

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Государственный научный центр Российской Федерации
Институт медико-биологических проблем РАН

На правах рукописи

Тыганов Сергей Александрович

**РЕАЛИЗАЦИЯ МЕХАНИЧЕСКОГО СИГНАЛА В СИСТЕМЕ РЕГУЛЯЦИИ
СИНТЕЗА БЕЛКА В СКЕЛЕТНОЙ МЫШЦЕ МЛЕКОПИТАЮЩИХ НА ФОНЕ
ГРАВИТАЦИОННОЙ РАЗГРУЗКИ**

03.03.01 – физиология

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:

кандидат биологических наук Т.М.Мирзоев

Научный консультант:

доктор биологических наук, профессор Б.С. Шенкман

Москва – 2019

Оглавление

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	6
ВВЕДЕНИЕ.....	9
Актуальность работы.....	9
Цель и задачи исследования	11
Положения, выносимые на защиту	11
Научная новизна работы	12
Научно-практическая значимость.....	13
Публикации.....	14
Апробация работы.....	14
Структура и объем диссертации.....	14
1.ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	16
1.1 Воздействие реальной или моделируемой микрогравитации на скелетную мышцу	16
1.2 Экспериментальные модели, используемые для изучения эффектов микрогравитации и механотрансдукции на скелетную мышцу.....	17
1.3 Механосенсорные молекулы	19
1.3.1 Механизм работы стретч-чувствительных каналов	21
1.3.2 Механосенсорные молекулы и пути передачи механического сигнала в скелетной мышце	23

1.4 Ключевая роль mTORC1 в реализации механического сигнала.....	29
1.4.1 Предполагаемые активаторы mTORC1 сигналинга.....	30
1.5 Влияние механической разгрузки на анаболические сигнальные системы и синтез белка.....	34
1.6 Стимуляция опорных афферентов в условиях моделируемой микрогравитации	38
2. ОРГАНИЗАЦИЯ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ	42
2.1 Экспериментальные методы и подходы	42
2.1.1. Объект исследований	42
2.1.2 Методы работы с изолированной мышцей	42
2.1.3 Антиортостатическое вывешивание	45
2.1.4 Динамическая опорная стимуляция стопы	46
2.1.5 Антиортостатическое вывешивание крыс в течение 1, 3, 7 дней	47
2.1.6 Антиортостатическое вывешивание крыс в течение 1, 3, 7 дней с последующей эксцентрической нагрузкой <i>ex vivo</i>	48
2.1.7 Антиортостатическое вывешивание крыс в течение 7 суток с последующей эксцентрической нагрузкой <i>ex vivo</i> и блокированием стретч- чувствительных каналов.....	48
2.1.8 Анализ воздействия динамической опорной стимуляции стопы на анаболические процессы в постуральной мышце крысы на фоне 1 и 3 суточного вывешивания	49
2.1.9 Воздействие опорного стимула на фоне 3 суточного вывешивания на реализацию механического сигнала в постуральной мышце крысы в ответ на эксцентрическую нагрузку <i>ex vivo</i>	49

2.2 Методики обработки биоматериала и анализ данных	49
2.2.1 Анализ биомеханических параметров изолированной мышцы.	49
2.2.2. ДДС-электрофорез с последующим вестерн-блоттингом	50
2.2.3 Оценка синтеза белка методом SU нSET	51
2.2.4 Анализ вестерн-блота	52
2.2.5 Анализ содержания тотальной и рибосомальной РНК.....	52
2.3 Статистическая обработка данных.....	53
3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	54
3.1 Исследование анаболических сигнальных путей в скелетной мышце крысы на фоне 1, 3, 7 суточного вывешивания.....	54
3.2 Исследование анаболических сигнальных путей в скелетной мышце крысы после стандартной нагрузки <i>ex vivo</i> на фоне 1, 3, 7 суточного вывешивания.....	60
3.3 Исследование влияния механочувствительных каналов на реализацию механического сигнала после стандартной нагрузки <i>ex vivo</i> на фоне 7 суточного вывешивания.....	67
3.4 Изучение роли опорной афферентации в поддержании стабильности анаболических процессов в постуральной мышце млекопитающих на фоне 1 и 3 суточного вывешивания	73
3.5 Исследование реализации механического сигнала при действии опорного стимула в постуральной мышце млекопитающих на фоне 3 суточного вывешивания	83
4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ	89

4.1 Исследование анаболических сигнальных путей в скелетной мышце крысы на фоне 1, 3, 7 суточного вывешивания.....	89
4.2 Исследование анаболических сигнальных путей в скелетной мышце крысы после стандартной нагрузки <i>ex vivo</i> на фоне 1, 3, 7 суточного вывешивания.....	91
4.3 Исследование влияния механочувствительных каналов на реализацию механического сигнала после стандартной нагрузки <i>ex vivo</i> на фоне 7 суточного вывешивания.....	94
4.4 Изучение роли опорной афферентации в поддержании стабильности анаболический процессов в постуральной мышце млекопитающих на фоне 1 и 3 суточного вывешивания	96
4.5 Исследование реализации механического сигнала при действии опорного стимула в постуральной мышце млекопитающих на фоне 3-суточного вывешивания	99
ВЫВОДЫ.....	101
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ.....	102

Список сокращений

- 4E-BP1 – белок, связывающий фактор инициации трансляции 4E (eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1)
- AMPK – АМФ-активируемая протеинкиназа (AMP-activated protein kinase)
- Akt/PKB – протеинкиназа В
- CaM – кальмодулин (calmodulin)
- CSA - площадь поперечного сечения (cross-sectional area)
- DFS – динамическая стимуляция стопы (dynamic foot stimulation)
- DGK ζ – диацилглицерол киназа ζ (diacylglycerol kinase ζ)
- ECC – эксцентрические сокращения (eccentric contraction)
- ECM – внеклеточный матрикс (extracellular matrix)
- eEF2 – эукариотический элонгационный фактор 2 (eukaryotic elongation factor 2)
- eEF2k – киназа eEF2 (eEF2 kinase)
- eIF2B – эукариотический инициаторный фактор (eukaryotic initiation factor 2B)
- ERK1/2 – внеклеточная сигнал-зависимая киназа 1/2 (extracellular signal-regulated kinase 1/2)
- FA – фокальные контакты (focal adhesions)
- FAC – комплекс фокальных контактов (focal adhesion complex)
- FAK – киназа фокальных контактов (focal adhesion kinase)
- GAPDH – глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase)
- GSK-3 β – киназа гликогенсинтазы 3 β (glycogen synthase kinase 3 β)
- HS – антиортостатическое вывешивание (hindlimb suspension)
- IGF-1 – инсулиноподобный фактор роста 1 (insulin-like growth factor 1)
- IGF-1R – рецептор IGF-1 (IGF-1 receptor)

- IRS-1 – субстрат инсулинового рецептора 1 (insulin receptor substrate 1)
- LEL – поздняя эндосомально-лизосомальная структура (late endosomes-lysosomes structure)
- MAPK – митоген-активируемая протеинкиназа (mitogen-activated protein kinase)
- MGF-1 – механический фактор роста 1 (mechano-growth factor 1)
- MSCL – механосенсорный ионный канал высокой проводимости (large conductance mechanosensitive ion channel)
- MSCS – механосенсорный ионный канал низкой проводимости (small conductance mechanosensitive ion channel)
- mTOR – белок, активность которого блокируется рапамицином (mammalian target of rapamycin)
- mTORC1,2 – mTOR комплекс 1,2
- nNOS – нейрональная NO-синтаза (neuronal NO-synthase)
- p70S6k – S6 рибосомальная киназа 70 (ribosomal protein S6 kinase p70)
- p90RSK – S6 рибосомальная киназа 90 (ribosomal protein S6 kinase p90)
- PA – фосфатидная кислота (phosphatidic acid)
- PDK-1 – фосфоинозитид-зависимая киназа 1 (phosphoinositide-dependent kinase-1)
- PI3K – фосфоинозитид-3-киназа (phosphoinositide 3-kinase)
- PLD1 – фосфолипаза D1 (phospholipase D1)
- Ragulator-Rag – гетеромерный комплекс, связывающий mTORC1 с лизосомой
- Raptor – регуляторно-связанный белок mTOR (regulatory-associated protein of mTOR)

- Rheb – RAS-гомолог распространенный в мозге (RAS homolog enriched in brain)
- S6rp – S6 рибосомальный белок (S6 ribosomal protein)
- SAC – стретч-активируемые ионные каналы (stretch-activated ion channels)
- SPEG – протеинкиназа, преимущественно экспрессирующаяся в поперечно-полосатых мышцах (striated muscle preferentially expressed protein kinase)
- TSC2 – комплекс туберозного склероза 2 (tuberous sclerosis complex 2)

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность работы

В настоящее время влияние гравитационной разгрузки (реальной или моделируемой микрогравитации) на организм человека и других млекопитающих интенсивно изучается многими лабораториями. Длительное воздействие гравитационной разгрузки на человека приводит к нейромоторной адаптации скелетных мышц, прежде всего постуральных, снижающей их возможность поддерживать вес тела при возвращении на землю. Побочные эффекты микрогравитации приводят к нарушениям в работе опорно-двигательного аппарата и мышечной атрофии. Эти факты указывают на необходимость изучения моррофункциональных перестроек и клеточных сигнальных механизмов формирования атрофии скелетной мышцы.

Скелетные мышцы играют фундаментальную роль в физиологии человека и других млекопитающих, осуществляя локомоцию и движение, усиливая поток крови к органам, предоставляя защиту жизненно важным органам. Помимо механической функции, скелетная мышца выступает регулятором метаболизма всего организма – является местом накопления аминокислот и глюкозы, а также секretирует различные миокины [187, 250]. В связи с большим количеством функций, которые выполняет скелетная мышца, существует необходимость исследовать факторы, влияющие на ее состояние, в особенности те факторы, которые приводят к мышечной атрофии. Снижение мышечной массы приводит к увеличению риска травмирования, появлению метаболических заболеваний, снижению физической подвижности. Масса скелетной мышцы регулируется многими факторами, в том числе питанием, гормональным фоном, генетикой, ростовыми факторами, а также механическими стимулами [200, 214]. Хорошо известно, что увеличению механической нагрузки сопутствует мышечная гипертрофия, в то время как снижение механической нагрузки приводит к мышечной атрофии

[11, 79]. Механическая нагрузка, которую испытывает скелетная мышца, как правило состоит из продольных и латеральных сил разной величины, которые создаются за счет активных мышечных сокращений разной скорости или же пассивным растяжением.

Следует заметить, что механо-зависимые изменения мышечной массы связаны прежде всего с изменением синтеза белка [11]. При этом, существенный объем данных свидетельствует о том, что ключевую роль в передаче механического сигнала играет протеинкиназа, называемая «мишень рапамицина у млекопитающих» (mammalian target of rapamycin - mTOR) [79, 108].

Результаты проведенных за последние годы нейрофизиологических и молекулярных исследований в области гравитационной физиологии опорно-двигательной системы дали возможность сформулировать представление о гипогравитационном двигательном синдроме, развитие которого происходит в результате устранения аксиальной нагрузки и силы реакции опоры [8, 70, 198]. При этом ведущую роль в развитии гипогравитационного синдрома играет устранение опорной афферентации (информации, полученной от mechanосенсоров кожи стопы), выполняющей триггерную роль в системе тонических регуляций [8]. Устранение опоры приводит к снижению активности тонических двигательных единиц постуральных мышц и изменению порядка рекрутования двигательных единиц спинного мозга, что в конечном итоге приводит к развитию атонии и мышечной атрофии [135]. Множество экспериментов, проведенных с использованием пассивной или активной стимуляции опорных афферентов, показали целесообразность использования этого метода в поддержании функциональных свойств постуральных мышц [135, 139, 148, 176, 179]. Однако в этих исследованиях не было показано влияние опорной стимуляции на молекулярные механизмы определяющие анаболические процессы, происходящие в мышечном волокне.

Несмотря на фундаментальную зависимость развития и поддержания мышечной массы от механических стимулов, конкретные механизмы, с помощью которых механическая нагрузка преобразовывается в анаболический ответ (механотрансдукция) остаются неясными.

Цель и задачи исследования

Целью исследования является изучение механизмов реализации механического сигнала в системе регуляции синтеза белка в скелетной мышце млекопитающих на фоне гравитационной разгрузки

Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие **задачи**:

1. Провести анализ анаболических сигнальных путей, ответственных за анаболические процессы в скелетной мышце крысы на фоне разных сроков гравитационной разгрузки;
2. Провести анализ анаболических сигнальных путей, ответственных за синтез белка в скелетной мышце крысы после стандартной нагрузки *ex vivo* на фоне разных сроков гравитационной разгрузки;
3. Оценить влияние mechanochувствительных каналов на реализацию механического сигнала после стандартной нагрузки *ex vivo* на фоне гравитационной разгрузки;
4. Изучить роль опорной афферентации в поддержании стабильности анаболических процессов в постуральной мышце млекопитающих;
5. Исследовать реализацию механического сигнала при действии опорного стимула на фоне гравитационной разгрузки в постуральной мышце млекопитающих.

Положения, выносимые на защиту

1. Уменьшение синтеза белка в камбаловидной мышце крысы на ранних этапах гравитационной разгрузки сопровождается снижением активности Akt/GSK-3 β и MAPK/ERK сигнальных путей и повышением активности mTORC1 сигнального пути.

2. Снижение активности mTORC1 в ответ на механическую стимуляцию камбаловидной мышцы крысы после гравитационной разгрузки связано с функциональной инактивацией стретч-активируемых ионных каналов.

3. Динамическая опорная стимуляция стопы позволяет частично предотвратить снижение общего синтеза белка в камбаловидной мышце крысы на ранних сроках гравитационной разгрузки, а также повышает способность мышцы активировать анаболические процессы под действием механической нагрузки.

Научная новизна работы

1. При анализе динамики основных анаболических маркеров в постуральной мышце на ранних этапах гравитационной разгрузки на фоне повышенного фосфорилирования рибосомальной киназы p70S6K1 впервые обнаружено транзиторное снижение уровня фосфорилирования сигнальных ферментов 4E-BP1, GSK-3 β и p90RSK, что может быть одной из причин снижения эффективности трансляции в условиях разгрузки.

2. Впервые показан сниженный относительно контроля анаболический ответ постуральной мышцы на эксцентрическую нагрузку *ex vivo* (механо-анаболическая резистентность) при гравитационной разгрузке разной длительности.

3. На основе эксперимента с ингибитором стретч-чувствительных ионных каналов (SAC) – соли гадолиния – впервые показана инактивация SAC-зависимой анаболической сигнализации в постуральной мышце в условиях моделируемой гравитационной разгрузки.

4. Впервые показано влияние динамической опорной стимуляции стопы на анаболические сигнальные процессы внутри мышечного волокна на фоне кратковременной гравитационной разгрузки. Показано влияние опорной стимуляции на маркеры канонического сигнального пути IGF1/Akt/PKB/mTOR, а также изменения в фосфорилировании GSK-3 β и eEF2.

5. Впервые показано частичное предотвращение механо-анаболической резистентности постуральной мышцы, при использовании динамической стимуляции стопы на фоне кратковременной гравитационной разгрузки.

Научно-практическая значимость

Для эффективного противодействия заболеваниям, связанных с развитием мышечной атрофии от бездействия (disuse atrophy), необходимо исследовать молекулярные механизмы, приводящие к уменьшению мышечной массы. Анализ изменения синтеза белка в результате гравитационной разгрузки позволит расширить знания о природе функциональной и структурной перестройки мышечного волокна. При этом изучение молекулярных mechanosенсоров скелетной мышцы может в дальнейшем привести к разработке фармакологических препаратов, эффективно предотвращающих негативные последствия микрогравитации.

Изучение сигнальных механизмов, вовлеченных в реализацию опорной стимуляции является важным не только для фундаментальной науки, но также имеет и практический интерес, так как опорная стимуляция стоп может быть использована для создания новых форм профилактических воздействий, направленных на предотвращение атрофических последствий длительного пребывания человека в условиях невесомости. Глубокое понимание клеточных механизмов, отвечающих за механотрансдукцию скелетной мышцы, необходимо для развития эффективных методов борьбы с мышечной

атрофией с помощью создания комплексов упражнений и фармакологических препаратов. Таким образом, полученные в работе данные могут найти приложение в космической и реабилитационной медицине.

Публикации

По теме диссертации работы опубликовано 6 статей в журналах, рекомендованных ВАК, 14 тезисов докладов конференций, в том числе международных.

Апробация работы

Основные результаты и положения диссертационной работы были представлены на: XVI Конференции по космической биологии и медицине с международным участием, школа молодых ученых, 5-8 декабря 2016 года (Москва); 46^ой Европейской Мышечной Конференции, 19-22 сентября, 2017г (Потсдам, Германия); Международной конференции "Клеточная биология: проблемы и перспективы", 2-6 октября 2017 года (Санкт-Петербург); XVII Конференции молодых ученых, специалистов и студентов, посвященной 100-летию со дня рождения академика О.Г. Газенко, 10-12 декабря, 2018г (Москва); 39-м ежегодном симпозиуме международного общества гравитационной физиологии (39th Annual Meeting of the ISGP), 18-22 июня, 2018г (Нордвейк, Нидерланды).

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 130 страницах,

содержит 38 рисунков, 8 таблиц и список цитируемой литературы из 265 источников.

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Воздействие реальной или моделируемой микрогравитации на скелетную мышцу

Приблизительно 40% от массы тела человека составляет скелетная мускулатура. Масса и состав скелетной мышцы критичны для ее функций и могут меняться исходя из нагрузки, активности или патологических состояний. Продолжительные периоды неактивности мышцы в результате денервации [168], иммобилизации [242], гравитационной разгрузки [239] могут привести к серьезной мышечной атрофии – сложному процессу, для которого свойственно снижение поперечного сечения мышцы, содержания белка, мышечной силы и повышение ее утомляемости [262]. Развитие мышечной атрофии от бездействия зависит от множества факторов: возраста, физиологической функции и типа мышечных волокон, длительности функциональной разгрузки или инактивации. Гравитационной атрофии, которая развивается в результате снижения сократительной активности и напряжения мышц, подвержены больше всего медленные постуральные мышцы, такие как камбаловидная и длинная приводящая мышца, а также экстензоры в большей мере, чем флексоры [204]. При этом в медленных мышцах наравне с атрофией происходит изменение мышечного фенотипа от медленного к быстрому [22].

На молекулярном уровне в скелетной мышце снижается синтез белка и увеличивается его распад [21, 28]. Для атрофических процессов наиболее характерно снижение белков миофибриллярной фракции [177], которая составляет по крайней мере 60% от общего объема белка в мышце. Изменяется паттерн экспрессии ряда ключевых регуляторных (SERCA, тропонины), сократительных (миозин) и структурных белков (титин, небулин). Эти

эффекты были зафиксированы для разных мышц и в разных моделях [22, 29, 60, 183].

1.2 Экспериментальные модели, используемые для изучения эффектов микрогравитации и механотрансдукции на скелетную мышцу

Исследование гравитационной разгрузки постуральных мышц может проводиться как во время космических полетов [61, 86], так и с использованием наземных имитационных моделей антиортостатической гипокинезии [205] и сухой иммерсии [9] в эксперименте на человеке, и антиортостатического вывешивания задних конечностей в экспериментах на грызунах [115, 175]. В первые часы и дни космического полета, постуральные мышцы голени (прежде всего камбаловидная мышца, содержащая до 85% волокон окислительного типа), а также мышцы спины и шеи теряют жесткость и упругость [2, 6, 60].

Существуют различные *in vivo* и *in vitro* модели для изучения путей, с помощью которых механический сигнал воспринимается и обрабатывается мышечным волокном. Одни модели используются для увеличения нагрузки на мышцу (удаление синергиста, электрическая стимулация, растяжение клеток в культуре), другие, напротив, уменьшают нагрузку – разгружают мышцу (иммобилизация конечностей, антиортостатическое вывешивание, денервация). Ответ мышцы на механический стресс сильно зависит от методики эксперимента.

Существуют данные о том, что эксцентрические сокращения значительно сильнее активируют анаболический сигналинг по сравнению с концентрическими сокращениями [56, 178]. Различия могут быть опосредованы тем, что эксцентрические сокращения дополнительно создают нагрузку растяжения, а значит активируют различные mechanосенсоры мышечного волокна.

Помимо типа механостимуляции, важную роль может играть интенсивность и длительность стимуляции. Было показано, что аэробная нагрузка способна запускать специфический адаптивный ответ, не активируя mTOR и p70S6k. При этом силовая нагрузка, напротив, вызывала сильную активацию mTOR сигналинга [15]. Кроме того, другая группа, использовавшая тот же тип стимуляции, но другую модель, не зафиксировала таких отличий [178]. В случае с повышенной нагрузкой на мышцу синтез белка инициируется механическим стимулом, а далее регулируется дополнительным анаболическим стимулом. IGF-1 является общепризнанным активатором синтеза белка через PI3K/Akt/mTOR сигнальный путь [26, 201]. Тем не менее, IGF-1 опосредованная активация сигналинга является поздним компонентом гипертрофического процесса [101, 102]. Также, стоит заметить, что активация синтеза белка на ранних этапах не всегда может зависеть от активации PI3K/Akt и mTOR [109, 111]. Тем самым, изучение mechanotransduction острого ответа может быть более подходящим, по сравнению с ответом мышцы на хроническую нагрузку.

Следует также учитывать, что у разных мышц разное соотношение типов волокон, а значит они имеют разные метаболические и сократительные свойства. Волокна «медленного» типа более устойчивы к утомлению и способны осуществлять сокращения большей длительности, но обладают пониженной максимальной силой и скоростью сокращения. Волокна «быстрого» типа обладают высокой скоростью и силой сокращения, но более высокой утомляемостью. Например, камбаловидная мышца (*m.soleus*) является тонической и постуральной, с преобладающим содержанием волокон «медленного» (окислительного) типа, и специфическим ответом на механическую нагрузку [249]. Это может свидетельствовать о существовании разных механосенсоров для быстрых и медленных волокон, или же о существовании разных сигнальных путей, отвечающих за передачу механического сигнала [106].

1.3 Механосенсорные молекулы

Живые клетки постоянно подвергаются механическим стимулам, возникающим в окружающем их внеклеточном матриксе (ECM) или в соседних клетках. Внутриклеточные молекулярные процессы, с помощью которых эти физические сигналы преобразуются в биологический ответ, принято называть механотрансдукцией, фундаментальной функцией которой является временная адаптация клеток к постоянно изменяющемуся микроокружению. Локальные изменения в составе и механике ECM управляются по механизму прямой связи между клеткой (накопление ECM белков) и матриксом. Таким образом, эти изменения происходят регулярно в ходе развития ткани и являются отличительным признаком различных физиологических и патологических состояний. Однако, только недавно, была признана важность механических сигналов в контроле клеточных функций (пролиферация, дифференцировка, миграция) [14, 38, 87, 134].

Механосенсорные молекулы были открыты в 1983 году в скелетной мышце цыпленка [92, 93], а также, позднее, в ооците шпорцевой лягушки [166]. После этого, механосенсорные каналы были обнаружены в клетках всех царств живых организмов [207].

Все организмы, а также все типы клеток, могут ощущать и отвечать на механический стимул [138]. Природа и степень молекулярного ответа на механическое воздействие может значительно изменяться, а посттрансляционные модификации [94, 212], внутриклеточная транслокация [54, 97] и изменение третичной структуры белков [50], создание новых взаимодействий [114] считаются отличительными признаками механической чувствительности. Все эти явления могут быть зафиксированы при передачи механических сигналов от ECM к ядру. Разные механосенсорные каналы способны генерировать электрический сигнал или создавать поток ионов в ответ на внешний или внутренний раздражитель [100, 231]. В условиях сильного внутреннего осмотического давления в бактериальной клетке,

неселективные механосенсорные каналы, такие как MSCL и MSCS служат в качестве предохранительного вентиля, который снижает тургорное давление. В высокоспециализированных клетках высших организмов, другие механосенсорные каналы отвечают за восприятие прикосновения, звуковых сигналов. Считается, что механосенсорные молекулы ощущают локальное изменения напряжения липидного бислоя, в противовес ощущению давления [159]. Для того, чтобы признать белок механосенсорным, необходимо показать его ответ на деформацию (растяжение, искривление) мембранны, цитоскелета или внеклеточного матрикса. Механосенсорные каналы отвечают на напряжение мембранны, изменяя свою конформацию (открытое состояние, закрытое состояние) [106, 233]. Механосенсорные ионные каналы в ответ на раздражение активируют специализированные сенсорные клетки, например, волосковые клетки и некоторые сенсорные нейроны кожи [58, 71].

Стретч-активируемые ионные каналы (SAC) используются для формирования первичного потенциала действия после механического стимула, например, в вибриссах. Афферентные нервные волокна, которые отвечают за сенсорные стимулы, особенно чувствительны к стимуляции. Это осуществляется за счет специализированных механорецепторных клеток, в которых расположены SAC. Эти каналы снижают порог для потенциала действия, делая афферентные нервные волокна более чувствительными к стимуляции. SAC отвечают за множество функций в клетках млекопитающих. В клетках кожи они участвуют в ощущении вибрации, давления, растяжения, прикосновения [51, 186]. Они экспрессируются в клетках рецепторов вкуса, слуха, обоняния, зрения [189, 255], а также регулируют внутренние функции клеток - осмотическое давление, кровяное давление вен и артерий, электрофизиологические и сократительные показатели сердца [189]. SAC были также обнаружены в клетках, отвечающих за баланс и проприоцепцию.

У каналов, которые ранее обозначались как "потенциал" и "лиганд" активируемыми, была тоже обнаружена механочувствительная функция. Тем не менее, механический стресс воздействует на разные каналы по-разному.

Работа потенциал- и лиганд-активируемых каналов может быть незначительно изменена под воздействием механического стресса, что повлияет на их проницаемость [206].

1.3.1 Механизм работы стретч-чувствительных каналов

К настоящему времени механосенсорные каналы подразделяют на 4 группы: каналы транзиентного рецепторного потенциала (transient receptor potential channel - TRPC), калиевые каналы с двухпоровым доменом (two-pore-domain potassium channel - K2P), эпителиальные натриевые каналы (DEG/ENaC) и Piezo каналы [38, 45, 46, 73, 191, 263]. Несмотря на значительные различия в кинетике, ионной проницаемости и чувствительности к растяжению, существует множество сходных параметров для всех классов SAC. Во всех SAC механический стимул увеличивает вероятность открытия каналов, не изменяя значительно их проводимость и ионную специфичность. Стретч-активация является специфичным для мембраны явлением – она не подразумевает, например, участие растворимых в цитозоле вторичных мессенджеров или находящихся в нем дополнительных каналов. Доказательством этого служит тот факт, что SAC проявляют свою активность вне клетки, в пэтч-системе на изолированной мембране, где исключено влияние вторичных мессенджеров и включение дополнительных каналов в растянутую мембрану [208].

Тем не менее существует два типа SAC, между которыми есть существенные отличия: непосредственно механочувствительные каналы, на которые напрямую действуют деформации мембранны, а также каналы, которые открываются под воздействием вторичного мессенджера, высвобожденного механосенсорным каналом [51]. Также было обнаружено два механизма для активации механочувствительных каналов: за счет механических деформаций клеточной мембранны (прокариотические клетки) или же за счет натяжения внеклеточного матрикса или цитоскелета,

связанного с каналами (специализированные клетки эукариот). Напряжение в этих структурах может повлиять на открытие SAC (*Рис.1*) [51, 154].

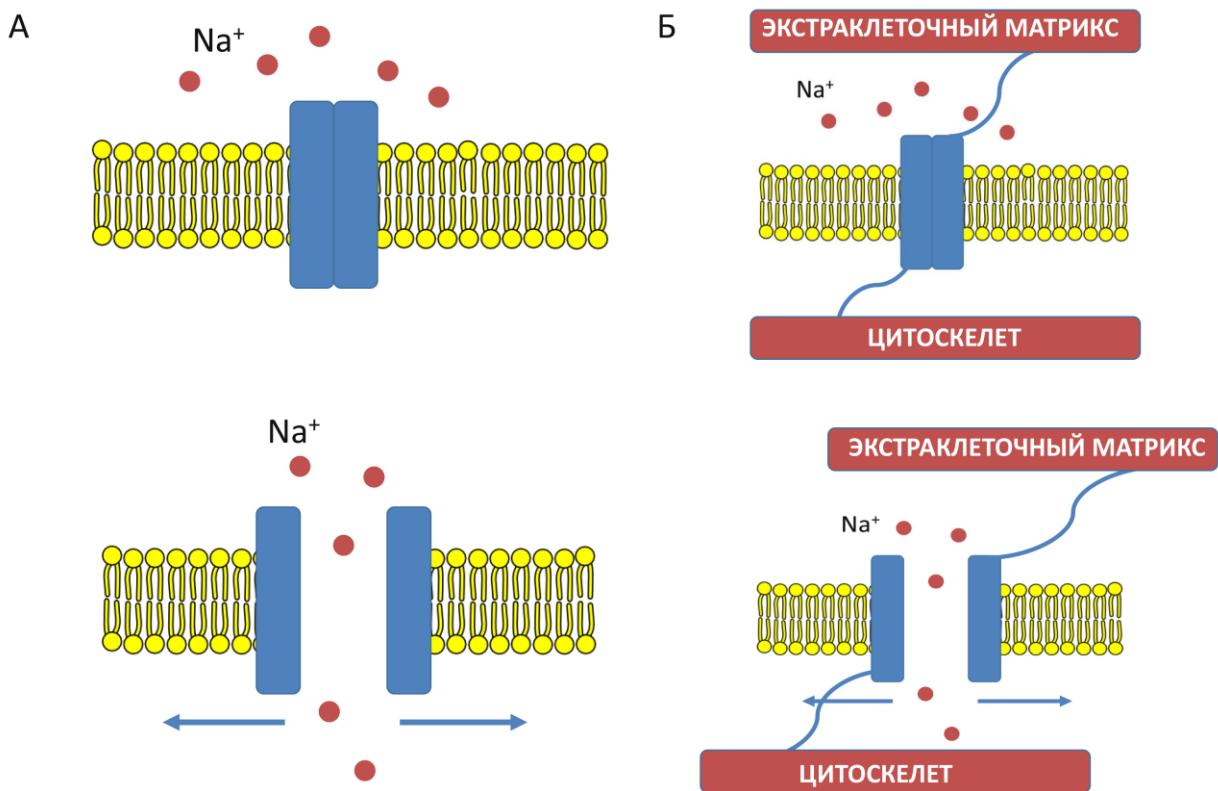


Рис.1 Два механизма активации механосенсорного канала: А – активация с помощью растяжения мембраны; Б – активация с помощью растяжения цитоскелетных структур (адаптировано из Del Valle et al. [51])

Рядом авторов была продемонстрирована взаимосвязь функции и работы SAC с цитоскелетом мышечных клеток. С помощью силовой спектроскопии отдельной молекулы было показано, что отдельные участки белков цитоскелета перестраивают свою структуру после механического растяжения SAC [169]. Кроме того, для катионных каналов, входящих в семейство TRPC (белки SAC вероятнее всего относятся к этому семейству [224, 228]) было показано взаимодействие с белками анкирином и дистрофином [169, 244]. Существует большой объем данных, свидетельствующих о том, что перестройка цитоскелета является важным регулятором активности SAC в разных типах клеток [66, 122, 129, 226]. На

C2C12 миобластах было показано, что формирование четко структурированного взаимодействия цитоскелета и мембранны клеток через фокальные контакты связано с увеличением жесткости этих клеток под воздействием S1P (сфингозин-1-фосфат) [213]. Это согласуется с ранее полученными данными о понижении эластичности плазматической мембранны после повышения плотности актина на поверхности клеток [130, 160]. С помощью блокирования блеббистатином актомиозинового взаимодействия в стресс-фибриллах, была продемонстрирована их роль в поддержании стабильности плазматической мембранны, подверженной пассивным деформациям [213]. Тем самым, можно предположить, что на функцию SAC влияет формирование и натяжение стресс-фибрилл и других цитоскелетных структур.

1.3.2 Механосенсорные молекулы и пути передачи механического сигнала в скелетной мышце

На данный момент, в литературе обсуждаются несколько потенциальных молекул, которые могут являться механосенсором скелетной мышцы или участвовать в передаче механического сигнала: SAC [68, 162, 163, 223, 253], дистрофин-гликопротeinовый комплекс и нейрональная NO-синтаза [10, 234], интегрины и комплексы фокальных контактов [62, 222], саркомерные белки [72, 190]. Однако, роль каждой из этих молекул недостаточно определена, а также существует вероятность, что скелетная мышца использует сигнал, полученный от нескольких механосенсоров одновременно.

SAC были изначально описаны в скелетной мышце [68]. SAC скелетной мышцы являются проницаемыми для ионов Na^+ и Ca^{2+} , а вероятность открытия поры повышается с растяжением мембранны. Использование блокаторов SAC (хлорида гадолиния и стрептомицина) показало, что эти каналы в условиях эксцентрического сокращения, активируют Akt/mTOR

сигнальный путь [33, 223]. Однако, при этом ни стрептомицин, ни хлорид гадолиния полностью не предотвращали активацию Akt/mTOR сигнального пути [33], что может говорить о том, что существуют и другие молекулы, регистрирующие механический сигнал и поддерживающие синтез белка.

В скелетной мышце механический сигнал может также частично передаваться комплексами фокальных контактов (FAC). Клетки воспринимают напряжение в первую очередь клеточной мембраной, которая непосредственно контактирует с ECM, и образуют при контакте с жесткой поверхностью дискретные мультипротеиновые комплексы под цитоплазматической мембраной. Эти комплексы были названы фокальными контактами (*focal adhesions*, FA) и являются основным местом взаимодействия клеток и ECM. Механочувствительность FA заключается в фиксировании и передаче механических сигналов, возникающих во внеклеточной среде, к цитоскелету. Поэтому, FA представляют собой комплексы, состоящие из трансмембранных и внутриклеточных структур. Внутриклеточная часть FA состоит из цитоскелетных, стыковочных и сигнальных белков, которые могут выступать в качестве интерфейса между трансмембранным компонентом, непосредственно соединенным с ECM (интегрины) и актиновым цитоскелетом. Молекулярный состав FA чрезвычайно вариативен и зависит от состава и механических свойств ECM, которые фиксируются через связь с интегринами. Более того, различная группировка интегринов, предопределенная расположением и возможностью создания соединений с ECM, влияет на задействование различных белков в создании структуры FA [215]. Исходя из сложности структуры FA и количества включенных в них белков, невозможно рассматривать FA как единую mechanosensorную структуру.

Уровень механического напряжения в районе конкретной FA напрямую коррелирует с размером адгезии, то есть с количеством задействованных стыковочных, структурных и функциональных белков [77]. Фокальные адгезии динамически перестраиваются исходя из сборки трансмембранных

белков, которые непосредственно взаимодействуют с компонентами ECM, а именно с фибронектином, витронектином, коллагеном, ламининами, а также интегринами. Интегрины являются гетеродимером, состоящим из α - и β -субъединиц (для млекопитающих комбинация 24 α - и 9 β -субъединиц), чья сборка регулируется методом альтернативного сплайсинга и определяется составом ECM. Комбинация α - и β -субъединиц определяет аффинность интегринов к компонентам ECM и является специфичной для разных клеток. Аффинность интегрина к его лиганду может регулироваться как внутри клетки с помощью процесса, называемого «inside-out signalling», так и внешним механическим воздействием, запускающим молекулярную перестройку [41]. В результате этих событий компоненты интегринов активируются, ассоциируются и усиливают молекулярное взаимодействие клетки с внеклеточным пространством [184, 229]. Внеклеточный домен интегринов взаимодействует с ECM, в то время как цитоплазматический участок взаимодействует с цитоскелетным актином через несколько стыковочных белков, формирующих ядро фокального контакта. Состав ECM влияет на экспрессию конкретных компонентов интегринов, что, наряду с действованием различных сигнальных каскадов, вызывает специфический клеточный ответ [216]. Beta-1 интегрин, входящий в FAC, связан с тирозинкиназой фокальных контактов (FAK) и паксиллином [36, 62], тем самым FAK способна передавать механический сигнал от интегринов к сигнальным путям, отвечающим за клеточный рост. Киназа фокальной адгезии (FAK) является одной из первых молекул FA, которая задействуется в передаче внешнего механического сигнала. Ее активация в результате автофосфорилирования запускает внутриклеточный mechanозависимый сигналинг [141]. Внутриклеточные сигналы, такие как сокращение цитоскелета или растяжение клетки, могут усиливать активацию FAK по механизму прямой связи, таким образом фосфорилирование FAK за счет приложенных внешних сил может модулироваться внутриклеточными процессами [167]. Взаимодействие между FAK и сократительными

структурами цитоскелета строго контролируется с помощью поддержания необходимого напряжения в определенных местах клетки, а также передачей механического сигнала до клеточного ядра [264]. Например, в ходе процесса изменения полярности клетки и деформации ядра (направленная клеточная миграция), FAK активируется в определенных частях клетки, способствуя локальной реорганизации цитоскелета и сжатию ядра [127]. FAK-механозависимый сигналинг изучался с помощью математического моделирования молекулярного взаимодействия, что продемонстрировало возможность FAK спонтанно самостоятельно настраивать свою чувствительность, исходя из жесткости субстрата [23]. Увеличение механической нагрузки приводит к увеличению содержания FAK и паксиллина, а также к увеличению автофосфорилирования FAK (тир-397) [62]. Как на животных моделях [62, 85, 133], так и в экспериментах на людях [76, 147, 238] был показан четкий ответ FAK как на повышенную нагрузку, так и на разгрузку. Существуют данные, показывающие взаимосвязь FAK и фосфоинозитол-3 киназой (PI3K). Сигнальный путь PI3K включает в себя протеинкиназу В (Akt), mTOR и рибосомальную киназу p70S6K. Фосфорилирование FAK по тирозину 397 приводит к связыванию этой молекулы с SH2 доменом 85 кДа субъединицы PI3K, что, в свою очередь, может привести к повышению активности PI3K [40], а значит к повышению активности всего сигнального пути PI3K/Akt/p70S6K (*Рис.2*). FAK также способна модулировать активность mTOR через ингибирование фосфорилирования комплекса туберозного склероза 2 (TSC2), которое приводит к дестабилизации и протеолитическому расщеплению TSC2 [69]. TSC2 в свою очередь является негативным регулятором mTOR, воздействуя на него через Rheb [113, 261].

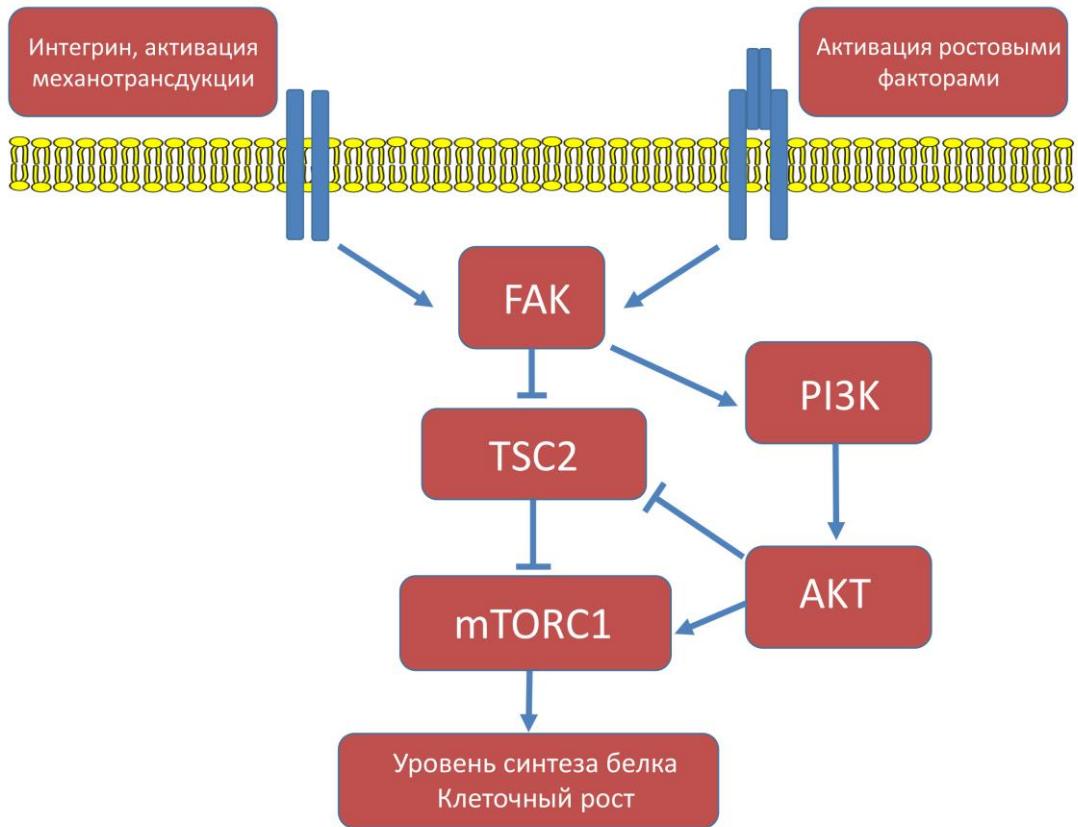


Рис.2 Влияние FAK на анаболические сигнальные пути в мышечном волокне (адаптировано из Graham et al. [88]). FAK – киназа фокальных контактов; TSC2 – комплекс туберозного склероза 2; mTORC1 – mTOR комплекс 1; Akt – протеинкиназа B; PI3K – фосфоинозитид-3-киназа

Внутри саркомера также потенциально существуют структуры, преобразовывающие механический сигнал. Взаимодействие актиновых и миозиновых филаментов в области М- и Z-диска обусловлены гигантским белком титином [140], молекула которого тянется вдоль половины длины саркомера, N-терминальный участок Z-диска и С-терминальный участок М-линии связаны, соответственно, с Z-диском и М-диском саркомера. N-терминальный участок титина выступает в качестве эластичного компонента молекулы, в то время как С-терминальный участок выполняет управляющую функцию и содержит участки с киназной активностью. Существуют данные, показывающие, что активирование титинкиназной активности может происходить за счет механического анфолдинга С-терминального автоингибиторного конца титина. Механическая модуляция, следовательно,

может дать возможность цитоскелетным сигнальным белкам выступать в роли механосенсоров [72, 185]. В исследовании на диафрагме мышей, у которых с помощью генетических модификаций варьировалась жесткость титина, было также показано, что связанные с титином механосенсоры способны модулировать уровень гипертрофии мышечных волокон после пассивного растяжения [243]. С помощью моделирования механических молекулярных свойств титина, было показано, что механическое напряжение способно вызывать конформационные изменения в киназном домене титина и тем самым регулировать его каталитическую активность [89, 193]. Однако, в недавней работе, основанной на фосфопротеомном исследовании механического ответа скелетной мышцы на механическую нагрузку, было показано, что основные изменения в фосфорилировании белков происходят в районе Z-диска [190]. При этом, киназный домен титина расположен ближе к середине саркомера [181], что, вероятно, не позволяет ему непосредственно влиять на молекулы Z-диска. Однако, с помощью фосфопротеомного анализа было также обнаружено, что серьезные изменения в фосфорилировании претерпевают 2 других гигантских молекулы Z-диска: обскурин и SPEG, киназные домены которых как раз ассоциированы с Z-диском [190].

Кроме того, в качестве потенциального механосенсора скелетной мышцы, может выступать периферический член дистрофин-гликопротеинового комплекса сарколеммы – нейрональная NO-синтаза (nNOS) – фермент, отвечающий за продукцию газа – оксида азота (II). Содержание этого фермента наиболее велико в местах перехода мышцы в сухожилия [39], то есть там, где усилие передается от мышцы к кости. Экспрессия и активность nNOS повышаются после физических упражнений [199], механической нагрузки, электрической стимуляции и пассивного растяжения [195, 240]. Было показано, что ингибирование nNOS с помощью L-NAME при хронической функциональной перегрузке (overload) снижает накопление мышечной массы [219, 220]. Существуют данные, показывающие,

что оксид азота (NO) высвобождается из мышечных волокон при растяжении *in vitro*, при этом активируя сателлитные клетки [237].

1.4 Ключевая роль mTORC1 в реализации механического сигнала

Задолго до открытия mTOR (mammalian Target Of Rapamycin) был обнаружен его ингибитор – антибиотик рапамицин. Его выделили из бактерии рода стрептомицеты, найденной в образцах почвы с острова Пасхи. Свойства этого вещества позволили использовать его в качестве иммунносупрессора и химиотерапевтического агента. Несколько позже после обнаружения рапамицина, исследователи провели генетический скрининг генов пекарских дрожжей, выделив 2 гена – TOR1 и TOR2, мутации в которых снижали воздействие рапамицина на рост клеток. Было установлено, что эти гены отвечают за экспрессию двух протеинкиназ – TOR1 и TOR2. Таким образом, белок, функционирование которого в клетке подавляется рапамицином назвали мишенью рапамицина, гомолог которого позже был обнаружен и у млекопитающих [42]. mTOR является консервативной серин\ треонин киназой, которая входит в два мультипротеиновых комплекса: mTOR комплекс 1 (mTORC1), который ингибируется рапамицином, и mTOR комплекс 2 (mTORC2), не чувствительный к рапамицину [143]. mTORC1 является важным регулятором клеточного роста, регулятором трансляции мРНК, а, следовательно, и белкового синтеза. Соответственно, mTORC1 способен оказывать влияние как на трансляционную эффективность (интенсивность трансляции мРНК), так и на трансляционную емкость (количество рибосом) [158]. Примечательно, что в скелетной мышце на разных моделях (культура клеток, целая мышца *in vivo* и *ex vivo*) была показана активация mTORC1 сигналинга различными типами механических стимулов [79]. Кроме того, было показано, что *in vivo* активация mTORC1 сигналинга необходима для повышения синтеза белка, а также запускает гипертрофию мышечных волокон [81, 82]. Тем не менее, несмотря на надежные доказательства участия mTORC1

в активации клеточного роста механическими стимулами, идентификация вышележащих механизмов, ответственных за механическую активацию mTORC1 остается сложной задачей.

1.4.1 Предполагаемые активаторы mTORC1 сигналинга

Одной из самых первых молекул, которую стали рассматривать в качестве кандидата на роль активатора mTORC1, был инсулиноподобный ростовой фактор 1 (IGF-1). IGF-1 в организме человека представлен несколькими сплайс-вариантами – IGF-I Ea, IGF-I Eb и IGF-I Ec, первый из которых является системной формой, синтезирующейся в печени, а две другие изоформы продуцируются скелетной мышцей в ответ на механические стимулы или повреждения. Проведенные исследования показали, что экспрессия IGF-1 (а также его сплайс варианта – MGF-1, который действует в качестве аутокринного регулятора) увеличивалась после механической нагрузки [102, 165, 252]. Оверэкспрессия IGF-1 также является достаточной для активации PI3K/Akt/mTORC1 сигналинга (*Рис. 3*), повышения синтеза белка и развития мышечной гипертрофии [43, 96, 174]. Тем не менее, хотя IGF-1 играет значительную роль в накоплении и поддержании мышечной массы [150], текущие данные не позволяют сказать, что IGF-1 участвует в реализации механического сигнала и является необходимым для развития гипертрофии, вызванной механическим сигналом, по крайней мере в остром периоде [79]. Таким образом, для более полного понимания возможного участия IGF-1 в реализации механического сигнала на раннем и более позднем этапах активации mTORC1 сигналинга необходимы дополнительные исследования.

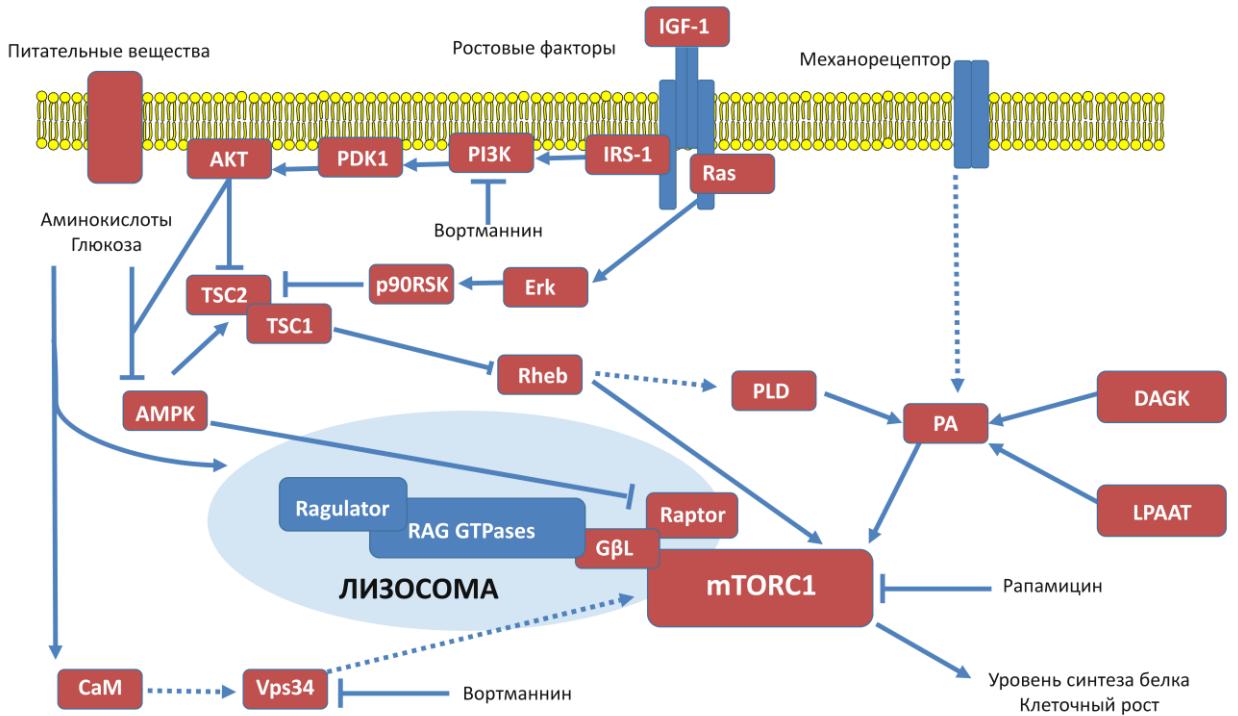


Рис.3 Схематическое изображение основных механизмов, регулирующих mTORC1 сигналинг (адаптировано из Hornberger [108]). IGF-1 - инсулиноподобный фактор роста 1; IRS-1 - субстрат инсулинового рецептора; Akt/PKB – протеинкиназа B; PDK-1 – фосфоинозитид-зависимая киназа 1; PI3K – фосфоинозитид-3-киназа; TSC2 – комплекс туберозного склероза 2; Rheb – RAS-гомолог распространенный в мозге; PLD1 – фосфолипаза D1; PA – фосфатидная кислота; DAGK – диацилглицерол киназа ζ ; LPAAT - ацетилтрансфераза лизофосфатидной кислоты; AMPK – АМФ-активируемая протеинкиназа; Ragulator-Rag – гетеромерный комплекс связывания mTOR и лизосомы; Raptor – регуляторно-связанный белок mTOR; mTORC1 – mTOR комплекс 1; CaM – кальмодулин; Vps34 - фосфоинозитид-3-киназа III класса

Другим потенциально возможным механически-зависимым регулятором mTORC1 сигналинга и мышечной массы является внеклеточная сигнал-регулируемая киназа 1 и 2 (ERK1/2). Эти белки являются членами семейства митоген-активируемых белков (MAPK) и входят в Ras/Raf/MEK/ERK1/2 сигнальный путь, а также активируются различными

типами механических стимулов, что показано как на клеточных культурах, так и на грызунах и людях *in vivo* [52, 161, 236]. ERK1/2-регулируемый сигналинг потенциально может позитивно влиять на синтез белка, в том числе через активацию mTORC1 через p90RSK зависимое фосфорилирование TSC2 и Raptor [35, 65, 156, 202]. Однако, было показано, что ингибиование ERK1/2 не предотвращало развитие гипертрофии культуры миотуб после растяжения [210]. Более того, в то время как ингибиование ERK1/2 понижало базальный уровень mTORC1 сигналинга, оно не уменьшало активацию mTORC1 сигналинга после растяжения изолированной мышцы мыши [258]. Тем самым, роль ERK1/2 в реализации механического сигнала остается неясной и требует дальнейших исследований на разных моделях.

В настоящее время большое внимание уделяется глицерофосфолипидному вторичному мессенджеру – фосфатидной кислоте (PA), поскольку она является прямым активатором mTORC1. PA соединяется с FKPB12-рапамицин связывающим доменом mTOR [59, 256]. Исследования показали, что стимулирование клеток экзогенной PA, или же оверэкспрессия PA-синтезирующих белков, таких как фосфолипаза D1 (PLD1), ацетилтрансферазы лизофосфатидной кислоты (LPAAT) и диациглицерол киназы ζ (DGK ζ), активировало mTORC1 сигналинг [17, 67, 180, 235]. Более того, оверэкспрессия PLD1 и DGK ζ была достаточной, чтобы вызвать гипертрофию в скелетной мышце мыши [120]. При этом, механическая стимуляция скелетной мышцы (пассивное растяжение, эксцентрические сокращения) повышали содержание внутримышечной PA [180]. Дальнейшие исследования роли PA в реализации механического сигнала показали, что участие PLD1 не является необходимым в увеличении количества PA [120], однако, активность DGK ζ повышалась в результате растяжения миотуб в культуре. У DGK ζ -нокаутных мышей наблюдалось серьезное снижение активации mTORC1 сигналинга [258]. Эти данные указывают на то, что DGK ζ является основным источником PA в результате воздействия механического сигнала, а значит является основным активатором mTORC1 сигналинга и

белкового синтеза. Для того, чтобы понять, как механосенсорные молекулы непосредственно взаимодействуют с DGK ζ для передачи механического сигнала, требуется провести дополнительные исследования с использованием разных моделей механической стимуляции.

Частью канонического сигнального пути инсулин/IGF-1 являются 2 молекулы: комплекс туберозного склероза 2 (TSC2) и Ras гомолог распространенный в мозге (Rheb) [112], который способен непосредственно влиять на активность mTOR [152, 211]. При этом, GAP домен TSC2 в базальных условиях способен стимулировать ГТФазную активность Rheb, что приводит, в конечном итоге, к подавлению mTORC1 сигналинга [117]. В скелетной мышце оверэкспрессия Rheb является достаточной для активации mTORC1 сигналинга, увеличения синтеза белка и усиления гипертрофии мышечных волокон [82]. Существуют данные о том, что серия эксцентрических сокращений приводила к диссоциации TSC2 и поздних эндосомальных/лизосомальных структур (LEL), на мемbrane которых сконцентрированы mTORC1 и Rheb [121], а также комплекс Ragulator-Rag. Таким образом, TSC2 потенциально теряет возможность ингибировать mTORC1 сигналинг вследствие разобщения с Rheb. Тем не менее, роль TSC2 и Rheb в реализации механического сигнала остается слабо изученной. Несколько, влияет ли разобщение TSC2 и Rheb на последующий синтез белка, а также какие структуры запускают этот процесс.

Работа скелетной мышцы приводит к увеличению содержания ионов Ca^{2+} внутри волокна за счет выброса кальция саркоплазматическим ретикулумом, а также за счет работы стретч-чувствительных каналов [13, 68]. Существуют данные, показывающие что на работу mTORC1 сигналинга позитивно влияет повышение ионов Ca^{2+} внутри волокна и наоборот [44, 90, 95]. Этот механизм осуществляет свою работу через взаимодействие кальмодулина (CaM) и Р13К III класса - Vps34, которая способна воздействовать на работу mTORC1 сигналинга [95]. Увеличение концентрации ионов кальция также приводило к увеличению синтеза белка в

изолированной, покоящейся скелетной мышце [128]. Было показано, что *in vivo* ингибирование стретч-чувствительных кальциевых каналов с помощью соли гадолиния (Gd^{3+}) предотвращало активацию mTORC1 сигналинга после эксцентрических сокращений [221, 223]. Тем не менее, использование хелатора кальция – ВАРТА-АМ – не повлияло на стретч-зависимую активацию mTORC1 в изолированной мышце [109].

Еще одним хорошо известным регулятором mTORC1 сигналинга являются аминокислоты с разветвлённой боковой цепью (валин, лейцин, изолейцин), недостаток данных аминокислот приводит к снижению активности mTORC1, тогда как достаточное их количество увеличивает активность mTORC1 [123]. Существуют работы, показывающие, что аминокислоты регулируют ассоциацию mTOR и LEL [209, 265], а также свидетельствующие о повышенном содержании лейцина в скелетной мышце после силовой нагрузки [157]. При этом, ассоциация mTORC1 с LEL осуществляется с помощью Ragulator-Rag комплекса, который является чувствительным к содержанию аминокислот в клетке [143]. Тем не менее, существуют работы показывающие и обратный эффект – понижение содержания лейцина при повышенном mTORC1 сигналинге [47]. Кроме того, есть данные, показывающие необходимость наличия незаменимых аминокислот для высокой активации синтеза белка при введении аминокислот с разветвленной цепью [91, 251].

Обобщая вышеизложенные данные, можно сказать об относительном вкладе каждого активирующего mTORC1 фактора в реализацию механического сигнала, который будет определяться типом, длительностью и интенсивностью нагрузки, а также временем, прошедшим после нагрузки.

1.5 Влияние механической разгрузки на анаболические сигнальные системы и синтез белка

Хорошо известно, что сниженный синтез белка в скелетной мышце наиболее сильно влияет на развитие атрофии [25]. Снижение базального уровня синтеза белка в ранний период разгрузки был изучен на человеке и животных моделях [19, 30, 49]. Многие данные указывают на ключевую роль сигнального пути Akt/mTORC1 в снижении белкового синтеза в условиях разгрузки [26, 75, 201].

В нормальных физиологических условиях сигнальный путь IGF-1/Akt /mTORC1 выступает в качестве регулятора инициации трансляции в скелетной мышце [57, 104]. Начальная инициация этого сигнального пути происходит за счет связывания IGF-1 с его специфическим рецептором (IGF-1R) (*Рис.4*), который запускает сигнальный каскад, приводящий к фосфорилированию субстрата инсулинового рецептора 1 (IRS-1). Последующая активация фосфатидилинозитол-3-киназы (PI3K) может быть достигнута с помощью связывания p85 регуляторной единицы с фосфорилированным IRS-1 [124]. Фосфатидилинозитол-3-fosfat далее взаимодействует с фосфоинозитид-зависимой протеинкиназой 1 (PDK1), которая фосфорилирует протеинкиназу B (Akt). Фосфорилированная Akt далее активирует mTORC1 [82, 118, 173]. Активированный mTORC1 фосфорилирует 2 молекулы: 4E-связывающий фактор 1 (4E-BP1) и рибосомальную киназу 70 (p70S6k), что и приводит к увеличению синтеза белка [84]. Помимо основного пути, Akt способна также фосфорилировать киназу гликоген-синтазы (GSK-3 β) по Ser9, что может приводить к увеличению синтеза общего белка через фактор инициации трансляции 2B (eIF2B) [247]. Кроме того, GSK-3 β способен фосфорилировать важный цитоскелетный белок десмин, а также компонент фокальных контактов β -катенин, что в дальнейшем приводит к их разрушению в протеосоме [18, 225].

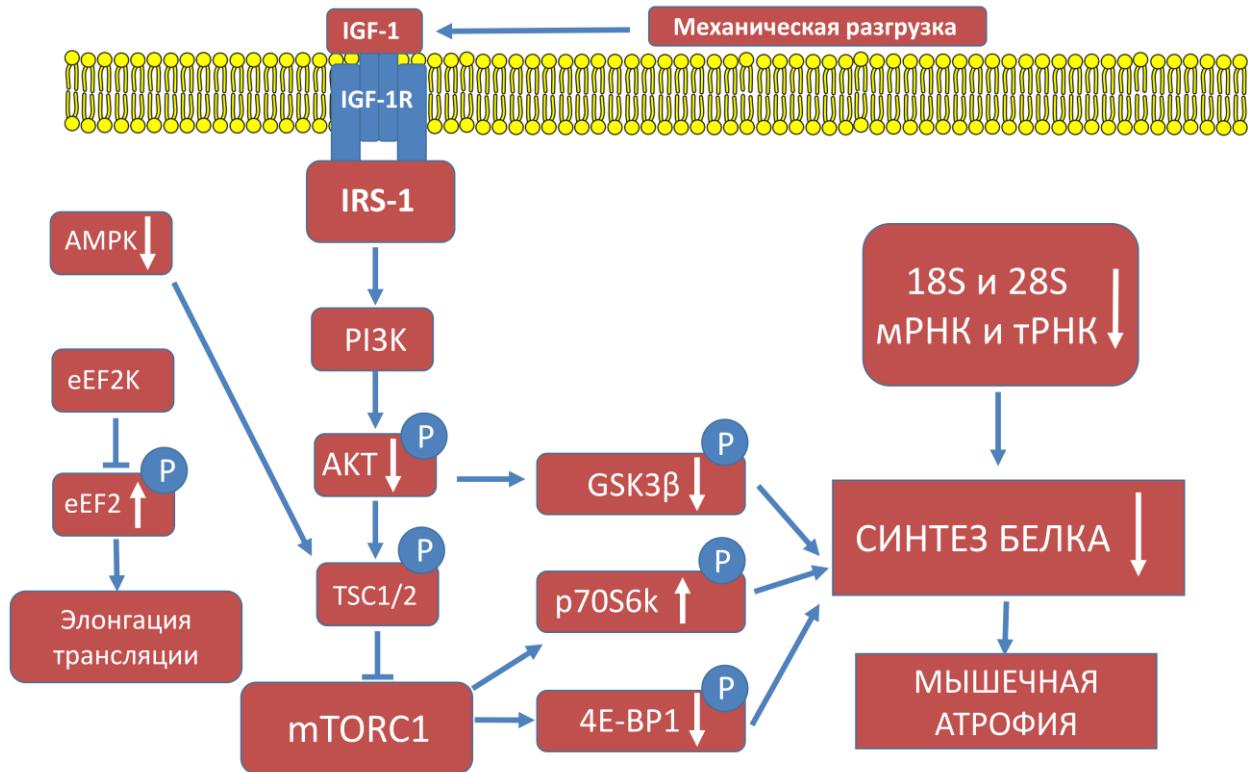


Рис.4 Схематическое представление сигнальных механизмов, ответственных за синтез белка на ранних сроках разгрузки (адаптировано из Gao et al. и Roux et al. [70, 203]). Стрелки рядом с названием белков указывают на снижение или увеличение фосфорилирования при гравитационной (механической) разгрузке. IGF-1 – инсулиноподобный фактор роста 1; IGF-1R – рецептор IGF-1; IRS-1 – субстрат инсулинового рецептора 1; AMPK – АМФ-активируемая протеинкиназа; eEF2 – эукариотический элонгационный фактор 2; eEF2k – киназа eEF2; PI3K – фосфоинозитид-3-киназа; Akt – протеинкиназа B; TSC2 – комплекс туберозного склероза 2; mTORC1 – mTOR комплекс 1; GSK-3 β – киназа гликогенсинтазы 3 β ; p70S6k – S6 рибосомальная киназа 70; 4E-BP1 – белок, связывающий фактор инициации трансляции 4E

Инсулиновая резистентность играет важную роль в условиях разгрузки, приводя к снижению белкового синтеза. Этот эффект много раз наблюдался у людей после антиортостатической гипокинезии [217, 230], иммобилизации [196], а также у крыс в модели антиортостатического вывешивания [12]. Эксперименты с антиортостатическим вывешиванием показали, что инсулиновая резистентность вызывала ослабление сигнального пути

Akt/mTORC1 [84] в камбаловидной (*soleus*) и средней икроножной (*medial gastrocnemius*) мышцах крысы. Также было показано изменение в уровне связывание 4E-BP1 и eIF4E в крысиной икроножной мышце в раннем периоде антиортостатического вывешивания [149]. В дополнение было обнаружено сниженное фосфорилирование GSK-3 β после вывешивания крыс [227]. На нокаутных по Akt и mTORC1 крысах было показано значительное развитие атрофии и замедление роста, что доказывает ключевую роль Akt/mTOR сигнального пути в поддержании мышечной массы [188, 197].

В дополнение к регулированию инициации трансляции, существуют механизмы регуляции элонгации трансляции мРНК [194], значительно влияющие на синтез белка. Было показано, что уровень фосфорилирования эукариотического фактора элонгации 2 (eEF2) значительно повышался в камбаловидной мышце после 14-суточного вывешивания [151], что приводило к его инактивации. На уровень синтеза белка также влияет трансляционная емкость, которая характеризуется количеством рибосом [37]. Снижение содержания тотальной и 28S РНК (основной маркер содержания рибосом) было зафиксировано в камбаловидной мышце после 1, 3 и 7 суток вывешивания крыс [20].

Кроме того, mTORC1 получает сигналы об энергетическом состоянии клетки. При недостатке АТФ и увеличении количества АМФ происходит активация протеинкиназы AMPK (fosфорилирование по Thr172), являющейся ключевым энергетическим сенсором в клетке. Будучи активированной, AMPK может подавлять mTORC1 сигналинг посредством фосфорилирования и активации TSC2 [218] или фосфорилирования Raptor (белок, который входит в комплекс mTORC1), приводящего к его последующему секвестрированию регуляторными белками семейства 14-3-3 [99]. Полученные в нашей лаборатории данные свидетельствуют о дефосфорилировании AMPK (Thr172) уже в первые сутки после вывешивания в *m. soleus* крысы [170, 246], а также в *m. soleus* человека после 3-суточной иммерсии [245], позволяют предположить, что повышенная активность mTORC1 на начальном этапе

гравитационной разгрузки может быть связана со снижением ингибирующего влияния AMPK на сигнальный путь TSC2/mTORC1/p70S6K (*Рис.4*).

1.6 Стимуляция опорных афферентов в условиях моделируемой микрогравитации

В условиях земной гравитации двигательная система человека (как и других млекопитающих) испытывает действие ряда биомеханических факторов. Это аксиальная нагрузка (т.е. действие веса тела,двигающего центр масс по направлению к опорной поверхности, что приводит к наклону оси тела) и сила реакции опоры, направленная на поверхность тела, контактирующую с субстратом [176]. Необходимость предотвращения отрицательных последствий гравитационной разгрузки в условиях космических полетов на скелетную мускулатуру космонавтов стала причиной разработки довольно большого количества тренажеров, основным недостатком которых является необходимость активного участия в заданном режиме упражнений. Ввиду вышесказанного, была проведена разработка и тестирование так называемой «пассивной контрмеры» в виде динамической стимуляции поверхности стоп (dynamic foot stimulation – DFS), которая может быть использована в качестве дополнения к имеющимся активным упражнениям, и в то же время не требовать большого количества времени и усилий от членов экипажа [136]. В дополнении ко всему методика DFS может быть использована для профилактики атрофии у лежачих больных.

Организм животных способен напрямую воспринимать эффекты микрогравитации с помощью отолитового аппарата внутреннего уха, который фиксирует изменения положения головы, воздействие на организм гравитационных сил, прямолинейных и центробежных ускорений. В то же время, опорно-двигательная система животных воспринимает эффекты гравитации опосредованно. С развитием у человека bipedальности пришла необходимость поддержания положения тела, когда большая масса

расположена над небольшой точкой опоры – подошвами стоп. При этом сенсорная информация, получаемая от механических сенсоров, расположенных на стопах, вносит значительный вклад в поддержание позы и обеспечение движения. Подошвенный контакт важен для поддержания вертикального положения тела [260] и «запуска» постурального ответа в условиях микрогравитации [145, 146].

Прямое влияние опорной афферентации было впервые показано в совместном советско-кубинском эксперименте на борту советского космического аппарата. В этом эксперименте была применена механическая стимуляция опорных зон стопы [107]. В экспериментах с участием членов космических экипажей, а также в экспериментах на животных в условиях космического полета и наземного моделирования было установлено, что устранение опоры в ряду других факторов приводит к существенным изменениям механизмов моторного контроля, в частности, сдвигает паттерн активности пулов двигательных единиц, инактивируя медленные двигательные единицы, определяет снижение рефлекторного тонуса постуральных и постурально-локомоторных мышц [131]. Исследования, проведенные на людях с использованием модели «сухая иммерсия» (в течение 7 дней) с измерением мышечной силы, показали, что использование опорной стимуляции стопы позволяло снизить или предотвратить негативные эффекты гравитационной разгрузки [135, 136]. В каждой серии испытуемые подразделялись на 2 равные группы: в первой, в течение всего экспериментального периода испытатели подвергались воздействию только иммерсии, во второй, в ходе иммерсии у них ежедневно в течение 6 ч по 20 мин каждый час применяли стимуляцию опорных зон ступней в режиме медленной (75 шагов/мин) и быстрой (120 шагов/мин) ходьбы. В камбаловидной мышце после 7-суточной иммерсии с применением опорной стимуляции не было обнаружено достоверного снижения площади поперечного сечения мышечных волокон медленного типа и сколько-нибудь заметных сдвигов в процентном соотношении волокон с экспрессией

медленных и быстрых изоформ тяжелых цепей миозина [148]. Используя опорную стимуляцию удалось предотвратить снижение максимального изометрического напряжения и кальциевой чувствительности пермеабилизованных волокон [148, 182]. Кроме того, в расслабленных волокнах после применения опорной стимуляции на фоне 7-супточной иммерсии достоверное снижение жесткости (на 30%) было обнаружено только в плоскости Z-диска. В других зонах мышечного волокна поперечная жесткость достоверно не изменялась от пред-иммерсионных значений [182]. Полученные данные указывают на то, что мышечная активность, активированная опорной стимуляцией стопы, позволяет избежать нарушений процессов формирования поперечных мостиков.

Дальнейшие исследования, проведенные с использованием грызунов с постоянной пассивной опорной стимуляцией, показали полное предотвращение негативных эффектов (снижение мышечной массы и поперечного сечения мышцы) антиортостатического вывешивания на камбаловидную мышцу [179]. Было также проведено исследование с интервальной (10 % от всего времени разгрузки) динамической стимуляции стопы на грызунах, которое также приводило к предотвращению атрофии камбаловидной мышцы [139]. Последующее снижение длительности до 10 минут в день в течение 14-суток антиортостатического вывешивания позволяло снизить атрофию камбаловидной мышцы на 40% [48]. Кроме того, в 2010 году были получены данные о влиянии вибростимуляции стопы крысы на содержание цитосклетных белков титина и небулина в камбаловидной мышце крысы на фоне антиортостатического вывешивания [1]. Вызванное разгрузкой снижение относительного содержания этих белков частично предотвращалось при вибростимуляции стопы. Тем самым, проведенные исследования доказывают эффективность опорной стимуляции стопы в противодействии разгрузке. Однако молекулярные механизмы, лежащие в основе поддержания структурных и сократительных характеристик мышц при стимуляции опорных афферентов в условиях реальной или моделируемой

микрогравитации остаются практически не изученными. В связи с этим, в задачи настоящей работы входило исследование потенциальных механизмов реализации механического сигнала при действии опорного стимула на фоне гравитационной разгрузки в постуральной мышце крысы.

2. ОРГАНИЗАЦИЯ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

2.1 Экспериментальные методы и подходы

2.1.1. Объект исследований

Все эксперименты проводились на самцах крыс линии Вистар. В нижеписанных экспериментах вес крыс составлял 220 ± 5 г. Крысы содержались при температуре 20-22°C, корм и воду грызуны получали без ограничения в соответствии с рационом для лабораторных животных. Все эксперименты проводились согласно биоэтическим правилам проведения исследований на животных и одобрены Физиологической секцией Национального комитета по биомедицинской этике. После проведения эксперимента крысы были усыплены 10% раствором авертина (трибромэтилэтанол) (Sigma, США). У каждого животного под авертиновым наркозом (в среднем 0,5 мл 10% авертина внутрибрюшно на животное весом 200г.) из обеих ног была выделена камбаловидная мышца и немедленно заморожена в жидкем азоте. Далее пробы помещали в холодильник, поддерживающий температуру -85°C, для последующей обработки.

2.1.2 Методы работы с изолированной мышцей

Для проведения серии эксцентрических и изометрических сокращений была использована стандартная методика [180]. Выделенные из крысы камбаловидные мышцы помещались в раствор Рингера-Кребса (138 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM NaH₂PO₄, 2 mM CaCl₂, 2 mM MgCl₂, 24 mM NaHCO₃, 11 mM глюкоза) с постоянной перфузией карбогеном (95% O₂ и 5% CO₂) для поддержания физиологического pH 7,4 и аэрации мышц. Температура раствора составляла 37°C. После чего, одна из мышц присоединялась

шелковыми нитками за основания сухожилия одним концом к динамометру (совмещенному с генератором усилия и длины), а другим к неподвижному крючку. Вторая мышца находилась в растворе Рингера-Кребса в течение всего эксперимента в качестве контроля. Затем закрепленная на датчике мышца растягивалась на оптимальную длину (L_0), которая соответствует максимальной силе одиночного (twitch) сокращения [83] при супрамаксимальном токе, что обусловлено максимальным перекрытием актина и миозина [31]. Для дополнительного контроля оптимальная длина мышцы замерялась перед выделением из голени крысы с помощью цифрового штангенциркуля. Эксцентрические и изометрические сокращения осуществлялись с помощью прямой стимуляции электрическим полем (80 V, 50 Hz в течение 3 секунд) двумя платиновыми параллельными электродами (*Рис.5*). Во время стимуляции мышца растягивалась на 15% от L_0 (время растяжения и возврата на прежнюю длину – 100 мс) [32] с задержкой растянутой длины на 3 секунды. Каждое сокращение сопровождалось 10 с перерывом, во время которого мышца находится при L_0 (*Рис.6*). После серии из 5 сокращений дополнительно вводился 30 секундный перерыв. Таким образом общая длительность теста составляла 25 минут, за время которого общее количество сокращений равнялось 60. Измерения параметров сокращения и растяжения мышцы проводились автоматически с использованием Dual Mode Lever Arm System 305C-LR и DMC/DMA software (Aurora Scientific, Канада). Так как во время сокращения мышцы активность анаболического сигналинга снижается [125], мышцы дополнительно инкубировалась в растворе Рингера-Кребса в течение 30 минут, после чего замораживались в жидком азоте.

Для измерения пассивной жесткости мышца устанавливалась на оптимальную длину (L_0), после чего проводилось растяжение на 15% от L_0 со скоростью 250 мм/с без стимулирования мышцы током [24].

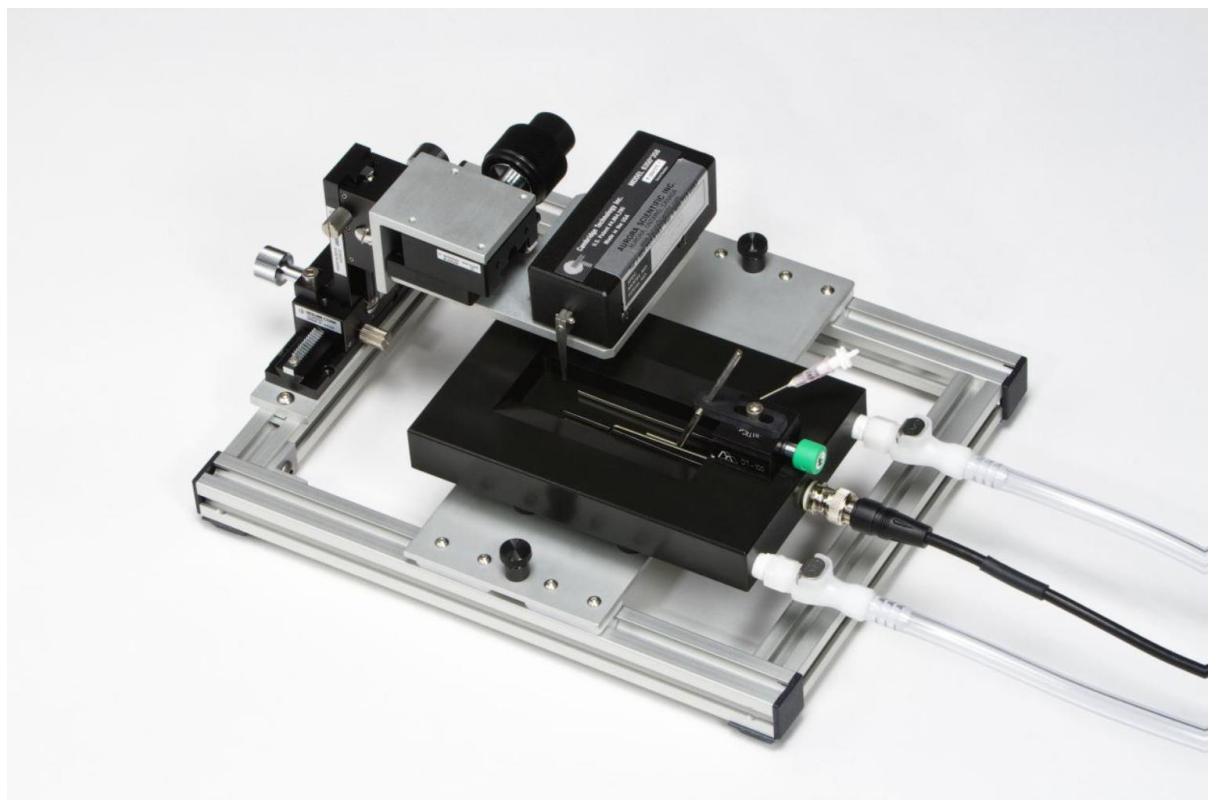


Рис.5 Изображение установки для работы с изолированной мышцей

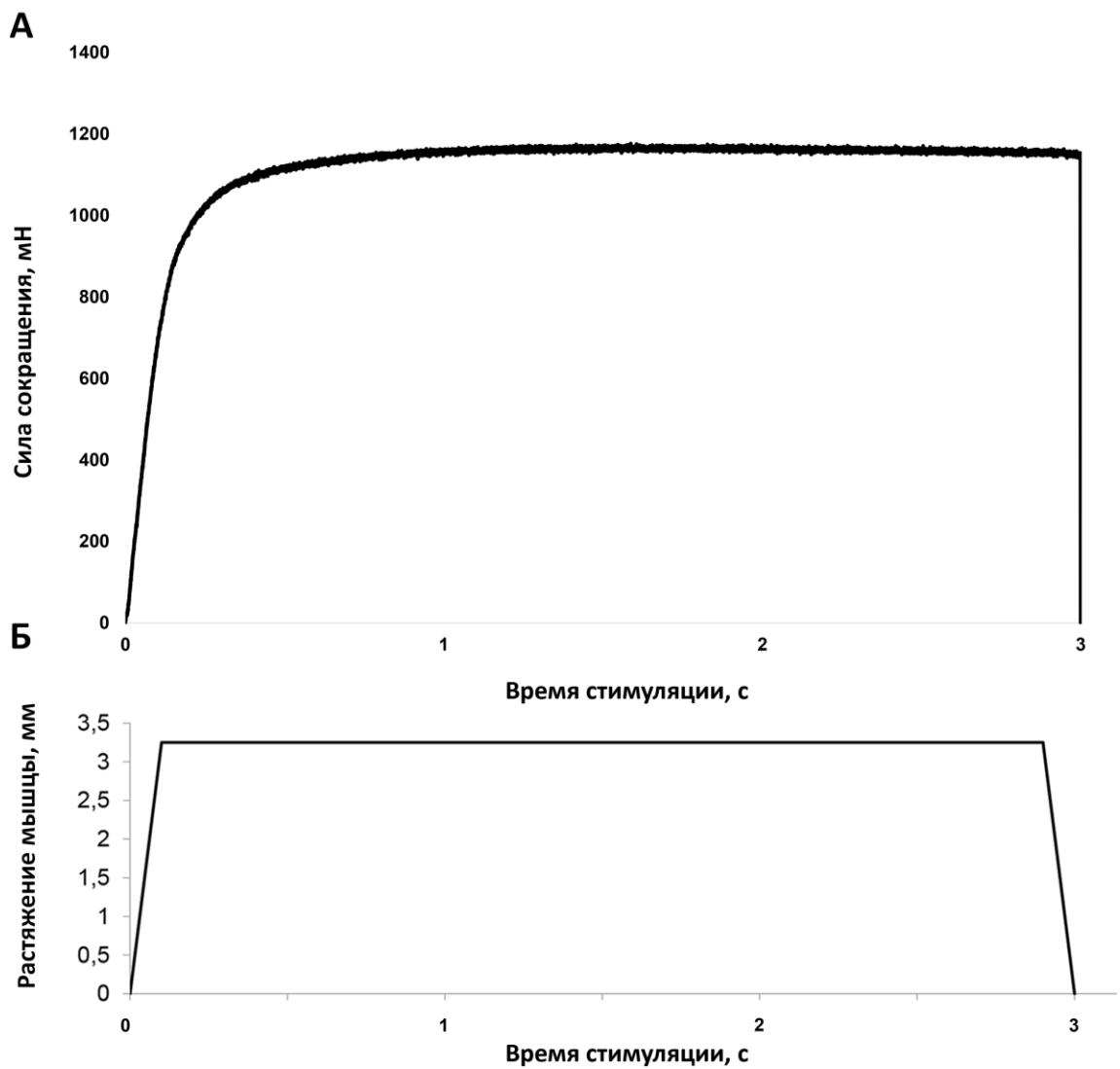


Рис.6 График изменения силы (A) и длины (B) для одного эксцентрического сокращения

2.1.3 Антиортостатическое вывешивание

Антиортостатическое вывешивание крыс (hindlimb suspension) – признанная во всем мире экспериментальная модель, позволяющая имитировать эффекты невесомости, вызывая атрофию мышц задних конечностей за счёт лишения их опоры. При правильном выполнении всех условий содержания животных, эксперименты с использованием этой модели, как правило, не сопровождаются гормональными и иммунологическими

проявлениями стресс-реакции [239]. Животных вывешивали за хвост таким образом, чтобы задние конечности не касались дна клетки, а передние свободно опирались на решетку для свободного перемещения крысы по клетке [115, 175]. При этом, животные во время вывешивания не испытывают ограничений в перемещении и имели постоянный доступ к воде и пище. Животные из группы контроля содержались в аналогичной клетке все время эксперимента (*Рис.7*).

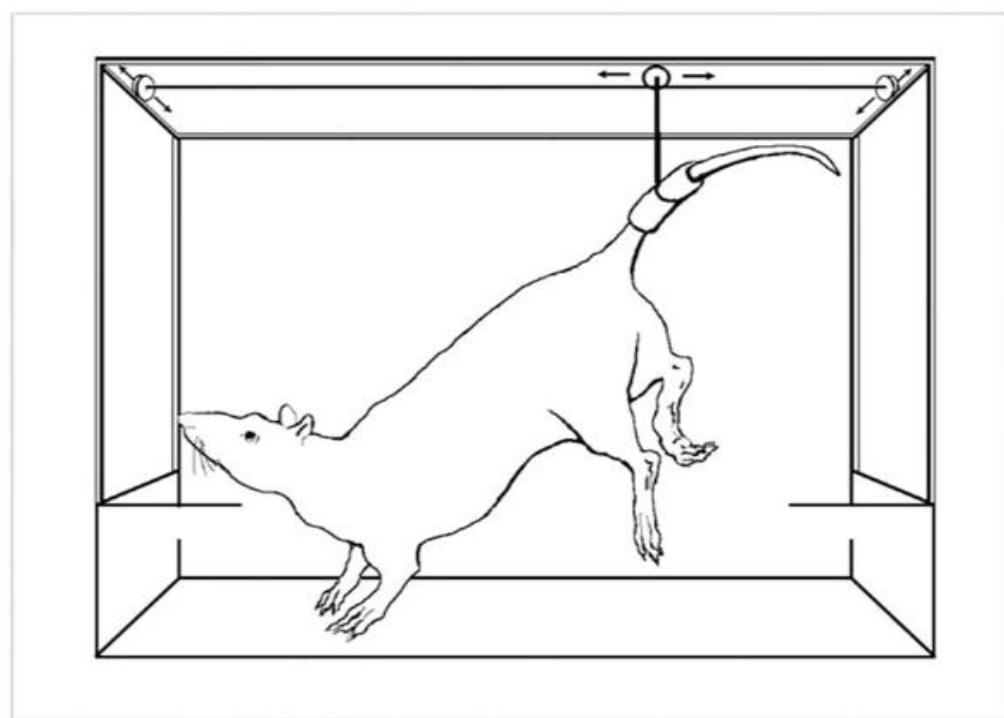


Рис.7 Модель антиортостатического вывешивания крысы

2.1.4 Динамическая опорная стимуляция стопы

Без перемещения животного из вывешенного состояния к задним лапам крысы прикреплялось устройство для опорной стимуляции стопы. Устройство представляет собой пластиковый «башмак», внутри которого расположена подвижная платформа. После подведения воздуха к «башмаку» с помощью шланга, подвижная платформа создает регулируемое давление на стопу крысы разной частоты и силы. Устройство закреплялось на ноге животного над

голеностопным суставом с использованием пластыря на предварительно выбритую кожу (*Рис.8*). Давление, которое подавалось на стопу с помощью подвижной поверхности стимулятора, регулировалось автоматически запрограммированным воздушным насосом, с частотой 1 стимул в секунду на каждую лапу, что имитирует ходьбу животного. Общая продолжительность стимуляции равнялась 20 минутам, после чего следовали 10 минут отдыха. Этот цикл повторялся 8 раз, в течение 4 часов, каждый день пока продолжалось вывешивание. После выполнение всех циклов, устройство снималось. Для расчета необходимого давления на стопу использовалось значение площади поверхности стопы взрослой крысы, которое лежит между 450 и 500 мм^2 . Также известно, что для стимуляции всех типов сенсорных рецепторов давление должно быть выше 8 mN. Исходя из вышесказанного, необходимое давление на стопу составляло – 104 мм рт.ст. (13.9 мН) [139].



Рис.8 Фотография крысы с закрепленным опорным стимулятором стопы

2.1.5 Антиортостатическое вывешивание крыс в течение 1, 3, 7 дней

Животные были распределены на 4 группы: «C» (контроль), «1HS» (вывешивание в течение 1 суток), «3HS» (вывешивание в течение 3 суток), «7HS» (вывешивание в течение 7 суток). Образцы биоматериала использовались для анализа содержания пуромицина, p-P70S6k, p-4E-BP1, p-GSK-3 β , p-Akt и p-p90RSK с помощью вестерн-блотинга.

2.1.6 Антиортостатическое вывешивание крыс в течение 1, 3, 7 дней с последующей эксцентрической нагрузкой *ex vivo*

Животные были распределены на 4 группы: «C» (контроль), «1HS» (вывешивание в течение 1 суток), «3HS» (вывешивание в течение 3 суток), «7HS» (вывешивание в течение 7 суток). После вывешивания камбаловидные мышцы помещались в экспериментальную установку для последующего эксцентрического сокращения (ЭС) *ex vivo*. Образцы биоматериала использовались для анализа содержания пуромицина, p-P70S6k, p-p90RSK, p-4E-BP1, p-GSK-3 β с помощью вестерн-блотинга.

2.1.7 Антиортостатическое вывешивание крыс в течение 7 суток с последующей эксцентрической нагрузкой *ex vivo* и блокированием стретч-чувствительных каналов

Животные были распределены на 4 группы: «C» (контроль), «C+GD» (контроль + последующей инъекцией в m.soleus неспецифического ингибитора стретч-чувствительных каналов – соли гадолиния ($GdCl_3$)), «7HS» (антиортостатическое вывешивание 7-суток), «7HS+Gd» (вывешивание 7-суток с добавлением ингибитора стретч-чувствительных каналов в среду) в концентрации 20 μ M [126, 221]. Образцы биоматериала использовались для анализа содержания пуромицина, p-P70S6k, p-S6RP, p-4E-BP1 с помощью вестерн-блотинга.

2.1.8 Анализ воздействия динамической опорной стимуляции стопы на анаболические процессы в постуральной мышце крысы на фоне 1 и 3 суточного вывешивания

Животные были случайным образом разделены на следующие группы: 1) «C» (контрольная группа); 2) «1HS» и «3HS» (1-суточное и 3-суточное антиортостатическое вывешивание); 3) «D» (1-суточное и 3-суточное антиортостатическое вывешивание с ежедневной опорной стимуляцией стопы). Образцы биоматериала использовались для анализа содержания пуромицина, p-P70S6k, p-4E-BP1, p-GSK-3 β , p-eEF2 с помощью вестерн-блотинга.

2.1.9 Воздействие опорного стимула на фоне 3 суточного вывешивания на реализацию механического сигнала в постуральной мышце крысы в ответ на эксцентрическую нагрузку ex vivo

Животные были случайным образом разделены на следующие группы: 1) «C» (контрольная группа); 2) «3HS» (3-суточное антиортостатическое вывешивание); 3) «D» (3-суточное антиортостатическое вывешивание с ежедневной опорной стимуляцией стопы). По окончании трех суток вывешивания осуществлялась серия эксцентрических сокращений изолированной m.soleus. Образцы биоматериала использовались для анализа содержания пуромицина, p-P70S6k, p-S6RP, с помощью вестерн-блотинга.

2.2 Методики обработки биоматериала и анализ данных

2.2.1 Анализ биомеханических параметров изолированной мышцы

Анализ биомеханических параметров изолированной мышцы проводился с помощью Dynamic Muscle Data Acquisition and Analysis Software

(Aurora Scientific, США). Показатели максимального тетанического сокращения нормировались на площадь поперечного сечения мышцы (отношение веса мышцы к оптимальной длине, умноженного на плотность мышцы – 1,07 г/см³) [78].

2.2.2. ДДС-электрофорез с последующим вестерн-блоттингом

Камбаловидная мышца крысы извлекалась хирургическим путём под общим авертиновым наркозом. Затем мышцу взвешивали, фиксировали на картонной подложке с помощью Sakura Finetek Tissue-Tek O.C.T. Compound (Sakura Finetek, США) и быстро замораживали в жидком азоте. Мышечные пробы хранили при температуре -80°C вплоть до обработки. Для выделения белка на криотоме при -20°C замороженную мышечную ткань нарезали (80 срезов толщиной 20 мкм) в пробирки. Затем в пробирки с образцами добавляли охлаждённый лизирующий буфер RIPA Lysis Buffer System (sc-24948, Santa Cruz Biotechnology, США) с 5ММ EDTA 24 мкл/мл; 1ММ Na3VO4 20мкл/мл; 1ММ DTT 4мкл/мл; 1ММ PMSF 20 мкл/мл; 1ММ апратинином 5 мкл/мл; 1ММ лейпептином 5 мкл/мл; 1ММ пепстатином А 5 мкл/мл и коктейлем ингибиторов фосфатаз 40 мкл/мл (Phosphatase Inhibitor Cocktail B, sc-45045, Santa Cruz Biotechnology, США) из расчёта 150 мкл буфера на одну пробу. Затем проводили гомогенизацию и центрифугирование (в течение 15 минут, при температуре +4°C и 12 000 об/мин). После этого отбирали надсадочную жидкость и определяли концентрацию белка на планшетном спектрофотометре Epoch (BioTek) методом Bradford, измеряя поглощение на длине волны 595 нм. Концентрация белка в пробах рассчитывалась по калибровочной кривой. Электрофорез по методу Лэммли [142] проводили в 8-10% разделяющем полиакриламидном геле в мини-системе Bio-Rad (США) в течение часа при силе тока 17mA на один гель. Перенос белков на нитроцеллюлозную мембрану (Bio-Rad, США) осуществляли в системе mini Trans-Blot (Bio-Rad, США) в течение 2 часов при температуре +4°C и

постоянном напряжении 100 В. Затем, для проверки равной загрузки белка на все дорожки, нитроцеллюлозная мембрана красилась краской Ponceau S. После этого мембранны отмывали от Ponceau S и блокировали в 5% растворе сухого молока в PBST (фосфатно-солевой буффер с 0,1% содержанием Tween 20) при комнатной температуре в течение часа. Затем проводили инкубацию (в течение 15 часов, +4°C) с первичными антителами против p-p70S6k (Thr 389) с разведением 1:1000 (sc-11759, Santa-Cruz, США), p70S6k с разведением 1:3000 (#9202, Cell Signaling, США), p-4E-BP-1 (Thr37/46) с разведением 1:1000 (#2855, Cell Signaling, США), 4E-BP-1 с разведением 1:2000 (#9452, Cell Signaling, США), p-GSK-3β (Ser 9) с разведением 1:1000 (#9322, Cell Signaling, США), GSK-3β с разведением 1:1000 (#12456, Cell Signaling, США), p-eEF2 Thr56 с разведением 1:1000 (#2331, Cell Signaling, США), eEF2 с разведением 1:2000 (#2332, Cell Signaling, США), p-S6RP (ser 240/244) с разведением 1:1000 (#2215, Cell Signaling, США), S6RP с разведением 1:3000 (#2216, Cell Signaling, USA), p-Akt (s473) с разведением 1:1000 (#9271, Cell Signaling, США), Akt с разведением 1:3000 (#9272, Cell Signaling, США), пуромицина с разведением 1:3000 (EQ0001, Kerafast Inc., США), а также моноклональными антителами Anti-GAPDH (G041, abm, Канада) в разведении 1:10000. После этого отмывали мембранны в PBST 3 раза по 5 минут. Затем мембранны инкубировали в течение часа с биотинилированными вторичными антителами goat anti-rabbit (sc-2004, Santa Cruz, США) в разведении 1:30000. Для выявления GAPDH и пуромицина использовали вторичные антитела goat anti-mouse в разведении 1:35000 (#1706516, Bio-Rad, США). Далее проводили отмыкание в PBST 3 раза по 5 минут. Белковые полосы выявляли на мемbrane с помощью Clarity Western ECL Substrate (Bio-Rad, США). Для пуромицина измеряли оптическую плотность каждой целой дорожки от 20 до 180 кДа.

2.2.3 Оценка синтеза белка методом SUnSET

Интенсивность синтеза белка в т. soleus оценивалась с помощью метода пуромицинового мечения – SUnSET. Данный метод предполагает использование антибиотика пуромицина (структурного аналога тирозил-тРНК) и соответствующих антител для выявления количества пуромицина, встраивающегося в образующиеся пептидные цепи. Включение пуромицина в растущую полипептидную цепь ограничивает элонгацию, причём, когда пуромицин используется в низких концентрациях (40 нмоль/г), накопление конъюгированных с пуромицином пептидов отражает интенсивность белкового синтеза. В дальнейшем интенсивность белкового синтеза выявляется с помощью вестерн-блоттинга [80]. Для нашего исследования был использован гидрохлорид пуромицина (Enzo Life Sciences, США) в дозе 40 нмоль/г, который вводился за 30 минут до эвтаназии животных (20 мг/кг веса внутрибрюшинно).

2.2.4 Анализ вестерн-блота

Анализ белковых полос проводили с использованием блот-сканера C-DIGIT (LI-COR Biotechnology, США) и соответствующей программы Image Studio Digits. Фосфорилированные формы белков были нормализованы к соответствующим тотальным формам белков. Вестерн-блот пуромицина нормировался на GAPDH. Хемилюминесцентный сигнал полосы контрольной группы на анализируемой мембране принимали за 100%, а сигнал полос других групп сравнивали с сигналом полос контрольной группы, расположенных на одной и той же мембране.

2.2.5 Анализ содержания тотальной и рибосомальной РНК

Выделение РНК из мышечной ткани проводили с помощью набора RNeasy Micro Kit (Qiagen, США) согласно рекомендациям производителя. Перед выделением тотальной РНК мышечную ткань нарезали на криостате

Leica, после чего вес образца измеряли на электронных весах. Концентрацию тотальной РНК определяли на планшетном спектрофотометре. Общий объем пробы нормировали на вес ткани, из которой была выделена данная проба, после чего аликвоту тотальной РНК смешивали с равным объемом денатурирующего буфера для нанесения (Thermo Scientific, США) и нагревали 10 минут при 70°C согласно рекомендациям производителя. Для электрофореза использовали 1,2% агарозный гель с использованием бромистого этидия (0,5 мкг/мл), приготовленный на буфере ТВЕ (89 mM ТРИС, 89 mM борная кислота, 2 mM ЭДТА pH 8,0). Электрофорез проводили при напряжении 10 В/см длины геля в буфере ТВЕ. Для определения длин полос РНК использовали маркёры RiboRuler (Thermo Scientific, США). Результаты электрофореза визуализировали на Gel Doc EZ Imager (Biorad, США). Для обсчёта результатов использовали программное обеспечение Image Studio Digits v. 4.0. Степень деградации РНК определяли по вычислению соотношения 28S РНК к 18S РНК.

2.3 Статистическая обработка данных

Данные представлены как средние значения \pm стандартная ошибка среднего ($M \pm SEM$). Результаты по рРНК приведены в виде медианы и интерквартильной широты (0.25-0.75). Достоверность различий между группами определяли с помощью критерия Краскела — Уоллиса или многофакторного дисперсионного анализа с повторными измерениями (ANOVA) с последующим применением критерия Тьюки. Достоверными считали отличия с уровнем значимости $p < 0,05$.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

3.1 Исследование анаболических сигнальных путей в скелетной мышце крысы на фоне 1, 3, 7 суточного вывешивания

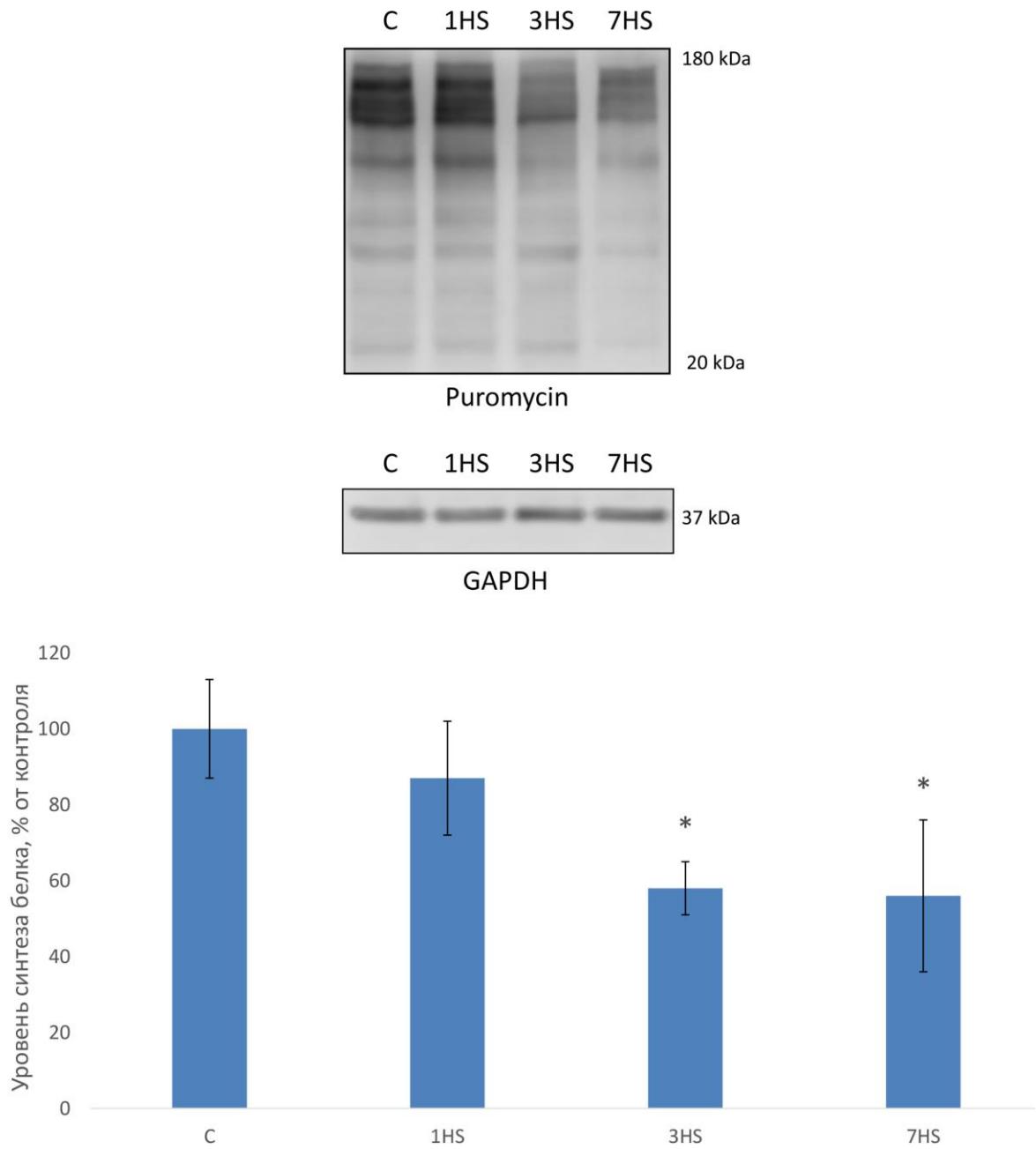
Анализ массы высушенной камбаловидной мышцы позволил оценить изменение содержания общего белка в мышце. Результаты по динамике сухой массы камбаловидной мышцы и отношению «масса m.soleus/масса крысы» представлены в *Табл.1*. Достоверное снижение массы сухой m. soleus наблюдалось в уже после 3-суточного вывешивания (-11%, p<0,05), при этом уменьшение сухого веса продолжилось в группе «7HS» (-35%, p<0,05). Отношение массы сухой камбаловидной мышцы к массе тела крысы было снижено на 32% (p<0,05) после 7-суточной гравитационной разгрузки (*Табл.1*).

Таблица 1 Вес животных, нормированный вес камбаловидной мышцы

Группа	Сухой вес m.soleus, мг	Нормированный на массу крысы сухой вес m.soleus, мг/г
C	26±0,8	0,1063±0,0029
1HS	25±1,1	0,1095±0,0040
3HS	23±0,7*	0,1028±0,0031
7HS	16.7±0.5*	0,0722±0,0026*

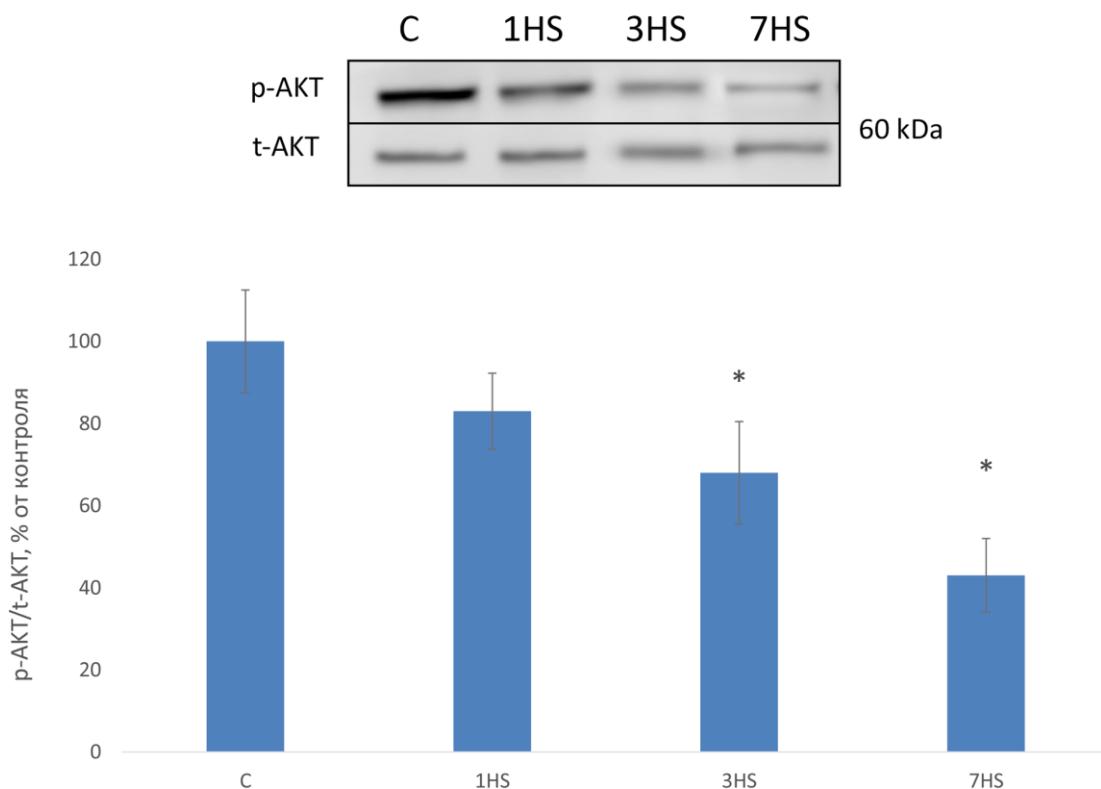
*C – контроль, 1HS – первые сутки вывешивания, 3HS – третьи сутки вывешивания, 7HS – седьмые сутки вывешивания. * - достоверное отличие от контроля (p<0,05). Данные представлены в виде средних ± стандартная ошибка среднего*

Гравитационная разгрузка в течение 3 и 7 суток привела к достоверному снижению интенсивности синтеза белка в камбаловидной мышце, соответственно, на 42% и 44% ($p<0,05$) относительно контрольного уровня (Рис. 9).



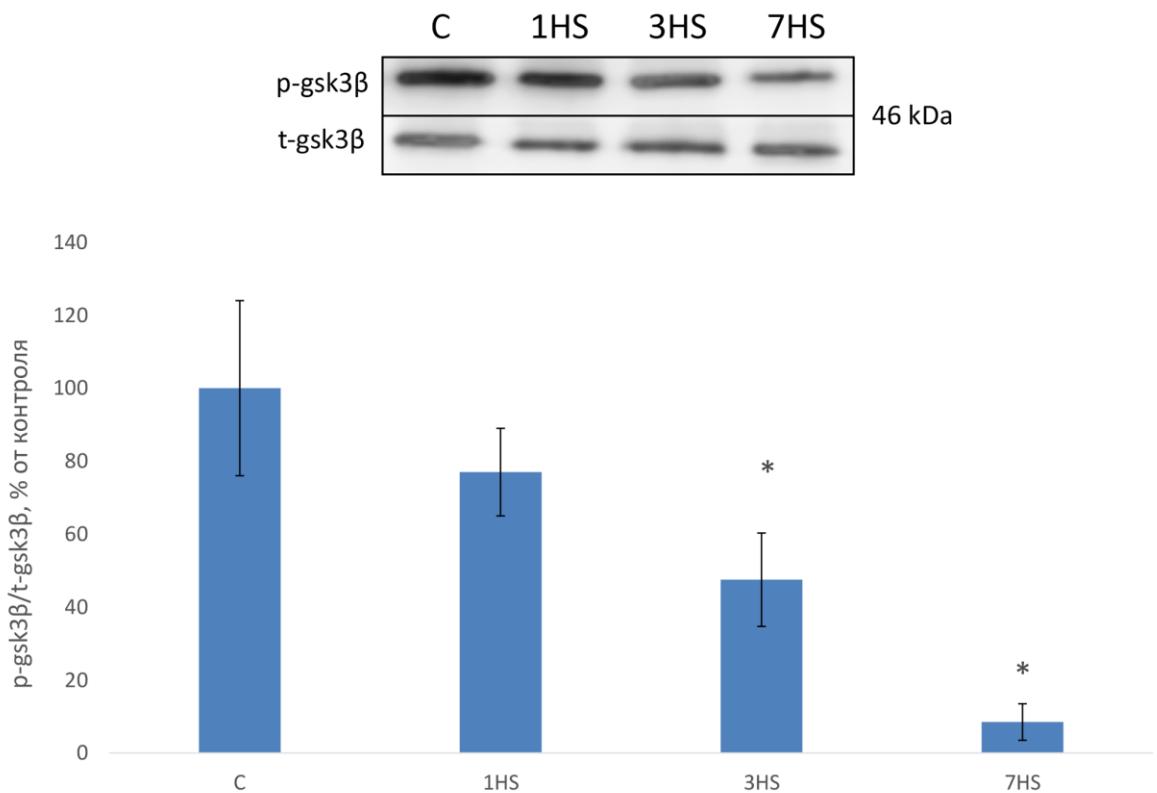
*Рис. 9 Уровень синтеза белка, измеренный пуромициновым методом, в процентах от контроля. С – контроль, 1HS – первые сутки вывешивания, 3HS – третий сутки вывешивания, 7HS – седьмые сутки вывешивания. * – достоверное отличие между контролем и вывешиванием ($p<0,05$)*

Фосфорилирование протеинкиназы B (Akt) достоверно снизилось через 3-е суток разгрузки на 32% ($p<0,05$), а через 7 суток выведения снижение фосфорилирования Akt достигло 58% ($p<0,05$) относительно контрольной группы животных (Рис. 10).



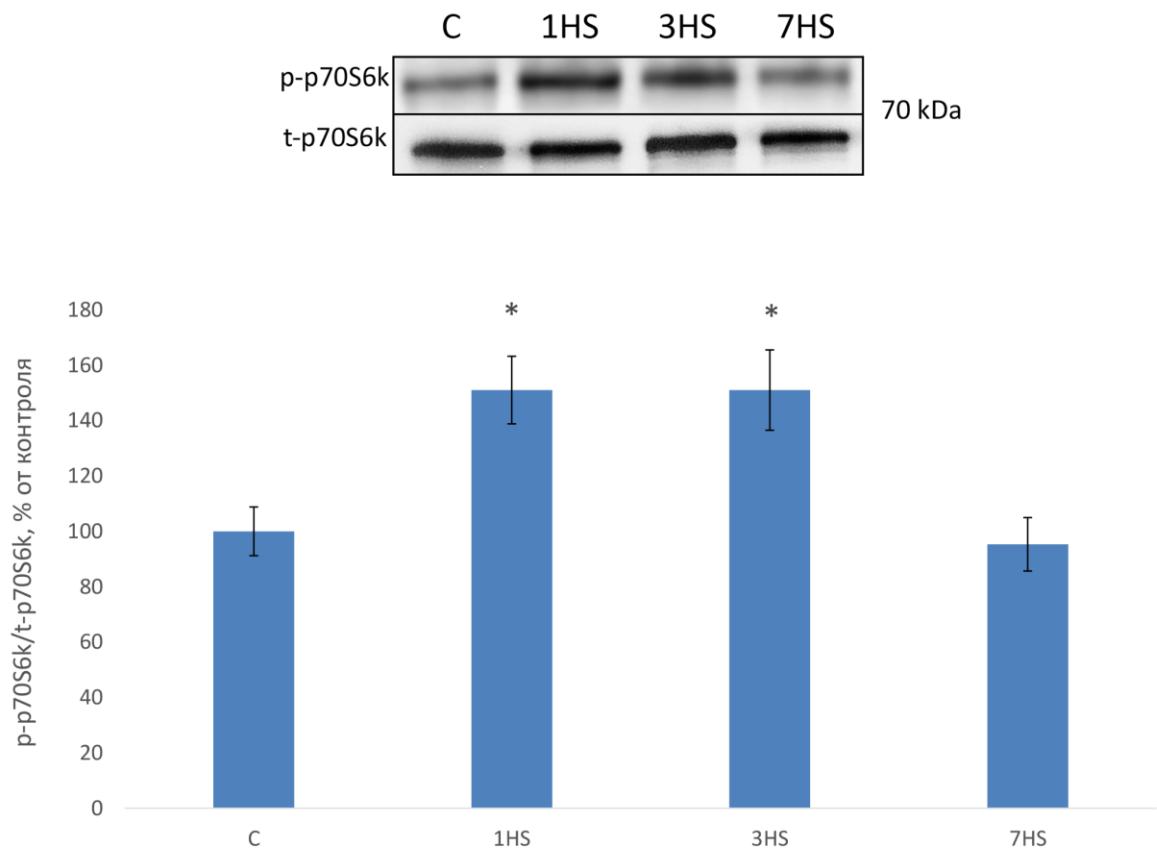
*Рис. 10 Содержание фосфорилированной (Ser473) формы протеинкиназы B (Akt), в процентах от контроля. C – контроль, 1HS – первые сутки выведения, 3HS – третьи сутки выведения, 7HS – седьмые сутки выведения. * - достоверное отличие между контролем и выведением ($p<0,05$)*

Схожая динамика наблюдалась и для фосфорилирования GSK-3 β : было зафиксировано достоверное ($p<0,05$) снижению после 3-х суток и 7-х суток разгрузки на 53% и 91% соответственно относительно контрольных значений (Рис. 11).



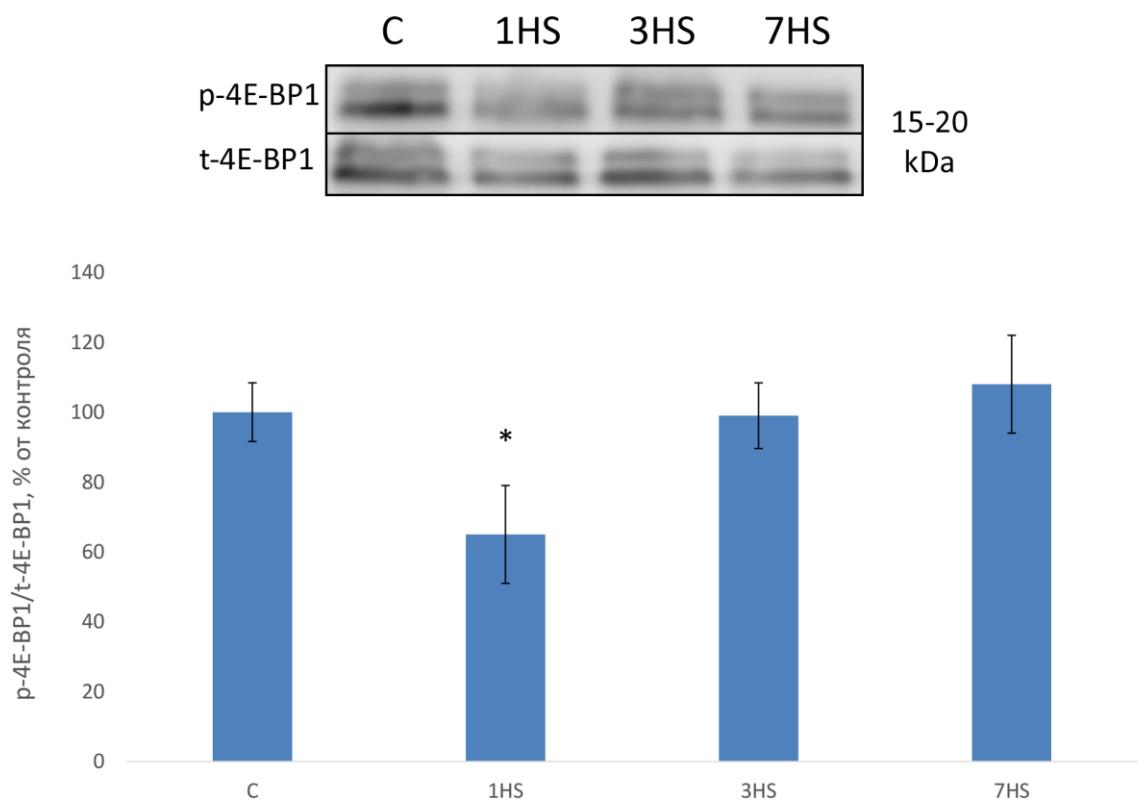
*Рис. 11 Содержание фосфорилированной (Ser9) формы GSK-3 β , в процентах от контроля. C – контроль, 1HS – первые сутки вывешивания, 3HS – третий сутки вывешивания, 7HS – седьмые сутки вывешивания. * - достоверное отличие между контролем и вывешиванием ($p<0,05$)*

Фосфорилирование рибосомальной киназы p70 оказалось повышенным на 50% ($p<0,05$) после 1-суточного и 3-суточного антиортостатического вывешивания (Рис.12).



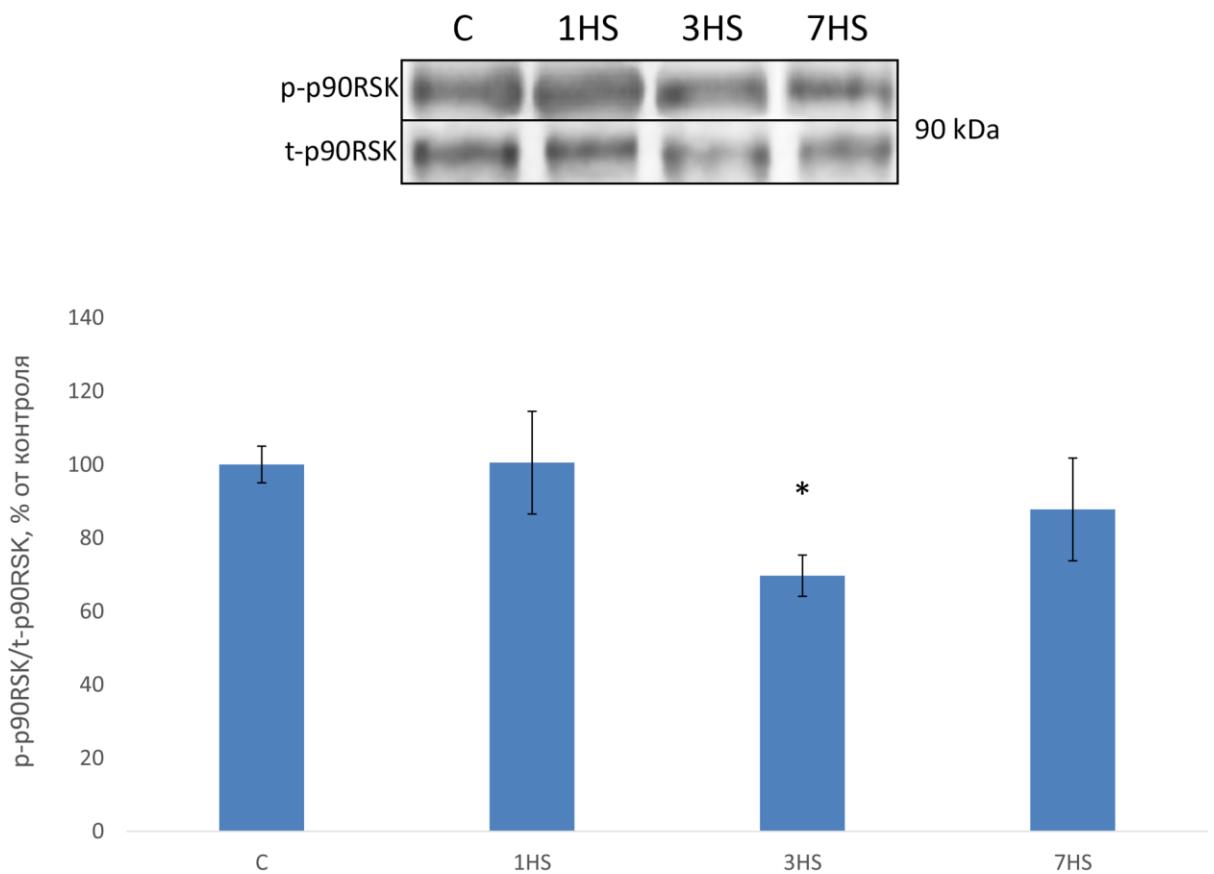
*Рис. 12 Содержание фосфорилированной (Thr389) формы p70S6k, в процентах от контроля. C – контроль, 1HS – первые сутки вывешивания, 3HS – третий сутки вывешивания, 7HS – седьмые сутки вывешивания. * - достоверное отличие между контролем и вывешиванием ($p<0,05$)*

Фосфорилирование 4E-BP1, который является еще одним эфектором mTORC1, было достоверно снижено на 35% ($p<0,05$) через сутки после гравитационной разгрузки (*Рис.13*).



*Рис. 13 Содержание фосфорилированной (Thr37/46) формы 4E-BP1, в процентах от контроля. С – контроль, 1HS – первые сутки вывешивания, 3HS – третий сутки вывешивания, 7HS – седьмые сутки вывешивания. * – достоверное отличие между контролем и вывешиванием ($p < 0,05$)*

Содержание фосфорилированной рибосомальной киназы p90RSK достоверно снизилось на 31% после 3-суточного антиортостатического вывешивания (*Рис.14*).



*Рис. 14 Содержание фосфорилированной (Thr359/Ser363) формы p90RSK, в процентах от контроля. C – контроль, 1HS – первые сутки вывешивания, 3HS – третьюи сутки вывешивания, 7HS – седьмые сутки вывешивания. * - достоверное отличие между контролем и группами с соответствующим вывешиванием ($p<0,05$)*

3.2 Исследование анаболических сигнальных путей в скелетной мышце крысы после стандартной нагрузки *ex vivo* на фоне 1, 3, 7 суточного вывешивания

Вес крыс из экспериментальных групп (1HS, 3HS и 7HS) достоверно не отличался от веса контрольных животных (Табл. 2). Масса камбаловидной мышцы, нормированная к массе тела животного, достоверно снизилась на 16% ($p<0,05$) относительно контроля после 7-суточного вывешивания (Таб. 2).

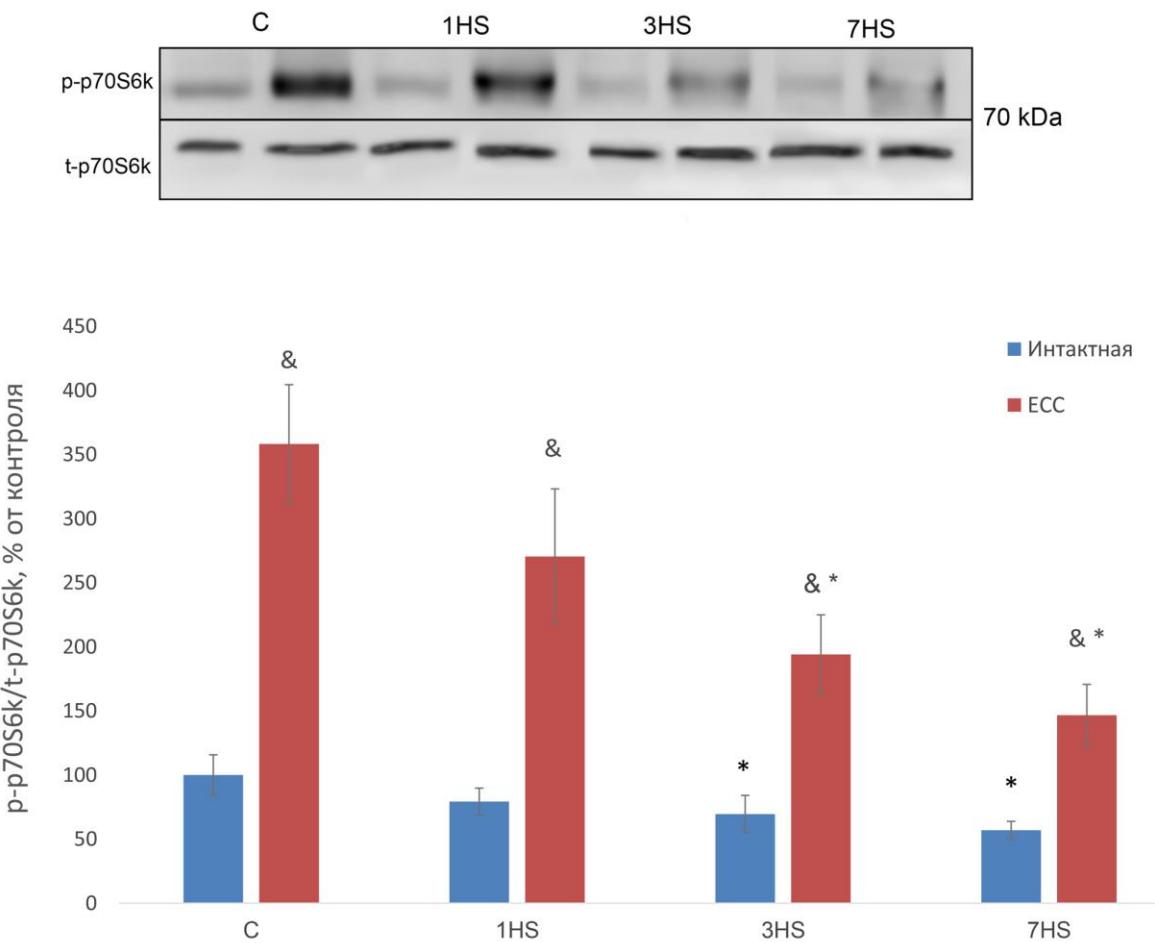
Таблица 2 Вес животных, нормированный вес камбаловидной мышцы, сила сокращения, нормированная на поперечное сечение мышцы (ППС)

Группа	Вес животных, г	Нормированный вес m.soleus, мг/г	Средняя сила сокращения, мН	Средняя сила сокращения, нормированная на ППС, Н/см ²
C	220±8	0,40±0,011	802,4±24	228,4±6,8
1HS	214±3	0,42±0,013	744,5±26	155,3±5,5*
3HS	222±10	0,372±0,015	742,5±21	205,3±3,7*
7HS	210±7	0,336±0,018*	660,8±24*	171,6±6,3*

*C – контроль, 1HS – первые сутки вывешивания, 3HS – третьи сутки вывешивания, 7HS – седьмые сутки вывешивания. * - достоверное отличие от контроля ($p<0,05$). Данные представлены в виде средних ± стандартная ошибка среднего*

В результате проведения теста на однократную эксцентрическую нагрузку (серию ЭС) были получены данные о силе, нормированной на поперечное сечение мышцы. Среднее максимальное напряжение, развиваемое мышцами не различалось между группами (Таб. 2).

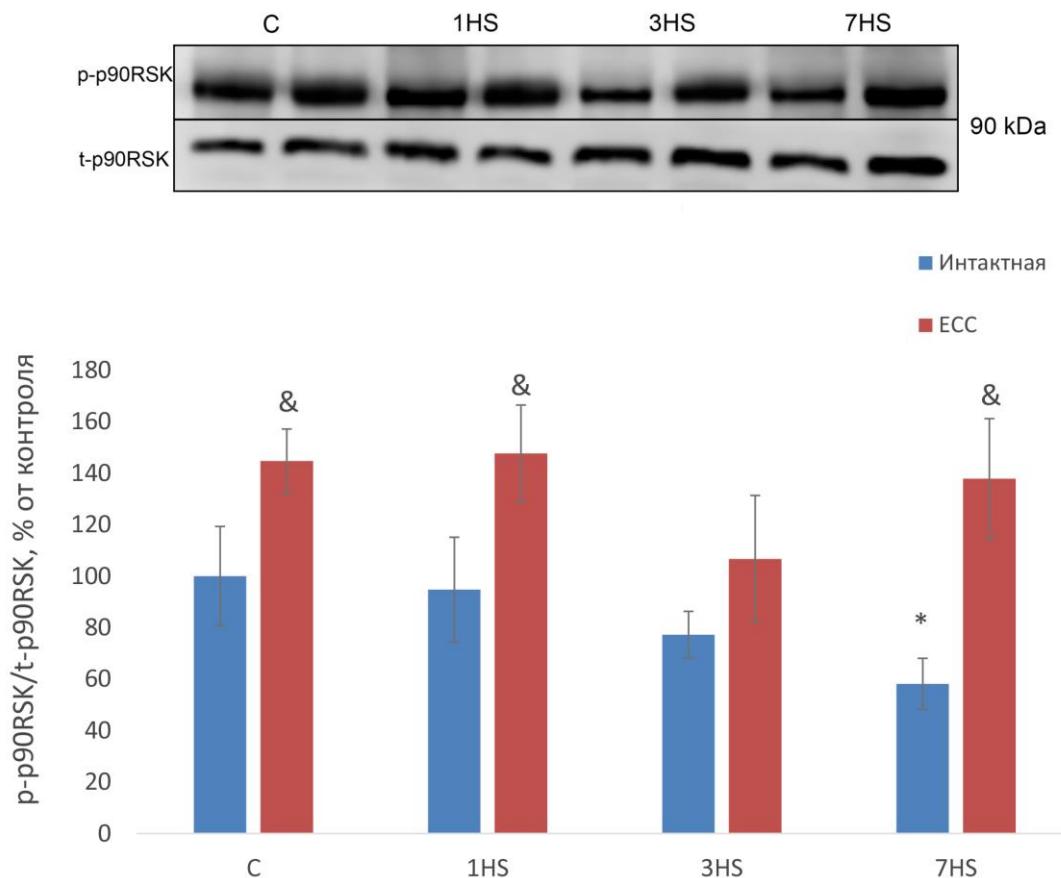
Содержание фосфорилированной формы рибосомальной киназы p70S6k в интактной мышце оказалось достоверно снижено на 44% и 47% ($p<0,05$) относительно контроля на 3 и 7 сутки вывешивания соответственно (Рис. 15). Фосфорилирование p70S6k оказалось достоверно увеличено ($p<0,05$) для всех групп с ECC относительно интактных групп. Средний прирост фосфорилирования p70S6k также достоверно снизился на 3 и 7 сутки (Таб. 3).



*Рис. 15 Содержание фосфорилированной (Thr389) формы рибосомальной киназы p70S6k, в процентах от контроля. C – контроль, 1HS – первые сутки вывешивания, 3HS – третью сутки вывешивания, 7HS – седьмые сутки вывешивания. * - достоверное отличие между контролем и группами с соответствующим вывешиванием ($p<0,05$). & - достоверное отличие между интактными мышцами и мышцами с ECC ($p<0,05$)*

Содержание фосфорилированной формы рибосомальной киназы p90RSK в интактных мышцах достоверно снизилось на 42% ($p<0,05$) относительно контроля только к седьмым суткам вывешивания (Рис.16). Содержание фосфорилированной формы рибосомальной киназы p90RSK достоверно ($p<0,05$) возросло во всех группах с ECC, кроме «3HS». При этом достоверных различий в приросте фосфорилирования p90RSK в

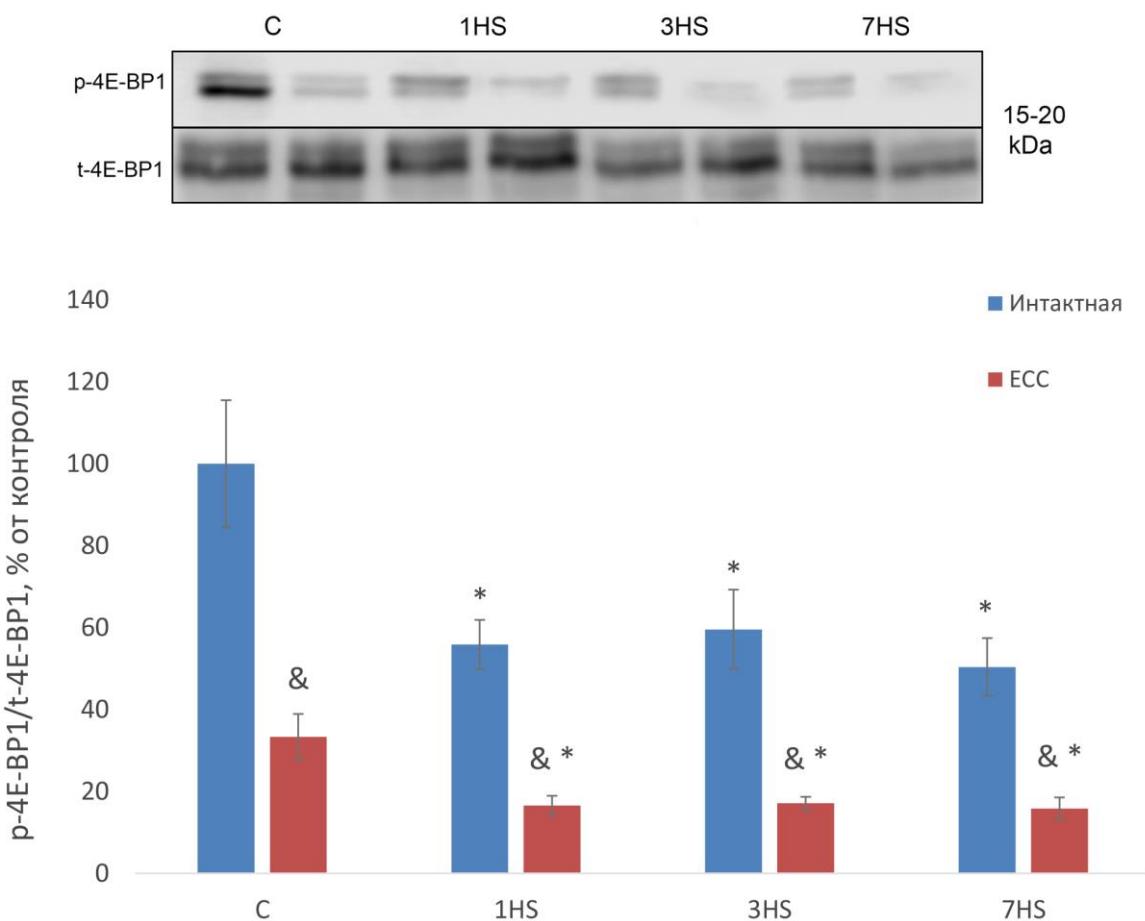
экспериментальных группах между интактной мышцей и мышцей после эксцентрических сокращений не наблюдалось (*Таб. 3*).



*Рис. 16 Содержание фосфорилированной (Thr359/Ser363) формы рибосомальной киназы p90RSK, в процентах от контроля. C – контроль, 1HS – первые сутки вывешивания, 3HS – третий сутки вывешивания, 7HS – седьмые сутки вывешивания. * - достоверное отличие между контролем и группами с соответствующим вывешиванием ($p<0,05$). & - достоверное отличие между интактными мышцами и мышцами с ECC ($p<0,05$)*

Содержание фосфорилированной формы 4e-связывающего белка (p-4E-BP1) достоверно снизилось на 45% ($p<0,05$) относительно контроля к первым суткам вывешивания. При этом содержание p-4E-BP1 достоверно уменьшилось ($p<0,05$) во всех группах с ECC относительно интактных групп (*Рис.17*). Достоверных отличий в снижении фосфорилирования 4E-BP1 в

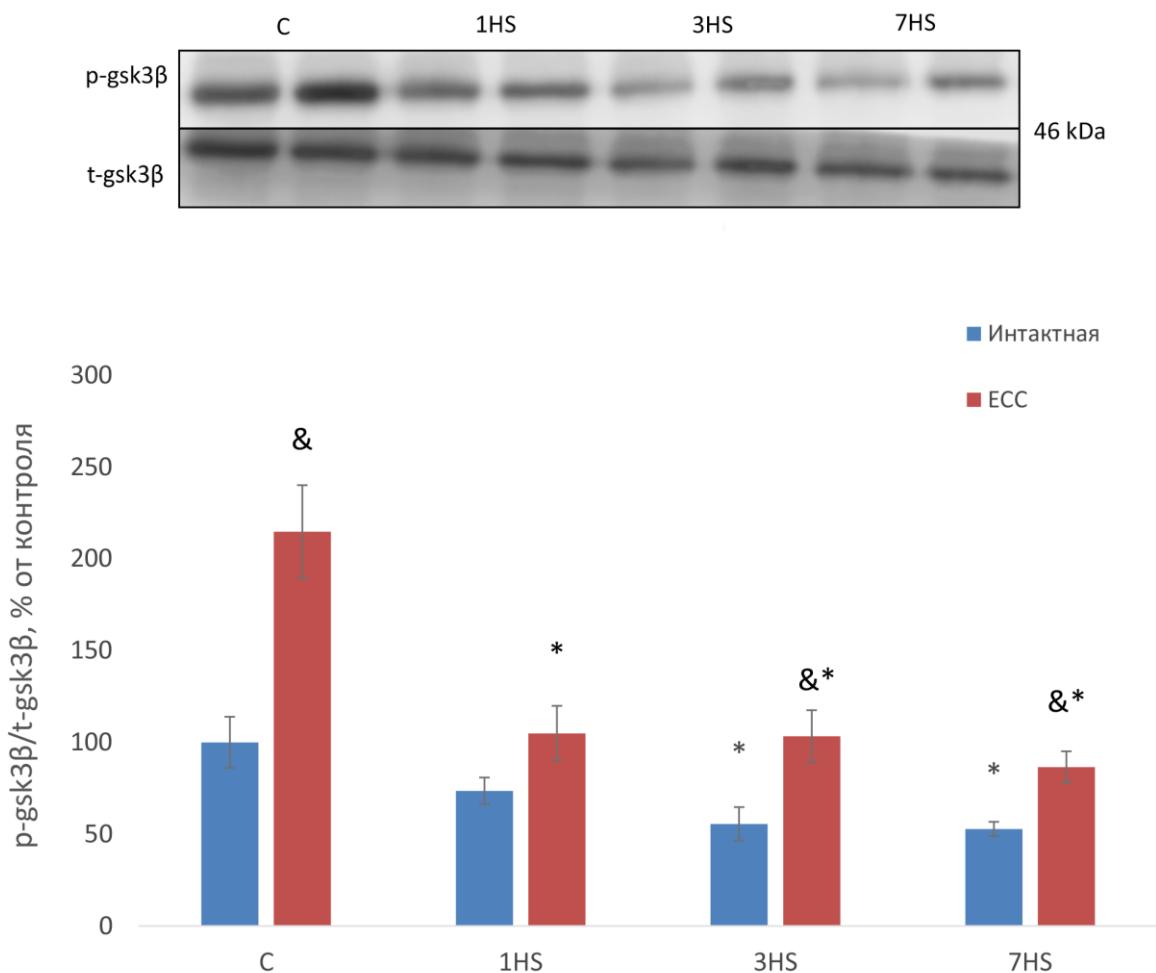
экспериментальных группах между интактной мышцей и мышцей после эксцентрических сокращений не наблюдалось (*Таб. 3*).



*Рис. 17 Содержание фосфорилированной (Thr37/46) формы 4E-BP1, в процентах от контроля. C – контроль, 1HS – первые сутки вывешивания, 3HS – третий сутки вывешивания, 7HS – седьмые сутки вывешивания. * - достоверное отличие между контролем и группами с соответствующим вывешиванием ($p<0,05$). & - достоверное отличие между интактными мышцами и мышцами с ECC ($p<0,05$)*

Содержание фосфорилированной формы киназы гликоген синтазы (р-GSK-3 β) достоверно снизилось относительно контроля на 45% к третьим суткам вывешивания и на 48% к 7 суткам, а также достоверно возросло во всех группах с ECC относительно интактных мышц (*Рис. 18*). При этом прирост

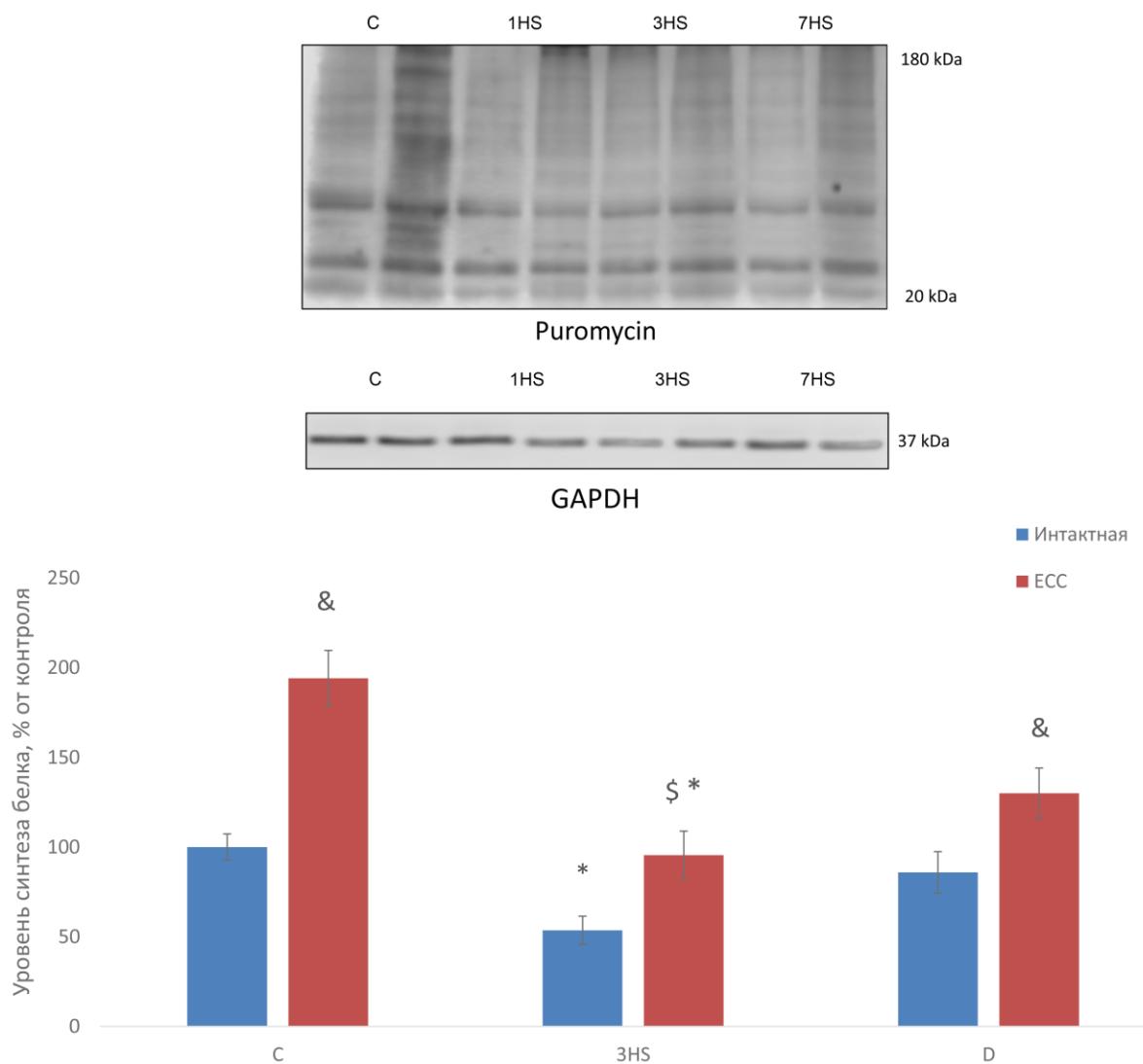
содержания p-GSK-3 β достоверно снизился во всех вывешенных группах (Таб.3).



*Рис. 18 Содержание фосфорилированной (Ser9) формы GSK-3 β , в процентах от контроля. C – контроль, 1HS – первые сутки вывешивания, 3HS – трети сутки вывешивания, 7HS – седьмые сутки вывешивания. * - достоверное отличие между контролем и группами с соответствующим вывешиванием ($p<0,05$). & - достоверное отличие между интактными мышцами и мышцами с ECC ($p<0,05$)*

Между группами с интактными мышцами достоверное снижение уровня синтеза белка на 42% ($p<0,05$) от контроля наблюдалось уже к третьим суткам вывешивания. Синтез белка достоверно увеличился ($p<0,05$) для всех групп с ECC относительно интактных групп, за исключением группы «1HS» (Рис. 19).

Прирост синтеза белка в мышце после механической нагрузки относительно интактной мышцы достоверно снизился во всех вывешенных группах (*Таб.3*).



*Рис. 19 Уровень синтеза белка, измеренный пуромициновым методом, в процентах от контроля. С – контроль, 1HS – первые сутки вывешивания, 3HS – третий сутки вывешивания, 7HS – седьмые сутки вывешивания. * - достоверное отличие между контролем и группами с соответствующим вывешиванием ($p<0,05$). & - достоверное отличие между интактными мышцами и мышцами с ECC ($p<0,05$)*

Таблица 3 Изменение фосфорилирования анаболических маркеров и уровня синтеза белка в мышце после эксцентрических сокращений относительно интактной мышцы

Группа	P70S6k	p90RSK	4E-BP1	GSK-3β	Синтез белка
C	246,7±23,7	56,3±5,6	-301,5±66,3	123,7±13,6	134,5±25,4
1HS	197,6±25,6	61,4±9,2	-341,4±25,4	74,1±6,1*	53,1±17,4*
3HS	145,4±19,9*	44,2±14,7	-342,7±73,1	93,8±5,2*	57,4±14,9*
7HS	152,1±17,4*	66,1±14,1	-332,4±30,4	84,5±15,8*	70,1±5,5*

C – контроль, 1HS – первые сутки вывешивания, 3HS – третьи сутки вывешивания, 7HS – седьмые сутки вывешивания. * - достоверное отличие от контроля ($p<0,05$). Данные представлены в виде средних ± стандартная ошибка среднего

3.3 Исследование влияния механочувствительных каналов на реализацию механического сигнала после стандартной нагрузки ex vivo на фоне 7 суточного вывешивания

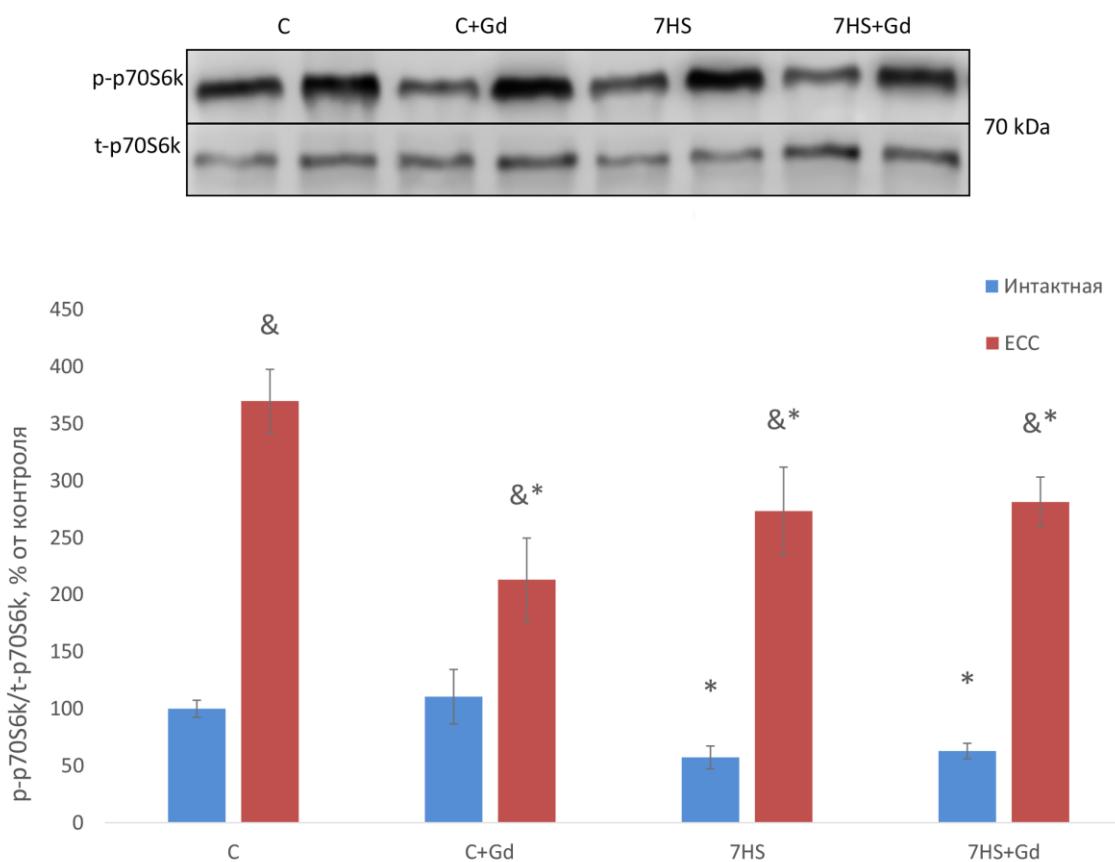
Вес крыс из всех экспериментальных групп достоверно не отличался от веса контрольных животных. Масса камбаловидной мышцы, нормированная к массе тела животного, достоверно ($p<0,05$) снизилась относительно контроля к 7-суткам вывешивания (Табл. 4).

Таблица 4 Вес животных и нормированный вес камбаловидной мышцы

Группа	Вес животного, г	Нормированный вес m.soleus, мг/г
C	225,5±16	0,43±0,03
C+Gd	219,8±28	0,44±0,04
7HS	226,6±18	0,31±0,03*
7HS+Gd	235,6±23	0,35±0,03*

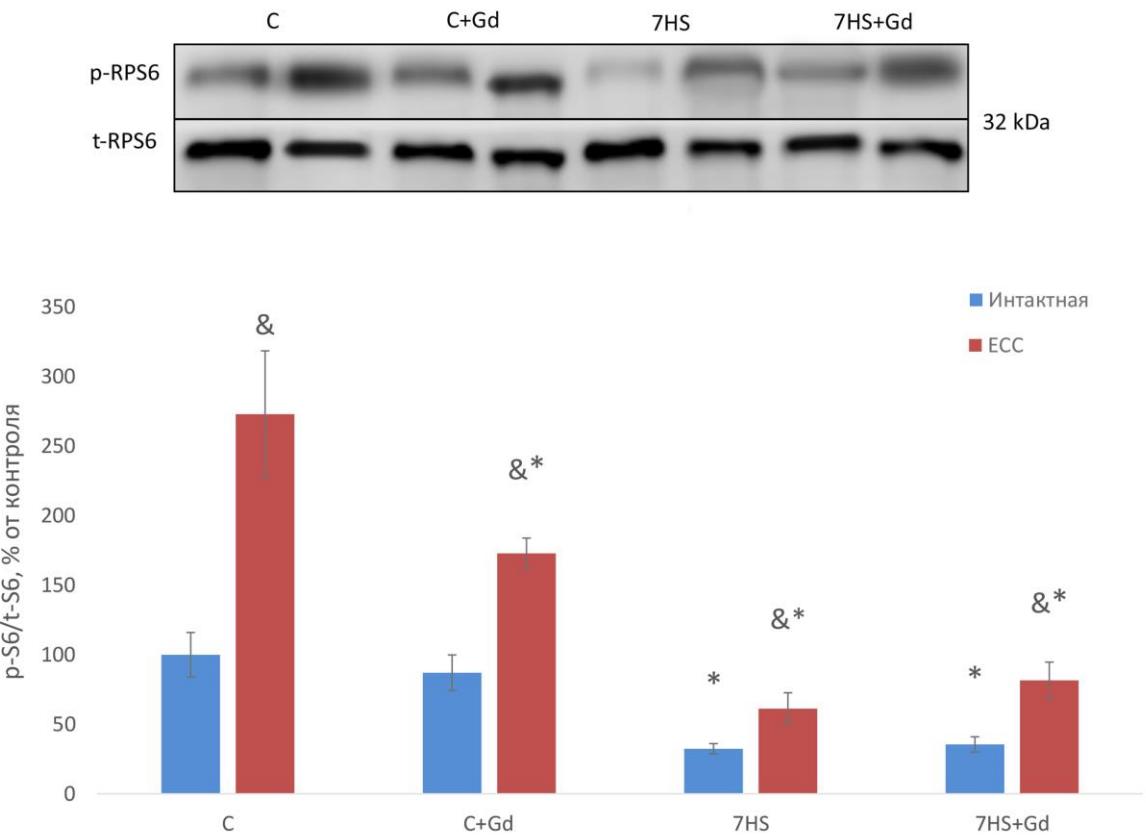
*C – контроль, C+Gd – контроль с введением ингибитора SAC, 7HS – 7 суток вывешивания, 7HS+Gd - 7 суток вывешивания с введением ингибитора SAC. * - достоверное отличие от контроля ($p<0,05$). Данные представлены в виде средних \pm стандартная ошибка среднего*

Между группами с интактными мышцами достоверное снижение фосфорилирования p70S6k на 43% ($p<0,05$) от контроля наблюдалось к седьмым суткам вывешивания, при этом в группе с дополнительным введением ингибитора SAC наблюдалось аналогичное снижение (Рис.20). Содержание фосфорилированной формы рибосомальной киназы p70S6k оказалось достоверно увеличено ($p<0,05$) для всех групп с ECC относительно интактных групп. Ингибитор SAC снижал прирост содержания фосфорилированной формы p70S6k в группе «C+Gd» относительно чистой контрольной группы после эксцентрической нагрузки. При этом, между группами «7HS» и «7HS+Gd» достоверных отличий в приросте содержания p-p70S6k не наблюдалось (Табл.5).



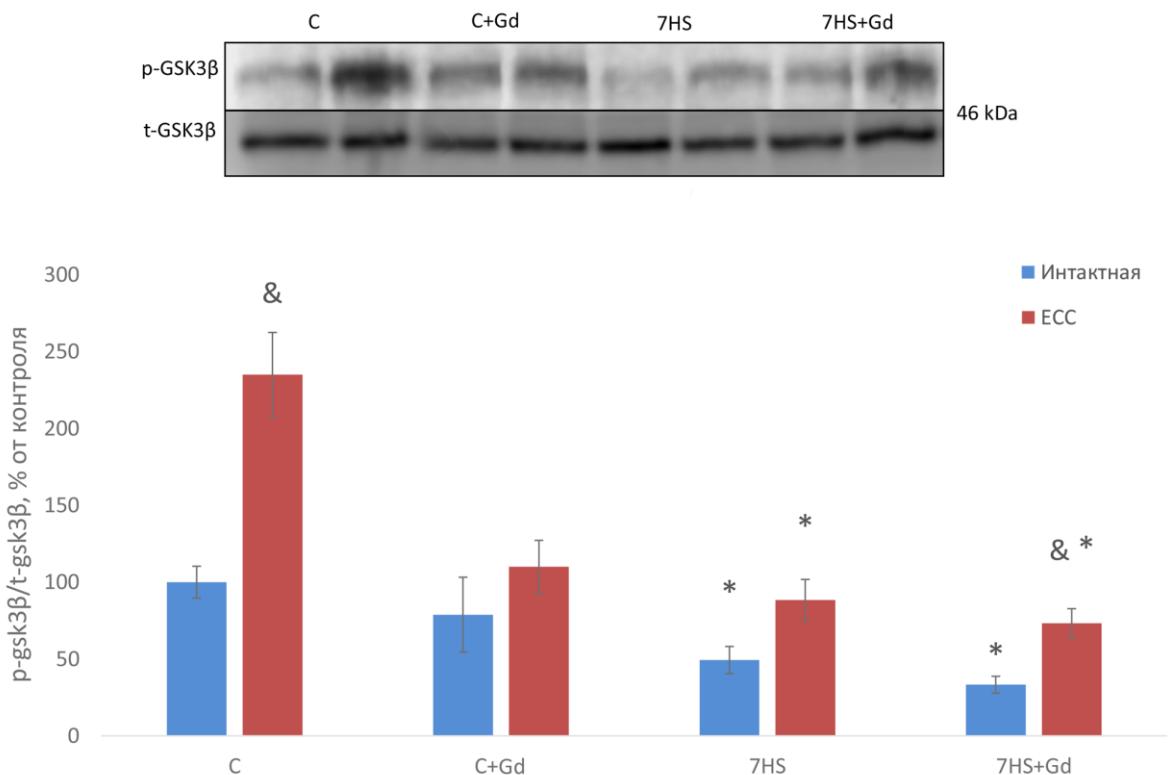
*Рис. 20 Содержание фосфорилированной (Thr389) формы рибосомальной киназы p70S6k, в процентах от контроля. C – контроль, C+Gd – контроль с введением ингибитора SAC, 7HS – 7 суток вывешивания, 7HS+Gd - 7 суток вывешивания с введением ингибитора SAC. * - достоверное отличие между контролем и экспериментальными группами ($p<0,05$). & - достоверное отличие между интактными мышцами и мышцами с ECC ($p<0,05$)*

Между группами с интактными мышцами достоверное ($p<0,05$) снижение содержания фосфорилированной формы субстрата p70S6k – S6 рибосомального белка (p-RPS6) на 68% от контроля наблюдалось к седьмым суткам вывешивания. При этом в группе с дополнительным введением ингибитора SAC наблюдалось похожее снижение на 66% (Рис.21). Содержание p-RPS6 достоверно увеличилось ($p<0,05$) для всех групп с ECC относительно интактных групп (Рис.21). Прирост содержания p-RPS6 после эксцентрической нагрузки относительно интактных мышц достоверно снизился в группе «C+Gd» на 94%. При этом в группах «7HS» и «7HS+Gd» было зафиксировано аналогичное снижение (Табл.5)



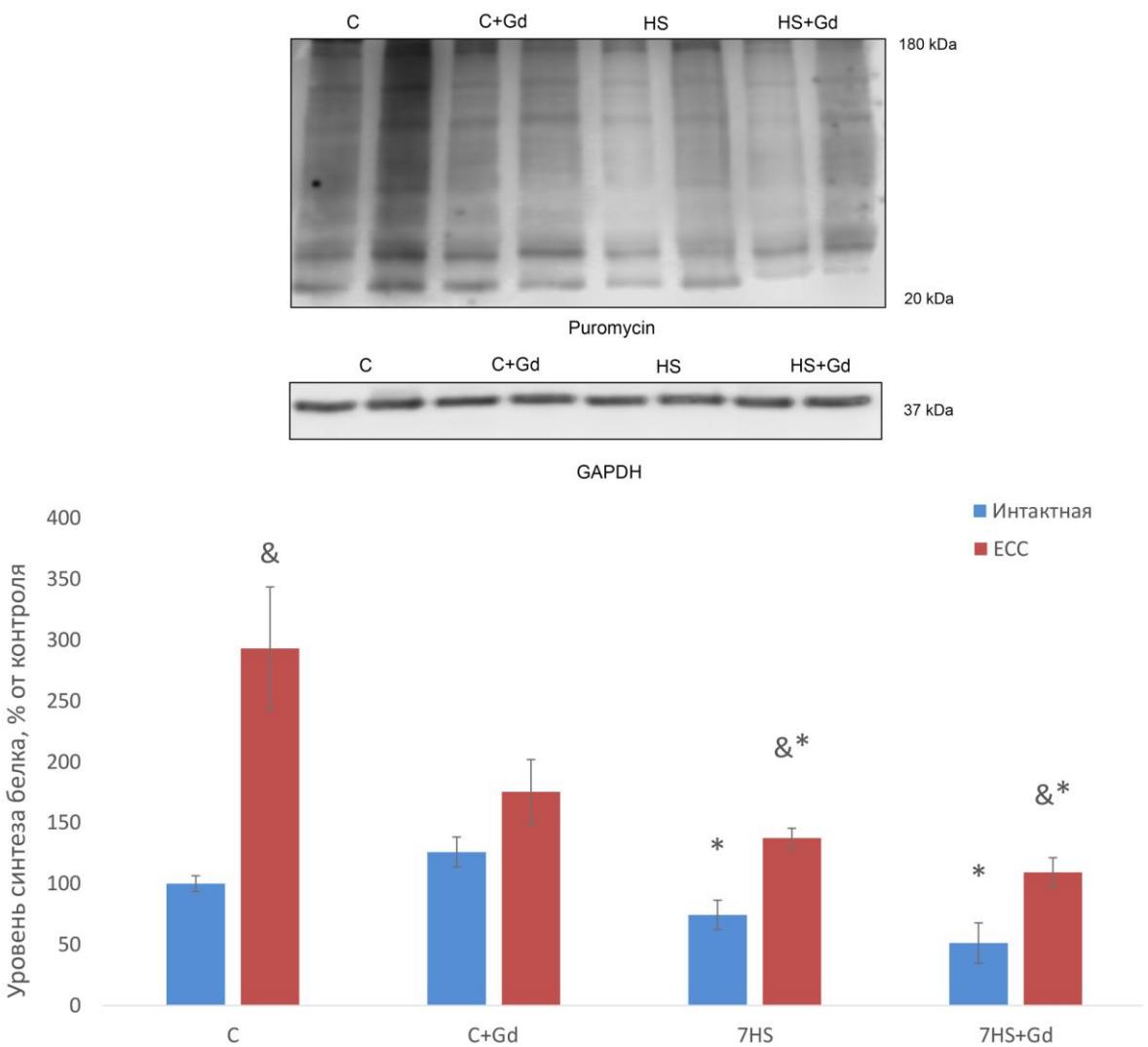
*Рис. 21 Содержание фосфорилированной (Ser240/244) формы S6 рибосомального белка, в процентах от контроля. C – контроль, C+Gd – контроль с введением ингибитора SAC, 7HS – 7 суток вывешивания, 7HS+Gd - 7 суток вывешивания с введением ингибитора SAC. * - достоверное отличие между контролем и экспериментальными группами ($p<0,05$). & - достоверное отличие между интактными мышцами и мышцами с ECC ($p<0,05$)*

Между группами с интактными мышцами наблюдалось достоверное ($p<0,05$) снижение фосфорилирования GSK-3 β на 51% к 7 седьмым суткам вывешивания, при этом в группе с дополнительным введением ингибитора SAC было схожее снижение на 67% (Рис.23). Содержание фосфорилированной формы GSK-3 β достоверно увеличилось после эксцентрической нагрузки ($p<0,05$) во всех экспериментальных группах, кроме «C+Gd» (Рис.23). При этом, прирост содержания p-GSK-3 достоверно снизился во всех экспериментальных группах относительно чистой контрольной группы (Табл.5).



*Рис. 23 Содержание фосфорилированной (Ser9) формы GSK-3 β , в процентах от контроля. C – контроль, C+Gd – контроль с введением ингибитора SAC, 7HS – 7 суток вывешивания, 7HS+Gd - 7 суток вывешивания с введением ингибитора SAC. * - достоверное отличие между контролем и экспериментальными группами ($p<0,05$). & - достоверное отличие между интактными мышцами и мышцами с ECC ($p<0,05$)*

Уровень синтеза белка достоверно снизился в интактной мышце на 40% на седьмые сутки вывешивания, при этом в группе с дополнительным введением ингибитора SAC наблюдалось схожее снижение на 39% (Рис.24). Уровень синтеза белка достоверно повысился ($p<0,05$) во всех группах с ECC относительно интактных групп, кроме группы «C+Gd». При этом прирост уровня синтеза белка после эксцентрической нагрузки достоверно снизился во всех экспериментальных группах относительно контроля (Табл.5).



*Рис. 24 Уровень синтеза белка, измеренный пуромициновым методом, в процентах от контроля. C – контроль, C+Gd – контроль с введением ингибитора SAC, 7HS – 7 суток вывешивания, 7HS+Gd - 7 суток вывешивания с введением ингибитора SAC. * - достоверное отличие между контролем и экспериментальными группами ($p<0,05$). & - достоверное отличие между интактными мышцами и мышцами с ECC ($p<0,05$)*

Таблица 5 Изменение фосфорилирования анаболических маркеров и уровня синтеза белка в мышце после эксцентрических сокращений относительно интактной мышцы

Группа	P70S6k	RPS6	GSK-3β	Синтез белка
C	298,2±35,2	181,3±21,6	144,2±11,86	217,52±38,5
C+Gd	215,3±23,1*	87,2±7,3*	80,4±9,07*	45,23±5,9*
7HS	213,2±21,3*	79,4±8,34*	101,5±7,84*	77,3±11,3*
7HS+Gd	219,7±29,2*	99,6±10,94*	105,4±14,55*	115,34±20,8*

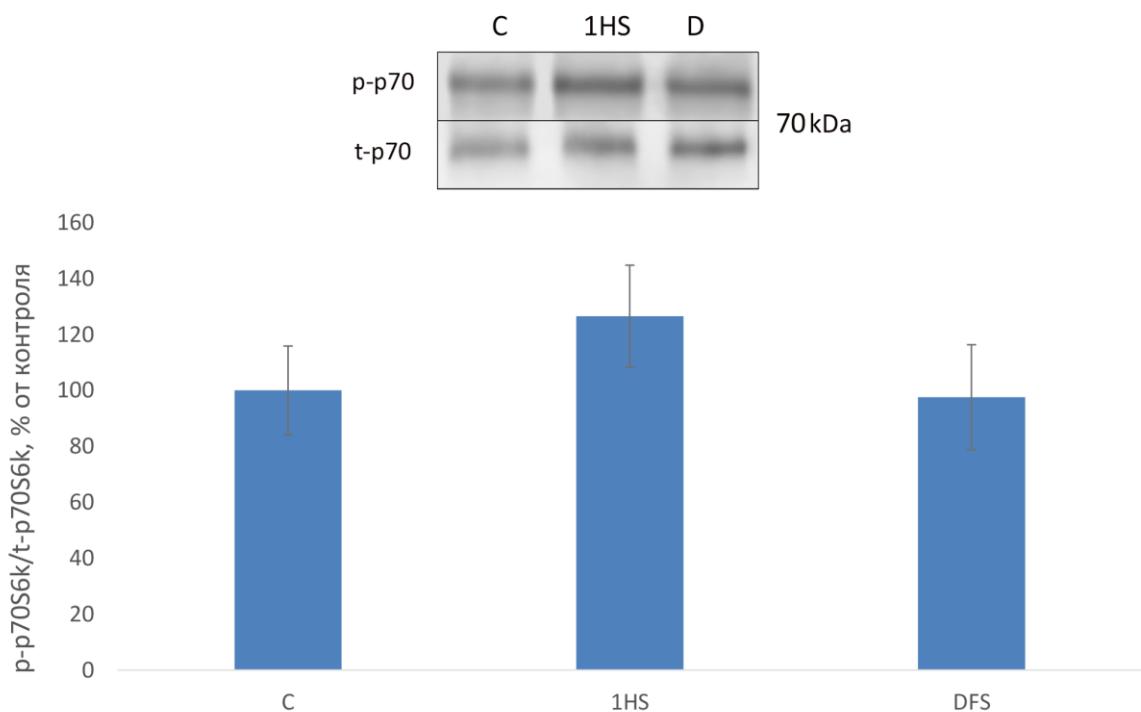
*C – контроль, C+Gd – контроль с введением ингибитора SAC, 7HS – 7 суток вывешивания, 7HS+Gd - 7 суток вывешивания с введением ингибитора SAC. * - достоверное отличие между контролем и экспериментальными группами ($p<0,05$). Данные представлены в виде средних ± стандартная ошибка среднего*

3.4 Изучение роли опорной афферентации в поддержании стабильности анаболических процессов в постуральной мышце млекопитающих на фоне 1 и 3 суточного вывешивания

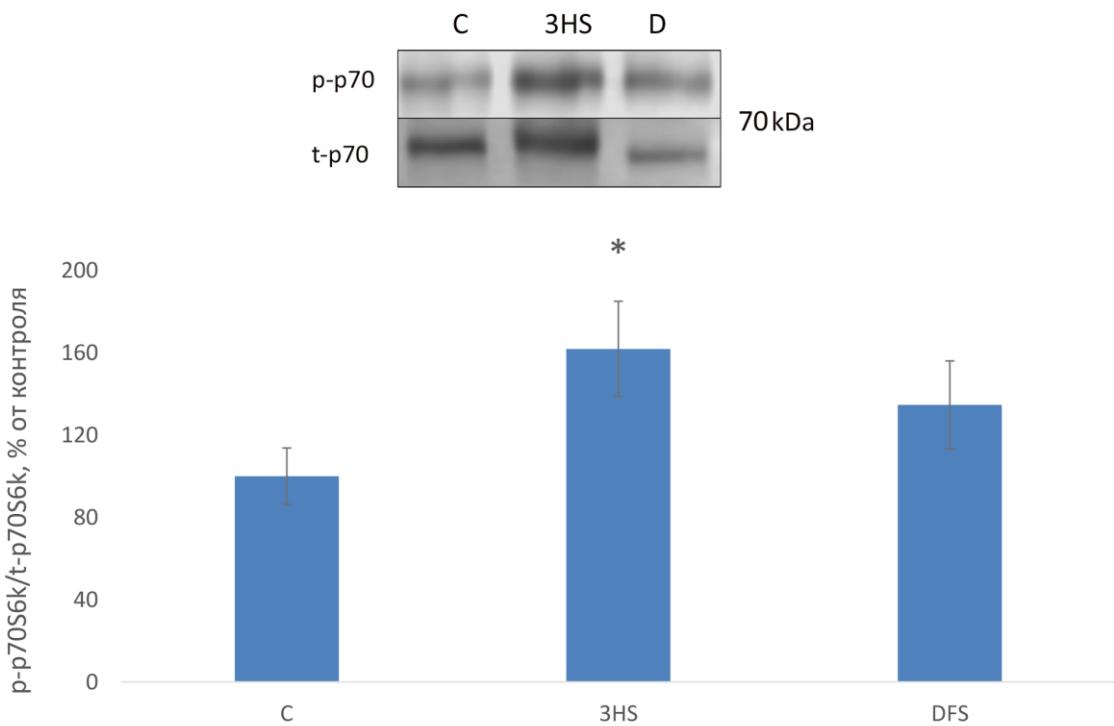
Вес крыс из всех экспериментальных групп достоверно не отличался от веса контрольных животных. Масса камбаловидной мышцы, нормированная к массе тела животного, не изменялась к 1 и 3 суткам вывешивания. В группах с опорной стимуляцией (D) также не наблюдалось отличий по нормированной массе камбаловидной мышцы.

Одним из ключевых сигнальных путей, регулирующих синтез белка на уровне инициации трансляции, является сигнальный путь IGF-1/Akt/mTORC1, эффекторами которого являются рибосомальная киназа p70S6k и белок, связывающий фактор инициации трансляции 4E-BP1. Содержание фосфорилированной формы рибосомальной киназы p70S6k достоверно не

изменялось после 1 суток вывешивания (*Рис.25*). Однако после 3 суток наблюдалось достоверное ($p<0,05$) увеличение фосфорилирования p70S6k на 23% (*Рис.26*). Опорная стимуляция не изменяла уровень фосфорилирования p70S6k после 1 суток вывешивания и предотвращала его повышение после 3 суток вывешивания.

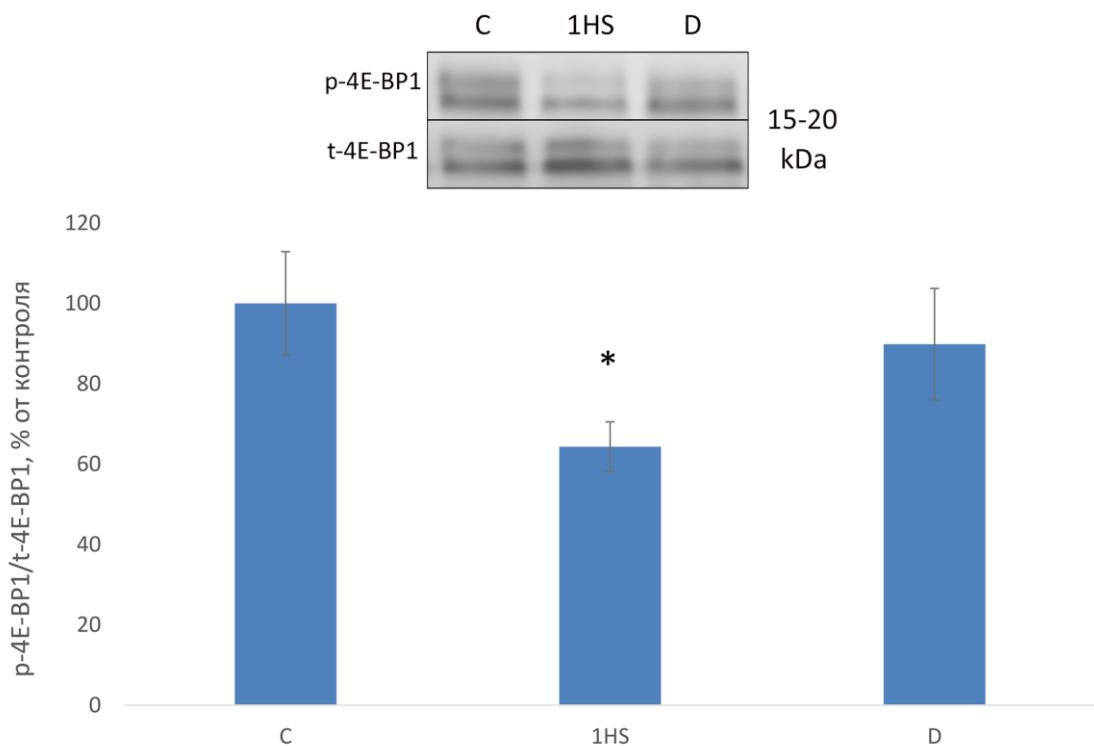


*Рис.25 Содержание фосфорилированной (Thr389) формы рибосомальной киназы p70S6k, в процентах от контроля. C – контроль, 1HS – 1-суточное антиортостатическое вывешивание; D – опорная стимуляция (4 часа) на фоне 1-суточного антиортостатического вывешивания. * - достоверное отличие между контролем и экспериментальными группами ($p<0,05$)*

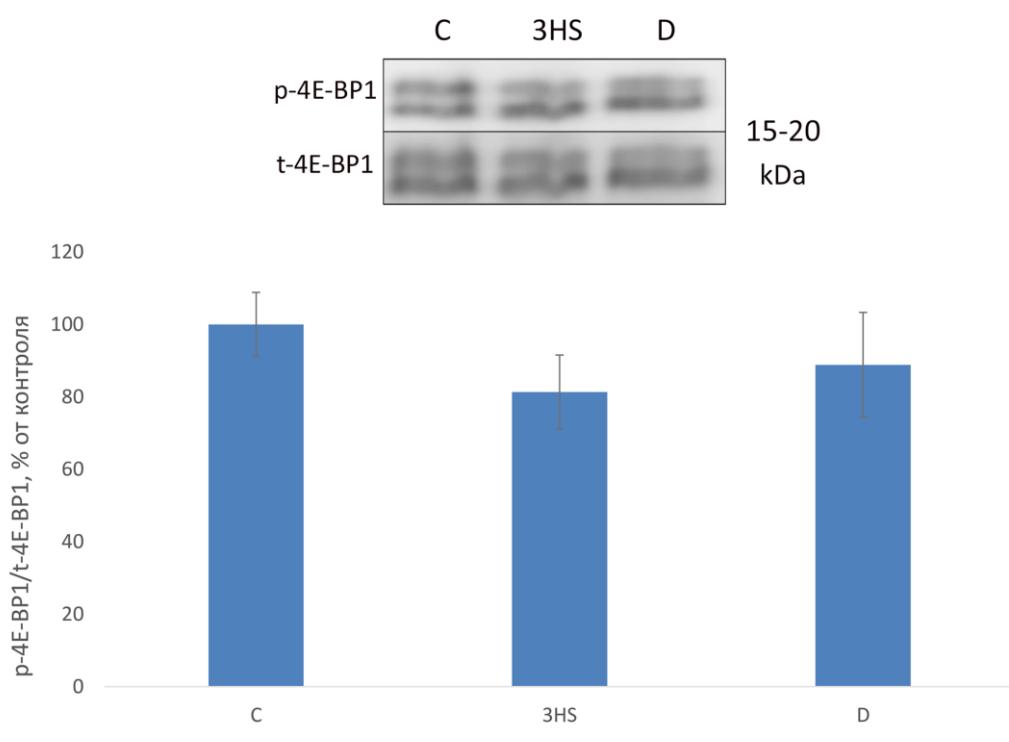


*Рис.26 Содержание фосфорилированной (Thr389) формы рибосомальной киназы p70S6k, в процентах от контроля. C – контроль, 3HS – 3-суточное антиортостатическое вывешивание; D – опорная стимуляция (4 часа) на фоне 3-суточного антиортостатического вывешивания. * - достоверное отличие между контролем и экспериментальными группами ($p<0,05$)*

Фосфорилирование 4E-BP1 достоверно снизилось на 1 сутки вывешивания, при этом опорная стимуляция предотвращала это снижение. На 3 сутки достоверные различия между группами отсутствовали (Рис.27, 28).

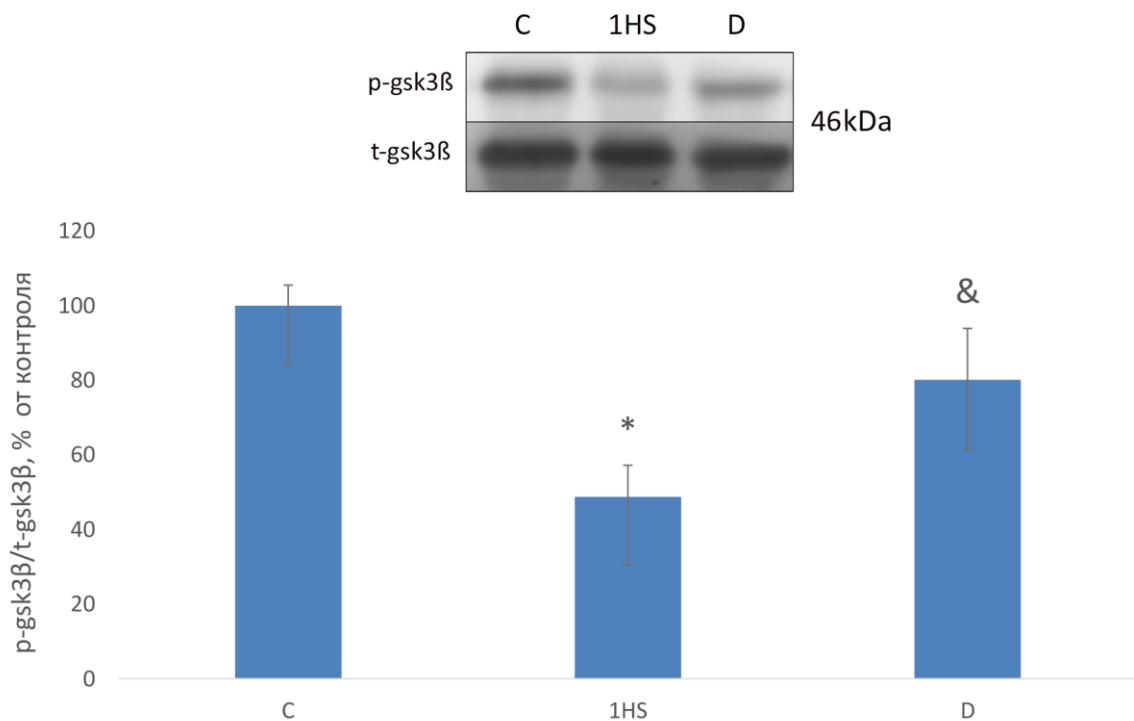


*Рис.27 Содержание фосфорилированной (Thr37/46) формы 4E-BP1, в процентах от контроля. C – контроль, 1HS – 1-суточное антиортостатическое вывешивание; D – опорная стимуляция (4 часа) на фоне 1-суточного антиортостатического вывешивания. * - достоверное отличие между контролем и экспериментальными группами ($p<0,05$)*

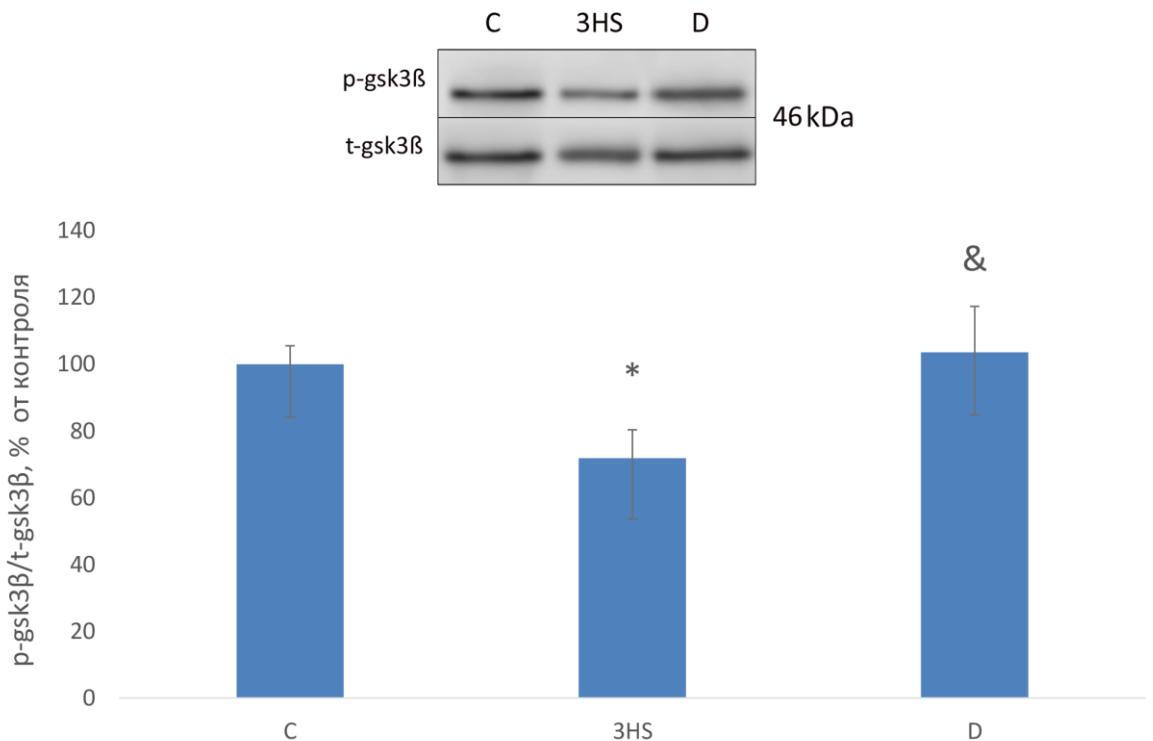


*Рис.28 Содержание фосфорилированной (Thr37/46) формы 4E-BP1, в процентах от контроля. C – контроль, 3HS – 3-суточное антиортостатическое вывешивание; D – опорная стимуляция (4 часа) на фоне 3-суточного антиортостатического вывешивания. * - достоверное отличие между контролем и экспериментальными группами ($p<0,05$)*

Регуляция инициации трансляции может также происходить через киназу гликогенсинтазы gsk-3 β , для которой наблюдалось достоверное ($p<0,05$) снижение фосфорилирования как на 1, так и на 3 сутки вывешивания. Опорная стимуляция возвращала фосфорилирование gsk-3 β на контрольный уровень (*Рис.29, 30*).

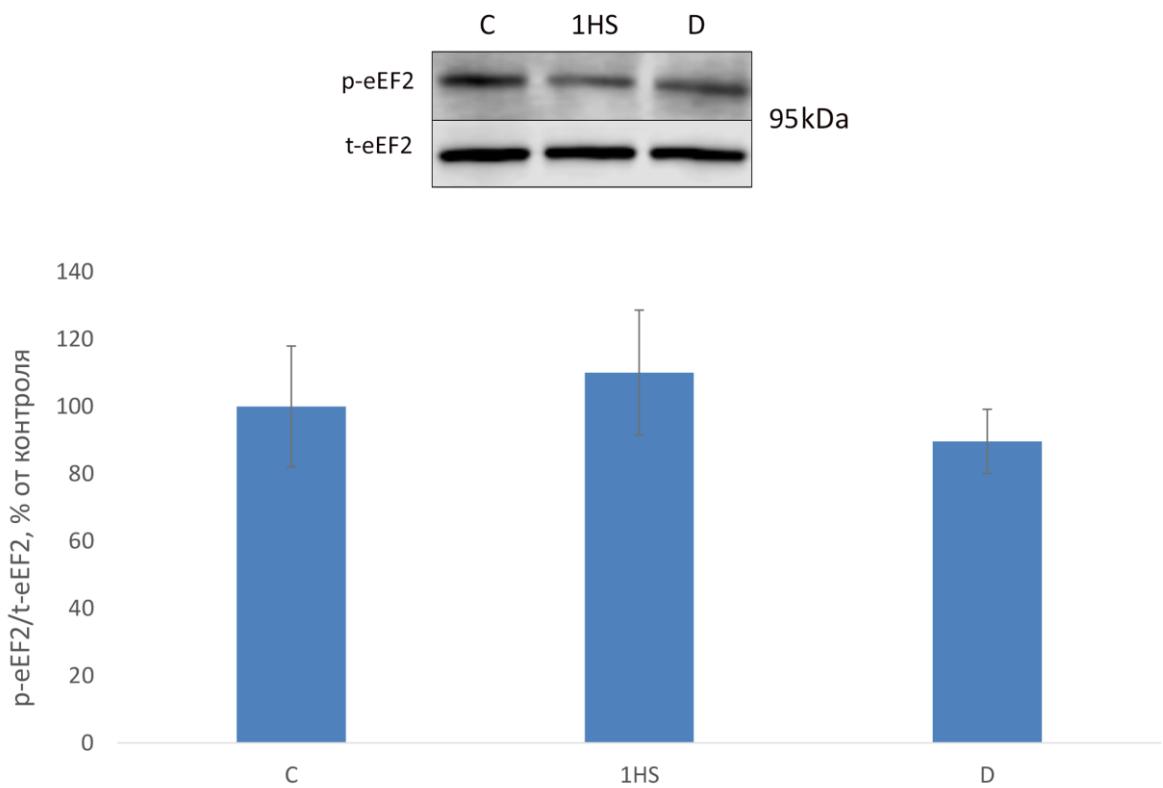


*Рис.29 Содержание фосфорилированной (Ser9) формы gsk-3 β , в процентах от контроля. C – контроль, 1HS – 1-суточное антиортостатическое вывешивание; D – опорная стимуляция (4 часа) на фоне 3-суточного антиортостатического вывешивания. * - достоверное отличие между контролем и экспериментальными группами. & - достоверное отличие от группы чистого вывешивания ($p<0,05$)*

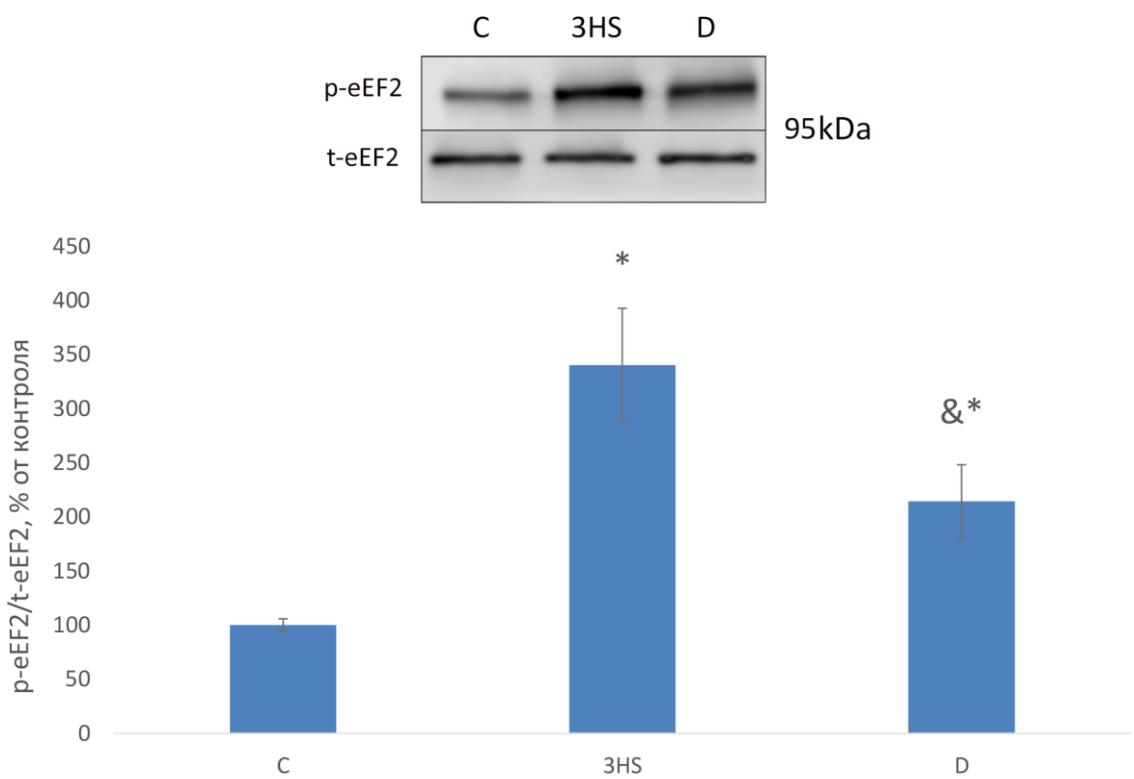


*Рис.30 Содержание фосфорилированной (Ser9) формы GSK-3 β , в процентах от контроля. C – контроль, 3HS – 3-суточное антиортостатическое вывешивание; D – опорная стимуляция (4 часа) на фоне 3-суточного антиортостатического вывешивания. * - достоверное отличие между контролем и экспериментальными группами. & - достоверное отличие от группы чистого вывешивания ($p<0,05$)*

В регуляции элонгации трансляции важная роль принадлежит эукариотическому фактору элонгации трансляции eEF2, гиперфосфорилирование которого ведет к ингибиции элонгации. После 1 суток вывешивания содержание фосфорилированной формы eEF2 не изменялось в экспериментальных группах (Рис.31). При этом фосфорилирование eEF2 достоверно ($p<0,05$) увеличилось в три раза после 3 суток вывешивания. Опорная стимуляция значительно снижала это повышение, но не возвращала фосфорилирование на контрольный уровень (Рис.32).

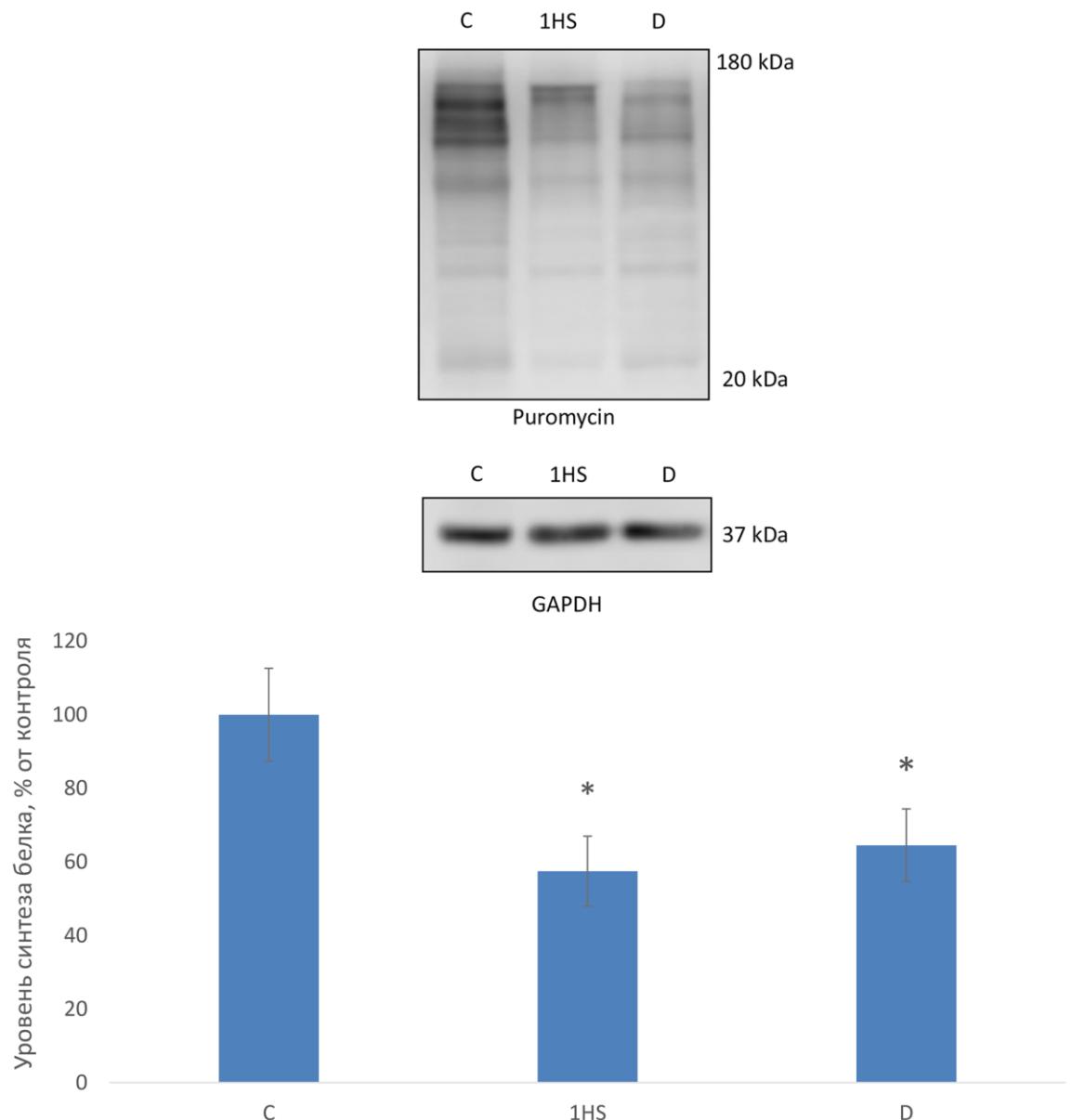


*Рис.31 Содержание фосфорилированной (Thr56) формы eEF2, в процентах от контроля. C – контроль, 1HS – 1-суточное антиортостатическое вывешивание; D – опорная стимуляция (4 часа) на фоне 1-суточного антиортостатического вывешивания. * - достоверное отличие между контролем и экспериментальными группами ($p<0,05$)*

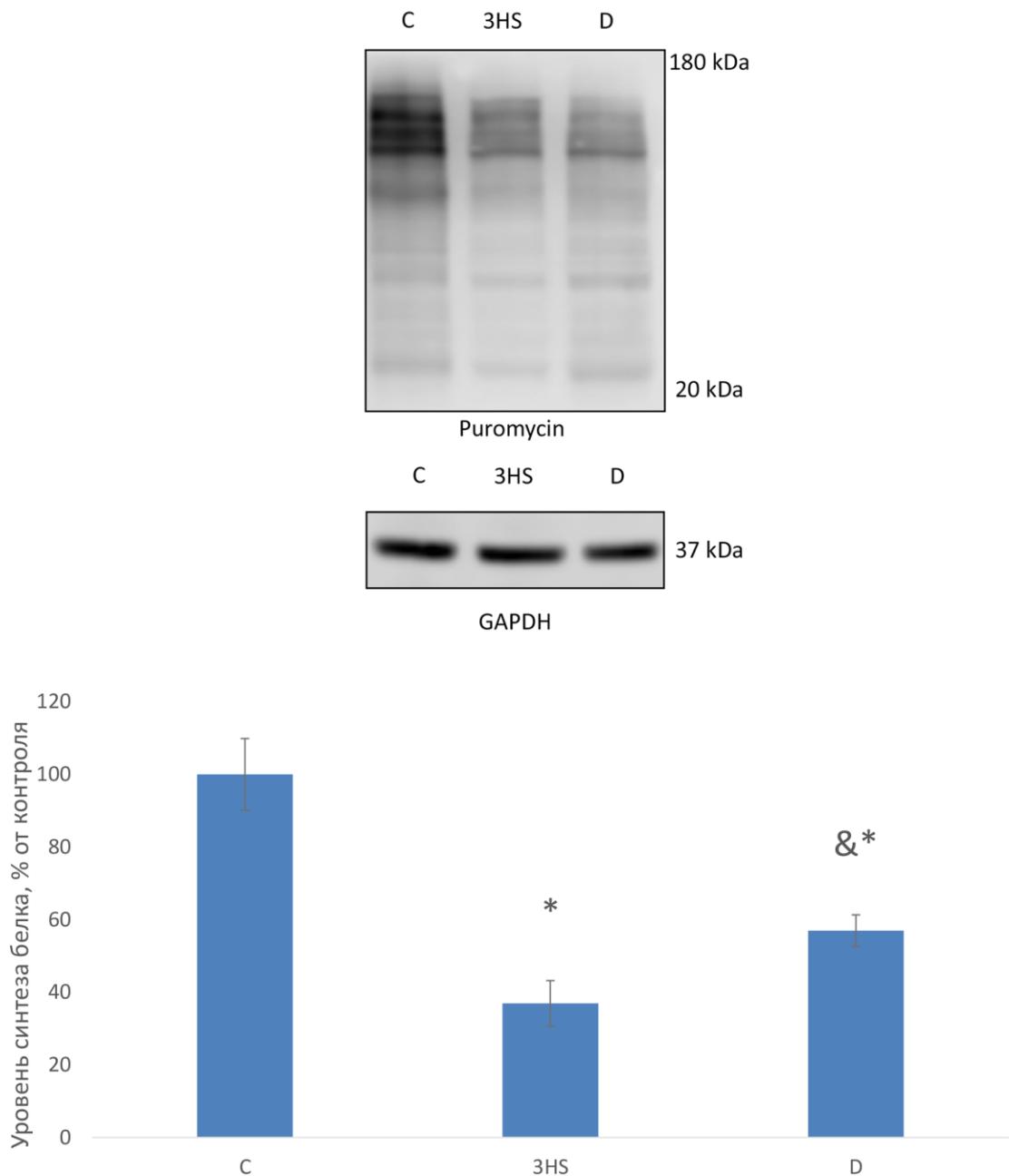


*Рис.32 Содержание фосфорилированной (Thr56) формы eEF2, в процентах от контроля. C – контроль, 3HS – 3-суточное антиортостатическое вывешивание; D – опорная стимуляция (4 часа) на фоне 3-суточного антиортостатического вывешивания. * - достоверное отличие между контролем и экспериментальными группами. & - достоверное отличие от группы чистого вывешивания ($p<0,05$)*

Интенсивность синтеза белка достоверно ($p<0,05$) снизилась после первых суток вывешивания на 42% от контрольного уровня. Опорная стимуляция не предотвращала это снижение (Рис.33). После 3 суток вывешивания наблюдалось еще большее снижение синтеза белка по сравнению с контрольным уровнем. Опорная стимуляция частично предотвращала это снижение – группа «D» достоверно отличалась от чистой вывешенной группы (Рис.34).



*Рис.33 Уровень синтеза белка, измеренный пуромициновым методом, в процентах от контроля. C – контроль, 1HS – 1-суточное антиортостатическое вывешивание; D – опорная стимуляция (4 часа) на фоне 1-суточного антиортостатического вывешивания. * - достоверное отличие между контролем и экспериментальными группами ($p<0,05$)*



*Рис.34 Уровень синтеза белка, измеренный пуромициновым методом, в процентах от контроля. C – контроль, 3HS – 3-суточное антиортостатическое вывешивание; D – опорная стимуляция (4 часа) на фоне 3-суточного антиортостатического вывешивания. * - достоверное отличие между контролем и экспериментальными группами. & - достоверное отличие от группы чистого вывешивания ($p<0,05$)*

Электрофоретический анализ 28S рибосомальной РНК показал достоверное ($p<0,05$) снижение количества РНК в расчёте на мг мышечной

ткани в обеих вывешенных группах животных (на 52% в группе 1HS и на 49% в группе D по сравнению с группой виварного контроля). Электрофоретический анализ 18S рибосомальной РНК также показал достоверное ($p<0,05$) снижение количества РНК в расчёте на мг мышечной ткани в обеих 1-суточных вывешенных группах животных (на 54% в группе 1HS и на 66% в группе D) по сравнению с группой виварного контроля. Снижение содержания 18S и 28S РНК наблюдалось также и на третий сутки вывешивания (Табл.6).

Таблица 6 Содержание 18S и 28S pРНК в камбаловидной мышце крысы в расчёте на мг мышечной ткани

Группа	18S РНК 1 сутки вывешивания, $2^{-\Delta\Delta Ct}$	28S РНК 1 сутки вывешивания, $2^{-\Delta\Delta Ct}$	18S РНК 3 сутки вывешивания, $2^{-\Delta\Delta Ct}$	28S РНК 3 сутки вывешивания, $2^{-\Delta\Delta Ct}$
C	1 (0,86-1,09)	1 (0,98-1,07)	1 (0,87-1,66)	1 (0,79-1,68)
3HS	0,43 (0,34-0,62)*	0,45 (0,31-0,66)*	0,46 (0,23-0,52)*	0,5 (0,26-0,52)*
D	0,59 (0,45-0,72)*	0,55 (0,53-0,64)*	0,34 (0,18-0,68)*	0,55 (0,36-0,63)*

*C – контроль, 3HS – 3-суточное антиортостатическое вывешивание; D – опорная стимуляция (4 часа) на фоне 3-суточного антиортостатического вывешивания. * - достоверное отличие между контролем и экспериментальными группами ($p<0,05$). Данные представлены в виде медианы и интерквартильной широты (0,25—0,75)*

3.5 Исследование реализации механического сигнала при действии опорного стимула в постуральной мышце млекопитающих на фоне 3 суточного вывешивания

После 3-суточного антиортостатического вывешивания не наблюдалось достоверного изменения нормированного веса m.soleus крысы как в группе чистого вывешивания, так и в группе с опорной стимуляцией относительно контроля. Максимальная сила изометрического сокращения была достоверно снижена на 20% ($p<0,05$) для абсолютной силы и на 15% ($p<0,05$) для нормированной на ППС силы в группе чистого вывешивания относительно контроля. В группе с опорной стимуляцией достоверное снижение максимальной силы отсутствовало. При этом наблюдались схожие изменения по измерению пассивной жесткости изолированной мышцы (Табл.7).

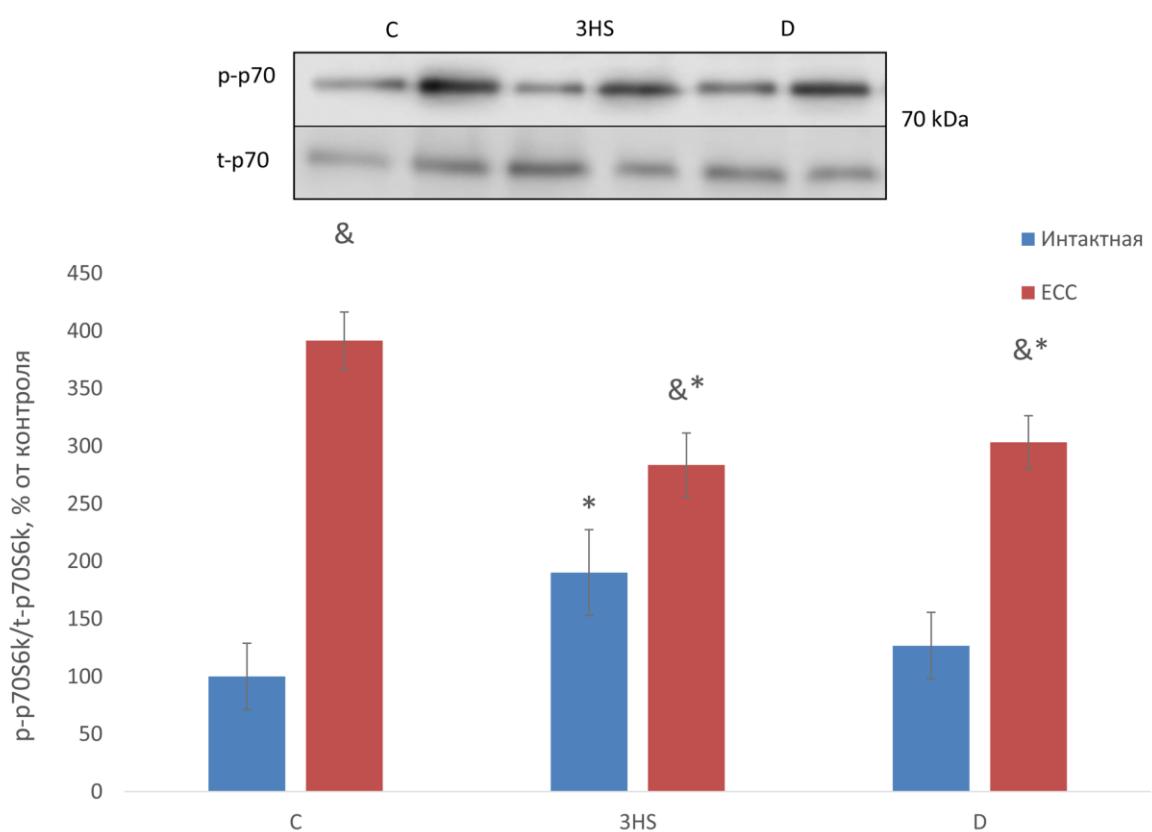
Таблица 7 Пассивное напряжение, нормированное на ППС пассивное напряжение, максимальная сила изометрического сокращения, нормированная максимальная сила изометрического сокращения

Группа	Пассивное напряжение, мН	Нормированное на ППС пассивное напряжение, Н/см ²	Максимальная сила изометрического сокращения, мН	Максимальная сила изометрического сокращения, нормированная на ППС, Н/см ²
C	119±7,3	26,5±2,1	795,6±37,5	176,3±9,9
3HS	72,1±5,5*	18,7±1,3*	638,3±9,5*	152,5±1,6*
D	103±5,9	25±1,3	683,1±69,3	169,9±20,6

*C – контроль, 3HS – 3-суточное антиортостатическое вывешивание; D – опорная стимуляция (4 часа) на фоне 3-суточного антиортостатического вывешивания. * - достоверное отличие между контролем и экспериментальными группами ($p<0,05$). Данные представлены в виде средних ± стандартная ошибка среднего*

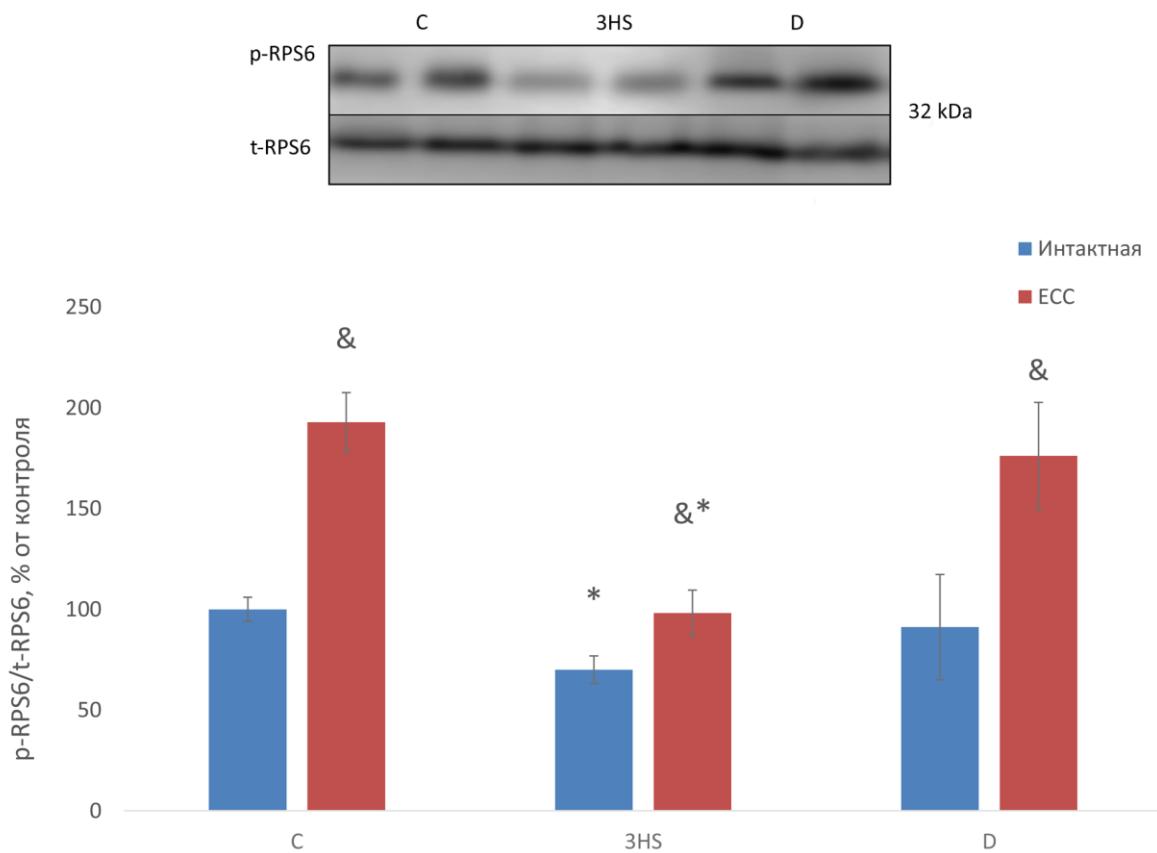
При анализе уровня фосфорилирования основной мишени mTORC1 рибосомальной киназы p70S6K было обнаружено, что уровень

fosфорилирования этого фермента в интактной мышце после 3-суточного вывешивания был достоверно выше контрольного уровня. Однако рост fosфорилирования p70S6K не наблюдался в группе с опорной стимуляцией в интактной мышце. Прирост содержания fosфорилированной p70S6K после эксцентрических сокращений был на 65% ($p<0,05$) ниже у вывешенных животных по сравнению с контрольной группой. При этом, в группе с опорной стимуляцией снижение прироста p-p70S6K после эксцентрических сокращений не наблюдалось (Табл.8).



*Рис. 35 Содержание fosфорилированной (Thr389) формы рибосомальной киназы p70S6k, в процентах от контроля. C – контроль, 3HS – 3-суточное антиортостатическое вывешивание; D – опорная стимуляция (4 часа) на фоне 3-суточного антиортостатического вывешивания. * - достоверное отличие между контролем и экспериментальными группами ($p<0,05$). & - достоверное отличие между интактными мышцами и мышцами с ECC ($p<0,05$)*

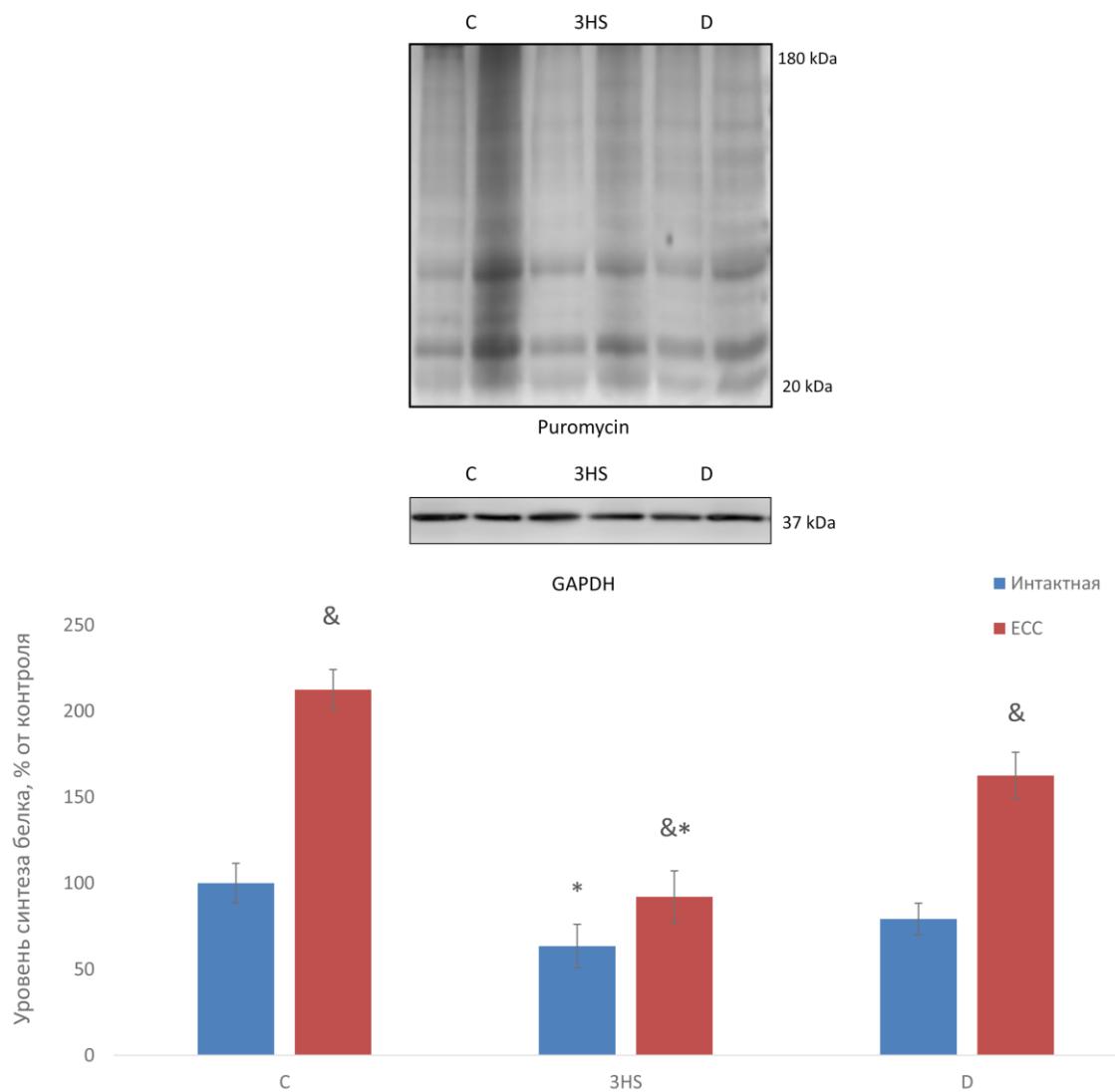
Для субстрата рибосомальной киназы p70 – S6 рибосомального белка - было обнаружено достоверное снижение уровня фосфорилирования на 32% ($p<0,05$) в интактной мышце после вывешивания относительно контрольной мышцы, при этом данное снижение не наблюдалось в группе с опорной стимуляцией. Для всех мышц после серии эксцентрических сокращений наблюдалось достоверное увеличение уровня фосфорилирования относительно интактных мышц (Рис.36). Схожим с p70S6k образом этот прирост был достоверно снижен у вывешенной группы, а в группе с опорной стимуляцией частично возвращался на контрольный уровень (Табл.8).



*Рис. 36 Содержание фосфорилированной (Ser240/244) формы S6 рибосомального белка, в процентах от контроля. С – контроль, ЗHS – 3-суточное антиортостатическое вывешивание; D – опорная стимуляция (4 часа) на фоне 3-суточного антиортостатического вывешивания. * - достоверное отличие между контролем и экспериментальными группами*

($p<0,05$). & - достоверное отличие между интактными мышцами и мышцами с ECC ($p<0,05$)

Используя методику SUnSET было обнаружено, что уровень белкового синтеза в интактной мышце после вывешивания был достоверно снижен на 37% ($p<0,05$), а при вывешивании с опорной стимулацией не отличался от контрольного (Рис. 38). Сравнивая интактные мышцы с мышцами после эксцентрических сокращений, было обнаружено достоверное увеличение синтеза белка после эксцентрических сокращений во всех группах (Рис. 38). Этот прирост был достоверно снижен в группе «3HS» на 43% (Табл.8).



*Рис. 38 Уровень синтеза белка, измеренный пуромициновым методом, в процентах от контроля. C – контроль, 3HS – 3-суточное антиортостатическое вывешивание; D – опорная стимуляция (4 часа) на фоне 3-суточного антиортостатического вывешивания. * - достоверное отличие между контролем и экспериментальными группами ($p<0,05$). & - достоверное отличие между интактными мышцами и мышцами с ECC ($p<0,05$)*

Таблица 8 Изменение фосфорилирования анаболических маркеров и уровня синтеза белка в мышце после эксцентрических сокращений относительно интактной мышцы

Группа	P70S6k	RPS6	Синтез белка
C	215,6±22,8	405,1±41,6	187,2±24,1
3HS	150,4±16,4*	196,7±26,4*	144,1±15,1*
D	223,9±19,7	256,4±33,7*	199,4±19,7

*C – контроль, 3HS – 3-суточное антиортостатическое вывешивание; D – опорная стимуляция (4 часа) на фоне 3-суточного антиортостатического вывешивания. * - достоверное отличие между контролем и экспериментальными группами ($p<0,05$). Данные представлены в виде средних ± стандартная ошибка среднего*

4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

4.1 Исследование анаболических сигнальных путей в скелетной мышце крысы на фоне 1, 3, 7 суточного вывешивания

В проведенном эксперименте было установлено достоверное снижение интенсивности синтеза белка в камбаловидной мышце после 3 и 7 суток функциональной разгрузки. При этом наблюдалось достоверное снижение сухого веса *m.soleus* после 7-суточного вывешивания, что отражало содержание тотального белка в мышце. Это подтвердило ранее полученные в нашей лаборатории данные о снижении содержания белка в камбаловидной мышце крысы после 7 и 14 суток вывешивания [4]. Очевидно, что снижение содержания белка в камбаловидной мышце являлось следствием снижения скорости его синтеза и/или увеличением его распада. Таким образом, полученные данные подтверждают гипотезу о том, что снижение интенсивности синтеза белка может вносить вклад в развитие атрофии постуральной мышцы крысы к 7-м суткам разгрузки. Ранее двумя коллективами авторов было показано, что скорость синтеза белка в *m. soleus* крысы снижается уже после 3-х [153], 4-х [63] и 28-и [64] суток вывешивания крыс. В данных работах использовался радиоактивный метод измерения, при этом Loughna et al. оценивали фракционную скорость синтеза белка, а Fluckey et al. скорость синтеза белка *in vitro* с использованием меченого радиоактивной меткой фенилаланина. Методом SUnSET, который использовался в нашем исследовании, недавно было показано снижение скорости синтеза белка в камбаловидной мышце мыши через 7 суток иммобилизации задней конечности [257]. Регуляция биосинтеза белка осуществляется посредством протеинкиназы mTORC1, которая, как известно, может фосфорилировать свои ключевые субстраты, p70s6k и 4E-BP1, активируя процесс инициации трансляции [132]. В нашем исследовании мы получили достаточно неожиданный результат: увеличение фосфорилирования p70s6k после 1- и 3-

суточного вывешивания, т.к. ранее было показано снижение фосфорилирования данной киназы на более длительных сроках разгрузки [4, 53, 232]. Однако совсем недавно появилась работа, в которой было установлено активирование p70s6k и одновременное снижение синтеза белка в *m. soleus* мыши после 3- и 7-суточной иммобилизации задней конечности [257], что вполне согласуется с полученными нами данными. Парадоксальное повышение или поддержание активности mTORC1 и зависимой рибосомальной киназы при снижении интенсивности белкового синтеза авторы цитируемой работы считают физиологическим ответом, обусловливающим частичную компенсацию снижения содержания мышечного белка. В то же время они никак не обсуждают возможные причины такой активации mTOR-зависимого сигналинга, но предполагают, что что активация mTORC1 является попыткой физиологической системы компенсировать снижение содержания мышечного белка при развитии атрофии. Однако, полученные в нашей лаборатории данные свидетельствуют о том, что на начальном этапе разгрузки существенно снижается уровень фосфорилирования АМФ-активируемой протеинкиназы (AMPK) [245]. Известно, что этот фермент является эффективным ингибитором mTORC1 [186]. Не исключено, что именно снижение уровня фосфорилирования AMPK приводит к активации mTORC1 и соответственно к увеличению фосфорилирования p70s6k. Снижение фосфорилирования 4E-BP1 в нашей работе наблюдалось только после 1-суточного вывешивания. В литературе имеются противоречивые данные, касающиеся содержания фосфо-4E-BP1 в камбаловидной мышце после разгрузки. Так, в одних исследованиях фосфорилирование 4E-BP1 не менялось после 3 и 7 суток разгрузки [34], тогда как в других снижалось на более длительных сроках вывешивания [53]. Полученные нами данные о снижении фосфорилирования Akt и GSK-3 β на 3 и 7 сутки разгрузки могли свидетельствовать об ингибировании eIF2B, что, в свою очередь, могло негативно сказаться на процессе инициации кэп-зависимой трансляции. Кроме того, ингибирование биосинтеза белка (на

уровне элонгации трансляции) в «разгруженной» камбаловидной мышце могло быть обусловлено гиперфосфорилированием eEF-2, которое наблюдалось нами ранее после 3-суточного антиортостатического вывешивания [3]. Фосфорилирование p90RSK, являющегося субстратом mTORC1-независимого пути MAPK/ERK, было снижено на 3 сутки разгрузки, что согласуется с данными, полученными нами ранее [4]. Дефосфорилирование рибосомальной киназы p90RSK также могло оказать ингибирующее воздействие на инициацию трансляции.

4.2 Исследование анаболических сигнальных путей в скелетной мышце крысы после стандартной нагрузки *ex vivo* на фоне 1, 3, 7 суточного вывешивания

После изучения вклада различных анаболических сигнальных путей в регуляцию синтеза белка в камбаловидной мышце крысы на ранних сроках гравитационной разгрузки, с помощью методики SUnSET было обнаружено достоверное снижение синтеза белка после 3 и 7 суток гравитационной разгрузки. Это подтвердило ранее полученные в нашей лаборатории, данные о снижении тотального белка в *m.soleus* на 7 и 14 сутки гравитационной разгрузки [155], а также данные, полученные в других лабораториях, о снижении интенсивности синтеза белка после 3 [153] и 4 [64] суток разгрузки, полученные с помощью радиоактивно-меченых аминокислот. Снижение содержания белка в мышце отражает уменьшение скорости синтеза белка и\или увеличение его распада. Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что снижение синтеза белка вносит вклад в развитие атрофии постуральной мышцы крысы к 7-м суткам гравитационной разгрузки. Известно, что регуляция синтеза белка осуществляется с помощью белкового комплекса mTORC1, который фосфорилирует свои ключевые субстраты – p70S6k и 4E-BP1, тем самым активируя инициацию трансляции [132]. Ранее было показано снижение содержания фосфорилированной формы

p70S6k на длительных сроках гравитационной разгрузки [53, 232], что согласуется с полученными нами данными о снижении фосфорилирования p70S6k к 7 суткам антиортостатического вывешивания. При этом, в данном эксперименте мы не наблюдали повышение содержания фосфорилированной формы p70S6k на 1 и 3 сутки вывешивания, что не согласуется с данными, полученными в предыдущем эксперименте. Данное противоречие можно объяснить тем, что изолированная из голени мышца находилась в физрастворе в течение часа. По всей видимости, этого времени оказалось достаточно для изменения фосфорилирования данной киназы. Снижение фосфорилирования 4E-BP1 наблюдалось уже на 1 сутки гравитационной разгрузки и оставалось сниженным к 7 суткам, при этом в литературе есть данные о снижении фосфорилирования 4E-BP1 на длительных сроках вывешивания [53]. Снижение содержания фосфорилированной формы p90RSK, являющейся субстратом mTORC1-независимого пути MAPK-ERK, согласуется с полученными в нашей лаборатории данными [155]. Кроме того, полученные данные о снижении фосфорилирования GSK-3 β на 3 и 7 сутки могут свидетельствовать об ингибировании eIF2B, что могло также отрицательно сказать на инициации трансляции [170, 171].

Анализируя фосфорилирование белков после воздействия эксцентрическим стимулом *ex vivo*, следует учитывать, что само по себе пребывание мышцы в физрастворе, в течение часа после извлечения из организма, может повлиять на состояние изучаемых параметров сигнальных путей. Полученные нами данные свидетельствуют о прогрессивном снижении прироста интенсивности белкового синтеза и активации системы mTORC1 в *m.soleus* крысы в ответ на ЭС *ex vivo* на фоне функциональной разгрузки задних конечностей. Снижение анаболического ответа после ЭС может быть связано со значительным уменьшением силы сокращения *m.soleus* в результате гравитационной разгрузки. Однако нормированная к ППС средняя сила сокращения достоверно не отличалась между исследованными группами

животных, что говорит о том, что снижение ответа mTORC1 не было связано с уменьшением удельного напряжения камбаловидной мышцы при ЭС. Полученные результаты обращают внимание, прежде всего, на ответ mTORC1, поскольку именно его «нижележащая» киназа p70S6k снижает уровень ЭС-индуцированного фосфорилирования после экспозиции животного в условиях разгрузки. Этого не происходит с рибосомальной киназой p90RSK, что, по-видимому, может свидетельствовать о том, функциональная разгрузка не оказывает влияние на активность сигнального пути ERK/p90RSK в ответ на серию ЭС. Интересно, что в отличии от p70S6k степень фосфорилирования 4E-BP1 в ответ на серию эксцентрических сокращений была снижена по сравнению с интактным контролем. Эти данные согласуются с работой Ato и соавт. [16], в которой было показано, что в икроножной мышце крысы сразу после ЭС уровень фосфорилирования 4E-BP1 был достоверно ниже, чем в интактной мышце. По-видимому, 30 минут задержки после серии эксцентрических сокращений недостаточно для того, чтобы вызвать повышенное фосфорилирование 4E-BP1 в ответ на механический сигнал. Что касается GSK-3 β , то можно предположить, что динамика фосфорилирования данной киназы могла быть связана с изменением содержания гликогена в норме и в условиях разгрузки, когда происходит накопление гликогена в мышечных волокнах. Однако точный механизм регуляции активности GSK-3 β в ответ на ЭС на фоне разгрузки остаётся неизвестным [7]. Снижение анаболического ответа (прежде всего, прироста синтеза белка) в ходе функциональной разгрузки могло быть обусловлено нарушением как непосредственно механосенсорных структур мышечного волокна, так и сигнальных молекул, вовлечённых в mechanotransduction. Так, потенциальными механосенсорами, воспринимающими внешний механический сигнал и проводящим его к вторичным мессенджерам, могли быть как фокальная адгезивная киназа [55, 62] так и стретч-чувствительные кальциевые каналы [223]. Кроме того, важная роль в передаче механического

сигнала от поверхности мышечного волокна к анаболическим регуляторным белкам может принадлежать цитоскелету [116].

4.3 Исследование влияния механочувствительных каналов на реализацию механического сигнала после стандартной нагрузки *ex vivo* на фоне 7 суточного вывешивания

После 7 суток гравитационной разгрузки наблюдалось достоверное снижение фосфорилирования p70S6k, 4E-BP1 и S6 белка, а также общего уровня синтеза белка. Эти данные в целом согласуются с ранее полученными результатами других исследователей [20, 34, 53, 98]. При этом, в ответ на серию эксцентрических сокращений в контрольной камбаловидной мышце произошло достоверное увеличение уровня фосфорилирования p70S6k, S6 белка и GSK-3 β . Этот результат совпадает с предшествующими данными как нашей лаборатории [170], так и других исследователей [16, 74, 223]. Примечательно, что нормированная к площади поперечного сечения средняя сила сокращения камбаловидной мышцы после 7-суточной функциональной разгрузки достоверно не отличалась от контроля [170], это позволяет сделать вывод о том, что снижение ответа mTORC1 не было связано с потерей удельного напряжения камбаловидной мышцей. В *in vivo* условиях эксцентрические сокращения оказывают более значительное и быстрое накопление кальция внутри мышечного волокна, чем изометрические сокращения [221], при этом SAC вовлечены в это накопление. Было показано, что применение ингибиторов SAC (гадолиния и стрептомицина) приводит к снижению деполяризации мембранных волокон скелетных мышц [163], уменьшению фосфорилирования протеинкиназы В и p70S6k в передней большеберцовой мышце (*m. tibialis anterior*) [223], а также снижению степени гипертрофии *m. tibialis anterior* крысы при эксцентрической тренировке [162]. Также известно, что GdCl₃ функционирует в качестве неспецифического блокатора SAC в здоровой мышце крысы [162, 163], и в мышце, нокаутной по

дистрофиину [248, 254]. Кроме того, было показано, что GdCl_3 не влияет на кальциевые каналы L-типа, а значит не должен влиять на эксцентрические сокращения в значительной мере [103, 223]. В нашем эксперименте не наблюдалось отличий в сократительных свойствах мышц, находящихся в обычном растворе Рингера-Кребса, от мышц, в растворе с добавлением соли гадолиния. С помощью ингибитора стретч-чувствительных каналов GdCl_3 , был оценен вклад SAC в реализацию механического сигнала во время эксцентрической нагрузки – наблюдалось достоверное снижение фосфорилирования p70S6k и S6 белка при воздействии ингибитора на контрольные мышцы. Также наблюдалось достоверное снижение прироста общего синтеза белка, измеренного методом SUnSET. Эти результаты соответствуют полученными другими авторами данным о влиянии GdCl_3 на реализацию механического сигнала [126, 137, 221, 254]. При этом конкретный механизм, с помощью которого мышечное волокно регистрирует механическое напряжение и изменяет уровень синтеза белка, остается не до конца определенным. SAC могут быть активированы непосредственно с помощью механического напряжения сарколеммы или косвенно, с помощью биохимического или механического влияния других mechanosенсоров. При этом повышенный уровень кальция может, например, активировать экспрессию IGF-1 или MGF-1, или ингибировать экспрессию миостатина [164]. Было также показано, что повышенный уровень кальция необходим для формирования высокомолекулярного сигнального белкового комплекса, который участвует в активации p70S6k [105]. В нашем исследовании ингибитор SAC не оказывал влияния на прирост синтеза белка и снижение фосфорилирования ключевых мишней mTORC1 после 7 суток вывешивания – достоверное снижение наблюдалось как в группе чистого вывешивания, так и в группе с введением хлорида гадолиния. Данный факт может свидетельствовать о том, что сама по себе функциональная разгрузка приводит к инактивации SAC и снижению активности mTORC1, в следствие чего

использование хлорида гадолиния не привело к дальнейшему изменению анаболического ответа на серию эксцентрических сокращений [5, 172].

В настоящее время молекулярные механизмы, с помощью которых сигнал от SAC передается к mTORC1, остаются малоизученными. В литературе есть данные, что в mechanозависимой активации mTORC1 непосредственно принимает участие фосфатидная кислота, синтез которой зависит от ζ -изоформы диацилглицеролкиназы (DGK- ζ) [259]. Кроме того, есть данные о том, что mTORC1 сигналинг может активироваться в результате увеличения внутриклеточной концентрации ионов Ca^{2+} в мышечном волокне [119, 259], что может зависеть от работы SAC [221]. Однако выявление точных молекулярных механизмов, ответственных за передачу механического сигнала от SAC к mTORC1, потребует дальнейших исследований [5, 241].

4.4 Изучение роли опорной афферентации в поддержании стабильности анаболический процессов в постуральной мышце млекопитающих на фоне 1 и 3 суточного вывешивания

Снижение интенсивности синтеза белка на ранних сроках гравитационной разгрузки было впервые показано в работах Loughna et al методом регистрации включения радиоактивной аминокислотной метки [153]. В этих же исследованиях было показано, что при пассивном хроническом растяжении камбаловидной мышцы снижения синтеза белка не наблюдается. В наших экспериментах удалось впервые проследить динамику синтеза белка в течение первой недели антиортостатического вывешивания методом регистрации включения пуромициновой метки (SU�SET) [170]. При этом достоверное и значительное снижение интенсивности синтеза белка было обнаружено только после 3 суток воздействия. В представляющей экспериментальной серии уже после 24 часов вывешивания наблюдалось значительное снижение интенсивности синтеза белка, которое увеличивалось

после 3 суток воздействия. При этом опорная стимуляция частично предотвращала снижение интенсивности синтеза белка уже в первые сутки, и почти полностью предотвращала это уменьшение к 3 суткам вывешивания.

Изменение уровня фосфорилирования сигнальных молекул, влияющих на эффективность белкового синтеза при гравитационной разгрузке с использованием модели антиортостатического вывешивания было ранее показано рядом авторов. Одним из основных эффекторов mTORC1 белкового комплекса является рибосомальная киназа p70S6k. Существуют различные данные об изменении фосфорилирования p70S6k в условиях гравитационной разгрузки. Одними исследователями было показано снижение фосфорилирования p70S6k после первых часов и дней антиортостатического вывешивания [53, 110], при этом в экспериментах, проведенных другими авторами снижение фосфорилирования p70S6k наблюдалось только после двух недель гравитационной разгрузки [155, 232]. Тем не менее, в работах зарубежных авторов отсутствуют результаты изменений p70S6K в первые и третьи сутки вывешивания. Однако после трех суток иммобилизации камбаловидной мышце крысы наблюдалось значительное повышение уровня фосфорилирования p70S6K [259]. В исследовании, проведенном в нашей лаборатории, было обнаружено повышение уровня фосфорилирования p70S6K после 24 часов и 3 суток вывешивания [170]. Повышение уровня фосфорилирования p70S6K на ранних этапах разгрузки может быть обусловлено уменьшением активности АМФ-активированной протеинкиназы и, соответственно, уменьшением ее ингибирующего влияния на сигнальный путь mTORC1/p70S6K [27, 246]. В настоящем исследовании после 3 суток гравитационной разгрузки было выявлено достоверное повышение уровня фосфорилирования p70S6K, которое полностью предотвращалось при действии опорной стимуляции. Снижение уровня фосфорилирования GSK3 β , сопровождающееся повышением ее ингибирующего влияния на инициацию трансляции на рибосомах, было зарегистрировано

преимущественно на ранних стадиях воздействия [53, 170]. После 3 суток вывешивания наблюдалось снижение уровня негативного фосфорилирования GSK3 β , уменьшающем ее способность ингибировать синтез белка, и это снижение почти полностью предотвращалось при стимуляции опорных афферентов. Элонгационный фактор eEF-2, будучи фосфорилированным препятствует осуществлению элонгации трансляции. Фосфорилирование этой сигнальной молекулы происходит при Ca-кальмодулин-зависимой активации eEF-2-киназы. В нашей лаборатории ранее было показано, что при гравитационной разгрузке уровень фосфорилирования eEF-2 значительно возрастает [151]. В настоящем исследовании после трех суток моделируемой гравитационной разгрузки также было обнаружено увеличение уровня фосфорилирования элонгационного фактора в камбаловидной мышце крысы. Это увеличение успешно предотвращалось при использовании стимуляции стопы животного.

Регуляция инициации и элонгации трансляции предоставляет возможность клетке быстро активировать синтез белка, повышая эффективность (efficiency) трансляционных механизмов. Для того, чтобы длительное время поддерживать высокий уровень синтеза белка, клетке необходимо задействовать повышение трансляционной емкости (capacity), которая определяется количеством рибосом. Маркерами биогенеза рибосом являются ключевые рибосомальные РНК – 18S и 28S [192]. Биогенез рибосом является необходимой предпосылкой сохранения трансляционной емкости мышцы. Гравитационная разгрузка приводит к снижению экспрессии рибосомальной РНК, что несомненно сказывается на трансляционных процессах [20, 170]. В настоящем исследовании было обнаружено глубокое снижение экспрессии 18S и 28S рРНК после 1 и 3 суток вывешивания. Применение опорной стимуляции никак не повлияло на снижение этих показателей. Не исключено, что для поддержания нормального уровня биогенеза рибосом опорная стимуляция недостаточна, и в этом случае

фоновая тоническая активность мышцы должна быть дополнена резистивным компонентом, который предположительно обеспечивается осевой нагрузкой на камбаловидную мышцу.

4.5 Исследование реализации механического сигнала при действии опорного стимула в постуральной мышце млекопитающих на фоне 3-суточного вывешивания

Антиортостатическое вывешивание широко используется в качестве модели, имитирующей воздействие микрогравитации на организм животного. Одним из ключевых эффектов данного воздействия является развитие мышечной атрофии и, как следствие, снижение площади поперечного сечения и силы сокращения мышцы [204]. Предполагается, что использование активной стимуляции опорных зон стоп в течение гравитационной разгрузки должно в определенной степени восстанавливать показатели силы мышечного сокращения и снижать развитие атрофии. В работе Kuparos et al. (2005) было показано, что подошвенная стимуляция задних лап группы вывешенных животных с помощью опорного стимулятора с пневматическим механизмом не приводила к различиям в площади поперечного сечения между крысами получающими опорную стимуляцию и крысами из контрольной группы [139]. В результате проведенного 3-суточного антиортостатического вывешивания были получены данные о снижении как абсолютной, так и нормированной на площадь поперечного сечения силы изометрического сокращения у вывешенных животных. Активная опорная стимуляция стопы в течение 4-суток (16% от общей длительности вывешивания) каждый день предотвращала это снижение. Эти результаты подтверждают ранее полученные в сухой иммерсии данные об эффективности опорного воздействия в поддержании функциональных свойств мышц нижних конечностей [135, 148].

После 3 суток гравитационной разгрузки достоверное снижение фосфорилирования p70S6k не наблюдалось, однако уровень фосфорилирования его субстрата – S6 белка был понижен. Кроме того, было снижено содержание фосфорилированной формы 4E-BP1, однако это не сказалось на общем уровне синтеза белка, измеренного пуромициновым методом. В ранее проведенных экспериментах с опорной стимуляцией стопы не была показана связь опорной афферентации с сигнальными механизмами, контролирующими белковый гомеостаз в постуральной мышце на фоне гравитационной разгрузки. В работе Litvinova et al. (2004) продемонстрировано снижение размеров волокон, содержания титина и небулина, а также снижение кальциевой чувствительности волокон после 7-суточной сухой иммерсии. Эти изменения повлияли на снижение сократительных свойств скинированных волокон, и частично предотвращались опорной стимуляцией [148]. Кроме того, опорная стимуляция предотвращала сдвиг миозинового фенотипа во время разгрузки от медленного к быстрому, а также предотвращала снижение содержания нейрональной NO-синтазы [176]. В нашем эксперименте наблюдался достоверно сниженный ответ на эксцентрические сокращения в группе 3-суточное вывешивание как для общего синтеза белка, так и для фосфорилирования p70S6k и S6 белка. Это снижение полностью нивелировалось опорной стимуляцией. Данные эффекты опорной стимуляции очевидно обусловлены увеличением электрической и соответственно механической (но ненагруженной) тонической активности камбаловидной мышцы при таком воздействии [135]. Так, в эксперименте Layne et al. (1998) опорная стимуляция усиливала электромиографическую активность камбаловидной мышцы космонавтов в условиях невесомости [144]. Причины и механизмы селективного действия опорной стимуляции на компоненты сигнальных систем, контролирующих белковый гомеостаз в камбаловидной мышце еще предстоит проанализировать в дальнейших исследованиях.

ВЫВОДЫ

1. Снижение интенсивности синтеза белка в камбаловидной мышце крысы после 3 и 7 суток гравитационной разгрузки на фоне повышенного фосфорилирования рибосомальной киназы p70S6K1 сопровождается пониженной активностью сигнальной мишени mTORC1 – белка 4E-BP1 и маркера сигнального пути MAPK/ERK – рибосомальной киназы p90RSK, а также повышенной активностью GSK-3 β .
2. Снижение прироста синтеза белка в ответ на серию эксцентрических сокращений камбаловидной мышцы *ex vivo* на фоне предшествовавшей функциональной разгрузки связано со снижением mechanозависимого ответа сигнального пути Akt/mTORC1/p70s6k.
3. Снижение активности mTORC1 в ответ на механическую стимуляцию камбаловидной мышцы крысы *ex vivo* после 7-суточной гравитационной разгрузки связано с функциональной инактивацией стретч-активируемых каналов.
4. Динамическая опорная стимуляция стопы в течение 4 часов в день в условиях 3-суточной гравитационной разгрузки задних конечностей крысы позволяет частично предотвратить снижение общего синтеза белка и изменения в фосфорилировании анаболических маркеров в камбаловидной мышце.
5. Динамическая опорная стимуляция стопы на фоне гравитационной разгрузки позволяет поддерживать сигнальную систему mTORC1/p70S6k/S6gr на физиологически оптимальном уровне, что приводит к повышенному по сравнению с контрольным вывешиванием приросту уровня синтеза белка в ответ на механический стимул.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

- 1 Вихлянцев И. М., Терентьева А. В., Балтина Т. В., Подлубная З. А. Влияние вибростимуляции опорных зон стопы крысы, а также опорной нагрузки на содержание N2A-изоформы и T2-фрагмента тайтина в m. soleus в условиях моделируемой микрогравитации // Авиакосмическая и экологическая медицина. 2010. Т.44. №2. С.45-49.
- 2 Григорьев А. И., Козловская И. Б., Шенкман Б. С. Роль опорной афферентации в организации тонической мышечной системы // Российский физиологический журнал им ИМ Сеченова. 2004. Т.90. №5. С.508-521.
- 3 Красный А. М., Лысенко Е. А., Козловская И. Б., Шенкман Б. С., Ломоносова Ю. Н. Фосфорилирование элонгационного фактора и экспрессия его киназы в m.soleus крысы в течение трех суток гравитационной разгрузки // ДАН. 2013. Т.453. №1. С.1-3.
- 4 Лысенко Е. А., Туртикова О. В., Качаева Е. В., Ушаков И. Б., Шенкман Б. С. Активность рибосомальных киназ при функциональной разгрузке различной продолжительности // ДАН. 2010. Т.434. №1. С.126-129
- 5 Мирзоев Т. М., Тыганов С. А., Шенкман Б. С. Роль стретч-активируемых каналов в реализации mTORC1 сигналинга в изолированной *m.soleus* крысы в ответ на механический стимул после функциональной разгрузки // Российский физиологический журнал им ИМ Сеченова. 2018. Т.104. №2. С.217-225.
- 6 Оганов В. С., Скуратова С. А., Мурашко Л. М., Губа Ф., Такач О. Влияние кратковременных космических полётов на физиологические свойства и состав миофибриллярных белков скелетных мышц крыс // Космическая биология и авиакосмическая медицина. 1988. Т.4. №4. С.50-54
- 7 Тыганов С. А., Петрова И. О., Мирзоев Т. М., Шенкман Б. С. Изменение синтеза белка в изолированной m. Soleus крысы в ответ на эксцентрическую

нагрузку на фоне антиортостатического вывешивания // Авиакосмическая и экологическая медицина. 2017. Т.51. №7. С.114-119.

- 8 Шенкман Б. С., Григорьев А. И., Козловская И. Б. Гравитационные механизмы в тонической двигательной системе. Нейрофизиологические и мышечные аспекты // ФИЗИОЛОГИЯ ЧЕЛОВЕКА. 2017. Т.43. №5. С.104-117.
- 9 Шульженко Е. Б., Виль-Вильямс И. Ф. Возможность проведения длительной водной иммерсии методом «сухого» погружения // Космическая биология и авиакосмическая медицина. 1976. Т.10. №9. С.82-84.
- 10 Acharyya S., Butchbach M. E., Sahenk Z., Wang H., Saji M., Carathers M., Ringel M. D., Skipworth R. J., Fearon K. C., Hollingsworth M. A., Muscarella P., Burghes A. H., Rafael-Fortney J. A., Guttridge D. C. Dystrophin glycoprotein complex dysfunction: a regulatory link between muscular dystrophy and cancer cachexia // Cancer Cell. 2005. V.8. P.421-432.
- 11 Adams G. R., Bamman M. M. Characterization and regulation of mechanical loading-induced compensatory muscle hypertrophy // Compr Physiol. 2012. V.2. P.2829-2870.
- 12 Allen D. L., Linderman J. K., Roy R. R., Grindeland R. E., Mukku V., Edgerton V. R. Growth hormone/IGF-I and/or resistive exercise maintains myonuclear number in hindlimb unweighted muscles // J Appl Physiol (1985). 1997. V.83. P.1857-1861.
- 13 Armstrong R. B., Duan C., Delp M. D., Hayes D. A., Glenn G. M., Allen G. D. Elevations in rat soleus muscle [Ca²⁺] with passive stretch // J Appl Physiol (1985). 1993. V.74. P.2990-2997.
- 14 Arnadottir J., Chalfie M. Eukaryotic mechanosensitive channels // Annu Rev Biophys. 2010. V.39. P.111-137.
- 15 Atherton P. J., Babraj J., Smith K., Singh J., Rennie M. J., Wackerhage H. Selective activation of AMPK-PGC-1alpha or PKB-TSC2-mTOR signaling can explain specific adaptive responses to endurance or resistance training-like electrical muscle stimulation // FASEB J. 2005. V.19. P.786-788.

- 16 Ato S., Makanae Y., Kido K., Fujita S. Contraction mode itself does not determine the level of mTORC1 activity in rat skeletal muscle // Physiol Rep. 2016. V.4.
- 17 Avila-Flores A., Santos T., Rincon E., Merida I. Modulation of the mammalian target of rapamycin pathway by diacylglycerol kinase-produced phosphatidic acid // J Biol Chem. 2005. V.280. P.10091-10099.
- 18 Aweida D., Rudesky I., Volodin A., Shimko E., Cohen S. GSK3-beta promotes calpain-1-mediated desmin filament depolymerization and myofibril loss in atrophy // J Cell Biol. 2018. V.217. P.3698-3714.
- 19 Baehr L. M., West D. W. D., Marshall A. G., Marcotte G. R., Baar K., Bodine S. C. Muscle-specific and age-related changes in protein synthesis and protein degradation in response to hindlimb unloading in rats // J Appl Physiol (1985). 2017. V.122. P.1336-1350.
- 20 Bajotto G., Sato Y., Kitaura Y., Shimomura Y. Effect of branched-chain amino acid supplementation during unloading on regulatory components of protein synthesis in atrophied soleus muscles // Eur J Appl Physiol. 2011. V.111. P.1815-1828.
- 21 Baldwin K. M. Effect of spaceflight on the functional, biochemical, and metabolic properties of skeletal muscle // Med Sci Sports Exerc. 1996. V.28. P.983-987.
- 22 Baldwin K. M., Haddad F. Effects of different activity and inactivity paradigms on myosin heavy chain gene expression in striated muscle // J Appl Physiol (1985). 2001. V.90. P.345-357.
- 23 Bell S., Terentjev E. M. Focal Adhesion Kinase: The Reversible Molecular Mechanosensor // Biophys J. 2017. V.112. P.2439-2450.
- 24 Bensamoun S., Stevens L., Fleury M. J., Bellon G., Goubel F., Ho Ba Tho M. C. Macroscopic-microscopic characterization of the passive mechanical properties in rat soleus muscle // J Biomech. 2006. V.39. P.568-578.
- 25 Bodine S. C. Disuse-induced muscle wasting // Int J Biochem Cell Biol. 2013. V.45. P.2200-2208.

- 26 Bodine S. C., Stitt T. N., Gonzalez M., Kline W. O., Stover G. L., Bauerlein R., Zlotchenko E., Scrimgeour A., Lawrence J. C., Glass D. J., Yancopoulos G. D. Akt/mTOR pathway is a crucial regulator of skeletal muscle hypertrophy and can prevent muscle atrophy in vivo // Nat Cell Biol. 2001. V.3. P.1014-1019.
- 27 Bolster D. R., Crozier S. J., Kimball S. R., Jefferson L. S. AMP-activated protein kinase suppresses protein synthesis in rat skeletal muscle through down-regulated mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling // J Biol Chem. 2002. V.277. P.23977-23980.
- 28 Booth F. W., Criswell D. S. Molecular events underlying skeletal muscle atrophy and the development of effective countermeasures // Int J Sports Med. 1997. V.18 Suppl 4. P.S265-269.
- 29 Booth F. W., Gollnick P. D. Effects of disuse on the structure and function of skeletal muscle // Med Sci Sports Exerc. 1983. V.15. P.415-420.
- 30 Booth F. W., Seider M. J. Early change in skeletal muscle protein synthesis after limb immobilization of rats // J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol. 1979. V.47. P.974-977.
- 31 Brughelli M., Cronin J. Altering the length-tension relationship with eccentric exercise : implications for performance and injury // Sports Med. 2007. V.37. P.807-826.
- 32 Burry M., Hawkins D., Spangenburg E. E. Lengthening contractions differentially affect p70s6k phosphorylation compared to isometric contractions in rat skeletal muscle // Eur J Appl Physiol. 2007. V.100. P.409-415.
- 33 Butterfield T. A., Best T. M. Stretch-activated ion channel blockade attenuates adaptations to eccentric exercise // Med Sci Sports Exerc. 2009. V.41. P.351-356.
- 34 Cannavino J., Brocca L., Sandri M., Bottinelli R., Pellegrino M. A. PGC1-alpha over-expression prevents metabolic alterations and soleus muscle atrophy in hindlimb unloaded mice // J Physiol. 2014. V.592. P.4575-4589.
- 35 Carriere A., Cargnello M., Julien L. A., Gao H., Bonneil E., Thibault P., Roux P. P. Oncogenic MAPK signaling stimulates mTORC1 activity by promoting RSK-mediated raptor phosphorylation // Curr Biol. 2008. V.18. P.1269-1277.

- 36 Carson J. A., Wei L. Integrin signaling's potential for mediating gene expression in hypertrophying skeletal muscle // *J Appl Physiol* (1985). 2000. V.88. P.337-343.
- 37 Chaillou T., Kirby T. J., McCarthy J. J. Ribosome biogenesis: emerging evidence for a central role in the regulation of skeletal muscle mass // *J Cell Physiol*. 2014. V.229. P.1584-1594.
- 38 Chalfie M. Neurosensory mechanotransduction // *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2009. V.10. P.44-52.
- 39 Chang W. J., Iannaccone S. T., Lau K. S., Masters B. S., McCabe T. J., McMillan K., Padre R. C., Spencer M. J., Tidball J. G., Stull J. T. Neuronal nitric oxide synthase and dystrophin-deficient muscular dystrophy // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996. V.93. P.9142-9147.
- 40 Chen H. C., Appeddu P. A., Isoda H., Guan J. L. Phosphorylation of tyrosine 397 in focal adhesion kinase is required for binding phosphatidylinositol 3-kinase // *J Biol Chem*. 1996. V.271. P.26329-26334.
- 41 Chen W., Lou J., Evans E. A., Zhu C. Observing force-regulated conformational changes and ligand dissociation from a single integrin on cells // *J Cell Biol*. 2012. V.199. P.497-512.
- 42 Chiu M. I., Katz H., Berlin V. RAPT1, a mammalian homolog of yeast Tor, interacts with the FKBP12/rapamycin complex // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994. V.91. P.12574-12578.
- 43 Coleman M. E., DeMayo F., Yin K. C., Lee H. M., Geske R., Montgomery C., Schwartz R. J. Myogenic vector expression of insulin-like growth factor I stimulates muscle cell differentiation and myofiber hypertrophy in transgenic mice // *J Biol Chem*. 1995. V.270. P.12109-12116.
- 44 Conus N. M., Hemmings B. A., Pearson R. B. Differential regulation by calcium reveals distinct signaling requirements for the activation of Akt and p70S6k // *J Biol Chem*. 1998. V.273. P.4776-4782.

- 45 Coste B., Murthy S. E., Mathur J., Schmidt M., Mechtioukhi Y., Delmas P., Patapoutian A. Piezo1 ion channel pore properties are dictated by C-terminal region // Nat Commun. 2015. V.6. P.7223.
- 46 Cox C. D., Bavi N., Martinac B. Origin of the Force: The Force-From-Lipids Principle Applied to Piezo Channels // Curr Top Membr. 2017. V.79. P.59-96.
- 47 D'Souza R. F., Marworth J. F., Figueiredo V. C., Della Gatta P. A., Petersen A. C., Mitchell C. J., Cameron-Smith D. Dose-dependent increases in p70S6K phosphorylation and intramuscular branched-chain amino acids in older men following resistance exercise and protein intake // Physiol Rep. 2014. V.2.
- 48 De-Doncker L., Picquet F., Falempin M. Effects of cutaneous receptor stimulation on muscular atrophy developed in hindlimb unloading condition // J Appl Physiol (1985). 2000. V.89. P.2344-2351.
- 49 de Boer M. D., Selby A., Atherton P., Smith K., Seynnes O. R., Maganaris C. N., Maffulli N., Movin T., Narici M. V., Rennie M. J. The temporal responses of protein synthesis, gene expression and cell signalling in human quadriceps muscle and patellar tendon to disuse // J Physiol. 2007. V.585. P.241-251.
- 50 del Rio A., Perez-Jimenez R., Liu R., Roca-Cusachs P., Fernandez J. M., Sheetz M. P. Stretching single talin rod molecules activates vinculin binding // Science. 2009. V.323. P.638-641.
- 51 Del Valle M. E., Cobo T., Cobo J. L., Vega J. A. Mechanosensory neurons, cutaneous mechanoreceptors, and putative mechanoproteins // Microsc Res Tech. 2012. V.75. P.1033-1043.
- 52 Drummond M. J., Fry C. S., Glynn E. L., Dreyer H. C., Dhanani S., Timmerman K. L., Volpi E., Rasmussen B. B. Rapamycin administration in humans blocks the contraction-induced increase in skeletal muscle protein synthesis // J Physiol. 2009. V.587. P.1535-1546.
- 53 Dupont E., Cieniewski-Bernard C., Bastide B., Stevens L. 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. 2011. V.300. P.408-417.

- 54 Dupont S., Morsut L., Aragona M., Enzo E., Giulitti S., Cordenonsi M., Zanconato F., Le Digabel J., Forcato M., Bicciato S., Elvassore N., Piccolo S. Role of YAP/TAZ in mechanotransduction // *Nature*. 2011. V.474. P.179-183.
- 55 Durieux A. C., Desplanches D., Freyssenet D., Fluck M. Mechanotransduction in striated muscle via focal adhesion kinase // *Biochem Soc Trans*. 2007. V.35. P.1312-1313.
- 56 Eliasson J., Elfegoun T., Nilsson J., Kohnke R., Ekblom B., Blomstrand E. Maximal lengthening contractions increase p70 S6 kinase phosphorylation in human skeletal muscle in the absence of nutritional supply // *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2006. V.291. P.E1197-1205.
- 57 Erbay E., Park I. H., Nuzzi P. D., Schoenherr C. J., Chen J. IGF-II transcription in skeletal myogenesis is controlled by mTOR and nutrients // *J Cell Biol*. 2003. V.163. P.931-936.
- 58 Ernstrom G. G., Chalfie M. Genetics of sensory mechanotransduction // *Annu Rev Genet*. 2002. V.36. P.411-453.
- 59 Fang Y., Vilella-Bach M., Bachmann R., Flanigan A., Chen J. Phosphatidic acid-mediated mitogenic activation of mTOR signaling // *Science*. 2001. V.294. P.1942-1945.
- 60 Fitts R. H., Riley D. R., Widrick J. J. Functional and structural adaptations of skeletal muscle to microgravity // *J Exp Biol*. 2001. V.204. P.3201-3208.
- 61 Fitts R. H., Trappe S. W., Costill D. L., Gallagher P. M., Creer A. C., Colloton P. A., Peters J. R., Romatowski J. G., Bain J. L., Riley D. A. Prolonged space flight-induced alterations in the structure and function of human skeletal muscle fibres // *J Physiol*. 2010. V.588. P.3567-3592.
- 62 Fluck M., Carson J. A., Gordon S. E., Ziemiecki A., Booth F. W. Focal adhesion proteins FAK and paxillin increase in hypertrophied skeletal muscle // *Am J Physiol*. 1999. V.277. P.152-162.
- 63 Fluckey J. D., Dupont-Versteegden E. E., Knox M., Gaddy D., Tesch P. A., Peterson C. A. Insulin facilitation of muscle protein synthesis following resistance

- exercise in hindlimb-suspended rats is independent of a rapamycin-sensitive pathway // Am J Physiol Endocrinol Metab. 2004. V.287. P.E1070-1075.
- 64 Fluckey J. D., Dupont-Versteegden E. E., Montague D. C., Knox M., Tesch P., Peterson C. A., Gaddy-Kurten D. A rat resistance exercise regimen attenuates losses of musculoskeletal mass during hindlimb suspension // Acta Physiol Scand. 2002. V.176. P.293-300.
- 65 Fonseca B. D., Alain T., Finestone L. K., Huang B. P., Rolfe M., Jiang T., Yao Z., Hernandez G., Bennett C. F., Proud C. G. Pharmacological and genetic evaluation of proposed roles of mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase kinase (MEK), extracellular signal-regulated kinase (ERK), and p90(RSK) in the control of mTORC1 protein signaling by phorbol esters // J Biol Chem. 2011. V.286. P.27111-27122.
- 66 Formigli L., Meacci E., Sassoli C., Squecco R., Nosi D., Chellini F., Naro F., Francini F., Zecchi-Orlandini S. Cytoskeleton/stretch-activated ion channel interaction regulates myogenic differentiation of skeletal myoblasts // J Cell Physiol. 2007. V.211. P.296-306.
- 67 Foster D. A. Regulation of mTOR by phosphatidic acid? // Cancer Res. 2007. V.67. P.1-4.
- 68 Franco A., Jr., Lansman J. B. Stretch-sensitive channels in developing muscle cells from a mouse cell line // J Physiol. 1990. V.427. P.361-380.
- 69 Gan B., Yoo Y., Guan J. L. Association of focal adhesion kinase with tuberous sclerosis complex 2 in the regulation of s6 kinase activation and cell growth // J Biol Chem. 2006. V.281. P.37321-37329.
- 70 Gao Y., Arfat Y., Wang H., Goswami N. Muscle Atrophy Induced by Mechanical Unloading: Mechanisms and Potential Countermeasures // Front Physiol. 2018. V.9.
- 71 Garcia-Anoveros J., Corey D. P. Touch at the molecular level. Mechanosensation // Curr Biol. 1996. V.6. P.541-543.
- 72 Gautel M. Cytoskeletal protein kinases: titin and its relations in mechanosensing // Pflugers Arch. 2011. V.462. P.119-134.

- 73 Ge J., Li W., Zhao Q., Li N., Chen M., Zhi P., Li R., Gao N., Xiao B., Yang M. Architecture of the mammalian mechanosensitive Piezo1 channel // Nature. 2015. V.527. P.64-69.
- 74 Glass D. J. Signalling pathways that mediate skeletal muscle hypertrophy and atrophy // Nat Cell Biol. 2003. V.5. P.87-90.
- 75 Glass D. J. PI3 kinase regulation of skeletal muscle hypertrophy and atrophy // Curr Top Microbiol Immunol. 2010. V.346. P.267-278.
- 76 Glover E. I., Phillips S. M., Oates B. R., Tang J. E., Tarnopolsky M. A., Selby A., Smith K., Rennie M. J. Immobilization induces anabolic resistance in human myofibrillar protein synthesis with low and high dose amino acid infusion // J Physiol. 2008. V.586. P.6049-6061.
- 77 Goffin J. M., Pittet P., Csucs G., Lussi J. W., Meister J. J., Hinz B. Focal adhesion size controls tension-dependent recruitment of alpha-smooth muscle actin to stress fibers // J Cell Biol. 2006. V.172. P.259-268.
- 78 Gollnick P. D., Timson B. F., Moore R. L., Riedy M. Muscular enlargement and number of fibers in skeletal muscles of rats // J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol. 1981. V.50. P.936-943.
- 79 Goodman C. A. The role of mTORC1 in regulating protein synthesis and skeletal muscle mass in response to various mechanical stimuli // Rev Physiol Biochem Pharmacol. 2014. V.166. P.43-95.
- 80 Goodman C. A., Mabrey D. M., Frey J. W., Miu M. H., Schmidt E. K., Pierre P., Hornberger T. A. Novel insights into the regulation of skeletal muscle protein synthesis as revealed by a new nonradioactive in vivo technique // FASEB J. 2011. V.25. P.1028-1039.
- 81 Goodman C. A., Mayhew D. L., Hornberger T. A. Recent progress toward understanding the molecular mechanisms that regulate skeletal muscle mass // Cell Signal. 2011. V.23. P.1896-1906.
- 82 Goodman C. A., Miu M. H., Frey J. W., Mabrey D. M., Lincoln H. C., Ge Y., Chen J., Hornberger T. A. A phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B-

independent activation of mammalian target of rapamycin signaling is sufficient to induce skeletal muscle hypertrophy // Mol Biol Cell. 2010. V.21. P.3258-3268.

83 Gordon A. M., Huxley A. F., Julian F. J. The variation in isometric tension with sarcomere length in vertebrate muscle fibres // J Physiol. 1966. V.184. P.170-192.

84 Gordon B. S., Kelleher A. R., Kimball S. R. Regulation of muscle protein synthesis and the effects of catabolic states // Int J Biochem Cell Biol. 2013. V.45. P.2147-2157.

85 Gordon S. E., Fluck M., Booth F. W. Selected Contribution: Skeletal muscle focal adhesion kinase, paxillin, and serum response factor are loading dependent // J Appl Physiol (1985). 2001. V.90. P.1174-1183; discussion 1165.

86 Goswami N. Falls and Fall-Prevention in Older Persons: Geriatrics Meets Spaceflight! // Front Physiol. 2017. V.8. P.603.

87 Gottlieb P. A., Sachs F. Cell biology: The sensation of stretch // Nature. 2012. V.483. P.163-164.

88 Graham Z. A., Gallagher P. M., Cardozo C. P. Focal adhesion kinase and its role in skeletal muscle // J Muscle Res Cell Motil. 2015. V.36. P.305-315.

89 Grater F., Shen J., Jiang H., Gautel M., Grubmuller H. Mechanically induced titin kinase activation studied by force-probe molecular dynamics simulations // Biophys J. 2005. V.88. P.790-804.

90 Graves L. M., He Y., Lambert J., Hunter D., Li X., Earp H. S. An intracellular calcium signal activates p70 but not p90 ribosomal S6 kinase in liver epithelial cells // J Biol Chem. 1997. V.272. P.1920-1928.

91 Greenhaff P. L., Karagounis L. G., Peirce N., Simpson E. J., Hazell M., Layfield R., Wackerhage H., Smith K., Atherton P., Selby A., Rennie M. J. Disassociation between the effects of amino acids and insulin on signaling, ubiquitin ligases, and protein turnover in human muscle // Am J Physiol Endocrinol Metab. 2008. V.295. P.E595-604.

92 Guharay F., Sachs F. Stretch-activated single ion channel currents in tissue-cultured embryonic chick skeletal muscle // J Physiol. 1984. V.352. P.685-701.

- 93 Guharay F., Sachs F. Mechanotransducer ion channels in chick skeletal muscle: the effects of extracellular pH // J Physiol. 1985. V.363. P.119-134.
- 94 Guilluy C., Osborne L. D., Van Landeghem L., Sharek L., Superfine R., Garcia-Mata R., Burridge K. Isolated nuclei adapt to force and reveal a mechanotransduction pathway in the nucleus // Nat Cell Biol. 2014. V.16. P.376-381.
- 95 Gulati P., Gaspers L. D., Dann S. G., Joaquin M., Nobukuni T., Natt F., Kozma S. C., Thomas A. P., Thomas G. Amino acids activate mTOR complex 1 via Ca²⁺/CaM signaling to hVps34 // Cell Metab. 2008. V.7. P.456-465.
- 96 Gulve E. A., Dice J. F. Regulation of protein synthesis and degradation in L8 myotubes. Effects of serum, insulin and insulin-like growth factors // Biochem J. 1989. V.260. P.377-387.
- 97 Gumbiner B. M. Signal transduction of beta-catenin // Curr Opin Cell Biol. 1995. V.7. P.634-640.
- 98 Gwag T., Lee K., Ju H., Shin H., Lee J. W., Choi I. Stress and signaling responses of rat skeletal muscle to brief endurance exercise during hindlimb unloading: a catch-up process for atrophied muscle // Cell Physiol Biochem. 2009. V.24. P.537-546.
- 99 Gwinn D. M., Shackelford D. B., Egan D. F., Mihaylova M. M., Mery A., Vasquez D. S., Turk B. E., Shaw R. J. AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint // Mol Cell. 2008. V.30. P.214-226.
- 100 Hackney C. M., Furness D. N. The composition and role of cross links in mechanoelectrical transduction in vertebrate sensory hair cells // J Cell Sci. 2013. V.126. P.1721-1731.
- 101 Haddad F., Adams G. R. Selected contribution: acute cellular and molecular responses to resistance exercise // J Appl Physiol (1985). 2002. V.93. P.394-403.
- 102 Hameed M., Orrell R. W., Cobbold M., Goldspink G., Harridge S. D. Expression of IGF-I splice variants in young and old human skeletal muscle after high resistance exercise // J Physiol. 2003. V.547. P.247-254.

- 103 Hamill O. P., McBride D. W., Jr. The pharmacology of mechanogated membrane ion channels // Pharmacol Rev. 1996. V.48. P.231-252.
- 104 Han B., Tong J., Zhu M. J., Ma C., Du M. Insulin-like growth factor-1 (IGF-1) and leucine activate pig myogenic satellite cells through mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway // Mol Reprod Dev. 2008. V.75. P.810-817.
- 105 Hannan K. M., Thomas G., Pearson R. B. Activation of S6K1 (p70 ribosomal protein S6 kinase 1) requires an initial calcium-dependent priming event involving formation of a high-molecular-mass signalling complex // Biochem J. 2003. V.370. P.469-477.
- 106 Haswell E. S., Phillips R., Rees D. C. Mechanosensitive channels: what can they do and how do they do it? // Structure. 2011. V.19. P.1356-1369.
- 107 Hernandez Corvo R., Kozlovskaia I. B., Kreidich Iu V., Martinez Fernandez S., Rakhamanov A. S. Effect of a 7-day space flight on the structure and function of the human locomotor apparatus // Kosm Biol Aviakosm Med. 1983. V.17. P.37-44.
- 108 Hornberger T. A. Mechanotransduction and the regulation of mTORC1 signaling in skeletal muscle // Int J Biochem Cell Biol. 2011. V.43. P.1267-1276.
- 109 Hornberger T. A., Chu W. K., Mak Y. W., Hsiung J. W., Huang S. A., Chien S. The role of phospholipase D and phosphatidic acid in the mechanical activation of mTOR signaling in skeletal muscle // Proc Natl Acad Sci U S A. 2006. V.103. P.4741-4746.
- 110 Hornberger T. A., Hunter R. B., Kandarian S. C., Esser K. A. Regulation of translation factors during hindlimb unloading and denervation of skeletal muscle in rats // Am J Physiol Cell Physiol. 2001. V.281. P.C179-187.
- 111 Hornberger T. A., Stuppard R., Conley K. E., Fedele M. J., Fiorotto M. L., Chin E. R., Esser K. A. Mechanical stimuli regulate rapamycin-sensitive signalling by a phosphoinositide 3-kinase-, protein kinase B- and growth factor-independent mechanism // Biochem J. 2004. V.380. P.795-804.
- 112 Huang J., Manning B. D. The TSC1-TSC2 complex: a molecular switchboard controlling cell growth // Biochem J. 2008. V.412. P.179-190.

- 113 Huang J., Manning B. D. A complex interplay between Akt, TSC2 and the two mTOR complexes // Biochem Soc Trans. 2009. V.37. P.217-222.
- 114 Humphries J. D., Wang P., Streuli C., Geiger B., Humphries M. J., Ballestrem C. Vinculin controls focal adhesion formation by direct interactions with talin and actin // J Cell Biol. 2007. V.179. P.1043-1057.
- 115 Ilin E. A., Novikov V. E. Stand for modelling the physiological effects of weightlessness in laboratory experiments with rats // Kosm Biol Aviakosm Med. 1980. V.14. P.79-80.
- 116 Ingber D. E. Cellular mechanotransduction: putting all the pieces together again // FASEB J. 2006. V.20. P.811-827.
- 117 Inoki K., Li Y., Xu T., Guan K. L. Rheb GTPase is a direct target of TSC2 GAP activity and regulates mTOR signaling // Genes Dev. 2003. V.17. P.1829-1834.
- 118 Inoki K., Li Y., Zhu T., Wu J., Guan K. L. TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling // Nat Cell Biol. 2002. V.4. P.648-657.
- 119 Ito N., Ruegg U. T., Kudo A., Miyagoe-Suzuki Y., Takeda S. Activation of calcium signaling through Trpv1 by nNOS and peroxynitrite as a key trigger of skeletal muscle hypertrophy // Nat Med. 2013. V.19. P.101-106.
- 120 Jaafar R., De Larichaudy J., Chanon S., Euthine V., Durand C., Naro F., Bertolino P., Vidal H., Lefai E., Nemoz G. Phospholipase D regulates the size of skeletal muscle cells through the activation of mTOR signaling // Cell Commun Signal. 2013. V.11. P.55.
- 121 Jacobs B. L., You J. S., Frey J. W., Goodman C. A., Gundermann D. M., Hornberger T. A. Eccentric contractions increase the phosphorylation of tuberous sclerosis complex-2 (TSC2) and alter the targeting of TSC2 and the mechanistic target of rapamycin to the lysosome // J Physiol. 2013. V.591. P.4611-4620.
- 122 Janmey P. A. The cytoskeleton and cell signaling: component localization and mechanical coupling // Physiol Rev. 1998. V.78. P.763-781.
- 123 Jewell J. L., Russell R. C., Guan K. L. Amino acid signalling upstream of mTOR // Nat Rev Mol Cell Biol. 2013. V.14. P.133-139.

- 124 Jheng H. F., Tsai P. J., Guo S. M., Kuo L. H., Chang C. S., Su I. J., Chang C. R., Tsai Y. S. Mitochondrial fission contributes to mitochondrial dysfunction and insulin resistance in skeletal muscle // Mol Cell Biol. 2012. V.32. P.309-319.
- 125 Jorgensen S. B., Richter E. A., Wojtaszewski J. F. Role of AMPK in skeletal muscle metabolic regulation and adaptation in relation to exercise // J Physiol. 2006. V.574. P.17-31.
- 126 Juffer P., Bakker A. D., Klein-Nulend J., Jaspers R. T. Mechanical loading by fluid shear stress of myotube glycocalyx stimulates growth factor expression and nitric oxide production // Cell Biochem Biophys. 2014. V.69. P.411-419.
- 127 Jung O., Choi S., Jang S. B., Lee S. A., Lim S. T., Choi Y. J., Kim H. J., Kim D. H., Kwak T. K., Kim H., Kang M., Lee M. S., Park S. Y., Ryu J., Jeong D., Cheong H. K., Kim H. J., Park K. H., Lee B. J., Schlaepfer D. D., Lee J. W. Tetraspan TM4SF5-dependent direct activation of FAK and metastatic potential of hepatocarcinoma cells // J Cell Sci. 2012. V.125. P.5960-5973.
- 128 Kameyama T., Etlinger J. D. Calcium-dependent regulation of protein synthesis and degradation in muscle // Nature. 1979. V.279. P.344-346.
- 129 Kamkin A., Kiseleva I., Isenberg G. Ion selectivity of stretch-activated cation currents in mouse ventricular myocytes // Pflugers Arch. 2003. V.446. P.220-231.
- 130 Kasas S., Wang X., Hirling H., Marsault R., Huni B., Yersin A., Regazzi R., Grenningloh G., Riederer B., Forro L., Dietler G., Catsicas S. Superficial and deep changes of cellular mechanical properties following cytoskeleton disassembly // Cell Motil Cytoskeleton. 2005. V.62. P.124-132.
- 131 Khusnutdinova D., Netreba A., Kozlovskaya I. Mechanic stimulation of the soles support zones as a countermeasure of the contractile properties decline under microgravity conditions // J Gravit Physiol. 2004. V.11. P.P141-142.
- 132 Kimball S. R., Jefferson L. S. Control of translation initiation through integration of signals generated by hormones, nutrients, and exercise // J Biol Chem. 2010. V.285. P.29027-29032.

- 133 Klossner S., Durieux A. C., Freyssenet D., Flueck M. Mechano-transduction to muscle protein synthesis is modulated by FAK // Eur J Appl Physiol. 2009. V.106. P.389-398.
- 134 Kocer A. Mechanisms of mechanosensing - mechanosensitive channels, function and re-engineering // Curr Opin Chem Biol. 2015. V.29. P.120-127.
- 135 Kozlovskaya I. B., Sayenko I. V., Sayenko D. G., Miller T. F., Khusnudinova D. R., Melnik K. A. Role of support afferentation in control of the tonic muscle activity // Acta Astronautica. 2007. V.60. P.285-294.
- 136 Kozlovskaya I. B., Sayenko I. V., Vinogradova O. L., Miller T. F., Khusnudinova D. R., Melnik K. A., Yarmanova E. N. New approaches to countermeasures of the negative effects of microgravity in long-term space flights // Acta Astronautica. 2006. V.59. P.13-19.
- 137 Kumar A., Khandelwal N., Malya R., Reid M. B., Boriek A. M. Loss of dystrophin causes aberrant mechanotransduction in skeletal muscle fibers // FASEB J. 2004. V.18. P.102-113.
- 138 Kung C. A possible unifying principle for mechanosensation // Nature. 2005. V.436. P.647-654.
- 139 Kyparos A., Feeback D. L., Layne C. S., Martinez D. A., Clarke M. S. Mechanical stimulation of the plantar foot surface attenuates soleus muscle atrophy induced by hindlimb unloading in rats // J Appl Physiol (1985). 2005. V.99. P.739-746.
- 140 Labeit S., Kolmerer B. Titins: giant proteins in charge of muscle ultrastructure and elasticity // Science. 1995. V.270. P.293-296.
- 141 Lachowski D., Cortes E., Robinson B., Rice A., Rombouts K., Del Rio Hernandez A. E. FAK controls the mechanical activation of YAP, a transcriptional regulator required for durotaxis // FASEB J. 2018. V.32. P.1099-1107.
- 142 Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // Nature. 1970. V.227. P.680-685.
- 143 Laplante M., Sabatini D. M. mTOR signaling in growth control and disease // Cell. 2012. V.149. P.274-293.

- 144 Layne C. S., Mulavara A. P., Pruett C. J., McDonald P. V., Kozlovskaya I. B., Bloomberg J. J. The use of in-flight foot pressure as a countermeasure to neuromuscular degradation // Acta Astronaut. 1998. V.42. P.231-246.
- 145 Layne C. S., Spooner B. S. EMG analysis of human postural responses during parabolic flight microgravity episodes // Aviat Space Environ Med. 1990. V.61. P.994-998.
- 146 Layne C. S., Spooner B. S. Effects of postural set on anticipatory muscle activation prior to rapid arm flexion // Res Q Exerc Sport. 1992. V.63. P.196-199.
- 147 Li R., Narici M. V., Erskine R. M., Seynnes O. R., Rittweger J., Pisot R., Simunic B., Fluck M. Costamere remodeling with muscle loading and unloading in healthy young men // J Anat. 2013. V.223. P.525-536.
- 148 Litvinova K. S., Vikhlyantsev I. M., Kozlovskaya I. B., Podlubnaya Z. A., Shenkman B. S. Effects of artificial support stimulation on fiber and molecular characteristics of soleus muscle in men exposed to 7-day dry immersion // J Gravit Physiol. 2004. V.11. P.P131-132.
- 149 Liu H., Blough E. R., Arvapalli R., Wang Y., Reiser P. J., Paturi S., Katta A., Harris R., Nepal N., Wu M. Regulation of contractile proteins and protein translational signaling in disused muscle // Cell Physiol Biochem. 2012. V.30. P.1202-1214.
- 150 Liu J. P., Baker J., Perkins A. S., Robertson E. J., Efstratiadis A. Mice carrying null mutations of the genes encoding insulin-like growth factor I (Igf-1) and type 1 IGF receptor (Igf1r) // Cell. 1993. V.75. P.59-72.
- 151 Lomonosova Y. N., Belova S. P., Mirzoev T. M., Kozlovskaya I. B., Shenkman B. S. Eukaryotic elongation factor 2 kinase activation in M. soleus under 14-day hindlimb unloading of rats // Dokl Biochem Biophys. 2017. V.474. P.165-167.
- 152 Long X., Lin Y., Ortiz-Vega S., Yonezawa K., Avruch J. Rheb binds and regulates the mTOR kinase // Curr Biol. 2005. V.15. P.702-713.

- 153 Loughna P., Goldspink G., Goldspink D. F. Effect of inactivity and passive stretch on protein turnover in phasic and postural rat muscles // J Appl Physiol (1985). 1986. V.61. P.173-179.
- 154 Lumpkin E. A., Caterina M. J. Mechanisms of sensory transduction in the skin // Nature. 2007. V.445. P.858-865.
- 155 Lysenko E. A., Turtikova O. V., Kachaeva E. V., Ushakov I. B., Shenkman B. S. Time course of ribosomal kinase activity during hindlimb unloading // Dokl Biochem Biophys. 2010. V.434. P.223-226.
- 156 Ma L., Chen Z., Erdjument-Bromage H., Tempst P., Pandolfi P. P. Phosphorylation and functional inactivation of TSC2 by Erk implications for tuberous sclerosis and cancer pathogenesis // Cell. 2005. V.121. P.179-193.
- 157 Mackenzie M. G., Hamilton D. L., Murray J. T., Baar K. mVps34 is activated by an acute bout of resistance exercise // Biochem Soc Trans. 2007. V.35. P.1314-1316.
- 158 Mahoney S. J., Dempsey J. M., Blenis J. Cell signaling in protein synthesis ribosome biogenesis and translation initiation and elongation // Prog Mol Biol Transl Sci. 2009. V.90. P.53-107.
- 159 Markin V. S., Sachs F. Thermodynamics of mechanosensitivity // Phys Biol. 2004. V.1. P.110-124.
- 160 Martens J. C., Radmacher M. Softening of the actin cytoskeleton by inhibition of myosin II // Pflugers Arch. 2008. V.456. P.95-100.
- 161 Martineau L. C., Gardiner P. F. Insight into skeletal muscle mechanotransduction: MAPK activation is quantitatively related to tension // J Appl Physiol (1985). 2001. V.91. P.693-702.
- 162 McBride T. A. Stretch-activated ion channels and c-fos expression remain active after repeated eccentric bouts // J Appl Physiol (1985). 2003. V.94. P.2296-2302.
- 163 McBride T. A., Stockert B. W., Gorin F. A., Carlsen R. C. Stretch-activated ion channels contribute to membrane depolarization after eccentric contractions // J Appl Physiol (1985). 2000. V.88. P.91-101.

- 164 McCall G. E., Allen D. L., Haddad F., Baldwin K. M. Transcriptional regulation of IGF-I expression in skeletal muscle // Am J Physiol Cell Physiol. 2003. V.285. P.C831-839.
- 165 McKoy G., Ashley W., Mander J., Yang S. Y., Williams N., Russell B., Goldspink G. Expression of insulin growth factor-1 splice variants and structural genes in rabbit skeletal muscle induced by stretch and stimulation // J Physiol. 1999. V.516 (Pt 2). P.583-592.
- 166 Methfessel C., Witzemann V., Takahashi T., Mishina M., Numa S., Sakmann B. Patch clamp measurements on *Xenopus laevis* oocytes: currents through endogenous channels and implanted acetylcholine receptor and sodium channels // Pflugers Arch. 1986. V.407. P.577-588.
- 167 Michael K. E., Dumbauld D. W., Burns K. L., Hanks S. K., Garcia A. J. Focal adhesion kinase modulates cell adhesion strengthening via integrin activation // Mol Biol Cell. 2009. V.20. P.2508-2519.
- 168 Midrio M. The denervated muscle: facts and hypotheses. A historical review // Eur J Appl Physiol. 2006. V.98. P.1-21.
- 169 Minke B., Cook B. TRP channel proteins and signal transduction // Physiol Rev. 2002. V.82. P.429-472.
- 170 Mirzoev T., Tyganov S., Vilchinskaya N., Lomonosova Y., Shenkman B. Key Markers of mTORC1-Dependent and mTORC1-Independent Signaling Pathways Regulating Protein Synthesis in Rat Soleus Muscle During Early Stages of Hindlimb Unloading // Cell Physiol Biochem. 2016. V.39. P.1011-1020.
- 171 Mirzoev T. M., Tyganov S. A., Lomonosova Y. N., Musienko P. E., Shenkman B. S. Signaling Pathways Regulating Protein Synthesis in Rat Soleus Muscle during Early Stages of Hindlimb Unloading // Ross Fiziol Zh Im I M Sechenova. 2015. V.101. P.1299-1308.
- 172 Mirzoev T. M., Tyganov S. A., Shenkman B. S. The role of stretch-activated channels in mTORC1 signaling in rat m. soleus in response to a mechanical stimulus following hindlimb unloading. // Ross Fiziol Zh Im I M Sechenova. 2018. V.104. P.217-225.

- 173 Miyazaki M., McCarthy J. J., Fedele M. J., Esser K. A. Early activation of mTORC1 signalling in response to mechanical overload is independent of phosphoinositide 3-kinase/Akt signalling // *J Physiol.* 2011. V.589. P.1831-1846.
- 174 Monier S., Le Cam A., Le Marchand-Brustel Y. Insulin and insulin-like growth factor I. Effects on protein synthesis in isolated muscles from lean and goldthioglucose-obese mice // *Diabetes.* 1983. V.32. P.392-397.
- 175 Morey-Holton E. R., Globus R. K. Hindlimb unloading rodent model: technical aspects // *J Appl Physiol* (1985). 2002. V.92. P.1367-1377.
- 176 Moukhina A., Shenkman B., Blottner D., Nemirovskaya T., Lemesheva Y., Puttmann B., Kozlovskaya I. Effects of support stimulation on human soleus fiber characteristics during exposure to "dry" immersion // *J Gravit Physiol.* 2004. V.11. P.P137-138.
- 177 Munoz K. A., Satarug S., Tischler M. E. Time course of the response of myofibrillar and sarcoplasmic protein metabolism to unweighting of the soleus muscle // *Metabolism.* 1993. V.42. P.1006-1012.
- 178 Nader G. A., Esser K. A. Intracellular signaling specificity in skeletal muscle in response to different modes of exercise // *J Appl Physiol* (1985). 2001. V.90. P.1936-1942.
- 179 Nemirovskaya T. L., Shenkman B. S. Effect of support stimulation on unloaded soleus in rat // *Eur J Appl Physiol.* 2002. V.87. P.120-126.
- 180 O'Neil T. K., Duffy L. R., Frey J. W., Hornberger T. A. The role of phosphoinositide 3-kinase and phosphatidic acid in the regulation of mammalian target of rapamycin following eccentric contractions // *J Physiol.* 2009. V.587. P.3691-3701.
- 181 Obermann W. M., Gautel M., Steiner F., van der Ven P. F., Weber K., Furst D. O. The structure of the sarcomeric M band: localization of defined domains of myomesin, M-protein, and the 250-kD carboxy-terminal region of titin by immunoelectron microscopy // *J Cell Biol.* 1996. V.134. P.1441-1453.

- 182 Ogneva I. V., Shenkman B. S., Kozlovskaya I. B. The contents of desmin and alpha-actinin-1 in the human soleus muscle after seven-day "dry" immersion // Dokl Biol Sci. 2011. V.436. P.20-22.
- 183 Ohira Y., Yoshinaga T., Ohara M., Kawano F., Wang X. D., Higo Y., Terada M., Matsuoka Y., Roy R. R., Edgerton V. R. The role of neural and mechanical influences in maintaining normal fast and slow muscle properties // Cells Tissues Organs. 2006. V.182. P.129-142.
- 184 Oria R., Wiegand T., Escribano J., Elosegui-Artola A., Uriarte J. J., Moreno-Pulido C., Platzman I., Delcanale P., Albertazzi L., Navajas D., Trepat X., Garcia-Aznar J. M., Cavalcanti-Adam E. A., Roca-Cusachs P. Force loading explains spatial sensing of ligands by cells // Nature. 2017. V.552. P.219-224.
- 185 Ottenheijm C. A., van Hees H. W., Heunks L. M., Granzier H. Titin-based mechanosensing and signaling: role in diaphragm atrophy during unloading? // Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2011. V.300. P.L161-166.
- 186 Patel A., Sharif-Naeini R., Folgering J. R., Bichet D., Duprat F., Honore E. Canonical TRP channels and mechanotransduction: from physiology to disease states // Pflugers Arch. 2010. V.460. P.571-581.
- 187 Pedersen B. K., Febbraio M. A. Muscles, exercise and obesity: skeletal muscle as a secretory organ // Nat Rev Endocrinol. 2012. V.8. P.457-465.
- 188 Peng X. D., Xu P. Z., Chen M. L., Hahn-Windgassen A., Skeen J., Jacobs J., Sundararajan D., Chen W. S., Crawford S. E., Coleman K. G., Hay N. Dwarfism, impaired skin development, skeletal muscle atrophy, delayed bone development, and impeded adipogenesis in mice lacking Akt1 and Akt2 // Genes Dev. 2003. V.17. P.1352-1365.
- 189 Peyronnet R., Nerbonne J. M., Kohl P. Cardiac Mechano-Gated Ion Channels and Arrhythmias // Circ Res. 2016. V.118. P.311-329.
- 190 Potts G. K., McNally R. M., Blanco R., You J. S., Hebert A. S., Westphall M. S., Coon J. J., Hornberger T. A. A map of the phosphoproteomic alterations that occur after a bout of maximal-intensity contractions // J Physiol. 2017. V.595. P.5209-5226.

- 191 Prager-Khoutorsky M., Khoutorsky A., Bourque C. W. Unique interwoven microtubule scaffold mediates osmosensory transduction via physical interaction with TRPV1 // *Neuron*. 2014. V.83. P.866-878.
- 192 Proud C. G. mTORC1 regulates the efficiency and cellular capacity for protein synthesis // *Biochem Soc Trans*. 2013. V.41. P.923-926.
- 193 Puchner E. M., Alexandrovich A., Kho A. L., Hensen U., Schafer L. V., Brandmeier B., Grater F., Grubmuller H., Gaub H. E., Gautel M. Mechanoenzymatics of titin kinase // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008. V.105. P.13385-13390.
- 194 Redpath N. T., Foulstone E. J., Proud C. G. Regulation of translation elongation factor-2 by insulin via a rapamycin-sensitive signalling pathway // *EMBO J*. 1996. V.15. P.2291-2297.
- 195 Reiser P. J., Kline W. O., Vaghy P. L. Induction of neuronal type nitric oxide synthase in skeletal muscle by chronic electrical stimulation in vivo // *J Appl Physiol* (1985). 1997. V.82. P.1250-1255.
- 196 Richter E. A., Kiens B., Mizuno M., Strange S. Insulin action in human thighs after one-legged immobilization // *J Appl Physiol* (1985). 1989. V.67. P.19-23.
- 197 Risson V., Mazelin L., Roceri M., Sanchez H., Moncollin V., Corneloup C., Richard-Bulteau H., Vignaud A., Baas D., Defour A., Freysenet D., Tanti J. F., Le-Marchand-Brustel Y., Ferrier B., Convard-Duplany A., Romanino K., Bauche S., Hantai D., Mueller M., Kozma S. C., Thomas G., Ruegg M. A., Ferry A., Pende M., Bigard X., Koulmann N., Schaeffer L., Gangloff Y. G. Muscle inactivation of mTOR causes metabolic and dystrophin defects leading to severe myopathy // *J Cell Biol*. 2009. V.187. P.859-874.
- 198 Rittweger J., Albracht K., Fluck M., Ruoss S., Brocca L., Longa E., Moriggi M., Seynnes O., Di Giulio I., Tenori L., Vignoli A., Capri M., Gelfi C., Luchinat C., Francheschi C., Bottinelli R., Cerretelli P., Narici M. Sarcolab pilot study into skeletal muscle's adaptation to long-term spaceflight // *NPJ Microgravity*. 2018. V.4. P.18.

- 199 Roberts C. K., Barnard R. J., Jasman A., Balon T. W. Acute exercise increases nitric oxide synthase activity in skeletal muscle // Am J Physiol. 1999. V.277. P.E390-394.
- 200 Robling A. G. The interaction of biological factors with mechanical signals in bone adaptation: recent developments // Curr Osteoporos Rep. 2012. V.10. P.126-131.
- 201 Rommel C., Bodine S. C., Clarke B. A., Rossman R., Nunez L., Stitt T. N., Yancopoulos G. D., Glass D. J. Mediation of IGF-1-induced skeletal myotube hypertrophy by PI(3)K/Akt/mTOR and PI(3)K/Akt/GSK3 pathways // Nat Cell Biol. 2001. V.3. P.1009-1013.
- 202 Roux P. P., Ballif B. A., Anjum R., Gygi S. P., Blenis J. Tumor-promoting phorbol esters and activated Ras inactivate the tuberous sclerosis tumor suppressor complex via p90 ribosomal S6 kinase // Proc Natl Acad Sci U S A. 2004. V.101. P.13489-13494.
- 203 Roux P. P., Topisirovic I. Regulation of mRNA translation by signaling pathways // Cold Spring Harb Perspect Biol. 2012. V.4.
- 204 Roy R. R., Baldwin K. M., Edgerton V. R. The plasticity of skeletal muscle: effects of neuromuscular activity // Exerc Sport Sci Rev. 1991. V.19. P.269-312.
- 205 Russomano T., Gustavo D., Falcão F. The Effects of Hypergravity and Microgravity on Biomedical Experiments // Biomedical Engineering. 2008. P.77.
- 206 Sachs F. Stretch-activated ion channels: what are they? // Physiology (Bethesda). 2010. V.25. P.50-56.
- 207 Sachs F., Morris C. E. Mechanosensitive ion channels in nonspecialized cells // Rev Physiol Biochem Pharmacol. 1998. V.132. P.1-77.
- 208 Sackin H. Stretch-activated ion channels // Kidney Int. 1995. V.48. P.1134-1147.
- 209 Sancak Y., Bar-Peled L., Zoncu R., Markhard A. L., Nada S., Sabatini D. M. Ragulator-Rag complex targets mTORC1 to the lysosomal surface and is necessary for its activation by amino acids // Cell. 2010. V.141. P.290-303.

- 210 Sasai N., Agata N., Inoue-Miyazu M., Kawakami K., Kobayashi K., Sokabe M., Hayakawa K. Involvement of PI3K/Akt/TOR pathway in stretch-induced hypertrophy of myotubes // Muscle Nerve. 2010. V.41. P.100-106.
- 211 Sato T., Nakashima A., Guo L., Tamanoi F. Specific activation of mTORC1 by Rheb G-protein in vitro involves enhanced recruitment of its substrate protein // J Biol Chem. 2009. V.284. P.12783-12791.
- 212 Sawada Y., Tamada M., Dubin-Thaler B. J., Cherniavskaya O., Sakai R., Tanaka S., Sheetz M. P. Force sensing by mechanical extension of the Src family kinase substrate p130Cas // Cell. 2006. V.127. P.1015-1026.
- 213 Sbrana F., Sassoli C., Meacci E., Nosi D., Squecco R., Paternostro F., Tiribilli B., Zecchi-Orlandini S., Francini F., Formigli L. Role for stress fiber contraction in surface tension development and stretch-activated channel regulation in C2C12 myoblasts // Am J Physiol Cell Physiol. 2008. V.295. P.C160-172.
- 214 Schiaffino S., Dyar K. A., Ciciliot S., Blaauw B., Sandri M. Mechanisms regulating skeletal muscle growth and atrophy // FEBS J. 2013. V.280. P.4294-4314.
- 215 Schiller H. B., Hermann M. R., Polleux J., Vignaud T., Zanivan S., Friedel C. C., Sun Z., Raducanu A., Gottschalk K. E., Thery M., Mann M., Fassler R. beta1- and alphav-class integrins cooperate to regulate myosin II during rigidity sensing of fibronectin-based microenvironments // Nat Cell Biol. 2013. V.15. P.625-636.
- 216 Seetharaman S., Etienne-Manneville S. Integrin diversity brings specificity in mechanotransduction // Biol Cell. 2018. V.110. P.49-64.
- 217 Shangraw R. E., Stuart C. A., Prince M. J., Peters E. J., Wolfe R. R. Insulin responsiveness of protein metabolism in vivo following bedrest in humans // Am J Physiol. 1988. V.255. P.E548-558.
- 218 Shenkman B. S., Nemirovskaya T. L., Lomonosova Y. N. No-dependent signaling pathways in unloaded skeletal muscle // Front Physiol. 2015. V.6. P.298.
- 219 Smith L. W., Smith J. D., Criswell D. S. Involvement of nitric oxide synthase in skeletal muscle adaptation to chronic overload // J Appl Physiol (1985). 2002. V.92. P.2005-2011.

- 220 Soltow Q. A., Betters J. L., Sellman J. E., Lira V. A., Long J. H., Criswell D. S. Ibuprofen inhibits skeletal muscle hypertrophy in rats // Med Sci Sports Exerc. 2006. V.38. P.840-846.
- 221 Sonobe T., Inagaki T., Poole D. C., Kano Y. Intracellular calcium accumulation following eccentric contractions in rat skeletal muscle in vivo: role of stretch-activated channels // Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2008. V.294. P.R1329-1337.
- 222 Spangenburg E. E. Changes in muscle mass with mechanical load: possible cellular mechanisms // Appl Physiol Nutr Metab. 2009. V.34. P.328-335.
- 223 Spangenburg E. E., McBride T. A. Inhibition of stretch-activated channels during eccentric muscle contraction attenuates p70S6K activation // J Appl Physiol (1985). 2006. V.100. P.129-135.
- 224 Squecco R., Sassoli C., Nuti F., Martinesi M., Chellini F., Nosi D., Zecchi-Orlandini S., Francini F., Formigli L., Meacci E. Sphingosine 1-phosphate induces myoblast differentiation through Cx43 protein expression: a role for a gap junction-dependent and -independent function // Mol Biol Cell. 2006. V.17. P.4896-4910.
- 225 Stamos J. L., Weis W. I. The beta-catenin destruction complex // Cold Spring Harb Perspect Biol. 2013. V.5. P.a007898.
- 226 Staruschenko A., Negulyaev Y. A., Morachevskaya E. A. Actin cytoskeleton disassembly affects conductive properties of stretch-activated cation channels in leukaemia cells // Biochim Biophys Acta. 2005. V.1669. P.53-60.
- 227 Stevenson E. J., Giresi P. G., Koncarevic A., Kandarian S. C. Global analysis of gene expression patterns during disuse atrophy in rat skeletal muscle // J Physiol. 2003. V.551. P.33-48.
- 228 Stiber J. A., Zhang Z. S., Burch J., Eu J. P., Zhang S., Truskey G. A., Seth M., Yamaguchi N., Meissner G., Shah R., Worley P. F., Williams R. S., Rosenberg P. B. Mice lacking Homer 1 exhibit a skeletal myopathy characterized by abnormal transient receptor potential channel activity // Mol Cell Biol. 2008. V.28. P.2637-2647.

- 229 Strohmeyer N., Bharadwaj M., Costell M., Fassler R., Muller D. J. Fibronectin-bound alpha5beta1 integrins sense load and signal to reinforce adhesion in less than a second // Nat Mater. 2017. V.16. P.1262-1270.
- 230 Stuart C. A., Shangraw R. E., Prince M. J., Peters E. J., Wolfe R. R. Bed-rest-induced insulin resistance occurs primarily in muscle // Metabolism. 1988. V.37. P.802-806.
- 231 Suchyna T. M., Sachs F. Mechanosensitive channel properties and membrane mechanics in mouse dystrophic myotubes // J Physiol. 2007. V.581. P.369-387.
- 232 Sugiura T., Abe N., Nagano M., Goto K., Sakuma K., Naito H., Yoshioka T., Powers S. K. Changes in PKB/Akt and calcineurin signaling during recovery in atrophied soleus muscle induced by unloading // Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2005. V.288. P.R1273-1278.
- 233 Sukharev S. I., Martinac B., Arshavsky V. Y., Kung C. Two types of mechanosensitive channels in the Escherichia coli cell envelope: solubilization and functional reconstitution // Biophys J. 1993. V.65. P.177-183.
- 234 Suzuki N., Motohashi N., Uezumi A., Fukada S., Yoshimura T., Itoyama Y., Aoki M., Miyagoe-Suzuki Y., Takeda S. NO production results in suspension-induced muscle atrophy through dislocation of neuronal NOS // J Clin Invest. 2007. V.117. P.2468-2476.
- 235 Tang W., Yuan J., Chen X., Gu X., Luo K., Li J., Wan B., Wang Y., Yu L. Identification of a novel human lysophosphatidic acid acyltransferase, LPAAT-theta, which activates mTOR pathway // J Biochem Mol Biol. 2006. V.39. P.626-635.
- 236 Tannerstedt J., Apro W., Blomstrand E. Maximal lengthening contractions induce different signaling responses in the type I and type II fibers of human skeletal muscle // J Appl Physiol (1985). 2009. V.106. P.1412-1418.
- 237 Tatsumi R., Liu X., Pulido A., Morales M., Sakata T., Dial S., Hattori A., Ikeuchi Y., Allen R. E. Satellite cell activation in stretched skeletal muscle and the role of nitric oxide and hepatocyte growth factor // Am J Physiol Cell Physiol. 2006. V.290. P.C1487-1494.

- 238 Tesch P. A., von Walden F., Gustafsson T., Linnehan R. M., Trappe T. A. Skeletal muscle proteolysis in response to short-term unloading in humans // J Appl Physiol (1985). 2008. V.105. P.902-906.
- 239 Thomason D. B., Booth F. W. Atrophy of the soleus muscle by hindlimb unweighting // J Appl Physiol (1985). 1990. V.68. P.1-12.
- 240 Tidball J. G., Lavergne E., Lau K. S., Spencer M. J., Stull J. T., Wehling M. Mechanical loading regulates NOS expression and activity in developing and adult skeletal muscle // Am J Physiol. 1998. V.275. P.C260-266.
- 241 Tyganov S., Mirzoev T., Shenkman B. An Anabolic Signaling Response of Rat Soleus Muscle to Eccentric Contractions Following Hindlimb Unloading: A Potential Role of Stretch-Activated Ion Channels // Int J Mol Sci. 2019. V.20. P.1165.
- 242 Udaka J., Terui T., Ohtsuki I., Marumo K., Ishiwata S., Kurihara S., Fukuda N. Depressed contractile performance and reduced fatigue resistance in single skinned fibers of soleus muscle after long-term disuse in rats // J Appl Physiol (1985). 2011. V.111. P.1080-1087.
- 243 van der Pijl R., Strom J., Conijn S., Lindqvist J., Labeit S., Granzier H., Ottenheijm C. Titin-based mechanosensing modulates muscle hypertrophy // J Cachexia Sarcopenia Muscle. 2018.
- 244 Vandebrouck A., Sabourin J., Rivet J., Balghi H., Sebille S., Kitzis A., Raymond G., Cognard C., Bourmeyster N., Constantin B. Regulation of capacitative calcium entries by alpha1-syntrophin: association of TRPC1 with dystrophin complex and the PDZ domain of alpha1-syntrophin // FASEB J. 2007. V.21. P.608-617.
- 245 Vilchinskaya N. A., Mirzoev T. M., Lomonosova Y. N., Kozlovskaya I. B., Shenkman B. S. Human muscle signaling responses to 3-day head-out dry immersion // J Musculoskelet Neuronal Interact. 2015. V.15. P.286-293.
- 246 Vilchinskaya N. A., Mochalova E. P., Nemirovskaya T. L., Mirzoev T. M., Turtikova O. V., Shenkman B. S. Rapid decline in MyHC I(beta) mRNA expression

in rat soleus during hindlimb unloading is associated with AMPK dephosphorylation // J Physiol. 2017. V.595. P.7123-7134.

247 Welsh G. I., Miller C. M., Loughlin A. J., Price N. T., Proud C. G. Regulation of eukaryotic initiation factor eIF2B: glycogen synthase kinase-3 phosphorylates a conserved serine which undergoes dephosphorylation in response to insulin // FEBS Lett. 1998. V.421. P.125-130.

248 Whitehead N. P., Streamer M., Lusambili L. I., Sachs F., Allen D. G. Streptomycin reduces stretch-induced membrane permeability in muscles from mdx mice // Neuromuscul Disord. 2006. V.16. P.845-854.

249 Widrick J. J., Stelzer J. E., Shoepe T. C., Garner D. P. Functional properties of human muscle fibers after short-term resistance exercise training // Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2002. V.283. P.R408-416.

250 Wolfe R. R. The underappreciated role of muscle in health and disease // Am J Clin Nutr. 2006. V.84. P.475-482.

251 Wolfe R. R. Branched-chain amino acids and muscle protein synthesis in humans: myth or reality? // J Int Soc Sports Nutr. 2017. V.14. P.30.

252 Yang S., Alnaqeeb M., Simpson H., Goldspink G. Cloning and characterization of an IGF-1 isoform expressed in skeletal muscle subjected to stretch // J Muscle Res Cell Motil. 1996. V.17. P.487-495.

253 Yeung E. W., Allen D. G. Stretch-activated channels in stretch-induced muscle damage: role in muscular dystrophy // Clin Exp Pharmacol Physiol. 2004. V.31. P.551-556.

254 Yeung E. W., Head S. I., Allen D. G. Gadolinium reduces short-term stretch-induced muscle damage in isolated mdx mouse muscle fibres // J Physiol. 2003. V.552. P.449-458.

255 Yin J., Kuebler W. M. Mechanotransduction by TRP channels: general concepts and specific role in the vasculature // Cell Biochem Biophys. 2010. V.56. P.1-18.

256 Yoon M. S., Sun Y., Arauz E., Jiang Y., Chen J. Phosphatidic acid activates mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1) kinase by displacing FK506

- binding protein 38 (FKBP38) and exerting an allosteric effect // J Biol Chem. 2011. V.286. P.29568-29574.
- 257 You J. S., Anderson G. B., Dooley M. S., Hornberger T. A. The role of mTOR signaling in the regulation of protein synthesis and muscle mass during immobilization in mice // Dis Model Mech. 2015. V.8. P.1059-1069.
- 258 You J. S., Frey J. W., Hornberger T. A. Mechanical stimulation induces mTOR signaling via an ERK-independent mechanism: implications for a direct activation of mTOR by phosphatidic acid // PLoS One. 2012. V.7. P.e47258.
- 259 You J. S., Lincoln H. C., Kim C. R., Frey J. W., Goodman C. A., Zhong X. P., Hornberger T. A. The role of diacylglycerol kinase zeta and phosphatidic acid in the mechanical activation of mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling and skeletal muscle hypertrophy // J Biol Chem. 2014. V.289. P.1551-1563.
- 260 Young L. R., Mendoza J. C., Groleau N., Wojcik P. W. Tactile influences on astronaut visual spatial orientation: human neurovestibular studies on SLS-2 // J Appl Physiol (1985). 1996. V.81. P.44-49.
- 261 Zhan J., Chitta R. K., Harwood F. C., Grosveld G. C. Phosphorylation of TSC2 by PKC-delta reveals a novel signaling pathway that couples protein synthesis to mTORC1 activity // Mol Cell Biochem. 2019.
- 262 Zhang P., Chen X., Fan M. Signaling mechanisms involved in disuse muscle atrophy // Med Hypotheses. 2007. V.69. P.310-321.
- 263 Zhang W., Cheng L. E., Kittelmann M., Li J., Petkovic M., Cheng T., Jin P., Guo Z., Gopfert M. C., Jan L. Y., Jan Y. N. Ankyrin Repeats Convey Force to Gate the NOMPC Mechanotransduction Channel // Cell. 2015. V.162. P.1391-1403.
- 264 Zhou J., Aponte-Santamaria C., Sturm S., Bullerjahn J. T., Bronowska A., Grater F. Mechanism of Focal Adhesion Kinase Mechanosensing // PLoS Comput Biol. 2015. V.11. P.e1004593.
- 265 Zoncu R., Bar-Peled L., Efeyan A., Wang S., Sancak Y., Sabatini D. M. mTORC1 senses lysosomal amino acids through an inside-out mechanism that requires the vacuolar H(+)-ATPase // Science. 2011. V.334. P.678-683.