

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

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Москва – 2019

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

**Научный руководитель:** кандидат биологических наук  
**Мирзоев Тимур Махмашарифович**

**Научный консультант:** доктор биологических наук  
**Шенкман Борис Стивович**

**Официальные оппоненты:** доктор биологических наук,  
**Ширинский Владимир Павлович,**  
Руководитель лаборатории клеточной подвижности, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, ФГБУ, Министерство здравоохранения Российской Федерации

доктор биологических наук,  
**Орлов Сергей Николаевич,**  
МГУ имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, лаборатория физико-химии биологических мембран, заведующий лабораторией физико-химии биологических мембран

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

Защита диссертации состоится «\_\_»\_\_\_\_\_ 2019 г. в \_\_\_\_\_ часов на заседании диссертационного совета Д 002.111.01 в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Государственном научном центре Российской Федерации – Институте медико-биологических проблем Российской академии наук по адресу: 123007, г. Москва, Хорошевское шоссе, 76а.

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

Автореферат разослан «\_\_»\_\_\_\_\_ 2019 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,  
кандидат биологических наук

С.В. Поддубко

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность проблемы.** В настоящее время исследования влияния гравитационной разгрузки (реальной или моделируемой микрогравитации) на организм человека и других млекопитающих интенсивно изучаются 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 морфофункциональных 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 секретирует различные миокины (Pedersen and Febbraio, 2012; Wolfe, 2006). В связи с большим количеством функций, которые выполняет скелетная мышца, существует необходимость исследовать факторы, влияющие на ее состояние, в особенности же 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 (Schiaffino et al., 2013; Robling, 2012). Хорошо известно, что увеличению механической нагрузки сопутствует мышечная гипертрофия, в то время как снижение механической нагрузки приводит к мышечной атрофии (Goodman, 2014; Adams and Vamman, 2012). 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 (Adams and Vamman 2012). 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) (Goodman, 2014; Hornberger, 2011).

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 (Шенкман и др., 2017; Gao et al., 2018; Rittweger et al., 2018). При этом ведущую роль в развитии

гипогравитационного синдрома играет устранение опорной афферентации (информации, полученной от механосенсоров кожи стопы), выполняющей триггерную роль в системе тонических регуляций (Шенкман и др., 2017). Устранение опоры приводит к снижению активности тонических двигательных единиц постуральных мышц и изменению порядка рекрутирования двигательных единиц спинного мозга, что в конечном итоге приводит к развитию атонии и мышечной атрофии (Kozlovskaya et al., 2007). Множество экспериментов, проведенных с использованием пассивной или активной стимуляции опорных афферентов, показали целесообразность использования этого метода в поддержании функциональных свойств постуральных мышц (Kozlovskaya et al., 2007; Litvinova et al., 2004; Курарос et al., 2005; Moukhina et al., 2004; Nemirovskaya and Shenkman, 2002). 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.

В связи с вышеизложенным **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 необходимо было решить 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 механочувствительных 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.

### **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 транзитное снижение уровня фосфорилирования сигнальных ферментов 4E-

BP1, GSK-3 $\beta$  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 гадолия – 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 $\beta$  и eEF2B.
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 нам расширить знания о природе функциональной и структурной перестройки мышечного волокна. При этом изучение молекулярных механосенсоров скелетной мышцы может в дальнейшем привести к разработке фармакологических препаратов, эффективно предотвращающих негативные последствия микрогравитации. Изучение молекулярных механизмов, вовлеченных в реализацию механической стимуляции опорных зон стопы на фоне гравитационной разгрузки, даст возможность разработать методы предотвращения мышечной атрофии и негативных изменений сократительных возможностей мышцы. Полученные в работе данные могут найти приложение в космической и реабилитационной медицине.

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.

### **Положения, выносимые на защиту**

1. Уменьшение синтеза белка в камбаловидной мышце крысы на ранних этапах гравитационной разгрузки сопровождается снижением активности Akt/GSK-3 $\beta$  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.

### **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 г. (Москва); 46-й Европейской Мышечной Конференции, 19-22 сентября, 2017 г. (Потсдам, Германия); Международной конференции "Клеточная биология: проблемы и перспективы", 2-6 октября 2017 г. (Санкт-Петербург); XVII Конференции молодых ученых, специалистов и студентов, посвященная 100-летию со дня рождения академика О.Г. Газенко, 10-12 декабря, 2018 г. (Москва); 39-м ежегодном симпозиуме международного общества гравитационной физиологии (39th Annual Meeting of the ISGP), 18-22 июня, 2018 г. (Нордвейк, Нидерланды).

Диссертация апробирована на заседании секции Ученого совета ГНЦ РФ-ИМБП РАН «Космическая физиология и биология» (протокол № 2 от 26 февраля 2019 г.).

Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ № 14-04-31414-мол\_а и 17-29-01029-офи\_м.

### **Публикации**

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

### **Структура и объем диссертации**

Работа включает в себя введение, обзор литературы, описание материалов и методов исследования, изложение результатов и их обсуждение, а также выводы.

Диссертационная работа изложена на 130 страницах, содержит 38 рисунков, 8 таблиц и список цитируемой литературы из 265 источников.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

### Организация экспериментов

**Объект исследований.** Все эксперименты проводились на самцах крыс линии Вистар. В нижеописанных экспериментах вес крыс составлял  $220 \pm 5$  г. Крысы содержались при температуре  $20-22^{\circ}\text{C}$ , 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 (трибромэтил-этанол) (Sigma, США). У каждого животного под авертиновым наркозом (в среднем 0,5 мл 10% авертина внутривентриально на животное весом 200г.) из обеих ног была выделена камбаловидная мышца и немедленно заморожена в жидком азоте. Далее пробы помещали в холодильник, поддерживающий температуру  $-85^{\circ}\text{C}$ , для последующей обработки.

**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 (Thomason and Booth, 1990). 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 (Ilin and Novikov, 1980; Morey-Holton and Globus, 2002). 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.1).

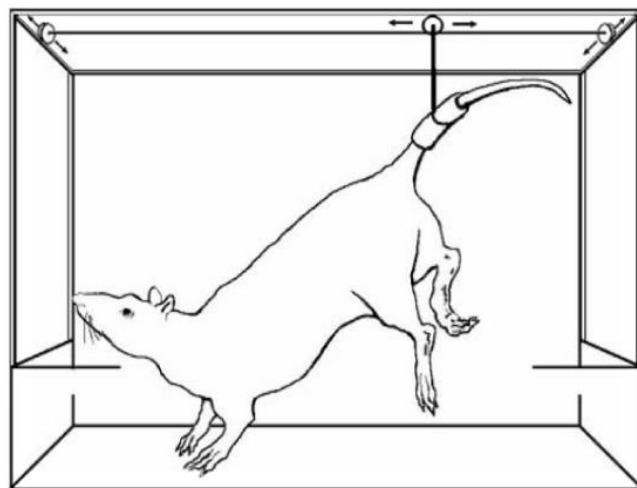


Рис.1 Модель антиортостатического вывешивания крысы

**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.2).



*Рис.2 Фотография крысы с закрепленным опорным стимулятором стопы*

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 выполнения всех циклов, устройство снималось. Для расчета необходимого давления на стопу использовалось значение площади поверхности стопы взрослой крысы, которое лежит между 450 и 500 мм<sup>2</sup>. 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 mN) (Курарос et al., 2005).

**Методы работы с изолированной мышцей.** Для проведения серии эксцентрических и изометрических сокращений была использована стандартная методика (O'Neil et al., 2009). Выделенные из крысы камбаловидные мышцы помещались в раствор Рингера-Кребса с постоянной перфузией карбогеном 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 (Gordon et al., 1966) при супрамаксимальном токе, что обусловлено максимальным перекрытием актина и миозина (Brughelli and Cronin, 2007). 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.



Во время стимуляции мышца растягивалась на 15% от  $L_0$  (время растяжения и возврата на прежнюю длину – 100 мс) (Burry et al. 2007) с задержкой растянутой длины на 3 секунды. Каждое сокращение сопровождалось 10 с перерывом, во время которого мышца находится при  $L_0$ . После серии из 5 сокращений дополнительно вводился 30 секундней 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 (Jorgensen et al., 2006), мышца 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 (Bensamoun et al., 2006).

### **Методики обработки биоматериала и анализ данных**

**Выявление содержания белков методом ДДС-электрофореза в ПААГ 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  $-80^{\circ}\text{C}$  вплоть до обработки. Для выделения белка на криотоме при  $-20^{\circ}\text{C}$  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  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  20мкл/мл; 1мМ DTT 4мкл/мл; 1мМ PMSF 20 мкл/мл; 1мМ аprotинином 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  $+4^{\circ}\text{C}$  и 12 000 об/мин). Электрофорез по методу Лэммли (Laemmli 1970) проводили в 8-10% разделяющем полиакриламидном геле в мини-системе Bio-Rad (США) в течение часа при силе тока 17мА 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  $+4^{\circ}\text{C}$  и постоянном напряжении 100 В. Затем, для проверки равной загрузки белка на все дорожки, нитроцеллюлозная мембрана красилась краской Ponceau S. После этого мембрану отмывали от Ponceau S и блокировали в 5% растворе сухого молока в PBST (фосфатно-солевой буффер с 0,1% содержанием Tween 20) при комнатной температуре в течение часа. Затем проводили инкубацию (в течение 15 часов,  $+4^{\circ}\text{C}$ ) с первичными антителами. После этого отмывали мембраны в PBST 3 раза по 5 минут. Затем мембраны инкубировали в течение часа с биотинилированными вторичными антителами goat anti-rabbit (sc-2004, Santa Cruz, США). Далее проводили отмывку в PBST 3 раза по 5 минут. Белковые полосы

выявляли на мембране с помощью Clarity Western ECL Substrate (Bio-Rad, США). Для пуромицина измеряли оптическую плотность каждой целой дорожки от 20 до 180 кДа.

**Оценка синтеза белка методом SUnSET.** Интенсивность синтеза белка в *m. 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 (Goodman et al., 2011). 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 внутривенно).

**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.

**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 TBE (89 mM ТРИС, 89 mM борная кислота, 2 mM ЭДТА pH 8,0). Электрофорез проводили при напряжении 10 В/см длины геля в буфере TBE. Для определения длин полос РНК использовали маркёры RiboRuler (Thermo Scientific, США). Результаты электрофореза визуализировали на Gel Doc EZ Imager (Biorad, США). Для подсчёта результатов использовали программное обеспечение Image Studio Digits v. 4.0. Степень деградации РНК определяли по вычислению соотношения 28S РНК к 18S РНК.

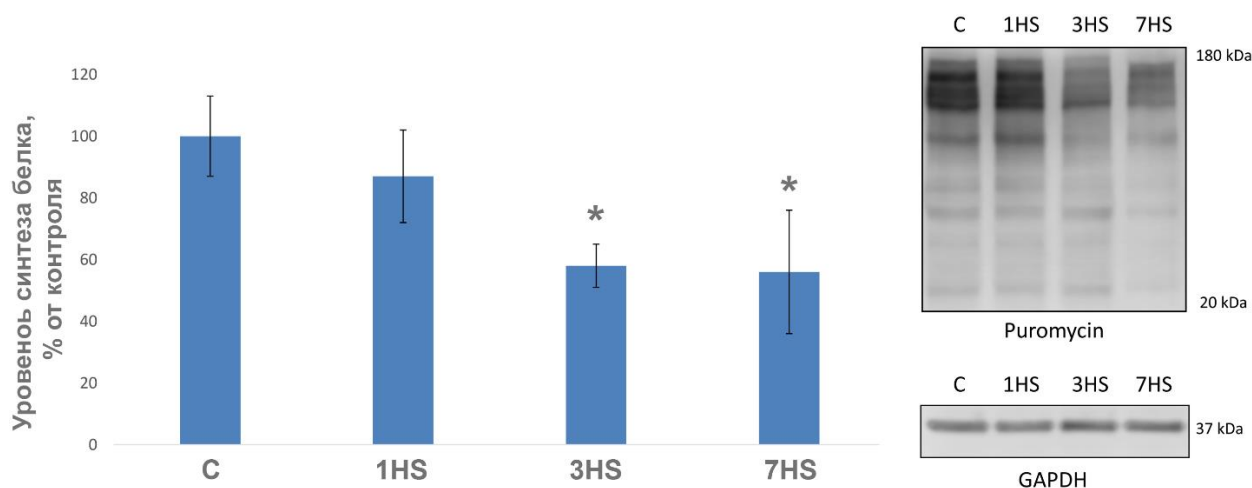
**Анализ биомеханических параметров изолированной мышцы.** Анализ биомеханических параметров изолированной мышцы проводился с помощью Dynamic Muscle Data Acquisition and Analysis Software (Aurora Scientific, США).

Показатели максимального тетанического сокращения нормировались на площадь поперечного сечения мышцы (отношение веса мышцы к оптимальной длине, умноженного на плотность мышцы – 1,07 г/см<sup>3</sup>) (Gollnick et al. 1981).

**Статистическая обработка данных.** Данные представлены как средние значения ± стандартная ошибка среднего ( $M \pm SEM$ ). Результаты по рНК 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  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ ЭКСПЕРИМЕНТОВ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

**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 (Лысенко и др., 2010). 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.



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

Регуляция биосинтеза белка осуществляется посредством протеинкиназы mTORC1, которая, как известно, может фосфорилировать свои ключевые субстраты,

p70s6k и 4E-BP1, активируя процесс инициации трансляции (Kimball and Jefferson, 2010). 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 (Лысенко и др., 2010; Dupont et al., 2011; Sugiura et al., 2005). Однако совсем недавно появилась работа, в которой было установлено активирование p70s6k и одновременное снижение синтеза белка в *m. soleus* мышцы после 3- и 7-суточной иммобилизации задней конечности (You et al., 2015), 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, обуславливающим частичную компенсацию снижения содержания мышечного белка. В то же время они никак не обсуждают возможные причины такой активации mTOR-зависимого сигналинга, но предполагают, что активация mTORC1 является попыткой физиологической системы компенсировать снижение содержания мышечного белка при развитии атрофии. 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 (Cannavino et al., 2014), тогда как в других снижалось на более длительных сроках вывешивания (Dupont et al., 2011a).

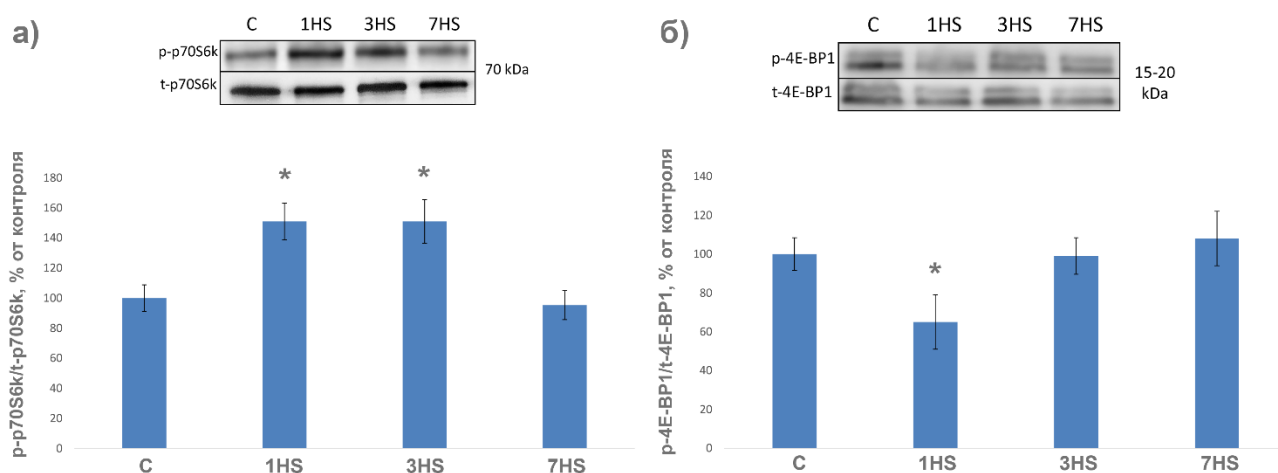


Рис. 4 Уровень фосфорилирования p70S6k (а) и 4E-BP1 (б), в процентах от контроля. С – контроль, 1HS – первые сутки вывешивания, 3HS – третьи сутки вывешивания, 7HS – седьмые сутки вывешивания. \* - достоверное отличие между контролем и вывешиванием ( $p < 0,05$ )

Полученные нами данные о снижении фосфорилирования Akt и GSK-3 $\beta$  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 (Красный и др., 2013).

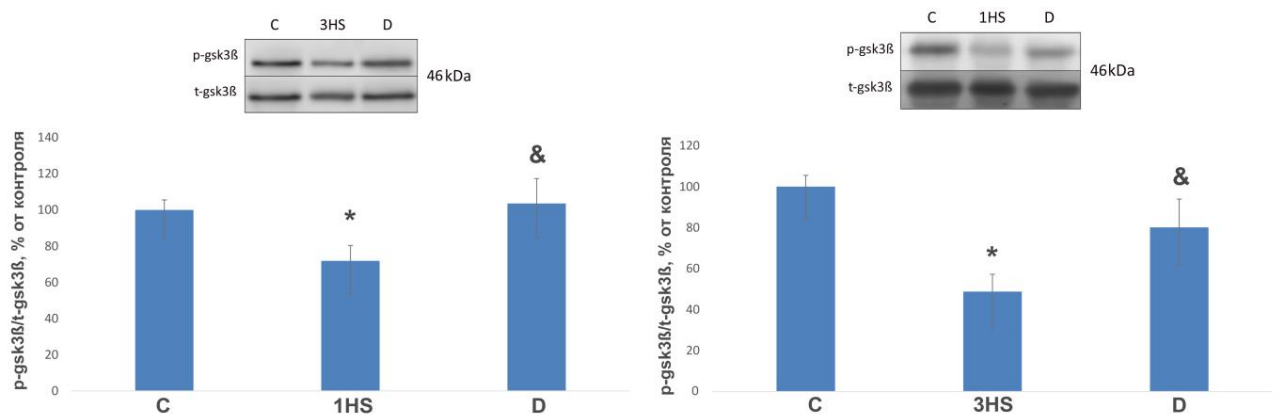


Рис. 5 Уровень фосфорилирования Akt (а) и GSK-3β (б), в процентах от контроля. С – контроль, 1HS – первые сутки вывешивания, 3HS – третьи сутки вывешивания, 7HS – седьмые сутки вывешивания. \* - достоверное отличие между контролем и вывешиванием ( $p < 0,05$ )

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

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.

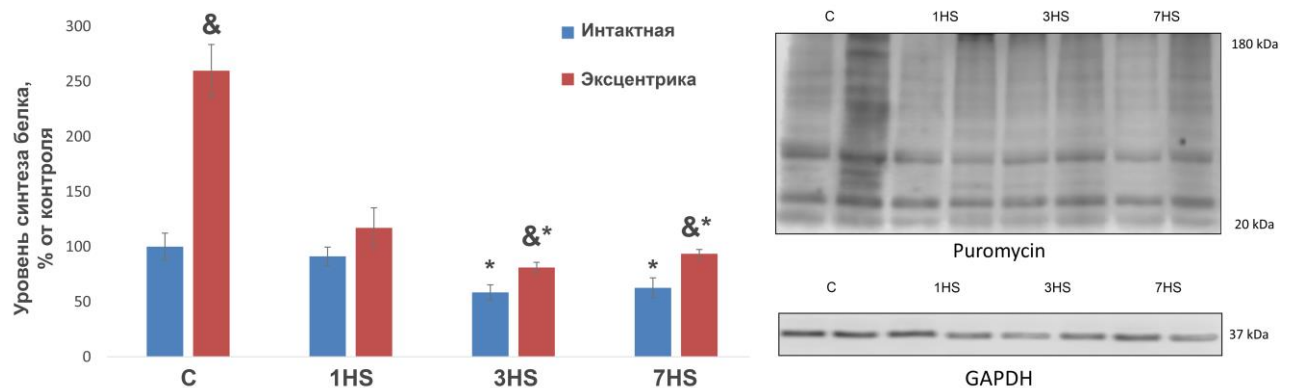


Рис.6 Уровень синтеза белка, измеренный пурамициновым методом, в процентах от контроля. С – контроль, 1HS – первые сутки вывешивания, 3HS – третьи сутки вывешивания, 7HS – седьмые сутки вывешивания. \* - достоверное отличие между контролем и группами с соответствующим вывешиванием ( $p < 0,05$ ). & - достоверное отличие между интактными мышцами и мышцами с ECC ( $p < 0,05$ )

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.

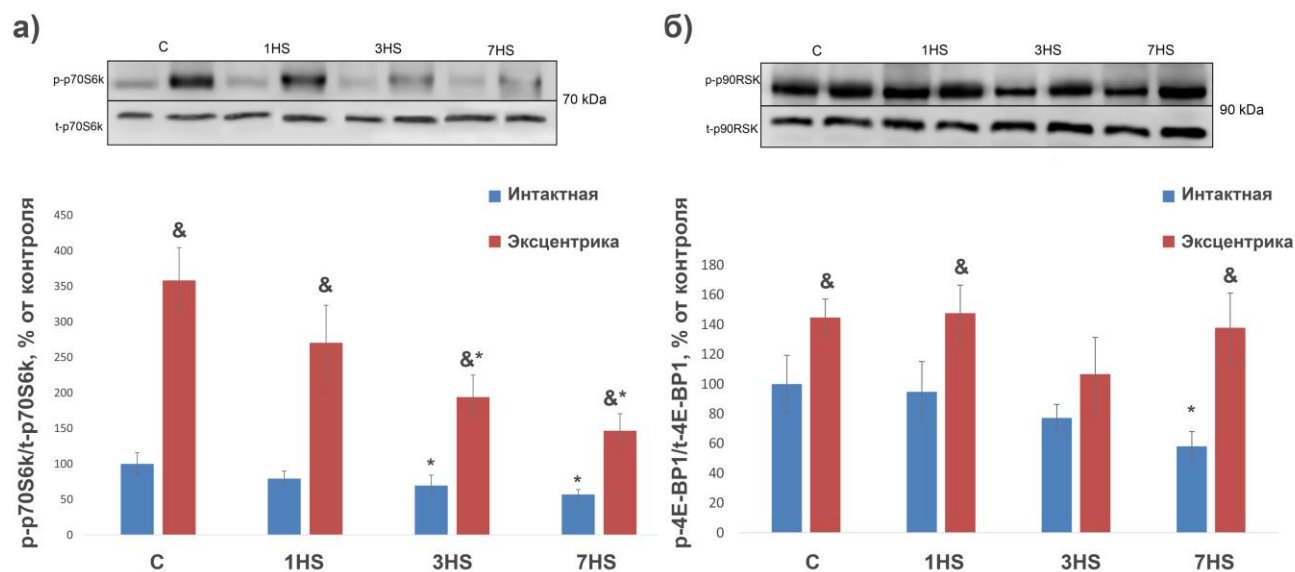
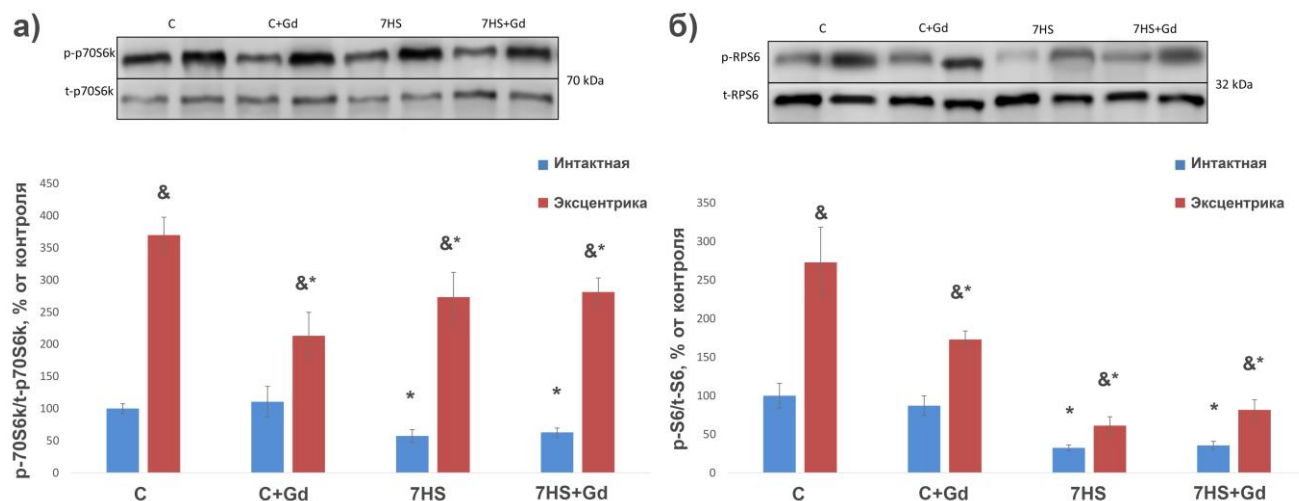


Рис.7 Уровень фосфорилирования p70S6k (а) и p90RSK(б), в процентах от контроля. С – контроль, 1HS – первые сутки вывешивания, 3HS – третьи сутки вывешивания, 7HS – седьмые сутки вывешивания. \* - достоверное отличие между контролем и группами с соответствующим вывешиванием ( $p < 0,05$ ). & - достоверное отличие между интактными мышцами и мышцами с ECC ( $p < 0,05$ )

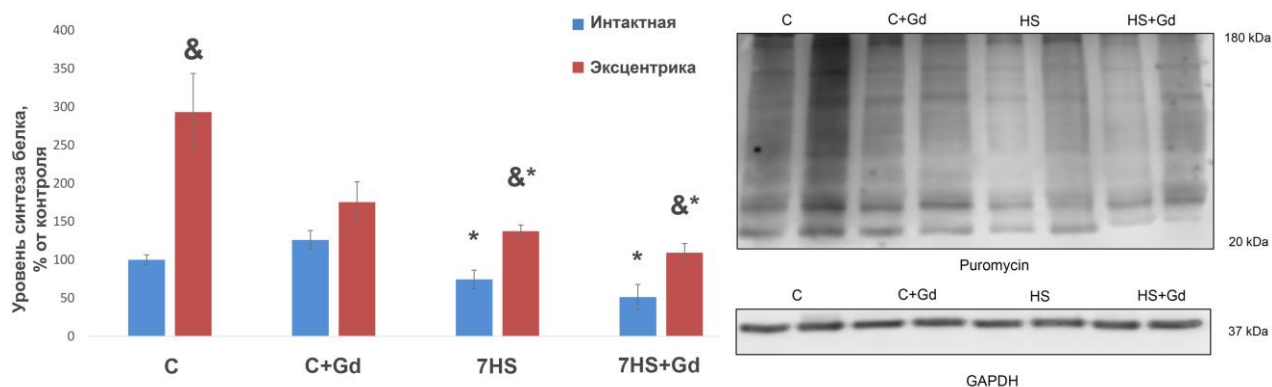
Интересно, что в отличие от p70S6k степень фосфорилирования 4E-BP1 в ответ на серию эксцентрических сокращений была снижена по сравнению с интактным контролем. Эти данные согласуются с работой Ato и соавт. (Ato et al., 2016), в которой было показано, что в икроножной мышце крысы сразу после ЭС уровень 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 $\beta$ , 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 $\beta$  в ответ на ЭС на фоне разгрузки остаётся неизвестным. 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 механотрансдукцию. Так, потенциальными механосенсорами, воспринимающими внешний механический сигнал и проводящим его к вторичным мессенджерам, могли быть как фокальная адгезивная киназа (Flück et al., 1999; Durieux et al., 2007), так и стретч-чувствительные кальциевые каналы (Spangenburg and McBride, 2006). Кроме того, важная роль в передаче механического сигнала от поверхности мышечного волокна к анаболическим регуляторным белкам может принадлежать цитоскелету (Ingber, 2006).

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



*Рис.8 Уровень фосфорилирования p70S6k (а) и S6RP (б), 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 ( $p < 0,05$ )*

Также наблюдалось достоверное снижение прироста общего синтеза белка, измеренного методом SUnSET.



*Рис.9 Уровень синтеза белка, измеренный пурамициновым 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 ( $p < 0,05$ )*

Эти результаты соответствуют полученными другими авторами данным о влиянии  $GdCl_3$  на реализацию механического сигнала (Juffer et al. 2014; Yeung et al.

2003). 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 механосенсоров. При этом повышенный уровень кальция может, например, активировать экспрессию IGF-1 или MGF-1, или ингибировать экспрессию миостатина (McCall et al. 2003). Было также показано, что повышенный уровень кальция необходим для формирования высокомолекулярного сигнального белкового комплекса, который участвует в активации p70S6k (Hannan et al. 2003). В нашем исследовании ингибитор SAC не оказывал влияния на прирост синтеза белка и снижение фосфорилирования ключевых мишеней 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 (Mirzoev et al. 2018).

**Роль опорной афферентации в поддержании стабильности анаболических процессов в постуральной мышце млекопитающих на фоне 1 и 3 суточного вывешивания.** 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.

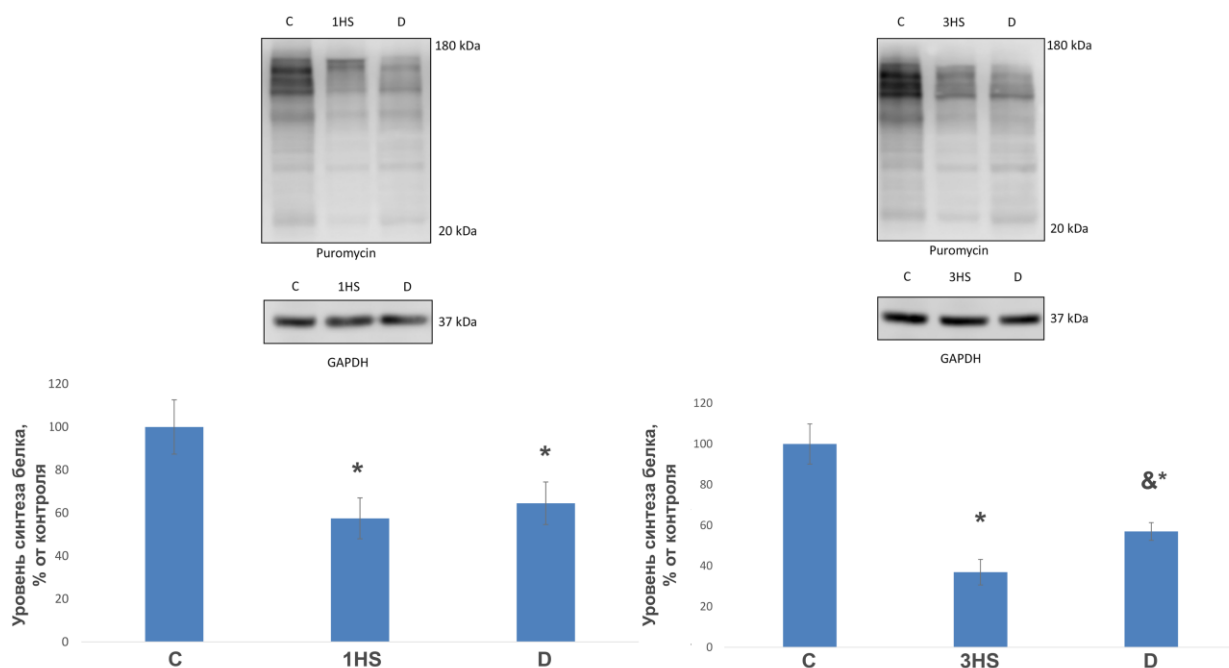


Рис.10 Уровень синтеза белка, измеренный пурамициновым методом, в процентах от контроля. С – контроль, 1HS – 1-суточное антиортостатическое вывешивание; 3HS - 3-суточное антиортостатическое вывешивание, D – опорная



стимуляция (4 часа) на фоне 1-суточного антиортостатического вывешивания. \* - достоверное отличие между контролем и экспериментальными группами ( $p < 0,05$ )

После 3 суток гравитационной разгрузки было выявлено достоверное повышение уровня фосфорилирования p70S6K, которое полностью предотвращалось при действии опорной стимуляции.

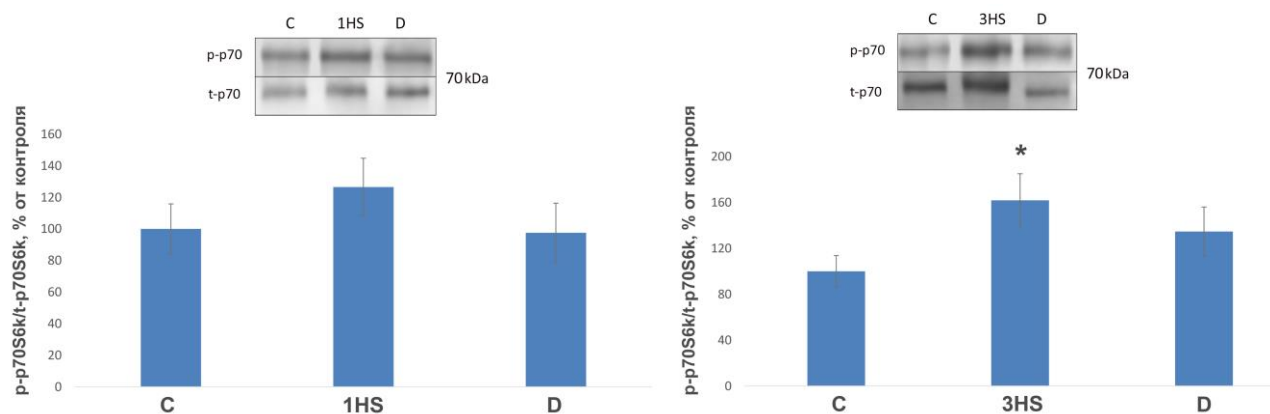


Рис.11 Уровень фосфорилирования p70S6k, в процентах от контроля. C – контроль, 1HS – 1-суточное антиортостатическое вывешивание; 3HS - 3-суточное антиортостатическое вывешивание, D – опорная стимуляция (4 часа) на фоне 1-суточного антиортостатического вывешивания. \* - достоверное отличие между контролем и экспериментальными группами ( $p < 0,05$ )

Кроме того, для GSK-3 $\beta$  наблюдалось снижение уровня негативного фосфорилирования, уменьшающем ее способность ингибировать синтез белка, и это снижение почти полностью предотвращалось при стимуляции опорных афферентов. В настоящем исследовании после трех суток моделируемой гравитационной разгрузки также было обнаружено увеличение уровня фосфорилирования элонгационного фактора. Это увеличение успешно предотвращалось при использовании стимуляции стопы животного.

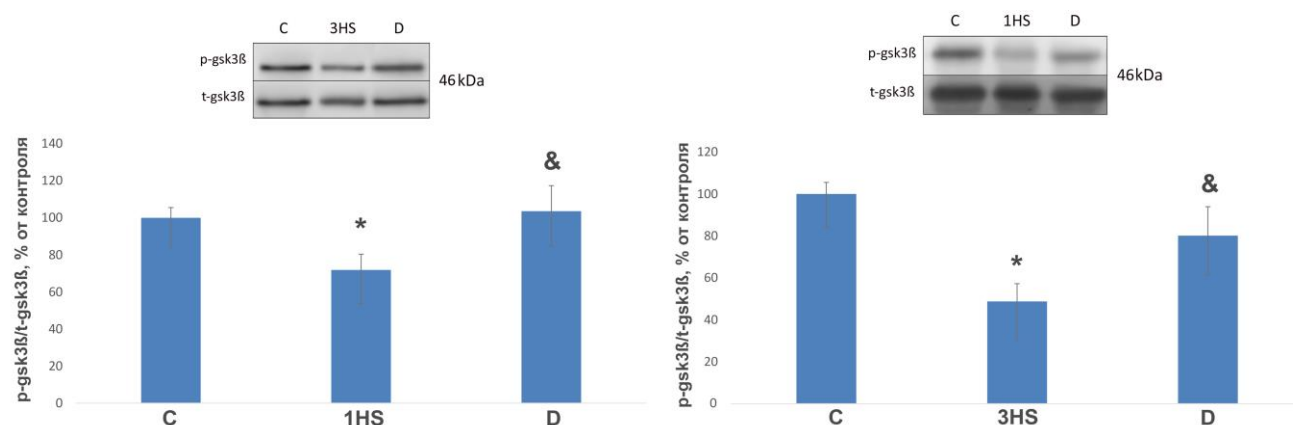


Рис.12 Уровень фосфорилирования GSK-3 $\beta$ , в процентах от контроля. C – контроль, 1HS – 1-суточное антиортостатическое вывешивание; 3HS - 3-суточное антиортостатическое вывешивание, D – опорная стимуляция (4 часа) на фоне 1-суточного антиортостатического вывешивания. \* - достоверное отличие между контролем и экспериментальными группами ( $p < 0,05$ )

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 (Proud 2013).

*Таб.1 Содержание 18S и 28S рРНК в камбаловидной мышце крысы в расчёте на мг мышечной ткани*

Группа	18S рРНК 1 сутки вывешивания, $2^{-\Delta\Delta Ct}$	28S рРНК 1 сутки вывешивания, $2^{-\Delta\Delta Ct}$	18S рРНК 3 сутки вывешивания, $2^{-\Delta\Delta Ct}$	28S рРНК 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)*

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 обеспечивается осевой нагрузкой на камбаловидную мышцу.

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

Максимальная сила изометрического сокращения была достоверно снижена на 20% для абсолютной силы и на 15% 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.

Таб.2 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 <sup>2</sup>	Максимальная сила изометрического сокращения, мН	Максимальная сила изометрического сокращения, нормированная на ППС, Н/см <sup>2</sup>
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

Применив методику серии эксцентрических сокращений в эксперименте с опорной стимуляцией, мы наблюдали 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.

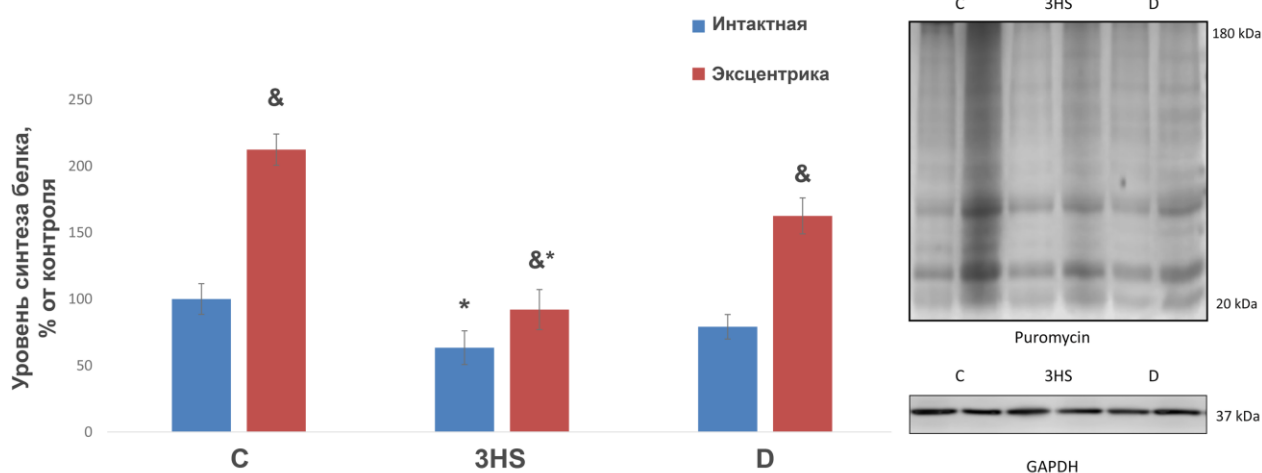


Рис. 13 Уровень синтеза белка, измеренный пурамициновым методом, в процентах от контроля. C – контроль, 3HS – 3-суточное антиортостатическое вывешивание; D – опорная стимуляция (4 часа) на фоне 3-суточного антиортостатического вывешивания. \* - достоверное отличие между контролем и экспериментальными группами ( $p < 0,05$ ). & - достоверное отличие между интактными мышцами и мышцами с ECC ( $p < 0,05$ )

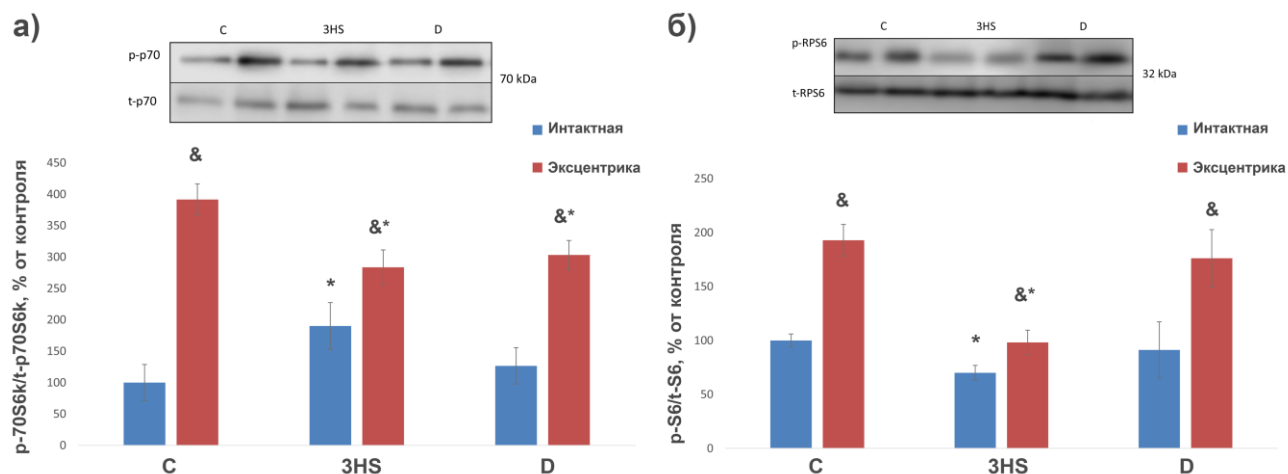


Рис.14 Уровень фосфорилирования p70S6k (а) и S6RP (б), в процентах от контроля. С – контроль, С+Gd – контроль с введением ингибитора SAC, 7HS – 7 суток вывешивания, 7HS+Gd - 7 суток вывешивания с введением ингибитора SAC. \* - достоверное отличие между контролем и экспериментальными группами ( $p < 0,05$ ). & - достоверное отличие между интактными мышцами и мышцами с ECC ( $p < 0,05$ )

Данные эффекты опорной стимуляции очевидно обусловлены увеличением электрической и соответственно механической тонической активности камбаловидной мышцы при таком воздействии (Kozlovskaya et al. 2007). Так, в эксперименте Layne et al. (1998) опорная стимуляция усиливала электромиографическую активность камбаловидной мышцы космонавтов в условиях невесомости (Layne et al. 1998). 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 $\beta$ .
2. Снижение прироста синтеза белка в ответ на серию эксцентрических сокращений камбаловидной мышцы *ex vivo* на фоне предшествовавшей функциональной разгрузки связано со снижением механозависимого 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/S6rp на физиологически оптимальном уровне, что приводит к повышенному по сравнению с контрольным вывешиванием приросту уровня синтеза белка в ответ на механический стимул.

## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО МАТЕРИАЛАМ ДИССЕРТАЦИИ

### Статьи в рецензируемых журналах:

1. Мирзоев Т.М., Тыганов С.А., Ломоносова Ю.Н., Мусиенко П.Е., Шенкман Б.С. Сигнальные пути, регулирующие синтез белка в камбаловидной мышце крысы на ранних сроках гравитационной разгрузки // Рос. Физиол. Журн. им. И.М. Сеченова. - 2015. - Т. 101. № 11. С. 1299-1308.
2. Мирзоев Т.М., Тыганов С.А., Петрова И.О., Шенкман Б.С. Реализация механического сигнала на фоне гравитационной разгрузки: реакция молекулярных мишеней mTORC1 на эксцентрические сокращения. // Биофизика. - 2016. - Т. 61. № 5. С. 979–985.
3. 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. № 3. P. 1011-1020.
4. 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.
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 // Рос. Физиол. Журн. им. И.М. Сеченова. - 2018. - Т.104. №2. С. 217-225.
6. Tyganov S.A., Mirzoev T.M., Shenkman B.S. 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. - 20(5): 1165. DOI: 10.3390/ijms20051165.

### Тезисы конференций:

7. Мирзоев Т.М., Тыганов С.А. Анаболические пути сигнальной трансдукции и синтез белка в постуральной мышце крысы на ранних сроках моделируемой микрогравитации // Биология – наука XXI века: 19-я Международная Пущинская школа-конференция молодых ученых (Пущино, 20-24 апреля 2015 г.). Сборник тезисов. Пущино, 2015, с. 350.
8. Мирзоев Т.М., Тыганов С.А., Шенкман Б.С. Влияние гравитационной разгрузки на анаболические сигнальные пути и синтез белка в камбаловидной мышце крысы // Рецепторы и внутриклеточная сигнализация. Сборник статей. Том 1./ Под редакцией В.П. Зинченко, А.В. Бережнова – Пущино: 2015. С. 280-283.
9. Mirzoev T., Tyganov S., Shenkman B. Anabolic signaling pathways regulating protein synthesis rate in rat soleus muscle during early stages of simulated microgravity // Book of Abstracts. 36th Annual Meeting of the International Society for Gravitational Physiology. June 7-12, Ljubljana, Slovenia, 2015, P. 108.
10. Shenkman B.S., Vilchinskaya N.A., Mirzoev T.M., Tyganov S.A., Lomonosova Y.N. Signaling pathways involved in the triggering the soleus muscle atrophy development at the early stages of unloading // 44th European Muscle Conference, Abstract Book, Warsaw, Poland, 21-25 September 2015. P. 116
11. Vilchinskaya N.A., Mirzoev T.M., Tyganov S.A., Shenkman B.S. Effects of short-term hindlimb-unloading on anabolic signaling pathways in rat soleus muscle // Biological Motility. – Pushchino: Synchronobook – 2016. – P. 253-254.
12. Тыганов С.А., Петрова И.О., Мирзоев Т.М., Шенкман Б.С. Влияние гравитационной разгрузки на реализацию механического сигнала в постуральной мышце млекопитающего // XVI Конференции по космической биологии и медицине с международным участием, школа молодых ученых. 5-8 декабря 2016 года, Москва. С. 236.

13. Mirzoev T., Tyganov S., Petrova I., Shenkman B. Impact of Mechanical Unloading and Subsequent Eccentric Contractions on Protein Synthesis and Anabolic Signaling in Rat Soleus Muscle // *Advances in Skeletal Muscle Biology in Health and Disease*. University of Florida. Abstract Book. March 8-10, Gainesville, FL - 2017. - P.142.
14. Шенкман Б.С., Тыганов С.А., Петрова И.О., Мирзоев Т.М. Снижение анаболического ответа постуральной мышцы на механический сигнал *ex vivo* на фоне гравитационной разгрузки. Рецепторы и внутриклеточная сигнализация. Сборник статей. Том 1. // Под редакцией В.П. Зинченко, А.В. Бережнова – Пущино: 2017. С. 318-322.
15. Tyganov S., Mirzoev T., Shenkman B. Impact of stretch-activated ion channels inhibition on the transduction of mechanical signal to mTORC1 in rat soleus muscle under hindlimb unloading // 46th European Muscle Conference. Abstract Book. September 19-22, 2017, Potsdam, Germany - 2017. - P.85.
16. Мирзоев Т.М., Тыганов С.А., Шенкман Б.С. Роль стретч-активируемых каналов в анаболическом ответе изолированной камбаловидной мышцы крысы на серию эксцентрических сокращений после функциональной разгрузки // *Цитология*. 2017. Т.59. № 11. С. 776-777.
17. Мирзоев Т.М., Тыганов С.А. Анаболический ответ *m.soleus* крысы на механический сигнал *ex vivo* после функциональной разгрузки. Роль стретч-активируемых каналов // *Симбиоз – Россия – 2017. X Всероссийский конгресс молодых учёных-биологов. Сборник тезисов (Казань, 25-28 октября 2017 г.)* / под общ. Ред. Т.В. Балтиной, Г.Г. Яфаровой. – Казань: Изд-во Казан. ун-та, 2017.- С. 236-238.
18. Тыганов С.А., Мирзоев Т.М., Рожков С.В. Воздействие опорной стимуляции на анаболический ответ после эксцентрической нагрузки *ex vivo* в камбаловидной мышце крысы на фоне функциональной разгрузки // XVII Конференция молодых ученых, специалистов и студентов, посвященная 100-летию со дня рождения академика О.Г. Газенко.
19. Sergey Tyganov, Timur Mirzoev, Sergey Rozhkov, Boris Shenkman. Protein Synthesis Alterations in Isolated Soleus Muscle after Ex Vivo Eccentric Exercise following Gravitational // ISGP & ESA Life Sciences Meeting 2018.
20. S.A.Tyganov, S.P.Belova, E.P.Mochalova, K.A.Sharlo, B.S.Shenkman. Effects of plantar stimulation on anabolic signalling in rat soleus muscle during gravitational unloading // 47th European Muscle Conference; Budapest; 30 August – 3 September 2018.

## Список сокращений

- 4E-BP1 – белок, связывающий фактор инициации трансляции 4E (eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1)
- Akt/PKB – протеинкиназа B
- CSA - площадь поперечного сечения (cross-sectional area)
- DFS – динамическая стимуляция стопы (dynamic foot stimulation)
- ECC – эксцентрические сокращения (eccentric contractions)
- eEF2 – эукариотический элонгационный фактор 2 (eukaryotic elongation factor 2)
- GAPDH – глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase)
- GSK-3 $\beta$  – киназа гликогенсинтазы 3 $\beta$  (glycogen synthase kinase 3 $\beta$ )
- HS – антиортостатическое вывешивание (hindlimb suspension)
- mTOR – белок, активность которого блокируется рапамицином (mammalian target of rapamycin)
- p70S6k – S6 рибосомальная киназа p70 (ribosomal protein S6 kinase p70)
- P90RSK – S6 рибосомальная киназа p90 (ribosomal protein S6 kinase p90)
- Regulator-Rag – гетеромерный комплекс, связывающий mTORC1 с лизосомой
- S6rp –рибосомальный белок S6 (S6 ribosomal protein)