

На правах рукописи

Шарло Кристина Андреевна

«NFATc1-зависимые механизмы стабилизации миозинового фенотипа
постуральных мышц млекопитающих в условиях функциональной разгрузки»

03.03.01 - физиология; 03.01.04 - биохимия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Москва - 2020

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

Научный руководитель

Шенкман Борис Стивович, доктор биологических наук, профессор, ведущий научный сотрудник, заведующий лабораторией миологии

Официальные оппоненты:

Балезина Ольга Петровна, доктор биологических наук, профессор кафедры физиологии человека и животных. Федерального государственного бюджетного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», биологический факультет

Дмитриева Рената Игоревна, кандидат биологических наук, руководитель группы клеточной биологии Института молекулярной биологии и генетики Федерального государственного бюджетного учреждения НМИЦ им. Алмазова Минздрава России

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова Российской академии наук

Защита состоится «24» сентября 2020 г. в 10 часов 00 минут на заседании диссертационного совета Д 002.111.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Государственном научном центре Российской Федерации -Институте медико-биологических проблем Российской академии наук по адресу: 123007, г Москва, Хорошёвское шоссе 76А

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения науки Государственном научном центре Российской Федерации - Институте медико-биологических проблем Российской академии наук по адресу 123007, г Москва, Хорошёвское шоссе 76А и на сайте <http://www.imbp.ru>

Автореферат разослан «__» _____ 2020 г.

Ученый секретарь Диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Поддубко Светлана Викторовна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы

Скелетная мышца состоит из волокон различных типов, расположенных мозаичным образом. Мышечные волокна медленного типа обладают высокой устойчивостью к утомлению при сравнительно небольшой максимальной силе и скорости сокращений. «Быстрые» мышечные волокна обладают высокой силой и скоростью сокращений наряду с быстрой утомляемостью. На протяжении последних лет было показано, что данные свойства мышечных волокон обусловлены преобладанием в волокне той или иной изоформы тяжелых цепей миозина (ТЦМ). В скелетной мышце млекопитающих существует четыре основных изоформы ТЦМ: «медленная» изоформа ТЦМ I(β) и три «быстрых» изоформы IIa-, IId/x-, and IIb-[1]. При функциональной разгрузке скелетных мышц, вызванной отсутствием сократительной активности, например, в условиях реальной или моделируемой невесомости, наблюдается сдвиг миозинового фенотипа, т.е. снижение экспрессии медленной изоформы тяжелых цепей миозина и увеличение экспрессии быстрых изоформ, что приводит к соответствующим метаболическим и функциональным изменениям [2, 3] [4]. Функциональная разгрузка мышц наблюдается у космонавтов в условиях невесомости, у больных, находящихся на длительном постельном режиме, при инсультах и спинальных поражениях, при иммобилизации мышц в травматологии и т.п. В наибольшей степени подвержены действию разгрузки постуральные мышцы, например, камбаловидная мышца *m. soleus*, у человека принимающая участие в поддержании вертикального положения тела в пространстве [5]. К сожалению, к настоящему времени отсутствует целостное представление о механизмах, обуславливающих изменения экспрессии медленной и быстрых изоформ ТЦМ в условиях функциональной разгрузки.

Показано, что сигнальный путь кальцинейрин/NFAT принимает участие в регулировании экспрессии медленной изоформы ТЦМ в миобластах C2C12[6], а также *in vivo* [7], однако состояние этого сигнального пути на ранних сроках функциональной разгрузки не изучено, а данные о поздних (две недели и более) сроках противоречивы и отрывочны[8] [9, 10]: к настоящему моменту литературные данные не позволяют судить о том, связаны ли в условиях функциональной разгрузки изменения содержания в мышечных ядрах NFATc1 и его транскрипционная активность с изменениями экспрессии различных миозиновых изоформ. Тем не менее, данные о снижении нервно-мышечной активности камбаловидной мышцы на ранних сроках вывешивания [11], а также тот факт, что транскрипционная активность NFATc1 в значительной степени определяется нервно-мышечной активностью [7], позволяют предположить, что инактивация NFATc1 может играть важную роль в снижении экспрессии медленной изоформы ТЦМ как минимум на ранних сроках функциональной разгрузки. В рамках данного предположения представляется необходимым изучить вклад различных протеинкиназ, способных инактивировать NFATc1, и эндогенных ингибиторов кальцинейрина в транскрипционную активность NFATc1 и его содержание в мышечных ядрах на разных этапах функциональной разгрузки: мы предполагаем, что вклад в инактивацию NFATc1 могут вносить киназа GSK-3 β и МАП-киназа p38, так как их активность повышается при функциональной разгрузке[12, 13] и они способны фосфорилировать NFATc1, что приводит к его инактивации и удалению из мышечных ядер [14, 15].

Цель и задачи исследования:

Целью настоящего исследования было изучение NFAT-зависимых механизмов стабилизации «быстрого» миозинового фенотипа камбаловидной мышцы в условиях функциональной разгрузки. Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

1. Проанализировать содержание NFATc1 в ядрах камбаловидной мышцы и транскрипционную активность NFATc1 после 1, 3, 7 и 14 суток моделируемой гравитационной разгрузки;

2. Выявить роль снижения уровня оксида азота в камбаловидной мышце после 7-суточного вывешивания в снижении экспрессии ТЦМ I(β) и инактивации сигнального пути кальцинейрин/NFATc1 и проанализировать участие в этом процессе NO-зависимой инактивации киназы GSK-3 β ;

3. Проанализировать влияние механической опорной стимуляции на активность сигнального пути кальцинейрин/NFATc1 и экспрессию различных изоформ ТЦМ на различных сроках моделируемой гравитационной разгрузки;

4. Проанализировать роль NO-синтазы в эффекте механической опорной стимуляции на активность сигнального пути кальцинейрин/NFATc1 и экспрессию различных изоформ ТЦМ после 7 суток моделируемой гравитационной разгрузки

5. Проанализировать роль активации МАП-киназы p38 в снижении экспрессии ТЦМ I(β) и инактивации сигнального пути кальцинейрин/NFATc1 после трёх суток вывешивания.

Научная новизна работы

1. Впервые показано снижение содержания NFATc1 в ядрах камбаловидной мышцы уже после первых суток вывешивания, частичное восстановление содержания NFATc1 после третьих суток вывешивания и несоответствие уровня транскрипционной активности NFATc1 и содержания NFATc1 в мышечных ядрах после 14 суток вывешивания;

2. Впервые показано предотвращение снижения содержания NFATc1 в мышечных ядрах при вывешивании на фоне восстановления в миоплазме оксида азота и при ингибировании GSK-3 β ;

3. Впервые показана регуляция уровня экспрессии кальсарцина-2 содержанием оксида азота в миоплазме камбаловидных мышц после 7 суток вывешивания;

4. Впервые показано, что механическая опорная стимуляция предотвращает снижение экспрессии мРНК медленной изоформы ТЦМ, NFATc1-зависимой транскрипционной активности и содержания в мышечных ядрах NFATc1 при моделируемой гравитационной разгрузке за счет NO-зависимой инактивации GSK-3 β ;

5. Впервые показано, что ингибирование МАП киназы p38 предотвращает снижение NFAT-зависимой транскрипции и снижение мРНК ТЦМ I(β) при моделируемой гравитационной разгрузке.

Научно-практическая значимость

Выявление механизмов, регулирующих трансформацию скелетных волокон из «медленного» типа в «быстрый» в условиях функциональной разгрузки позволит создать базу для дальнейших исследований возможности фармакологической коррекции данного процесса, а также внесёт вклад в понимание принципов регуляции экспрессии гена медленной изоформы ТЦМ и других NFATc1-зависимых генов. При этом получение представления о ключевых регуляторах активности сигнального каскада кальцинейрин/NFATc1 и экспрессии ТЦМ I(β) на различных этапах функциональной разгрузки позволит задать направления для поиска фармакологических мишеней, воздействие на которые на той или иной стадии развития патологических процессов, связанных с мышечной разгрузкой, с наибольшей эффективностью позволит влиять на процесс трансформации мышечных волокон.

Положения, выносимые на защиту

1. Снижение содержания NFATc1 в ядерной фракции камбаловидных мышц и снижение его транскрипционной активности происходит уже на ранних сроках моделируемой гравитационной разгрузки (1-3 сутки), что вносит вклад в снижение уровня экспрессии мРНК медленной изоформы ТЦМ на данном этапе. Однако транскрипционная активность NFATc1 не всегда соответствует его содержанию в ядерной фракции;

2. Снижение уровня оксида азота в миоплазме камбаловидной мышцы при моделируемой гравитационной разгрузке является одним из ключевых сигнальных событий, приводящих к инактивации сигнального пути кальцинейрин/NFATc1 и снижению экспрессии ТЦМ I(β);

3. Механическая стимуляция опорных афферентов стопы на фоне разгрузки предотвращает снижение активности сигнального пути «кальцинейрин/NFATc1» и экспрессии медленного миозина. Это свидетельствует о значительной роли опорной афферентации в поддержании миозинового фенотипа постуральной мышцы;

4. Увеличение активности МАП-киназы p38 играет существенную роль в инактивации NFATc1 и снижении экспрессии мРНК ТЦМ I(β) на ранних сроках гравитационной разгрузки.

Апробация работы

Результаты исследований и основные положения работы были представлены и обсуждены на: конференциях «Ломоносов» 2017, 2018 гг (Россия, Москва), XVII конференции по космической биологии и авиакосмической медицине с международным участием 2019 г (Россия, Москва), Международных симпозиумах по гравитационной физиологии 2017 г (Россия, Звенигород), 2018 г (Нидерланды, Нордвейк), 2019 г (Япония, Нагоя), IX Всероссийской с международным участием конференция с элементами научной школы по физиологии мышц и мышечной деятельности, посвящённой памяти Е. Е. Никольского 2019 г (Россия, Москва) XVIII Конференции молодых учёных, специалистов и студентов, посвящённой 50-летию высадки человека на Луну 2019 г (Россия, Москва), XII Всероссийском симпозиуме с международным участием памяти профессора З. А. Подлубной (Россия, Пушкино), Международной конференции «Биохимия упражнений» 2018 г (Китай, Пекин), Международной конференции "Актуальные проблемы нейробиологии", посвященной памяти академика РАН Евгения Евгеньевича Никольского (Россия, Казань).

Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ 18-15-00107, 14-15-00358 и РФФИ 17-29-01029, 17-04-01838, а также в рамках базовой программы Института.

Публикации

По теме диссертации работы опубликовано 4 статьи в журналах, рекомендованных ВАК, 10 тезисов докладов конференций, в том числе международных.

Структура и объем диссертации

Работа включает в себя введение, обзор литературы, описание материалов и методов исследования, изложение результатов и их обсуждение, а также выводы. Диссертационная работа изложена на 129 страницах, содержит 46 рисунков, 1 таблицу и список цитируемой литературы из 216 источников.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Объект исследования

Для проведения экспериментальной работы использовались самцы крыс линии Вистар, предоставленные вивариумом ГНЦ РФ-ИМБП РАН, или же питомником лабораторных животных «Пушино». Перед началом экспериментальных работ животные проходили период адаптации. Животные содержались при температуре 20-22°C и в соответствующем периоде года режиме дня и ночи. Грызуны получали воду и корм *ad libitum* в соответствии с рационом для лабораторных животных. Все эксперименты были проведены согласно биоэтическим правилам проведения исследований и одобрены Комиссией по биомедицинской этике ГНЦ РФ-ИМБП РАН-Физиологической секцией Российского комитета по биоэтике при Комиссии РФ по делам ЮНЕСКО. После окончания эксперимента у животных под наркозом выделяли *m. soleus* из обеих ног и немедленно замораживали в жидком азоте, после чего крысам вводилась летальная доза бромэтанола (75 мг/кг веса). Далее пробы, анализируемые с помощью Вестерн-блоттинга,

иммуногистохимического окрашивания или ПЦР в реальном времени, помещали в низкотемпературный холодильник, поддерживающий температуру -85°C .

Антиортостатическое вывешивание

Одним из основных физиологических методов, применяемых в данной работе, является модель антиортостатического вывешивания крысы по Ильину-Новикову в модификации Morey-Holton [16, 17]. В этой модели крыса с помощью лейкопластыря мягко фиксируется за хвост к подвижной подвеске. Этим обеспечивается свободное движение животного в пределах клетки. При этом задние конечности животного приподняты над землей. При использовании данной модели животные не испытывают ограничений в перемещении и имеют постоянный доступ к пище и воде. Угол наклона тела животного составляет 30-35 градусов. Модель одобрена всеми инстанциями по биомедицинской этике в странах Европы, США, Канаде, Японии и России. Животные из групп контроля во время эксперимента содержатся в аналогичных клетках.

Механическая стимуляция опорных зон стопы крыс

К лапе вывешенной крысы под изофлурановым наркозом прикрепляли устройство для опорной стимуляции стопы. Устройство прикрепляли к правой и левой задней конечности животного с помощью пластыря над голеностопом на предварительно выбритую кожу. Давление на стопу осуществлялось с помощью подвижной площадки стимулятора и регулировалось автоматически запрограммированным воздушным насосом, с частотой 2 импульса в секунду, что симулирует нормальный режим ходьбы животного. Общая продолжительности стимуляции равна 20 минут, после чего следовало 10 минут отдыха. Этот цикл повторялся 8 раз в течение 4 часов ежедневно на протяжении всего эксперимента. После выполнения всех циклов, устройство снимали. Для расчета необходимого давления на стопу использовали значение площади поверхности стопы взрослой крысы, которое лежит в интервале между 450 и 500 mm^2 . Поскольку известно, что для стимуляции всех типов сенсорных рецепторов давление должно быть выше 8 mN , необходимое давление на стопу составляет – 104 mm Hg ст (13.9 mH) [18]. Самцы крыс Вистар весом 220 ± 5 г были разделены группы виварного контроля (С), группы, подвергнутые разгрузке задних конечностей на протяжении 1, 3 или 7 дней (1HS, 3HS, 7HS соответственно), и группы разгрузки, сопровождавшейся опорной стимуляцией: 1HS+МСО; 3HS+МСО, 7HS+МСО. Для проверки гипотезы о ключевой роли оксида азота в реализации эффекта механической опорной стимуляции также была введена группа «7HS+LMCO» – 7-суточное антиортостатическое вывешивание с ежедневной механической опорной стимуляцией стопы и введением ингибитора синтазы оксида азота в концентрации 90 mg/kg массы тела в сутки внутривентриально. Замороженный биоматериал использовали для анализа содержания NFATc1 в ядерной фракции камбаловидных мышц и фосфорилированной и тотальной форм GSK-3 β в тотальной фракции мышц методом Вестерн-блоттинга, анализа содержания NFATc1 в ядрах на криосрезках мышц методом иммуногистохимии и для анализа экспрессии мРНК МСIP1.4, кальсарцина-2 и мРНК изоформ ТЦМ методом ОТ-ПЦР в реальном времени.

Введение L-аргинина и L-аргинина совместно с ингибитором NO-синтазы крысам на фоне 7-суточного вывешивания

Данный эксперимент проводили для выявления роли оксида азота в регуляции экспрессии медленной изоформы ТЦМ и сигнального пути кальцинейрин/NFATc1 при моделируемой гравитационной разгрузке. Для выявления NO-зависимых (а не аминокислотных) эффектов L-аргинина, применявшегося в качестве донора оксида азота, в эксперимент ввели дополнительную контрольную группу с совместным введением L-аргинина и ингибитора NO-синтазы L-NAME: NO-зависимыми считали лишь те эффекты введения L-аргинина, которые не проявлялись в группе с ингибированием NO-синтазы. Для проведения эксперимента отобрали 64 самца крыс линии Вистар. Самцы крыс весом 213 (136–273) г были случайным образом распределены по 4 экспериментальным группам по 16 животных в каждой группе: С – группа виварного контроля; 7HS – животные, вывешенные на протяжении 7 суток; 7HS+A – животные, вывешенные в

течение 7 суток с ежедневной внутрибрюшинной инъекцией 500 мг/кг L-аргинина в 1,5 мл физраствора; 7HS+AN - животные, вывешенные в течение 7 суток с ежедневной внутрибрюшинной инъекцией 500 мг/кг L-аргинина и 50 мг/кг L-NAME в 1,5 мл физраствора. Группам С и 7HS также ежедневно внутрибрюшинно вводили 1,5 мл физраствора.

Введение ингибитора киназы GSK-3 β крысам на фоне 7-суточного вывешивания

Данный эксперимент проводили для выявления роли инактивации GSK-3 β в NO-зависимом восстановлении экспрессии медленной изоформы ТЦМ при вывешивании. 24 самца крыс Вистар весом 200 \pm 10 г были разделены на 3 группы по 8 животных в каждой: С – группа виварного контроля, 7HS – группа, вывешенная на протяжении 7 суток, 7HS+G – группа, вывешенная на протяжении 7 суток с ежедневным внутрибрюшинным введением ингибитора GSK-3 AR-A014418 в дозировке 4мг/кг веса тела в 1% DMSO в 1,5 мл физраствора. Группам 7HS и С ежедневно вводили 1,5 мл 1% DMSO в физрастворе.

Введение ингибитора МАП-киназы p38 на фоне 3-х суточного вывешивания

Данный эксперимент проводили для того, чтобы выявить роль активации МАП-киназы p38 в снижении экспрессии ТЦМ I(β) и инактивации сигнального пути кальцинейрин/NFATc1 после трёх суток вывешивания. Эксперимент был проведён совместно с группой исследования катаболических сигнальных путей лаборатории миологии под руководством Т.Л. Немировской (Т.Л. Немировская, С. П. Белова, Е. П. Мочалова). Для проведения эксперимента было отобрано 24 самца крыс Вистар. Животные были разделены на три группы: виварный контроль (С), группа, вывешенная в течение 3 суток (3HS) и группа, вывешенная в течение 3 суток с ежедневным введением ингибитора VX-745 (3HS+VX). Препарат вводился перорально, в дозировке 10мг/кг дозу распределяли на два приема, утром и вечером, в 10% DMSO.

Методы обработки биоматериала и анализ данных

Выделение ядерной, цитоплазматической и тотальной белковых фракций мышцы

Для выделения тотальной белковой фракции был использован набор реагентов RIPA Lysis Buffer System («Santa Cruz», США) с дополнительным добавлением ингибиторов протеаз. Для выделения белков ядерной фракции был использован набор реагентов NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction («Thermo Scientific», США) с дополнительным добавлением ингибиторов протеаз и фосфатаз. Выделение фракций проводили согласно рекомендациям производителя. Содержание белка во всех образцах было измерено дважды по методу Брэдфорда. После выделения образцы замораживались и хранились при температуре -80 С°.

Электрофорез с последующим Вестерн-блоттингом

Для проведения электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ) образцы разводились в двукратном буфере для образцов (5,4 мМ Tris-HCl (pH 6,8), 4%-ный Ds-Na, 20%-ный глицерин, 10%-ный β -меркаптоэтанол, 0,02%-ный бромфеноловый синий). Электрофорез был проведен в 10%-ном разделяющем ПААГ. Электрофорез проводили при силе тока 17 мА на гель в мини-системе («Bio-Rad Laboratories») при комнатной температуре. Электроперенос белков проводили на нитроцеллюлозную мембрану при 100 V при температуре 4°С в течение 120 мин в системе mini Trans-Blot («Bio-Rad Laboratories»). После электропереноса НЦ-мембраны инкубировали в растворе 5%-ого сухого молока («Bio-Rad Laboratories») в PBST (PBS + 0,1% Tween 20) в течение 1 часа при комнатной температуре. Для выявления белковых полос использовали первичные поликлональные антитела против GSK-3 β (Cell signaling, США) и фосфорилированной (Ser 6) GSK-3 β (Cell signaling, США) с разведением 1:1 000 в 5% БСА, GAPDH (Cell Signalling, США, 1:10,000), кальсарцина-2 (Proteintech, Великобритания, 1:3,000), NFATc1 (1:1000., Abcam, США), MEF-2D (1:1000, AMD Millipore, США), Lamin B1 (Abcam, США, 1:1,000), нейрональной NO-синтазы («Sigma-Aldrich», USA, 1:500). В качестве вторичных антител использовали антитела goat anti-rabbit, или goat-anti-mouse, конъюгированные с пероксидазой хрена (Santa Cruz, США) в разведении 1:5 000.

Инкубация блотов с первичными антителами проводилась в течение ночи при 4°C, со вторичными антителами 1 час при комнатной температуре. Выявление белковых полос осуществляли с помощью набора ImmunStar Substrate Kit («BioRad Laboratories», США). Анализ белковых полос проводили с использованием C-DiGit Blot Scanner (LI-COR Biotechnology, США). Оптическая плотность белковых полос была нормализована к GAPDH при анализе белков в тотальной белковой фракции или к lamin B1 при анализе белков ядерной фракции. Фосфорилированные формы белков нормализовали по содержанию тотальной формы данных белков. Мембраны, на которых детектировали фосфорилированные формы белков, отмывали в восстанавливающем растворе RestoreWestern Blot Stripping Buffer (Thermo Scientific), после чего анализировали содержание тотальных форм белков на этих же мембранах как описано выше. Обработка данных Вестерн-блота производилась с помощью программы Image Studio Digits Ver4.0.

Иммуногистохимический анализ поперечных криосрезов мышцы

Криосрезы мышц толщиной 10 мкм фиксировали в 100% ацетоне. В качестве метки мышечных ядер использовали антитела к белку периферического материала 1 (PCM1): было показано, что данный метод позволяет с высокой точностью детектировать мышечные ядра [19]. Затем срезы промывали от ацетона буфером PBST 3 раза по 5 минут и помещали на 1 час в блокирующий раствор (1% БСА с 0.1% Tween 20 в PBS) при комнатной температуре. Срезы инкубировали в растворе первичных антител анти-NFATc1 («Santa Cruz», 1:100) и анти-PCM1 (1:1,000 Sigma) в блокирующем растворе с 0.1% БСА в PBS, в течение ночи при 4°C. На следующий день срезы инкубировали в растворе вторичных антител (1:500 goat anti-mouse, Alexa 488 + goat anti-rabbit, Alexa 546, («Molecular Probes», США)) разведённых в PBST, при комнатной температуре в течении 1 часа. Затем срезы инкубировали в течение 20 минут с интеркалирующим красителем нуклеиновых кислот DAPI («Molecular Probes», 1:10 000 в PBST) для окрашивания клеточных ядер. Отмывки между инкубациями с антителами, перед и после DAPI производились PBS 3 раза по 5 минут. Далее срезы заключали в раствор для флуоресценции Vectashield («Vector», США) и покрывали стеклом. Срезы анализировали с помощью микроскопа Leica DMR Upright Microscope с камерой Leica DC 300F. Для анализа данных, полученных с помощью иммуногистохимии, было сделано 15 изображений с каждого среза экспериментальной *m soleus* при увеличении 40X. Для каждого среза подсчитывали количество ядер, окрашенных как PCM1, так и NFATc1, далее полученный результат делили на общее количество ядер, находящихся внутри мышечного волокна и окрашенных DAPI, и выражали в процентах. Данные представлены в виде процента ядер, содержащих NFATc1, от общего числа мышечных ядер.

Анализ экспрессии генов

Для анализа экспрессии мРНК генов тяжелых цепей миозина (ТЦМ) ТЦМ I(β), ТЦМ IIa, ТЦМ IIb/x и ТЦМ IIb, а также гена кальсарцина-2 и MСIP1.4 из мышечной ткани с помощью набора RNeasy micro kit (Qiagen, США) была выделена тотальная фракция РНК и использована в качестве матрицы для проведения обратной транскрипции с последующей ПЦР-реакцией. Концентрацию РНК, а также степень чистоты её выделения измеряли путём спектрофотометрического анализа. Для проведения обратной транскрипции были использованы компоненты фирмы «Синтол» (Россия): 30 мкМ случайных гексануклеотидов, 17,4 мкМ олиго-d(T)15, 1,3 мМ дНТФ, 0,02 ед./мкл ингибитора РНКазы, 6 ед./мкл M-MLV-ревертазы, 5x-буфер для M-MLV-ревертазы и 1 мкг РНК-матрицы. Обратную транскрипцию проводили в амплификаторе (CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System, «Bio-Rad Laboratories», США).

Для проведения ПЦР в реальном времени использовали полученную в результате обратной транскрипции кДНК, праймеры с концентрацией 10 мкМ мастер-микс (0,3 мМ дНТФ, 3 мМ MgCl₂, 2,5 мкл 10-кратного ПЦР-буфера Б (pH 8,8), 0,06 ед./мкл Taq ДНК-полимеразы, «Синтол»). Для оценки содержания кДНК различных генов в каждой пробе были использованы значения Ct(тест) и Ct(реф), где Ct(реф) – точка пересечения базовой линии и графика амплификации референсного гена в пробе, а Ct(тест) - точка пересечения базовой линии и

графика амплификации изучаемого гена в той же пробе. В качестве референсного гена с помощью базы EST Database выбирали гены, экспрессия которых не имела достоверных различий между экспериментальными группами – в зависимости от эксперимента это были гены *sumo1*, *RPL19* или *Cyclophilin A*.

Определение уровня оксида азота в миоплазме камбаловидных мышц

Экспериментальным животным за 1 час до забоя вводили ловушку NO, диэтилдитиокарбамат железа (II) (Fe(ДЭТК)₂) Относительное содержание оксида азота в мышце определяли стандартным методом спиновой ловушки и электронного парамагнитного резонанса (ЭПР). В качестве ловушки использовали диэтилдитиокарбамат (ДЭТК), который в тканях образует нитрозильные парамагнитные комплексы с железом, находящиеся в равновесии со стационарной концентрацией NO в ткани и имеющие характерный спектр ЭПР. Крысе вводили спиновую ловушку из расчета 500 мг/кг массы. ДЭТК связывается с NO, образуя парамагнитные комплексы. Сразу после введения ДЭТК животному внутримышечно вводили водный раствор смеси 29 мМ FeSO₄ и 116 мМ цитрата натрия (2,0 мл/кг). Через час животных умерщвляли, *m. soleus* замораживали в жидком азоте и регистрировали сигнал ЭПР при температуре жидкого азота на ЭПР*спектрометре фирмы «Bruker EMX*8». Измерение относительного содержания оксида азота в камбаловидной мышце крысы проводилось в сотрудничестве с лабораторией Нейрохимии ФГБУ Института биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН (Г.Р. Каламкарным, А.Е. Бугровой и Т.Ф. Шевченко).

Статистический анализ данных

Все данные представлены в виде среднего значения по группе, включающей в себя восемь животных, ±стандартная ошибка среднего. Средние значения для всех групп представлены в виде процента от среднего значения контрольной группы. Статистические различия между двумя группами определяли с помощью непараметрического статистического критерия Манна-Уитни. Статистические различия между тремя или четырьмя группами определяли с помощью непараметрического статистического критерия Краскелла-Уоллиса с последующим *post hoc* тестом Данна. Статистически достоверными различия считали при уровне значимости $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Содержание в мышечных ядрах NFATc1 и транскрипционная активность NFATc1 после 1,3,7 и 14 суток вывешивания

Для того, чтобы исследовать динамику ядерного траффика NFATc1, а также динамику транскрипционной активности NFATc1 в течение вывешивания, мы проанализировали данные параметры после 1,3,7 и 14 суток вывешивания. Уже после первых суток гравитационной разгрузки мы обнаружили достоверное снижение содержания в ядерной фракции транскрипционного фактора NFATc1 на 49 процентов относительно группы виварного контроля, однако на третьи сутки содержание NFATc1 составляло 71 процент от группы контроля и не имело достоверных отличий от контроля (Рис.1А.). После 7 суток гравитационной разгрузки содержание NFATc1 в ядерной фракции было достоверно снижено на 53% относительно контрольной группы (Рис. 1А). После 14 суток вывешивания содержание NFATc1 в ядерной фракции не отличалось от контроля (Рис. 1А). Для детектирования транскрипционной активности NFATc1 мы исследовали динамику экспрессии мРНК гена MСIP1 (Рис.1Б.). Перед четвёртым экзоном данного гена находится альтернативный промотор, содержащий 15 сайтов связывания NFATc1. Экспрессия изоформы MСIP1.4 используется во многих исследованиях для описания состояния сигнального пути кальцинейрин/NFAT, в частности, для описания уровня транскрипционной активности NFAT в ядре [20, 21]. Уже после первых суток вывешивания экспрессия мРНК MСIP1.4 снизилась на 95% в сравнении с группой контроля (Рис. 1А.). После третьих суток вывешивания уровень экспрессии мРНК MСIP1.4 составлял 15% от контроля, после 7-х суток 18% и после 14 суток – 26% от контроля (Рис. 1Б.). Во всех случаях отличия от контроля были достоверными. Интересно, что до 14 суток вывешивания динамика экспрессии

мРНК МСР1.4 в целом согласуется с динамикой содержания NFATc1 в ядрах, однако возвращение содержания NFATc1 в ядрах к контрольному уровню на 14 сутки вывешивания не приводит к возвращению на контрольный уровень его транскрипционной активности.

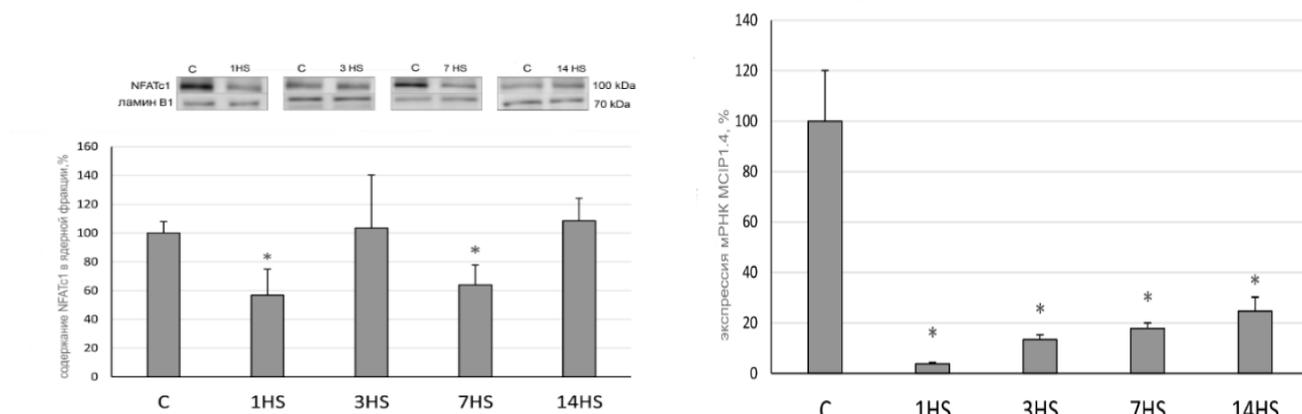


Рис.1. Содержание NFATc1 в ядерной фракции камбаловидных мышц животных после 1,3,7 и 14 суток вывешивания по данным Вестерн-блота (А); Экспрессия мРНК МСР1.4 в ядерной фракции камбаловидных мышц животных после по данным ОТ-ПЦР (Б)* - достоверные отличия от группы контроля ($p < 0,05$).

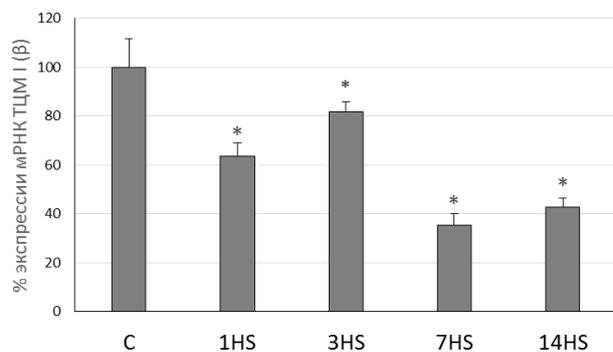


Рис.2. Экспрессия мРНК ТЦМ I(β) после 1,3,7 и 14 суток вывешивания по данным ОТ-ПЦР. * - достоверные отличия от группы контроля ($p < 0,05$)

Уже после первых суток вывешивания экспрессия мРНК ТЦМ I (β) снизилась 37% в сравнении с группой контроля (Рис.9.). После третьих суток вывешивания уровень экспрессии мРНК ТЦМ I (β) составлял 81% от контроля, после 7-х суток 38% и после 14 суток – 42% от контроля (Рис.2.). Во всех случаях отличия от контроля были достоверными.

Динамика содержания NFATc1 в мышечных ядрах коррелирует с наблюдающейся в данном эксперименте динамикой содержания мРНК медленной изоформы ТЦМ вплоть до 14 суток вывешивания (Рис 1, Рис 2). И содержание NFATc1 в мышечных ядрах, и содержание мРНК медленной изоформы ТЦМ частично восстанавливаются после третьих суток вывешивания. Стоит отметить, что по данным ряда работ, после достоверного снижения содержания мРНК медленной изоформы ТЦМ на первые сутки вывешивания[22], промежуток от вторых до четвертых суток вывешивания содержание мРНК медленной изоформы ТЦМ в камбаловидных мышцах вывешенных животных не имеет достоверных отличий от контроля[13, 23], т е на данном сроке происходит транзитное увеличение экспрессии мРНК ТЦМ I(β), исчезающее к седьмым суткам вывешивания. Как бы то ни было, наблюдаемая динамика содержания NFATc1 в ядерной фракции на 1-3 сутки вывешивания согласуется с этими данными и, возможно, транзитное увеличение экспрессии мРНК ТЦМ I(β) обусловлено повышением содержания ядерного NFATc1 после третьих суток вывешивания. Содержание мРНК МСР1.4, являющееся маркёром уровня NFAT-зависимой транскрипции, согласуется с данными о содержании NFATc1 в мышечных ядрах после 1-3 и после 7 суток вывешивания, если принять во внимание временной сдвиг между накоплением в ядрах транскрипционного фактора и накоплением мРНК его генов-мишеней.

Наблюдаемое уже после первого дня вывешивания снижение содержания NFATc1 в ядерной фракции и снижение экспрессии мРНК MСIP1.4 может объясняться снижением активности NO-синтазы и соответствующим снижением уровня оксида азота в миоплазме камбаловидных мышц на данном сроке, которое было показано в диссертационной работе Н. А. Вильчинской [24], это снижение может быть причиной снижения фосфорилирования Ser 9 GSK-3 β и ее активации, приводящей к экспорту NFATc1 из ядер.; при этом транзиторное увеличение содержания NFATc1 в мышечных ядрах, происходящее после третьих суток вывешивания, может быть вызвано накоплением ионов кальция в миоплазме камбаловидных мышц вывешенных животных, которое наблюдается на данном сроке вывешивания, и соответствующей ре-активацией кальцинеина [25].

Последующее снижение содержания NFATc1 в мышечных ядрах, наблюдающееся после семи суток вывешивания, может быть связано как с увеличением экспрессии эндогенного ингибитора кальцинеина кальсарцина-2, происходящим после третьих суток вывешивания [13], так и с активацией потенциального кальций-зависимого механизма инактивации транслокации NFATc1 в ядро, связанного с работой сигнального пути СаМК II/МАР-киназа p-38 [26, 27], однако последнюю гипотезу ещё предстоит проверить. Наблюдаемое восстановление содержания NFATc1 в мышечных ядрах после 14 суток вывешивания согласуется с данными других исследователей [8, 9]; мы предполагаем что данный эффект может быть связан с возвращением уровня фосфорилирования Ser 9 GSK-3 β к контрольному уровню на данном сроке [28].

Отдельно стоит отметить несоответствие содержания NFATc1 в ядерной фракции камбаловидных мышц вывешенных животных после двух недель вывешивания и экспрессии медленной изоформы ТЦМ I(β); судя по сниженной на данном сроке NFAT-зависимой экспрессии мРНК MСIP1.4 (Рис. 1Б), содержание в мышечных ядрах NFATc1 на данном сроке не отражает его реальную транскрипционную активность. Этот эффект может объясняться влиянием посттрансляционных модификаций, не влияющих на содержание NFATc1 в ядре, таких как деацетилирование NFATc1, снижающее его транскрипционную активность [29]. Также, возможно, данный эффект может быть обусловлен эпигенетическими модификациями, в частности, деацетилированием гистона H3 на промоторе гена *myh7* [30]; возможно, деацетилированы также и гистоны на промоторе MСIP1.4. К сожалению, динамика сайт-специфичного деацетилирования гистонов на промоторах миозиновых генов при вывешивании, а также взаимодействие гистондеацетилазы 4 с MEF-2 и NFATc1 при вывешивании остаются неизученными.

Влияние опорной механической стимуляции на функционирование сигнального пути кальцинеин/NFATc1 и экспрессию медленной изоформы ТЦМ после 1 и 3 суток вывешивания

Для того, чтобы проанализировать влияние механической опорной стимуляции на активность сигнального пути кальцинеин/NFATc1 и экспрессию различных изоформ ТЦМ на ранних сроках моделируемой гравитационной разгрузки мы провели эксперимент с механической опорной стимуляцией (МСО) задних конечностей крыс на фоне вывешивания в течение 1 и 3-х суток.

После первого дня вывешивания мы обнаружили снижение экспрессии мРНК ТЦМ I(β), что соответствует данным, полученным Giger et al, 2009 [22], а также данным, полученным ранее в нашей лаборатории [13, 31] (Рис.3 А). Данные, свидетельствующие о снижении уровня мРНК ТЦМ I(β) после трёх суток вывешивания, являются более противоречивыми. Ранее в нашей лаборатории были получены данные, показывающие лишь тенденцию к снижению ТЦМ I(β) на этом сроке, несмотря на то, что некоторые исследователи наблюдали снижение экспрессии ТЦМ I(β) после второго дня вывешивания и после четвёртого дня вывешивания [22, 32].

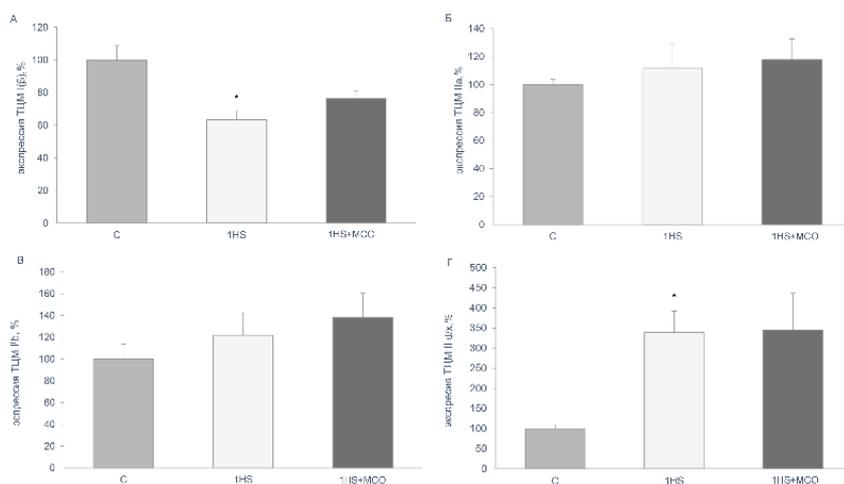


Рис.3. ПЦР-анализ содержания мРНК медленной ТЦМ I(β) (А) и быстрых ТЦМIIId/x (Б), ТЦМ IIa (В), ТЦМ IIb (Г) в группах С, 1HS и 1HS+МСО. * - достоверные (p<0,05) отличия от контрольной группы.

Тем не менее, все авторы наблюдали снижение уровня экспрессии ТЦМ I(β), однако скорость данного процесса несколько различалась. Наблюдаемая динамика экспрессии ТЦМ I(β) коррелирует с наблюдавшейся в нашем исследовании динамикой содержания NFATc1 в ядерной фракции. В данном исследовании мы не обнаружили восстановления уровня экспрессии ТЦМ I(β) на третьи сутки в группе чистого вывешивания – это противоречие можно объяснить тем, что накоплением мРНК ТЦМ I(β) несколько запаздывает по сравнению с накоплением NFATc1 в мышечных ядрах. Этим же временным сдвигом можно объяснить несоответствие между уровнем мРНК MСIP1.4 и содержанием NFATc1 в мышечных ядрах в данной экспериментальной серии.

Наблюдавшееся поддержание и даже некоторое усиление экспрессии ТЦМ I(β), вызванное опорной стимуляцией после первых и после третьих суток (Рис. 3-4) вывешивания соответствует данным, полученным на человеке [33], свидетельствующим, что опорная стимуляция предотвращает сдвиг миозинового фенотипа в быструю сторону при 7-суточной «сухой» иммерсии. Данные по экспрессии «быстрых» изоформ ТЦМ после 1 и 3 суток вывешивания соответствуют ранее полученным в нашей лаборатории результатам [13]. В данной работе мы впервые показали, что опорная механическая стимуляция предотвращает снижение содержания NFATc1 в мышечных ядрах на 1 сутки и снижение уровня NFAT-зависимой транскрипции на 3 сутки вывешивания (Рис. 5-6 А, Б).

Наблюдаемое в данной работе увеличение экспрессии кальсарцина-2 вдвое по сравнению с уровнем контрольной группы после третьих суток вывешивания (Рис.7 А, Б) соответствует данным, полученным в нашей лаборатории в 2016 году [13]. Данные о предотвращении увеличения экспрессии кальсарцина-2 при опорной стимуляции получены впервые; к сожалению, механизм, обуславливающий повышение уровня экспрессии кальсарцина-2 при вывешивании и его снижение при опорной стимуляции, остаётся неизвестным.

Обнаруженное снижение уровня фосфорилирования GSK-3β после третьих суток вывешивания (Рис 8 Б) согласуется с ранее полученными данными [34]. Мы предполагаем, что наблюдаемое дефосфорилирование GSK-3β при разгрузке (Рис 8 А, Б) может быть связано со снижением уровня оксида азота в скелетной мышце.

В таком случае восстановление содержания NFATc1 в ядре, NFAT-зависимой транскрипции и экспрессии медленной изоформы ТЦМ при механической опорной стимуляции может быть связано с обнаруженным предотвращением снижения содержания нейрональной NO-синтазы в тотальной белковой фракции камбаловидных мышц. Известно, что активность GSK-3β подавляется с помощью NO-зависимого сигнального каскада [35], и восстановление уровня оксида азота в скелетной мышце вывешенных животных предотвращает как снижение уровня фосфорилирования GSK-3β, так и снижение экспрессии мРНК ТЦМ I(β) [36]. Данные о снижении содержания нейрональной NO-синтазы при моделируемой гравитационной разгрузке

(Рис.9) согласуются с данными, полученными ранее на человеке [37]. Увеличение содержания NO-синтазы при механической опорной стимуляции на фоне функциональной разгрузки (Рис.9) также согласуется с данными, ранее полученными на человеке [38].

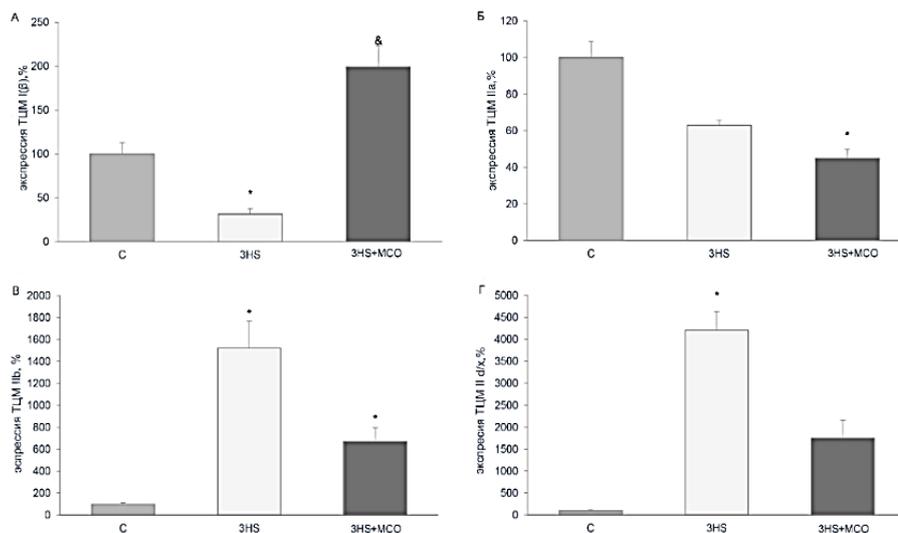


Рис.4. ПЦР-анализ содержания мРНК медленной ТЦМ I(β) (А) и быстрых ТЦМ IIa/x (Б), ТЦМ IIa (В), ТЦМ IIb (Г) в группах С, 1HS и 1HS+МСО. * - достоверные ($p < 0,05$) отличия от контрольной группы, & - достоверные отличия от группы чистого вывешивания

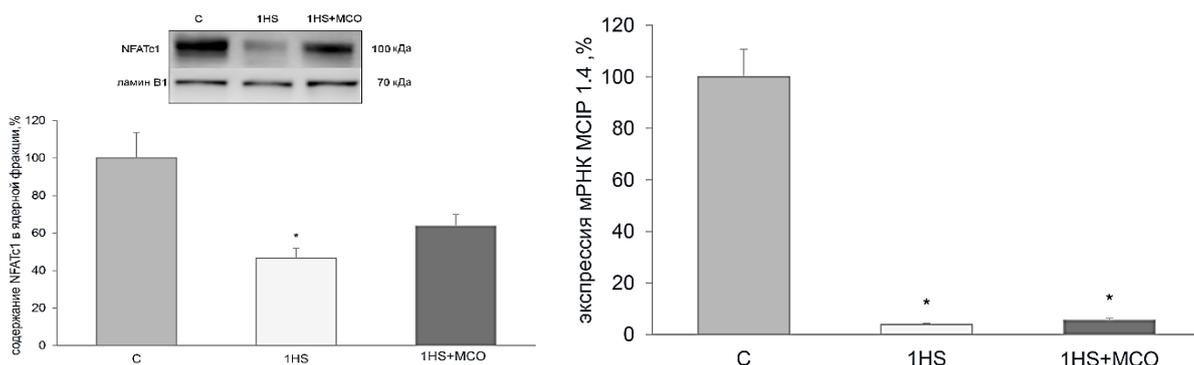


Рис.5. Содержание NFATc1 в ядерной фракции камбаловидных мышц экспериментальных животных в группах С, 1HS и 1HS+МСО по данным Вестерн-блота (А); ПЦР-анализ содержания мРНК МСР1.4 (Б). * - достоверные ($p < 0,05$) отличия от контрольной группы

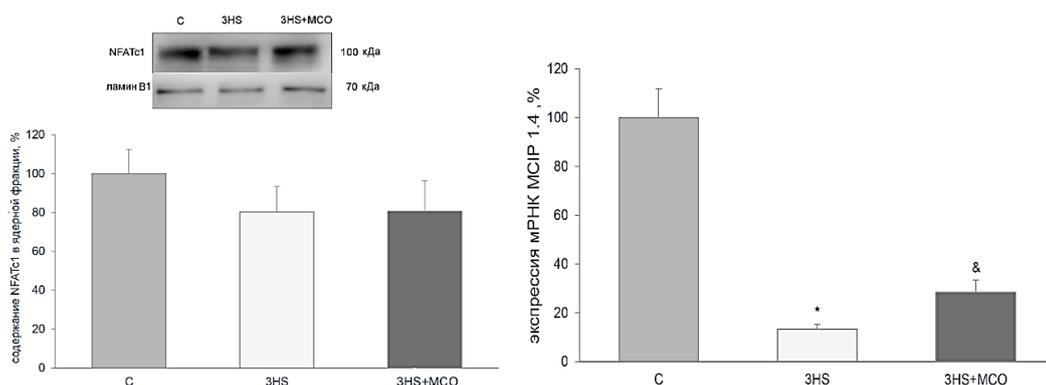


Рис.6. Содержание NFATc1 в ядерной фракции камбаловидных мышц экспериментальных животных в группах C, 3HS и 3HS+MCO по данным Вестерн-блота (А); ПЦР-анализ содержания мРНК MDR1.4 (Б). * - достоверные ($p < 0,05$) отличия от контрольной группы. & - достоверные отличия от группы 3HS ($p < 0,05$).

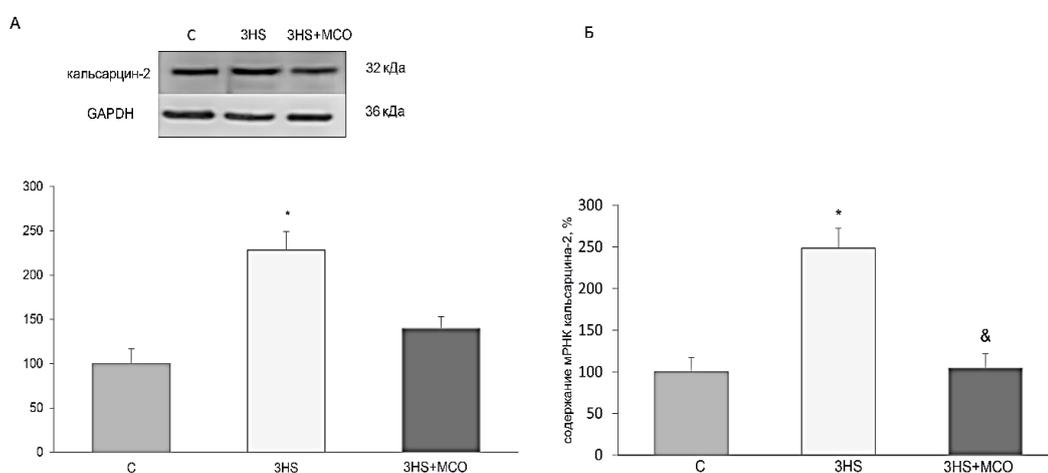


Рис.7. Содержание кальсарцина-2 в группах C, 3HS и 3HS+MCO по данным Вестерн-блота. (А); ПЦР-анализ содержания мРНК кальсарцина-2 в группах (Б) * - достоверные ($p < 0,05$) отличия от контрольной группы. & - достоверные отличия от группы 3HS ($p < 0,05$).

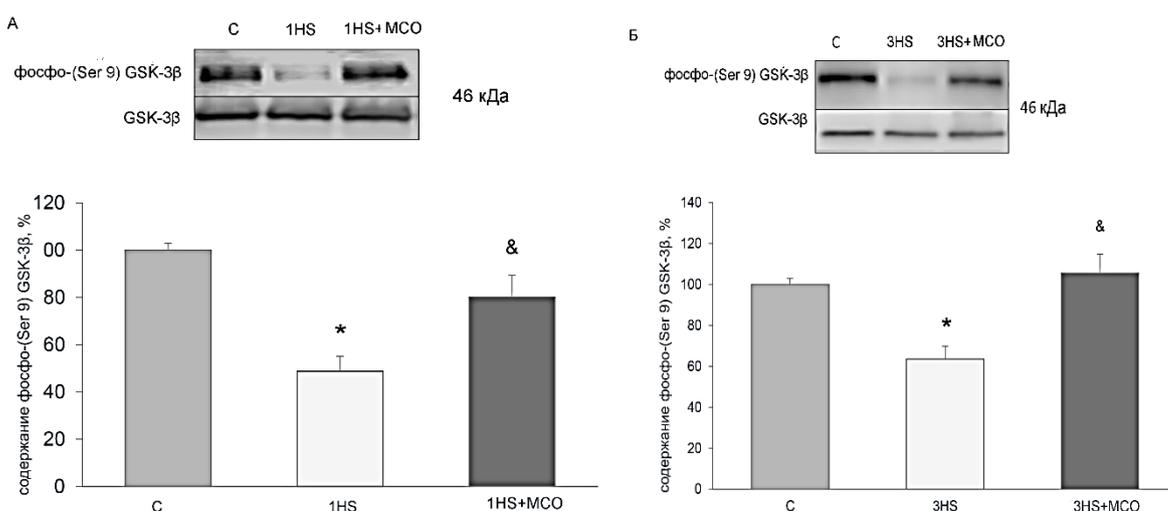


Рис.8. Процент фосфорилирования GSK-3β по Ser 9 в группах C, 1HS и 1HS+MCO (А); процент фосфорилирования GSK-3β по Ser 9 в группах C, 3HS и 3HS+MCO (Б) по данным Вестерн-блота. * - достоверные ($p < 0,05$) отличия от контрольной группы. & - достоверные отличия от группы 3HS ($p < 0,05$).

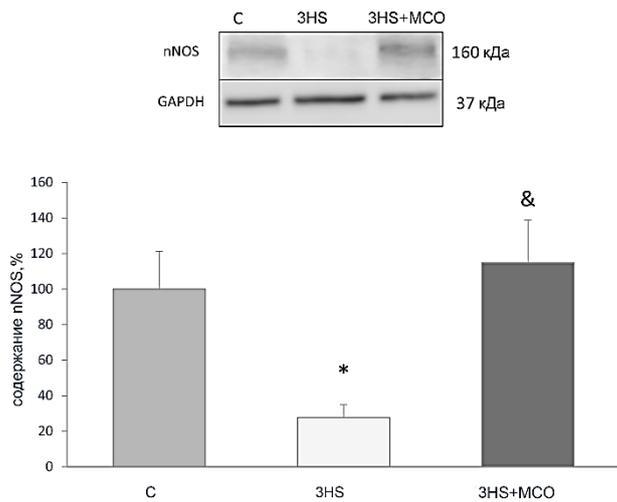


Рис.9. Содержание нейрональной NO-синтазы (nNOS) в тотальной фракции камбаловидных мышц экспериментальных животных в группах C, 3HS и 3HS+MCO по данным Вестерн-блота. * - достоверные ($p < 0,05$) отличия от контрольной группы.

Итак, мы показали, что опорная механическая стимуляция предотвращает инактивацию сигнального пути кальцинейрин/NFATc1 и снижение экспрессии медленной изоформы ТЦМ после 1-3 суток вывешивания и на основании этих данных выдвинули гипотезу об NO-зависимом влиянии MCO на эти процессы.

Влияние опорной механической стимуляции на функционирование сигнального пути кальцинейрин/NFATc1 и экспрессию медленной изоформы ТЦМ после 7 суток вывешивания: роль NO-синтазы.

Данный эксперимент проводили с целью проанализировать роль NO-синтазы в эффекте механической опорной стимуляции в регулировании активности сигнального пути кальцинейрин/NFATc1 и экспрессии различных изоформ ТЦМ после 7 суток моделируемой гравитационной разгрузки, а также для выявления эффекта механической опорной стимуляции на активность сигнального пути кальцинейрин/NFATc1 и экспрессию различных изоформ ТЦМ после семи суток моделируемой гравитационной разгрузки. После семи суток вывешивания в группе 7HS мы наблюдали снижение экспрессии мРНК медленной изоформы ТЦМ и ТЦМ IIa, а также повышение экспрессии мРНК ТЦМ IIb и ТЦМ IId/x (Рис 10 А-Г), что соответствует данным других авторов [4, 5, 22], [13]. Наблюдаемое в группе с механической опорной стимуляцией (7HS+MCO) предотвращение снижения экспрессии мРНК ТЦМ I(β) соответствует данным, полученным после 1-3 суток опорной стимуляции на фоне вывешивания; тем не менее, предотвращения снижения содержания мРНК ТЦМ IIa на более ранних сроках не наблюдалось (Рис. 10 А). Влияние механической опорной стимуляции на экспрессию ТЦМ IIa может быть связано с инактивацией GSK-3 β [39]. Сходство поведения экспрессии ТЦМ IIb в обеих группах с опорной механической стимуляцией (Рис. 10 В) позволяет предположить, что влияние стимуляции на экспрессию

ТЦМ IIb не связано с NO-зависимыми механизмами.

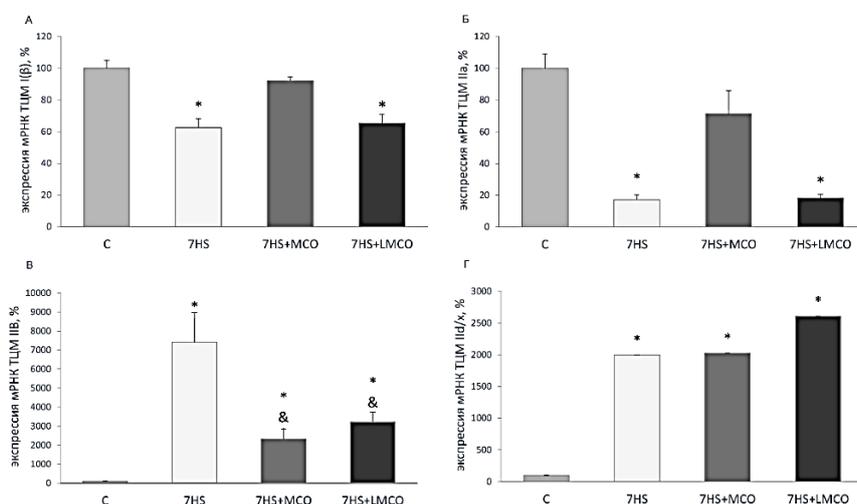


Рис.10. ПЦР-анализ содержания мРНК медленной ТЦМ I(β) (А) и быстрых ТЦМ IIa (Б), ТЦМ IIb (В), ТЦМ IId/x (Г) в группах C, 7HS, 7HS+MCO и 7HS+LMCO. * - достоверные ($p < 0,05$) отличия от контрольной группы, & - достоверные отличия от группы 7HS

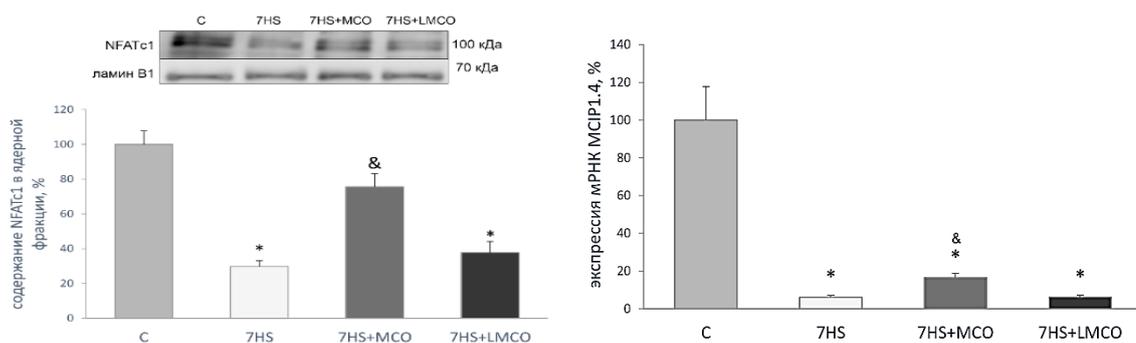


Рис.11. Содержание NFATc1 в ядерной фракции камбаловидных мышц экспериментальных животных в группах C, 7HS, 7HS+MCO и 7HS+LMCO по данным Вестерн-блота (А); ПЦР-анализ содержания мРНК МСIP1.4 в группах C, 7HS, 7HS+MCO и 7HS+LMCO (Б)* - достоверные ($p < 0,05$) отличия от контрольной группы, & - достоверные ($p < 0,05$) отличия от группы вывешивания.

Предотвращение снижения уровня фосфорилирования Ser 9 GSK-3 β , снижения содержания NFATc1 в ядерной фракции и снижения экспрессии мРНК МСIP1.4 в группе 7HS+MCO (Рис 11-12А) соответствует результатам, полученным после 1-3 суток вывешивания; при этом то, что все эти эффекты были блокированы в группе 7HS+LMCO, позволяет сделать заключение о том, что активность NO-синтазы играет ключевую роль во влиянии механической опорной стимуляции на экспрессию медленной изоформы ТЦМ и содержание NFATc1 в ядерной фракции. Результаты, касающиеся экспрессии кальсарцина-2 (Рис. 12Б), будут обсуждены в следующем разделе, так как для корректной интерпретации результатов их необходимо рассматривать совместно с данными, полученными в эксперименте с введением L-аргинина на фоне 7-суточного вывешивания.

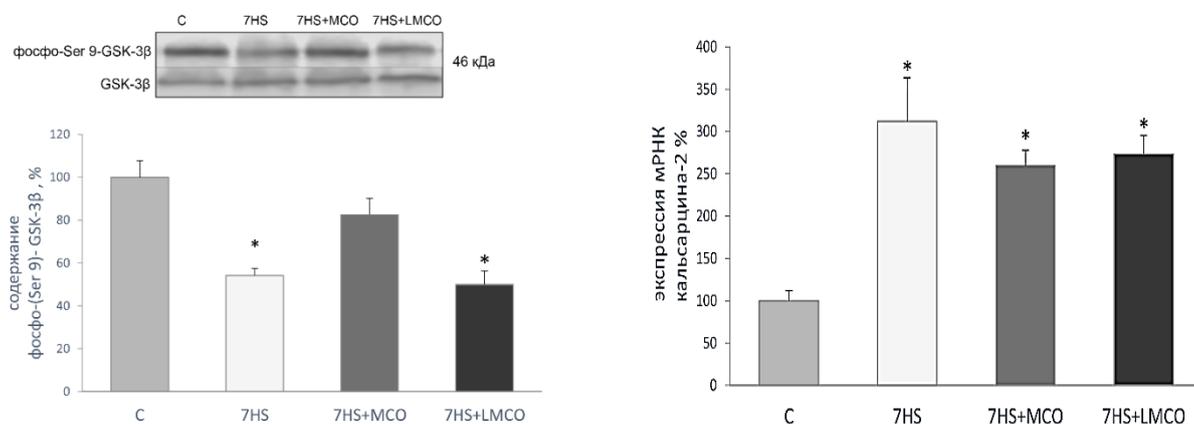


Рис.12. (А)Процент фосфорилирования GSK-3 β по Ser 9 в группах C, 7HS, 7HS+MCO и 7HS+LMCO по данным Вестерн-блота (Б) ПЦР-анализ содержания мРНК кальсарцина-2 в группах в группах C, 7HS, 7HS+MCO и 7HS+LMCO. * - достоверные ($p < 0,05$) отличия от контрольной группы.

Итак, мы показали, что эффект MCO на предотвращение снижения мРНК медленной изоформы ТЦМ и содержания NFATc1 в мышечных ядрах, а также уровня NFAT-зависимой транскрипционной активности зависит от активности NO-синтазы.

Роль снижения уровня оксида азота при вывешивании в инактивации сигнального пути кальцинейрин/NFATc1 после 7 суток вывешивания: GSK-3 β -зависимые и GSK-3 β -независимые механизмы

Для того, чтобы выявить роль снижения уровня оксида азота в камбаловидной мышце после 7-суточного вывешивания в снижении экспрессии ТЦМ I(β) и инактивации сигнального пути кальцинейрин/NFATc1 был проведен эксперимент с введением донора оксида азота (L-аргинина) на фоне 7-суточного вывешивания. В эксперимент ввели дополнительную контрольную группу с совместным введением L-аргинина и ингибитора NO-синтазы L-NAME: NO-зависимыми считали лишь те эффекты введения L-аргинина, которые не проявлялись в группе с ингибированием NO-синтазы. Для выявления роли NO-зависимой инактивации GSK-3 β в данном предотвращении инактивации сигнального пути кальцинейрин/NFATc1 был проведён эксперимент с фармакологическим ингибированием GSK-3 на фоне 7-суточного вывешивания.

Наблюдавшееся после седьмых суток вывешивания снижение уровня NO в миоплазме камбаловидных мышц вывешенных животных (Рис. 13) согласуется с данными о снижении содержания нейрональной NO-синтазы после 10 дней и 14 дней гравитационной разгрузки [40] [41], антиортостатической гипокинезии и иммерсии [41, 42], а также данным о снижении экспрессии мРНК нейрональной NO-синтазы после 14 суток вывешивания[36]. В то же время, стоит отметить, что по данным Suzuki и соавторов, после 14-суточного вывешивания мышей уровень оксида азота в мышцах вывешенных животных увеличивается[41].

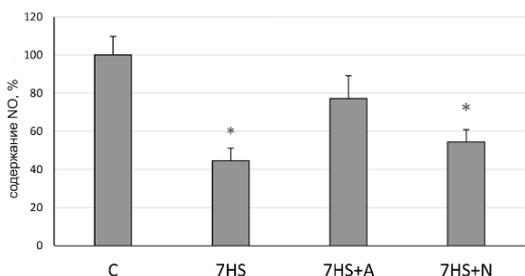


Рис.13. Содержание оксида азота в камбаловидных мышцах животных в группах C, 7HS, 7HS+A, 7HS+N.

Обнаруженное после 7 суток вывешивания снижение экспрессии мРНК медленной изоформы ТЦМ и ТЦМ II α , а также повышение экспрессии мРНК ТЦМ II β и ТЦМ II d/x (Рис. 15, 16 А-Г) соответствует данным других авторов [4, 5, 22], [13]. Частичное предотвращение снижения экспрессии мРНК ТЦМ II α в группах 7HS+A и 7HS+G (Рис. 14, 15) может быть связано с инактивацией GSK-3 β : было показано, что ингибирование GSK-3 β приводит к увеличению экспрессии мРНК ТЦМ II α в сателлитных клетках козы[39]. Блокирование эффектов L-аргинина в группе 7HS+N (в которой введение L-аргинина сопровождалось введением ингибитора NO-синтазы) свидетельствует о том, что воздействие L-аргинина на экспрессию мРНК изоформ ТЦМ является NO-зависимым.

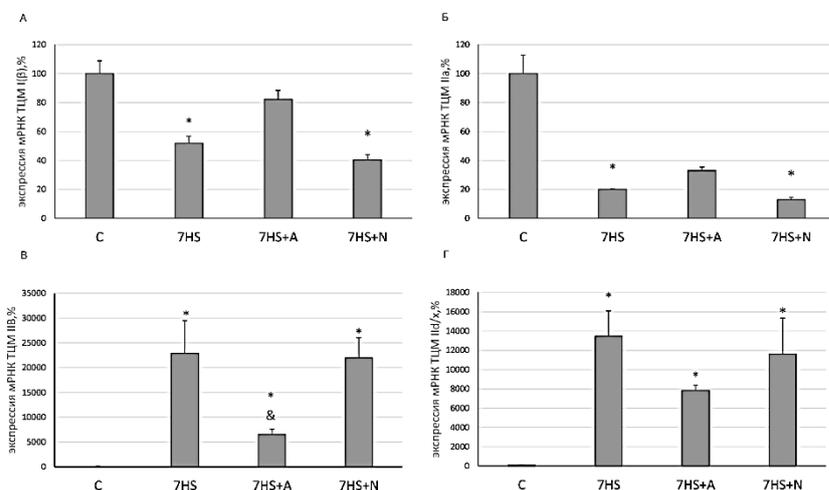


Рис.14. ПЦР-анализ содержания медленной ТЦМ I(β) (А) и быстрых ТЦМ II α (Б), ТЦМ II d/x (В), ТЦМ II β (Г) в группах C, 7HS, 7HS+A, 7HS+N. * - достоверные ($p < 0,05$) отличия от контрольной группы, & - достоверные отличия от группы 7HS.

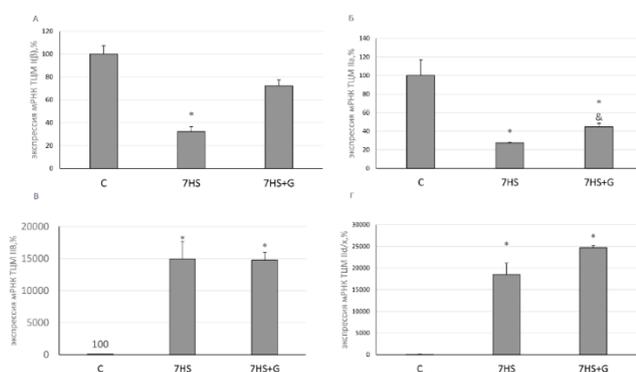


Рис.15. ПЦР-анализ содержания медленной ТЦМ I(β) (А) и быстрых ТЦМ IIa (Б), ТЦМ IIb/х (В), ТЦМ IIb (Г) в группах С, 7HS, 7HS+G, * - достоверные (p<0,05) отличия от контрольной группы. & - достоверные отличия от группы 7HS

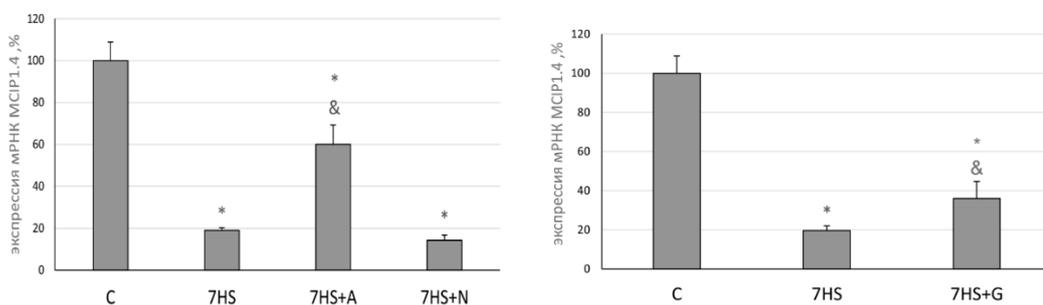


Рис.16. ПЦР-анализ содержания мРНК MCIP1.4 в группах в группах С, 7HS, 7HS+A, 7HS+N (А); ПЦР-анализ содержания мРНК MCIP1.4 в группах в группах С, 7HS, 7HS+G (Б) * - достоверные (p<0,05) отличия от контрольной группы, & - достоверные отличия от группы 7HS

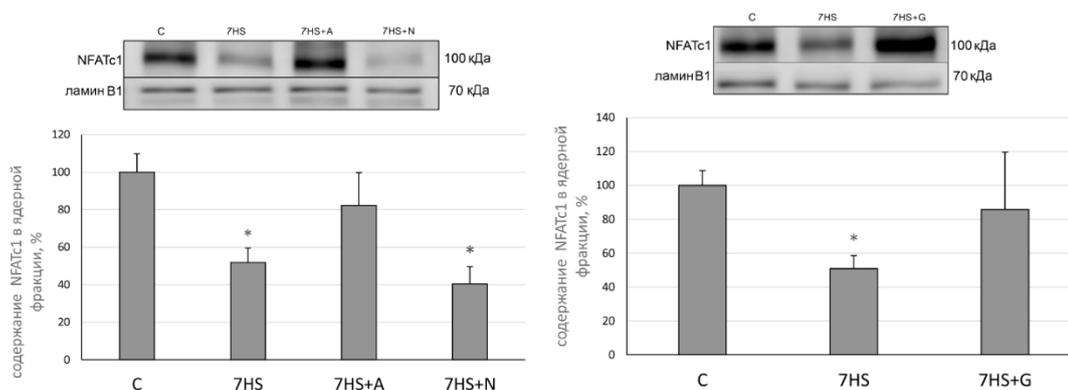


Рис.17. Содержание NFATc1 в ядерной фракции камбаловидных мышц экспериментальных животных в группах С, 7HS, 7HS+A и 7HS+N по данным Вестерн-блота (А); в группах С, 7HS, 7HS+G по данным Вестерн-блота (Б) * - достоверные (p<0,05) отличия от контрольной группы

Эффекты оксида азота на уровень фосфорилирования Ser 9 GSK-3β и накопление в мышечных ядрах NFATc1 были ранее показаны на миотубах[43]; в данной работе этот эффект удалось наблюдать *in vivo* при вывешивании; также впервые было показано влияние NO на уровень экспрессии мРНК MCIP1.4 (Рис. 16, 17,18). Введение ингибитора GSK-3 не повлияло вызванное вывешиванием снижение уровня фосфорилирования GSK-3β (Рис.18 Б). Тем не менее, уровень фосфорилирования GSK-3β в группе 7HS+G не отражает её ферментативной активности, поскольку ингибитор GSK-3, применявшийся в данной группе, AR-A014418, ингибирует GSK-

3β, взаимодействуя с её АТФ-связывающим центром, а не воздействуя на фосфорилирование Ser 9 [44].

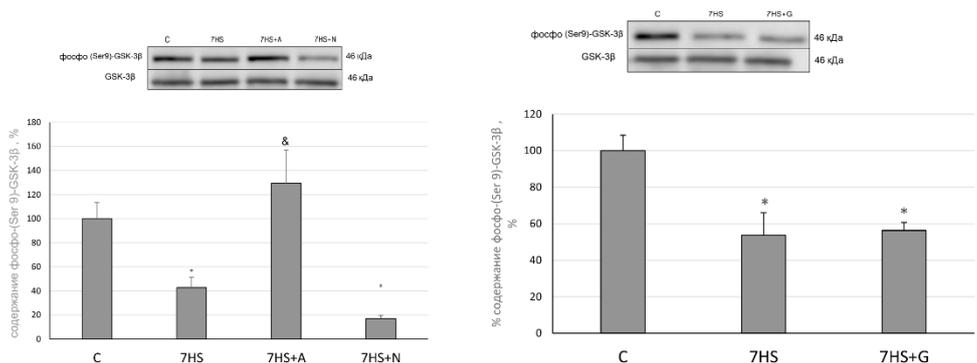


Рис.18. Процент фосфорилирования GSK-3β по Ser 9 в группах C, 7HS, 7HS+A и 7HS+N по данным Вестерн-блота (А); процент фосфорилирования GSK-3β по Ser 9 в группах C, 7HS, 7HS+G по данным Вестерн-блота (Б). * - достоверные ($p < 0,05$) отличия от контрольной группы. & - достоверные отличия от группы 7HS.

Увеличение экспрессии кальсарцина-2 в группе 7HS (Рис.19) согласуется с данными, ранее полученными в нашей лаборатории [13]. В данной работе впервые получены результаты, свидетельствующие о том, что экспрессия кальсарцина-2 в камбаловидной мышце регулируется уровнем оксида азота, причем данный эффект не зависит от инактивации GSK-3β (Рис. 19). Отдельно следует отметить влияние механической опорной стимуляции на содержание кальсарцина-2: увеличение экспрессии кальсарцина-2 блокировалось в группе 7HS+A, но не отличалось от группы 7HS в группе 7HS+MCO (Рис. 12Б, 19). Эти результаты позволяют сделать вывод о том, что влияние MCO на регуляцию экспрессии миозинов не сводятся исключительно к NO-зависимым эффектам.

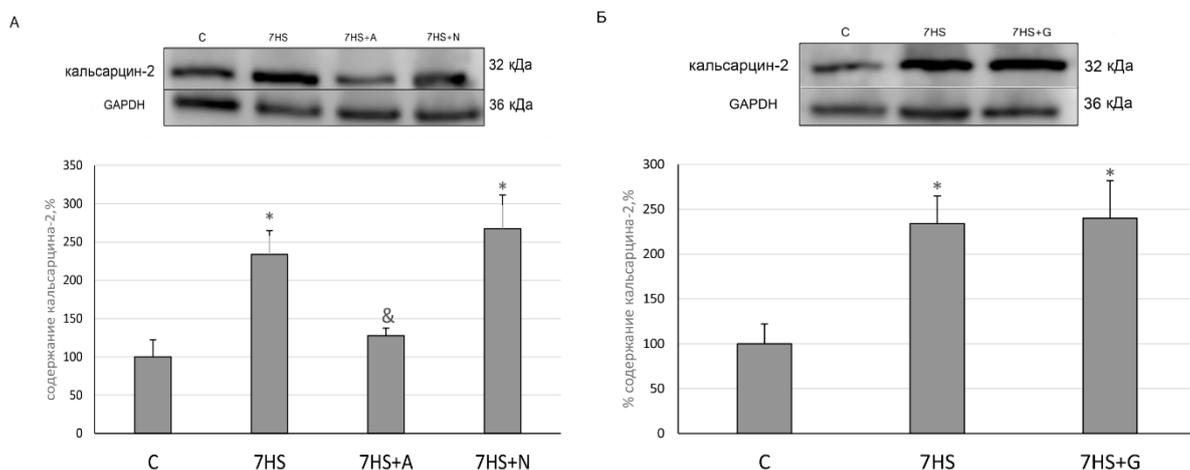


Рис.19. Содержание кальсарцина-2 в группах в группах C, 7HS, 7HS+A и 7HS+N (А) и в группах C, 7HS, 7HS+G (Б) по данным Вестерн-блота* - достоверные ($p < 0,05$) отличия от контрольной группы. & - достоверные отличия от группы 7HS.

Итак, на основании этих данных можно заключить, что NO-зависимое поддержание экспрессии ТЦМ I(β) обусловлено как инактивацией GSK-3β, так и блокированием увеличения экспрессии эндогенного ингибитора кальцинейрина кальсарцина-2, что приводит к накоплению NFATc1 в мышечных ядрах, увеличению NFAT-зависимой транскрипционной активности и восстановлению экспрессии медленной изоформы ТЦМ.

Влияние ингибирования МАП-киназы p38 на содержание в мышечных ядрах NFATc1 и экспрессию медленной изоформы ТЦМ после 3 суток вывешивания

Для того, чтобы проанализировать роль активации МАП-киназы p38 в снижении экспрессии ТЦМ I(β) и инактивации сигнального пути кальцинейрин/NFATc1 после трёх суток вывешивания был проведён эксперимент с введением ингибитора МАП-киназы p-38 VX-745. Эксперимент был проведён совместно с группой исследования катаболических сигнальных путей лаборатории миологии под руководством Т.Л. Немировской.

Наблюдаемое увеличение уровня фосфорилирования МАП-киназы p-38 после третьих суток вывешивания (Рис.20) согласуется с ранее полученными данными, однако в цитируемых статьях данное увеличение исследовали после 7 суток вывешивания или на ещё более поздних сроках [12, 45].

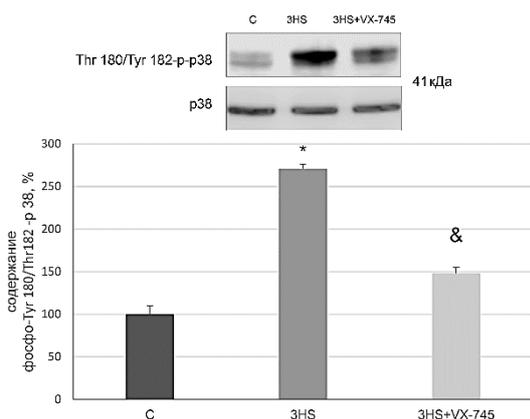


Рис.20. Уровень фосфорилирования МАП-киназы p-38 по Thr180/Tyr 182 в группах C, 3HS, 3HS+VX-745 по данным Вестерн-блота. * - достоверные ($p < 0,05$) отличия от контрольной группы. & - достоверные отличия от группы 3HS.

Наблюдаемое увеличение экспрессии мРНК ТЦМ II d/x и II B и снижение экспрессии мРНК ТЦМ II a и медленной изоформы ТЦМ соответствует ранее полученным данным [13]. Увеличение содержания мРНК медленной изоформы ТЦМ в группе трехсуточного вывешивания с введением ингибитора МАП-киназы p-38 (Рис 21 А) соотносится с данными

Derbre и соавторов о предотвращении трансформации волокон камбаловидной мышцы в «быструю» сторону при применении аллопуринола, приводящего, в частности, к инактивации МАП-киназы p-38 [12].

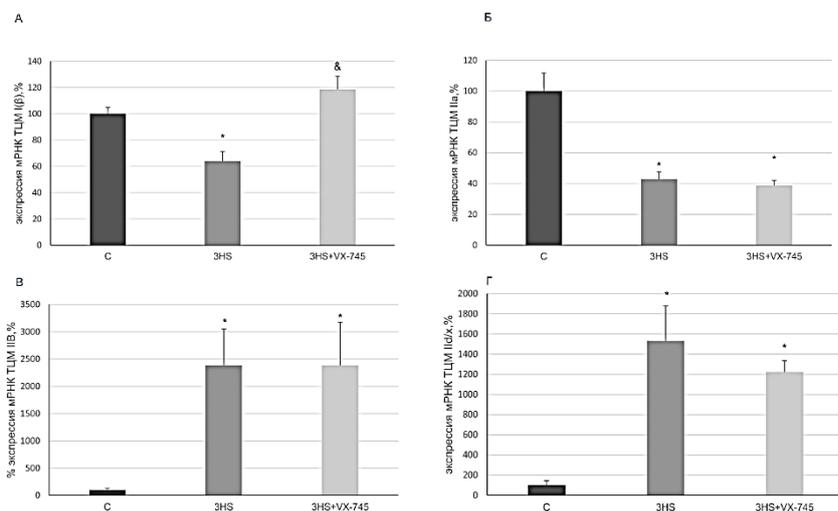


Рис.21. ПЦР-анализ содержания мРНК медленной ТЦМ I(β) (А) и быстрых ТЦМ II d/x (Б), ТЦМ II a (В), ТЦМ II b (Г) в группах C, 3HS, 3HS+VX-745. * - достоверные ($p < 0,05$) отличия от контрольной группы. & - достоверные отличия от группы 3HS.

Несоответствие между сниженной NFAT-зависимой экспрессией мРНК MCIP1.4 и содержанием NFATc1 в мышечных ядрах после трёх суток вывешивания можно объяснить задержкой во времени между транслокацией NFATc1 в ядро и накоплением мРНК NFAT-зависимых транскриптов (Рис. 22 А,Б). Согласно этому предположению, ингибирование МАП-киназы p-38 приводит к предотвращению снижения содержания ТЦМ I(β) и частичному предотвращению снижения экспрессии мРНК MCIP1.4 после третьих суток вывешивания за счёт предотвращения снижения содержания NFATc1 в мышечных ядрах на первые-вторые сутки вывешивания.

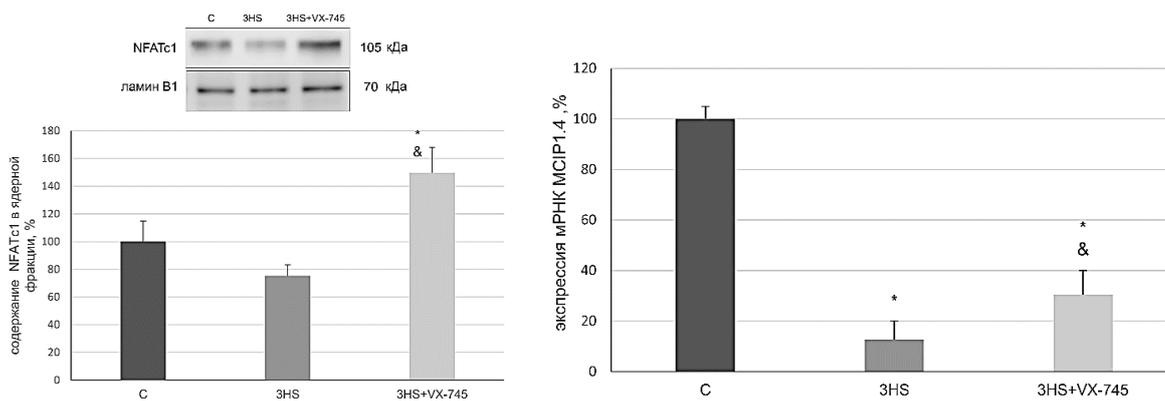


Рис.22. Содержание NFATc1 в ядерной фракции камбаловидных мышц в группах C, 3HS, 3HS+VX-745 по данным Вестерн-блота (А); ПЦР-анализ содержания мРНК MSIP1.4 в группах C, 3HS, 3HS+VX-745 (Б);. * - достоверные ($p < 0,05$) отличия от контрольной группы. & - достоверные отличия от группы 3HS

Итак, мы обнаружили, что ингибирование МАП-киназы р-38 предотвращает вызываемое вывешиванием снижение содержания ТЦМ I(β) и приводит к увеличению содержания NFATc1 в мышечных ядрах, а также к активации NFAT-зависимой транскрипции. Вероятно, эффект ингибирования МАП-киназы р-38 на экспрессию медленной изоформы ТЦМ связан с активацией NFAT-зависимых сигнальных механизмов.

Выводы

1. Снижение содержания NFATc1 в ядерной фракции камбаловидных мышц и снижение его транскрипционной активности происходит уже на ранних сроках моделируемой гравитационной разгрузки (1-3 сутки и 7 сутки),
2. После двух недель моделируемой гравитационной разгрузки содержание NFATc1 в мышечных ядрах камбаловидных мышц восстанавливается, однако на данном этапе содержание NFATc1 в мышечных ядрах не отражает уровень NFAT-зависимой транскрипционной активности
3. Снижение содержания оксида азота в миоплазме камбаловидной мышцы при моделируемой гравитационной разгрузке приводит к инактивации сигнального пути кальцинейрин/NFATc1 и снижению экспрессии ТЦМ I(β) за счет активации киназы GSK-3 β и увеличения экспрессии кальсарцина-2.
4. Механическая стимуляция опорных афферентов стопы приводит к восстановлению содержания NFATc1 в мышечных ядрах, NFAT-зависимой транскрипции и экспрессии ТЦМ I(β)
5. Реализация эффектов опорной стимуляции применительно к регуляции экспрессии ТЦМ I(β) и ТЦМ IIa происходит при участии NO-зависимых сигнальных путей.
6. Активация МАП-киназы р-38 вносит вклад в снижение экспрессии ТЦМ I(β) и NFAT-зависимой транскрипционной активности на 1-3 сутках вывешивания.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО МАТЕРИАЛАМ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых журналах

1. Sharlo, K.A., Paramonova I.I., Turtikova O.V., Tyganov S.A., Shenkman B.S. Plantar mechanical stimulation prevents calcineurin-NFATc1 inactivation and slow-to-fast fiber type shift in rat soleus muscle under hindlimb unloading // *J Appl Physiol* - 2019 - V. 126. - № 6. - P. 1769-1781.
2. Sharlo K. A., Lomonosova. Y.N., Turtikova O. V., Mitrofanova O.V., Kalamkarov G.R., Bugrova A. A. Shevchenko T. F., Shenkman B.S. 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* - 2018 - V. 12 - № 1. - P. - 85-91.
3. Парамонова И, Шарло К, Вильчинская Н., Шенкман Б. Динамика содержания в мышечных ядрах транскрипционных регуляторов экспрессии медленной изоформы миозина в камбаловидной мышце крыс на фоне гравитационной разгрузки // *Биологические мембраны – 2020* - Т. 37 № 2. С. 126–133
4. Kristina A. Sharlo, Inna I. Paramonova, Irina D. Lvova, Natalia A. Vilchinskaya, Anna E. Bugrova, Tatiana F. Shevchenko, Grigoriy R. Kalamkarov, Boris S. Shenkman. NO-Dependent Mechanisms of Myosin Heavy Chain Transcription Regulation in Rat Soleus Muscle After 7-Days Hindlimb Unloading // *Frontiers in physiology* – 2020 – V 11 - 814

Статьи в сборниках

1. Sharlo, K., I. Paramonova, O. Turtikova, S. Tyganov and B. Shenkman. Effects of gravitational hindlimb unloading and plantar mechanical stimulation on calcineurin/NFATc1 signaling pathway and slow myosin expression in rat soleus muscle. // *Frontiers in physiology (extended abstract)* - 2018
2. B.S. Shenkman, Yu.N. Lomonosova, Ch.A. Lyubimova, K. Ptitsyn. Slow to fast. Physiological control over slow myosin expression in soleus muscle under gravitational unloading. // *Сборник Biological Motility* – 2016 - С. 215-216

Тезисы конференций:

1. B. Shenkman, C. Luibimova, K. Ptitsyn, Yu. Lomonosova. The Machinery of the expression of slow myosin downregulation in soleus muscle under gravitational unloading. Mechanisms suppressing NFATc1 myonuclear accumulation // *Programme & Abstract book, 14th European life sciences symposium, 37 annual international gravitational physiology meeting – Toulouse, 2016, P.66*
2. Шенкман Б. С., Любимова К.А., Птицын К.Г., Вильчинская Н. А., Ломоносова Ю. Н. Молекулярно-физиологические основы трансформации медленных волокон постуральной мышцы в быстрые при гравитационной разгрузке // *Научные труды V съезда биохимиков России, конференции ADFILM – Acta Naturae. Спецвыпуск. – Москва, 2016 – Т. 1. – С. 34 – 35*
3. Любимова К. А., Птицын К. Г., Ломоносова Ю. Н., Шенкман Б. С. NO-зависимые механизмы снижения экспрессии медленной изоформы миозина в m soleus при гравитационной разгрузке // *Авиакосмическая и экологическая медицина. Спецвыпуск. – Москва, 2016 – Т.50 - №5 – С 136 – 137*
4. Shenkman B. S., Nemirovskaya T. L., Lomonosova Yu. N., Luibimova, K. A., Ptitsyn K. G. Nitric oxide in unloaded muscle: powerless guard of stability // *Absrtact book of experimental and computational biomedicine: Russian conference with international participation in memory of professor Vladimir Markhasin – Moscow, 2016 – P.52*
5. Шарло К. А., Белова С. П., Мочалова Е. П., Шенкман Б. С. Протеинкиназы, регулирующие ядерно-цитоплазматическую транслокацию NFAT, в условиях гравитационной разгрузки // *Авиакосмическая и экологическая медицина. Спецвыпуск. – Москва, 2018 – Т. 52. №7 С. 260-261*
6. Шарло К. А., Львова И.Д., Каламкар Г. Р., Шенкман Б. С. NFAT-зависимые механизмы регуляции фенотипа волокон камбаловидной мышцы крыс при гравитационной

разгрузке // X Всероссийская школа молодых учёных, посвящённая памяти академика РАН Евгения Евгеньевича Никольского: сборник тезисов под общей редакцией Э.А. Бухараевой, А. Л. Зефирова. – Казань, 2019 – С. 140-141

7. Shenkman B.S., Vilchinskaya N. A., Sharlo K. A., Paramonova I.I., Kalamkarov G. R. Metabolic signals and their sensors are involved in the control of slow myosin expression in unloaded rat soleus muscle // Program&abstract book of 40th annual meeting of the ISGP and space life science and medicine meeting – 2019 – P.63

8. Шенкман Б. С., Шарло К. А., Вильчинская Н. А., Парамонова И. И., Каламкарров Г. Р. Метаболические сигналы и их сенсоры регулируют экспрессию медленного миозина в инактивированной постуральной мышце // Acta naturae - Москва, 2019 – с. 101-102

9. Sharlo K. A., Belova S. P., Mochalova E. P., Nemirovskaya T. L., Shenkman B.S. The role of MAP-kinase p38 activation in the m soleus slow-to-fast fiber-type shift during gravitational unloading // annual meeting of the ISGP and space life science and medicine meeting – 2019 – P 52

10. Boris Shenkman, Natalia Vilchinskaya, Kristina Sharlo. Physiological triggers involved in reduced slow myosin expression in disused postural muscle // Proceedings of IBEC – Beijing, 2018 – V. 1 - № 1.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- АДФ – аденозиндифосфат
- АМФ - аденозинмонофосфат
- АТФ - аденозинтрифосфат
- ДЭТК - диэтилдитиокарбамат
- МАП-киназа – митоген-активируемая протеинкиназа
- МСО – механическая опорная стимуляция
- ОТ-ПЦР – полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией
- ПААГ – полиакриламидный гель
- ТЦМ – тяжёлые цепи миозина
- ЭПР – электронный парамагнитный резонанс
- АМРК – АМФ-активируемая протеинкиназа
- СаМК – кальций-кальмодулин киназа
- DAPI - 4', 6-диамидино-2-фенилиндол
- DMSO – диметилсульфоксид
- GSK-3 β – киназа гликогенсинтазы 3 β
- HDAC - гистондеацетилаза
- MCIP – модулирующие взаимодействующие с кальцинеирином белки
- NFAT – ядерный фактор активированных Т-лимфоцитов
- nNOS – нейрональная NO-синтаза
- PBS – фосфатно-солевой буфер
- PCM1 - белок перинуклеолярного материала 1