стрелка 1 на рис. 4). Субсарколеммальная популяция митохондрий, расположена под сарколеммой на периферии мышечного волокна (стрелка 2 на рис. 4).

Мы обнаружили, что с возрастом структура хондриома скелетной мышцы мышей претерпевает значительные изменения по сравнению с молодыми животными. На поперечных сечениях мышечного волокна скелетной мышцы мыши C57BL/6 в возрасте 2.5 года можно видеть значительную редукцию митохондриального ретикулума (рис. 5). В изотропной зоне мышечного волокна отсутствует сеть митохондриального ретикулума – видны лишь отдельные митохондрии овальной или извитой неправильной формы.

Наиболее наглядно редукция с возрастом митохондриального аппарата волокон скелетной мышцы мыши демонстрируется на продольном сечении мышечного волокна. На рис. 6 можно видеть, что митохондриальный материал в мышечных во-

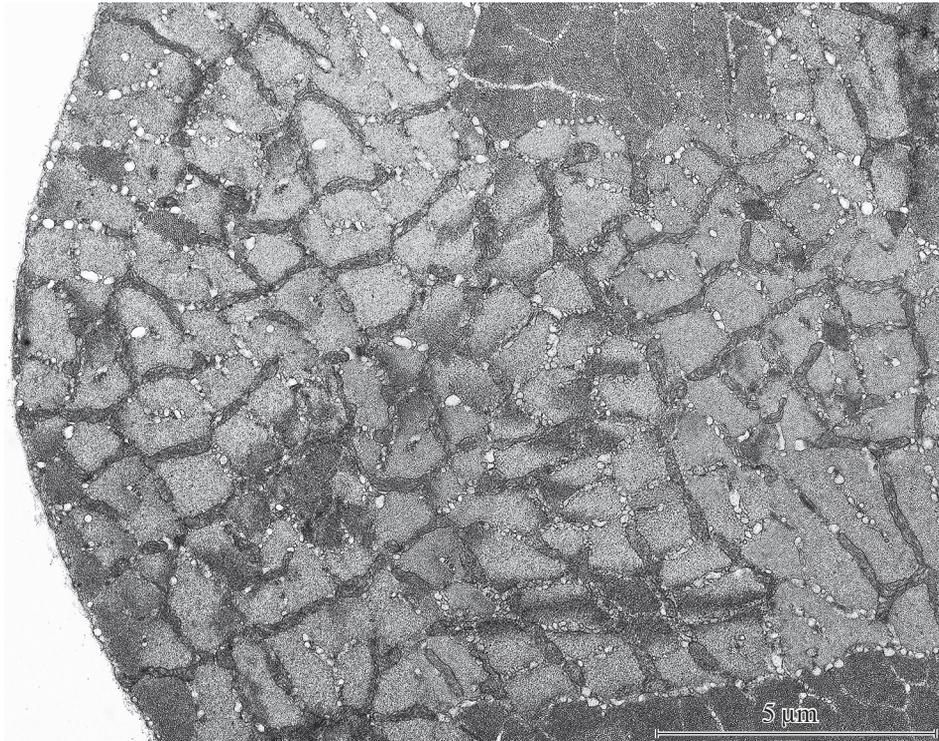


Рис. 3. Ультраструктура митохондриального аппарата скелетной мышцы на поперечном срезе изотропной зоны мышечного волокна мыши C57BL/6 в возрасте 2.5 мес.

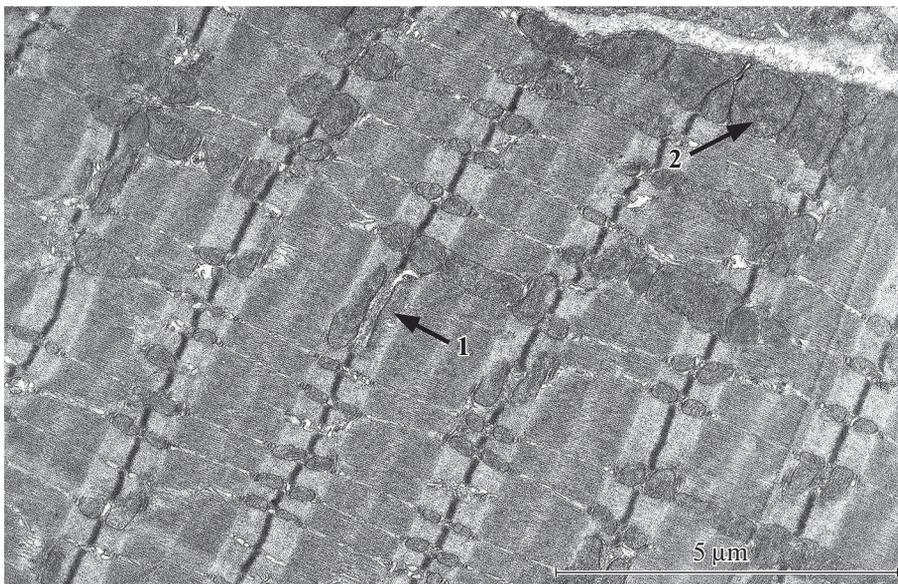


Рис. 4. Ультраструктура митохондриального аппарата скелетной мышцы на продольном срезе мышечного волокна мыши C57BL/6 в возрасте 2.5 мес. Стрелка 1 – удлиненные сечения митохондрий в изотропной зоне параллельно Z-дискам. Стрелка 2 – субсарколеммальная популяция митохондрий.

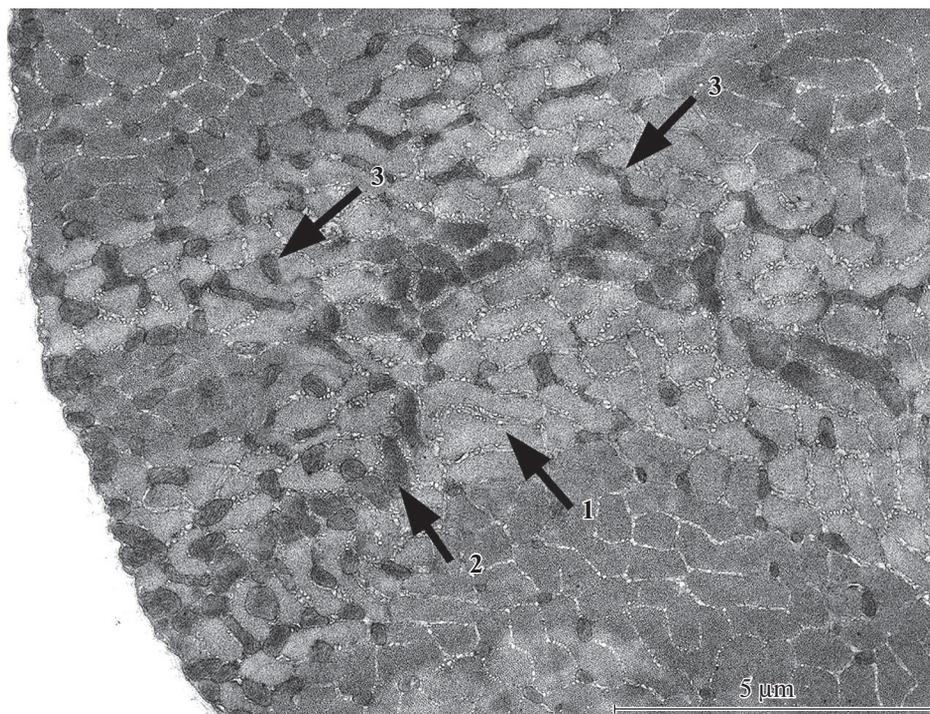


Рис. 5. Ультраструктура митохондриального аппарата скелетной мышцы на поперечном срезе изотропной зоны мышечного волокна мыши C57BL/6 в возрасте 2.5 года. Стрелка 1 – изотропная зона мышечного волокна; стрелка 2 – Z-диск; стрелка 3 – митохондрии.

локнах слабо выражен и представлен мелкими митохондриями, расположенными в основном вдоль миофибрилл.

Сравнительная картина изменений общей структуры хондриома, развивающихся в скелетной мышце мыши с возрастом, показана на рис. 7, где на одном увеличении представлены участки мышечного волокна мыши C57BL/6 в возрасте 2.5 месяцев (рис. 7а) и в возрасте 2.5 года (рис. 7б). В то же время изменений внутренней организации митохондрий скелетной мышцы у мышей в возрасте 2.5 года нами обнаружено не было.

Морфометрическое исследование возможных изменений хондриома скелетной мышцы, обусловленных возрастом, у мышей C57BL/6 было проведено на 20 электронно-микроскопических снимках для каждого животного (100 снимков на группу) (см. раздел Методы исследования).

На рис. 8 представлены результаты морфометрического анализа. У животных в возрасте 2.5 лет наблюдалось практически двукратное снижение среднего количества сечений митохондрий на 1 мкм^2 мышечного волокна по сравнению с 2.5-месячными животными (0.23 ± 0.02 против 0.45 ± 0.07 шт на мкм^2 соответственно) (рис. 8а) при одновременном увеличении средней площади одного сечения митохондрии — с $0.15 \pm 0.01 \text{ мкм}^2$ в 2.5 мес. до $0.22 \pm 0.01 \text{ мкм}^2$ в 2.5 года (рис. 8б). В це-

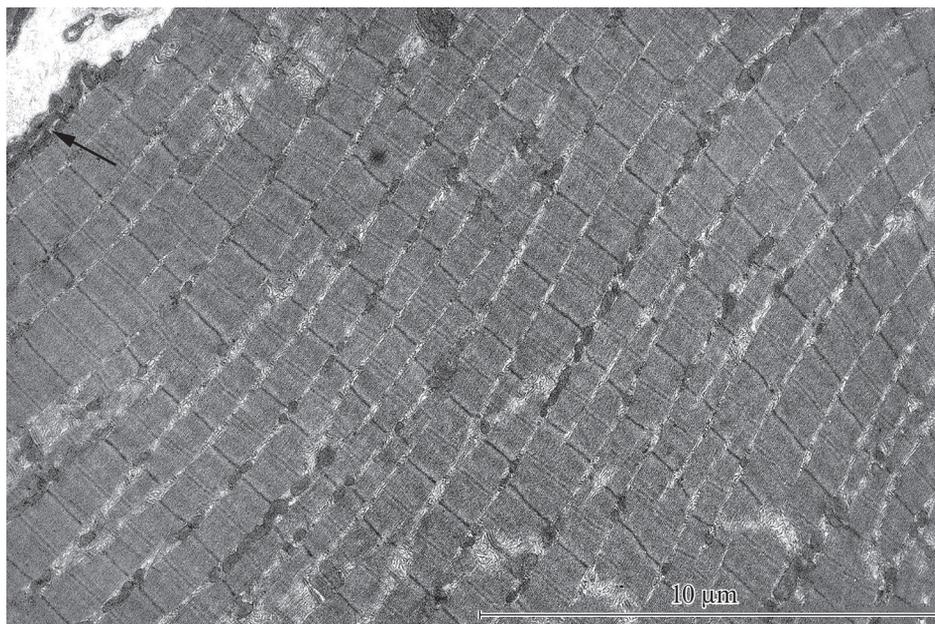


Рис. 6. Ультраструктура митохондриального аппарата скелетной мышцы на продольном срезе мышечного волокна мыши C57BL/6 в возрасте 2.5 года. Стрелкой показана субсарколеммальная популяция митохондрий.

лом, объемная доля митохондрий скелетной мышцы у мышей C57BL/6 снизилась с возрастом с $6.81 \pm 1.51\%$ в 2.5 мес. до $5.44 \pm 0.38\%$ в 2.5 года (рис. 8с).

Таким образом, площадь хондриома в скелетной мышце мышей C57BL/6 снижается с возрастом за счет почти двукратного снижения количества сечений митохондрий в мышечном волокне (рис. 8). При этом объемная доля митохондрий изменяется не столь значительно. Можно предположить, что снижение числа митохондрий в некоторой степени компенсируется увеличением их размеров.

Полученные данные возрастных изменений митохондриального аппарата скелетной мышцы мышей полностью соответствуют ранее опубликованным результатам исследования возрастных нарушений структурной организации митохондриального аппарата скелетной мышцы крыс Вистар — еще одного представителя короткоживущих грызунов [34]. Морфометрические исследования показывают, что у крыс Вистар к 24-м месяцам площадь хондриома изотропной зоны значительно снижается (с 38 до 24%, $p < 0.05$) (рис. 9). В то же время у крыс линии OXYS, как показали опубликованные нами ранее результаты [34], к 24-ем месяцам площадь хондриома изотропной зоны снижается более значительно: с 17 до 6%, $p < 0.05$, т.е. у крыс OXYS площадь, занимаемая митохондриями, почти в 5 раз меньше, чем у крыс Вистар (24% для Вистар и всего 6% для OXYS, $p < 0.05$) (рис. 9).

У крыс линии OXYS, в отличие от мышей и крыс Вистар, изменения структуры митохондриального аппарата мышечной ткани начинают развиваться уже в возрасте 3-х месяцев и затрагивают не только общую организацию хондриома, но и внутреннюю ультраструктуру митохондрий. Нами была обнаружена удивительная

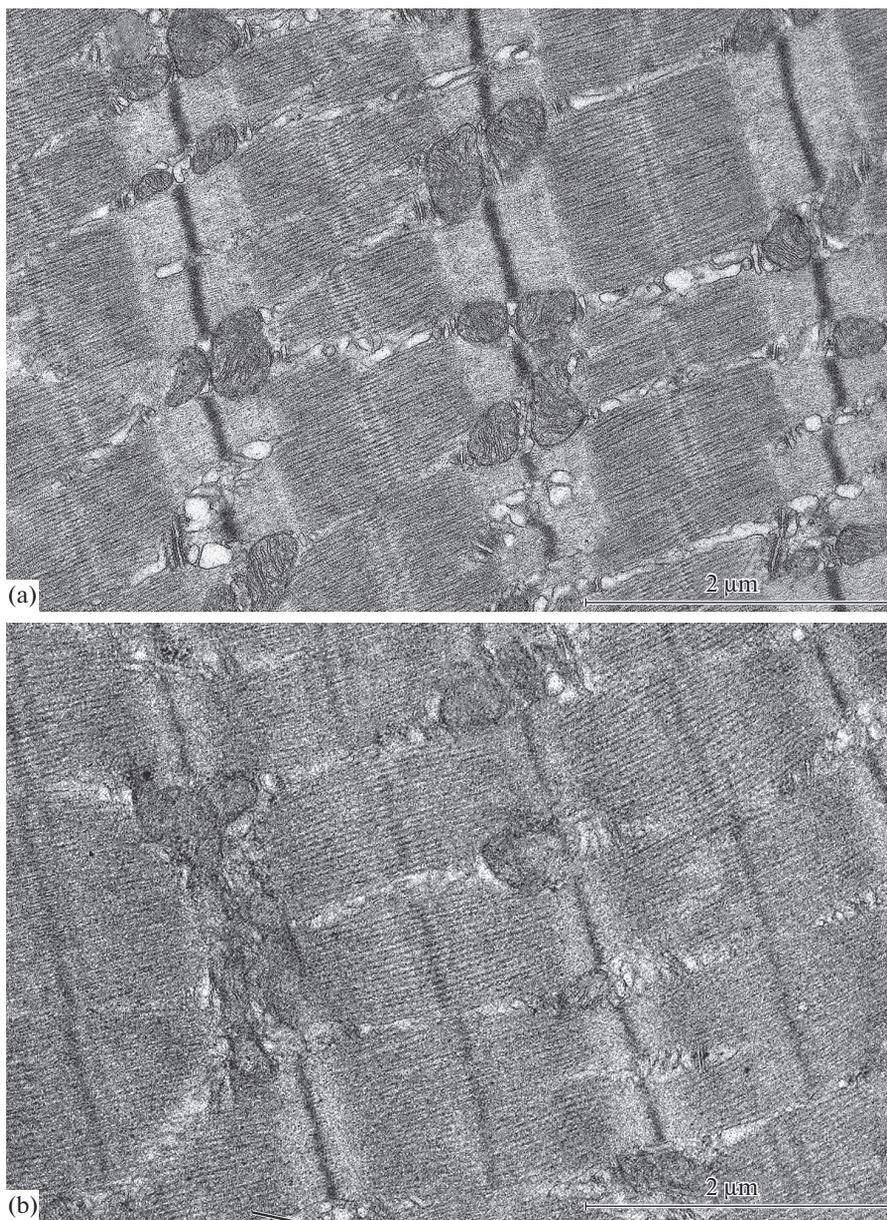


Рис. 7. Сравнительная картина изменений общей структуры хондриома, развивающихся в скелетной мышце мыши с возрастом. Участок продольного среза мышечного волокна мыши C57BL/6 в возрасте 2.5 мес. (a); в возрасте 2.5 года (b).

перестройка ультраструктурной организации митохондрий, неизвестная ранее в литературе — митохондрии в виде протяженных извитых органелл, у которых пространство матрикса представлено продольно расположенными двумя—тремя кристами, а межмембранное пространство имеет вид локальных расширений, запол-

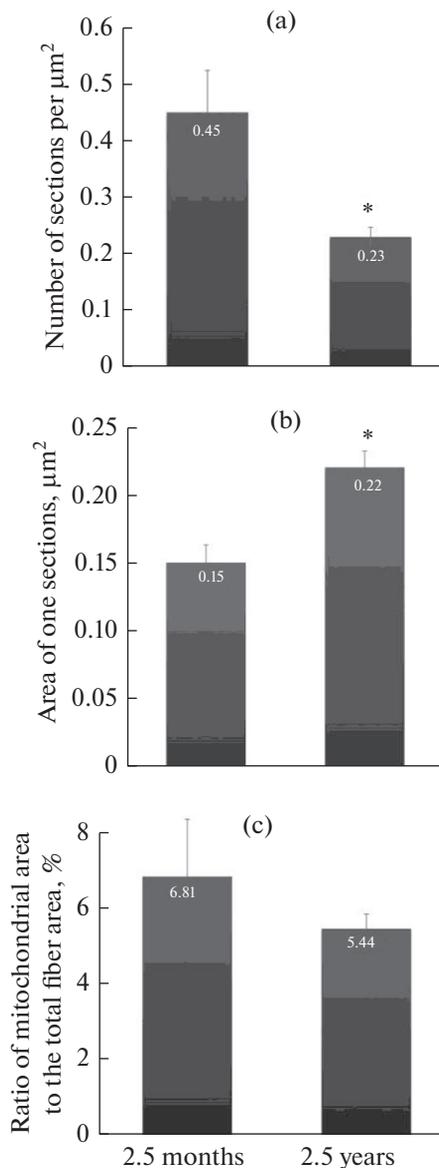


Рис. 8. Количественная оценка динамики изменений хондриома скелетной мышцы мышей C57BL/6 в возрасте 2.5 мес. и 2.5 года. (а) – количество митохондрий (шт.) на $1 \mu\text{m}^2$ мышечного волокна, (б) – площадь сечения одной митохондрии, (с) – объемная доля митохондрий мышечного волокна. * – различие достоверно ($p < 0.05$). Погрешности соответствуют стандартной ошибке среднего.

ненных гомогенным веществом (обычно межмембранное пространство митохондрий электронно-прозрачное) (рис. 10) [35]. Первые признаки такой перестройки в виде локальных увеличений межмембранного пространства появляются в митохондриях скелетной мышцы крыс линии OXYS еще в 3-месячном возрасте.

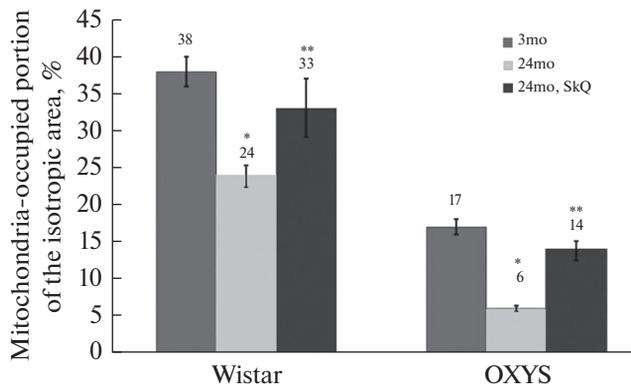


Рис. 9. Отношение суммарной площади митохондрий, расположенных в изотропной области к общей площади изотропной области у крыс Вистар и OXYS (%) [34]. * – $p < 0.05$ при сравнении с 3-месячными животными Вистар или OXYS соответственно; ** – $p < 0.01$ по сравнению с 24-месячными животными.

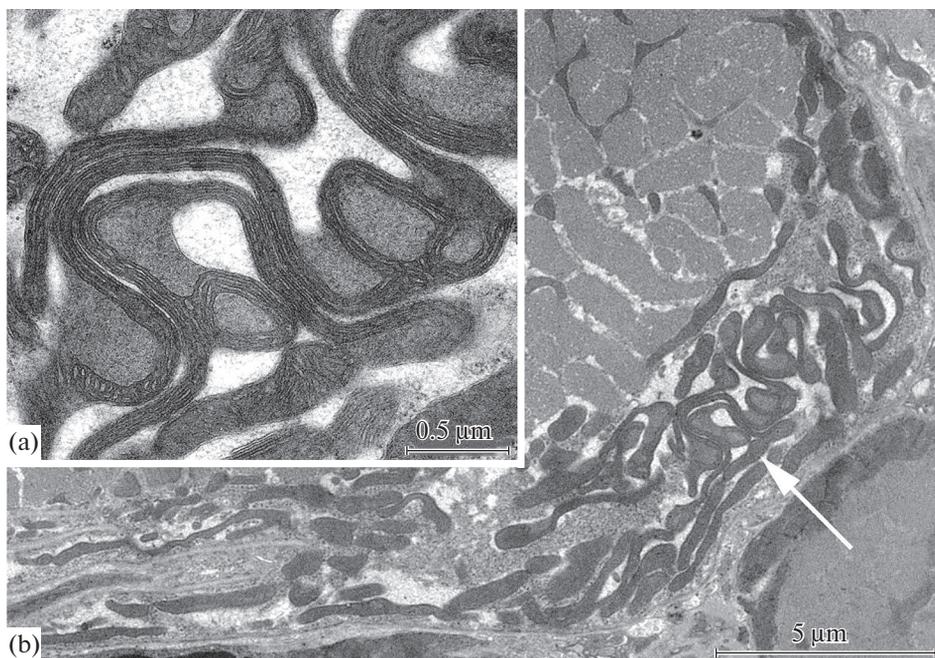


Рис. 10. Скопление атипичных митохондрий в субсарколеммальной области мышечного волокна крыс OXYS в возрасте 24 мес. (a) – обзорная фотография; стрелкой показана группа митохондрий, представленная на рисунке (b) на большем увеличении [35].

Наряду с изменениями митохондриального аппарата происходят нарушения структуры мышечных волокон в целом: появляются обширные области разрушенных миофибрилл, области аутофагосомальной активности. Таким образом, у крыс OXYS степень патологических изменений мышечной ткани значительно выше, чем у крыс Вистар. Антиоксидант SkQ1 снижал степень патологических изменений митохондриального аппарата скелетной мышцы у крыс OXYS. Прием SkQ1 в течение 6 мес. (с 18 мес.) приводил к сохранению суммарной площади митохондрий изотропной зоны (этот показатель менялся с 6 до 14%, $p < 0.01$) (рис. 9). Поскольку ключевой характеристикой крыс OXYS является усиленная генерация радикалов кислорода митохондриями, эти данные соответствуют литературным представлениям, согласно которым митохондрии играют центральную роль в развитии возрастных патологических процессов в скелетной мышце [36]. Необходимо отметить, что и у крыс Вистар прием антиоксиданта SkQ1 в течение 5 мес. (с 19 мес.) оказывал значительный защитный эффект. Площадь хондриома изотропной зоны скелетной мышцы крыс Вистар с возрастом снижалась незначительно по сравнению с молодыми животными (3 мес.): с 38 до 33% соответственно (рис. 9). Таким образом, митохондриальный антиоксидант SkQ1, оказывая защитный эффект на уровне митохондрий, останавливает процесс дегенерации на органном уровне.

Наши исследования показали, что с возрастом в скелетных мышцах мышей C57BL/6 и крыс Вистар и OXYS происходят значительные нарушения общей организации и структуры митохондриального аппарата за счет уменьшения как числа митохондрий, так и размеров отдельных органелл.

С полученными нами результатами для короткоживущих грызунов полностью расходятся имеющиеся к настоящему времени предварительные данные по исследованию митохондриального аппарата голого землекопа (*Heterocephalus glaber*) [37, 38]. Как было показано ранее, в скелетной мышце крыс после рождения постепенно количество митохондрий значительно увеличивается, митохондрии объединяются друг с другом, шаг за шагом создавая трехмерный ретикулум. Этот процесс завершается к 1.5–2-месячному возрасту [24]. Однако у голых землекопов даже к возрасту 6 мес. митохондрии мелкие, одиночные как на поперечных, так и на продольных сечениях мышечного волокна (рис. 11а). К возрасту 5-ти лет количество и размер митохондрий значительно возрастает, однако митохондриальная сеть так и не формируется (рис. 11б).

У голого землекопа с возрастом наблюдались следующие морфометрические изменения хондриома скелетной мышцы: число сечений митохондрий выросло вдвое и составило 0.47 ± 0.03 шт на мкм^2 для пятилетних животных (0.23 ± 0.02 шт на мкм^2 в 6 мес.) (рис. 12б). Средняя площадь сечения одной митохондрии выросла к пяти годам до 0.29 ± 0.03 с 0.21 ± 0.1 мкм^2 в 6 мес. (рис. 12а). Объемная доля хондриома в 6 месяцев составила $4.77 \pm 0.42\%$ и к пяти годам увеличилась практически трехкратно – до $12.68 \pm 1.81\%$ (рис. 12с). Таким образом, у голого землекопа к 5-ти годам не только не развивается патологические изменения митохондриального аппарата скелетной мышцы, но и наоборот – происходит существенный рост, усиление хондриома, хотя при этом митохондрии так и не объединяются в ретикулум.

Эти данные позволяют предположить, что в скелетной мышце голого землекопа к возрасту 5 лет митохондриальный ретикулум все еще находится в процессе формирования, которое у крыс и мышей, как указывалось, заканчивается уже в 1.5–2 мес.

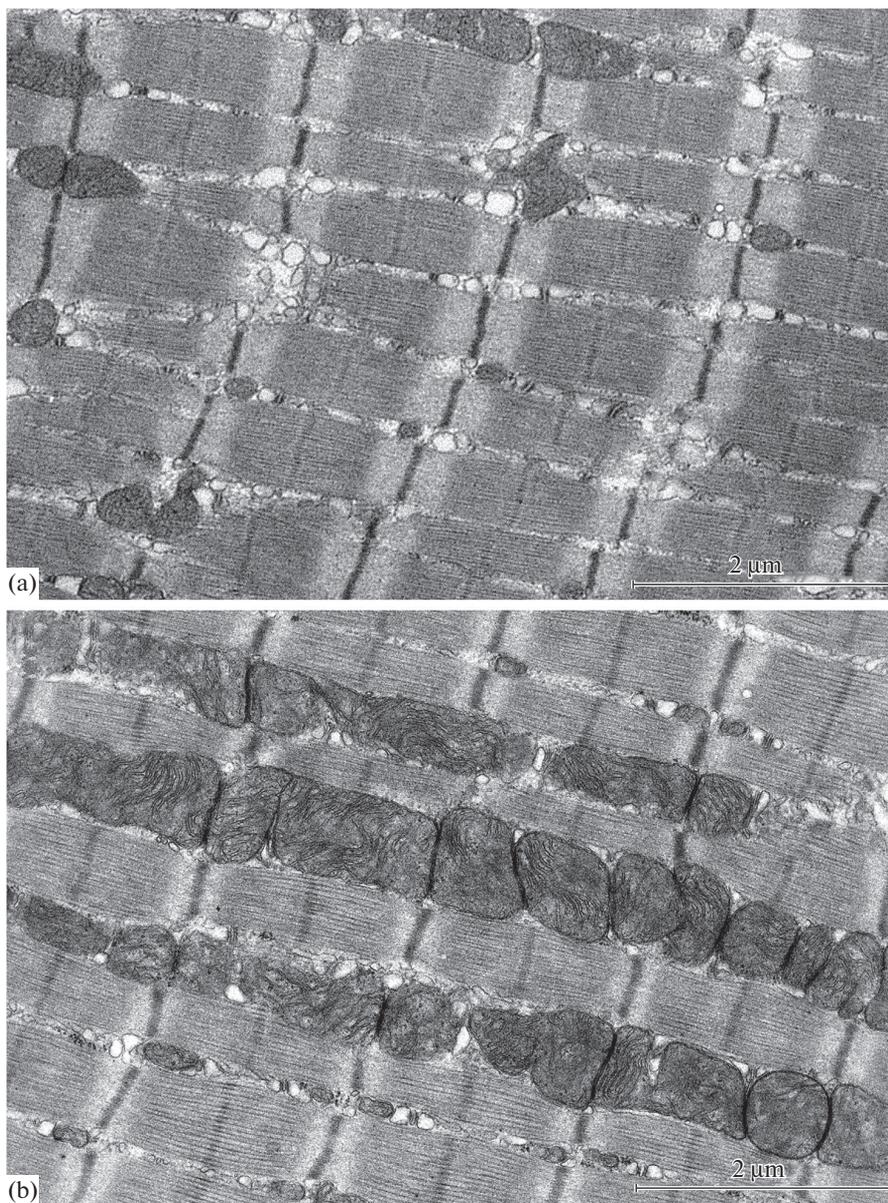


Рис. 11. Ультраструктура продольного среза мышечного волокна скелетной мышцы голого землекопа (*Heterocephalus glaber*) в возрасте: 6 мес. (a); 5 лет (b).

В свете этих данных, атипичную модель развития ультраструктуры хондриома скелетной мышцы у голого землекопа можно рассматривать как длительную задержку развития — замедление старения. В настоящее время предполагается, что замедление старения может быть следствием неотении — сохранение ювенильных черт у половозрелой особи [38].

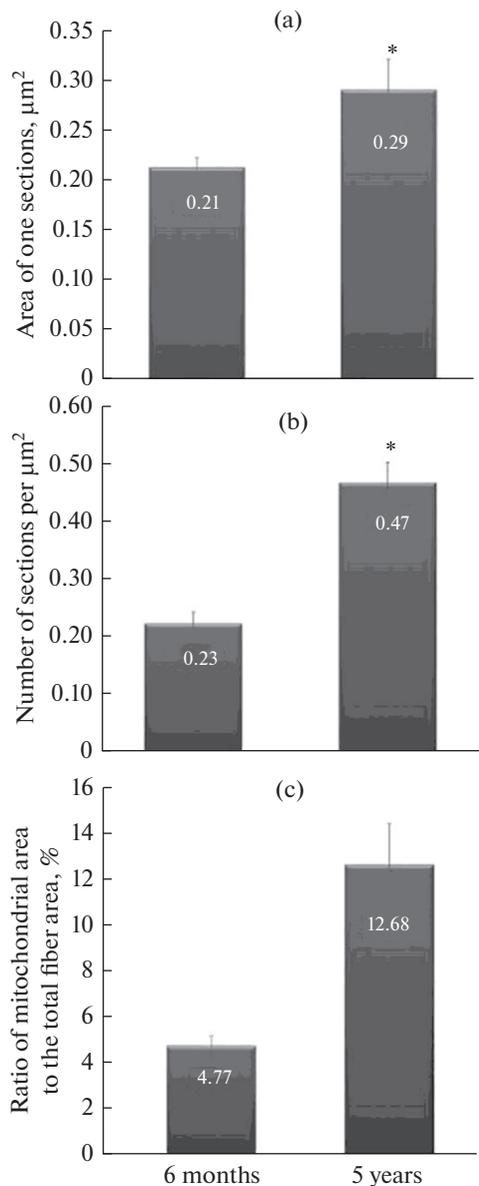


Рис. 12. Количественная оценка динамики изменений хондриома скелетной мышцы голого землекопа (*Heterocephalus glaber*) в возрасте 6 месяцев и 5 лет. (a) – площадь сечения одной митохондрии (мкм^2). (b) – количество митохондрий (в шт.) на 1 мкм^2 мышечного волокна. (c) – объемная доля хондриома (%). * – различие достоверно при уровне $p < 0.05$. Погрешности соответствуют стандартной ошибке среднего.

Можно предположить, что формирующаяся к 5-летнему возрасту в скелетной мышце голого землекопа особая организация митохондриального аппарата обеспечивает необходимый уровень окислительно-восстановительных процессов в мышцах, предупреждая снижение работоспособности и развитие саркопении.

Обнаруженные нами развивающиеся с возрастом нарушения структурной организации митохондриального аппарата скелетной мышцы как у мышей C57BL/6, так и у крыс Вистар и OXYS, очевидно, отражают нарушения в функционировании этих органелл и могут являться одной из основных причин развития возраст-зависимых патологий и, в частности, саркопении.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 19-04-00578-а).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента – Б.Л.Е., экспериментальная часть исследований – В.В.Б., В.И.М., математическая обработка данных - Э.Ч.М., написание и редактирование манускрипта – В.В.Б., В.И.М., Э.Ч.М., Б.Л.Е.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Baumann CW, Kwak D, Liu HM, Thompson VL* (2016) Age-induced oxidative stress: How does it influence skeletal muscle quantity and quality? *J Appl Physiol* 121: 1047–1052. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00321.2016>
2. *Brunk UT, Terman A* (2002) The mitochondrial-lysosomal axis theory of aging: accumulation of damaged mitochondria as a result of imperfect autophagocytosis. *Eur J Biochem* 269: 1996–2002. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1033.2002.02869.x>
3. *Derbré F, Gratas-Delamarche A, Gómez-Cabrera MC, Viña J* (2014) Inactivity-induced oxidative stress: A central role in age-related sarcopenia? *Eur J Sport Sci* 14: 98–108. <https://doi.org/10.1080/17461391.2011.654268>
4. *Gamboa JL, Billings FT, Bojanowski MT, Gilliam LA, Yu C, Roshanravan B, Roberts LJ, Himmelfarb J, Ikizler TA, Brown NJ* (2016) Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in patients with chronic kidney disease. *Physiol Rep* 4(9): e12780. <https://doi.org/10.14814/phy2.12780>
5. *Santos LS, Baraibar MA, Lundberg S, Eeg-Olofsson O, Larsson L, Friguet B* (2015) Oxidative proteome alterations during skeletal muscle ageing. *Redox Biol* 5: 267–274. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2015.05.006>
6. *Moulin M, Ferreiro A* (2017) Muscle redox disturbances and oxidative stress as pathomechanisms and therapeutic targets in early-onset myopathies. *Semin Cell Dev Biol* 64: 213–223. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2016.08.003>
7. *Rygiel KA, Picard M, Turnbull DM* (2016) The ageing neuromuscular system and sarcopenia: a mitochondrial perspective. *J Physiol* 594: 4499–4512. <https://doi.org/10.1113/JP271212>
8. *Dai DF, Chiao YA, Marcinek DJ, Szeto HH, Rabinovitch PS* (2014) Mitochondrial oxidative stress in aging and healthspan. *Longev Heal* 3: 6. <https://doi.org/10.1186/2046-2395-3-6>
9. *Johnson ML, Robinson MM, Nair KS* (2013) Skeletal muscle aging and the mitochondrion. *Trends Endocrinol Metab* 24: 247–256. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2012.12.003>

10. *Sacktor B, Shimada Y* (1972) Degenerative changes in the mitochondria of flight muscle from aging blowflies. *J Cell Biol* 52: 465–477.
<https://doi.org/10.1083/jcb.52.2.465>
11. *Бакеева ЛЕ, Сапрунова ВБ, Пасюкова ЕГ, Рощина НВ* (2007) Митоптоз в летательной мышце *Drosophila melanogaster*. Докл Акад наук 413: 1–3 [*Bakeeva LE, Saprunova VB, Pasyukova EG, Roshina NV* (2007) Mitoptosis in the flight muscle of *Drosophila melanogaster*. *Acad Sci Rep* 413: 1–3 (In Russ)].
<https://doi.org/10.1134/S0012496607020111>
12. *Williams CM, Barness LA, Sawyer WH* (1943) The utilization of glycogen by flies during flight and some aspects of the physiological ageing of *Drosophila*. *Biol Bull (Woods Hole)* 84: 263–268.
<https://doi.org/10.2307/1538009>
13. *Walker DW, Benzer S* (2004) Mitochondrial “swirls” induced by oxygen stress and in the *Drosophila* mutant hyperswirl. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 10290–10295.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0403767101>
14. *Anisimov VN, Bakeeva LE, Egormin PA, Filenko OF, Isakova EF, Manskikh VN, Mikhelson VM, Panteleeva AA, Pilipenko DI, Piskunova TS, Popovich IG, Saprunova VB, Samoylova TA, Semchenko AV, Skulachev MV, Tyndyk ML, Vyssokikh MY, Yurova MN, Zabezinsky MA, Skulachev VP* (2008) Mitochondria-targeted plastoquinone derivatives as tools to interrupt execution of the aging program. 5. SkQ1 prolongs lifespan and prevents development of traits of senescence. *Biochemistry (Moscow)* 73: 1329–1342.
<https://doi.org/10.1134/s0006297908120055>
15. *Beregi E, Regius O, Huttl T, Gobl Z* (1988) Age-related changes in the skeletal muscle cells. *Z Gerontol* 21: 83–86. PMID: 2968024
16. *Бакарев МА, Непомнящих ЛМ* (2004) Структурные проявления нарушений митохондриальной функции в скелетных мышцах у преждевременно стареющих крыс OXYS. Булл эксп биол и мед 138: 674–679. [*Bakarev MA, Nepomnyashchikh LM* (2004) Structural manifestations of mitochondrial dysfunction in skeletal muscles in premature aging OXYS rats. *Bull Exp Biol Med* 138: 674–679 (In Russ)].
17. *Corsetti G, Pasini E, D'Antona G, Nisoli E, Flati V, Assanelli D, Dioguardi FS, Bianchi R* (2008) Morphometric changes induced by amino acid supplementation in skeletal and cardiac muscles of old mice. *Am J Cardiol* 101: 26E–34E.
<https://doi.org/.amjcard.2008.02.078>
18. *Crane JD, Devries C, Safdar A, Hamadeh MJ, Tarnopolsky MA* (2010) The effect of aging on human skeletal muscle mitochondrial and intramyocellular lipid ultrastructure. *J Gerontol* 65: 119–128.
<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a029785>
19. *Orlander J, Kiessling K, Larsson L, Karlsson J, Aniansson A* (1978) Skeletal muscle metabolism and ultrastructure in relation to age in sedentary men. *Acta Physiol Scand* 104: 249–261.
<https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.1978.tb06277.x>
20. *Palade GE* (1956) Electron microscopy of mitochondria and other cytoplasmic structures. In: *Enzymes: Units of Biological Structure and Function*. Acad Press New York 185–215.
21. *Gauthier GF, Padykula HA* (1966) Cytological studies of fiber types in skeletal muscle. A comparative study of the mammalian diaphragm. *J Cell Biol* 28: 333–354.
<https://doi.org/10.1083/jcb.28.2.333>
22. *Bubenzler HJ* (1966) Die dunnen und die dicken Muskelfasern des Zwerchfells der Ratte. *Z Zellforsch* 69: 520–550.
<https://doi.org/10.1007/BF00406300>
23. *Bakeeva LE, Skulachev VP, Chentsov YS* (1978) Mitochondrial framework (reticulum mitochondriale) in rat diaphragm muscle. *Biochim Biophys Acta* 501: 349–369.
[https://doi.org/10.1016/0005-2728\(78\)90104-4](https://doi.org/10.1016/0005-2728(78)90104-4)
24. *Bakeeva LE, Chentsov YS, Skulachev VP* (1981) Ontogenesis of mitochondrial reticulum in rat diaphragm muscle. *Eur J Cell Biol* 25: 175–181.
25. *Kirkwood SP, Munn EA, Brooks GA* (1986) Mitochondrial reticulum in limb skeletal muscle. *Am J Physiol* 251: 395–402.
<https://doi.org/10.1152/ajpcell.1986.251.3.C395>
26. *Glancy B, Hartnell LM, Malide D, Yu ZX, Combs CA, Connelly PS, Subramaniam S, Balaban RS* (2015) Mitochondrial reticulum for cellular energy distribution in muscle. *Nature* 523: 617–620.
<https://doi.org/10.1038/nature14614>
27. *Pellegrini G, Barbieri S, Moggio M, Cheldi A, Scarlato G, Minetti C* (1985) A case of congenital neuromuscular disease with uniform type I fibers, abnormal mitochondrial network and jagged

- Z-line. *Neuropediatrics* 16: 162–166.
<https://doi.org/10.1055/s-2008-1059533>
28. *Leduc-Gaudet JP, Picard M, Pelletier FSt-J, Sgarlato N, Auger MJ, Vallée J, Robitaille R, St-Pierre DH, Gouspillou G* (2015) Mitochondrial morphology is altered in atrophied skeletal muscle of aged mice. *Oncotarget* 6: 17923–17937.
<https://doi.org/10.18632/oncotarget.4235>
 29. *Buffenstein R* (2008) Negligible senescence in the longest living rodent, the naked mole-rat: insights from a successfully aging species. *Compar Physiol B* №178: 439–445.
<https://doi.org/10.1007/s00360-007-0237-5>
 30. *Orr ME, Garbarino VR, Salinas A, Buffenstein R* (2015) Sustained high levels of neuroprotective, high molecular weight, phosphorylated tau in the longest-lived rodent. *Neurobiol Aging* 36: 1496–1504.
<https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2014.12.004>
 31. *Larson J, Park TJ* (2009) Extreme hypoxia tolerance of naked mole-rat brain. *NeuroReport* 20: 1634–1637.
<https://doi.org/10.1097/WNR.0b013e32833370cf>
 32. *Maina JN, Gebreegzjabher Y, Woodley R, Buffenstein R* (2001) Effects of change in environmental temperature and natural shifts in carbon dioxide and oxygen concentrations on the lungs of captive naked mole-rats (*Heterocephalus glaber*): a morphological and morphometric study. *J Zool* 253: 371–382.
<https://doi.org/10.1017/S0952836901000346>
 33. *Park TJ, Lu Y, Jüttner R, Smith EJ, Hu J, Brand A, Wetzel C, Milenkovic N, Erdmann B, Heppenstall PA, Laurito CE, Wilson SP, Lewin GR* (2008) Selective Inflammatory Pain Insensitivity in the African Naked Mole-Rat (*Heterocephalus glaber*). *PLoS Biol* January 6: 13.
<https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0060013>
 34. *Eldarov CM, Vangely IM, Kolosova NG, Bakeeva LE, Skulachev VP* (2014) Antioxidant SkQ1 delays sarcopenia- associated damage of mitochondrial ultrastructure. *Aging* 6: 140–148.
<https://doi.org/10.18632/aging.100636>
 35. *Bakeeva LE* (2015) Age-Related Changes in Ultrastructure of Mitochondria. Effect of SkQ1. *Biochemistry* 80: 1582–8.
<https://doi.org/10.1134/S0006297915120068>
 36. *Marzetti E, Hwang JC, Lees HA, Wolhgemuth SE, Dupont-Versteegden EE, Carter CS, Bernabei R, Leeuwenburgh C* (2010) Mitochondrial death effectors: relevance to sarcopenia and disuse muscle atrophy. *Biochim Biophys Acta* 1800: 235–244.
<https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2009.05.007>
 37. *Holtze S, Eldarov CM, Vays VB, Vangeli IM, Vysokikh MY, Bakeeva LE, Skulachev VP, Hildebrandt TB* (2016) Study of Age-Dependent Structural and Functional Changes of Mitochondria in Skeletal Muscles and Heart of Naked Mole Rats (*Heterocephalus glaber*). *Biochemistry* 81: 1703–1712.
<https://doi.org/10.1134/S000629791612004>
 38. *Skulachev VP, Holtze S, Vysokikh MY, Bakeeva LE, Skulachev MV, Markov AV, Hildebrandt TB, Sadovnichii VA* (2017) Neoteny, prolongation of youth: from naked mole rats to “naked apes” (humans). *Physiol Rev* 97: 699–720.
<https://doi.org/10.1152/physrev.00040.2015>

Comparative Analysis of Age-Related Changes in the Structure of the Mitochondrial Apparatus of Skeletal Muscles in Species with Different Life Spans

V. B. Vays^a, I. M. Vangeli^a, Ch. M. Eldarov^a, and L. E. Bakeeva^{a, *}

^a*Belozersky Research Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia*

*e-mail: bakeeva@belozersky.msu.ru

Comparative analysis of age-related changes in the ultrastructure of the mitochondrial apparatus of skeletal muscle was performed using electron microscopic and morphometric methods in specimens with different aging programs: short-lived, well-studied classical species – mice (C57BL/6), Wistar rats; prematurely aging OXYS rats; and animals with delayed aging – naked mole-rat (*Heterocephalus glaber*). In mice age-related

changes in organization of the mitochondrial apparatus of skeletal muscle was shown to correspond with the previously studied for Wistar rats: the mitochondrial reticulum is formed to 2.5–3 months of age, to 30 months of age there is a significant reduction of the mitochondrial apparatus as the result of a decline in the number of mitochondria – number of sections of mitochondria in muscle fibers is reduced by almost 2 times – from 0.45 ± 0.074 sections per μm^2 to 0.23 ± 0.017 sections per μm^2 . Destructive changes in the mitochondrial ultrastructure were not observed, in contrast to OXYS rats, in which age-related changes in the chondriome affect both the overall structure of the mitochondrial apparatus of muscle fibers and the internal ultrastructure of organelles. At the same time, in a small rodent similar in size to mice, *Heterocephalus glaber*, the number and size of mitochondria in skeletal muscle increases significantly by the age of five, but the mitochondrial reticulum does not form.

Keywords: skeletal muscle, aging, mitochondria, electron microscopy

**СТРУКТУРНО-МЕТАБОЛИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ СКЕЛЕТНЫХ МЫШЦ
У ПАЦИЕНТОВ С ХРОНИЧЕСКИМ НАРУШЕНИЕМ СОЗНАНИЯ –
К ВОПРОСУ О ПОЛИНЕЙРОМИОПАТИЯХ КРИТИЧЕСКИХ СОСТОЯНИЙ
(ПЭТ-ПАТОМОРФОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ)**

© 2021 г. С. А. Кондратьев¹, Е. Н. Скитева¹, Ю. М. Забродская¹*, Д. В. Рыжкова¹,
Е. А. Кондратьева¹, А. Н. Кондратьев¹

¹Российский научно-исследовательский нейрохирургический институт им. проф. А.Л. Поленова –
филиал Национального медицинского исследовательского центра им. В.А. Алмазова,
Санкт-Петербург, Россия

*E-mail: zabrjulia@yandex.ru

Поступила в редакцию 10.03.2021 г.

После доработки 07.05.2021 г.

Принята к публикации 08.05.2021 г.

Пребывание пациентов в состоянии хронического нарушения сознания (ХНС) приводит к развитию дисфункции (слабости, парезам) их скелетной мускулатуры – полинейропатии и миопатии критических состояний. Представляют интерес изучение механизмов развития патологии и оценка реабилитационного потенциала таких пациентов. Методами позитронной эмиссионной компьютерной томографии (ПЭТ/КТ) с 18F-фтордезоксиглюкозой (18F-ФДГ) и патоморфологического исследования с иммуногистохимией получены данные о структурных и метаболических изменениях в скелетных мышцах верхних конечностей у 22 пациентов с ХНС. Проведенное исследование показало, что структурные изменения скелетных мышц имеют неспецифический дегенеративно-атрофический характер с более выраженными проявлениями на стороне пареза. Выявленные по снижению уровня метаболизма 18F-ФДГ метаболические нарушения мышц плечевого пояса у пациентов с ХНС развивались симметрично, вне зависимости от степени снижения мышечного тонуса и глубоких рефлексов. Наряду с дегенеративными изменениями, включающими повреждение сократительных элементов саркомеров, потерю десмина и дистрофина, снижение уровня метаболизма 18F-ФДГ, в скелетных мышцах пациентов наблюдались признаки адаптивных структурно-функциональных перестроек – модификация фенотипа мышечных волокон по “быстро” типу и активация аутофагического пути.

Ключевые слова: атрофия скелетных мышц, критическая полинейропатия, хроническое нарушение сознания, вегетативное состояние, синдром бессознательного бодрствования, состояние минимального сознания, ПЭТ, КТ

DOI: 10.31857/S0869813921060169

В последние десятилетия совершенствование методов интенсивной терапии привело к увеличению количества пациентов, которые из состояния комы переходят в различные варианты хронического нарушения сознания (ХНС): синдром ареактивного бодрствования (САБ), состояние минимального сознания (СМС) “плюс” и “минус”. САБ характеризует полное отсутствие признаков сознания на фоне сохранного бодрствования, при СМС “плюс” пациент может следить взгля-

дом за предметами и выполнять простые задания, а при СМС “минус” – только фиксировать взгляд [1]. Согласно статистике, в США число пациентов с ХНС составляет в среднем 46 на 1 млн популяции, в Великобритании – 14 [2], в Бельгии – 36 [3]; в России обобщающих статистических данных по количеству пациентов с ХНС в настоящее время нет. О распространенности патологии можно судить по данным анкетированного опроса 15 крупных стационаров различных городов, в которых общее число пациентов с ХНС за три года (2009–2012 гг.) составило 747 человек с преобладанием пациентов с последствием черепно-мозговой травмы (42%). В 35 стационарах Санкт-Петербурга число пациентов, находившихся в отделениях реанимации и интенсивной терапии более 30 сут в 2016 г., составило 705, из них 533 – в состоянии ХНС [4]. Лечение, оценка возможности восстановления сознания и реабилитационного потенциала пациентов с ХНС затрагивают не только медицинские, но и социальные, этические аспекты. Все большее внимание привлекает возникающая у получающих интенсивную терапию больных слабость скелетной мускулатуры – полинейропатия и миопатия критических состояний [5, 6]. Фундаментальные работы, обобщающие механизм нарушения функций поперечнополосатой мускулатуры у больных с тяжелым поражением ЦНС, переживших критическое состояние, возможности их восстановления, а также сопоставлений структурных изменений со степенью выраженности неврологических изменений в настоящее время имеют фрагментарный характер [7–9]. Первоначально интерес к этой проблеме был вызван наблюдениями, что мышечная слабость препятствует переводу пациента с искусственной вентиляции легких на спонтанное дыхание. Неспецифическое поражение нервов и мышц, по данным разных авторов, развивается у 50–100% больных в срок от нескольких часов до нескольких суток пребывания в палате интенсивной терапии при различных заболеваниях [8–10]. Отсутствуют исследования проявлений полинейропатии критических состояний у нейрореанимационных больных, исходно имеющих парезы и параличи вследствие очагового поражения ЦНС.

Патогенез полинейропатии критических состояний с развитием атрофии мышц остается недостаточно изученным [10, 11]. Гиподинамия, слабость – составные части синдрома “поведение при болезни” (Sickness behavior) [12]. Этот синдром рассматривается как координированный адаптивный вариант поведения индивидуума во время инфекционного заболевания или выраженного системного воспалительного ответа на действие неинфекционных факторов. С этих позиций гиподинамия и вторичная мышечная слабость рассматривается как приспособительная реакция организма. В повседневной практической работе с данной категорией пациентов мы наблюдаем, что со временем у 95% больных появляется двигательная активность в виде произвольных и непроизвольных движений, которая, на наш взгляд, косвенно демонстрирует возможный первично-приспособительный характер внутриклеточных и метаболических изменений мышечной ткани в остром периоде повреждения головного мозга различной этиологии при критических состояниях и заложенный восстановительный потенциал. Совершенствование дифференциальной диагностики, прогнозирования исхода, лечения слабости скелетной мускулатуры у нейрореанимационных пациентов является актуальной проблемой как с научной, так и с практической точек зрения. Решение данной задачи возможно с применением клинических, электрофизиологических, нейровизуализационных и патоморфологических исследований [13]. Указанные подходы необходимы для изучения морфофункциональных механизмов атрофии и возможности к регенерации поперечнополосатой мускулатуры у пациентов с мышечной слабостью, обусловленной тяжелыми поражениями головного мозга различной этиологии.

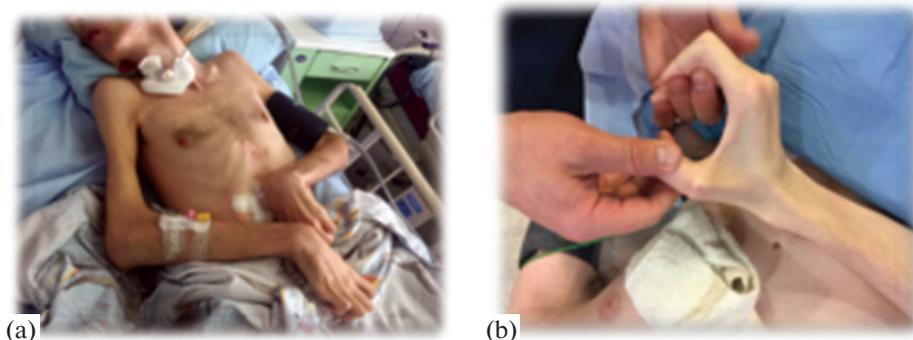


Рис. 1. Пациент с хроническим нарушением сознания. Глубокая атрофия мышц (а), спастика верхних конечностей (б).

Целью исследования была характеристика структурных и метаболических изменений в скелетных мышцах у пациентов с ХНС с глубокой атрофией скелетных мышц и аналитическое сопоставление данных позитронной эмиссионной компьютерной томографии (ПЭТ/КТ) с ^{18}F -фтордезоксиглюкозой (^{18}F -ФДГ) и результатов патоморфологического исследования.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В исследование были включены 22 пациента с ХНС (САБ, СМС), лечившиеся в отделении анестезиологии и реанимации РНХИ им. проф. А.Л. Поленова. Международные критерии диагноза САБ: восстановление реакции пробуждения – открывание глаз на фоне отсутствия признаков осознания себя и окружающих (отсутствие поведенческих реакций). По преимущественному проявлению спонтанной активности выделяют пациентов с гипореактивным (патологическая поза, спастические и вялые тетрапарезы) и гиперреактивным (гиперкинезы, постгипоксические миоклонии действия, другие виды экстрапирамидных нарушений) бодрствованием. В зависимости от уровня сознания пациенты были разделены на три группы: I группа – вегетативное состояние (ВС)/САБ – 6 пациентов, средний возраст – 36 лет; II группа – СМС “минус” – 12 пациентов, средний возраст – 36 лет (от 19 до 56 лет); III группа – СМС “плюс” и “выход из состояния минимального сознания” – 4 пациента, средний возраст – 28 лет (от 22 до 32 лет). Продолжительность нарушения сознания – не менее 2 мес. на момент включения в исследование.

Всем пациентам, вошедшим в исследование, был поставлен диагноз полинейропатия критических состояний на основе клинических и/или электрофизиологических данных (рис. 1). Была определена различная степень латерализации симптоматики: неравномерное распределение и изменения мышечного тонуса, односторонние моно- или гемипарезы и/или параличи.

Все процедуры, выполненные в нашем исследовании с участием людей, соответствуют этическим стандартам национального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 г. и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики. Так как все обследованные больные на момент принятия решения о проведении диагностической биопсии находились в малом сознании, согласие на проведение исследования во всех случаях получено от род-

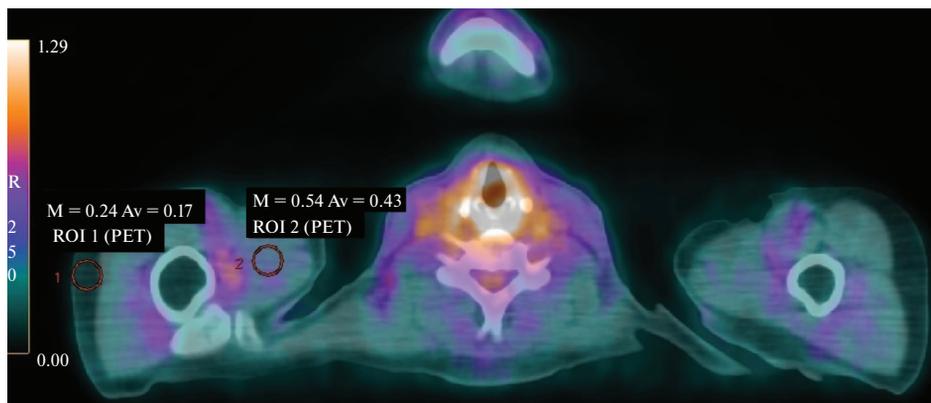


Рис. 2. ПЭТ/КТ с 18F-ФДГ скелетных мышц. Аксиальный срез. ROI 1 – регион интереса, построенный над подкожной жировой клетчаткой правой верхней конечности; ROI 2 – регион интереса, построенный над скелетной мышцей правой верхней конечности, SUV_{max} (M) и $SUV_{средний}$ (Av) рассчитаны автоматически в ROI 1 и ROI 2.

стенников пациентов. Исследование одобрено локальным этическим комитетом ФГБУ НМИЦ им. В.А. Алмазова. Всем пациентам выполнена ПЭТ/КТ с 18F-ФДГ скелетных мышц плечевого пояса, для выявления асимметрии метаболизма мышц проводилось сопоставление со шкалой мышечного тонуса. ПЭТ/КТ с 18F-ФДГ выполняли на фоне 6-часового голода, в состоянии седации (пропофол 0.5–2 мкг/кг/ч) на совмещенном сканере Discovery 710 (GeneralElectric). 18F-ФДГ вводили внутривенно струйно в дозе 125–250 МБк. ПЭТ/КТ-сканирование начинали через 40 мин после введения 18F-ФДГ в статическом режиме одной анатомической зоны (скелетных мышц плечевого пояса обеих конечностей), длительность ПЭТ/КТ-сканирования составила 3 мин на каждое положение топографического стола, ПЭТ/КТ-сканированию предшествовала низкодозная компьютерная томография для коррекции аттенуации.

Анализ ПЭТ/КТ изображений скелетных мышц плечевого пояса проводился при помощи программного пакета PET/CTReview, установленного на рабочей станции томографа в рабочей среде AdvantageWindowsWorkstation 4.6. Для расчета коэффициента дифференциального накопления ($KDN_{скелетная\ мышца/жир}$) определяли стандартизированное накопление 18F-ФДГ и $SUV_{средний}$ в регионах интереса (ROI), построенными над скелетными мышцами (дельтовидной, двуглавой, трехглавой и плечелучевой) обеих конечностей и подкожным жиром (рис. 2).

Для патоморфологического исследования врачом-хирургом в условиях “малой хирургической операции” осуществлялся забор исследуемой ткани под местной анестезией 1%-ным раствором новокаина, размер мышечных биоптатов составлял $1 \times 1 \times 1$ см. Критериями исключения являлись воспаление в области забора биопсийного материала, непереносимость местных анестетиков, тяжелая сопутствующая патология (сепсис, полиорганная недостаточность, почечная недостаточность в стадии декомпенсации). Материал, биоптаты дельтовидных мышц (*m. deltoideus*), забирался с двух сторон, у 11 пациентов – условно здоровой (без пареза и спастики) и больной (с изменением мышечного тонуса и парезами) (22 биоптата), у 1 пациента без атрофии мышц – условно здорового (2 биоптата).

Гистологическое исследование включало в себя фиксацию биоптатов в забуференном 10%-ном растворе нейтрального формалина, проведение спиртовой проводки и заливку в парафин. На ротационном микротоме получали парафиновые срезы толщиной 5–7 мкм. Далее гистологические препараты окрашивались по стандартным протоколам с использованием окрасок гематоксилином и эозином, для изучения структуры соединительной ткани пикриновой кислотой и фуксином по методу Ван Гизона. Для 12 биоптатов процедура воспроизведена с определением среднего значения для стороны с парезом и без пареза.

Иммуногистохимические (ИГХ) реакции выполнялись на парафиновых срезах по стандартному протоколу, с демаскировкой антигена на водяной бане. Использовались первичные антитела к дистрофину – dystrophin (ab85302; 1 : 150), беклину-1 – beclin-1 (ab62557; 1 : 100), миозину – myosin (Fast, DBS; 1 : 150), десмину – desmin (DBS; 1 : 50). Система визуализации фирмы DBS. Для морфометрической оценки степени атрофии и количества быстрых мышечных волокон проводился подсчет общего количества миоцитов на поперечных срезах в пяти полях зрения с определением среднего значения. Использовался ручной алгоритм подсчета в программе ImageJ.

Производились вычисление количественных данных среднего арифметического (M) и ошибки среднего (m). Различия считались значимыми при $p < 0.05$. Применялся U-тест Манна–Уитни, а также критерий согласия Пирсона. Статистическая обработка полученных результатов проводилась с помощью программы Microsoft Office Excel 2010.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

ПЭТ/КТ с 18F-ФДГ

ФДГ-ПЭТ/КТ является важным гибридным методом визуализации в онкологии, кардиологии и неврологии. ФДГ, являясь аналогом глюкозы, подвергается схожим трансформациям в живых тканях. Попадая в клетку, она фосфорилируется до глюкозо-6-фосфата и далее метаболизируется. Однако ФДГ, являясь 2-дезоксиглюкозой, не может удерживаться внутри клетки. Поглощение ФДГ клетками зависит от транспортеров глюкозы, взаимосвязанных с ее уровнем в сыворотке крови, а также других факторов [14]. Окисление жирных кислот является основным источником энергии для скелетных мышц в состоянии покоя. В норме скелетные мышцы демонстрируют мягкое гомогенное поглощение 18F-ФДГ с обычным максимальным стандартизированным значением поглощения (SUV_{\max} мышцы/жировой клетчатке) в диапазоне от 0.5 до 2.2 [15]. Денервационные изменения мышц могут сопровождаться повышенным поглощением ФДГ. Несколько исследований на животных моделях показали, что повышенный метаболизм глюкозы в денервированной мышце можно зарегистрировать уже через 1 нед., но через 5, 8 и 10 нед. разница в поглощении ФДГ между денервированной и контрольной мышцами становится незначительной [16]. Исследования метаболизма скелетных мышц методом ФДГ-ПЭТ/КТ у пациентов с хроническим нарушением сознания, сочетаниями центральных и периферических парезов в доступных источниках нами не найдены.

Нами установлено, что уровень метаболизма глюкозы в скелетных мышцах у пациентов трех групп достоверно снижен по сравнению с контролем. Показатели между группами не имели существенной разницы, кроме пациентов II группы (СМС “минус”), в которой зарегистрированы наиболее низкие показатели. Значения коэффициента дифференциального накопления (КДН) SUV_{\max} скелетная мускулатура / SUV_{\max} в жировой клетчатке: сред-

Таблица 1. Средние значения коэффициента дифференциального накопления SUV_{\max} скелетная мускулатура/ SUV_{\max} жировая клетчатка, средний балл по шкале Ашворда и шкале оценки глубоких рефлексов для пациентов различных групп

Исследуемые мышцы правой и левой руки		Группы			
		I	II	III	контроль
Дельтовидная мышца	Левая	2.34 ± 0.39	2.34 ± 0.79	2.13 ± 0.76	2.47 ± 0.51
	Правая	2.42 ± 1.17	2.05 ± 0.46	2.89 ± 2.30	4.20 ± 1.06
Двуглавая мышца плеча	Левая	2.44 ± 0.94	1.96 ± 0.64	2.32 ± 0.54	2.97 ± 1.57
	Правая	2.47 ± 0.93	1.92 ± 0.77	3.10 ± 2.37	3.09 ± 2.36
Трехглавая мышца плеча	Левая	2.31 ± 0.47	2.20 ± 0.70	2.34 ± 0.90	3.31 ± 1.18
	Правая	2.45 ± 0.67	1.97 ± 0.72	2.97 ± 2.50	3.98 ± 2.25
Плечелучевая мышца	Левая	2.93 ± 1.22	2.64 ± 0.65	2.22 ± 0.82	—
	Правая	2.69 ± 0.91	2.06 ± 0.69	3.42 ± 2.36	—
Балл по шкале Ашворда	Левая	2.83 ± 0.93	2.40 ± 0.76	2.66 ± 1.13	0
	Правая	2.83 ± 1.17	2.50 ± 0.81	3.00 ± 0.98	0
Балл по шкале оценки рефлексов	Левая	1.66 ± 0.65	2.00 ± 0.62	1.66 ± 1.49	2
	Правая	1.66 ± 0.82	1.80 ± 0.58	1.66 ± 1.49	2

Группы: I – с ВС/САБ, II – с СМС “минус”, III – СМС “плюс”.

Таблица 2. Средние значения коэффициента дифференциального накопления $SUV_{\text{средний}}$ скелетная мускулатура/ $SUV_{\text{средний}}$ в жировой клетчатке для пациентов различных групп

Исследуемые мышцы правой и левой руки		Группа			контроль
		I	II	III	
Дельтовидная мышца	Левая	1.21 ± 0,33	1.97 ± 0.70	1.72 ± 0.45	2.18 ± 0.61
	Правая	1.81 ± 0.89	1.58 ± 0.37	1.83 ± 1.37	3.08 ± 0.93
Двуглавая мышца плеча	Левая	2.07 ± 0.91	1.57 ± 0.49	1.74 ± 0.34	1.91 ± 1.45
	Правая	2.04 ± 0.70	1.36 ± 0.518	1.93 ± 1.28	2.35 ± 1.25
Трехглавая мышца плеча	Левая	1.90 ± 0.39	1.79 ± 0.62	1.60 ± 0.08	2.59 ± 0.98
	Правая	2.02 ± 0.68	1.69 ± 0.54	1.83 ± 1.26	3.38 ± 1.00
Плечелучевая мышца	Левая	2.43 ± 1.01	2.02 ± 0.59	1.77 ± 0.58	—
	Правая	2.34 ± 0.86	1.71 ± 0.60	2.41 ± 1.68	—

Группы: I – с ВС/САБ, II – с СМС “минус”, III – СМС “плюс”.

него балла по шкале спастичности Ашфорда и бальной оценки глубоких рефлексов представлены в табл 1.

У всех пациентов, в том числе контрольной группы, выявлена асимметрия накопления ^{18}F -ФДГ в правой и левой руке. У пациентов I группы средние значения метаболизма ^{18}F -ФДГ были наиболее высокими в мышцах левой руки, а у пациентов в III группы – правой.

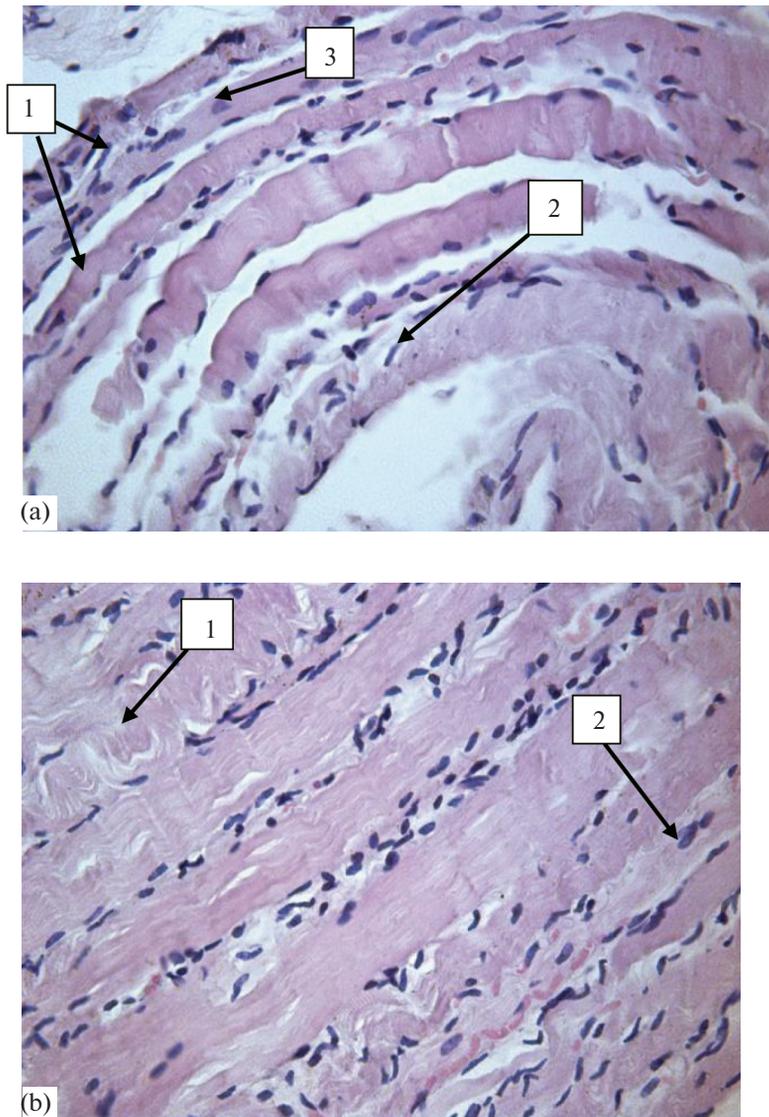


Рис. 3. Гистологические проявления структурных изменений в скелетной мышце верхних конечностей. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение $\times 400$.

(a) – разная степень атрофии мышечных волокон (1), начальные проявления миолиза (2), смещение ядер к центру (3);

(b) – “змеевидная извитость” истонченных миоцитов (1), центральное положение ядер (2).

Гистологическое исследование

При гистологическом исследовании у больных с ХНС наблюдался разный диаметр мышечных волокон. В мышечных волокнах выявлена разная степень выраженности атрофических, дистрофических и склеротических изменений, которые имели мозаичный характер (рис. 3.) Обнаружена миграция ядер от сарколеммы в

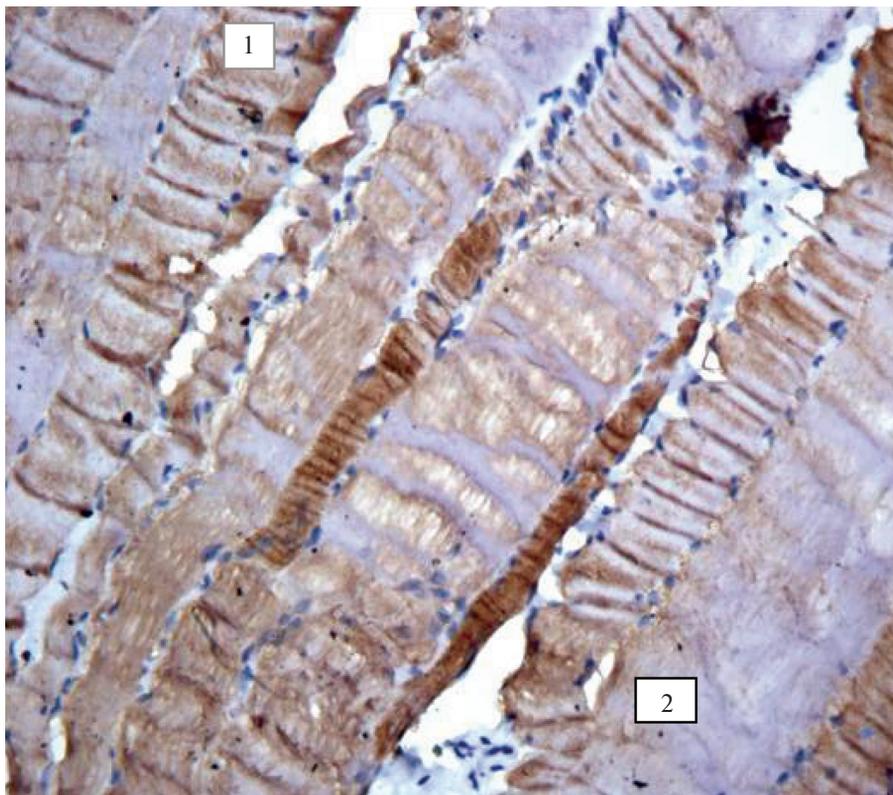


Рис. 4. Очаговая потеря десмина в отдельных мышечных волокнах. Иммуногистохимическое исследование. Увеличение $\times 400$.

1 – нормальное распределение десмина по Z-линиям, 2 – стертость и снижение интенсивности окрашивания десмином.

центр, что характерно для денервированных волокон. Выраженные атрофически-дистрофические изменения и склероз преобладали на стороне пареза во всех случаях. Клеточной воспалительной инфильтрации не наблюдалось.

ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Десмин. Одним из ранних миогенных маркеров скелетных мышц является белок семейства промежуточных филаментов – десмин (desmin). Известна роль белка в поддержании прочности и стабильности клеток, при недостатке десмина мышцы становятся хрупкими и дегенерируют в процессе повторных сокращений [17]. При исследовании 22 биоптатов от 11 пациентов во всех случаях обнаружено неравномерное светло-коричневое окрашивание с контрастирующими темно-коричневыми участками в области Z-полос на протяжении всей мышечной клетки. Обнаружены очаговая потеря десмина, стертый рисунок Z-дисков, что указывает на разрозненность структурной и механической целостности сократительного аппарата в мышечных тканях (рис. 4).

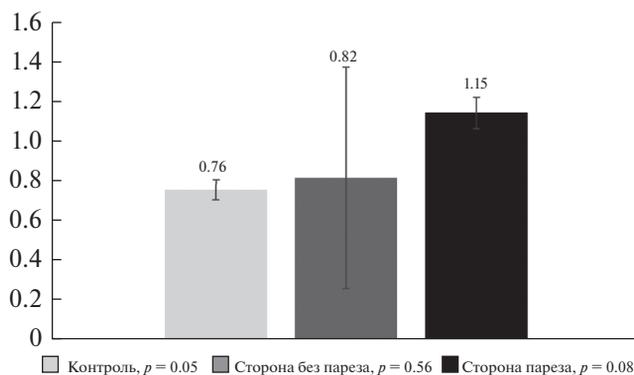


Рис. 5. Среднее отношение быстрых мышечных волокон к медленным у пациентов с хроническим нарушением сознания ($n = 6$) и контролем ($n = 2$).

Миозин. Основная функция миозиновых белков в мышечных волокнах заключается в способности приводить в движение поперечнополосатые и гладкие мышцы за счет АТФазной активности миозина [18]. Известно, что при обездвиживании наблюдается трансформация медленных мышц в быстрые [19]. Именно поэтому основным критерием исследования материала от 6 пациентов послужил количественный метод оценки быстрых и медленных волокон. Для исследуемой группы на стороне без пареза отмечалась тенденция к увеличению количества быстрых мышц и еще более выраженное значимое увеличение на стороне пареза до 30%. (рис. 5). Полученные данные указывают на преобладание быстрых волокон на стороне пареза (табл. 3). Наряду с интенсивным окрашиванием цитоплазмы, часть мышечных волокон имела слабое окрашивание, что может быть связано с функциональной перестройкой мышц, находящихся в переходном состоянии от медленных к быстрым (рис. 6).

Дистрофин. Основная функция дистрофина (dystrophin) – участие в мышечном сокращении за счет формирования с другими белками мембраны и белками внеклеточного матрикса дистрофин-протеинового комплекса [20]. В роли структурного белка он обеспечивает целостность мышечных волокон, стабилизирует клеточную мембрану и увеличивает ее сопротивляемость при мышечных сокращениях [21]. При исследовании на дистрофин подчеркнуто определялась извитость и “сжатость” во-

Таблица 3. Морфометрические характеристики мышечных волокон в группе больных с хроническим нарушением сознания и контрольной группе, ($M \pm m$)

	Контроль $n = 4$ $N = 14$	Группа больных с хроническим нарушением сознания $n = 6$	
		сторона без пареза $N = 14$	сторона пареза $N = 17$
Количество миоцитов быстрого типа в поле зрения, шт.	0.76 ± 0.05	0.82 ± 0.56	$1.15 \pm 0.08^*$
d , мкм	84.56 ± 0.32	69.66 ± 0.61	57.34 ± 0.28

d – среднее значение диаметра мышечной клетки дельтовидной мышцы, мкм.
 n – количество случаев, N – количество полей зрения, $*p < 0.05$.

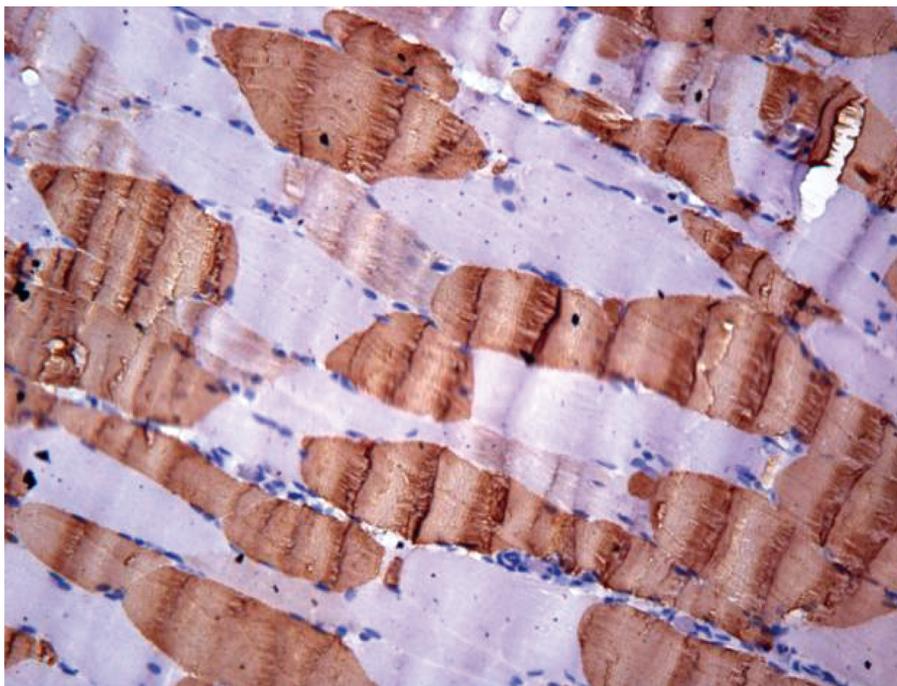


Рис. 6. Различная интенсивность окрашивания мышечных волокон при иммуногистохимической реакции с антителами к миозину быстрых мышц. Увеличение $\times 400$.

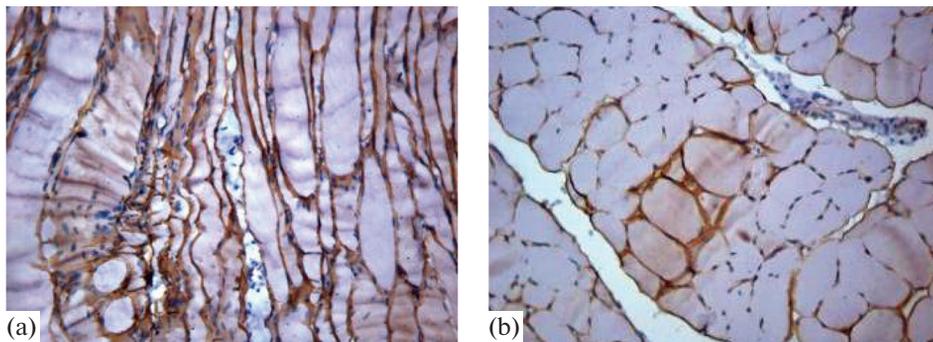


Рис. 7. Иммуногистохимическая реакция к дистрофину. Увеличение $\times 200$

- (a) – на продольном срезе извитые, истонченные мышечные волокна, размытость мембран;
 (b) – на поперечном срезе очаговое исчезновение дистрофина в мембранах, группа крупных мышечных волокон с сохранившимся дистрофином в мембранах на стороне пареза.

локон, демонстрирующие мышечную атрофию, “затяжки” мембран миоцитов (рис. 7а). Отмечена неравномерная интенсивность накопления дистрофина в мембране мышечных волокон с появлением “изъеденных” участков вплоть до очаговой потери дистрофина, особенно ближе к сарколемме (рис. 7б). Наблюдаемые изменения носили в большей степени очаговый характер. Дефицит стабилизирующего

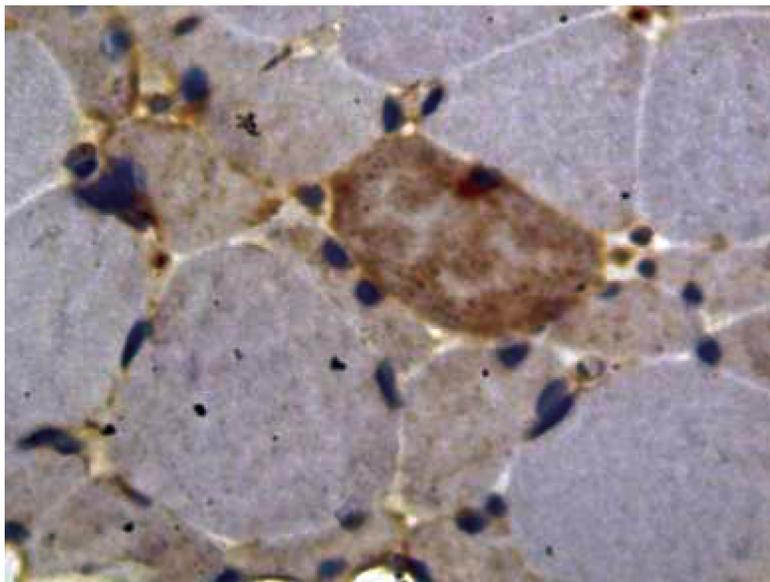


Рис. 8. Очаговая цитоплазматическая экспрессия беклина-1 в миоцитах. Иммуногистохимическая реакция. Увеличение $\times 200$.

белка мембраны скелетных клеток дистрофина приводит к повышению хрупкости сарколеммы, а также к псевдогипертрофии мышц и мышечной атрофии [22]. Так, на стороне пареза выявлялись группы крупных мышечных волокон с равномерной экспрессией дистрофина вдоль полноценной мембраны.

Беклин-1. Альтернативным механизмом, способствующим деградации и потере клеток под влиянием неблагоприятных факторов, является аутофагия [23]. Особую роль в координации данного процесса занимает белок беклин-1 (becline-1). В проведенном исследовании, во всех 6 случаях, наблюдалось как единичное, так и очаговое цитоплазматическое окрашивание мышечных клеток (рис. 8). Необходимо заметить, что изучаемый процесс прижизненной утилизации метаболитов клетки, подвергнувшихся изменениям, входит в естественный процесс так называемого “запрограммированного выживания клетки” [14].

Морфометрическое исследование

При подсчете количества быстрых мышц в препаратах у пациентов с ХНС и контрольной группе, выявленных при иммуногистохимической реакции с миозином быстрых мышц, отмечено значимое увеличение среднего количества быстрых мышц у пациентов с ХНС более выраженными на стороне пареза. Морфометрические показатели диаметра мышечных клеток продемонстрировали уменьшения среднего значения мышечного волокна у пациентов с ХНС, подтверждающие атрофию скелетных мышц с более выраженными проявлениями на стороне пареза (табл. 3).

Таким образом, структурные изменения скелетных мышц у пациентов с длительным нарушением сознания при развитии полинейропатии и миопатии крити-

ческих состояний являются неотъемлемой частью данных синдромов и носят прогрессирующий неспецифический дегенеративно-атрофический характер.

Результаты анализа метаболизма мышц плечевого пояса у пациентов с ХНС с применением ПЭТ-КТ с 18F-ДГ показал, что несмотря на наличие тетрапареза с симметричным изменением мышечного тонуса и глубоких рефлексов, у всех пациентов наблюдается отчетливая асимметрия метаболизма 18-ФДГ в правой и левой руке. Причем, у пациентов у пациентов правой (исходя из данных анамнеза, беседы с родственниками) с устойчивыми признаками сознания активизация метаболизма отмечена в мышцах правой руки. На наш взгляд, это может являться косвенным доказательством более быстрого восстановления функций моторной коры доминантного полушария.

Метаболизм ФДГ связан с произвольной (разговор, жевание и физические упражнения) и непроизвольной мышечной активностью (одышка, спастика), которые приводят к повышенному поглощению 18F-ФДГ в мышечной ткани. В зависимости от уровня инсулина в плазме может увеличиваться накопление глюкозы мышцами, индуцируя транслокацию GLUT-4 из внутриклеточных везикул в плазматическую мембрану. GLUT-4 также может увеличить поглощение глюкозы скелетными мышцами в постпрандиальном состоянии [24]. Описывают диффузное снижение фиксации 18F-ФДГ в мышцах плечевого пояса у пациентов с умеренной активизацией метаболизма мышц, связанных с моторной корой доминантного полушария.

Результаты гистологических исследований не выявили какой-либо разницы в зависимости от уровня метаболизма. Атрофия, дистрофия и миолиз наблюдались во всех образцах мышечной ткани. В мышечных группах зон исходного пареза эти процессы были более акцентированы, но принципиальных различий мы не обнаружили.

Атрофически-дистрофические изменения сопровождались повреждением сократительного аппарата и разрушением десмина. Сигнальный белок десмин входит в состав сарколеммы мышечных волокон и обеспечивает ее стабильность. Деградация цитоскелетного белка приводит к нарушению основных его функций с последующим нарушением целостности мембраны и дегенерации мышечных волокон [17, 25]. На начальных стадиях дегенерации включаются вспомогательные и защитные функции организма, обеспечивающие активную регенерацию мышечных фибрилл. При нарушении механизма регенерации наблюдаются дистрофические изменения и фиброзирование ткани. Подобные изменения мы нашли в мышцах пациентов с ограниченной подвижностью в виде дегенеративных изменений. Полная и/или частичная потеря белка, главным образом локализуемого в районе Z-диска саркомера, свидетельствует о нарушении структурной и динамической целостности клетки во время сокращения и передачи усилия с сократительного аппарата на мембрану с подмембранным цитоскелетом [17].

Увеличение количества волокон быстрого типа указывает на уменьшение физической нагрузки. Полной атрофии мышечного аппарата препятствуют изменения миозинового фенотипа медленных волокон в быстрые, в результате чего сохраняется объем миофибрилярного аппарата. Эта реакция является приспособительной в условиях снижения физической нагрузки и измененных нейротрофических воздействий [25]. По данным литературы, перестройка скелетных мышц в быстрые происходит при нарушениях иннервации у пациентов с повреждением различной этиологии. В экспериментах при полном “отключении” спинальных мотонейронов также наблюдается сдвиг миозинового фенотипа в “быструю” сторону [26].

Проведенные ранее исследования показали, что активация некоторых маркеров клеточной аутофагии начинается уже после 24 часового обездвиживания человека [14]. Инициация такой клеточной программы связана с воздействием различных индукторов клеточного стресса, например, таких как дефицит питательных веществ и повреждение органелл [27]. Необходимо отметить, что процесс аутофагии имеет разное функциональное значение, в одних случаях он может выступать как репаративное явление и обеспечивать выживание клетки за счет мобилизации ее ресурсов [28], в других, как механизм запрограммированной клеточной гибели [29]. Центральную роль в процессе аутофагии и обеспечении секвестрации органелл играет беклин-1 [30]. Принимая во внимание цитоплазматическую экспрессию белка и регенерационную способность клеток миосателлитов и миосимпластов [19], можно говорить о роли аутофагии как механизма запрограммированного выживания клеток.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Структурные изменения скелетных мышц у пациентов с длительным нарушением сознания при развитии полинейропатии и миопатии критических состояний имеют неспецифический дегенеративно-атрофический характер и более выражены на стороне пареза. Метаболические изменения, оцениваемые по уровню метаболизма 18F-ФДГ, развиваются симметрично, вне четкой зависимости от мышечного тонуса и глубоких рефлексов, с определенным приоритетом в скелетных мышцах, иннервируемых доминантным полушарием. Наблюдаемая в клинической практике возможность восстановления функций скелетных мышц с глубокими структурными и метаболическими изменениями у пациентов с ХНС указывает на их высокий регенеративный потенциал, связанный с адаптивными механизмами структурно-функциональной перестройки мышечных волокон.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа поддержана грантом РФФИ № 19-29-01066.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы и планирование (К.С.А., З.Ю.М., К.А.Н.), сбор данных (К.С.А., С.Е.Н., Р.Д.В., К.Е.А.), обработка данных (К.С.А., С.Е.Н., Р.Д.В., З.Ю.М.), написание и редактирование манускрипта (К.С.А., С.Е.Н., З.Ю.М., К.А.Н.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Schnakers C, Steven Laureys* (2018) *Coma and Disorders of consciousness*, second edition. Springer. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-55964-3>
2. *Jennett B* (2005) Thirty years of the vegetative state: clinical, ethical and legal problems. *Brain Res* 150: 537–543. [https://doi.org/10.1016/S0079-6123\(05\)50037-2](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(05)50037-2)
3. *Bruno MA, Gosseries O, Vanhauwenhuysse A, Chatelle C, Laureys S* (2010) État végétatif et état de conscience minimale : un devenir pire que la mort? In: *Enjeux éthiques en réanimation*. Springer, Paris. https://doi.org/10.1007/978-2-287-99072-4_13

4. Кондратьева ЕА, Кондратьев СА, Иванова НЕ (2016) Мышечная слабость без признаков полинейропатии у больных с длительным нарушением сознания. Случаи из практики. Анестезиология и реаниматология 61(2): 151–154. [Kondratieva EA, Kondratiev SA, Ivanova NE (2016) Muscle weakness without signs of polyneuropathy in patients with prolonged impaired consciousness. Cases from practice. Anesthesiology and Reanimatology 61(2): 151–154 (In Russ)].
<https://doi.org/10.18821/0201-7563-2016-61-2-151-154>
5. White J (1999) Consensus Conference. Rehabilitation of persons with traumatic brain injury. NIH consensus development panel on rehabilitation of persons with traumatic brain injury. JAMA 282(10): 974–983.
<https://doi.org/10.1001/jama.282.10.974>
6. Joseph T, Douglas I, Nicholas I (2018) Practice guideline update recommendations summary: disorders of consciousness: report of the Guideline Development, Dissemination, and Implementation Subcommittee of the American Academy of Neurology; the American Congress of Rehabilitation Medicine; and the National Institute on Disability, Independent Living, and Rehabilitation Research. *Giacino* 91(10): 450–460.
<https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000005926>
7. Pasternak C, Wong S, Elson EL (1995) Mechanical function of dystrophin in muscle cells. *J Cell Biol* 128: 355–361.
<https://doi.org/10.1083/jcb.128.3.355>
8. Hermans G, De Jonghe B, Bruyninckx F (2008) Clinical review: Critical illness polyneuropathy and myopathy. *Crit Care* 12: 238.
<https://doi.org/10.1186/cc7100>
9. Derde S, Hermans G, Derese I, Güiza F, Hedström Y, Wouters PJ, Bruyninckx F, D’Hoore A, Larsson L, Berghe G, Vanhorebeek I (2012) Muscle atrophy and preferential loss of myosin in prolonged critically ill patients. *Respirat Crit Care Med* 40(1): 79–89.
<https://doi.org/10.1097/CCM.0b013e31822d7c18>
10. Bierbrauer J, Koch S, Olbricht C, Hamati J, Lodka D, Schneider J, Luther-Schröder A, Kleber C, Faust K, Wiesener S, Spies CD, Spranger J, Spuler S, Fielitz J, Weber-Carstens S (2012) Early type II fiber atrophy in intensive care unit patients with nonexcitable muscle membrane. *Crit Care Med* 40(2): 647–650.
<https://doi.org/10.1097/CCM.0b013e31823295e6>
11. Shepherd S, Batra A, Lerner DP (2017) Review of Critical Illness Myopathy and Neuropathy. *The Neurohospitalist* 7(1): 41–48.
<https://doi.org/10.1177/1941874416663279>
12. Vanhorebeek I, Latronico N, Van den Berghe G (2020) ICU-acquired weakness. *Intensive Care Med* 46(4): 637–653.
<https://doi.org/10.1007/s00134-020-05944-4>
13. Кондратьев СА, Забродская ЮМ, Размологова ОЮ, Сафаров БИ, Жулев НИ, Никущенко АС (2013) Патоморфологические особенности полинейромиопатии критических состояний у пациентов в перестимулирующем вегетативном состоянии и состоянии “малого сознания”. *Рос нейрохирургическ Журн им проф АЛ Поленова* 4: 46–52. [Kondrat'ev SA, Zabrodskaya YuM, Razmahova OY, Safarov BI, Zhulev N, Nikishenkov AS (2013) Pathologic features of polyneuromyopathy critical conditions of patients in persistent vegetative state and the status of the “small mind”. *Rus Neurosurg J named after Prof AL Polenov* 4: 46–52 (In Russ)].
[https://doi.org/10.20969/VSKM.2016.9\(6\).124-130](https://doi.org/10.20969/VSKM.2016.9(6).124-130)
14. Kuballa P, Nolte WM, Castoreno AB, Xavier RJ (2012) Autophagy and the immune system. *Ann Rev Immunol* 30: 611–46.
<https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-020711-074948>
15. Karunanithi S, Soundararajan R, Sharma P, Nasw N, Bal Ch, Kumar R (2015) Spectrum of physiologic and pathologic skeletal muscle 18F-FDG uptake on PET/CT. *Am J Roentgenol* 205: W141–W149.
<https://doi.org/10.2214/AJR.14.13457>
16. Pak K, Shin MJ, Hwang SJ, Shin JH, Shin HK, Kim SJ, Kim IJ (2016) Longitudinal Changes in Glucose Metabolism of Denervated Muscle after Complete Peripheral Nerve Injury. *Mol Imaging Biol* 18(5): 741–747. PMID:
<https://doi.org/10.1007/s11307-016-0948-727028758>
17. Кубасова НФ, Цатурян ФК (2011) Молекулярный механизм работы актин-миозинового мотора в мышце. *Успехи биол химии* 51: 233–282. [Kubasova NF, Tsaturyan FK (2011) Molecular mechanism of the actin-myosin motor in the muscle. *Adv Biol Chem* 51: 233–282 (In Russ)].
<https://doi.org/10.1134/S0006297911130086>

18. *Shenkman BS, Turtikova OV, Nemirovskaya TL, Grigoriev AI* (2010) Contractile activity of skeletal muscle and the fate of myonuclei. *Acta Naturae* 2 (5): 62–69.
<https://doi.org/10.32607/20758251-2010-2-2-59-65>
19. *Relaix F, Zammit PS* (2012) Satellite cells are essential for skeletal muscle regeneration: the cell on the edge returns centre stage. *Development* 139(16): 2845–2856.
<https://doi.org/10.1242/dev.069088>
20. *Sharma P, Basu S, Mitchel W* (2014) Role of dystrophin in airway smooth muscle phenotype, contraction and lung function. *PLoS One* 9(7): 27–37.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0102737>
21. *Shenkman BS* (2016) From slow to fast. Geographical area the restructuring of the myosin phenotype of muscle fibers. *Acta Naturae* 4 (31): 52–65.
<https://doi.org/10.32607/20758251-2016-8-4-47-59>
22. *Brocca L, Cannavino J, Coletto L* (2012) The time course of the adaptations of human muscle proteome to bed rest and the underlying mechanisms. *J Physiol* 590(20): 5211–5230.
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.2012.240267>
23. *Kroemer G, Marino G, Levine B* (2010) Autophagy and the Integrated Stress Response. *Mol Cell* 40(2): 280–293.
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.09.023>
24. *Abouzjed MM, Crawford ES, Nabi HA* (2005) 18F-FDG imaging: Pitfalls and artifacts. *J Nucl Med Technol* 33: 145–155.
25. *Huey K, Roy R, Baldwin M, Edgerton R* (2001) Temporal effects of inactivity on myosin heavy chain gene expression in rat slow muscle. *Muscle Nerve* 24(4): 517–526.
<https://doi.org/10.1002/mus.1035>
26. *He C, Klionsky DJ* (2009) Regulation Mechanisms and Signaling Pathways of Autophagy. *Ann Rev Genetics* 43: 67–93.
<https://doi.org/10.1146/annurev-genet-102808-114910>
27. *Ravikumar B, Sarkar S, Davies JE* (2010) Regulation of mammalian autophagy in physiology and pathophysiology. *Physiol Rev* 90(4): 1383–1435.
<https://doi.org/10.1152/physrev.00030.2009>
28. *Пуньшев АВ* (2014) Репаративная аутофагия и аутофаговая гибель клетки. Функциональные и регуляторные аспекты 56(3): 179–196. [*Pyryshev AV* (2014) Reparative autophagy and autophagous cell death. *Function Regulator Aspects* 56(3): 179–196 (In Russ)].
<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003287>
29. *Meijer AJ, Codogno P* (2004) Regulation and role of autophagy in mammalian cells. *Int J Biochem Cell Biol* 36(12): 2445–2462.
<https://doi.org/10.1016/j.biocel.2004.02.002>
30. *Pasternak C, Wong S, Elson EL* (1995) Mechanical function of dystrophin in muscle cells. *J Cell Biol* 128: 355–361.
<https://doi.org/10.1083/jcb.128.3.355>

Structural and Metabolic Changes in Skeletal Muscles in Patients with Chronic Disorders of Consciousness – on the Issue of Critical Illness Polyneuromyopathies (Pet-Pathomorphological Study)

**S. A. Kondratyev^a, E. N. Skiteva^a, Yu. M. Zabrodskaya^{a, *}, D. V. Ryzkova^a,
E. A. Kondratyeva^a, and A. N. Kondratyev^a**

^a*Polenov Neurosurgical Institute, Branch of Almazov National Medical Research Centre, St. Petersburg, Russia*

**e-mail: zabrjulia@yandex.ru*

The presence of patients in a state of chronic disorders consciousness leads to the development of dysfunction (weakness, paresis) of their skeletal muscles – polyneuropathy and myopathy of critical states. It is of interest to study the mechanisms of pathology development and assess the rehabilitation potential of such patients. Positron emission computed tomography (PET/CT) with 18F-fluorodeoxyglucose (18F-FDG) and pathomorphological studies with immunohistochemistry were used to obtain data on structural and metabolic changes in the skeletal muscles of the upper extremities in 22 patients with chronic disorders consciousness. The study showed that structural changes in skeletal muscles have a non-specific degenerative-atrophic character with more pro-

nounced manifestations on the side of paresis. The metabolic disorders of the shoulder girdle muscles revealed by the decrease in the level of ^{18}F -FDG metabolism in patients with chronic disorders consciousness developed symmetrically, regardless of the degree of decrease in muscle tone and deep reflexes. Along with degenerative changes, including damage to the contractile elements of sarcomeres, loss of desmin and dystrophin, a decrease in the level of ^{18}F -FDH metabolism, signs of adaptive structural and functional rearrangements were observed in the skeletal muscles of patients- modification of the phenotype of muscle fibers by the “fast” type and activation of the autophagic pathway.

Keywords: skeletal muscle atrophy, critical illness polyneuropathy, chronic disorders of consciousness, vegetative state, unresponsive wakefulness syndrome, minimally conscious state, PET/CT

**МЫШЕЧНАЯ ПЛАСТИЧНОСТЬ В УСЛОВИЯХ
ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ РАЗГРУЗКИ: ЭФФЕКТЫ ИНГИБИТОРА
КИСЛОЙ СФИНГОМИЕЛИНАЗЫ КЛОМИПРАМИНА**

© 2021 г. А. В. Секунов¹, В. А. Протопопов¹, В. В. Скурыгин²,
М. Н. Шалагина¹, И. Г. Брындина^{1, *}

¹Ижевская государственная медицинская академия, Ижевск, Россия

²Удмуртский государственный университет, Ижевск, Россия

*E-mail: i_bryndina@mail.ru

Поступила в редакцию 18.02.2021 г.

После доработки 07.05.2021 г.

Принята к публикации 11.05.2021 г.

Сфинголипиды являются структурными компонентами клеток и внутриклеточными мессенджерами. Роль сфинголипидов, в том числе церамида, в регуляции мышечной пластичности не изучена. Цель работы – исследовать влияние ингибитора каталитического пути образования церамида на экспрессию тяжелых цепей миозина (ТЦМ, МуНС), атрофию и уровень протеинов mTOR/p-mTOR (Ser2484)/p70S6k (Thr389) в постуральной мышце голени (*m. soleus*) в условиях функциональной разгрузки. Работа выполнена на крысах-самцах Вистар массой 180–230 г. Для воспроизведения разгрузки использовали модель антиортостатического вывешивания (АОВ). Определяли признаки атрофии мышц (масса, диаметр Ферета), уровни церамида (ТСХ), протеинов сигнальной системы mTOR (вестерн-блоттинг) и экспрессию “быстрых” и “медленных” изоформ тяжелых цепей миозина (ПЦР в реальном времени, иммунофлуоресцентное исследование). Установлено, что в *m. soleus* при вывешивании наблюдается снижение уровней p-mTOR (Ser2484) и p70S6k (Thr389), которое предотвращается введением ингибитора кислой сфингомиелиназы (aSMase) кломипрамина. Сдвиг мышечного фенотипа в сторону экспрессии “быстрых” изоформ миозина (МуНС ПВ и МуНС II d/x), характерный для АОВ, также устраняется кломипразином, а степень атрофии мышцы под действием препарата уменьшается. Полученные результаты свидетельствуют о роли сфинголипидных механизмов в нарушении mTOR-сигналинга, регуляции экспрессии “быстрых” изоформ миозина и развитии атрофии мышц при их функциональной разгрузке.

Ключевые слова: скелетные мышцы, вывешивание, мышечный фенотип, mTOR, p70S6k, атрофия, сфингомиелиназа/церамид, кломипрамин

DOI: 10.31857/S0869813921060170

Необходимость постоянной адаптации к повышению или снижению сократительной активности эволюционно сформировало одну из ведущих характеристик скелетных мышц – высокую степень пластичности, которая реализуется посредством реорганизации сигнальных механизмов, поддерживающих как определенный мышечный фенотип, так и баланс анаболических/катаболических и проапоптотических/антиапоптотических процессов, от которых зависит мышечная масса [1–3]. Длительная адаптация к физическим нагрузкам или, напротив, к дефициту двигательной активности (гиподинамия, невесомость, иммобилизация) изменяет

структурно-функциональную организацию скелетной мышцы, максимально приспособлявая ее к изменившимся условиям [4–7]. Однако, будучи целесообразной на определенном (раннем) этапе разгрузки, такая адаптация несет и ряд негативных последствий, требующих применения профилактических мер, препятствующих переходу адаптивных перестроек в дезадаптивные.

Механизмы мышечной пластичности в условиях гравитационной разгрузки широко обсуждаются в литературе [1, 2, 6]. К настоящему времени определены некоторые звенья внутриклеточных сигнальных систем, регулирующих пластичность мышц в условиях функциональной разгрузки, а также при последующем восстановлении двигательной активности [8, 9].

Роль сфинголипидов в регуляции пластичности мышц практически не изучена. Между тем, накапливается все больше данных, свидетельствующих о том, что сфинголипиды, включая церамид, играют ключевую роль в регуляции функций скелетных мышц как структурно-функциональные компоненты клеточных мембран и внутриклеточные мессенджеры [10]. Установлено, что церамид повышает утомляемость мышц, снижает силу сокращений, усиливает прооксидантную активность, ингибирует синтез белков, негативно влияет на функции митохондрий, способствует индукции апоптоза и инсулинорезистентности [11–13]. Необходимо отметить, что эффекты функциональной разгрузки скелетных мышц при их неиспользовании, в том числе в условиях гипогравитации, во многом совпадают с действием церамида.

В исследованиях на моделях гравитационной разгрузки работ, посвященных изучению интрамукулярных эффектов церамида, немного [14–20]. Нами установлено, что при разгрузке, вызванной антиортостатическим вывешиванием (АОВ), церамид, накапливающийся в мышцах в результате каталитического расщепления сфингомиелина, модулирует состояние липидных рафтов; это приводит к формированию особых доменов (ceramide enriched membrane domains), способных к слиянию в более крупные кластеры [14–18]. Показано, что такие кластеры становятся платформами, способствующими сборке и активации мембранных белков, в том числе инициирующих проапоптотической сигналингу [21, 22].

Участие сфинголипидов в механизмах регуляции пластичности мышц, включая вызванную АОВ реорганизацию мышечного фенотипа постуральной мышцы в сторону снижения экспрессии “медленного” миозина, совершенно не изучено. Принимая во внимание множественность эффектов церамида как сигнальной молекулы, мы предположили, что он может оказывать влияние на регуляцию экспрессии тяжелых цепей миозина, определяющих тот или иной мышечный фенотип. Предпосылкой к данному предположению явились данные, свидетельствующие о роли aSMase и церамида в ингибировании активации транскрипционного регулятора NFATc (nuclear factor of activated T-cells) в Т-лимфоцитах [21], а также результаты исследований, указывающих на роль сфинголипидов в сигнальных механизмах, ассоциированных с MyoD (myoblast determination protein 1) как регулятором экспрессии “быстрых” изоформ миозина [23, 24]. Так, Seward с соавт. [23] обнаружили, что в камбаловидной мышце мышей с нокаутом гена белка MyoD повышение экспрессии MyHC IIb после двухнедельного АОВ было менее выражено, чем у мышей дикого типа. С другой стороны, показано, что С2-церамид и сфингомиелиназы подавляют экспрессию MyoD, индуцированную IGF-I в культуре мышечных С2С12 миобластов [24].

Учитывая вышеизложенное, в данной работе мы поставили цель выяснить влияние кломипрамина (функционального ингибитора aSMase [22]) на изменения мышечного фенотипа, атрофию и mTOR/p70S6k сигналингу в *m. soleus* крыс при функциональной разгрузке, вызванной АОВ.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Опыты проведены на крысах-самцах Вистар массой 180–230 г (количество использованных животных дано ниже в описании каждого раздела работы). Для воспроизведения функциональной разгрузки мышц использовали модель АОВ под углом 30° к горизонтальной поверхности по Ильину-Новикову [25] в модификации Morey-Holton [26]. В данной модели у животных сохраняется возможность передвижения по клетке на передних конечностях и нормальный доступ к воде и пище. Длительность воздействия составляла 4 и 14 дней. Исследование одобрено этическим комитетом Ижевской государственной медицинской академии. При выполнении экспериментов руководствовались правилами проведения работ на экспериментальных животных (Приложение к Приказу Министерства здравоохранения РФ № 267 от 19.06.2003).

Проведены следующие серии экспериментов: 1) 4- и 14-дневное АОВ в сочетании с введением ингибитора аSMase кломипрамина; 2) АОВ в сочетании с введением растворителя – 0.9%-ного раствора NaCl. Кломипрамин (Анафранил, Novartis, Швейцария) вводили внутримышечно в дозе 10 мг/кг в следующем режиме: ежедневно в течение 5 дней до АОВ и через день во время АОВ. Контролем служили интактные крысы. После окончания воздействий у животных под золеитоловым наркозом (Virbas, Франция, в дозе 10 мг/кг, 0.1 мл) выделяли камбаловидную мышцу, взвешивали и быстро замораживали в жидком азоте, после чего хранили при –80°C.

Для биохимического исследования мышцы (10 мг), полученные от интактных ($n = 8$), вывешенных с введением кломипрамина или 0.9%-ного раствора NaCl крыс ($n = 6$ и $n = 5$ соответственно), гомогенизировали, и в гомогенатах определяли уровень общего mTOR, фосфорилированного p-mTOR (Ser2484) и p-p70S6k (Thr389) с помощью вестерн-блоттинга. Мышечную ткань гомогенизировали в 100 мкл охлажденной буферной системы, содержащей RIPA-буфер, фенилметилсульфонил фторид (PMSF), ортованадат натрия, коктейль ингибиторов протеаз (Santa Cruz Biotechnology, США). Затем проводили гомогенизацию и инкубацию образцов в течение 30 мин при 4°C с последующим центрифугированием (15 мин при температуре 4°C, 12000 об/мин). В полученном супернатанте содержание исследуемых белков определяли методом иммуноблоттинга. Для этого подготовленные образцы разделяли в геле SDS-PAGE по Laemmli [27] с использованием камеры Mini Protean Tetra (Bio-Rad, США), затем переносили на нитроцеллюлозную мембрану в системе Mini Trans-Blot Cell (Bio-Rad, США). Для иммуноокрашивания использовали первичные кроличьи и антивидовые козы антитела, меченные пероксидазой (Abcam, США). Разведение первичных и вторичных антител проводили в соответствии с рекомендациями производителя. Полосы белка на нитроцеллюлозной бумаге инкубировали с первичными антителами в течение ночи (16–18 ч). После 3-кратной промывки нитроцеллюлозной бумагой по 5–10 мин в растворе TBS-T (pH 7.5) ее инкубировали с раствором вторичных антител в течение 1 ч. Проявляли полосы с помощью диаминбензидиновой реакции. Цифровые изображения полос получали с помощью сканера и затем анализировали в программе ImageLab Software (Bio-Rad, США). Минимальную интенсивность окрашивания полосы белка для анализируемого образца принимали за 1, а интенсивность окрашивания других полос на этой мембране выражали отношением к минимальной интенсивности. Статистический анализ проводили с помощью программы SPSS 22.0.

Церамид определяли в детергент-резистентной мембранной фракции (ДРМ) камбаловидных мышц (в контроле $n = 6$, при АОВ 4 и 14 дней $n = 5$ и 6 соответственно, при АОВ 4 и 14 дней с введением кломипрамина $n = 8$, в серии с введением кломипрамина интактным животным ежедневно в течение 5 дней $n = 6$). ДРМ

Таблица 1. Праймеры для qRT-PCR исследования ТЦМ

Ген	Прямой праймер	Обратный праймер	№ по базе данных NCBI
<i>Myh7</i> (ТЦМ Iβ)	3'-CCAAGTTCGCAAGGTGCAG-5'	3'-ATCCTTAGGGTTGGGTAGACA-5'	NM_017240.2
<i>Myh2</i> (ТЦМ IА)	3'-CAAGAGACAAGCTGAGGAGGCT-5'	3'-TTCTACAGCATCAGAGCTGCCTT-5'	NM_001135157.1
<i>Myh4</i> (ТЦМ IВ)	3'-ATTACAGGCGTCTCTGGAGGAAG-5'	3'-CTCAGCGTCCAGTGTGCTTTG-5'	NM_019325.1
<i>Myh1</i> (ТЦМ II d/x)	3'-AGAGACAAGCCGAGGAAGCG-5'	3'-GGTCACTTTCCTGCTTTGGATCG-5'	NM_001135158.1

получали путем ультрацентрифугирования в градиенте сахарозы по Раевой с соавт. [28]. С целью определения количества церামида, липиды экстрагировали из ткани мышц по Фолчу [29], хлороформенные экстракты наносили на пластины силикагеля с УФ-меткой (HPTLC Silica gel 60 F₂₅₄ plates, Merck) и подвергали тонкослойной хроматографии в смеси бутанол : ледяная уксусная кислота : вода в соотношении 3 : 1 : 1 [30]. Пятна сфинголипидов проявляли в парах йода. Оценку содержания церамидов проводили в сравнении со стандартом (“Avanti polar lipids”) с использованием видеоденситометра “Сорбфил”, в ультрафиолетовом диапазоне (254 нм); расчет уровня церамидов производили с помощью программного обеспечения “Сорбфил”.

С целью определения экспрессии тяжелых цепей миозина (ТЦМ) использовали ПЦР в реальном времени и иммунофлуоресцентное (ИФ) исследование поперечных срезов мышц, меченных антителами к “быстрым” ТЦМ. ПЦР исследования проводили на интактных ($n = 6$) и вывешенных в течение 14 дней крысах, которым вводили кломипрамин ($n = 6$) или 0.9%-ный раствор NaCl ($n = 6$).

Для ПЦР анализа [31] тотальную РНК выделяли из 10 мг замороженного образца мышцы с использованием набора РНК-экстран (Синтол, Россия). Выделение проводили согласно инструкции производителя. Выделенную РНК хранили при -70°C до проведения ПЦР анализа. Для конструирования праймеров (табл. 1) использовали сервис Primer BLAST, находящийся в свободном доступе (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). В качестве референсных генов были выбраны гены GAPDH (глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы) и бета-актина. ПЦР анализ проводили в амплификаторе CFX96 (Bio Rad, США).

Использованные праймеры приведены в табл. 1.

Для оценки степени атрофии определяли относительную массу мышц (мг/г массы тела животного), а также проводили иммунофлуоресцентное исследование препаратов мышц, меченных антителами к кавеолину-3 (Cav-3). С целью определения экспрессии “быстрой” изоформы миозина проводили иммунофлуоресцентный анализ поперечных срезов мышц, меченных антителами к данной изоформе.

Для проведения иммунофлуоресцентного исследования животных перфузировали через восходящую аорту забуференным физиологическим раствором (PBS в мМ: 3.2 NaH₂PO₄, 0.5 K₂HPO₄, 1.3 KCl, 135 NaCl, pH 7.4), а затем 4%-ным раствором параформальдегида в PBS. После этого камбаловидную мышцу помещали в тот же фиксатор на 2 ч, затем переносили в 30%-ный раствор сахарозы на сутки, после чего замораживали на сухом льду. Серийные продольные и поперечные срезы мышц (14 мкм) были сделаны с помощью криостата HM525 NX и закреплены на предметных стеклах Superfrost Plus (Thermo Fisher Scientific, США). Иммунофлуоресцентное окрашивание проводили согласно методике, описанной ранее [18]. Перед окрашиванием срезы выдерживали в 3%-ном растворе перекиси водорода в течение 10 мин и после промывки в PBS инкубировали в 5%-ном растворе BSA в течение 2 ч.

Для исследования атрофии мышц срезы инкубировали с антителами к Cav-3 (кроличьи IgG, 1 : 200, Abcam) в течение 24 ч при комнатной температуре. Для выявления связавшихся с Cav-3 антител использовали вторичные антикроличьи антитела (козьи IgG, 1 : 300, Abcam), конъюгированные с Alexa Fluor 488. Брали каждый 5-й участок и проводили по 10 измерений диаметра Ферета мышечных волокон. Для выявления изменений фенотипа мышц проводили обработку срезов антителами к “быстрым” изоформам ТЦМ (Anti-Fast Myosin Skeletal Heavy chain antibody, Abcam). Экспрессия “быстрого” миозина измерялась по количеству (доле) иммунопозитивных к этой изоформе волокон по отношению ко всем волокнам в поле зрения. Анализ изображений проводился с помощью приставки DS-Fi3 EF-2E, совмещенной с микроскопом Nikon Eclipse E200, с использованием морфометрических программ Image-Pro Plus 6.0 и Image-Pro Insight (Media Cybernetics, США). Количество животных в данной серии: контроль ($n = 4$), АОВ 14 дней с введением кломипрамина или 0.9%-ного раствора NaCl (также по 4 крысы).

Статистическую обработку проводили в SPSS Statistica 22.0. Для оценки достоверности различий в группах и между отдельными группами применяли критерии Краскела–Уоллиса и Манна–Уитни, различия считали достоверными при $p < 0.05$ (с учетом поправок на множественные сравнения).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

1. Изменение уровня церамида в детергент-резистентной мембранной фракции скелетных мышц

Установлено, что после 4- и 14-дневного АОВ количество церамида в ДРМ возросло (в 7.3 раза, $p < 0.01$ и в 2.1 раза, $p < 0.01$ соответственно).

При введении кломипрамина вывешенным животным уровень церамида не отличался от контрольных значений. Достоверные различия с АОВ найдены в мышцах животных, вывешенных в течение 14 дней и получавших кломипрамин (рис. 1). Введение кломипрамина до начала вывешивания (эксперименты на интактных крысах, которым вводили препарат ежедневно в течение 5 дней) не сопровождалось достоверным изменением количества церамида в исследуемых мышцах ($57.1 \pm 11.8\%$ при $100 \pm 23.3\%$ в контроле, $p > 0.05$)

2. Оценка атрофии мышц при функциональной разгрузке

14-дневная функциональная разгрузка сопровождалась потерей массы камбаловидной мышцы на 34.8% ($p < 0.05$), уменьшением диаметров Ферета мышечных волокон (FDM) на 49% ($p < 0.05$). Мышцы крыс, которым вводили кломипрамин, были менее атрофичными, чем мышцы крыс, не получавших препарат: масса мышц и FDM уменьшались соответственно на 25.4% и 24.7% ($p < 0.05$) по сравнению с контрольными значениями и были достоверно больше, чем при АОВ (рис. 2).

3. Оценка изменений фенотипа мышечных волокон

С целью оценки особенностей экспрессии различных изоформ тяжелых цепей миозина в контрольной и вывешенной мышце (в том числе на фоне введения ингибитора α Smase), применяли ПЦР в реальном времени и иммунофлуоресцентное исследование поперечных срезов мышц, обработанных антителами к “быстрой” изоформе ТЦМ.

Как и следовало ожидать, в мышцах, подвергнутых двухнедельной функциональной разгрузке, ПЦР-анализ выявил изменения экспрессии как “быстрых”, так и “медленных” изоформ ТЦМ (рис. 3). Так, уровень мРНК “медленного” миозина (ТЦМ I β) уменьшился на $99.1 \pm 1.3\%$ ($p < 0.01$), а мРНК одной из быстрых изоформ

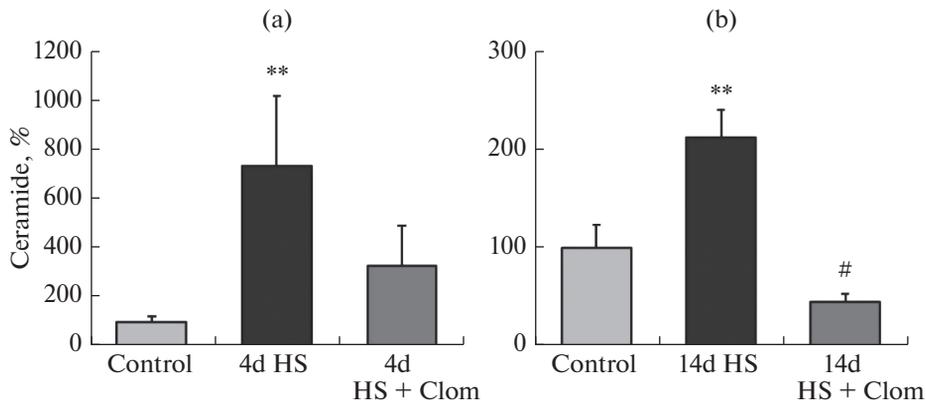


Рис. 1. Влияние ингибитора aSMase кломипрамина (Clom) на уровень церамида в *m. soleus* при 4-дневном (4d HS) – (a) и 14-дневном (14d HS) (b) антиортостатическом вывешивании (АОВ). Обозначения: серый столбик – контроль; черный – АОВ; темно-серый – АОВ + ингибитор; * – различия по сравнению с контрольной группой статистически значимы при $p < 0.05$, ** – при $p < 0.01$; # – различия между группами АОВ и АОВ + ингибитор ($p < 0.05$). Значения представлены как $M \pm SEM$.

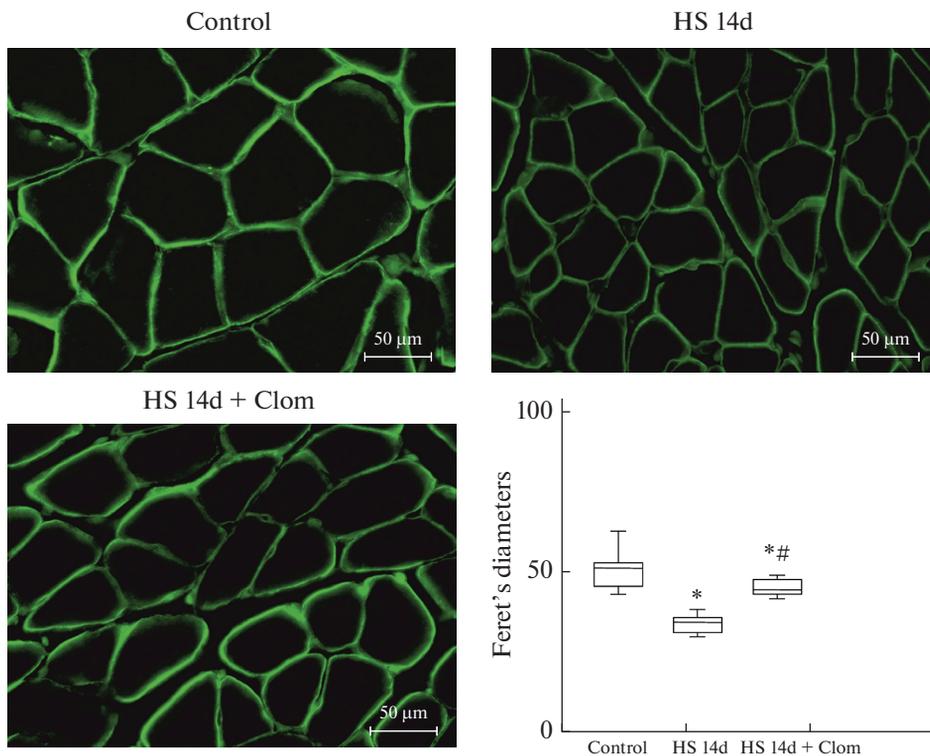


Рис. 2. Влияние ингибитора aSMase кломипрамина (Clom) на диаметр Ферета мышечных волокон (мкм) *m. soleus* в контроле, при 14-дневном антиортостатическом вывешивании (АОВ) (HS 14d) и при АОВ на фоне введения Clom. * – различия по сравнению с контрольной группой статистически значимы при $p < 0.05$; # – различия между группами АОВ и АОВ + ингибитор ($p < 0.05$).

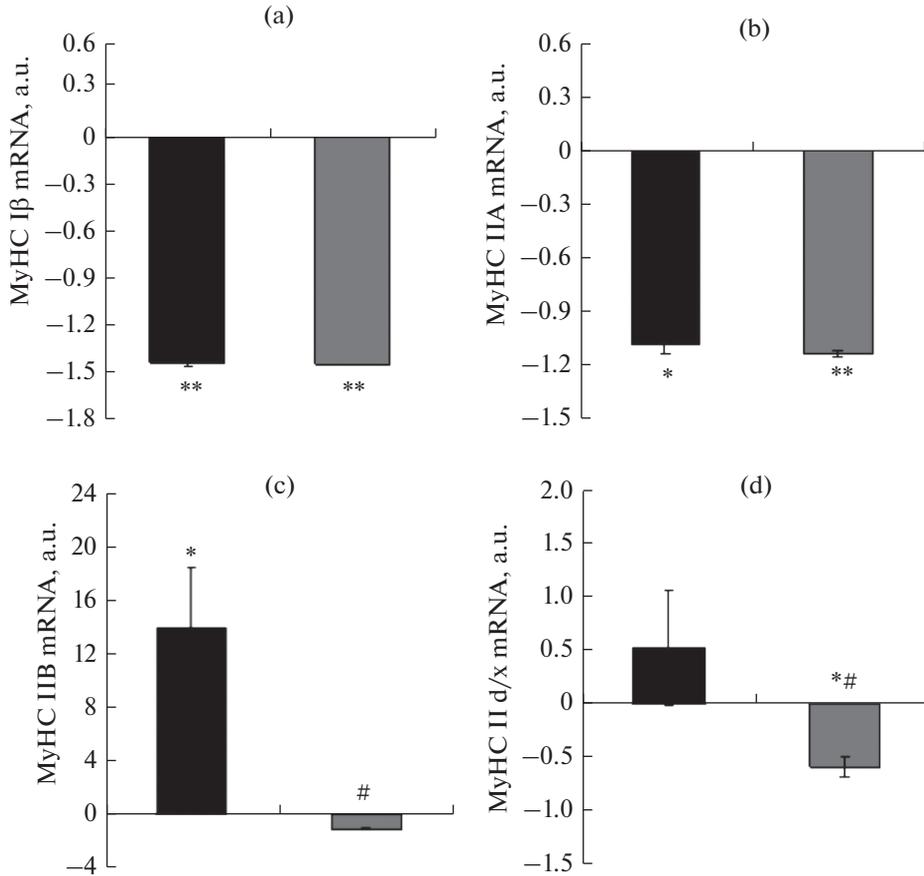


Рис. 3. Влияние кломипрамина на экспрессию миозинов “медленного” (а) и “быстрого” (b–d) типов в *m. soleus* крыс при 14-дневном антиортостатическом вывешивании (АОВ). Обозначения: черный столбик – АОВ; темно-серый столбик – АОВ + ингибитор; * – различия по сравнению с контрольной группой статистически значимы при $p < 0.05$, ** – при $p < 0.01$; # – различия между группами АОВ и АОВ + ингибитор ($p < 0.05$). Значения представлены как $M \pm SEM$, в условных единицах (а.у.). Контрольные значения приняты за ноль.

(ТЦМ IIA) – на $88.0 \pm 3.7\%$ ($p < 0.01$). Введение кломипрамина вывешенным животным не повлияло на экспрессию этих изоформ ТЦМ.

Экспрессия других изоформ “быстрого” миозина повышалась (ТЦМ IIB) или имела тенденцию к повышению (ТЦМ II d/x). Интересно, что у животных, которым вводили ингибитор сфингомиелиназы, экспрессия мРНК данных изоформ восстанавливалась до уровня контроля (ТЦМ IIB) или становилась достоверно более низкой, чем в контроле (ТЦМ II d/x).

Изучение мышечных волокон, экспрессирующих преимущественно “быстрые” изоформы ТЦМ, на поперечных срезах камбаловидных мышц, обработанных антителами к данным изоформам, показало следующее (рис. 4). В группе контроля такие волокна были немногочисленны и составляли $5.69 \pm 1\%$ ($p < 0.001$) от общего числа ($n = 703$) волокон в препарате.

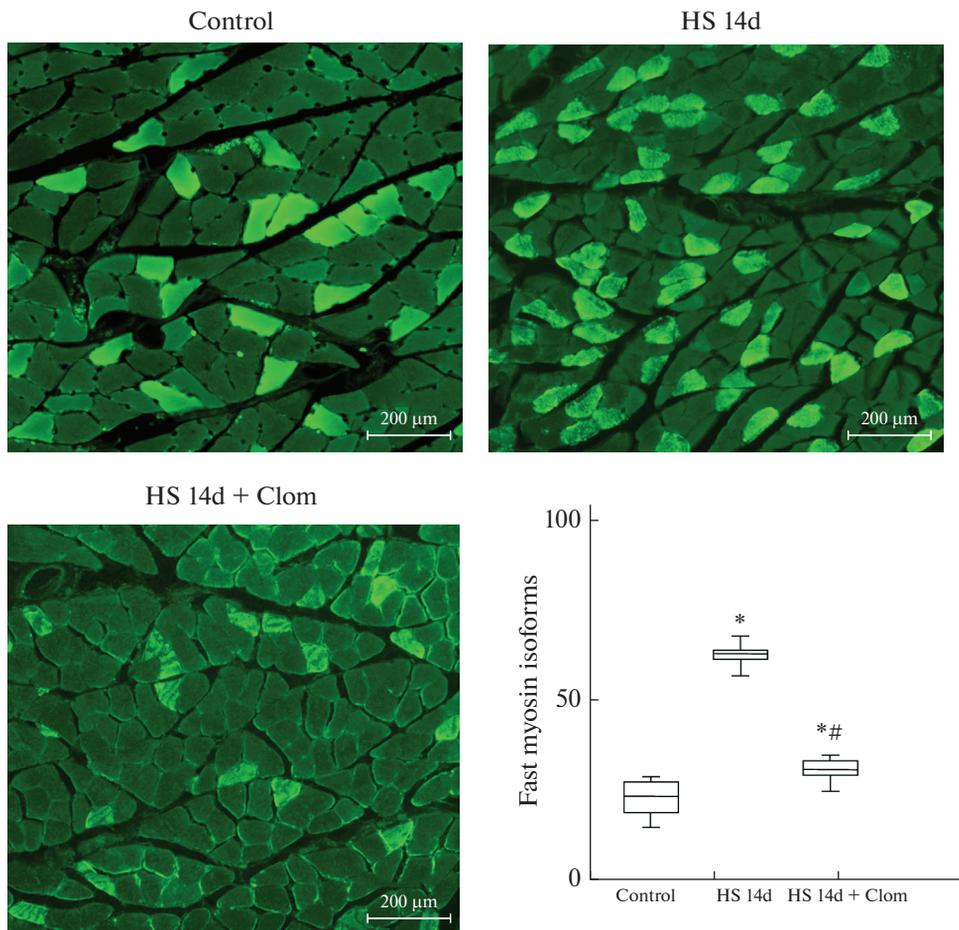


Рис. 4. Иммунофлуоресцентный анализ экспрессии быстрых изоформ тяжелых цепей миозина на поперечных срезах *m. soleus*. * – $p < 0.05$ в сравнении с контролем; # – $p < 0.05$ в сравнении с антиортостатическим вывешиванием. Данные представлены как число волокон (n), экспрессирующих “быстрые” изоформы миозина, в поле зрения, равном 3 мм^2 .

В группе, подвергнутой 14-дневной функциональной разгрузке, наблюдалось значительное увеличение количества волокон, экспрессирующих “быстрые” изоформы миозина: их доля составила $19.3 \pm 1\%$ ($p < 0.01$) от общего числа исследованных ($n = 545$); при этом прирост был равен $236 \pm 6\%$ ($p < 0.01$) в сравнении с контролем. В вывешенной на 14 дней группе, получавшей ингибитор αSMase кломипрамин, повышенная экспрессия “быстрых” изоформ ТЦМ сохранялась, однако прирост по сравнению с контролем был существенно меньшим ($84.4 \pm 6\%$, $p < 0.01$). Доля волокон, экспрессирующих “быстрые” изоформы миозина (относительно общего количества исследованных, $n = 362$), составляла при этом лишь $10.49 \pm 1\%$ ($p < 0.01$).

Таким образом, как ПЦР-анализ, так и иммунофлуоресцентное исследование мышц показали, что кломипрамин предотвращает повышение экспрессии “быстрых” изоформ ТЦМ при 14-дневном АОВ.

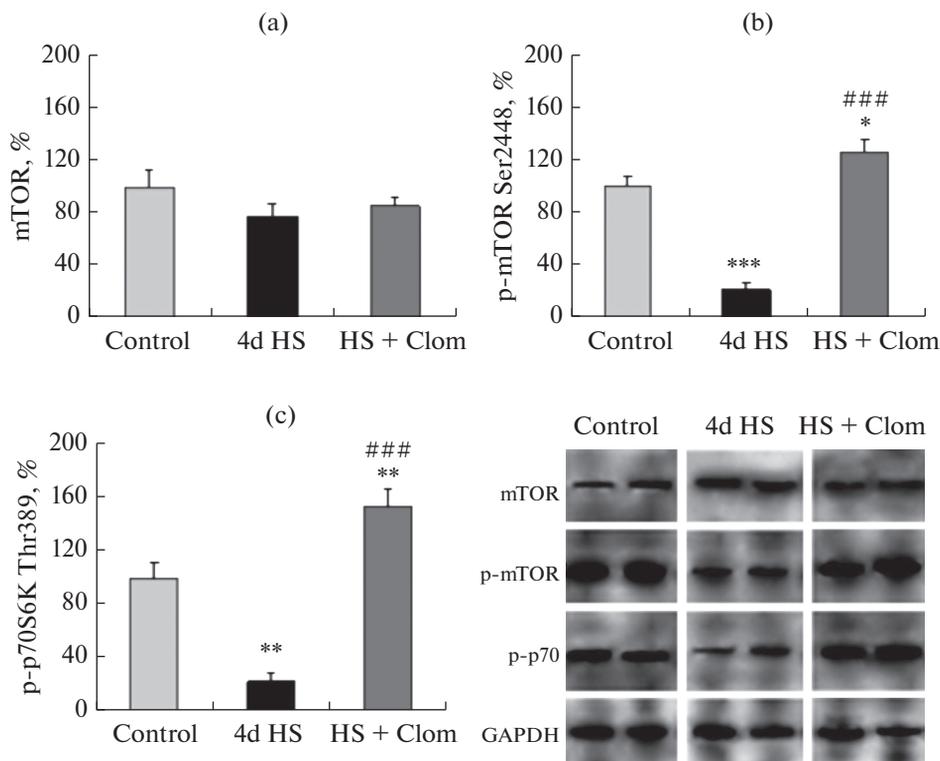


Рис. 5. Влияние кломипрамина на уровень белков: (a) – mTOR, (b) – p-mTOR (Ser2448), (c) – p-p70S6K (Thr389) в *m. soleus* при 4-дневном антиорто статистическом вывешивании.

Серый столбик – контроль; черный – АОВ; темно-серый – АОВ + ингибитор; * – различия по сравнению с контрольной группой статистически значимы при $p < 0.05$, ** – при $p < 0.01$; *** – при $p < 0.001$; ### – различия между группами АОВ и АОВ + ингибитор ($p < 0.001$). Значения представлены как $M \pm SEM$, в %.

4. Изменения mTOR, p-mTOR (Ser2448) и p-p70S6K (Thr389)

Поскольку известно, что мышечная разгрузка сопровождается прогрессирующим снижением синтеза белка при увеличении длительности воздействия, нами были проанализированы изменения белков системы mTOR (mammalian target of rapamycin), имеющей непосредственное отношение к регуляции белково-синтетических процессов в клетках.

После 4-дневного АОВ в *m. soleus* крыс наблюдалось снижение уровня фосфорилирования mTOR (p-mTOR) при отсутствии изменений общего количества данного протеина (рис. 5). Показано, что p-mTOR (Ser2448) уменьшался на $79 \pm 5.3\%$, или в 4.8 раза ($p < 0.001$). Параллельно наблюдалось уменьшение количества фосфорилированного p70S6K (Thr389), причем степень уменьшения данного протеина была сопоставима с дефицитом p-mTOR (Ser2448) и составляла $77.1 \pm 6.2\%$ (снижение в 4.4 раза, $p < 0.001$) по отношению к контролю. Введение кломипрамина предотвращало понижение обоих показателей, увеличивая уровень p-mTOR по сравнению с АОВ в 6.0 раз ($p < 0.01$) и p-p70S6K – в 6.7 раза соответственно ($p < 0.01$). При этом обнаружена тенденция к увеличению p-p70S6K (Thr389) и по сравнению с контролем (на $53.8 \pm 12.8\%$, $p = 0.048$). Введение кломипрамина в течение 5 дней

перед вывешиванием не изменяло уровень фосфорилированного p-mTOR (Ser2448): прирост составил $17.7 \pm 4.9\%$ ($p = 0.057$).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Полученные результаты свидетельствуют о том, что кломипрамин, ингибирующий образование церамида из сфингомиелина путем подавления активности aSMase [22], предотвращает снижение активности сигнальной системы mTOR/p70S6k и повышение экспрессии “быстрых” изоформ ТЦМ, а также уменьшает признаки атрофии, вызванной разгрузкой мышц.

Известно, что атрофия, вызванная бездействием (disuse), связана с нарушением баланса между синтезом и деградацией мышечных протеинов [4, 5]. В наших экспериментах атрофии предшествовало снижение фосфорилирования mTOR (Ser2448) и p70S6K (Thr 389). Нарушение фосфорилирования p70S6K по Thr389 может приводить к снижению эффектов данной киназы как одного из основных регуляторов белкового синтеза [32]. Имеются сведения об ингибирующем влиянии церамида на Akt/mTOR сигналинг [33]. На основании ранее опубликованных [14] и полученных в данной работе результатов, свидетельствующих о накоплении церамида в *m. soleus* при 4- и 14-дневной разгрузке, можно предположить участие данного сфинголипида в развитии атрофии разгруженной мышцы посредством подавления сигнального пути Akt/mTOR. Восстановление фосфорилирования mTOR и p70S6K на фоне введения ингибитора aSMase свидетельствует о важной роли церамида, образованного путем сфингомиелиназного гидролиза, в негативном влиянии разгрузки мышц на компоненты системы Akt/mTOR/p70S6k. С другой стороны, уменьшение степени атрофии мышц на фоне применения кломипрамина также позволяет предположить, что церамид, образованный в результате усиления сфингомиелиназного гидролиза, может быть вовлечен в механизмы развития атрофии при мышечной разгрузке. Примечательно, что ингибирование мириоцином серинпальмитойлтрансферазы (SPT) – ключевого фермента, регулирующего синтез церамида *de novo* [34], не приводило к ослаблению атрофического процесса в разгруженной *m. soleus* [20].

По-видимому, возможны следующие объяснения различий результатов, полученных в работе Salaun с соавт. [20] и в нашем исследовании. Так, можно предположить, что для реализации “атрофического” эффекта церамида важно не только повышение уровня данного сфинголипида как таковое, но и механизм (путь), по которому он образуется. Местом образования церамида *de novo* является саркоплазматический ретикулум, откуда церамид транспортируется в комплекс Гольджи для последующего синтеза сложных сфинголипидов. Основным компартментом, где реализуются эффекты сфингомиелиназ, является клеточная мембрана, куда aSMase транспортируется из лизосом под действием ряда факторов, включая воздействие цитокинов, оксидативного стресса и др. [10]. Повышение образования церамида под действием aSMase в мембранных областях мышечных волокон приводит к дезорганизации липидных рафтов и образованию церамидных микродоменов, формирующих при слиянии более крупные структуры. Они функционируют как платформы, способные к относительно избирательной кластеризации определенных белков (рецепторов, каналов и т.п.); в такую кластеризацию могут быть вовлечены рецепторы, активирующие сигнальные пути регуляции апоптоза или подавляющие сигнализацию, связанную с белковым синтезом [22]. Также интересно отметить, что в работе [20] помимо снижающего уровень церамида действия мириоцина продемонстрировано его выраженное токсическое действие на печень; не исключено, что побочные эффекты могут быть и в мышцах. Следует упомянуть, что в

наших ранее проведенных экспериментах [14] уровень SPT при АОВ понижался или достоверные изменения данного фермента отсутствовали.

Данные о влиянии ингибитора aSMase на экспрессию ТЦМ в разгруженной мышце получены нами впервые. Интересно, что в исследовании, выполненном с помощью ПЦР-анализа, кломипрамин оказывал превентивное влияние на повышение экспрессии только “быстрых” изоформ миозина (МуНС II β и МуНС II α), но при этом совершенно не влиял на экспрессию “медленного” миозина (МуНС I β). Аналогичные результаты в отношении “быстрого” миозина получены и в нашем иммуоферментном исследовании. Следует отметить, что механизмы экспрессии “быстрых” изоформ к настоящему времени являются крайне мало изученными [2]. Данных о том, какие сигнальные пути, связанные со сфингомиелиназой и церамидом, могут участвовать в усилении экспрессии МуНС II β и МуНС II α в разгруженной мышце, в литературе отсутствуют. Выше было упомянуто, что о такой возможности косвенно свидетельствуют работы Seward [23] и Strle [24] с соавторами. На основании этих работ можно сделать предположение о роли церамида в регуляции экспрессии “быстрых” изоформ миозина посредством MyoD.

Таким образом, впервые полученные в нашем исследовании результаты свидетельствуют о том, что в условиях функциональной разгрузки мышц кломипрамин предотвращает снижение активности сигнальной системы mTOR/p70S6k и повышение экспрессии “быстрых” изоформ ТЦМ, а также уменьшает признаки атрофии, вызванной разгрузкой. На данном этапе не представляется возможным окончательно ответить на вопрос о механизмах участия церамида в вышеупомянутых процессах. Можно предположить, что в регуляции каждого из них значимы механизмы, ассоциированные с активацией сфингомиелиназного гидролиза и образованием церамида. Более точные сведения об участии сфинголипидов в поддержании мышечной пластичности в условиях функциональной разгрузки предстоит получить в дальнейших исследованиях.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 16-15-10220) и Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 19-315-90099).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы (И.Г.Б.), планирование эксперимента (И.Г.Б., В.В.С.), сбор данных (А.В.С., В.А.П., В.В.С., М.Н.Ш.), обработка данных (А.В.С., В.А.П., В.В.С.), написание манускрипта (И.Г.Б., А.В.С., В.В.С.), редактирование манускрипта (И.Г.Б.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Baldwin KM, Haddad F (2001) Invited review: Effects of different activity and inactivity paradigms on myosin heavy chain gene expression in striated muscle. *J Appl Physiol* 90: 345–357. <https://doi.org/10.1152/jappl.2001.90.1.345>
2. Шенкман БС (2016) От медленных к быстрым. Гипогравиционная перестройка миозинового фенотипа мышечных волокон. *Acta Naturae* 8: 52–56. [Shenkman BS (2016) From slow to fast: Hypogravity-induced remodeling of muscle fiber myosin phenotype. *Acta Naturae* 8: 47–59 (In Russ)]. <https://doi.org/10.32607/20758251-2016-8-4-47-59>

3. *Siu PM* (2009) Muscle apoptotic response to denervation, disuse, and aging. *Med Sci Sports Exerc* 41(10): 1876–1886.
<https://doi.org/10.1249/MSS.0b013e3181a6470b>
4. *Fitts RH, Riley DR, Widrick JJ, Robert H, Riley DR* (2000) Physiology of a microgravity environment invited review: microgravity and skeletal muscle. *J Appl Physiol* 89(2): 823–839.
<https://doi.org/10.1152/jappl.2000.89.2.823>
5. *Bodine SC* (2013) Disuse-induced muscle wasting. *Int J Biochem Cell Biol* 45: 2200–2208.
<https://doi.org/10.1016/j.biocel.2013.06.011>
6. *Baldwin KM, Haddad F, Pandorf CE, Roy RR, Edgerton VR* (2013) Alterations in muscle mass and contractile phenotype in response to unloading models: role of transcriptional/pretranslational mechanisms. *Front Physiol* 4: 284.
<https://doi.org/10.3389/fphys.2013.00284>
7. *Leeuwenburgh C, Gurley CM, Strotman BA, Dupont-Versteegden EE* (2005) Age-related differences in apoptosis with disuse atrophy in soleus muscle. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 288(5): R1288–R1296.
8. *Ohlendieck K* (2011) Proteomic profiling of skeletal muscle plasticity. *Muscles Ligaments Tendons J* 1: 119–126.
9. *Cho Y, Ross RS* (2018) A mini review: Proteomics approaches to understand disused vs. exercised human skeletal muscle. *Physiol Genomics* 50: 746–757.
<https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00043.2018>
10. *Hannun YA, Obeid LM* (2008) Principles of bioactive lipid signalling: lessons from sphingolipids. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9: 139–150.
<https://doi.org/10.1038/nrm2329>
11. *Bruni P, Donati C* (2008) Pleiotropic effects of sphingolipids in skeletal muscle. *Cell Mol Life Sci* 65: 3725–3736.
<https://doi.org/10.1007/s00018-008-8236-6>
12. *Nikolova-Karakashian MN, Reid MB* (2011) Sphingolipid Metabolism, Oxidant Signaling, and Contractile Function of Skeletal Muscle. *Antioxid Redox Signal* 15: 2501–2517.
<https://doi.org/10.1089/ars.2011.3940>
13. *Hyde R, Hajdich E, Powell DJ, Taylor PM, Hundal HS* (2005) Ceramide downregulates System A amino acid transport and protein synthesis in rat skeletal muscle cells. *FASEB J* 19: 1–24.
<https://doi.org/10.1096/fj.04-2284fje>
14. *Брындина ИГ, Шалагина МН, Овечкин СВ, Овчинина НГ* (2014) Сфинголипиды скелетных мышц у мышей C57B1/6 в условиях непродолжительной моделированной гипогравитации. *Рос Физиол Журн им ИМ Сеченова* 100(11): 1280–1286. [*Bryndina IG, Shalagina MN, Ovechkin SV, Ovchinina NG* (2014) Sphingolipids in skeletal muscles of C57B1/6 mice after short-term simulated microgravity. *Russ J Physiol* 100(11): 1280–1286 (In Russ)].
15. *Брындина ИГ, Шалагина МН, Овечкин СВ, Яковлев АА* (2017) Метаболизм сфинголипидов в скелетных мышцах передних и задних конечностей мышей при антиортостатическом вывешивании разной длительности. *Авиакосм и эколог мед* 51(7): 794–798. [*Bryndina IG, Shalagina MN, Ovechkin SV, Yakovlev AA* (2017) Sphingolipid metabolism in mice forelimb and hindlimb skeletal muscles under antiorthostatic suspension of different durations. *Aerospace Environment Med* 51(7): 794–798 (In Russ)].
<https://doi.org/10.21687/0233-528X-2017-51-7-94-98>
16. *Bryndina I, Protopopov V, Sergeev V, Shalagina M, Ovechkin S, Yakovlev A* (2018) Ceramide enriched membrane domains in rat skeletal muscle exposed to short-term hypogravitational unloading. *Front Physiol* 9.
<https://doi.org/10.3389/conf.fphys.2018.26.00028>
17. *Bryndina IG, Shalagina MN, Sekunov AV, Zefirov AL, Petrov AM* (2018) Clomipramine counteracts lipid raft disturbance due to short-term muscle disuse. *Neurosci Lett* 664: 1–6.
<https://doi.org/10.1016/j.neulet.2017.11.009>
18. *Petrov AM, Shalagina MN, Protopopov VA, Sergeev VG, Ovechkin SV, Ovchinina NG, Sekunov AV, Zefirov AL, Zakirjanova GF, Bryndina IG* (2019) Changes in Membrane Ceramide Pools in Rat Soleus Muscle in Response to Short-Term Disuse. *Int J Mol Sci* 20: 4860.
<https://doi.org/10.3390/ijms20194860>
19. *Kwon OS, Tanner RE, Barrows KM, Runtsch M, Symons JD, Jalili T, Bikman BT, McClain DA, O'Connell RM, Drummond MJ* (2015) MyD88 regulates physical inactivity-induced skeletal muscle inflammation, ceramide biosynthesis signaling, and glucose intolerance. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 309: E11–E21.
<https://doi.org/10.1152/ajpendo.00124.2015>
20. *Salaun E, Lefevre-Orfila L, Cavey T, Martin B, Turlin B, Ropert M, Loreal O, Derbré F* (2016) Myriocin prevents muscle ceramide accumulation but not muscle fiber atrophy during short-term mechanical unloading. *J Appl Physiol* 120: 178–187.
<https://doi.org/10.1152/japplphysiol.00720.2015>
21. *Lepple-Wienhues A, Belka C, Laun T, Jekle A, Walter B, Wieland U, Welz M, Heil L, Kun J, Busch G, Weller M, Bamberg M, Gulbins E, Lang F* (1999) Stimulation of CD95 (Fas) blocks T lympho-

- cyte calcium channels through sphingomyelinase and sphingolipids. *Proc Natl Acad Sci* 96: 13795–13800.
<https://doi.org/10.1073/pnas.96.24.13795>
22. *Beckmann N, Sharma D, Gulbins E, Becker KA, Edelmann B* (2014) Inhibition of acid sphingomyelinase by tricyclic antidepressants and analogs. *Front Physiol* 5: 331.
<https://doi.org/10.3389/fphys.2014.00331>
 23. *Seward DJ, Haney JC, Rudnicki MA, Swoap SJ* (2001) bHLH transcription factor MyoD affects myosin heavy chain expression pattern in a muscle-specific fashion. *Am J Physiol Cell Physiol* 280(2): C408–C413.
<https://doi.org/10.1152/ajpcell.2001.280.2.C408>
 24. *Stirle K, Broussard SR, McCusker RH, Shen WH, Johnson RW, Freund GG, Dantzer R, Kelley KW* (2004) Proinflammatory cytokine impairment of insulin-like growth factor I-induced protein synthesis in skeletal muscle myoblasts requires ceramide. *Endocrinology* 145(10): 4592–4602.
<https://doi.org/10.1210/en.2003-1749>
 25. *Ильин ЕА, Новиков ВЕ* (1980) Стенд для моделирования физиологических эффектов невесомости в лабораторных условиях. *Косм Биол и авиакосм Мед* 14: 79–80. [*Ilin EA, Novikov VE* (1980) Stand for modelling the physiological effects of weightlessness in laboratory experiments with rats. *Kosm Biol Aviakosm Med* 14(3): 79–80 (In Russ)].
 26. *Morey-Holton ER, Globus RK* (2002) Hindlimb unloading rodent model: technical aspects. *J Appl Physiol* 92: 1367–1377.
<https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00969.2001>
 27. *Laemmli UK* (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680–685.
<https://doi.org/10.1038/227680a0>
 28. *Radeva G, Sharom FJ* (2004) Isolation and characterization of lipid rafts with different properties from RBL-2H3 (rat basophilic leukaemia) cells. *Biochem J* 380: 219–230.
<https://doi.org/10.1042/BJ20031348>
 29. *Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH* (1957) A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem* 226: 497–509.
 30. *Boath A, Graf C, Lidome E, Ullrich T, Nussbaumer P, Bornancin F* (2008) Regulation and traffic of ceramide 1-phosphate produced by ceramide kinase: Comparative analysis to glucosylceramide and sphingomyelin. *J Biol Chem* 283: 8517–8526.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M707107200>
 31. *Livak KJ, Schmittgen TD* (2001) Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2^{-ΔΔCT} Method. *Methods* 25: 402–408.
<https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
 32. *Rommel C, Bodine SC, Clarke BA, Rossmann R, Nunez L, Stitt TN, Yancopoulos GD, Glass DJ* (2001) Mediation of IGF-1-induced skeletal myotube hypertrophy by PI(3)K/Akt/mTOR and PI(3)K/Akt/GSK3 pathways. *Nat Cell Biol* 3: 1009–1013.
<https://doi.org/10.1038/ncb1101-1009>
 33. *Mahfouz R, Houry R, Blachnio-Zabielska A, Turban S, Loiseau N, Lipina C, Stretton C, Bourron O, Ferré P, Foufelle F, Hundal HS, Hajduch E* (2014) Characterising the Inhibitory Actions of Ceramide upon Insulin Signaling in Different Skeletal Muscle Cell Models: A Mechanistic Insight. *PLoS One* 9:e101865.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0101865>
 34. *Hanada K* (2003) Serine palmitoyltransferase, a key enzyme of sphingolipid metabolism. *Biochim Biophys Acta – Mol Cell Biol Lipids* 1632: 16–30.
[https://doi.org/10.1016/S1388-1981\(03\)00059-3](https://doi.org/10.1016/S1388-1981(03)00059-3)

Muscle Plasticity at Functional Unloading: Effects of the Inhibitor of Acid Sphingomyelinase Clomipramine

A. V. Sekunov^a, V. A. Protopopov^a, V. V. Skurygin^b,
M. N. Shalagina^a, and I. G. Bryndina^{a, *}

^aIzhevsk State Medical Academy, Izhevsk, Russia

^bUdmurt State University, Izhevsk, Russia

*e-mail: i_bryndina@mail.ru

Sphingolipids are the structural components of cells and intracellular messengers. The role of sphingolipids, including ceramide, in the regulation of muscle plasticity has not been studied. The purpose of the present work is to study the effect of an inhibitor of the catalytic pathway of ceramide formation on the expression of myosin heavy chains

(MyHC), atrophy and the levels of mTOR/p-mTOR (Ser2484)/p70S6k (Thr389) proteins in the postural muscle (m. soleus) under conditions of functional unloading. The work was performed on male Wistar rats (180–230 g). To reproduce the unloading, the antiorthostatic suspension model (HS) was used. Signs of atrophy (changes in muscle mass and Feret's diameter of muscle fibers), the amount of ceramide (TLC), mTOR signaling system proteins (Western blotting) and the expression of "fast" and "slow" isoforms of myosin heavy chains (PCR, immunofluorescence study) were determined. In suspended m. soleus, we found a decrease in the levels of p-mTOR (Ser2484) and p70S6k (Thr389), which was prevented by administration of the acid sphingomyelinase inhibitor (aSMase) clomipramine. The shift of the muscle phenotype towards the expression of "fast" myosin isoforms (MyHC IIB and MyHC II d/x), a characteristic feature of HS, was also eliminated by clomipramine, along with the diminished muscle atrophy. The results obtained indicate the role of sphingolipid mechanisms in the disturbance of mTOR signaling, dysregulation of the expression of "fast" myosin isoforms and the development of muscle atrophy caused by functional unloading.

Keywords: skeletal muscle, hindlimb suspension, muscle phenotype, atrophy, mTOR, p70S6k, sphingomyelinase, ceramide, clomipramine