# ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ – ИНСТИТУТ МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКИХ ПРОБЛЕМ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

На правах рукописи

Зарипова Ксения Асхатовна

# АТФ-ЗАВИСИМАЯ РЕГУЛЯЦИЯ СИГНАЛЬНЫХ ПУТЕЙ В СКЕЛЕТНЫХ МЫШЦАХ ПРИ МОДЕЛИРУЕМОЙ ГРАВИТАЦИОННОЙ РАЗГРУЗКЕ

3.3.7. Авиационная, космическая и морская медицина

# ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Научный руководитель:

кандидат биологических наук, Белова Светлана Павловна

# ОГЛАВЛЕНИЕ

ОГЛАВЛЕНИЕ
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ5
ВВЕДЕНИЕ1
Актуальность проблемы1
Цель и задачи исследования
Положения, выносимые на защиту 4
Научная новизна
Научно-практическая значимость5
Публикации 6
Апробация работы 6
Связь работы с научными программами7
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ
1.1 Катаболическая сигнализация в скелетной мышце9
1.2 Анаболическая сигнализация в скелетной мышце12
1.3 АТФ-зависимая сигнализация в скелетных мышцах 15
1.4 Паннексиновые каналы в скелетной мышце18
1.5 Рецепторы Р2Ү1 и Р2Ү2 в скелетной мышце21
1.6 Рецепторы инозитол-3 фосфата и фосфатидилинозитол-3-киназа в скелетных
мышцах
2. ОРГАНИЗАЦИЯ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ 32
2.1 Введение ингибитора паннексиновых каналов на фоне трехсуточного вывешивания
2.2 Введение ингибиторов рецепторов Р2Ү2 и Р2Ү1 на фоне трехсуточного
вывешивания

2.3 Введение ингибитора PI3K на фоне трехсуточного вывешивания 34					
2.4 Выделение белка. Электрофорез с последующим вестерн-блоттингом					
2.4.1 Электрофорез в полиакриламидном геле					
2.4.2 Вестерн-блоттинг					
2.5 Содержание АТФ в мышце					
2.6 Исследование экспрессии генов					
2.6.1 Выделение РНК					
2.6.2 Обратная транскрипция					
2.6.3 Проведения ПЦР в реальном времени					
2.7 Статистический анализ данных 42					
3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ 43					
3.1 Содержание АТФ в камбаловидной мышце на коротких сроках функциональной разгрузки					
3.2 Роль PANX1 каналов в регуляции сигналинга в камбаловидной мышце при					
гравитационной разгрузке					
3.2.1 Влияние пробенецида на вес разгруженной мышцы, содержание АТФ и экспрессию PANX1					
3.2.2 Влияние пробенецида на содержание катаболических сигнальных					
маркёров и их регуляцию 46					
3.2.3 Влияние пробенецида на содержание анаболических сигнальных					
маркеров и сигнальные каскады, регулирующие мышечный гомеостаз					
3.3 Роль Р2 Y рецепторов в регуляции сигналинга в камбаловидной мышце при					
травитационной разгрузко					

3.3.1 Влияние введения ингибиторов Р2Ү рецепторов на вес разгруженной *m.soleus*, экспрессию мРНК Р2Ү рецепторов и энергетический гомеостаз....... 55

3.4.1 Влияние введения LY294002 на вес разгруженной m.soleus и					
энергетический гомеостаз 69					
3.4.2 Влияние введения LY294002 на содержание IP3R и кальций-					
зависимый сигналинг71					
3.4.3 Влияние введения LY294002 на содержание катаболических					
сигнальных маркёров и их регуляцию73					
3.4.4 Влияние LY294002 на содержание анаболических сигнальных					
маркеров75					
ЗАКЛЮЧЕНИЕ					
ВЫВОДЫ					
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ					

# СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АДФ – аденозиндифосфат

АТФ – аденозинтрифосфат

ГТФ – гуанозинтрифосфат

кДНК – комплементарная дезоксирибонуклеиновая кислота

КК – креатинкиназа

мРНК – матричная рибонуклеиновая кислота

ПААГ – полиакриламидный гель

ПЦР – полимеразная цепная реакция

рРНК – рибосомальная рибонуклеиновая кислота

УДФ – уридиндифосфат

УТФ – уридинтрифосфат

 $\label{eq:main_state}$  ЦТФ – цитидинтрифосфат

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

AKT – alpha serine/threonine-protein kinase, protein kinase B, серин/треонин-протеин киназа альфа, протеинкиназа B

АМРК – AMP activated protein kinase, АМФ-активируемая протеинкиназа

AR-C118925XX – 5-[[5-(2,8-Dimethyl-5H-dibenzo[a,d]cyclohepten-5-yl)-3,4-dihydro-2-

oxo-4-thioxo-1(2H)-pyrimidinyl]methyl]-N-2H-tetrazol-5-yl-2-furancarboxamide

CaMK II – Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II, Ca2+/кальмодулин-зависимая киназа II

CaN – calcineurin, кальцинейрин

Cr – креатин

DHPR – дигидропиридиновые рецепторами

DMSO – диметилсульфоксид

DTT – дитиотреитол

EDTА – этилендиаминтетрауксусная кислота

eEF2 – фактор элонгации трансляции 2

eEF2К – киназа элонгационного фактора 2

eIF2B – эукариотический фактор инициации 2В

eIF3 – эукариотический фактор инициации трансляции 3

eIF4E – eukaryotic translation initiation factor 4E, эукариотический фактор инициации трансляции 4E

ERK - extracellular signal-regulated kinase

FOXO3 – forkhead box O3

GAPDH – глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа

GPCR – G-protein-coupled receptors, рецепторы, сопряжённые с G-белком

GSK3 $\beta$  – glycogen sintase kinase 3 $\beta$ , киназа гликогенсинтаза 3 $\beta$ 

IGF1 – insulin-like growth factor 1, Инсулиноподобный фактор роста 1

IL-6 – interleukin-6, интерлейкин 6

IP3 – инозитолтрифосфат

IP3R – рецепторы инозитолтрифосфата

IRS1 – insulin receptor substrate 1, субстрат инсулинового рецептора 1

JNK - c-Jun N-terminal kinases

LY294002 - 2-morpholino-8-phenyl-4H-chromen-4-one

m.soleus – musculus soleus

MAFbx – E3-убиквитинлигаза MAFbx (Muscle Atrophy F-box), Atrogin-1

MRS2179 - 2'-Deoxy-N6-methyladenosine 3',5'-bisphosphate tetrasodium salt

mTOR – mammalian target of rapamycin, мишень рапамицина млекопитающих / механистическая мишень рапамицина

MuRF1 – E3-убиквитинлигаза Muscle RING (really interesting new gene) Finger-1

NO – оксид азота

р38МАРК – митоген-активируемая протеин киназа р38

p70S6K – ribosomal protein S6 kinase beta-1, рибосомальная протеинкиназа S6 бета-1

p90RSK – ribosomal s6 kinase p90, рибосомальная протеин киназа p90

Panx1 – паннексиновые каналы

PBS – phosphate-buffered saline, фосфатно-солевой буфер

PCr – фосфокреатин

PDK1 – фосфоинозитид-зависимая протеинкиназы

- PGC-1a peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha
- РІЗК фосфоинозитид-З-киназа
- РІР2 фосфатидилинозитол-(4,5)-бисфосфат
- РІРЗ фосфатидилинозитол-(3,4,5)-трифосфат
- РКС протеинкиназа С
- $PLC- \phi oc \phi oлипаза \ C$
- PMSF phenylmethane sulfonyl fluoride или phenylmethylsulfonyl fluoride
- RIPA radioimmunoprecipitation assay buffer
- RyR1 рианодиновый рецептор типа 1
- TEMED N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин
- ТFEВ транскрипционный фактор ЕВ
- TSC2 tuberous Sclerosis Complex 2, комплекс туберозного склероза 2

#### введение

### Актуальность проблемы

Скелетная мышца обладает пластичностью и способна отвечать атрофией на функциональной состояние разгрузки, вызванное микрогравитацией, иммобилизацией, повреждением нерва, а также длительным постельным режимом, связанным с различными патологическими состояниями. Атрофия скелетных мышц сопровождается снижением диаметра мышечных волокон, изменениями В содержании белка, снижением силы и увеличением утомляемости (Baldwin, Haddad, 2002; Fitts et al., 2000; Fluck, Hoppeler, 2003). По современным представлениям, мышечная атрофия – результат увеличения деградации белка и снижения его синтеза (Glass, 2003; Bodine, Baehr, 2014; Мирзоев, Шенкман, 2018; Shenkman, 2020). При гипокинезии скелетные мышцы подвергаются атрофии в результате снижения или полного прекращения сократительной активности (Шенкман и соавт., 2020). Недавно в нашей лаборатории было показано, что даже непродолжительное нахождение крыс в клетках ограниченного размера вызывает атрофию «быстрых» скелетных мышц и набор веса тела животного (Белова и соавт., 2021). Исследование причины атрофии мышц и разработка способов её профилактики актуальны, особенно когда большие популяции людей столкнулись с условиями ограничения подвижности, что оказало негативное влияние на состояние здоровья.

Для разработки способов предотвращения развития атрофического процесса необходимо выявить фундаментальные механизмы его инициирования. В недавних работах показано, что изменения внутриклеточных сигнальных путей происходят в первые дни и даже часы функциональной разгрузки мышц (Мирзоев, Шенкман, 2018; Shenkman, 2020). Известно, что экспрессия основных мышечных E3-убиквитинлигаз, участвующих в процессе деградации белка, значимо повышается через 24 часа разгрузки мышц и достигает пика к 3-м суткам (Kachaeva, Shenkman, 2012; Tyganov *et al.*, 2019; Shenkman, 2020). Поэтому имеет смысл исследовать ранние этапы развития этого процесса для разработки эффективных средств его профилактики, так

как физиологические механизмы, активизирующие эти процессы не полностью понятны.

При длительной функциональной разгрузке мышц происходит накопление макроэргических фосфатов (Gupta *et al.*, 1989; Wakatsuki *et al.*, 1994) и ионов Ca<sup>2+</sup> в мышечных волокнах (Ohira *et al.*, 1994; Shenkman, Nemirovskaya, 2008; Ingalls *et al.*, 1999). Однако недавно было обнаружено, что фосфорилирование сенсора аденозинтрифосфата (ATФ) AMФ-активируемой протеинкиназы (AMP activated protein kinase, AMPK) снижается на 1-3 сутки функциональной разгрузки (Vilchinskaya *et al.*, 2018). Кроме того, было показано, что разгрузка мышц вызывает снижение мембранного потенциала покоя в *musculus soleus*, и это сопровождается накоплением ионов кальция в саркоплазме уже после 3 дней разгрузки (Kravtsova *et al.*, 2015). Мы предположили, что эти процессы могут быть стимулами, запускающими процесс атрофии мышц.

В экспериментах на культуре мышечных клеток было обнаружено, что в мышечных волокнах внеклеточный АТФ активирует мембранный сигнальный каскад, который в конечном итоге, высвобождая  $Ca^{2+}$ , регулирует экспрессию генов (Casas *et al.*, 2014). Было показано, что АТФ, который оказывается в межклеточном пространстве, вызывает отставленное медленное высвобождение кальция через путь P2Y2-PLC-IP3 (Рисунок 1) (Liu *et al.*, 2018; Casas *et al.*, 2014).

Возникает вопрос каким образом подобный механизм может работать в скелетных мышцах при атрофии? При функциональной разгрузке АТФ через паннексиновые каналы (Panx1) может выходить во внеклеточное пространство. Эти нуклеотиды затем могут взаимодействовать с каналами Р2Ү, которые в свою очередь активируют фосфоинозитид-3-киназу гамма (PI3K) в Т-каналах мембраны и, в конечном итоге, рецепторы инозитолтрифосфата (IP3R), находящиеся в ядре и саркоплазматическом ретикулуме. Активация IP3R может вызывать слабый сигнал высвобождения кальция как цитозольный, так и нуклеоплазматический, который способствует c (возможно. другими сигнальными каскадами) активации транскрипционных факторов, что приводит к изменению экспрессии ключевых генов скелетной мышцы (Рисунок 1).



Рисунок 1 – Молекулярные механизмы АТФ-зависимой передачи сигналов в скелетных мышцах.

Итак, мы предположили, что АТФ может быть запускающим сигналом кальций-зависимых путей на ранних этапах функциональной разгрузки. Мы впервые рассмотрели данные процессы в экспериментах *in vivo* на модели функциональной разгрузки *m.soleus* крыс в следующих экспериментах:

- 1. Эксперимент с ингибированием паннексиновых каналов при трёхдневной функциональной разгрузке *m.soleus* крыс.
- 2. Эксперимент с ингибированием пуринергических P2Y1 и P2Y2 рецепторов при трёхдневной функциональной разгрузке *m.soleus* крыс.
- 3. Эксперимент с ингибированием PI3K при трёхдневной функциональной разгрузке *m.soleus* крыс.

### Цель и задачи исследования

Цель нашей работы – исследовать АТФ-зависимые пути регуляции сигнальных путей скелетных мышц при их функциональной разгрузке.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

- Измерить содержание АТФ в *m.soleus* крыс на коротких сроках (сутки, трое суток) функциональной разгрузки.
- 2. Оценить роль паннексиновых каналов в регуляции катаболических и анаболических сигнальных путей при 3-суточной функциональной разгрузке *m.soleus* крысы с помощью селективного ингибирования паннексиновых каналов пробенецидом.
- Проанализировать участие рецепторов P2Y1 и P2Y2 в регуляции атрофических процессов при 3-суточной функциональной разгрузке *m.soleus* крысы с помощью селективных антагонистов этих рецепторов – MRS2179 и AR-C 118925XX.
- 4. Исследовать роль PI3K в регуляции атрофических процессов при 3-суточной функциональной разгрузке *m.soleus* крысы с помощью селективного ингибитора LY294002.

### Положения, выносимые на защиту

- 1. На ранних этапах функциональной разгрузки происходит накопление АТФ в мышцах.
- Часть молекул АТФ в условиях функциональной разгрузки транспортируются через паннексиновые каналы в интерстициальное пространство, и, взаимодействуя с пуринорецепторами, принимают участие в регуляцииэкспрессии ЕЗ-лигаз и анаболических сигнальных путей.
- 3. PI3K при функциональной разгрузке мышц регулирует активность сигнальных путей, зависимых от кальция и регулирующих белковый гомеостаз.

#### Научная новизна

Впервые показано, что на ранних этапах функциональной разгрузки происходит накопление АТФ в мышцах. Паннексиновые каналы участвуют в транспорте АТФ при функциональной разгрузке мышц. Panx1-опосредованный транспорт АТФ влияет на экспрессию специфичных для мышц E3-убиквитинлигаз MuRF1 и MAFbx и регулирует сигнальные пути, контролирующие процессы трансляции и элонгации белка.

Впервые показано, что P2Y1/2 рецепторы участвуют в регуляции атрофического процесса и клеточного сигналинга при функциональной разгрузке мышц. Ингибирование как P2Y1, так и P2Y2 предотвращает накопление ATФ и регулирует интенсивность синтеза белка. Предотвращение атрофии *m.soleus* при вывешивании крыс с ингибированием рецепторов P2Y2 в большей степени связано с ингибированием катаболических процессов и влиянием на энергетический гомеостаз, чем с изменением анаболического сигналинга. Ингибирование рецепторов P2Y1 препятствует активации p38MAPK и замедляет экспрессию мPHK E3-лигазы MuRF1.

Впервые показано, что РІЗК $\gamma$  участвует в регуляции сигналинга при функциональной разгрузке *m.soleus*. Ингибирование РІЗК при функциональной разгрузке предотвращает накопление АТФ и замедляет атрофию *m.soleus* путем снижения скорости элонгационных процессов и замедления экспрессии ЕЗубиквитинлигаз и убиквитина, а также регулирует активность кальций-зависимых сигнальных путей при функциональной разгрузке мышц.

Впервые показано, что выход АТФ во внеклеточное пространство может являться запускающим сигналом для изменения экспрессии генов при функциональной разгрузке мышц. В передаче сигнала участвуют последовательно находящиеся в плазмолемме каналы Panx1, рецепторы P2Y1/2 и PI3K.

### Научно-практическая значимость

Исследование АТФ-зависимой сигнализации в скелетных мышцах при их функциональной разгрузке – фундаментальное направление мышечной В физиологии, которое может найти приложение в нейрологии, экстремальной и реабилитационной медицине, геронтологии. Новые данные о работе ключевых сигнальных путей в скелетной мышце, подвергшейся атрофии, могут изменить традиционную парадигму о фармацевтических мишенях для её лечения при вызванной постельным режимом, разгрузке, космическим полётом ИЛИ иммобилизацией. Результаты исследования можно будет использовать ЛЛЯ разработки новых препаратов, ингибирующих работу паннексиновых каналов, Р2У и IP3 рецепторов при функциональной разгрузке мышц, для снижения степени атрофии или её предотвращения. Кроме того, полученные данные могут существенно расширить представление о фундаментальных механизмах развития атрофических процессов в мышце и позволят разработать подходы фармакологической коррекции негативных последствий гипокинезии и гравитационной разгрузки. Исследование работы Panx1-P2Y-IP3 пути позволит найти терапевтическую мишень для профилактики и лечения мышечной атрофии. По результатам работы зарегистрировано два патента: 1. "Способ предотвращения атрофии скелетных мышц при их функциональной разгрузке" №2797216; 2. "Способ предотвращения развития утомления скелетной мышцы" (рег. № 2023114128).

### Публикации

По диссертации работы опубликовано 4 статей В теме журналах, ВАК, 18 тезисов докладов конференций, рекомендованных том В числе международных.

### Апробация работы

Результаты исследований и основные положения работы были представлены и обсуждены на: Aerospace and Environmental Medicine XXII International Symposium Human in Space 2021; Международной конференции "Рецепторы и внутриклеточная сигнализация" 2021; Всероссийской с международным участием школе-конференции по физиологии мышц и мышечной деятельности, посвященной памяти И.Б. Козловской и приуроченной к году науки и технологий, Москва, 2021; V Российском симпозиуме с международным участием "Клеточная сигнализация: итоги и перспективы", Казань, 2021; Virtual European Muscle Conference, Warsaw, 2021; XIX Конференции молодых ученых, специалистов и студентов, посвященной 60-летию первого полета человека в космос, г. Москва, 2021; 49<sup>th</sup> European Muscle Conference (Prague, Czech Republic) 2022; IX Российской с международным участием конференции по управлению движением, посвященной 95-летию со дня рождения И.Б. Козловской, Москва, 2022; III Объединенном научном форуме физиологов, биохимиков и молекулярных биологов, Сочи, 2021; XX Конференции молодых учёных, специалистов и студентов с международным участием, посвященной 165-летию со дня рождения К.Э. Циолковского; Всероссийской конференции с международным участием "Интегративная физиология", Санкт-Петербург, 2022; VII Съезде биофизиков России, г. Краснодар, 2023; 12-ой международной конференции "Рецепторы и внутриклеточная сигнализация", Пущино, 2023; 42<sup>nd</sup> Annual ISGP

Meeting, Antwerp, Belgium 2023; XXIV съезде Физиологического общества им. И.П.

# Павлова, Санкт-Петербург, 2023.

# Связь работы с научными программами

Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ №20–015–00138 и РНФ №21– 15–00228.

## 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Скелетные мышцы способны адаптироваться к условиям функциональной разгрузки (иммобилизация, микрогравитация, постельный режим или повреждение нерва), характеризующиеся уменьшением диаметра волокон, потерей мышечной массы и силы, что также сопровождается увеличением утомляемости И резистентности к инсулину (Оганов и соавт., 1988). Наиболее наглядно этот процесс можно наблюдать на постуральных мышцах, таких как *m.soleus*, в которых происходит: 1) прогрессирующее снижение мышечной массы (мышечная атрофия), связанное с повышенной деградацией и/или снижением синтеза белка; и 2) частичный переход от медленных к быстрым изоформам белка тяжелой цепи миозина из-за изменений экспрессии генов сократительных белков (Baldwin, Haddad, 2002). Напротив, мышцы быстрого типа, такие как длинный разгибатель пальцев (т. extensor digitorum longus), обычно не страдают от разгрузки (Pette, Staron, 1997). Для изучения этих процессов широко используется модель вывешивания задних конечностей Ильина-Новикова (Novikov, Ilyin, 1981), согласно которой животное подвешивается за хвост таким образом, что передние конечности опираются на пол, а задние его не касаются. Такой способ используется также для моделирования космического полёта и эффектов микрогравитации, т.к. он отражает некоторые аспекты этого воздействия и вызывает схожие признаки мышечной атрофии, которые наблюдаются как у животных, так и у человека (Morey-Holton, Globus, 2002). Помимо вывешивания существует ещё несколько способов моделирования бездействия скелетной мышцы, такие как иммобилизация конечности и денервация. Для моделирования эффектов микрогравитации на скелетные мышцы и организм человека в целом используются также модели антиортостатической гипокинезии и сухой иммерсии (Шенкман и соавт., 2020).

В развитии мышечной атрофии в условиях разгрузки участвуют различные сигнальные системы, направленные на активацию протеолиза (в большей степени за счет регуляции специфических для мышц ЕЗ-убиквитинлигаз) и изменения белкового синтеза (в первую очередь за счет ингибирования биогенеза рибосом и активации эндогенных ингибиторов трансляции матричной рибонуклеиновой кислоты (мРНК)) (Мирзоев, Шенкман, 2018).

## 1.1 Катаболические сигнальные пути в скелетной мышце

Различные исследования на животных (Thomason, Booth, 1990) и людях (Caiozzo, 2002) показали, что мышечная разгрузка приводит к изменениям на молекулярном уровне, которые проявляются в потере массы мышц и ухудшении их функции. При разгрузке цитоскелетные и сократительные белки скелетных мышц подвергаются деструкции. Деградация белка в основном опосредована четырьмя путями: (1) кальпаины (Dargelos *et al.*, 2008), (2) каспазы (Du *et al.*, 2004), (3) катепсины (Bechet *et al.*, 2005) и (4) убиквитин-протеасомная система (Kandarian, 2008). Многие исследования предполагают, что последний играет более важную роль в деградации белка при мышечной атрофии (Ventadour, Attaix, 2006).

Было показано, что компоненты убиквитин-протеасомной системы активно синтезируются при разгрузке (Bodine et al., 2001a; Taillandier et al., 1996; Ikemoto et al., 2001; Jagoe, Goldberg, 2001) и при мышечной атрофии другой природы (Chang et al., 2011; Lecker et al., 2004). Усиление протеолитической активности обусловлено увеличением количества мРНК, кодирующих основные члены убиквитинсистемы (полиубиквитин, убиквитин-связывающие протеасомной ферменты, убиквитин-лигазы, субъединицы 20S протеасомы), и последующим синтезом соответствующих белков (Gomes et al., 2001, Сорокин и соавт., 2009). Основными генами, регулируемыми во время атрофии, являются Fbxo32 и Trim63, которые соответствуют убиквитинлигазам MAFbx и MuRF-1 (Bodine et al., 2001a). Экспрессия этих генов достигает пика примерно через 3 дня после разгрузки, в то же время, когда скорость потери веса в мышцах повышается (Sacheck et al., 2007). Сверхэкспрессия MuRF-1 в миотубах вызывает атрофию, тогда как у мышей с недостатком любой из этих лигаз уровень атрофии после разгрузки заметно ниже (Bodine et al., 2001a; Gomes et al., 2001; Rommel et al., 2001). Вывешивание животных и антиортостатическая гипокинезия у людей приводят к увеличению мРНК субъединиц убиквитинсвязывающего фермента 14 кДа и 20S протеасомы (Taillandier et al., 1996) и увеличению количества убиквитинированных белков (Ikemoto et al., 2001), что

доказывает значительный вклад убиквитин-протеасомной системы в атрофию мышц при разгрузке.

Процесс убиквитинирования требует активации трех ферментов: убиквитинфермента (Е1), убиквитин-связывающего фермента активирующего (E2) И убиквитин-лигаз (ЕЗ). Сначала убиквитин связывается с Е1 (АТФ-зависимый процесс), а затем транслоцируется на Е2. Лигазы Е3 ковалентно связывают белковый субстрат и затем взаимодействуют с Е2, который переносит активированный убиквитин. Убиквитин, в свою очередь, транслоцируется с Е2 на белок-мишень. Процесс повторяется до тех пор, пока белок-мишень не свяжет цепочку из 4-5 молекул убиквитина. Затем убиквитинированный белок распадается на пептиды внутри протеасомы. Важную роль в распознавании белков, подлежащих деградации, играют ЕЗ-лигазы. Фермент Е2 и лигаза ЕЗ являются тканеспецифичными, индивидуальный Е2 взаимодействует с определенной лигазой Е3. Два основных маркера активности убиквитин-протеасомной системы – E3-лигазы – MAFbx/atrogin-1 и MuRF1 (Medina et al., 1991). МАFbx участвует в формировании функционального лигазного комплекса, a MuRF-1 связывает консервативный домен молекулы титина (Litvinova et al., 2004; Allen et al., 2009). MuRF-1 убиквитинирует и деградирует тропонин I (Lagirand-Cantaloube et al., 2008) и тяжелые цепи миозина (Kedar et al., 2004). Предполагается, что MAFbx убиквитинирует и деградирует MyoD (Jones et al., 2004) и эукариотический фактор инициации трансляции 3 (eIF3) (Tintignac et al., 2005), играя тем самым роль в торможении синтеза мышечного белка, а не в активации протеолиза в истощенной мышце.

Ингибирующее фосфорилирование субстрата инсулинового рецептора 1 (insulin receptor substrate 1, IRS1) по сайтам S636-639 приводит к нарушению передачи сигнала на АКТ (серин/треонин-киназа, протеинкиназа В), что, в свою очередь, может приводить к дефосфорилированию FOXO3 (forkhead box O3), транслокации в ядро и активации транскрипции гена MuRF1. Блокирование сигнала от рецепторов инсулина и/или инсулиноподобного фактора роста 1 (insulin-like growth factor 1, IGF1) к АКТ при гравитационной разгрузке происходит путем убиквитинирования и последующей деградации IRS1. Деградация IRS1 была обнаружена в скелетных мышцах крыс как после хронического подвешивания задней конечности (14, 28, 38, 56 дней) (Hilder *et al.*, 2005; Han *et al.*, 2007; Mirzoev, Shenkman, 2008; Hilder *et al.*, 2003), так и после кратковременной разгрузки (5 дней), а также после 16-дневного космического полета (Nakao *et al.*, 2009). Было выдвинуто предположение, что деградация IRS1 при разгрузке опосредована убиквитинилированием, которое связано с E3-убиквитин-лигазой CBL-B (Nakao *et al.*, 2009).

Кроме того, в атрофии скелетных мышц при разгрузке важную роль играют  $Ca^{2+}$ -зависимые протеазы – кальпаины (Taillandier *et al.*, 1996), которые являются системой первичной деградации белков, поскольку не расщепляют белки до аминокислот или малых пептидов. По чувствительности к  $Ca^{2+}$  кальпаины делятся на две группы:  $\mu$ - и m-кальпаины (кальпаин 1 и кальпаин 2); они активируются соответственно микромолярными и миллимолярными концентрациями кальция. В скелетных мышцах присутствует также кальпаин 3 (р94), имеющий общую структуру с кальпаинами 1 и 2 (Goll *et al.*, 2003). На ранних стадиях функциональной разгрузки кальпаины активируются и перераспределяются из цитоплазматической фракции в мембранную в медленных и быстрых мышцах (Enns, Belcastro, 2006).

Вклад кальпаинов в атрофию разгруженных мышц составляет около 10%. Их ключевая роль была продемонстрирована в экспериментах по вывешиванию мышей, сверхэкспрессирующих кальпастатин (регулятор экспрессии кальпаинов), у которых не наблюдалось уменьшения размеров мышечных волокон (Tidball, Spencer, 2002). Кальпаины не способны расщеплять белки, но делают их доступными для убиквитинирования (Kramerova *et al.*, 2005), а активирование кальпаинов в миотубах увеличивает активность ферментов протеасом (Menconi *et al.*, 2004). Таким образом, кальпаины в скелетных мышцах помимо прямой протеолитической активности обладают также сигнальными свойствами, которые реализуются отчасти через E3-убиквитин лигазы (Centner *et al.*, 2001). Роль ионов кальция и кальций-зависимых процессов как регуляторов экспрессии генов в начальный период разгрузки еще предстоит выяснить в дальнейших исследованиях.

К другим важным протеинкиназам, активируемым ионами кальция или комплексами кальций/кальмодулин, относятся различные изоформы протеинкиназы

С, кальций-кальмодулин-киназы II и IV, а также семейство митоген-активируемых протеинкиназ. Существует три основных сигнальных пути МАР-киназ, регулируемых через фосфорилирование: киназа, связанная с внеклеточным сигналом (ERK), c-Jun NH2-концевая киназа (JNK) и p38 MAPK. p38 MAPK играет важную роль в регуляции транскрипции и подвижности клеток (Jones et al., 2005; Lluis et al., 2006). Роль р38 МАРК при разгрузке изучалась лишь в единичных работах. Сообщалось, что повышенная при разгрузке активация р38 МАРК коррелирует с атрофией скелетных мышц (Hilder et al., 2005; Dupont et al., 2011). Активация МАРК пролиферацию регулирует И дифференцировку через фосфорилирование цитоплазматических и ядерных белков, а также модуляцию экспрессии генов (Dupont et al., 2011). Dupont и соавт. предположили, что повышенное фосфорилирование p38 МАРК после 14-дневной разгрузки может быть вовлечено в регуляцию экспрессии тяжелой цепи миозина и индуцированные разгрузкой изменения состава миозина (Dupont et al., 2011).

Было обнаружено увеличение фосфорилирования митоген-активируемой протеин p38MAPK в *m.soleus* крысы после 3-х дней вывешивания. Это фосфорилирование сопровождалось активацией экспрессии MuRF-1. Интересно, что вызванное разгрузкой увеличение экспрессии MuRF-1 и потеря мышечной массы эффективно предотвращались применением селективного ингибитора p38 (Belova *et al.*, 2020). Очевидно, что активация p38MAPK в начальный период разгрузки может быть связана с действием различных метаболических пусковых сигналов, однако нельзя исключить и роль кальций-зависимых механизмов.

# 1.2 Анаболические сигнальные пути в скелетной мышце

Атрофия при разгрузке – это результат смещения баланса между синтезом и протеолизом белка в сторону увеличения протеолиза и снижения интенсивности синтеза. Основной сигнальной системой, регулирующей синтез белка в мышцах, является путь Akt/mTOR, который активируется при связывании IGF-1 со своим рецептором на мембране. Этот сигнальный каскад отвечает за стимуляцию синтеза белка в скелетных мышечных волокнах, реализуя свой эффект, в частности, через стимуляцию пролиферации и слияния клеток-сателлитов (Sandri, 2008). mTOR

12

(mammalian target of rapamycin) входит в состав двух мультибелковых комплексов, один из которых – mTORC1 (чувствительный к рапамицину). mTORC1 активирует рибосомальную протеинкиназу S6 бета-1 (ribosomal protein S6 kinase beta-1, p70S6K) и 4E-BP1 (eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1), через которые реализуется сигнал АКТ-FOXO. Влияние mTOR на процесс трансляции и синтез белка осуществляется через TORC1-зависимое фосфорилирование рибосомальных S6-киназ (S6K1 и S6K2) и 4E-BP1 – репрессора кэп-связывающего белка эукариотического фактора инициации трансляции 4E (eukaryotic translation initiation factor 4E, eIF4E). mTOR также может быть активирован с помощью питательных веществ, включая аминокислоты с разветвленной цепью. Интересно, что ингибиторы mTORC1, такие как рапамицин, используются в качестве иммуносупрессоров при трансплантации органов (Thomson *et al.*, 2008).

Таким образом, усиление синтеза белка через механизм AKT/mTOR осуществляется посредством активации p70S6K, eIF4E и ингибирования perулятора трансляции 4E-BP1. В то же время путь IGF-1/PI3K/AKT предотвращает развитие атрофии путем ингибирования (дефосфорилирования AKT) факторов регуляции транскрипции FOXO1/3, стимулируя их переход из ядра в цитоплазму (Sandri *et al.*, 2004).

Главным регулятором процесса элонгации белка является фактор элонгации трансляции 2 (eEF2), который катализирует процесс перемещения рибосомы вдоль мРНК (Proud, 1994). Киназа элонгационного фактора 2 (eEF2K) фосфорилирует eEF2 по Thr56, что предотвращает связывание с рибосомой (Ryazanov, Davydova, 1989; Ryazanov, Spirin, 1990). Активность АМРК может стимулировать работу eEF2K (Diggle *et al.*, 2001). eEF2K в свою очередь может негативно фосфорилироваться рибосомальными киназами p70S6K и p90RSK (Mahoney *et al.*, 2009).

В исследовании Беловой и соавторов (2019), проведенном в нашей лаборатории, был выявлен иной механизм эффекта повышенного фосфорилирования р70S6K. Через 24ч вывешивания гиперфосфорилирование р70S6K(Thr389) сопровождалось резким увеличением экспрессии мРНК и количества белка E3-убиквитин-лигазы MuRF1 (Belova *et al.*, 2019).

Другим важным биохимическим каскадом, участвующим как в mTORC1зависимой, так и в mTORC1-независимой регуляции синтеза белка, является сигнальный путь Ras/ERK/p90RSK. Из литературы известно, что киназы ERK (extracellular signal-regulated kinase) и p90RSK могут фосфорилировать и ингибировать белок TSC2 (Tuberous Sclerosis Complex 2, комплекс туберозного склероза 2), являющийся ингибитором mTORC1 (Roux *et al.*, 2007; Ballif *et al.*, 2005). ERK и p90RSK могут также непосредственно активировать mTORC1, фосфорилируя белок Raptor (Carriere *et al.*, 2011).

Одним из главных негативных регуляторов синтеза белка в скелетной мышце является киназа гликогенсинтазы 3β (GSK3β), которая выполняет, прежде всего, ингибирующие/блокирующие сигнальные функции. Фосфорилирование эукариотического фактора инициации 2В (eIF2B) при помощи GSK3β может приводить к снижению инициации трансляции мРНК (Pap, Cooper, 2002), тем самым уменьшая эффективность трансляции. GSK3β также может фосфорилировать βкатенин, предотвращая его ядерную транслокацию и тем самым препятствуя экспрессии генов, необходимых для роста мышц (Armstrong, Esser, 2005). GSK3β также способна снижать интенсивность синтеза рибосомальной РНК (рРНК) за счет убиквитинирования протоонкогена с-Мус – ключевого регулятора экспрессии рибосомных генов (Gregory et al., 2003). В нашей лаборатории впервые было обнаружено значительное снижение скорости синтеза белка и содержания 18S и 28S рРНК В подошвенной мышце крысы на ранних сроках вывешивания, сопровождающееся уменьшением содержания фосфорилирования GSK3β Ser9, что указывает на увеличение ферментативной активности GSK3β (Tyganov et al., 2019). GSK3β также может оказывать негативное влияние на динамику митохондрий. GSK3β может фосфорилировать транскрипционный фактор EB (TFEB), что предотвращает его ядерную транслокацию, что в итоге приводит к ингибированию транскрипции гена, кодирующего PGC1 – важного кофактора, контролирующего биогенез митохондрий (Theeuwes et al., 2020).

### 1.3 АТФ-зависимая сигнализация в скелетных мышцах

Несмотря на то, что теория, согласно которой АТФ является хранилищем внутриклеточной энергии, была быстро принята сразу после ее подтверждения, функция АТФ как передатчика сигналов получила признание в научном сообществе только спустя десятилетия. Сигнальная функция АТФ была впервые постулирована в 1929 г. (Drury, Szent-Györgyi, 1929), а начиная с 1970-ых годов труды Бернстока и соавт. (Burnstock *et al.*, 1971) привели к формированию отдельной области исследований пуринергической передачи сигналов.

Внеклеточный АТФ является основным аутокринно-паракринным медиатором клеточной передачи сигналов, опосредованных гормонами, факторами роста, нейротрансмиттерами, механическими стимулами и воспалением (Abbracchio *et al.*, 2006, Corriden, Insel, 2010). Мы предполагаем, что АТФ может быть центральным интегратором всех стимулов, которые координируют события экспрессии мышечных генов. Естественным следствием прекращения сократительной активности мышечных волокон при разгрузке является изменение баланса пуриновых нуклеотидов (АТФ/АДФ/АМФ) в сторону накопления АТФ (Wakatsuki *et al.*, 1994).

Предполагается несколько механизмов высвобождения  $AT\Phi$ : (1) экзоцитоз; (2) транспортеры ABC; (3) высвобождение через каналы, активируемые растяжением или напряжением и (4) высвобождение через полуканалы коннексина или паннексина (Lazarowski *et al.*, 2003). Во многих, если не в большинстве, типах клеток совместно существуют разные механизмы высвобождения  $AT\Phi$ .  $AT\Phi$  высвобождается из клеток скелетных мышц в ответ на мышечное сокращение. При электрической стимуляции адениловые нуклеотиды высвобождаются как из нервных окончаний иннервируемых скелетных мышц, так и из самих мышечных волокон. Электрическая стимуляция вызывает высвобождение  $AT\Phi$  из первичных миотуб крыс (Osorio-Fuentealba *et al.*, 2013) и волокон скелетных мышц мышей (Riquelme *et al.*, 2013; Jorquera *et al.*, 2013). ATФ высвобождается при электрической стимуляции скелетных мышц через Panx1 каналы (Cea *et al.*, 2012), вызывая как быстрый кальциевый сигнал, связанный с сокращением через рецепторы P2X, так и медленный сигнал, который

регулирует экспрессию генов через рецепторы Р2Ү (Buvinic *et al.*, 2009) и запускает экспрессию интерлейкина 6 (IL-6) (Jaimovich *et al.*, 2011).

Было показано, что разгрузка мышц приводит к изменению тока Ca<sup>2+</sup> из саркоплазматического ретикулума (Stevens, Mounier, 1992). Но впервые о роли накопления кальция при разгрузке мышц стали говорить только в 1995 году (Arutyunyan *et al.*, 1995). Авторы предположили, что мышечная разгрузка приводит к изменению механизма возбуждения-сокращения, что приводит к высвобождению Ca<sup>2+</sup> и изменению кальций-зависимых сигнальных путей (Arutyunyan et al., 1995). Уже позднее было показано, что  $Ca^{2+}$ , в зависимости от концентрации в цитоплазме, регулирует сокращение скелетных мышц, а возбуждение скелетных мышц в свою очередь приводит к быстрому высвобождению Ca<sup>2+</sup> из саркоплазматического ретикулума через канал рианодинового рецептора типа 1 (RyR1). Нуклеотиды активируют рианодиновые рецепторы скелетных мышц, тогда как аденозин ингибирует активацию этих рецепторов АТФ (Laver et al., 2001). Транзиторный (быстрый) поток кальция зависит от активации рецепторов Р2Х и последующей деполяризации, тогда как рецепторы Р2У ответственны за большую часть "медленного" потока кальция (Szigeti et al., 2007). Тетаническая электрическая стимуляция вызывает высвобождение АТФ, а высокочастотная электрическая стимуляция приводит к утомлению с участием внеклеточного Ca<sup>2+</sup>, что в свою очередь активирует сигнальный каскад, который в конечном итоге регулирует экспрессию генов (Buvinic et al., 2009). Этот механизм присутствует в изолированных скелетных мышечных волокнах мышей и зависит от частоты стимула (Collet et al., 2003).

АТФ оказывает различные пре- и постсинаптические эффекты в синапсах быстрых, смешанных и медленных мышц у крыс и мышей. При этом пресинаптическое действие АТФ в синапсах всех трех типов двигательных единиц мышей потенцирующее, а у крыс разнонаправленное. Постсинаптические эффекты АТФ совпадают в синапсах всех грызунов: в «быстрых» мышцах они тормозные, а в «смешанных» и «медленных» — потенцирующие (Khairullin *et al.*, 2023). АТФ, высвобождаемый по аутокринным/паракринным механизмам, также регулирует

пролиферацию миобластов C2C12 (Martinello *et al.*, 2011). Было показано, что внеклеточный АТФ контролирует пролиферацию миобластов мыши посредством индукции активных форм кислорода (Sciancalepore *et al.*, 2012).

Кроме тогоб пуринергическая система выполняет свою роль в удовлетворении потребностей клеток в энергии посредством модуляции механизма, опосредованного AMP-активируемой протеинкиназой. AMPK – это повсеместно распространенная серин/треониновая протеинкиназа, которая регулирует клеточный энергетический гомеостаз, действуя как центральный энергетический сенсор и поддерживая запасы энергии путем точной настройки анаболических и катаболических путей посредством активации путей, генерирующих ATФ (например, транспорт глюкозы и гликолиз), и дезактивации энергозатратных анаболических путей (например, ингибирование синтеза жирных кислот) (Kjøbsted *et al.*, 2018). AMPK активируется посредством фосфорилирования остатка тирозина 172 с увеличением внутриклеточного соотношения AM $\Phi$ /AT $\Phi$  (Kim *et al.*, 2016). Было показано, что накопление AT $\Phi$  в 1е сутки функциональной разгрузки является пусковым сигналом, провоцирующим снижение активности AMPK, накопление ядерного HDAC4, снижение экспрессии мPHK МуНС I $\beta$ , PGC-1 $\alpha$ , TFAM и митофузина-1 (Lvova *et al.*, 2023).

Креатинкиназа (КК) также играет энергетическую роль в пуринергической системе. АТФ, вырабатываемая посредством митохондриального окислительного фосфорилирования, используется для катализа превращения креатина (Cr) в фосфокреатин (PCr). РСг высвобождается в цитозоль и активирует КК для регенерации АТФ, потребляемой во время мышечных затрат (Baird *et al.*, 2012). Повышенные уровни PCr в цитозоле связаны с неактивной АМРК из-за высоких концентраций АТФ (Wright *et al.*, 2019). Таким образом, АМРК и КК действуют как медиаторы энергетического контроля в пуринергической системе (Ponticos, 1998).

Рапх1, DHPR, P2Y2 и Cav3 образуют мультибелковый комплекс в Т-трубочке скелетной мышцы, который участвует в сопряжении возбуждения-транскрипции, а внеклеточный АТФ является ключевым посредником между деполяризацией мембраны и экспрессией генов, которые формируют пластичность скелетных мышц (Buvinic *et al.*, 2009; Casas *et al.*, 2014; Arias-Calderón *et al.*, 2016).

17

Давно обсуждается, что в ненагруженных мышцах изменяется соотношение высокоэнергетических фосфатов (Gupta *et al.*, 1989; Ohira *et al.*, 1994), но роль этого процесса не исследована. На ранних стадиях обычно регистрируется почти полное отсутствие электрической и механической активности *m.soleus* (De-Doncker *et al.*, 2005). Ожидаемо, что в условиях отсутствия сократительной активности и неограниченного функционирования митохондрий содержание АТФ возрастает. В данной работе мы измерили уровень высокоэнергетических фосфатов в мышце на коротких сроках разгрузки (3 дня), а также исследовали ключевые звенья предполагаемого механизма передачи сигнала.

### 1.4 Паннексиновые каналы в скелетной мышце

Семейство паннексинов состоит из трех генов: PANX1, PANX2 и PANX3 (Penuela et al., 2013). Характер экспрессии паннексинов варьируется в зависимости от вида, типа клеток и физиологического состояния. Паннексины экспрессируются во многих типах клеток, но Panx2 обнаруживается преимущественно в нервной системе позвоночных животных, Panx3 локализуется в остеобластах, синовиальных фибробластах и хондроцитах (Bruzzone et al., 2003; Li et al., 2011; Ray et al., 2006). Преобладающей изоформой в скелетных мышцах является Panx1 (Shestopalov, Panchin, 2007). Это интегральный мембранный гликопротеин массой 48 килодальтон, который обеспечивает транспорт АТФ из саркоплазмы во внеклеточное пространство (Dahl, 2015). Предполагается, что коннексины и паннексины представляют сходные белковые структуры, состоящие из четырех α-спиральных трансмембранных доменов, двух внеклеточных петель и одной внутриклеточной петли, причем их амино- и карбоксильные концы обращены в цитоплазму. В то время как коннексины не экспрессируются в скелетных мышцах взрослых крыс (Rackauskas et al., 2010), было продемонстрировано присутствие мРНК Panx1 (Baranova et al. 2004) и его белка (Dvoriantchikova et al., 2006). Описано, что Panx1 играет определенную роль в процессе дифференцировки мышц (Langlois et al., 2014). Хотя Panx1 экспрессируется на протяжении всей пролиферации и дифференцировки мышечных клеток, его сверхэкспрессия была описана во время дифференцировки в миотубы in vitro.

Langlois *et al*. показали, что Panx1 играет роль в высвобождении АТФ и сигнализации Ca<sup>2+</sup>, необходимых для правильного миогенеза (Langlois *et al.*, 2014).

Шесть субъединиц белка Panx1 образуют канал в плазматической мембране, который можно назвать «паннексоном» (Boassa *et al.*, 2007; Dahl, Locovei, 2006). Он обладает большой проводимостью и позволяет проходить относительно крупным молекулам, таким как АТФ, производным арахидоновой кислоты и флуоресцентным красителям (Bao *et al.*, 2004). В здоровой скелетной мышце Panx1 локализуется в сарколемме системы T-трубочек (Jorquera *et al.*, 2013). Соответственно, он является терапевтической мишенью, представляющей все больший интерес для многих патологических состояний, включая инфекционные заболевания, рак, воспаление и некоторые заболевания центральной нервной системы.

Рапх1 проявляет активность, находясь в непосредственной близости с дигидропиридиновыми рецепторами, указывая на то, что Panx1 играет соответствующую функциональную роль в физиологии мышц. Также прямое взаимодействие между каналами Panx1 и рецепторами P2 играет критическую роль в процессах трансдукции, таких как сопряжение возбуждения-транскрипции (Araya *et al.*, 2003).

Известно, что АТФ, высвобождаемый самим Panx1, может ингибировать дальнейшего высвобожления. активность канала лля предотвращения B физиологических условиях усиление ограничивается отрицательной обратной связью на паннексон. Это представляет собой важный механизм для сохранения целостности клеток, потому что без него апоптотические пути активировались бы даже при незначительном повышении внеклеточного AT $\Phi$  (Thompson *et al.*, 2006). Механизм контроля, предотвращающий чрезмерную активацию пуринергических рецепторов, обеспечивается связыванием АТФ с белком Panx1 и закрытием канала. Открытие канала Panx1 может быть усилено деполяризацией мембраны, механическим и метаболическим стрессом и активацией пуринергических рецепторов. Канал может активироваться АТФ как через ионотропные Р2Х, так и через метаботропные Р2У пуринергические рецепторы (Thompson *et al.*, 2006). Рапх1-опосредованное высвобождение АТФ активирует пуринергический сигналинг (Bustamante et al.,

2014). Этот процесс протекает в зависимости от частоты потенциала действия, воспринимается и передается дигидропиридиновыми рецепторами CaV1.1 (DHPR) на Panx1 (Casas *et al.*, 2014; Jorquera *et al.*, 2013). Было показано, что нуклеотиды, высвобождаемые вне клетки после электрической стимуляции, частично участвуют в быстрой передаче кальциевого сигнала, но в значительной степени ответственны за медленные сигналы (Burnstock, 2007).

Паннексиновые каналы открываются во время деполяризации мембраны и за счет изменений внутриклеточной передачи сигналов  $Ca^{2+}$  участвуют в вазодилатации, вазоконстрикции, передаче вкусовых ощущений, защите дыхательных путей, процессах обучения и памяти, клеточной дифференцировке, гибели клеток, а также в иммунной реакции (Checkeni *et al.*, 2010; MacVicar, Thompson, 2010; Prochnow *et al.*, 2012; Bao *et al.*, 2004; Locovei *et al.*, 2006).

Также был предложен возможный механизм активации каналов Panx1, который включает фосфорилирование. Во время повторяющихся сокращений скелетных мышц активность канала Panx1 увеличивается, а также увеличивается степень фосфорилирования остатков Panx1 Ser и Thr (Riquelme *et al.*, 2013). За активацией, зависящей от фосфорилирования белка, может следовать инактивация с помощью фосфопротеинфосфатазы или фосфорилирование другого аминокислотного остатка другой протеинкиназой с меньшим сродством к Ca<sup>2+</sup> с последующим полным дефосфорилированием с помощью протеинфосфатазы.

Альтернативным механизмом активации канала Panx1 в скелетных мышцах может быть прямой белок-белковый механизм (канал Panx1/DHPR), опосредованный DHPR, конформационными изменениями активируемых напряжением индуцированных деполяризующими мембранными потенциалами. В поддержку этой точки зрения можно сказать, что электрическая стимуляция индуцирует высвобождение АТФ и поглощение флуоресцентных производных глюкозы в миофибриллах, указывая на открытие каналов Panx1 (Riquelme et al., 2013). Кроме того, миотубы, лишенные субъединицы Cav1.1-α1, почти не высвобождают АТФ при электрической стимуляции, указывая на то, что Cav1.1 играет критическую роль в этом процессе (Jorquera et al., 2013).

Мы предполагаем, что паннексиновые каналы играют важную роль в накоплении АТФ в мышце во время вывешивания, что в дальнейшем может влиять на запуск и развитие атрофических процессов. Для выявления роли паннексиновых каналов в этом процессе мы применили селективный ингибитор пробенецид.

Пробенецид является одним из самых распространенных ингибиторов Panx1. Пробенецид имеет большую историю клинического применения благодаря своей способности ингибировать транспортеры органических анионов, что делает его эффективным урикозурическим средством для лечения подагры (Gutman, Yu, 1951; Roch-Ramel *et al.*, 1997) и адъювантом для повышения концентрации антибиотиков и химиотерапевтических средств (Burnell and Kirby, 1951). Существуют также перспективы его использования в качестве противовирусного и противоракового средства (Ahmed *et al.*, 2016), благодаря его способности блокировать активацию инфламмасомы (Dahl, Keane, 2012). Пробенецид также приобрел популярность в области спортивного допинга, предположительно из-за его способности снижать выведение анаболических и андрогенных стероидов (Hemmersbach, 2020).

# 1.5 Рецепторы Р2Ү1 и Р2Ү2 в скелетной мышце

Пуринергические рецепторы делятся на две группы (на основании селективности агонистов), а именно аденозиновые рецепторы Р1 и нуклеотидные рецепторы Р2. Охарактеризованы два подсемейства рецепторов Р2 – ионотропные рецепторы Р2Х и метаботропные рецепторы Р2Y (Burnstock, 2018; Antonioli *et al.*, 2019) и четыре различных подтипа рецепторов Р1 (A1, A2A, A2B и A3) (Fredholm *et al.*, 2001) (Таблица 1).

Существует как пуринергическая кратковременная сигнализация, так и долгосрочная (трофическая) сигнализация. Рецепторы Р2Х представляют собой ионные каналы, которые активируются пуринтрифосфатными нуклеотидами и вызывают быстрые и неселективные потоки Na<sup>+</sup> и Ca<sup>2+</sup> внутрь клетки. Рецепторы Р2Ү метаботропны, представляют собой рецепторы, сопряжённые с G-белком, (G-proteincoupled receptors, GPCR), активируемые АТФ, аденозиндифосфатом (АДФ), уридинтрифосфатом (УТФ) или уридиндифосфатом (УДФ) (Lazarowski *et al.*, 2003; Araya *et al.*, 2004; Burnstock, 2007; North, 2002). На сегодняшний день у

21

млекопитающих известно семь подтипов P2X (P2X1-7) и восемь подтипов P2Y (P2Y1, 2, 4, 6, 11, 12, 13, 14) рецепторов.

Известно, что в физиологических условиях Р2-рецепторы обычно играют лишь незначительную роль, однако их влияние значительно возрастает при некоторых патофизиологических состояниях, когда они могут выступать в качестве сигнальной молекулы (Burnstock et al., 2013). Разнообразие Р2-рецепторов и их широкое распространение в организме делают их весьма привлекательными в качестве фармакологических мишеней И, следовательно, создания препаратов с принципиально новым механизмом действия. Наиболее успешным направлением создания принципиально новых препаратов является внедрение в клиническую Р2Ү12-рецепторов тромбоцитов практику антагонистов человека, которые используются в качестве эффективных антиагрегантов (Gachet, 2008).

### 1.5.1 Аденозиновые рецепторы в скелетной мышце

Рецепторы P1 активируются при разных концентрациях аденозина, A1 и A2AR представляют собой рецепторы с высоким сродством (<1 мкМ), а A2B и A3 – рецепторы с низким сродством (<10 мкМ) (Fredholm *et al.*, 2007). Подтипы рецепторов P1 опосредуют различные физиологические эффекты, включая модуляцию деятельности сердечно-сосудистой, иммунной и центральной нервной систем (Ledent *et al.*, 1997; Sun *et al.*, 2001). Экспрессия и распределение аденозиновых рецепторов в скелетных мышцах могут меняться в зависимости от вида, а внутри вида могут зависеть от состояния мышц, типа волокон и расположения внутри волокон. В клетках C2C12 A2B экспрессировался наиболее сильно, тогда как A1, A2A и A3 были выражены в меньшей степени (Gnad *et al.*, 2020). В *m.tibialis* мышей наблюдалась экспрессия A1, A2A и A2B с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) (Warren *et al.*, 2011) и вестерн блота (Sacramento *et al.*, 2020).

А2А одинаково распределен в волокнах 1-го и 2-го типа, но в волокнах 1-го типа немного больше экспрессируется в цитоплазме, чем в мембране. А2В, напротив, в основном экспрессируется в цитоплазме волокон типа 2 и плазматической мембране волокон типа 1. Таким образом, за транспорт глюкозы через клеточную мембрану в

волокнах 2-го типа отвечает A2A, а в волокнах 1-го типа – A2B (Lynge, Hellsten, 2000). При блокировании аденозиновых рецепторов или использовании аденозиндезаминазы для удаления внеклеточного аденозина происходит резкое снижение транспорта глюкозы в волокнах скелетных мышц, что подтверждает их роль в метаболизме глюкозы (Han *et al.*, 1998).

Таблица 1. Характеристика пуринергических рецепторов.

группа		рецептор	ТИП	агонист
		A1		
P1		A2a	рецепторы, связанные с G-белками	аденозин
		A2b		
		A3		
Р2	P2X	P2X1	лиганд-зависимые ионные каналы	ΑΤΦ
		P2X2		
		P2X3		
		P2X4		
		P2X5		
		P2X6		
		P2X7		
	P2Y	P2Y1	рецепторы, связанные	$AT\Phi < 2$ -метилтио $AT\Phi < AД\Phi$
		P2Y2	с G-белками;	АТФ; УТФ
		P2Y4	активируют PLC, что	УТФ
		P2Y6	приводит к	УДФ
		P2Y11	образованию ІРЗ и	ΑΤΦ
		P2Y12	мобилизации	АДФ
		P2Y13	внутриклеточного	АДФ; ди-аденозин трифосфат
		P2Y14	$Ca^{2+}$	УДФ

# 1.5.2 Р2Х рецепторы в скелетной мышце

Паттерн экспрессии пуринергических рецепторов в скелетных мышцах зависит от вида и стадии развития. Подробно показана последовательная экспрессия рецепторов P2X2, P2X5 и P2X6 в развивающихся скелетных мышцах крысы и экспрессия рецепторов P2X1, P2X4, P2X5 и P2X6 в развивающихся миобластах цыплят (Ryten *et al.*, 2001). Все эти наблюдения подтверждают роль рецепторов P2X в развитии скелетных мышц. Сразу после рождения уровень экспрессии рецепторов P2X у млекопитающих снижается и функционально часто не обнаруживается, но рецептор P2X7 присутствует в умеренном количестве (Banachewicz *et al.*, 2005). В стехиометрии рецепторов P2X участвуют три субъединицы, которые образуют вытянутый тример или гексамер из двух тримеров (Nicke *et al.*, 1998; North, 2002; Stelmashenko *et al.*, 2012). В формировании ионной поры тримера участвуют как гетеромультимеры, так и гомомультимеры (Nicke *et al.*, 1998), включая рецепторы P2X2/3, P2X1/2, P2X1/5, P2X2/6, P2X4/6 и P2X1/4. Рецептор P2X6 был клонирован из мозга крысы (Soto *et al.*, 1996). Человеческий эквивалент был выделен из периферических лимфоцитов и обильно экспрессируется в скелетных мышцах человека и мыши. Субъединица P2X6 функционально экспрессируется только в виде гетеромультимера (Burnstock, 2007).

Экспрессия пуринорецепторов хорошо изучена в развивающихся клетках скелетных мышц. Реакции, характерные для активации Р2 рецепторов, были обнаружены на миобластах и миотубах, выращенных из эмбриональных мышц цыпленка и миобластов C2C12 (Kolb, Wakelam, 1983; Henning *et al.*, 1993). Была продемонстрирована экспрессия специфических подтипов рецепторов Р2X и Р2Y во время развития скелетных мышц. Р2Y1, Р2X5 и Р2X6 экспрессируются при развитии скелетных мышц цыплят (Meyer *et al.*, 1999; Choi *et al.*, 2001; Ruppelt *et al.*, 2001), а экспрессия рецепторов Р2X2, Р2X5, Р2X6, Р2Y1, Р2Y2 и Р2Y4 была продемонстрирована при развитии скелетных мышц крыс (Cheung *et al.*, 2003; Ryten *et al.*, 2001).

Белок и мРНК Р2Х7 активируются при моделировании мышечной дистрофии Дюшенна у мышей mdx. Например, было показано, что рецептор Р2Х7, чувствительный к АТФ, улучшает восстановление после травмы спинного мозга (Khairullin *et al.*, 2023).

### 1.5.3 Р2Ү рецепторы в скелетной мышце

Клетки C2C12, полученные из сателлитных миобластов, экспрессируют рецепторы P2Y1, P2Y2, P2Y4, P2Y6 и P2Y12 (Banachewicz *et al.*, 2005). Было показано, что волокна длинного сгибателя пальцев (*m. flexor digitorum brevis*) экспрессируют мPHK рецепторов P2Y1, P2Y2, P2Y13 и P2Y14. Произвольная физическая активность мышей в течение 5 недель изменяет характер экспрессии этих

рецепторов (Р2Ү2 подавляется, а Р2Ү14 гиперэкспрессируется) и повышает чувствительность волокон к АТФ для стимуляции экспрессии IL-6 (Fernández-Verdejo *et al.*, 2014).

Были клонированы и охарактеризованы P2Y1-рецепторы человека (Ayyanathan *et al.*, 1996; Janssens *et al.*, 1996; Léon *et al.*, 1996; Schacter *et al.*, 1996), крысы, мыши (Tokuyama *et al.*, 1995), коровы (Henderson *et al.*, 1995), цыпленка (Webb *et al.*, 1993), индейки (Filtz *et al.*, 1994) и шпорцевой лягушки (Cheng *et al.*, 2003). Методами нозерн-блота и ПЦР выявили мРНК рецептора P2Y1 в большинстве тканей человека, включая мозг, сердце, плаценту, легкие, печень, скелетные мышцы, почки, поджелудочную железу и различные клетки крови (Ayyanathan *et al.*, 1996; Léon *et al.*, 1996).

Рецептор Р2Y1 широко экспрессируется во всем организме, значит, нокаут его гена может иметь фенотипические последствия. Это подтвердилось в случае с гомеостазом глюкозы, поскольку было обнаружено, что у нокаутных мышей наблюдается более высокий уровень глюкозы, а также больший вес, чем у мышей дикого типа (Léon *et al.*, 2005). Для Р2Y1 рецепторов АДФ является более активным агонистом, чем АТФ, а их 2-метилтиопроизводные – еще более активными, чем исходные соединения. УТФ, УДФ, гуанозинтрифосфат (ГТФ) и цитидинтрифосфат (ЦТФ) неактивны (Waldo *et al.*, 2002; Waldo, Harden, 2004). АТФ, по сути, является частичным агонистом рецептора Р2Y1, ЕС50 которого примерно в 20 раз больше, чем у АДФ (Palmer *et al.*, 1998; Waldo, Harden, 2004), и поэтому при низких уровнях экспрессии рецептора будет действовать как антагонист (Léon *et al.*, 1997).

Рецепторы Р2Ү2, ранее известные как Р2U, были клонированы и фармакологически охарактеризованы из клеток или тканей человека, крысы, мыши, собаки и свиньи (Lustig *et al.*, 1993; Parr *et al.*, 1994; Bowler *et al.*, 1995; Rice *et al.*, 1995; Zambon *et al.*, 2000; Shen *et al.*, 2004). Рецепторы Р2Ү2 полностью активируются эквивалентными концентрациями АТФ и УТФ, тогда как АДФ и УДФ являются менее эффективными агонистами (Lustig *et al.*, 1993; Parr *et al.*, 1994; Lazarowski *et al.*, 1995). Экспрессия мРНК рецептора Р2Ү2 была обнаружена в скелетных мышцах, сердце, мозге, селезенке, лимфоцитах, макрофагах, костном мозге и легких, с более низким

уровнем экспрессии в печени, желудке и поджелудочной железе человека (Moore et al., 2001). Функциональные рецепторы P2Y2 экспрессируются в эпителиальных, гладкомышечных и эндотелиальных клетках, в лейкоцитах, кардиомиоцитах, остеобластах и клетках, полученных из периферической и центральной нервной клетки Шванна, нейроны коры головного мозга системы, включая крыс, астроциты дорсального рога олигодендроциты, И коры головного мозга, иммортализованные астроциты, астроцитомы и гибридные клетки клетки нейробластомы и глиомы NG108-15 (Bowler et al., 1995; Ho et al., 1995; Kirischuk et al., 1995; Rice et al., 1995; Berti-Mattera et al., 1996; Kim et al., 1996; Kunapuli, Daniel, 1998; Weisman et al., 1999; Pillois et al., 2002; Seye et al., 2002; Gendron et al., 2003; Kumari et al., 2003).

# 1.5.4 Роль и функции Р2Ү1 и Р2Ү2 рецепторов в скелетных мышцах

Р2Y рецепторы, сопряженные с G белком (GPCR), связываются с белками семейства Gp/11 в скелетных мышцах и передают внеклеточные сигналы внутрь клетки посредством пуринергической сигнальной системы. Рецепторы Р2Y2 могут напрямую связываться с фосфолипазой Сβ (PLCβ1) через белок Gαq/11 для производства IP3 и диацилглицерола, с последующим высвобождением кальция из внутриклеточных запасов и активацией протеинкиназы С (PKC), соответственно.

P2Y1/2 принимают участие в процессе регенерации мышц, регулируя мышечные стволовые клетки с помощью пуринергических сигналов и молекул (Khalafalla *et al.*, 2017). Хотя существующие данные указывают на то, что P2Y1 или P2Y2 участвуют в регенерации скелетных мышц, о клиническом применении антагонистов P2Y1 или P2Y2 при мышечных заболеваниях не сообщалось.

Рецептор P2Y1 играет важную роль в функции скелетных мышц. Внеклеточные нуклеотиды, действуя через рецептор P2Y1, усиливают мышечное сокращение за счет увеличения экспрессии рецепторов ацетилхолина и активности холинэстеразы (Choi *et al.*, 2003). Активация этого рецептора также ингибирует хлоридные каналы в зрелых скелетных мышцах млекопитающих, что имеет значение для мышечной возбудимости и утомляемости, а также патофизиологии (Voss, 2009). Повышение

26

активности Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-АТФазы во время мышечной активности, по-видимому, связано со стимулирующим эффектом АДФ с участием рецепторов P2Y1 (Walas, Juel, 2012). Увеличение активности Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-АТФазы при участии P2Y1 может быть важно для поддержания возбудимости во время интенсивных упражнений (Broch-Lips *et al.*, 2010).

Активация рецепторов P2Y2 увеличивает синтез и/или высвобождение арахидоновой кислоты, простагландинов и оксида азота (NO) (Lustig *et al.*, 1992; Pearson *et al.*, 1992; Xing *et al.*, 1999; Xu *et al.*, 2002; Welch *et al.*, 2003). Активация рецептора P2Y2 может вызывать фосфорилирование стресс-активируемых киназ ERK1/2, JNK и p38MAPK (Gendron *et al.*, 2003). Активация рецептора P2Y2 также вызывает p38- и ERK1/2-зависимую регуляцию генов, контролирующих выживание клеток астроцитомы человека (например, Bcl-2 и Bcl-xl) (Chorna *et al.*, 2004).

Известно, что АТФ, высвобождаемый ИЗ клеток, P2X активирует (ионотропные) или Р2Ү (метаботропные) рецепторы плазматической мембраны. В скелетных первичных миотубах деполяризующие стимулы индуцируют как быстрый кальциевый сигнал, связанный с сокращением, так и медленный сигнал, который регулирует экспрессию генов. Метаботропные рецепторы также связаны с движением Ca<sup>2+</sup> в клетке и вне ее. Активация Р2У рецепторов вызывает генерацию IP3. активируют IP3R и последующее высвобождение Ca<sup>2+</sup> которые саркоплазматического ретикулума. Было показано, что рецепторы Р2У1, Р2У2 и Р2Ү4 принимают участие в формировании межклеточных сигнальных путей Ca<sup>2+</sup>. Причем ток через рецепторы Р2Ү2, по-видимому, распространяется быстрее и дальше, чем через рецепторы P2Y1 (Gallagher, Salter, 2003). Внеклеточный АТФ склонен к быстрой деградации до АДФ и АМФ под действием нескольких классов эктонуклеотидаз. Следствием быстрой деградации внеклеточного АТФ является то, что, хотя токи Ca<sup>2+</sup> могут первоначально опосредоваться АТФ, действующим на рецепторы Р2Ү2, их распространение может также поддерживаться АДФ, активирующим рецепторы P2Y1. Опосредованный P2Y рецепторами ток Ca<sup>2+</sup> приводит к активации ERK1/2 (May et al., 2006). Повышенный уровень АТФ после повреждения или в процессе разгрузки скелетных мышц может напрямую

активировать Р2Ү рецепторы. Сигналы Р2Ү2 через PLC, Ca<sup>2+</sup>, ERK и р38МАРК вызывают активацию, пролиферацию и миграцию клеток.

Пуринергическая передача сигналов также связана с патофизиологическими состояниями скелетных мышц. Показано, что у мышей mdx выброс АТФ больше, при этом экспрессия рецепторов P2Y2 повышена, а экспрессия рецепторов P2Y1 снижена (Valladares *et al.*, 2012). Также было обнаружено, что сурамин, который приводит к нормальной экспрессии рецепторов P2Y2, улучшает клиническую картину дистрофии Дюшенна (De Oliveira Moreira *et al.*, 2017).

Мы предположили, что пуринергические рецепторы в разгруженной мышце могут взаимодействовать с нуклеотидами, накапливающимися во внеклеточном пространстве при разгрузке мышц. На ранних стадиях разгрузки содержание АТФ в мышечных волокнах значительно увеличивается, что приводит к переносу большего количества АТФ через паннексиновые каналы, чем АДФ. Следовательно, сигнальная активность Р2Ү2-рецепторов должна быть значительно выше, и ингибирование этих рецепторов может иметь более значительные физиологические последствия, чем ингибирование Р2Ү1-рецепторов. Нами была проверена гипотеза об участии пуринергических рецепторов в изменении экспрессии ЕЗ-лигаз и запуске специфических транскрипционных сигнальных программ мышц при функциональной разгрузке мышц.

# 1.6 Рецепторы инозитол-3 фосфата и фосфатидилинозитол-3-киназа в скелетных мышцах

Внеклеточный АТФ при участии Р2 рецепторов индуцирует накопление инозитолфосфата. Это может указывать на возможность того, что АТФ участвует в процессе слияния миобластов с участием Р2 рецепторов (Keresztes *et al.*, 1991). В экспериментах на культуре мышечных клеток было обнаружено новое свойство DHPR как сенсора сигнала, который регулируется G-белком цитоплазматической мембраны. Так, мембранная деполяризация вызывает активацию PLC и PI3K, что ведет к последующему высвобождению  $Ca^{2+}$  из-за действия IP3 на IP3R (Casas *et al.*, 2014).

РІЗК делят на три класса: І, ІІ и ІІІ. Все из них обладают «фирменным мотивом», состоящим из домена C2, спирального домена и каталитического киназного домена. Классификация на три различных класса основана главным образом на наличии дополнительных белковых доменов и их взаимодействии с регуляторными субъединицами (Vanhaesebroeck *et al.*, 2010). Каждый домен кодируется отдельным геном, у млекопитающих есть гены восьми каталитических и шести регуляторных субъединиц. Субъединицы регуляторного белка кодируются изоформами р85 $\alpha$  и р85 $\beta$ . Связывание доменов позволяет дополнительно рекрутировать и активировать каталитические субъединицы РІЗК (р110 $\alpha$ , р110 $\beta$  и р110 $\gamma$ ). Каждый класс РІЗК выполняет множество функций в клетке через регуляцию различных пулов фосфоинозитидов (Dou *et al.*, 2010; Lu *et al.*, 2012; Kok *et al.*, 2009). Прямые роли РІЗК можно разделить преимущественно на участие в клеточном сигналинге (класс I, II) или в мембранном трафике (класс II, III).

РІЗК класса І представляют собой гетеродимерные ферменты, состоящие из каталитической субъединицы массой 110 кДа (p110 $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ) в комплексе с регуляторной субъединицей. Они активируются сигнальными путями тирозинкиназы и GPCR, что приводит к образованию фосфатидилинозитол-3,4,5-трифосфатного липида [PtdIns(3,4,5)P3]. Мишени PtdIns(3,4,5)P3 включают протеинкиназы, адаптерные белки и регуляторы малых ГТФаз, которые опосредуют сигнальные каскады, контролирующие рост, развитие клеточного цикла и миграцию клеток (Vanhaesebroeck *et al.*, 2001). Каталитические субъединицы класса IA (p110 $\alpha$ , p110 $\beta$ и p110 $\delta$ ) связаны с регуляторной субъединицей p85, которых существует пять видов  $(p85\alpha, p85\beta, p55\alpha, p55\gamma, up50\alpha)$ . p85 имеет два домена гомологии Src2 (SH2), которые ферментный комплекс p85-p110 PI3K с сигнальными путями связывают тирозинкиназы. Напротив, каталитическая субъединица класса IB p110 у связывает одну из двух регуляторных субъединиц, не относящихся к p85, называемых p101 (Stephens et al., 1997) и p84 (Suire et al., 2005), и опосредует активность PI3K при стимуляции GPCR. Было показано, что p110β PI3K класса IA активируется агонистами GPCR (Guillermet-Guibert et al., 2008).
Ha мембране PI3K плазматической активированная фосфорилирует фосфатидилинозитол-(4,5)-бисфосфат (PIP2) с образованием фосфатидилинозитол-(3,4,5)-трифосфата (PIP3) (Matsui et al., 2003). PI3K находится в сарколемме в одном каскаде с P2Y1/2, паннексиновыми рецепторами и DHPR (Arias-Calderón et al., 2016). Было показано, что РІЗКу может активироваться электрическим стимулом, передающимся через DHPR. Продукция PIP3 с помощью PI3K необходима для активации PLC и протекания медленного кальциевого сигнала. Также было показано, что ингибитор PI3K LY294002 полностью блокировал как медленные сигналы Ca<sup>2+</sup>, так и кратковременное увеличение содержания IP3, вызванное электростимуляцией (Eltit *et al.*, 2006). Хотя РІЗК фосфорилируют PIP2, PLС гидролизуют фосфоинозитиды и производят IP3 и диацилглицерол. Активация множества рецепторов клеточной мембраны приводит к повышению внутриклеточного IP3, который является триггером и/или регулятором волн Ca<sup>2+</sup> (Clapham, 1995). Активность PLC повышается под действием PIP3 непосредственно через связывание с плекстриновым доменом (PH) (Falasca et al., 1998) и доменами SH2 (Rameh et al., 1998).

РІРЗ представляет собой сайт связывания с мембраной двух киназ: АКТ1 и фосфоинозитид-зависимой протеинкиназы (PDK1). АКТ1 фосфорилируется PDK1 и тем самым активируется при транслокации на мембрану (Andjelkovic *et al.*, 1997). После активации АКТ1 фосфорилирует набор субстратов, включая белки, которые блокируют апоптоз, индуцируют синтез белка, транскрипцию генов и пролиферацию клеток (Matsui *et al.*, 2003). Ключевой мишенью АКТ являются факторы транскрипции FOXO (Bodine *et al.*, 2001b). При фосфорилировании с помощью АКТ р-FOXO секвестрируются и становятся неактивными в цитоплазме за счет прямого связывания с белками 14-3-3 (Sandri *et al.*, 2004). Другим важным компонентом АКТ являются мишень рапамицина млекопитающих (mTOR, киназа, принадлежащая к семейству протеинкиназ, родственных PI3K), который участвует в метаболизме, росте и пролиферации. Lee *et al.* обнаружили, что в диабетической мышце мPHK FOXO, его ядерная транслокация и связывание с промотором atrogin-1/MAFbx были повышены. Авторы предполагают, что, когда активность PI3K низкая, как

апоптотический, так и убиквитин-протеасомный пути активируются скоординированно, запуская протеолиз в мышечных клетках. Этот механизм может усиливать мышечную атрофию в условиях нарушенной чувствительности к инсулину. Однако данный эксперимент проводился на культуре клеток икроножной мышцы (*m. gastrocnemius*), в которой преобладают быстрые волокна (Lee *et al.*, 2004).

Хотя мРНК РІЗКу в скелетных мышцах была выявлена более 10 лет назад, её физиологическая роль не выяснена.

PI3Kγ может активироваваться P2Y рецепторами и, в конечном итоге, активировать IP3R, которые находятся в ядре и саркоплазматическом ретикулуме. Активация IP3R может вызывать слабый сигнал высвобождения кальция, как цитозольный, так и нуклеоплазматический, который способствует (возможно, с другими сигнальными каскадами) активации транскрипционных факторов, что приводит к изменению экспрессии ключевых генов скелетной мышцы. Мы хотим проверить эту гипотезу в эксперименте *in vivo* на модели функциональной разгрузки мышц крыс с помощью селективного ингибитора LY294002.

## 2. ОРГАНИЗАЦИЯ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

При моделировании функциональной разгрузки скелетных мышц использовалась широко применяемая во всем мире методика Ильина-Новикова в модификации Morey-Holton (Novikov, Ilyin, 1981; Morey-Holton, Globus, 2002; Morey-Holton *et al.*, 2005).

Вывешивание задних конечностей делалось так, что задние конечности крыс не касались пола, а передние свободно опирались на пол, и животные свободно передвигались. Крысы были подвешены на специальных мягких шинках. Данные показывают, что при таком способе проведения вывешивания животные не подвергаются стрессу, кровообращение хвоста не нарушается. Пищу и воду животные получали *ad libitum*. По окончанию эксперимента крыс наркотизировали сверхдозой авертина (5 мл/кг веса 10 % раствора), выделяли *m.soleus*, взвешивали, замораживали в жидком азоте и хранили при -85°C.

## 2.1 Введение ингибитора паннексиновых каналов на фоне трехсуточного вывешивания

Для изучения роли паннексиновых каналов крысам при вывешивании в течение трех суток вводился ингибитор этих каналов пробенецид (PRB) (Biokanol Pharma GmbH, Германия). Для проведения эксперимента 24 самца крыс линии Wistar массой 180-200 г были случайным образом распределены на 3 группы по 8 животных в каждой: интактный контроль (С), 3-х суточное вывешивание с введением растворителя препарата (HS); 3-х суточное вывешивание с введением ингибитора PRB (P) (Рисунок 2). Проведение эксперимента получило одобрение комиссией по биомедицинской этике ГНЦ РФ ИМБП РАН (№ 537 от 18.02.2020). Животные экспериментальных групп получали пробенецид, растворенный в фосфатно-солевом буффере (PBS), в дозе 50 мг/кг массы тела в сутки внутрижелудочно при помощи зонда в течение 3 дней. Животные других групп получали PBS. Выбор концентрации препарата определялся данными литературы (Burma *et al.*, 2017; Carrillo-Mora *et al.*, 2010; Silverman *et al.*, 2008; He *et al.*, 2018; Navis *et al.*, 2020). Для анализа использовалась *m.soleus*. В мышце были определены следующие параметры: методом ПЦР в реальном времени – MuRF-1, MAFbx/Atrogin-1, убиквитин, паннексин-1; методом вестернблоттинга – pFOXO3, FOXO3, pAkt, Akt, peEF2, eEF2, pGSK3b, GSK3b, pAMPK, AMPK, pP70S6K, P70S6K, pP90, P90, pErk1/2, Erk1/2, миогенин.



Рисунок 2 – Схема эксперимента с введением ингибитора паннексиновых каналов на фоне трехсуточного вывешивания

# 2.2 Введение ингибиторов рецепторов Р2Ү2 и Р2Ү1 на фоне трехсуточного вывешивания

Для проверки роли P2Y2 и P2Y1 в развитии атрофических процессов блокировали эти рецепторы (чувствительные к адениловым нуклеотидам) при вывешивании крыс специфическими ингибиторами AR-C118925XX и MRS2179 (Tocris Bioscience, Великобритания). Данные специфические ингибиторы появились недавно и используются впервые при моделировании функциональной разгрузки крыс. 32 самца крыс линии Wistar случайным образом были распределены на 4 группы по 8 крыс в каждой (Рисунок 3): контроль (С) с введением растворителя (10% DMSO в физ. растворе, объём инъекции – 400 мкл), 3-суточное вывешивание (HS) с введением растворителя, 3-суточное вывешивание с введением ингибитора P2Y2 рецепторов AR-C 118925XX (10 мг/кг в день в 10% DMSO в физ. растворе, внутрибрюшинно) (А) (Ни *et al.*, 2019), 3-суточное вывешивание с введением

ингибитора P2Y1-рецепторов MRS2179 (25 мг/кг в день в 10% DMSO в физ. растворе, внутрибрюшинно) (М) (Liu *et al.*, 2014). Эксперимент был одобрен комиссией по биомедицинской этике ГНЦ РФ ИМБП РАН (протокол № 585 от 31.05.2021) и соответствует современным нормам и стандартам работы с животными. В *m.soleus* были определены следующие параметры: методом ПЦР в реальном времени – MuRF-1, MAFbx/Atrogin-1, убиквитин, кальпаин-1, P2Y1, P2Y2, IL6R; методом вестерн-блоттинга – pFOXO3, FOXO3, pAkt, Akt, peEF2, eEF2, pGSK3b, GSK3b, pAMPK, AMPK, pP70S6K, P70S6K, pP90, P90, pErk1/2, Erk1/2, p-p38, p38, p4E-BP1, 4E-BP1, IP3R.





### 2.3 Введение ингибитора PI3К на фоне трехсуточного вывешивания

Для изучения роли PI3K в АТФ-зависимой регуляции сигналинга скелетных мышц при их функциональной разгрузке применялся ингибитор LY294002. 24 самца крыс линии Wistar случайным образом были распределены на 3 группы по 8 крыс в каждой (Рисунок 4): контроль (С) с введением плацебо (10% DMSO в физрастворе, объём инъекции – 400 мкл), 3-суточное вывешивание (HS) с введением плацебо, 3-

суточное вывешивание с введением ингибитора PI3K LY294002 (30 мг/кг в день в 10% DMSO в физрастворе, внутрибрюшинно) (LY) (Su *et al.*, 2003). Эксперимент был одобрен комиссией по биомедицинской этике ГНЦ РФ ИМБП РАН (протокол № 617 от 22.06.2022) и соответствует современным нормам и стандартам работы с животными. В *m.soleus* были определены следующие параметры: методом ПЦР в реальном времени – MuRF-1, MAFbx/Atrogin-1, убиквитин, CaN A; методом вестерн-блоттинга – pFOXO3, FOXO3, pAkt, Akt, peEF2, eEF2, pGSK3b, GSK3b, pAMPK, AMPK, pP70S6K, P70S6K, pP90, P90, pS6, S6, pErk1/2, Erk1/2, p4E-BP1, 4E-BP1, IP3R, CaMK II, p-CaMK II, IRS1.





### 2.4 Выделение белка. Электрофорез с последующим вестерн-блоттингом

С каждого образца *m.soleus* были сделаны срезы толщиной 20 мкм (10-15 мг) на микротоме-криостате фирмы Leica и немедленно прогомогенизированы в течение 25 минут в 125 мкл лизирующего буфера RIPA (Santa-Cruz, USA), содержащего 50 mM Tris (pH 7.4), 150 mM NaCl, 0.1% Triton X-100, 0.1% SDS, 5 mM EDTA (pH 8.0) 1 mM DTT, 1 mM PMSF, 1мM Na3VO4, апротинин (10  $\mu$ g/ml), леупептин (10  $\mu$ g/ml),

пепстатин A (10 µg/ml), протеазный ингибиторный коктейль (Santa-Cruz, USA) и фосфотазный ингибиторный коктейль (Santa-Cruz, USA), 50мM NaF и 50мM бетаглицерофосфат. Затем образцы центрифугировали при 20000 g в течение 15 минут. Цитоплазматическая фракция белков была выделена с помощью набора NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents («Thermo Fisher Scientific», США).

Часть супернатанта отбирали для определения концентрации общего белка с помощью реактива Бредфорда (Bio-Rad Laboratories, США). Определения проводились на современном планшетном фотометре Epoch при длине волны 595 нм. Остальная часть белковых образцов делилась на аликвоты в пробирки для дальнейшего проведения электрофоретических анализов.

Образцы для нанесения разводились в 2х-кратном Laemmli буфере (5,4 мМ Tris-HCl (pH 6,8), 4%-ный Ds-Na, 20%-ный глицерин, 10%-ный β меркаптоэтанол, 0,02%ный бромфеноловый синий).

### 2.4.1 Электрофорез в полиакриламидном геле

Электрофорез проводили в 10%-ном разделяющем полиакриламидном геле (ПААГ) (0,2%-ный метилбисакриламид, 0,1%-ный Ds-Na, 375 мМ Tris-HCl (pH 8,8), 0,05%-ный персульфат аммония, 0,1%-ный ТЕМЕД) и в 5%-ном концентрирующем ПААГ (0,2%-ный метилбисакриламид, 0,1%-ный Ds-Na, 125 мМ Tris-HCl (pH 6,8), 0,05%-ный аммоний персульфат, 0,1%-ный ТЕМЕД). Для проведения электрофореза был использован трис-глициновый буфер (192 мМ Tris-глицин (pH 8,6), 0,1%-ный Ds-Na). Образцы каждой группы загружались на один гель с контрольными образцами. Образцы загружались из расчета 25 мкг общего белка в каждой пробе на дорожку и нормировались относительно уровня GAPDH, содержащегося в той же пробе. При необходимости для некоторых белков объем нанесения мог подбираться индивидуально. Электрофорез проводился при 15 мА на гель в мини-системе («Bio-Rad Laboratories») при комнатной температуре.

36

### 2.4.2 Вестерн-блоттинг

Электроперенос белков проводился в буфере (25 мМ Tris (pH 8,3), 192 мМ глицин, 20%-ный этанол, 0,04%-ный Ds-Na) на нитроцеллюлозную мембрану при 100 V при температуре 4 °C в системе mini Trans-Blot («Bio-Rad Laboratories») в течение 2 часов. После электропереноса НЦ-мембраны инкубировались в течение 5 минут в 0,3%-ом растворе Ponceau Red в 5%-ой уксусной кислоте, затем отмывались в PBS (Биолот) с 0,1%-ным Tween20 (PBST) до появления четких белковых полос на мембране. Этот этап проводился для контроля эффективности переноса; а также для того, чтобы убедиться, что количества общего белка, внесенного в каждую дорожку, было одинаковым. Мембраны блокировались в растворе 5%-го сухого молока («Bio-Rad Laboratories») в PBST 1 час при комнатной температуре, затем помещались в раствор первичных антител на ночь на +4 °C. При необходимости для усиления сигнала и улучшения детекции некоторых белков (p-Akt, p-AMPK, p-p38) использовались новые коммерческие блокировочные растворы – Every Blot («Bio-Rad Laboratories») и Pierce Protein-Free («Thermo Fisher Scientific»).

Для выявления белковых полос были использованы первичные антитела против p-4E-BP1 (Thr37/46) (1:1000, #2855), 4E-BP1 (1:1000, #9644), p-Akt (Ser437) (1:500, #9271), Akt (1:1000, #9272), p-AMPK (Thr172) (1:500, #2535), AMPK (1:1000, #2532), p-CaMKII $\beta$  (Thr286) (1:1000, #12716), CaMKII $\beta$  (1:1000, #3362), p-eEF2 (Thr56) (1:1000, #2331), eEF2 (1:1000, #2332), p-Erk1/2 (Thr202/Tyr204) (1:1000, #9101), Erk1/2 (1:1000, #4695), p-GSK3 $\beta$  (Ser9) (1:1000, #9322), GSK3 $\beta$  (1:1000, #12456), p-p38 (Thr180/Tyr182) (1:500, #9211), p38 (1:1000, #9212), p70S6K (1:1000, #9202), p-p90 (Thr359/Ser363) (1:1000, #9344), p90 (1:1000, #8408), p-S6 (Ser240/244) (1:1000, #5364), p-S6 (Ser235/236) (1:1000, #4858), S6 (1:1000, #2217), IRS1 (1:1000, #2382), mTOR (1:1000, #2972) фирмы «Cell Signaling Technology» (CША), p-FoxO3 (Ser253) (1:1000, sc-101683), p-P70S6K (Thr389) (1:1000, sc-11759) фирмы «Santa Cruz» (CША), FOXO3 (1:1000, #PA5-20973), IP3R (1:1000, #PA5-96855), MYOG (1:500, #MA5-11658) фирмы «Thermo Fisher Scientific» (CША), Puromycin (1:3000, EQ0001) фирмы Kerafast Inc. (CША), GAPDH (1:10000) фирмы «ABM», к p-PIK3R1/PIK3R3 (Y467/199) (1:1000, #CSB-PA030058) фирмы «Cusabio» (Китай).

Затем мембрана отмывалась от первичных антител в PBST 3 раза по 5 минут на шейкере и инкубировалась 1 час с вторичными антителами goat-anti-rabbit (1: 30 000, ImmunoResearch», CIIIA) или goat-anti-mouse  $(1:20\ 000)$ «Jackson «Bio-Rad Laboratories», США). Потом мембрана отмывалась от вторичных антител в PBST 3 раза по 5 минут на шейкере. Выявление проводилось с помощью Clarity Western ECL Substrate (Bio-Rad Laboratories, США). Хемилюминисцентный сигнал детектировался с помощью сканера C-DiGit Blot Scanner (LI-COR, США). Затем полученные на сканере изображения обрабатывались с помощью прилагаемого программного обеспечения Image Studio Software (LI-COR) для получения количественных данных для анализа. Данный прибор и его аналоги вместе с программным обеспечением широко используются во всем мире для детекции сигнала в иммуноблотинге, делая эту методику гораздо производительнее. 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.

#### 2.5 Содержание АТФ в мышце

Для определения содержания АТФ в мышце использовался набор АТР Colorimetric / Fluorometric Assay Kit (MAK190; Sigma, St. Louis, MO, CША). Образец ткани взвешивали, добавляли в пробирку 2Н хлорную кислоту, 10 мкл/мг ткани и гомогенизировали. Затем пробы выдерживались на льду 30-45 минут. После этого образцы центрифугировали на 13000g 2 минуты при 4°С, супернатант переносился в чистую пробирку. Объем супернатанта измеряли, доводили до 500 мкл с помощью АТР Assay Buffer. Хлорную кислоту нейтрализовали добавлением 2М КОН (КОН добавляли постепенно, перемешивая и проверяя pH с помощью индикаторной бумаги до тех пор, пока pH пробы не достигал 6,5-8). Далее пробы центрифугировали при 13000g 15 минут при 4°С. Супернатант использовали для дальнейшего определения АТФ.

В лунки планшета вносили по 50 мкл образца (и по 50 мкл подготовленных стандартов в диапазоне 2-10 нмоль/лунка) и 50 мкл ATP Reaction Mix, затем инкубировали 30 минут в темноте. Оптическую плотность каждого образца измеряли

с помощью планшетного спектрофотометра при 570 нм. Концентрация АТФ рассчитывалась по следующей формуле:

Концентрация  $AT\Phi = B * DDF / V$ , где

В – количество АТФ в лунке с образцом, рассчитанное по стандартной кривой;

V – объем пробы, добавленный в лунки (50 мкл в нашем случае);

DDF – deproteinization dilution factor – фактор разведения, считался по формуле: DDF = (500 мкл + объем KOH (мкл)) / начальный объем пробы.

## 2.6 Исследование экспрессии генов

#### 2.6.1 Выделение РНК

Для выделения тотальной РНК из скелетных мышц была выделена фракция РНК на микроколонках «RNeasy Micro» («Qiagen», Германия). Производилась нарезка *m. soleus* крысы на микротоме при толщине срезов 20 мкм. 4-6 мкг нарезанной ткани помещались в пробирку с 300 мкл лизирующего буфера RLT, содержащего гуанидин тиоцианат, сильный белковый детергент, в который добавлялось 10 мкл βмеркаптоэтанола. Гомогенат перемешивали в течение 1 минуты на Microspin FV-2400 («Biosan», Латвия). Затем к гомогенату было добавлено 589 мкл воды, очищенной от РНКаз, и 11 мкл раствора протеиназы К (18,7 мг/мл) («Синтол», Россия). Далее раствор инкубировался в течение 15 минут при 55°С, а затем центрифугировался при комнатной температуре 3 минуты при 10000g. Супернатант переносился в новую пробирку с 450 мкл 96-100% этилового спирта, смесь перемешивалась пипетированием. Полученный лизат был перенесен на колонку в пробирке и центрифугировался 15 секунд при ≥8000g. Смыв был отброшен. Колонка была промыта 350 мкл буфера RW1 центрифугированием в течение 15 секунд при ≥ 8000g. На 20 минут на силикагелевую мембрану колонки было нанесено 80 мкл ДНКазы І. Затем колонка последовательно была промыта буферами RW1, RPE, 80%-ным этанолом. Для элюции колонка была перенесена в пробирку, на мембрану нанесено 30 мкл воды, проведено центрифугирование в течение 1 минуты при 10000g. Пробирка с водным раствором РНК немедленно помещалась в лёд, а затем на хранение при -85°С. При помощи данного метода выделяются в основном молекулы мРНК.

Концентрация мРНК определялась по поглощению раствора мРНК при помощи спектрофотометра NanoPhotometer IMPLEN, способного проводить измерения в объеме 2 мкл, что позволяет существенно экономить биоматериал и снимает необходимость разводить образцы, увеличивая таким образом точность измерения. Снимались показания в диапазоне от 200 до 320 нм. Измерение каждой пробы проводилось не менее 3 раз. Чистота образцов была оценена исходя из соотношений показателей поглощения при различных длинах волн. Соотношение A260/A230 экспериментальных образцов было >2,0, что указывает на то, что они являлись достаточно чистыми от углеводов, пептидов, фенолов и ароматических соединений.

## 2.6.2 Обратная транскрипция

Для проведения обратной транскрипции был использован набор RevertAid RT Kit (Thermo Fisher Scientific, USA). Для подготовки кДНК водный раствор, содержащий 0,5 мкг тотальной РНК, 30 мкМ случайных гексануклеотидов и 17,4 мкМ олиго-d(T)15, инкубировался 3 мин при 70°С и немедленно переносился на лед. Далее к смеси было добавлено 8 мкл мастер-микса из набора RevertAid RT Kit в соответствии с протоколом производителя: 4 мкл 5X Reaction Buffer, 1 мкл RiboLock RNase Inhibitor (20 U/мкл), 2 мкл 10 мМ dNTP Mix, 1 мкл RevertAid RT (200 U/мкл). После этого пробы были помещены в амплификатор (CFX96 Touch, «Bio-Rad Laboratories») для проведения обратной транскрипции: 10 мин при 25°С, 60 мин при 42°С, 5 мин при 95°С. После проведения реакции образцы, содержащие кДНК, хранились при -25°С.

## 2.6.3 Проведения ПЦР в реальном времени

Для проведения ПЦР в реальном времени смешивалось 2 мкл кДНК, 2 мкл праймеров с концентрацией 10 мкМ и 21 мкл мастер-микса (0,3 мМ дНТФ, 3 мМ MgCl2, 2,5 мкл 10х ПЦР-буфера Б (pH 8,8), 0,06 ед./мкл Таq ДНК-полимеразы, «Синтол»). ПЦР проводили в амплификаторе CFX96 Touch («Bio-Rad Laboratories»)

по протоколу: 5 мин при 95°C; 44 цикла: 15 сек при 95°C, 15 сек при 60°C, 20 сек при 72°C. В конце для построения кривой плавления 5 сек от 65°C до 95°C.

Белок-мишень	Ген	Последовательность праймеров	Эффективность
CaN	CALN	5'-gca-cac-ata-gat-ggt-cgg-c-3' 5'-cag-gtg-cat-gct-ttg-atc-gc-3'	91%
IL6R	IL6R	5'- tca-cag-agc-aga-gaa-tgg-act -3' 5'- gta-tgg-ctg-ata-cca-caa-ggt -3'	84%
MAFbx/ Atrogin-1	FBXO32	5'-cta-cga-tgt-tgc-agc-caa-ga-3' 5'-ggc-agt-cga-gaa-gtc-cag-tc-3'	91%
MuRF-1	TRIM63	5'-gcc-aat-ttg-gtg-ctt-ttt-gt-3' 5'-aaa-ttc-agt-cct-ctc-ccc-gt-3'	80%
Pannexin1	Panx1	5'-cga-tcg-tgg-agc-agt-act-tga-aga-3' 5'-agg-aga-ggc-tga-agt-agt-agct-3'	82%
P2RY1	P2Y1	5'-agt-tca-agc-aga-acg-gag-aca-3' 5'-ctc-agt-ggt-cac-atc-acg-gtt-3'	83%
P2RY2	P2Y2	5'-ctg-cca-ggc-acc-cgt-gct-cta-ctt-3' 5'-ctg-agg-tca-agt-gat-cgg-aag-gag-3'	89%
ribosomal protein L19	RPL19	5'-gta-ccc-ttc-ctc-ttc-cct-atg-c-3' 5'-caa-tgc-caa-ctc-tcg-tca-aca-g-3'	96%
Убиквитин	UBB	5'-cac-caa-gaa-ggt-caa-aca-gga-3' 5'-gca-aga-act-tta-ttc-aaa-gtg-caa-3'	100%

Таблица 2. Используемые в работе праймеры.

Все праймеры были подобраны с помощью программы UGENE (http://ugene.unipro.ru, Россия) и были синтезированы фирмой «Синтол» (Россия).

Специфичность амплификации была подтверждена анализом кривой плавления в программном обеспечении CFX Manager, который используется для анализа данных ПЦР реального времени, полученных от системы CFX96 Touch. Относительное количественное определение проводили на основе порогового цикла (CT) для каждого образца ПЦР (Pfaffl, 2001). Ген домашнего хозяйства RPL19 был выбран для нормализации всех экспериментов по количественному ПЦР-анализу в данном исследовании. Для анализа полученных с помощью ПЦР в реальном времени данных применялось относительное количественное определение исследуемого гена, нормализованное к референсному, метод 2- $\Delta\Delta$ Ct (метод Ливака).

#### 2.7 Статистический анализ данных.

Статистическая обработка данных производилась с помощью программы REST 2009 v.2.0.12 и OpenOffice.org Calc, находящихся в свободном доступе. Для проверки нормальности распределения выборки использовался тест Шапиро-Уилка. Значимость отличий между группами определялась с помощью критерия Краскела-Уоллиса. В тексте и на гистограммах результаты анализа экспрессии представлены в виде медианы и интерквартильного размаха, результаты анализа относительного содержания белков с помощью вестерн-блоттинга и содержания АТФ представлены в виде среднего значения и ошибки среднего. Статистически значимыми различия считали при уровне достоверности p<0,05.

## 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

## 3.1 Содержание АТФ в камбаловидной мышце на начальных этапах функциональной разгрузки

На первом этапе работы мы проверяли гипотезу о накоплении АТФ в мышцах на коротких сроках разгрузки. Мы обнаружили повышение содержания АТФ на 32% на третьи сутки функциональной разгрузки *m.soleus* относительно группы контроля, тогда как после суток вывешивания содержание АТФ не изменилось (Рисунок 5). Мы впервые показали, что на коротких сроках разгрузки (3 суток) происходит накопление АТФ в *m.soleus*.



Рисунок 5 – Содержание АТФ в *m.soleus* на фоне суточного и трехсуточного вывешивания.

С – контроль; 1HS – вывешивание 24 часа; 3HS – вывешивание 3 суток. \* – значимое отличие от контроля (p<0,05)

В нашем эксперименте мы измеряли содержание АТФ в *m.soleus* после 1 и 3 суток разгрузки. В этот период в мышце обычно регистрируют практически полное отсутствие электрической и механической активности (Kawano *et al.*, 2004; De-Doncker *et al.*, 2005). Можно предположить, что в этих условиях при отсутствии сократительной активности и отсутствии существенных препятствий в работе митохондрий, должно наблюдаться увеличение содержания АТФ, что мы и зарегистрировали в нашей работе.

Позднее в нашей лаборатории методом ВЭЖХ было показано накопление АТФ в 1-е сутки функциональной разгрузки (Lvova *et al.*, 2023). Кроме того, повышение содержания АТФ в *m.soleus* после 1-3 суток разгрузки сопровождается снижением уровня фосфорилирования АМРК, которое предотвращается при изменении уровня макроэргических фосфатов с помощью  $\beta$ -гуанидинпропионовой кислоты (Mirzoev *et al.*, 2016; Vilchinskaya *et al.*, 2017; Kravtsova *et al.*, 2019).

## 3.2 Роль PANX1 каналов в регуляции сигналинга в камбаловидной мышце при гравитационной разгрузке

Мы исследовали возможные механизмы АТФ-зависимой регуляции путей анаболического и катаболического сигналинга скелетных мышц при их функциональной разгрузке. И, в частности, влияет ли трафик АТФ через паннексиновые каналы на регуляцию этого сигналинга.

## 3.2.1 Влияние пробенецида на вес разгруженной мышцы, содержание АТФ и экспрессию PANX1

Через 3 дня вывешивания вес *m.soleus* был существенно снижен в обеих вывешенных группах (Таблица 3, p<0,05).

Таблица 3. Вес *m.soleus* при введении пробенецида на фоне 3-х суточного вывешивания.

Группа животных	Bec m.soleus
С	$90,6\pm3,0$ mg
HS	73,7 ± 1,7 * мг
Р	73,6 ± 2,9 * мг

В то же время мы обнаружили повышенное содержание АТФ в *m.soleus* к третьему дню вывешивания групп HS и P (на 32 и 52% соответственно) относительно группы контроля (p<0,05) (Рисунок 6А).





С – контроль; HS – вывешивание 3 суток; Р – вывешивание 3 суток + пробенецид;

\* – значимое отличие от контроля (p < 0,05); # – значимое отличие от группы HS

## (p<0,05)

Известно, что в мышечных волокнах АТФ выходит из клетки через паннексиновые каналы во внеклеточное пространство (MacVicar, Thompson, 2010; Penuela *et al.*, 2013; Dahl, 2015), а при разгрузке накапливается вследствие неиспользования. Блокирование паннексиновых каналов приводит к подавлению выхода АТФ и при 3-дневной разгрузке в нашем эксперименте привело к 20-процентному повышению содержания АТФ в *m.soleus* (Рисунок 6А).

Мы обнаружили повышенную экспрессию мРНК *Panx1* только в группах вывешивания с ингибированием каналов после 3 суток (гр. Р, p<0,05) на 44% по сравнению с группой интактного контроля (Рисунок 6Б).

Мы полагаем, что повышенная экспрессия *Panx1* в *m.soleus* группы Р могла быть компенсаторной реакцией в ответ на угнетение функции каналов. В группе вывешивания без ингибирования паннексиновых каналов уровень экспрессии паннексина был таким же, как в группе контроля, что указывает на специфичность работы данного ингибитора. Сверхэкспрессия *Panx1* в клеточной линии миобласта L6 крысы приводила к повышению уровня внеклеточного АТФ в покое и после электрической стимуляции (Arias-Calderón *et al.*, 2016). Когда пробенецид

использовали для блокирования Panx1, подавлялось высвобождение ATФ (Silverman *et al.*, 2008)

## 3.2.2 Влияние пробенецида на содержание катаболических сигнальных маркёров и их регуляцию

Ингибирование паннексиновых каналов не влияло на изменение веса *m.soleus* при вывешивании крыс, так как масса мышц в них снижалась так же, как при вывешивании с введением плацебо. Однако мы впервые обнаружили более низкую экспрессию E3 лигаз MAFbx (которая участвует в убиквитинировании некоторых цитоскелетных белков) и MuRF1 (которая участвует в убиквитинировании сократительных белков миозинов) в ответ на ингибирование паннексиновых каналов и накопление АТФ в волокне при функциональной разгрузке *m.soleus* крыс. В группе HS экспрессия MAFbx и MuRF1 была существенно повышена относительно группы контроля на 65 и 59% соответственно (p<0,05). Экспрессия MuRF1 в группе Р снижена на 37% (p<0,05) относительно группы, вывешенной без препарата HS (Рисунок 7А). Экспрессия MAFbx также была существенно снижена в группе Р относительно группы HS (на 38%, p<0,05, Рисунок 7Б).





С – контроль; HS – вывешивание 3 суток; Р – вывешивание 3 суток + пробенецид;

\* – значимое отличие от контроля (p < 0.05);# – значимое отличие от группы HS

(p < 0.05)

Мы предполагаем, что увеличение экспрессии мРНК ЕЗ-лигаз может быть связано с активацией пуринергических рецепторов экзогенными агонистами, которые могут вызывать выход кальция, зависящий от активации сигнального пути IP3 (May *et al.*, 2006). Мы впервые обнаружили свидетельства изменения регуляции экспрессии генов при ингибировании паннексиновых каналов, осуществляющих транспорт макроэргических фосфатов во внеклеточное пространство во время 3-дневной разгрузки *m.soleus*.

Известно несколько транскрипционных факторов, регулирующих экспрессию MuRF1 и MAFbx при функциональной разгрузке мышц. Эти факторы запускаются разными сигнальными путями. Мы протестировали миогенин и FOXO3 (Рисунок 8).

Миогенин может участвовать в увеличении экспрессии E3-лигаз MuRF-1 и MAFbx/atrogin-1 при денервации мышц (Moresi *et al.*, 2010; Bricceno *et al.*, 2012; Furlow *et al.*, 2013) и прямо взаимодействовать с их промоторами. Миогенин – мышечно-специфический транскрипционный фактор, повышение его экспрессии наблюдалось ранее при длительной иммобилизации конечности (Yoshihara *et al.*, 2016).

Мы обнаружили повышение содержания миогенина при трехсуточном вывешивании на 44% относительно группы контроля. В группе Р содержание миогенина значимо не отличалось от группы контроля и было ниже, чем в группе вывешивания без препарата (p<0,05, Pисунок 8A). Более низкая экспрессия E3-лигаз в группе Р, вероятно, была связана с пониженным содержанием у них транскрипционного фактора миогенина, т.к. именно в этих группах его уровень совпадает с контрольным и снижен относительно группы вывешивания с введением плацебо.





### (p<0,05)

Экспрессия ЕЗ-лигаз может также регулироваться FOXO3 (Furlow et al., 2013). FOXO3 Имеются сообщения, транскрипционный фактор что может взаимодействовать как с промотором MAFbx (Sandri et al., 2004; Clavel et al., 2010; Bodine, Baehr, 2014), так и с промотором MuRF-1 (Bodine, Baehr, 2014) и активировать их экспрессию. Известно, что фосфорилирование FOXO3 мешает его проникновению ядро и активированию экспрессии ЕЗ-лигаз. В нашем случае снижение В фосфорилирования FOXO3 не приводит к увеличению экспрессии MuRF1 и MAFbx в группе Р относительно групп интактного контроля и вывешивания (Рисунок 7). Результаты экспрессии ЕЗ-лигаз в этих группах противоположны изменениям в них фосфорилирования FOXO3. В отличие OT миогенина, содержание фосфорилированной формы транскрипционного фактора FOXO3 было существенно более низким в группах HS и P относительно группы контроля (на 58 и 68% соответственно) (p<0,05, Рисунок 8Б). Можно заключить, что в нашем эксперименте в регуляции экспрессии MuRF1 и MAFbx в группе с ингибированием паннексиновых каналов принимал участие транскрипционный фактор миогенин, но не FOXO3.

Аналогично p-FOXO3, содержание p-AKT в нашем эксперименте во всех вывешенных группах крыс было также значимо снижено относительно групп контроля (на 49 в группе HS и 48% в группе P, Рисунок 8В). АКТ фосфорилирует

48

FOXO3 по сайтам Thr32, Ser253 и Ser315, что приводит к его накоплению в цитоплазме и препятствует проникновению в ядро (Lin, Liu, 2019). Динамика его содержания в цитоплазме соответствует динамике содержания фосфорилированных форм FOXO3 в *m.soleus* вывешенных групп крыс.

## 3.2.3 Влияние пробенецида на содержание анаболических сигнальных маркеров и сигнальные каскады, регулирующие мышечный гомеостаз

eEF2 является ключевым компонентом аппарата трансляции белков. Гиперфосфорилирование eEF2 препятствует его связыванию с рибосомой, тем самым снижая скорость элонгации. eEF2K может фосфорилировать eEF2, предотвращая его транслокацию в ядро и блокируя элонгацию и белковый синтез (Bodine, 2013). Активность eEF2K регулируется с помощью фосфорилирования киназами p70S6K и p90RSK (Bodine, 2013) и кальций-кальмодулин-зависимыми процессами (Rose et al., 2009). Ранее было обнаружено увеличение содержания p-eEF2 после вывешивания крыс (Shenkman et al., 2015; Lomonosova et al., 2017, Tyganov et al., 2019). В то время как в настоящем эксперименте к третьим суткам вывешивания в группе с введением пробенецида (P) повышения p-eEF2 не наблюдалось, что свидетельствует о снятии препятствий для процесса элонгации в *m.soleus* этой группы крыс. На третьи сутки вывешивания в группе с введением пробенецида уровень фосфорилирования eEF2 был существенно ниже, чем в группе HS, и не отличался от группы контроля (Рисунок 9).



Рисунок 9 – Уровень фосфорилирования eEF2 в *m.soleus* при введении пробенецида на фоне 3-х суточного вывешивания.

С – контроль; HS – вывешивание 3 суток; Р – вывешивание 3 суток + пробенецид; \* – значимое отличие от контроля (p<0,05); # – значимое отличие от группы HS (p<0.05)

Мы исследовали также содержание в *m.soleus* GSK-3β. GSK-3β выполняет множество функций в клетке. Ингибирование гликоген синтазы с помощью GSK-3β приводит к снижению синтеза гликогена в мышце и развитию патологических состояний. Однако известно, что GSK-3β взаимодействует более чем со 100 белками, многие из которых он фосфорилирует, что затем приводит к их убиквитинированию (Robertson et al., 2017). Активация GSK-3β катализирует фосфорилирование десмина, что приводит к его деполимеризации, а затем потере миофибрилл и атрофии мышцы (Aweida et al., 2018; Cohen, 2020). GSK-3β является мишенью для протеинкиназы В (AKT). которая может ингибировать активность GSK-3β посредством фосфорилирования Ser9 (Jefferson et al., 1999; Leger et al., 2006). Фосфорилирование Ser9 в GSK-3β значительно снижает доступность активного сайта. Обнаружено фосфорилированной повышенное содержание формы GSK-3β b группе с ингибированием паннексиновых каналов (P) относительно группы интактного

контроля и группы вывешивания (на 188%, p<0,05, Рисунок 10). В группе вывешивания HS соотношение p-GSK-3 $\beta$ /GSK-3 $\beta$  не отличалось от группы контроля. Содержание p-AKT в группе P было низкое, и не отличалось от группы вывешивания без препарата (Рисунок 7В), что может свидетельствовать о том, что в нашем случае имеется другой источник фосфорилирования GSK-3 $\beta$  помимо AKT. Уровень фосфорилирования GSK-3 $\beta$  может также зависеть от цГМФ-зависимых киназ (Fang *et al.*, 2000), а также протеинкиназы A, PKC, киназы cdc2, Rho-киназы и CaMK II. Интересно отметить, что в группе, где GSK-3 $\beta$  гиперфосфорилирован, экспрессия E3-лигаз ниже, чем в группах вывешивания без ингибирования паннексиновых каналов, что подтверждает ранее полученые данные (Verhees *et al.*, 2011)



Рисунок 10 – Уровень фосфорилирования GSK3β в *m.soleus* при введении пробенецида на фоне 3-х суточного вывешивания.

С – контроль; HS – вывешивание 3 суток; Р – вывешивание 3 суток + пробенецид; \* – значимое отличие от контроля (p<0,05); # – значимое отличие от группы HS (p<0,05)

Известно, что GSK-3β мешает активации TSC2/mTOR сигнального пути (Gu *et al.*, 2019). В группе Р, с высоким уровнем фосфорилирования GSK-3β, мы обнаружили повышенное содержание p-p70S6k относительно группы контроля и HS (на 53 и 52% соответственно, p<0,05, Рисунок 11). Рибосомный белок S6 киназа p70 (p70S6k) – анаболический маркёр, который управляется сигнальным путём mTORC1. Фосфорилирование S6 индуцирует белковый синтез на рибосоме.





С – контроль; HS – вывешивание 3 суток; Р – вывешивание 3 суток + пробенецид;

\* – значимое отличие от контроля (p < 0,05); # – значимое отличие от группы HS

## (p<0,05)

В некоторых работах отмечено увеличение фосфорилирования p70S6k в 1-й день вывешивания крыс (Mirzoev et al., 2016; Uchida et al., 2018; Tyganov et al., 2019), на 3-й день вывешивания этот маркёр обычно не отличается от контроля (Shenkman et al., 2015), а на более поздних сроках вывешивания он обычно снижен (Bajotto et al., 2011; Dupont et al., 2011). Ранее You et al., 2015 продемонстрировали, что 3-дневная иммобилизация задних конечностей снижает общую скорость синтеза белка в mTOR-зависимую m.soleus. но активирует сигнализацию увеличивает И фосфорилирование p70S6k(Thr389). Высокое содержание p-p70S6k в группе Р работой свидетельствует 0 взаимосвязи между паннексиновых каналов, осуществляющих транспорт макроэргических фосфатов из волокна во внеклеточное активацией маркёров белкового пространство, синтеза. Повышенное И фосфорилирование p-p70S6k(Thr389) в группе Р могло быть связано С фосфорилированием и ингибированием у них работы GSK-3β.

Мы исследовали митоген-активируемую протеинкиназу ERK1/2 и серин/треонин S6-киназу массой 90 кДа (p90RSK), которая регулирует синтез белка посредством модуляции пути mTORC1. ERK1/2 непосредственно фосфорилирует и

активирует p90RSK, которая, в свою очередь, активирует различные события передачи сигналов посредством выбора различных субстратов фосфорилирования. В частности, p90RSK может регулировать работу GSK3 $\beta$  (Fang *et al.*, 2000). Обнаружено существенное снижение фосфорилирования ERK1/2 и p90RSK в вывешенной без введения препарата группе Н относительно группы контроля на 62 и 27% соответственно (p<0,05, Рисунок 12). Введение пробенецида существенно замедлило снижение фосфорилирования ERK1/2 и предотвратило снижение фосфорилирования p90RSK (Рисунок 12).



Рисунок 12 – Уровень фосфорилирования ERK1/2 и p90RSK в *m.soleus* при введении пробенецида на фоне 3-х суточного вывешивания.

С – контроль; HS – вывешивание 3 суток; Р – вывешивание 3 суток + пробенецид; \* – значимое отличие от контроля (p<0,05); # – значимое отличие от группы HS (p<0,05)

Ранее в нашей лаборатории уже наблюдали снижение p-p90RSK после 3дневного вывешивания крыс (Shenkman *et al.*, 2015). Можно заключить, что фосфорилирование маркёров MAP-киназного ERK1/2 и p90RSK сигнального пути связано с содержанием макроэргических фосфатов в волокне, а предотвращение их трансфера из волокна активирует анаболические сигнальные пути при функциональной разгрузке мышц.

АМРК является центральным регулятором энергетического гомеостаза. Уровень её фосфорилирования может изменяться с продолжительностью функциональной разгрузки (Vilchinskaya *et al.*, 2017; Stouth *et al.*, 2018; Tyganov *et al.*, 2019). Снижение фосфорилирования АМРК часто наблюдается в первые сутки вывешивания (ещё до снижения мышечной массы), к 3-му дню вывешивания фосфорилирование АМРК существенно не отличается от того, который обнаруживается у животных группы интактного контроля. Мы обнаружили высокое содержание фосфорилированной АМРК в группе Р, которое значимо отличалось на 191% от группы контроля и на 206% от группы вывешивания без препарата (p<0,05, Рисунок 13).



Рисунок 13 – Уровень фосфорилирования АМРК в *m.soleus* крыс при введении пробенецида на фоне 3-х суточного вывешивания. С – контроль; HS – вывешивание 3 суток; Р – вывешивание 3 суток + пробенецид;

\* – значимое отличие от контроля (p<0,05); # – значимое отличие от группы HS (p<0,05)

## 3.3 Роль Р2Ү рецепторов в регуляции сигналинга в камбаловидной мышце при гравитационной разгрузке

Целью третьего этапа работы являлась проверка гипотезы об участии пуринергических рецепторов (P2Y) в регуляции уровня IP3R при функциональной разгрузке мышц, а также экспрессии E3-лигаз и запуске специфических транскрипционных сигнальных программ мышц.

3.3.1 Влияние введения ингибиторов Р2Ү рецепторов на вес разгруженной *m.soleus*, экспрессию мРНК Р2Ү рецепторов и энергетический гомеостаз

За время эксперимента изменения веса крыс ни в одной из групп не наблюдалось. В группах HS и M масса *m.soleus* была снижена по отношению к группе контроля на 10 и 9 мг соответственно (p<0,05, Рисунок 14), в то время, как между группой A и контролем статистически значимых различий не наблюдалось. Мы обнаружили предотвращение атрофии *m.soleus* при 3-дневном введении ингибитора пуринэргических рецепторов P2Y2 (гр. A) во время вывешивания крыс относительно группы интактного контроля.



Рисунок 14 – Масса *m.soleus* крыс после 3-дневного вывешивания. С – контроль, HS – 3-х суточное вывешивание с введением плацебо, М – 3-х суточное вывешивание с введением MRS2179, А – 3-х суточное вывешивание с введением AR-C 118925XX, \* – значимые отличия от группы C (p<0,05)

Недавно Chen *et al.*, 2021 обнаружили меньшую атрофию мышцы у мышей с отсутствием гена P2Y2 при денервации в течении 2, 4 и 6 недель. Было показано, что P2Y2 усиливают атрофию скелетных мышц и активацию фибробластов после мышечного повреждения.

Мы обнаружили пониженную на 17% и 36% экспрессию мРНК Р2Y1 (гр. М) и Р2Y2 (гр. А) при применении их специфических ингибиторов у вывешенных с препаратом животных (р <0,05) относительно контрольной группы (Рисунок 15).

Результат свидетельствует о специфическом действии ингибиторов на белок-мишень и снижении его экспрессии в мышце.





С – контроль, HS – 3-х суточное вывешивание с введением плацебо, М – 3-х суточное вывешивание с введением MRS2179, А – 3-х суточное вывешивание с

введением AR-C 118925XX; \* – значимые отличия от группы С (p<0,05);

# – значимые отличия от группы HS (p<0,05)

Показано, что паннексиновые каналы пропускают АТФ из цитоплазмы во внеклеточное пространство (Dahl, 2015). Так как оба рецептора взаимодействуют с нуклеотидами и АТФ в частности, мы определили его содержание в *m.soleus* всех экспериментальных групп. Уровень АТФ был существенно повышен только в группе вывешенных животных без введения препарата (HS) на 62 % по сравнению с группой контроля (р <0,05, Рисунок 16А), похожие результаты мы наблюдали в предыдущем эксперименте с ингибированием Panx1. В группах с ингибированием P2Y рецепторов такого увеличения не наблюдалось. В группе М (с ингибированием P2Y1 рецепторов) уровень АТФ был значимо ниже на 95% по сравнению с группой вывешивания без препарата (HS, p<0,05), а в группе А (с ингибированием P2Y2 рецепторов) не отличался от группы контроля (Рисунок 16А).

АМРК является ключевым регулятором энергетического гомеостаза и уровень его фосфорилирования может меняться в зависимости от продолжительности

мышечной разгрузки (Vilchinskaya *et al.*, 2017; Tyganov *et al.*, 2019; Stouth *et al.*, 2018). В нашем исследовании содержание p-AMPK в группах HS и M было существенно ниже группы контроля (Рисунок 16Б). Однако в группе с ингибированием P2Y2 рецепторов (группа A) её уровень в *m.soleus* не отличался от группы контроля (p<0,05) (Рисунок 16Б). Фосфорилирование AMPK может регулироваться несколькими механизмами, включая метилирование (Stouth *et al.*, 2020). Активация AMPK регулируется также кальцием (Mathew *et al.*, 2014).



Рисунок 16 – Содержание АТФ и уровень фосфорилирования АМРК в *m.soleus* крыс после 3-дневного вывешивания. С – контроль, HS – 3-х суточное вывешивание с введением плацебо, М – 3-х суточное вывешивание с введением MRS2179, А – 3-х суточное вывешивание с введением AR-C 118925XX. \* – значимые отличия от группы C (p<0,05); # – значимые отличия от группы HS (p<0,05)

## 3.3.2 Влияние введения ингибиторов Р2Ү рецепторов на катаболические процессы и содержание IP3-рецепторов в разгруженной *m.soleus*

Ранее в работе Liu *et al.*, 2018 было отмечено, что сопряжение AT $\Phi$  с сигнальным путем P2Y2R/PLC/IP3 вызывает высвобождение Ca<sup>2+</sup> из эндоплазматического ретикулума. Известно, что P2Y2 пуринергические рецепторы активируют высвобождение IP3, которые затем связываются с IP3R (May *et al.*, 2006; Casas *et al.*, 2014). Мы измерили содержание IP3R в *m.soleus* и обнаружили самое высокое их содержание в группе вывешенных без препарата крыс (HS) (на 34% больше относительно группы контроля, p<0,05, Рисунок 17А). Уровень IP3R у

вывешенных с введением ингибитора животных (группы М и А) не отличался от группы контроля, и был существенно ниже (на 36 и 56% соответственно), чем в группе HS (р <0,05, Рисунок 17А).

Изменение активности IP3R способно вызвать слабый сигнал высвобождения кальция как в цитозоле, так и в нуклеоплазме (Taylor *et al.*, 2010; Georgiev *et al.*, 2015). Уровень CaN повышается при увеличении концентрации кальция в мышцах. Экспрессия CaN в группах M и A была ниже по сравнению с группой HS, вывешенной без препарата (p<0,05), но выше, чем в группе контроля (Рисунок 17Б).



Рисунок 17 – Содержание IP3R и экспрессия мРНК CaN в *m.soleus* крыс после 3дневного вывешивания. С – контроль, HS – 3-х суточное вывешивание с введением плацебо, М – 3-х суточное вывешивание с введением MRS2179, А – 3-х суточное вывешивание с введением AR-C 118925XX. \* – значимые отличия от группы С

(p<0,05); # – значимые отличия от группы HS (p<0,05)

СаМКІІ может регулировать фосфорилирование большого количества различных белков, включая АМРК (Nakanishi *et al.*, 2017). В группах с введением ингибиторов рецепторов P2Y1 и P2Y2 содержание фосфорилированной СаМКІІ было ниже, чем в вывешенной группе с введением плацебо, и было сопоставимо с содержанием р-СаМКІІ в контроле (Рисунок 18). СаМКІІ представляет собой кальций-зависимую киназу (Park *et al.*, 2011). Таким образом, можно предположить, что введение ингибиторов влияет на уровень кальция и приводит к снижению фосфорилирования СаМКІІ во время разгрузки скелетных мышц.



Рисунок 18 – Уровень фосфорилирования CaMKII в m.soleus крыс после 3-дневного вывешивания. С – контроль, HS – 3-х суточное вывешивание с введением плацебо,

М – 3-х суточное вывешивание с введением MRS2179, А – 3-х суточное вывешивание с введением AR-C 118925XX. \* – значимые отличия от группы C (p<0,05); # – значимые отличия от группы HS (p<0,05)</p>

IP3R-зависимые медленные сигналы Ca<sup>2+</sup> могут участвовать в активации специфических транскрипционных программ мышечных волокон (Takeda *et al.*, 2018; Casas *et al.*, 2014). Мы определили уровень экспрессии мPHK E3-убиквитин лигаз MuRF1 и MAFbx. Экспрессия MuRF1 у всех вывешенных животных была выше по сравнению с группой контроля (p<0,05, Рисунок 19А). Однако, в группе M (введение ингибитора P2Y1 рецепторов) экспрессия мPHK MuRF1 повышалась в существенно меньшей степени (на 47% относительно контроля), чем в вывешенной без ингибитора группе HS (на 82% относительно контроля, p<0,05, Рисунок 19А).



Рисунок 19 – Экспрессия мРНК MuRF1 (A) и MAFbx/Atrogin (Б) в *m.soleus* крыс после 3-дневного вывешивания. С – контроль, HS – 3-х суточное вывешивание с введением плацебо, М – 3-х суточное вывешивание с введением MRS2179, A – 3-х суточное вывешивание с введением AR-C 118925XX. \* – значимые отличия от

группы C (p<0,05); # – значимые отличия от группы HS (p<0,05)

Экспрессия мРНК MAFbx также была высокой во всех вывешенных группах относительно уровня группы контроля (p<0,05), но в группе A (введение ингибитора P2Y2 рецепторов) экспрессия его мРНК была существенно ниже, чем в группе HS без препарата (на 151% выше контроля, p<0,05, Рисунок 19Б). Обе E3-лигазы участвуют в убиквитинировании белков, что ведёт к атрофии мышц.

Увеличение экспрессии мРНК убиквитина частично было предотвращено только в группе, вывешенной с ингибированием P2Y2 рецепторов относительно группы контроля (выше на 48%, p<0,05; Рисунок 20), т.е. в той группе, где не было атрофии *m.soleus*. В остальных вывешенных группах его уровень был существенно выше, чем в группе контроля (HS — на 114%, М — на 141%). Убиквитинирование белков является меткой для их дальнейшей деградации.



Рисунок 20 – Экспрессия мРНК убиквитина в *m.soleus* крыс после 3-дневного вывешивания. С – контроль, HS – 3-х суточное вывешивание с введением плацебо,

M – 3-х суточное вывешивание с введением MRS2179, A – 3-х суточное вывешивание с введением AR-C 118925XX. \* – значимые отличия от группы C

(p<0,05); # – значимые отличия от группы HS (p<0,05)

Одним из транскрипционных факторов, контролирующих экспрессию мРНК E3-убиквитин лигаз является FOXO3. Мы измерили уровень фосфорилирования FOXO3 (Рисунок 21А) и АКТ (Рисунок 21Б) и обнаружили, что он одинаково снижен во всех вывешенных группах относительно контроля (p<0,05). Можно заключить, что экспрессия E3-лигаз в вывешенных с ингибированием пуринергических рецепторов группах контролируется иными транскрипционными факторами.



Рисунок 21 – Уровень фосфорилирования FOXO3 (А), АКТ (Б) в *m.soleus* крыс после 3-дневного вывешивания. С – контроль, HS – 3-х суточное вывешивание с

введением плацебо, М – 3-х суточное вывешивание с введением MRS2179, А – 3-х суточное вывешивание с введением AR-C 118925XX. \* – значимые отличия от группы C (p<0,05)

Известно, что содержание IL-6, миокина, увеличивается при функциональной разгрузке мышц, что ассоциируется с экспрессией атрогенов (MuRF1 и MAFbx) и атрофией (Yakabe *et al.*, 2018). Блокирование рецепторов IL-6 предотвращает развитие атрофии, а введение IL-6 в мышцу, напротив, ведёт к её атрофии (Sun *et al.*, 2021). Мы обнаружили увеличение экспрессии IL-6R во всех *m.soleus* вывешенных животных (гр. HS, M, A) относительно группы контроля на 199, 138 и 48% соответственно (Рисунок 22). Интересно отметить, что в группе A (где масса *m.soleus* не отличалась от группы контроля) экспрессия рецепторов IL-6 была значительно ниже, чем в группе вывешивания без препарата HS (p<0,05).

Мы также измерили уровень фосфорилирования миогенина, который может регулировать экспрессию ЕЗ-лигаз, но не обнаружили изменений среди вывешенных групп (153±14%, 166±13% и 123±6% относительно контроля в группах HS, М и А соответсвенно).



Рисунок 22 – Экспрессия мРНК IL6R в *m.soleus* крыс после 3-дневного вывешивания. С – контроль; HS – 3-х суточное вывешивание с введением плацебо; M – 3-х суточное вывешивание с введением MRS2179; A – 3-х суточное вывешивание с введением AR-C 118925XX. \* – значимые отличия от группы С (p<0,05); # – значимые отличия от группы HS (p<0,05)

## 3.3.3 Влияние ингибирования Р2Ү рецепторов на маркёры МАРК сигнальных путей

MAPK способны активироваться внеклеточными сигналами, которые распознаются соответствующими рецепторами, в том числе ассоциированными с Gбелками. В данном случае мы ингибировали пуринэргические рецепторы Р2Ү1 и Р2Ү2. МАРК фосфорилируют белки-мишени по остаткам серина и треонина и таким образом передают сигнал дальше. Мы исследовали сигнальные пути ERK1/2 и р38МАРК и определили содержание их фосфорилированных форм в *m.soleus*. Было обнаружено увеличение фосфорилирования митоген-активируемой протеин киназы после 3-х p38 (p38MAPK) в *m.soleus* крысы дней Это вывешивания. экспрессии фосфорилирование сопровождалось активацией MuRF-1. При ингибировании рецепторов P2Y1 и P2Y2 мы не обнаружили повышения уровня фосфорилированной р38МАРК в группе крыс, вывешенной с ингибированием Р2Ү1 рецепторов (М), в то время как в остальных вывешенных группах (HS и A) фосфорилирование рЗ8МАРК было выше на 90 и 58 % соответсвенно, чем в m.soleus группы контроля (p<0,05, Рисунок 23А). Интересно отметить, что в этой же группе М экспрессия MuRF1 была существенно ниже, чем в остальных вывешенных группах (HS и A). Ранее в нашей лаборатории проверяли гипотезу о возможности регулирования с помощью рЗ8МАРК экспрессии ЕЗ-лигаз и обнаружили, что её ингибирование при 3-дневном вывешивании крыс предотвращает развитие атрофии *m.soleus* и увеличение экспрессии MuRF1 (но не MAFbx) в мышце (Belova *et al.*, 2020).

ERK 1/2 регулирует синтез белка посредством модуляции пути mTORC1. Фосфорилирование Erk1/2 в *m.soleus* в нашем эксперименте было снижено в группе вывешенных крыс на 63% (HS) и вывешенных с введением ингибитора P2Y1 рецепторов на 55 % (M) относительно группы контроля (p<0,05, Рисунок 23Б). Мы впервые показали, что введение ингибитора P2Y2 рецептора полностью предотвращает индуцированное разгрузкой снижение фосфорилирования Erk1/2 в группе A: оно не отличалось от контроля и было на 34% выше, чем при вывешивании (гр. HS). Стоит также отметить, что в *m.soleus* группы A экспрессия мPHK MAFbx была также существенно снижена относительно других вывешенных групп. В предыдущем эксперименте с ингибированием паннексиновых каналов мы уже отмечали снижение фосфорилирования ERK 1/2 при 3-дневном вывешивании.

Мишенью ERK 1/2 является рибосомальная серин/треонин киназа p90RSK. В нашем эксперименте уровень фосфорилирования p90RSK был значительно снижен в вывешенной группе HS на 28% (p<0,05) относительно группы контроля (Рисунок 23В). Однако в обеих группах (М и А), вывешенных с ингибированием пуринергических рецепторов, уровень фосфорилирования p90RSK в *m.soleus* не отличался от группы контроля, что было отмечено впервые.



Рисунок 23 – Уровни фосфорилирования p38, ERK 1/2 и p90RSK в *m.soleus* крыс после 3-дневного вывешивания. С – контроль; HS – 3-х суточное вывешивание с введением плацебо; М – 3-х суточное вывешивание с введением MRS2179; А – 3-х суточное вывешивание с введением AR-C 118925XX. \* – значимые отличия от

группы C (p<0,05); # – значимые отличия от группы HS (p<0,05)

## 3.3.4 Влияние ингибирования рецепторов Р2Ү1 и Р2Ү2 на маркёры, участвующие в регуляции белкового синтеза и мышечного гомеостаза

GSK-3β является субстратом для фосфорилирования p90RSK, что может также (Fang активность et al., 2000). В регулировать ee нашем эксперименте фосфорилирование GSK3β (Рисунок 24) в разных группах аналогично тем результатам, что мы наблюдали для p90RSK (Рисунок 23В). В группе HS оно было существенно снижено на 25 % (p<0,05), тогда как в группах с введением ингибиторов Р2Ү1 и Р2Ү2 оно не отличалось от группы контроля (Рисунок 24). АКТ способна фосфорилировать GSK-3β по сайту Ser9. В то же время уровень фосфорилирования АКТ в группах М и А не отличался от группы вывешивания без препарата (Рисунок

21Б). Можно предположить, что p90RSK могла иметь отношение к фосфорилированию GSK-3β в ненагруженных мышцах крыс, которым вводили ингибиторы пуринергических рецепторов.



Рисунок 24 – Уровень фосфорилирования GSK3β в *m.soleus* крыс после 3-дневного вывешивания. С – контроль; HS – 3-х суточное вывешивание с введением плацебо;

М – 3-х суточное вывешивание с введением MRS2179; А – 3-х суточное вывешивание с введением AR-C 118925XX. \* – значимые отличия от группы С

(p<0,05); # – значимые отличия от группы HS (p<0,05)

Мы не обнаружили каких-либо различий в содержании белка mTORC1 между всеми вывешенными группами и контрольными животными, как и нижележащего маркёра этого сигнального пути 4E-BP1, фосфорилирование которого активирует трансляцию мРНК (Рисунок 25).

В нашем эксперименте мы наблюдали увеличение фосфорилирования p70S6K в группах HS и M, в то время как в группе A фосфорилирование p70S6K не отличается от контроля (Рисунок 26A). В работе Belova *et al.*, 2019 показано, что повышению фосфорилирования p70S6K способствует снижение фосфорилирования AMPK. В статье обсуждалось, что механизм действия AMPK на p70S6K может осуществляться через подавление mTORC1. Таким образом, мы можем предположить, что в группе A снижение фосфорилирования p70S6K относительно вывешивания связано с увеличением активности AMPK (Рисунок 16Б).


Рисунок 25 – Содержание mTORC1 (А) и уровень фосфорилирования 4E-BP1 (Б) в *m.soleus* крыс после 3-дневного вывешивания. С – контроль, HS – 3-х суточное вывешивание с введением плацебо, М – 3-х суточное вывешивание с введением

MRS2179, А – 3-х суточное вывешивание с введением AR-C 118925XX

Фосфорилирование eEF2 в *m.soleus* всех вывешенных групп было существенно выше на 154, 117 и 123 %, чем в группе контроля (p<0,05, Рисунок 26Б), что согласуется с данными литературы и результатами нашей предыдущей работы.



Рисунок 26 – Уровни фосфорилирования p70 и eEF2 в *m.soleus* крыс после 3дневного вывешивания. С – контроль; HS – 3-х суточное вывешивание с введением плацебо; М – 3-х суточное вывешивание с введением MRS2179; А – 3-х суточное вывешивание с введением AR-C 118925XX. \* – значимые отличия от группы С (p<0,05); # – значимые отличия от группы HS (p<0,05)

Оценивая интегральный показатель интенсивности синтеза белка с помощью введения пуромицина (метод SUnSET), мы обнаружили существенно более высокий уровень интенсивности синтеза белка в группах А и М с введением ингибиторов относительно группы вывешивания без препарата (p<0,05, Pucyhok 27). Это свидетельствует об активизации синтеза белка при блокировании пуринергических рецепторов.



Рисунок 27 – Интенсивность синтеза белка в *m.soleus* крыс после 3-дневного вывешивания. С – контроль; HS – 3-х суточное вывешивание с введением плацебо;

М – 3-х суточное вывешивание с введением MRS2179; А – 3-х суточное вывешивание с введением AR-C 118925XX. \* – значимые отличия от группы C (p<0,05); # – значимые отличия от группы HS (p<0,05)



Рисунок 28 – Влияние антагонистов Р2Ү1 и Р2Ү2 рецепторов на сигнальные пути в скелетной мышце.

### 3.4 Роль РІЗК в регуляции сигналинга в камбаловидной мышце при гравитационной разгрузке

Последний этап нашей работы был посвящен исследованию роли активности РІЗК в активации маркеров кальций-зависимых сигнальных путей, IP3R и экспрессии ЕЗ-лигаз при функциональной разгрузке *m.soleus*.

# 3.4.1 Влияние введения LY294002 на вес разгруженной m.soleus и энергетический гомеостаз

*M.soleus* крыс, вывешенных без введения препарата, подверглись существенной атрофии (по сравнению с группой контроля). Мы впервые обнаружили снижение скорости атрофии *m.soleus* в группе, вывешенной с введением ингибитора PI3K (p<0,05) по сравнению с группой, вывешенной без введения препарата (Рисунок 29).



Рисунок 29 – Изменение массы *m.soleus*. С – контроль, HS – 3-суточное вывешивание, LY – 3-суточное вывешивание с введением LY294002. \* – значимое отличие от контроля, # – значимое отличие от группы вывешивания, p≤0,05

Мы обнаружили тенденцию к повышению фосфорилирования PI3K в группе животных, вывешенных с введением плацебо (p=0.09). Введение ингибитора PI3K предотвратило это повышение (Рисунок 30). Результат свидетельствует о специфическом действии ингибитора на белок-мишень и снижении его фосфорилирования в мышце.



Рисунок 30 – Содержание PI3K в *m.soleus* при введении LY294002 на фоне 3-х суточного вывешивания. С – контроль, HS – 3-суточное вывешивание, LY – 3-суточное вывешивание с введением LY294002. *#* – значимое отличие от группы вывешивания, р≤0,05; Т – тенденция к повышению относительно контрольной группы, р=0,09

В отличии от группы, вывешенной без введения препарата (HS), ингибирование PI3K во время функциональной разгрузки *m.soleus* предотвратило накопление в ней ATФ (группа LY), и уровень АТФ в ней не отличался от группы интактного контроля (Рисунок 31А). На раннем этапе функциональной разгрузки (3-е суток) уровень макроэргических фосфатов в мышце повышается. В этот период обычно регистрируют практически полное отсутствие электрической и механической активности *m.soleus* (Kawano *et al.*, 2002). Логично, что в этих условиях наблюдается увеличение содержания АТФ. Можно предположить, что ингибирование активности PI3K могло отразиться на передаче сигнала от пуринергических рецепторов, активирующихся при контакте с АТФ и продуктами его распада, и повлиять на содержание АТФ в мышце.

Уровень фосфорилирования АМРК в *m.soleus* в группе LY также не отличался от группы контроля, в то время как в группе, вывешенной без препарата (HS), он был несколько снижен (Рисунок 31Б). Известно, что фосфорилирование АМРК снижено в присутствии АТФ, а уровень её фосфорилирования изменяется с

продолжительностью функциональной разгрузки (Tyganov *et al.*, 2019; Vilchinskaya *et al.*, 2017; Stouth *et al.*, 2018).



Рисунок 31 – Содержание АТФ и уровень фосфорилирования АМРК в *m.soleus* при введении LY294002 на фоне 3-х суточного вывешивания. С – контроль, HS – 3- суточное вывешивание, LY – 3-суточное вывешивание с введением LY294002. \* – значимое отличие от контроля, # – значимое отличие от группы вывешивания,

р≤0,05, T – тенденция к снижению, р=0,1

## 3.4.2 Влияние введения LY294002 на содержание IP3R и кальцийзависимый сигналинг

Содержание IP3R в группе LY также было существенно ниже, чем в группе, вывешенной без введения препарата (Рисунок 32). Имеется очевидная связь между ингибированием PI3K, уровнем её фосфорилирования и содержанием IP3R в *m.soleus*. IP3R — кальций-зависимые рецепторы, которые активируются при повышении концентрации ионов кальция в цитоплазме и пропускают их в ядро. В ядре кальций активирует транскрипционные факторы, запускающие экспрессию атрогенов (Takeda *et al.*, 2018; Casas *et al.*, 2014).



Рисунок 32 – Содержание рецепторов IP3 в *m.soleus* при введении LY294002 на фоне 3-х суточного вывешивания. С – контроль, HS – 3-суточное вывешивание, LY – 3-суточное вывешивание с введением LY294002. \* – значимое отличие от

### контроля, р≤0,05

Мы измерили содержание маркеров кальций-зависимой передачи сигналов (CaMKIIβ и CaN) (Park al., 2011). Активность CaMKII регулируется et внутриклеточной концентрацией кальция (Witczak et al., 2008; Raney, Turcotte, 2008), о повышении которого при разгрузке мышц сообщалось ранее (Shenkman, Nemirovskaya, 2008; Ingalls et al., 1999). СаМКІІ регулирует фосфорилирование многочисленных белков, включая АМРК (Nakanishi et al., 2017; Rose et al., 2006; Raney, Turcotte, 2008) и факторы транскрипции (Chin, 2004). Известо об аутофосфорилировании CaMK IIB по Thr 287, которое происходит в ответ на повышение содержания ионов кальция (Rostas, Skelding, 2023). Фосфорилирование СаМК IIβ было увеличено в ненагруженной *m.soleus* относительно группы контроля (Рисунок 33А), однако введение ингибитора РІЗК предотвратило эти изменения. Аналогичные результаты получены для CaN. Его экспрессия в *m.soleus* группы LY была существенно ниже, чем в группе, вывешенной без препарата (Рисунок 33Б). CaN представляет собой кальций- и кальмодулин-зависимую фосфатазу, активность которой повышается при увеличении концентрации кальция в мышцах (Sharlo et al., 2019; Mochalova et al., 2020). Результаты позволяют предположить, что

ингибирование PI3K оказывает влияние на экспрессию CaN, уровень фосфорилирования CaMK IIβ и регуляцию Ca-зависимых сигнальных путей при разгрузке.



Рисунок 33 – Уровень фосфорилирования CaMK IIβ и экспрессия кальцинейрина A в *m.soleus* при введении LY294002 на фоне 3-х суточного вывешивания.

С – контроль, HS – 3-суточное вывешивание, LY – 3-суточное вывешивание с введением LY294002. \* – значимое отличие от контроля, # – значимое отличие от группы вывешивания, р≤0,05

## 3.4.3 Влияние введения LY294002 на содержание катаболических сигнальных маркёров и их регуляцию

В группе HS уровень экспрессии мРНК E3-лигаз MuRF1 и MAFbx, а также убиквитина был существенно выше, чем в группе контроля (Рисунок 34А, Б). При введении ингибитора PI3K рост экспрессии мРНК MuRF1 был обнаружен только в группе HS (Рисунок 34А). Введение ингибитора существенно снизило экспрессию MAFbx и убиквитина в группе LY (относительно группы вывешивания без препарата) (Рисунок 34Б, В). Убиквитинирование белков является меткой для их дальнейшей деградации. E3-лигазы MuRF1 и MAFbx участвуют в убиквитинировании белков, что ведёт к атрофии мышц. Как и в предыдущих экспериментах, мы обнаружили снижение роста экспрессии маркёров убиквитин-протеасомной системы.

Анализ экспрессии транскрипционных факторов, способных регулировать экспрессию ЕЗ-лигаз, показал, что снижение их экспрессии при ингибировании PI3K

может быть связано со снижением экспрессии транскрипционного фактора TFEB (Рисунок 33Г).



Рисунок 34 – Экспрессия MuRF1, MAFbx, убиквитина и TFEB в *m.soleus* при введении LY294002 на фоне 3-х суточного вывешивания. С – контроль, HS – 3- суточное вывешивание, LY – 3-суточное вывешивание с введением LY294002. \* – значимое отличие от контроля, # – значимое отличие от группы вывешивания,

p≤0,05

3.4.4 Влияние LY294002 на содержание анаболических сигнальных маркеров

Ингибирование PI3K снижает уровень экспрессии маркеров сигнальных путей белковой деградации при 3-дневной разгрузке *m.soleus*. В группе с введением ингибитора LY294002 при вывешивании крыс содержание маркеров белкового синтеза IRS-1 (Рисунок 35А), 4E-BP (Рисунок 35Б), фосфорилирование рибосомного белка S6 (Рисунок 35В) не отличалось от уровня группы контроля, в то время как в группе HS эти параметры были существенно снижены.



Рисунок 35 – Содержание IRS-1 и уровни фосфорилирования 4EBP1, рибосомального белка S6, eEF2 в *m.soleus* при введении LY294002 на фоне 3-х суточного вывешивания. С – контроль, HS – 3-суточное вывешивание, LY – 3суточное вывешивание с введением LY294002. \* – значимое отличие от контроля, р≤0,05 Фосфорилирование S6 коррелирует с трансляцией мРНК рибосомных белков и факторов элонгации, необходимых для процесса трансляции (Meyuhas, 2015). Одновременно в группе LY было предотвращено снижение скорости элонгационных процессов. Уровень фосфорилирования eEF2 в группе LY не отличался от контроля, в то время как в группе, вывешенной без введения препарата, уровень p-eEF2 был высоким (Рисунок 35Г).

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Мы предположили, что АТФ может быть запускающим сигналом для Ca<sup>2+-</sup> зависимых сигнальных путей и атрофических процессов при разгрузке мышц. АТФ через Panx1 может выходить во внеклеточное пространство и взаимодействовать с Р2У рецепторами, которые в свою очередь активируют РІЗК в Т-каналах мембраны и, в конечном итоге, IP3R, находящиеся в ядре и саркоплазматическом ретикулуме, вызывая слабый сигнал высвобождения кальция, способствующего (возможно, с другими сигнальными каскадами) активации транскрипционных факторов и изменению экспрессии ключевых генов скелетной мышцы. Мы проанализировали содержание АТФ в *m.soleus* при функциональной разгрузке и проверили эту гипотезу, применив модель функциональной разгрузки мышц крыс (вывешивание по методу Ильина-Новикова) в экспериментах: 1. Ингибирование паннексиновых каналов, пропускающих АТФ из цитоплазмы во внеклеточное пространство; 2. Ингибирование Р2Ү1/2 пуринергических рецепторов, активируемых АТФ; 3. Ингибирование PI3K. Ранее показано, что IP3R-зависимые медленные сигналы Ca<sup>2+</sup> могут участвовать в активации специфических транскрипционных программ формирования фенотипа медленных и быстрых мышечных волокон (Takeda et al., 2018; Casas et al., 2014). Наши гипотезы подтвердились, и исследование Panx1-P2Y-IP3 пути позволило найти терапевтические мишени для профилактики мышечной атрофии.

Обнаружено, что АТФ-проницаемые паннексиновые каналы участвуют в регуляции мышечных атрофических процессов путем изменения экспрессии ЕЗлигаз, а также процессов трансляции и элонгации белков во время функциональной разгрузки. Ингибирование паннексиновых каналов в течение трех дней разгрузки скелетных мышц приводит к снижению активности катаболической сигнализации и поддержанию уровня фосфорилирования мышечных анаболических маркеров р70S6K и p90RSK, а также поддержанию элонгации белка на контрольном уровне. Впервые показано, что активация атрофических процессов при разгрузке *m.soleus* запускается в том числе с помощью передачи АТФ-опосредованных сигналов, и пуринергические рецепторы P2Y2 принимают участие в её регуляции. Блокирование рецепторов P2Y2 предотвращает развитие атрофии *m.soleus* при разгрузке как за счёт снижения протеолитических процессов, так и за счёт увеличения интенсивности синтеза белка через сигнальный каскад ERK/p90RSK. Ингибирование рецепторов P2Y1 препятствует повышению фосфорилирования p38 MAPK в *m.soleus* и замедляет в ней экспрессию мPHK MuRF1 Ингибирование фосфоинозитид-3-киназы при функциональной разгрузке предотвращает накопление ATФ; замедляет атрофию *m.soleus*, а также экспрессию E3 лигаз и убиквитина; регулирует активность кальций-зависимых сигнальных путей; влияет на регуляцию маркеров анаболической передачи сигналов в ненагруженных мышцах.

Таким образом, выход АТФ во внеклеточное пространство может являться пусковым сигналом для изменения экспрессии генов при функциональной разгрузке мышц. В передаче сигнала участвуют последовательно находящиеся в сарколемме Panx1 каналы, P2Y1/2 рецепторы и PI3K.

### выводы

- 1. Функциональная разгрузка *m.soleus* крыс приводит к накоплению АТФ в мышце на начальных этапах.
- Ингибирование паннексиновых каналов в течение трех дней разгрузки скелетных мышц приводит к снижению экспрессии мРНК ЕЗ убиквитинлигаз MAFbx и MuRF1, повышению уровня фосфорилирования GSK-3β и мышечных анаболических маркеров p70S6K и p90RSK, а также усиливает процессы трансляции и препятствует снижению элонгации при функциональной разгрузке мышц.
- 3. Блокирование и P2Y1, и P2Y2 пуринергических рецепторов при 3-дневной функциональной разгрузке *m.soleus* крыс предотвращает накопление АТФ, увеличение содержания IP3R, снижение интенсивности синтеза белка. уровня фосфорилирования GSK-3β и P90RSK. Предотвращение атрофии *m.soleus* наблюдается только при блокировании P2Y2 рецепторов и сопровождается замедлением экспрессии мPHK E3-лигазы MAFbx, убиквитина и IL6R, увеличением уровня фосфорилирования ERK1/2, AMPK и нормализацией уровня фосфорилирования p70S6K. Наблюдаемого при блокировании рецепторов P2Y1 снижения фосфорилирования p38 MAPK и экспрессии мPHK E3-лигазы MuRF1 оказывется недстаточно для предотвращения атрофии.
- 4. Ингибирование PI3K при функциональной разгрузке *m.soleus* замедляет атрофию, предотвращая накопление в ней АТФ и увеличение экспрессии E3 убиквитинлигаз MuRF1 и MAFbx, убиквитина и IP3-рецепторов; регулируя активность кальций-зависимых сигнальных путей (снижение экспрессии мPHK CaN и фосфорилирования CaMKII); сохраняя скорость элонгационных процессов (замедляя рост фосфорилирования eEF2) и фосфорилирование маркеров анаболической передачи сигналов 4E-BP, рибосомного белка S6.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Белова С.П., Тыганов С.А., Мочалова Е.П., Шенкман Б.С. Ограничение двигательной активности и синтез белка в постуральных и локомоторных мышцах // Рос. физиол.журн. им. Сеченова. 2021. Т. 107. С. 842–853.
- Мирзоев Т.М., Шенкман Б.С. Регуляция синтеза белка в инактивированной скелетной мышце: входные сигналы, протеинкиназные каскады и биогенез рибосом // Биохимия. 2018. Т. 83. вып. 11. С. 1606 – 1626.
- Немировская Т.Л. Шарло К.А. Регуляция кальциевого обмена в скелетных мышцах при их функциональной разгрузке // Авиакосмическая и экологическая медицина. 2022. Т. 56, № 1. С. 5-13. doi: 10.21687/0233-528X-2022-56-1-5-13
- 4. Оганов В.С., Скуратова С.А., Мурашко Л.М. Влияние кратковременных космических полётов на физиологические свойства и состав миофибриллярных белков скелетных мышц крыс // Космическая биология и авиакосмическая медицина. 1988. № 4.
- 5. Сорокин А.В., Ким Е.Р., Овчинников Л.П. Протеасомная система деградации и процессинга белков // Успехи биологической химии, 2009, 49, С. 3-76.
- Шенкман Б.С., Мирзоев Т.М., Козловская И.Б. Тоническая активность и гравитационный контроль постуральной мышцы // Авиакосмическая и экологическая медицина. 2020. Т. 54. № 6. С. 58 – 72.
- Abbracchio M.P., Burnstock G., Boeynaems J.M., Barnard E.A., Boyer J.L., Kennedy C., Knight G.E., Fumagalli M., Gachet C., Jacobson K.A., Weisman G.A. International Union of Pharmacology LVIII: update on the P2Y G protein-coupled nucleotide receptors: from molecular mechanisms and pathophysiology to therapy // Pharmacol. Rev. 2006. V. 58. № 3. P. 281-341. doi: 10.1124/pr.58.3.3
- Ahmed M.U., Bennett D.J., Hsieh T.C., Doonan B.B., Ahmed S., Wu J.M. Repositioning of drugs using open-access data portal DTome: A test case with probenecid // Int. J. Mol. Med. 2016. V. 37. P. 3–10. doi: 10.3892/ijmm.2015.2411
- 9. Allen D.L., Bandstra E.R., Harrison B.C., Thorng S., Stodieck L.S., Kostenuik P.J., Morony S., Lacey D.L., Hammond T.G., Leinwand L.L., Argraves W.S., Bateman T.A.,

Barth J.L. Effects of spaceflight on murine skeletal muscle gene expression // J. Appl. Physiol. 2009. V. 106. № 2. P. 582-595. doi: 10.1152/japplphysiol.90780.2008

- 10.Andjelković M., Alessi D.R., Meier R., Fernandez A., Lamb N.J., Frech M., Cron P., Cohen P., Lucocq J.M., Hemmings B.A. Role of translocation in the activation and function of protein kinase B // J. Biol. Chem. 1997. V. 272. № 50. P. 31515-31524. doi: 10.1074/jbc.272.50.31515
- 11.Antonioli L., Blandizzi C. Pacher P., Haskó G. The Purinergic System as a Pharmacological Target for the Treatment of Immune-Mediated Inflammatory Diseases // Pharmacological Reviews. 2019. V. 71. I. 3. P. 345-382. doi: 10.1124/pr.117.014878
- 12.Araya R., Liberona J.L., Ca'rdenas J.C., Riveros N., Estrada M., Powell J.A., Carrasco M.A., Jaimovich E. Dihydropyridine receptors as voltage sensors for a depolarization-evoked, IP3R mediated, slow calcium signal in skeletal muscle cells // J. Gen. Physiol. 2003. V. 121. P. 3–16.
- 13.Araya R., Riquelme M.A., Brandan E., Sáez J.C. The formation of skeletal muscle myotubes requires functional membrane receptors activated by extracellular ATP // Brain. Res. Brain. Res. Rev. 2004. V. 47. P. 174–188.
- 14.Arias-Calderón M., Almarza G., Díaz-Vegas A., Contreras-Ferrat A., Valladares D., Casas M., Toledo H., Jaimovich E., Buvinic S. Characterization of a multiprotein complex involved in excitation-transcription coupling of skeletal muscle // Skeletal Muscle. 2016. V. 6. P. 15. doi: 10.1186/s13395-016-0087-5
- Armstrong D.D., Esser K.A. Wnt/beta-catenin signaling activates growth-control genes during overload-induced skeletal muscle hypertrophy // Am. J. Physiol. Cell Physiol. 2005. V. 289. P. 853–859. doi: 10.1152/ajpcell.00093.2005
- 16.Arutyunyan R.S., Kozlovskaya I.B., Nasledov G.A., Nemirovskaya T.L., Radzyukevich T.L., Shenkman B.S. The Contraction of Unweighted Fast and Slow Rat Muscles in Calcium-Free Solution // Basic and Appl. Myology. 1995. V. 5. P. 169-175.
- 17.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.

- 18.Ayyanathan K., Webb T.E., Sandhu A.K., Athwal R.S., Barnard E.A., Kunapuli S.P. Cloning and chromosomal localization of the human P2Y1 purinoceptor // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1996. V. 218. P. 783-788.
- 19.Baird M.F., Graham S.M., Baker J.S., Bickerstaff G.F. Creatine-Kinase- and Exercise-Related Muscle Damage Implications for Muscle Performance and Recovery // J. Nutr. Metab. 2012. 960363.
- 20.Baldwin K.D., Haddad F. Skeletal muscle plasticity: cellular and molecular responses to altered physical activity paradigms // Am. J. Phys. Med. Rehabil. 2002. V. 81. P. 40-51. doi: 10.1097/01.PHM.0000029723.36419.0D
- 21.Ballif B.A.; Roux P.P.; Gerber S.A.; MacKeigan J.P.; Blenis J.; Gygi S.P. Quantitative phosphorylation profiling of the ERK/p90 ribosomal S6 kinase-signaling cassette and its targets, the tuberous sclerosis tumor suppressors // Proc. Natl. Acad. Sci. 2005. V. 102. P. 667–672.
- 22.Banachewicz W., Suplat D., Krzeminski P., Pomorski P., Baranska J. P2 nucleotide receptors on C2C12 satellite cells // Purinergic. Signal. 2005. V. 1. P. 249–257.
- 23.Bao L., Locovei S., Dahl G. Pannexin membrane channels are mechanosensitive conduits for ATP // FEBS Lett. 2004. V. 572. P. 65–68. doi: 10.1016/j.febslet.2004.07.009
- 24.Baranova A., Ivanov D., Petrash N., Pestova A., Skoblov M., Kelmanson I., Shagin D., Nazarenko S., Geraymovych E., Litvin O., Tiunova A., Born T.L., Usman N., Staroverov D., Lukyanov S., Panchin Y. The mammalian pannexin family is homologous to the invertebrate innexin gap junction proteins // Genomics. 2004. V. 83 №. 4. P. 706-716. doi: 10.1016/j.ygeno.2003.09.025
- 25.Bechet D., Tassa A., Taillandier D., Combaret L., Attaix D. Lysosomal proteolysis in skeletal muscle // Int. J. Biochem. Cell Biol. 2005. V. 37. P. 2098–2114.
- 26.Belova S., Mochalova E., Kostrominova T., Shenkman B., Nemirovskaya T. P38α-MAPK signaling inhibition attenuate soleus atrophy during early stages of muscle unloading // Int. J. Mol. Sci. 2020. V. 21. P. 2756. doi: 10.3390/ijms21082756
- 27.Belova S.P., Vilchinskaya N.A., Mochalova E.P., Mirzoev T.M., Nemirovskaya T.L., Shenkman B.S. Elevated p70S6K phosphorylation in rat soleus during the early stage of

unloading: Causes and consequences // Arch. Biochem. Biophys. 2019. V. 674. P.108105. doi: 10.1016/j.abb.2019.108105

- 28.Boassa D., Ambrosi C., Qiu F., Dahl G., Gaietta G.,Sosinsky G. Pannexin1 channels contain a glycosylation site that targets the hexamer to the plasma membrane // J. Biol. Chem. 2007. V. 282. № 31. P. 31733-31743. doi:10.1074/jbc.M702422200
- 29.Bodine S.C. Disuse-induced muscle wasting // Int. J. Biochem. Cell Biol. 2013. V. 45. № 10. P. 2200-2208. doi: 10.1016/j.biocel.2013.06.011
- 30.Bodine S.C., Baehr L.M. Skeletal muscle atrophy and the E3 ubiquitin ligases MuRF1 and MAFbx/atrogin-1 // Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 2014. V. 307. № 6. P. 469-484. doi: 10.1152/ajpendo.00204.2014
- 31.Bodine S.C., Latres E., Baumhueter S., Lai V.K., Nunez L., Clarke B.A., Poueymirou W.T., Panaro F.J., Na E., Dharmarajan K., Pan Z.Q., Valenzuela D.M., DeChiara T.M., Stitt T.N., Yancopoulos G.D., Glass D.J. Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy // Science. 2001a. V. 294. № 5547. P. 1704–1708.
- 32.Bodine S.C., Stitt T.N., Gonzalez M. Akt/mTOR pathway is a crucial regulator of skeletal muscle hypertrophy and can prevent muscle atrophy in vivo // Nat. Cell Biol. 2001b. V. 3. P. 1014–1019. doi: 10.1038/ncb1101-1014
- 33.Bricceno K.V., Sampognaro P.J., Van Meerbeke J.P., Sumner C.J., Fischbeck K.H., Burnett B.G. Histone deacetylase inhibition suppresses myogenin-dependent atrogene activation in spinal muscular atrophy mice // Hum. Mol. Genet. 2012. V. 21. P. 4448– 4459.
- 34.Broch-Lips M., Pedersen T.H., Nielsen O.B. Effect of purinergic receptor activation on Na+ -K+ pump activity, excitability, and function in depolarized skeletal muscle // Am.
  J. Physiol. Cell Physiol. 2010. V. 298. P. 1438–1444.
- 35.Bruzzone R., Hormuzdi S.G., Barbe M.T., Herb A., Monyer H. Pannexins, a family of gap junction proteins expressed in brain // Proc. Natl. Acad. Sci. 2003. V. 100. № 23. P. 13644-13649. doi: 10.1073/pnas.2233464100
- 36.Burma N.E., Bonin R.P., Leduc-Pessah H., Baimel C., Cairncross Z.F., Mousseau M., Shankara J.V., Stemkowski P.L., Baimoukhametova D., Bains J.S., Antle M.C., Zamponi G.W., Cahill C.M., Borgland S.L., De Koninck Y., Trang T. Blocking

microglial pannexin-1 channels alleviates morphine withdrawal in rodents // Nat. Med. 2017. V. 23. № 3. P. 355-360. doi: 10.1038/nm.4281

- 37.Burnell J.M., Kirby W.M. Effectiveness of a new compound, benemid, in elevating serum penicillin concentrations // J. Clin. Invest. 1951. V. 30. P. 697–700. doi: 10.1172/JCI102482
- 38.Burnstock G. Neural nomenclature // Nature. 1971. V. 229. P. 282–283. doi: 10.1038/229282d0
- 39.Burnstock G. Purine and purinergic receptors // Brain and Neuroscience Advances. 2018.V. 2. doi: 10.1177/2398212818817494
- 40.Burnstock G. Purine and pyrimidine receptors // Cell Mol. Life Sci. 2007. V. 64. P. 1471– 1483.
- 41.Burnstock G. Purinergic signalling: pathophysiology and therapeutic potential // Keio J. Med. 2013. V. 62. № 3. P. 63-73. doi: 10.2302/kjm.2013-0003-re
- 42.Bustamante M., Ferńandez-Verdejo R., Jaimovich E., Buvinic S. Electrical stimulation induces IL-6 in skeletal muscle through extracellular ATP by activating Ca 2+ signals and an IL-6 autocrine loop // Am.J.Physiol.Endocrinol.Metab. 2014. V. 306. P. 869–882. doi: 10.1152/ajpendo.00450.2013
- 43.Buvinic S., Almarza G., Bustamante M., Casas M., López J., Riquelme M., Sáez J.C., Huidobro-Toro J.P., Jaimovich E. ATP released by electrical stimuli elicits calcium transients and gene expression in skeletal muscle // J. Biol. Chem. 2009. V. 284. P. 34490–34505.
- 44.Caiozzo V.J. Plasticity of skeletal muscle phenotype: mechanical consequences // Muscle and Nerve. 2002. V. 26. № 6. P. 740–768.
- 45.Carriere A., Romeo Y., Acosta-Jaquez H.A., Moreau J., Bonneil E., Thibault P., Fingar D.C., Roux P.P. ERK1/2 phosphorylate Raptor to promote Ras-dependent activation of mTOR complex 1 (mTORC1) // J. Biol. Chem. 2011. V. 286. P. 567–577.
- 46.Carrillo-Mora P., Méndez-Cuesta L.A., La Cruz V.P.-D., Der Goes T.I.F.-V., Santamaría
  A. Protective effect of systemic l-kynurenine and probenecid administration on behavioural and morphological alterations induced by toxic soluble amyloid beta (25–

35) in rat hippocampus // Behav. Brain Res. 2010. V. 210. P. 240–250. doi: 10.1016/j.bbr.2010.02.041

- 47.Casas M., Buvinic S., Jaimovich E. ATP signaling in skeletal muscle: from fiber plasticity to regulation of metabolism // Exerc. Sport Sci. Rev. 2014. V. 42.№ 3. P. 110–116. doi: 10.1249/JES.00000000000017
- 48.Cea L.A., Riquelme M.A., Cisterna B.A., Puebla C., Vega J.L., Rovegno M., Sáez J.C. Connexin- and pannexin-based channels in normal skeletal muscles and their possible role in muscle atrophy // J. Membr. Biol. 2012. V. 245. P. 423–436.
- 49.Centner T., Yano J., Kimura E., McElhinny A.S., Pelin K., Witt C.C., Bang M.L., Trombitas K., Granzier H., Gregorio C.C., Sorimachi H., Labeit S. Identification of muscle specific ring finger proteins as potential regulators of the titin kinase domain // J. Mol. Biol. 2001 V. 306. № 4. P. 717-726. doi: 10.1006/jmbi.2001.4448
- 50.Chang H., Zhang L., Xu P.T., Li Q., Sheng J.J., Wang Y.Y., Chen Y., Zhang L.N., Yu Z.B. Nuclear translocation of calpain-2 regulates propensity toward apoptosis in cardiomyocytes of tail-suspended rats // J. Cell Biochem. 2011. V. 112. № 2. P. 571-580. doi: 10.1002/jcb.22947
- 51.Chen M., Chen H., Gu Y., Sun P., Sun J., Yu H., Zheng H., Chen D. P2Y2 promotes fibroblasts activation and skeletal muscle fibrosis through AKT, ERK, and PKC // BMC Musculoskelet. Disord. 2021. V. 22. № 1. P. 680. doi: 10.1186/s12891-021-04569-y
- 52.Cheng A.W.M., Kong L.W., Tung E.K.K., Siow N.L., Choi R.C.Y., Zhu S.Q., Peng B.H., Tsim K.W.K. cDNA encodes Xenopus P2Y1 nucleotide receptor: expression at the neuromuscular junctions // Neuroreport. 2003. V. 14. P. 351-357.
- 53.Cheung K.K., Ryten M., Burnstock G. Abundant and dynamic expression of G proteincoupled P2Y receptors in mammalian development // Dev. Dyn. 2003. V. 228. P. 254– 266.
- 54.Chin E.R. The role of calcium and calcium/calmodulin-dependent kinases in skeletal muscle plasticity and mitochondrial biogenesis // Proc. Nutr. Soc. 2004. V. 63. P. 279– 286.
- 55.Choi R.C., Man M.L., Ling K.K., Ip N.Y., Simon J., Barnard E.A., Tsim K. W. Expression of the P2Y1 nucleotide receptor in chick muscle: its functional role in the

regulation of acetylcholinesterase and acetylcholine receptor // J. Neurosci. 2001. V. 21. P. 9224–9234.

- 56. Choi R.C., Siow N.L., Cheng A.W., Ling K.K., Tung E.K., Simon J., Barnard E.A., Tsim K.W. ATP acts via P2Y1 receptors to stimulate acetylcholinesterase and acetylcholine receptor expression: transduction and transcription control // J. Neurosci. 2003. V. 23. P. 4445–4456.
- 57. Clapham D.E. Calcium signaling // Cell. 1995. V. 80. P. 259–268.
- 58.Clavel S., Siffroi-Fernandez S., Coldefy A.S., Boulukos K., Pisani D., Dérijard B. Regulation of the intracellular localization of Foxo3a by stress-activated protein kinase signaling pathways in skeletal muscle cells // Mol. Cell. Biol. 2010. V. 30. P. 470–480.
- 59.Collet C., Csernoch L., Jacquemond V. Intramembrane charge movement and L-type calcium current in skeletal muscle fibers isolated from control and mdx mice // Biophys. J. 2003. V. 84. № 1. P. 251-265.
- 60.Corriden R., Insel P.A. Basal release of ATP: an autocrine-paracrine mechanism for cell regulation // Sci. Signal. 2010. V. 3. № 104. re1.
- 61.Dahl G. ATP release through pannexon channels // Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. 2015. V. 370. № 1672. P. 20140191. doi: 10.1098/rstb.2014.0191.
- 62.Dahl G., Keane R.W. Pannexin: from discovery to bedside in 11+4 years? // Brain Res.V. 1487. P. 150–159. doi:10.1016/j.brainres.2012.04.058
- 63.Dahl G., Locovei S. Pannexin: to gap or not to gap, is that a question? // IUBMB Life. 2006. V. 58. P. 409–419. doi: 10.1080/15216540600794526
- 64.Dargelos E., Poussard S., Brule C., Daury L., Cottin P. Calciumdependent proteolytic system and muscle dysfunctions: a possible role of calpains in sarcopenia // Biochimie. 2008. V. 90. P. 359–368.
- 65.De Oliveira Moreira D., Santo Neto H., Marques M.J. P2Y2 purinergic receptors are highly expressed in cardiac and diaphragm muscles of mdx mice, and their expression is decreased by suramin // Muscle Nerve. 2017. V. 55. P. 116–121.
- 66.De-Doncker L., Kasri M., Picquet F., Falempin M. Physiologically adaptive changes of the L5 afferent neurogram and of the rat soleus EMG activity during 14 days of hindlimb

unloading and recovery. J. Exp. Biol. 2005. V. 208. P. 4585–4592. doi: 10.1242/jeb.01931

- 67.Diggle T.A., Subkhankulova T., Lilley K.S., Shikotra N., Willis A.E., Redpath N.T. Phosphorylation of elongation factor 2 kinase on serine 499 by cAMP dependent protein kinase induces Ca2+/calmodulin independent activity // Biochem. J. 2001. V. 353. P. 621–626.
- 68.Dou Z., Chattopadhyay M., Pan J. A., Guerriero J. L., Jiang Y. P., Ballou L. M., Yue Z., Lin R. Z., Zong W. X. The class IA phosphatidylinositol 3-kinase p110-beta subunit is a positive regulator of autophagy // J. Cell Biol. 2010. V. 191. P. 827–843. doi: 10.1083/jcb.201006056
- 69.Drury A.N., Szent-Gyorgyi A. The physiologicalactivity of adenine compounds with especialreference to their action upon the mammalian heart // J. Physiol. 1929. V. 68. P. 213–237. doi: 10.1113/jphysiol.1929.sp002608
- 70.Du J., Wang X., Miereles C., Bailey J.L., Debigare R., Zheng B., Price S.R., Mitch W.E. Activation of caspase-3 is an initial step triggering accelerated muscle proteolysis in catabolic conditions // J. Clin. Invest. 2004. V. 113. P. 115–123.
- 71.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.
- 72.Dvoriantchikova G., Ivanov D., Panchin Y., Shestopalov V.I. Expression of pannexin family of proteins in the retina // FEBS Lett. 2006. V. 580. P. 2178–2182.
- 73.Eltit J.M., García A.A., Hidalgo J., Liberona J.L., Chiong M., Lavandero S., Maldonado E., Jaimovich E. Membrane electrical activity elicits inositol 1,4,5-trisphosphate-dependent slow Ca2+ signals through a Gbetagamma/phosphatidylinositol 3-kinase gamma pathway in skeletal myotubes // J. Biol. Chem. 2006. V. 281. № 17. P. 12143-12154. doi: 10.1074/jbc.M511218200
- 74.Enns D.L., Belcastro A.N. Early activation and redistribution of calpain activity in skeletal muscle during hindlimb unweighting and reweighting // Canadian Journal of Physiology and Pharmacology. 2006. V. 8. № 6. P. 601–609.

- 75.Falasca M., Logan S.K., Lehto V.P., Baccante G., Lemmon M.A., Schlessinger J. Activation of phospholipase C gamma by PI 3-kinase-induced PH domain-mediated membrane targeting // EMBO (Eur. Mol. Biol. Organ.) J. 1998. V. 17. P. 414–422.
- 76.Fang X.; Yu S.X.; Lu Y.; Bast R.;Woodgett J.; Mills G.B. Phosphorylation and inactivation of glycogen synthase kinase 3 by protein kinase A // Proc. Natl. Acad. Sci. 2000. V. 97. P. 11960–11965.
- 77.Fernández-Verdejo R., Casas M., Galgani J.E., Jaimovich E., Buvinic S. Exercise sensitizes skeletal muscle to extracellular ATP for IL-6 expression in mice // Int. J. Sports Med. 2014. V. 36. № 4. P. 273-279.
- 78.Fitts R.H., Riley D.R., Widrick J.J. Physiology of a microgravity environment invited review: microgravity and skeletal muscle // J. Appl. Physiol. 2000. V. 89. № 2. P. 823–839. doi: 10.1152/jappl.2000.89.2.823
- 79.Fluck M., Hoppeler H. Molecular basis of skeletal muscle plasticity-from gene to form and function // Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol. 2003. V. 146. P. 159–216. doi: 10.1007/s10254-002-0004-7
- 80.Fredholm B.B. Adenosine, an Endogenous Distress Signal, Modulates Tissue Damage and Repair // Cell Death Differ. 2007. V. 14. P. 1315–1323
- 81.Fredholm B.B., IJzerman A.P., Jacobson K.A., Klotz K.N., Linden J. International union of pharmacology. XXV: Nomenclature and classification of adenosine receptors // Pharmacological Reviews. 2001. V. 53. I. 4. P. 527–552.
- 82.Furlow J.D., Watson M.L., Waddell D., Neff E.S., Baehr L.M., Ross A.P., Bodine S. Altered gene expression patterns in muscle ring finger 1 null mice during denervationand dexamethasone-induced muscle atrophy // Physiol. Genom. 2013. V. 45. P. 1168– 1185.
- 83.Gachet C. P2 receptors, platelet function and pharmacological implications // Thromb. Haemost. 2008. V. 99. P. 466–472.
- 84.Gallagher C.J., Salter M.W. Differential properties of astrocyte calcium waves mediated by P2Y1 and P2Y2 receptors // J. Neurosci. 2003. V. 23. P. 6728–6739.
- 85.Gendron F.P., Newbold N.L., Vivas-Mejia P.E., Wang M., Neary J.T., Sun G.Y., Gonzalez F.A., Weisman G.A. Signal transduction pathways for P2Y2 and P2X7

nucleotide receptors that mediate neuroinflammatory responses in astrocytes and microglial cells // Biomed. Res. 2003. V.14. P. 47-61.

- 86.Glass D.J. Signalling pathways that mediate skeletal muscle hypertrophy and atrophy // Nat. Cell Biol. 2003. V. 5 № 2. P. 87–90. doi: 10.1038/ncb0203-87
- 87.Gnad T., Navarro G., Lahesmaa M., Reverte-Salisa L., Copperi F., Cordomi A., Naumann J., Hochhäuser A., Haufs-Brusberg S., Wenzel D., Suhr F., Jespersen N.Z., Scheele C., Tsvilovskyy V., Brinkmann C., Rittweger J., Dani C., Kranz M., Deuther-Conrad W., Eltzschig H.K., Niemi T., Taittonen M., Brust P., Nuutila P., Pardo L., Fleischmann B.K., Blüher M., Franco R., Bloch W., Virtanen K.A., Pfeifer A. Adenosine/A2B Receptor Signaling Ameliorates the Effects of Aging and Counteracts Obesity // Cell Metab. 2020. V. 32. P. 56–70.e7.
- 88.Goll D.E., Thompson V.F., Li H., Wei W., Cong J. The calpain system // Physiological Reviews. 2003. V. 83. № 3. P. 731–801.
- 89.Gomes M.D., Lecker S.H., Jagoe R.T., Navon A., Goldberg A.L. Atrogin-1, a musclespecific F-box protein highly expressed during muscle atrophy // Proc. Natl. Acad. Sci. 2001. V. 98. P. 14440–14445.
- 90.Gregory M.A., Qi Y., Hann S.R. Phosphorylation by glycogen synthase kinase-3 controls c-myc proteolysis and subnuclear localization // J. Biol. Chem. 2003. V. 278. P. 51606– 51612. doi: 10.1074/jbc.M310722200
- 91.Gu Y., Gao L., Han Q., Li A., Yu H., Liu D., Pang Q. GSK-3beta at the crossroads in regulating protein synthesis and lipid deposition in zebrafish // Cells. 2019. V. 8. P. 205.
- 92.Guillermet-Guibert J., Bjorklof K., Salpekar A., Gonella C., Ramadani F., Bilancio A., Meek S., Smith A.J., Okkenhaug K., Vanhaesebroeck B. The p110beta isoform of phosphoinositide 3-kinase signals downstream of G protein-coupled receptors and is functionally redundant with p110gamma // Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 2008. V. 105. № 2. P. 8292-8297. doi: 10.1073/pnas.0707761105
- 93.Gupta R.C., Misulis K.E., Dettbarn W.D. Activity dependent characteristics of fast and slow muscle: biochemical and histochemical considerations // Neurochem. Res. 1989. V. 14. № 7. P. 647–655. doi: 10.1007/BF00964874

- 94.Gutman A.B., Yu T.F. Benemid (p-di-n-propylsulfamyl)-benzoic acid) as uricosuric agent in chronic gouty arthritis // Trans. Assoc. Am. Physicians. 1951. V. 64. P. 279– 288.
- 95.Han B., Zhu M.J., Ma C., Du M. Rat hindlimb unloading down-regulates insulin like growth factor-1 signalling and AMP-activated protein kinase and leads to severe atrophy of the soleus muscle // Appl. Physiol. Nutr. Metab. 2007. V. 32. P. 1115–1123. doi: 10.1139/H07-102
- 96.Han D.H., Hansen P.A., Nolte L.A., Holloszy J.O. Removal of Adenosine Decreases the Responsiveness of Muscle Glucose Transport to Insulin and Contractions // Diabetes. 1998. V. 47. P. 1671–1675.
- 97.He H., Liu D., Long Y., Wang X., Yao B. The Pannexin-1 Channel Inhibitor Probenecid Attenuates Skeletal Muscle Cellular Energy Crisis and Histopathological Injury in a Rabbit Endotoxemia Model // Inflammation. 2018. V. 41. P. 2030–2040.
- 98.Hemmersbach P. The Probenecid-story: A success in the fight against doping through out-of-competition testing // Drug Test. Anal. 2020. V. 12. P. 589–594. doi: 10.1002/dta.2727
- 99.Henderson D.J., Elliot D.G., Smith G.M., Webb T.E., Dainty I.A. Cloning and characterisation of a bovine P2Y receptor // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1995. V. 212. P. 648-656.
- 100. Henning R.H., Duin M., den Hertog A., Nelemans A. Activation of the phospholipase C pathway by ATP is mediated exclusively through nucleotide type P2-purinoceptors in C2C12 myotubes // Br J Pharmacol. 1993. V. 110. I. 2. P. 747-752. doi: 10.1111/j.1476-5381.1993.tb13875.x
- Hilder T.L., Baer L.A., Fuller P.M., Fuller C.A., Grindeland R.E., Wade C.E., Graves L.M. Insulin-independent pathways mediating glucose uptake in hindlimb suspended skeletal muscle // J. Appl. Physiol. 2005. V. 99. P. 2181–2188. doi: 10.1152/japplphysiol.00743.2005
- 102. Hilder T.L., Tou J.C., Grindeland R.E., Wade C.E., Graves L.M. Phosphorylation of insulin receptor substrate-1 serine 307 correlates with JNK activity in atrophic skeletal muscle // FEBS Lett. 2003. V. 553. P. 63–67. doi: 10.1016/S0014-5793(03)00972-4

- 103. Hu L.P., Zhang X.X., Jiang S.H., Tao L.Y., Li Q., Zhu L.L., Yang M.W., Huo Y.M., Jiang Y.S., Tian G.A., Cao X.Y., Zhang Y.L., Yang Q., Yang X.M., Wang Y.H., Li J., Xiao G.G., Sun Y.W., Zhang Z.G. Targeting Purinergic Receptor P2Y2 Prevents the Growth of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma by Inhibiting Cancer Cell Glycolysis // Clin. Cancer Res. 2019. V. 25. № 4. P. 1318-1330. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-18-2297
- 104. Ikemoto M., Nikawa T., Takeda S., Watanabe C., Kitano T., Baldwin K.M., Izumi R., Nonaka I., Towatari T., Teshima S., Rokutan K., Kishi K. Space shuttle flight (STS-90) enhances degradation of rat myosin heavy chain in association with activation of ubiquitin-proteasome pathway // FASEB J. 2001. V. 15. № 7. P. 1279-1281. doi: 10.1096/fj.00-0629fje
- 105. Ingalls C.P., Warren G.L., Armstrong R.B. Intracellular Ca2+ transients in mouse soleus muscle after hindlimb unloading and reloading // J. Appl. Physiol. (1985). 1999.
  V. 87. № 1. P. 386-90. doi: 10.1152/jappl.1999.87.1.386
- 106. Jagoe R.T., Goldberg A.L. What do we really know about the ubiquitin-proteasome pathway in muscle atrophy? // Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care. 2001. V. 4. № 3. P. 183–190.
- 107. Jaimovich E., Bustamante M., Fernández R., Buvinic S. ATP released by electrical stimulation of myotubes triggers IL6 expression and increases STAT3 activity // FASEB J. 2011. V. 306. № 8. P. 869–882.
- 108. Janssens R., Communi D., Pirotton S., Samson M., Parmentier M., Boeynaems J.M. Cloning and tissue distribution of the human P2Y1 receptor // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1996. V. 221. P. 588–593.
- 109. Jefferson L.S.; Fabian J.R.; Kimball S.R. Glycogen synthase kinase-3 is the predominant insulin-regulated eukaryotic initiation factor 2B kinase in skeletal muscle // Int. J. Biochem. Cell Biol. 1999. V. 31. P. 191–200.
- 110. Jones N.C., Tyner K.J., Nibarger L., Stanley H.M., Cornelison D.D., Fedorov Y.V., Olwin B.B. The p38alpha/beta MAPK functions as a molecular switch to activate the quiescent satellite cell // J. Cell Biol. 2005. V. 169. P. 105–116.

- 111. Jones S.W., Hill R.J., Krasney P.A., O'Conner B., Peirce N., Greenhaff P.L. Disuse atrophy and exercise rehabilitation in humans profoundly affects the expression of genes associated with the regulation of skeletal muscle mass / The FASEB Journal. 2004. V. 18. № 9. P. 1025–1027.
- 112. Jorquera G., Altamirano F., Contreras-Ferrat A., Almarza G., Buvinic S., Jacquemond V., Jaimovich E., Casas M. Cav1.1 controls frequency-dependent events regulating adult skeletal muscle plasticity // J. Cell Sci. 2013. V. 126(Pt 5) P. 1189-98. doi: 10.1242/jcs.116855
- 113. Kachaeva E.V., Shenkman B.S. Various jobs of proteolytic enzymes in skeletal muscle during unloading: facts and speculations // J. Biomed. Biotechnol. 2012. 493618. doi: 10.1155/2012/493618
- 114. Kandarian S. The molecular basis of skeletal muscle atrophy— parallels with osteoporotic signaling // J. Musculoskelet. Neuronal. Interact. 2008. V. 8. P. 340–341.
- 115. Kawano F., Ishihara A., Stevens J.L., Wang X.D., Ohshima S., Horisaka M., Maeda Y., Nonaka I., Ohira Y. Tension- and afferent input-associated responses of neuromuscular system of rats to hindlimb unloading and/or tenotomy // Am. J. Physiol. Integr. Comp. Physiol. 2004. V. 287. I. 1. R. 76-86. doi: Regul. 10.1152/ajpregu.00694.2003
- 116. Kawano F., Nomura T., Ishihara A., Nonaka I., Ohira Y. Afferent input-associated reduction of muscle activity in microgravity environment // Neuroscience. 2002. V. 114.
  P. 1133–1138. doi: 10.1016/S0306-4522(02)00304-4
- 117. Kedar V., McDonough H., Arya R., Li H.H., Rockman H.A., Patterson C. Muscle-specific RING finger 1 is a bona fide ubiquitin ligase that degrades cardiac troponin I // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2004. V. 101. № 52. P. 18135–18140.
- 118. Keresztes M., Häggblad J., Heilbronn E. Basal and ATP stimulated phosphoinositol metabolism in fusing rat skeletal muscle cells in culture // Exp. Cell Res. 1991. V. 196 № 2. P. 362–364. doi: 10.1016/0014-4827(91)90272-v
- Khairullin A.E., Grishin S.N. Ziganshin A.U. P2 Receptor Signaling Motor Units Muscular Dystrophy // Int. J. Mol. Sci. 2023. V. 24. P. 1587. doi: 10.3390/ ijms24021587

- 120. Khalafalla F.G., Greene S., Khan H., Ilves K., Monsanto M.M., Alvarez R. Jr, Chavarria M., Nguyen J., Norman B., Dembitsky W.P., Sussman M.A. P2Y(2) nucleotide receptor prompts human cardiac progenitor cell activation by modulating hippo signaling // Circ. Res. 2017. V. 121. № 11. P. 1224–1236. doi: 10.1161/circresaha.117.310812
- 121. Kim J., Yang G., Kim Y., Kim J., Ha J. AMPK Activators: Mechanisms of Action and Physiological Activities // Exp. Mol. Med. 2016. V. 48, e224.
- 122. Kjøbsted R., Hingst J.R., Fentz J., Foretz M., Sanz M., Pehmøller C., Shum M., Marette A., Mounier R., Treebak J.T., Wojtaszewski J.F.P., Viollet B., Lantier L. AMPK in Skeletal Muscle Function and Metabolism // FASEB J. 2018. V. 32. P. 1741–1777.
- 123. Kok K., Geering B., Vanhaesebroeck B. Regulation of phosphoinositide 3-kinase expression in health and disease // Trends Biochem. Sci. 2009. V. 34. P. 115–127. doi: 10.1016/j.tibs.2009.01.003
- 124. Kolb H.A., Wakelam M.J.O. Transmitter-like action of ATP on patched membranes of cultured myoblasts and myotubes // Nature. 1983. V. 303. I. 5918. P. 621–623. doi: 10.1038/303621a0
- 125. Kramerova I., Kudryashova E., Venkatraman G., Spencer M.J. Calpain 3 participates in sarcomere remodeling by acting upstream of the ubiquitinproteasome pathway // Hum. Mol. Genet. 2005. V. 14.№ 15. P. 2125-2134.
- 126. Kravtsova V.V., Matchkov V.V., Bouzinova E.V., Vasiliev A.N., Razgovorova I.A., Heiny J.A., Krivoi I.I., Isoform-Specific Na,K-ATPase Alterations Precede Disuse-Induced Atrophy of Rat Soleus Muscle // BioMed. Research International. 2015. V. 2015. P720172. doi: 10.1155/2015/720172
- 127. Kravtsova V.V., Vilchinskaya N.A., Rozlomii V.L., Shenkman B.S., Krivoi I.I. Low Ouabain Doses and AMP-Activated Protein Kinase as Factors Supporting Electrogenesis in Skeletal Muscle // Biochemistry. 2019. V. 84. P. 1085–1092. doi: 10.1134/S0006297919090116
- 128. Lagirand-Cantaloube J., Offner N., Csibi A., Leibovitch M.P., Batonnet-Pichon S., Tintignac L.A., Segura C.T., Leibovitch S.A. The initiation factor eIF3-f is a major target

for atrogin1/MAFbx function in skeletal muscle atrophy // EMBO J. 2008. V. 27. № 8. P. 1266-1276. doi: 10.1038/emboj.2008.52

- 129. Langlois S., Xiang X., Young K., Cowan B.J., Penuela S., Cowan K.N. Pannexin 1 and pannexin 3 channels regulate skeletal muscle myoblast proliferation and differentiation // J. Biol. Chem. 2014. V. 289. № 44. P. 30717–30731.
- Laver D.R., Lenz G.K., Lamb G.D. Regulation of the calcium release channel from rabbit skeletal muscle by the nucleotides ATP, AMP, IMP and adenosine // J. Physiol. 2001. V. 537. P. 763–778.
- 131. Lazarowski E.R., Boucher R.C., Harden T.K. Mechanisms of release of nucleotides and integration of their action as P2X- and P2Y-receptor activating molecules // Mol. Pharmacol. 2003. V. 64. № 4. P. 785-795.
- 132. Lazarowski E.R., Watt W.C., Stutts M.J., Boucher R.C., Harden T.K. Pharmacological selectivity of the cloned human P2U-purinoceptor: potent activation by diadenosine tetraphosphate // Br. J. Pharmacol. V. 116. P. 1619-1627.
- 133. Lecker S.H., Jagoe R.T., Gilbert A., Gomes M., Baracos V., Bailey J., Price S.R., Mitch W.E., Goldberg A.L. Multiple types of skeletal muscle atrophy involve a common program of changes in gene expression // FASEB J. 2004. V. 18. № 1. P. 39-51. doi: 10.1096/fj.03-0610com
- 134. Ledent C., Vaugeois J.M., Schiffmann S.N., Pedrazzini T., El Yacoubi M., Vanderhaeghen J.J., Costentin J., Heath J.K., Vassart G., Parmentier M. Aggressiveness, hypoalgesia and high blood pressure in mice lacking the adenosine A2a receptor // Nature. 1997. V. 388. I. 6643. P. 674–678.
- 135. Lee S.W., Dai G.; Hu Z.; Wang X.; Du J.; Mitch W.E.. Regulation of Muscle Protein Degradation: Coordinated Control of Apoptotic and Ubiquitin-Proteasome Systems by Phosphatidylinositol 3 Kinase // Journal of the American Society of Nephrology. 2004.
  V. 15. № 66. P. 1537-1545. doi: 10.1097/01.ASN.0000127211.86206.E1
- 136. Léger B., Cartoni R., Praz M., Lamon S., Dériaz O., Crettenand A., Gobelet C., Rohmer P., Konzelmann M., Luthi F., Russell A.P. Akt signalling through GSK-3beta, mTOR and Foxo1 is involved in human skeletal muscle hypertrophy and atrophy // J. Physiol. 2006. V. 576(Pt 3). P. 923-933. doi: 10.1113/jphysiol.2006.116715

- 137. Léon C., Freund M., Latchoumanin O., Farret A., Petit P., Cazenave J.P., Gachet C. The P2Y(1) receptor is involved in the maintenance of glucose homeostasis and in insulin secretion in mice // Purinergic. Signal. 2005. V. 1. № 2. P. 145-151. doi: 10.1007/s11302-005-6209-x
- 138. Léon C., Hechler B., Vial C., Leray C., Cazenave J.P., Gachet C. The P2Y1 receptor is an ADP receptor antagonized by ATP and expressed in platelets and megakariyoblastic cells // FEBS Lett. 1997. V. 403. P. 26-30.
- 139. Léon C., Vial C., Cazenave J.P., Gachet C. Cloning and sequencing of a human cDNA encoding endothelial P2Y1 purinoceptor. Gene. 1996. V. 171. P. 295-297.
- 140. Li S., Bjelobaba I., Yan Z., Kucka M., Tomic M., Stojilkovic S.S. Expression and roles of pannexins in ATP release in the pituitary gland // Endocrinology. 2011. V. 152. P. 2342–2352.
- 141. 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 // Journal of Gravitational Physiology. 2004. V. 11 № 2. P. 131–132.
- 142. Liu B., Cao W., Li J., Liu J. Lysosomal exocytosis of ATP is coupled to P2Y2 receptor in marginal cells in the stria vascular in neonatal rats // Cell Calcium. 2018. V. 76. P. 62–71. doi: 10.1016/j.ceca.2018.09.006
- 143. Liu R., Ma S., Lu Z., Shen H., Sun L., Wei M. The ADP Antagonist MRS2179 Regulates the Phenotype of Smooth Muscle Cells to Limit Intimal Hyperplasia // Cardiovascular Drugs and Therapy. 2014. V. 29. № 1. P. 23–29. doi: 10.1007/s10557-014-6561-6
- 144. Lluis F., Perdiguero E., Nebreda A.R., Munoz-Canoves P. Regulation of skeletal muscle gene expression by p38 MAP kinases // Trends Cell Biol. 2006. V. 16. P. 36–44.
- 145. Locovei S., Wang J., Dahl G. Activation of pannexin 1 channels by ATP through P2Y receptors and by cytoplasmic calcium // FEBS Lett. 2006. V. 580. P. 239–244. doi: 10.1016/j.febslet.2005.12.004

- 146. Lu N., Shen Q., Mahoney T. R., Neukomm L. J., Wang Y., Zhou Z. Two PI 3-kinases and one PI 3-phosphatase together establish the cyclic waves of phagosomal PtdIns(3)P critical for the degradation of apoptotic cells // PLoS Biol. 2012. V. 10. e1001245.
- 147. Lustig K.D., Landis D.M., Hicks-Taylor C.S., Zhang X., Erb L., Sportiello M., Weisman G.A. Mechanisms by which extracellular ATP and UTP stimulate the release of prostacyclin from bovine pulmonary artery endothelial cells // Biochim. Biophys. Acta. 1992. V. 1134. P. 61-72.
- Lustig K.D., Shiau A.K., Brake A.J., Julius D. Expression cloning of an ATP receptor from mouse neuroblastoma cells // Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1993. V. 90. P. 5113-5117.
- 149. Lvova I., Sharlo K., Vilchinskaya N., Sidorenko D., Sharlo D., Shenkman B. Accumulation of high-energy phosphates blocks the expression of mitochondrial biogenesis markers and slow-type myosin in soleus muscle under 24 hours of rat hindlimb suspension // Life Sci. Space Res. (Amst). 2023. V. 38. P. 8-18. doi: 10.1016/j.lssr.2023.04.003
- 150. Lynge J., Hellsten Y. Distribution of Adenosine A1, A2A and A2B Receptors in Human Skeletal Muscle: Adenosine Receptors in Human Skeletal Muscle // Acta Physiol. Scand. 2000. V. 169. P. 283–290.
- 151. MacVicar B. A., Thompson, R. J. Non-junction functions of pannexin-1 channels // Trends Neurosci. 2010. V. 33. P. 93–102. doi: 10.1016/j.tins.2009.11.007
- 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.
- Martinello T., Baldoin M.C., Morbiato L., Paganin M., Tarricone E., Schiavo G., Bianchini E., Sandona D., Betto R. Extracellular ATP signaling during differentiation of C2C12 skeletal muscle cells: role in proliferation // Mol. Cell Biochem. 2011. V. 351. P. 183–196.
- 154. Mathew T.S., Ferris R.K., Downs R.M., Kinsey S.T., Baumgarner B.L. Caffeine promotes autophagy in skeletal muscle cells by increasing the calcium-dependent

activation of AMP-activated protein kinase // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2014. V. 453. № 3. P. 411–418. doi: 10.1016/j.bbrc.2014.09.094

- 155. Matsui T., Nagoshi T., Rosenzweig A. Akt and PI 3-kinase signaling in cardiomyocyte hypertrophy and survival // Cell Cycle. 2003. V. 2. № 3. P. 220-223.
- 156. May C., Weigl L., Karel A., Hohenegger M. Extracellular ATP activates ERK1/ERK2 via a metabotropic P2Y1 receptor in a Ca2+ independent manner in differentiated human skeletal muscle cells // Biochem. Pharmacol. 2006. V. 71. № 10. P. 1497–1509. doi: 10.1016/j.bcp.2006.02.003
- 157. Medina R., Wing S.S., Haas A., Goldberg A.L. Activation of the ubiquitin-ATPdependent proteolytic system in skeletal muscle during fasting and denervation atrophy // Biomedica Biochimica Acta. 1991. V. 50. № 4–6. P. 347–356.
- 158. Menconi M.J., Wei W., Yang H., Wray C.J., Hasselgren P.O. Treatment of cultured myotubes with the calcium ionophore A23187 increases proteasome activity via a CaMK II-caspase-calpain-dependent mechanism // Surgery. 2004. V. 136. № 2. P. 135-142.
- 159. Meyer M.P., Clarke J.D., Patel K., Townsend-Nicholson A., Burnstock G. Selective expression of purinoceptor cP2Y1 suggests a role for nucleotide signaling in development of the chick embryo // Dev. Dyn. 1999. V. 214. P. 152–158.
- 160. 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. I. 3. P. 1011-1020. doi: 10.1159/000447808
- Mirzoev T.M., Shenkman B.S. Regulation of Protein Synthesis in Inactivated Skeletal Muscle: Signal Inputs, Protein Kinase Cascades, and Ribosome Biogenesis // Biochemistry (Mosc.) 2018. V. 83. P. 1299–1317. doi: 10.1134/S0006297918110020
- 162. Moresi V., Williams A.H., Meadows E., Flynn J.M., Potthoff M.J., McAnally J., Shelton J.M., Backs J., Klein W.H., Richardson J.A., Bassel-Duby R., Olson E.N. Myogenin and class II HDACs control neurogenic muscle atrophy by inducing E3 ubiquitin ligases // Cell. 2010. V. 143. № 1. P. 35-45. doi: 10.1016/j.cell.2010.09.004

- 163. Morey-Holton E., Globus R.K., Kaplansky A., Durnova G. The hindlimb unloading rat model: literature overview, technique update and comparison with space flight data // Adv. Space Biol. Med. 2005. V. 10. P. 7–40. doi: 10.1016/s1569-2574(05)10002-1
- 164. Morey-Holton E.R., Globus R.K. Hindlimb unloading rodent model: technical aspects // J. Appl. Physiol. 2002. V. 92. № 4. P. 1367-1377. doi: 10.1152/japplphysiol.00969.2001
- 165. Nakanishi A., Hatano N., Fujiwara Y., Sha'ri A., Takabatake S., Akano H., Kanayama N., Magari M., Nozaki N., Tokumitsu H. AMP-activated protein kinase-mediated feedback phosphorylation controls the Ca2+/calmodulin (CaM) dependence of Ca2+/CaM dependent protein kinase kinase // Journal of Biological Chemistry. 2017. V. 292. P. 19804-19813.
- 166. Nakao R., Hirasaka K., Goto J., Ishidoh K., Yamada C., Ohno A., Okumura Y., Nonaka I., Yasutomo K., Baldwin K.M., Kominami E., Higashibata A., Nagano K., Tanaka K., Yasui N., Mills E.M., Takeda S., Nikawa T. Ubiquitin ligase Cblb is a negative regulator for insulin-like growth factor 1 signaling during muscle atrophy caused by unloading // Mol. Cell Biol. 2009. V. 29. P. 4798–4811. doi: 10.1128/MCB.01347-08
- 167. Navis K. E., Fan C. Y., Trang T., Thompson R. J., Derksen D. J. Pannexin 1 Channels as a Therapeutic Target: Structure, Inhibition, and Outlook // ACS Chemical Neuroscience. 2020. V. 11. I. 15. P. 2163-2172
- 168. Nicke A., Baumert H.G., Rettinger J., Eichele A., Lambrecht G., Mutschler E., Schmalzing G. P2X1 and P2X3 receptors form stable trimers: A novel structural motif of ligand-gated ion channels // EMBO J. 1998. V. 17. I. 11. P. 3016–3028.
- 169. North R.A. Molecular physiology of P2X receptors // Physiological Reviews. 2002.V. 82. I. 4. P. 1013–1067.
- 170. Novikov V.E., Ilyin E.A. Age-related reactions of rat bones to their unloading // Aviat. Space Environ. Med.. 1981. V. 52. № 9. P. 551-553.
- 171. Ohira Y, Yasui W., Kariya F., Wakatsuki T., Nakamura K., Asakura T., Edgerton V.R. Metabolic adaptation of skeletal muscles to gravitational unloading // Acta Astronaut. 1994. V. 33. P. 113–117. doi: 10.1016/0094-5765(94)90115-5

- 172. Osorio-Fuentealba C., Contreras-Ferrat A.E., Altamirano F., Espinosa A., Li Q., Niu W., Lavandero S., Klip A., Jaimovich E. Electrical stimuli release ATP to increase GLUT4 translocation and glucose uptake via PI3Kγ-Akt-AS160 in skeletal muscle cells // Diabetes. 2013. V. 62.№ 5. P. 1519-1526. doi: 10.2337/db12-1066
- 173. Palmer R.K., Boyer J.L., Schacter J.B., Nicolas R.A., Harden T.K. Agonist action of adenosine triphosphates at the human P2Y1 receptor // Mol. Pharmacol. 1998. V. 54. P. 1118-1123.
- 174. Pap M., Cooper G.M. Role of translation initiation factor 2B in control of cell survival by the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/glycogen synthase kinase 3beta signaling pathway // Mol. Cell. Biol. 2002. V. 22. P. 578–586. doi: 10.1128/MCB.22.2.578-586.2002
- 175. Park S., Scheffler T.L., Gerrard D.E. Chronic high cytosolic calcium decreases AICARinduced AMPK activity via calcium/calmodulin activated protein kinase II signaling cascade // Cell Calcium. 2011. V. 50. P. 73-83.
- 176. Parr C.E., Sullivan D.M., Paradiso A.M., Lazarowski E.R., Burch L.H., Olsen J.C., Erb L., Weisman G.A., Boucher R.C., Turner J.T. Cloning and expression of a human P2U nucleotide receptor, a target for cystic-fibrosis pharmacotherapy // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1994. V. 91. P. 3275-3279.
- 177. Pearson P.J., Evora P.R., Schaff H.V. Bioassay of EDRF from internal mammary arteries: implications for early and late bypass graft patency // Ann. Thor. Surg. 1992. V. 54. P. 1078-1084.
- 178. Penuela S.; Gehi R.; Laird D.W. The biochemistry and function of pannexin channels// Biochim. Biophys. Acta Biomembr. 2013. V. 1828. P. 15–22.
- Pette D., Staron R.S. Mammalian skeletal muscle fiber type transitions // Int. Rev. Cytol. 1997. V. 170. P. 143–223.
- Pfaffl, M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR // Nucleic Acids Res. 2001. V. 29. e45.
- Ponticos M. Dual Regulation of the AMP-Activated Protein Kinase Provides a Novel Mechanism for the Control of Creatine Kinase in Skeletal Muscle // EMBO J. 1998. V. 17. P. 1688–1699.

- 182. Prochnow N., Abdulazim A., Kurtenbach S., Wildförster V., Dvoriantchikova G., Hanske J., Petrasch-Parwez E., Shestopalov V.I., Dermietzel R., Manahan-Vaughan D., Zoidl G.. Pannexin1 stabilizes synaptic plasticity and is needed for learning // PLoS One. 2012. V. 7. № 12. e51767. doi: 10.1371/journal.pone.0051767
- Proud C.G. Peptide chain elongation in eukaryotes // Mol. Biol. Rep. 1994. V. 19. P. 161–170.
- 184. Rackauskas M., Neverauskas V., Skeberdis V.A.\ Diversity and properties of connexin gap junction channels // Medicina (Kaunas) 2010. V. 46. P. 1–12.
- 185. Rameh L.E., Rhee S.G., Spokes K., Kazlauskas A., Cantley L.C., Cantley L.G. Phosphoinositide 3-kinase regulates phospholipase Cγ-mediated calcium signaling // J. Biol. Chem. 1998. V. 273. P. 23750–23757.
- 186. Raney M.A., Turcotte L.P. Evidence for the involvement of CaMKII and AMPK in Ca2+-dependent signaling pathways regulating FA uptake and oxidation in contracting rodent muscle // J. Appl. Physiol. 2008. V. 104. P. 1366–1373.
- 187. Ray A., Zoidl G., Wahle P., Dermietzel R.Pannexin expression in the cerebellum // Cerebellum. 2006. V. 5. P. 189–192.
- Riquelme M.A., Cea L.A., Vega J.L., Boric M.P., Monyer H., Bennett M.V., Frank M., Willecke K., Saez J.C. The ATP required for potentiation of skeletal muscle contraction is released via pannexin hemichannels // Neuropharmacology. 2013. V. 75. P. 594–603. doi: 10.1016/j.neuropharm.2013.03.022
- 189. Robertson H.; Hayes J.D.; Sutherland C. A partnership with the proteasome; the destructive nature of GSK3 // Biochem. Pharmacol. 2017. V. 147. P. 77–92.
- 190. Roch-Ramel F., Guisan B., Diezi J. Effects of uricosuric and anti-uricosuric agents on urate transport in human brush-border membrane vesicles // J. Pharmacol. Exp. Ther. 1997. V. 280. P. 839–845.
- 191. 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 PI3K/Akt/mTOR and PI3K/ Akt/GSK3 pathways // Nat. Cell Biol. 2001. V. 3. P. 1009–1013.

- 192. Rose A.J., Alsted T.J., Jensen T.E., Kobberø J.B., Maarbjerg S.J., Jensen J., Richter E.A. A Ca(2+)-calmodulin-eEF2K-eEF2 signalling cascade, but not AMPK, contributes to the suppression of skeletal muscle protein synthesis during contractions // J. Physiol. 2009. V. 587. P. 1547–1563. doi: 10.1113/jphysiol.2008.167528
- Rose A.J., Kiens B., Richter E.A. Ca2+-calmodulin-dependent protein kinase expression and signalling in skeletal muscle during exercise // J. Physiol. 2006. V. 574. P. 889–903.
- 194. Rostas J.A.P., Skelding, K.A. Calcium/Calmodulin-Stimulated Protein Kinase II (CaMKII): Different Functional Outcomes from Activation, Depending on the Cellular Microenvironment // Cells. 2023. V. 12. P. 401.
- 195. Roux P.P., Shahbazian D., Vu H., Holz M.K., Cohen M.S., Taunton J., Sonenberg N., Blenis J. RAS/ERK signaling promotes site-specific ribosomal protein S6 phosphorylation via RSK and stimulates cap-dependent translation // J. Biol. Chem. 2007. V. 282. P. 14056–14064.
- 196. Ruppelt A., Ma W., Borchardt K., Silberberg S. D., Soto F. Genomic structure, developmental distribution and functional properties of the chicken P2X(5) receptor // J. Neurochem. 2001. V. 77. P. 1256–1265.
- 197. Ryazanov A.G., Davydova E.K. Mechanism of elongation factor 2 (EF2) inactivation upon phosphorylation. Phosphorylated EF2 is unable to catalyze translocation // FEBS Lett. 1989. V. 251. P. 187–190.
- 198. Ryazanov A.G., Spirin A.S. Phosphorylation of elongation factor 2: a key mechanism regulating gene expression in vertebrates // New Biol. 1990. V. 2. P. 843–850.
- Ryten M., Hoebertz A., Burnstock G. Sequential expression of three receptor subtypes for extracellular ATP in developing rat skeletal muscle // Dev. Dyn. 2001. V. 221. P. 331–341.
- 200. Sacheck J.M., Hyatt J.P., Raffaello A., Jagoe R.T., Roy R.R., Edgerton V.R., Lecker S.H., Goldberg A.L. Rapid disuse and denervation atrophy involve transcriptional changes similar to those of muscle wasting during systemic diseases // FASEB J. V. 21. P. 140–155.
- 201. Sacramento J.F., Martins F.O., Rodrigues T., Matafome P., Ribeiro M.J., Olea E., Conde S.V. A2 Adenosine Receptors Mediate Whole-Body Insulin Sensitivity in a Prediabetes Animal Model: Primary Effects on Skeletal Muscle // Front. Endocrinol. 2020. V. 11. P. 262.
- 202. Sandri M. Signaling in muscle atrophy and hypertrophy // Physiology. 2008. V. 23.
   № 3. P. 160–170.
- 203. Sandri M., Sandri C., Gilbert A., Skurk C., Calabria E., Picard A., Walsh K., Schiaffino S., Lecker S.H., Goldberg A.L. Foxo transcription factors induce the atrophyrelated ubiquitin ligase atrogin-1 and cause skeletal muscle atrophy // Cell. 2004. V. 117. P. 399–412.
- Sciancalepore M., Luin E., Parato G., Ren E., Giniatullin R., Fabbretti E., Lorenzon P. Reactive oxygen species contribute to the promotion of the ATP-mediated proliferation of mouse skeletal myoblasts // Free Radic. Biol. Med. 2012. V. 53. P. 1392–1398.
- 205. Shenkman B.S. How Postural Muscle Senses Disuse? Early Signs and Signals // Int.
  J. Mol. Sci. 2020. V. 21. № 14. P. 5037. doi: 10.3390/ijms21145037
- 206. Shenkman B.S., Nemirovskaya T.L. Calcium-dependent signaling mechanisms and soleus fiber remodeling under gravitational unloading // J. Muscle Res. Cell Motil. 2008.
  V. 29. P. 221-230. doi: 10.1007/s10974-008-9164-7
- 207. Shestopalov V.I.; Panchin Y. Pannexins and gap junction protein diversity // Experientia. 2007. V. 65. P. 376–394.
- 208. Silverman W., Locovei S., Dahl G. Probenecid, a gout remedy, inhibits pannexin 1 channels // American Journal of Physiology-Cell Physiology. 2008. V. 295. I. 3, P. 761-767.
- 209. Soto F., Garcia-Guzman M., Karschin C., Stühmer W. Cloning and tissue distribution of a novel P2X receptor from rat brain // Biochemical and Biophysical Research Communication. 1996. V. 223. I. 2. P. 456–460.
- Stelmashenko O., Lalo U., Yang Y., Bragg L., North R.A., Compan V. Activation of trimeric P2X2 receptors by fewer than three ATP molecules // Molecular Pharmacology. 2012. V. 82. I. 4. P. 760–766.

- 211. Stephens L.R., Eguinoa A., Erdjument-Bromage H., Lui M., Cooke F., Coadwell J., Smrcka A.S., Thelen M., Cadwallader K., Tempst P., Hawkins P.T. The G beta gamma sensitivity of a PI3K is dependent upon a tightly associated adaptor, p101 // Cell. 1997.
  V. 89. № 1. P. 105-114. doi: 10.1016/s0092-8674(00)80187-7
- Stevens L., Mounier Y. Ca2+ movements in sarcoplasmic reticulum of rat soleus fibers after hindlimb suspension // Journal of Applied Physiology. 1992. V. 72. I. 5. P. 1735-1740.
- 213. Stouth D.W., Manta A., Ljubicic V. Protein arginine methyltransferase expression, localization, and activity during disuse-induced skeletal muscle plasticity // Am. J. Physiol. Cell Physiol. 2018. V. 314. № 2. P. 177–190. doi: 10.1152/ajpcell.00174.2017
- 214. Stouth D.W., van Lieshout T.L., Ng S.Y., Webb E.K., Manta A., Moll Z., Ljubicic V. CARM1 Regulates AMPK Signaling in Skeletal Muscle // iScience. 2020. V. 23. № 11.
  P. 101755. doi: 10.1016/j.isci.2020.101755
- 215. Su J.D., Mayo L.D., Donner D.B., Durden D.L. PTEN and phosphatidylinositol 3'kinase inhibitors up-regulate p53 and block tumor-induced angiogenesis: evidence for an effect on the tumor and endothelial compartment // Cancer Res. 2003. V. 63. № 13. P. 3585-3592.
- 216. Suire S., Coadwell J., Ferguson G.J., Davidson K., Hawkins P., Stephens L. p84, a new Gbetagamma-activated regulatory subunit of the type IB phosphoinositide 3-kinase p110gamma // Curr. Biol. 2005. V. 15. № 6. P. 566-570. doi: 10.1016/j.cub.2005.02.020
- 217. Sun D., Samuelson L.C., Yang T., Huang Y., Paliege A., Saunders T., Briggs J., Schnermann J. Mediation of tubuloglomerular feedback by adenosine: evidence from mice lacking adenosine 1 receptors // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2001. V. 98. I. 17. P. 9983-9988. doi: 10.1073/pnas.171317998
- 218. Sun H., Sun J., Li M., Qian L., Zhang L., Huang Z., Shen Y., Law B.Y., Liu L., Gu X. Transcriptome Analysis of Immune Receptor Activation and Energy Metabolism Reduction as the Underlying Mechanisms in Interleukin-6-Induced Skeletal Muscle Atrophy // Front. Immunol. 2021. V. 12. P. 730070. doi: 10.3389/fimmu.2021.730070

- 219. Szigeti G.P., Szappanos H., Deli T., Cseri J., Kovács L., Csernoch L. Differentiationdependent alterations in the extracellular ATP-evoked calcium fluxes of cultured skeletal muscle cells from mice. Pflugers Arch. 2007. V. 453. P. 509–518.
- 220. Taillandier D., Aurousseau E., Meynial-Denis D., Bechet D., Ferrara M., Cottin P., Ducastaing A., Bigard X., Guezennec C.Y., Schmid H.P., Attaix D. Coordinate activation of lysosomal, Ca 2+-activated and ATP-ubiquitin-dependent proteinases in the unweighted rat soleus muscle // Biochem J. 1996. V. 316 (Pt 1). P. 65-72. doi: 10.1042/bj3160065
- 221. Theeuwes W.F., Gosker H.R., Schols A.M.W.J., Langen R.C.J., Remels A.H.V. Regulation of PGC-1α expression by a GSK-3β-TFEB signaling axis in skeletal muscle
  // Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell. Res. 2020. V. 1867. P. 118610. doi: 10.1016/j.bbamcr.2019.118610
- 222. Thomason D.B., Booth F.W. Atrophy of the soleus muscle by hindlimb unweighting //Journal of Applied Physiology. 1990. V. 68. no. 1. P. 1–12.
- 223. Thompson R.J., Zhou N., MacVicar B.A. Ischemia opens neuronal gap junction hemichannels // Science. 2006. V. 312. № 5775. P. 924-927.
- 224. Thomson D.M., Fick C.A., Gordon S.E. AMPK activation attenuates S6K1, 4E-BP1, and eEF2 signaling responses to high-frequency electrically stimulated skeletal muscle contractions // J. Appl. Physiol. 2008. V. 104. P. 625–632.
- 225. Tidball J.G., Spencer M.J. Expression of a calpastatin transgene slows muscle wasting and obviates changes in myosin isoform expression during murine muscle disuse // Journal of Physiology. 2002. V. 545. № 3. P. 819–828.
- 226. Tintignac L.A., Lagirand J., Batonnet S., Sirri V., Leibovitch M.P., Leibovitch S.A. Degradation of MyoD mediated by the SCF (MAFbx) ubiquitin ligase // The Journal of Biological Chemistry. 2005. V. 280. № 4. P. 2847–2856.
- 227. Tokuyama Y., Hara M., Jones E.M.C., Fan Z., Bell G.I. Cloning of rat and mouse P2Y purinoceptors // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1995. V. 211. P. 211-218.
- 228. Tyganov S.A., Mochalova E.P., Belova S.P., Sharlo K.A., Rozhkov S.V., Vilchinskaya N.A., Paramonova I.I., Mirzoev T.M., Shenkman B.S. Effects of plantar mechanical stimulation on anabolic and catabolic signaling in rat postural muscle under

short-term gravitational unloading // Front. Physiol. 2019. V. 10. P. 1252. doi: 10.3389/fphys.2019.01252

- 229. Valladares D., Almarza G., Pavez M., Jaimovich E. ATP release is altered in a mouse model for Duchenne Muscular Dystrophy and signals for proteins that promote cell death // FASEB J. 2012. V. 26. P. 798–823.
- 230. Vanhaesebroeck B., Guillermet-Guibert J., Graupera M., Bilanges B. The emerging mechanisms of isoform-specific PI3K signalling // Nat. Rev. Mol. Cell Biol.2010. V. 11.
  P. 329–341. doi: 10.1038/nrm2882
- 231. Vanhaesebroeck B., Leevers S.J., Ahmadi K., Timms J., Katso R., Driscoll P.C., Woscholski R., Parker P.J., Waterfield M.D. Synthesis and function of 3-phosphorylated inositol lipids // Annu. Rev. Biochem. 2001. V. 70. P. 535-602. doi: 10.1146/annurev.biochem.70.1.535
- Ventadour S., Attaix D. Mechanisms of skeletal muscle atrophy // Curr. Opin. Rheumatol. 2006. V. 1. P. 631–635.
- 233. Verhees K.J.P., Schols A.M.W.J., Kelders M.C.J.M., Op den Kamp C.M.H., van der Velden J.L.J., Langen R.C.J. Glycogen synthase kinase-3β is required for the induction of skeletal muscle atrophy // American Journal of Physiology-Cell Physiology. 2011. V. 301. I. 5. P. 995-1007.
- 234. Vilchinskaya N.A., Krivoi I.I., Shenkman B.S. AMP-Activated Protein Kinase as a Key Trigger for the Disuse-Induced Skeletal Muscle Remodeling // Int. J. Mol. Sci. 2018.
  V. 19. № 11. P. 3558. doi: 10.3390/ijms19113558
- 235. 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. № 23. P. 7123–7134. doi: 10.1113/JP275184.
- 236. Voss A.A. Extracellular ATP inhibits chloride channels in mature mammalian skeletal muscle by activating P2Y1 receptors // J. Physiol. 2009. V. 587. P. 5739–5752.
- 237. Wakatsuki T., Ohira Y., Yasui W., Nakamura K., Asakura T., Ohno H., Yamamoto M. Responses of contractile properties in rat soleus to high-energy phosphates and/or unloading // Jpn. J. Physiol. 1994. V. 44. P. 193–204. doi: 10.2170/jjphysiol.44.193

- 238. Walas H., Juel C.Purinergic activation of rat skeletal muscle membranes increases Vmax and Na + affinity of the Na, K-ATPase and phosphorylates phospholemman and α1 subunits // Pflugers Arch. 2012. V. 463. P. 319–326.
- 239. Waldo G.L., Corbitt J., Boyer J.L., Ravi G., Kim H.S., Ji H.D., Lacy J., Jacobson K.A., Harden T.K. Quantification of the P2Y1 receptor with a high affinity radiolabeled antagonist // Mol. Pharmacol. 2002. V. 62. P. 1249-1257.
- 240. Waldo G.L., Harden T.K. Agonist binding and Gq-stimulating activities of the purified human P2Y1 receptor // Mol. Pharmacol. 2004. V. 65. P. 426-436.
- 241. Warren G.L., Hulderman T., Liston A., Simeonova P.P. Toll-like and Adenosine Receptor Expression in Injured Skeletal Muscle // Muscle Nerve. 2011. V. 44. P. 85–92.
- 242. Webb T.E., Simon J., Krishek B.J., Bateson A.N., Smart T.G., King B.F., Burnstock G., Barnard E.A. Cloning and functional expression of a brain G-protein-coupled ATP receptor // FEBS Lett. 1993. V. 324. P. 219-225.
- 243. Welch B.D., Carlson N.G., Shi H., Myatt L., Kishore B.K. P2Y2 receptor-stimulated release of prostaglandin E2 by rat inner medullary collecting duct preparations // Am. J. Physiol. 2003. V. 285. P. 711-721.
- 244. Witczak C.A., Sharoff C.G., Goodyear L.J. AMP-activated protein kinase in skeletal muscle: From structure and localization to its role as a master regulator of cellular metabolism // Cell. Mol. Life Sci. 2008. V. 65. P. 3737–3755.
- 245. Wright N.A., Wilcox S.H., Thomson D.M. Month-Long AICAR Treatment Reverses Age-Related mTOR Pathway Hyperactivity // FASEB J. 2019. V. 33. P. 539.9.
- 246. Xing M., Post S., Ostrom R.S., Samardzija M., Insel P.A. Inhibition of phospholipase A2-mediated arachidonic acid release by cyclic AMP defines a negative feedback loop for P2Y receptor activation in Madin-Darby canine kidney D1 cells // J. Biol. Chem. 1999. V. 274. P. 10035-10038.
- 247. Xu J., Weng Y.I., Simonyi A., Krugh B.W., Liao Z., Weisman G.A., Sun G.Y., Simonyi A. Role of PKC and MAPK in cytosolic PLA2 phosphorylation and arachidonic acid release in primary murine astrocytes // J. Neurochem. 2002. V. 83. P. 259-270.
- 248. Yakabe M., Ogawa S., Ota H., Iijima K., Eto M., Ouchi Y., Akishita M. Inhibition of interleukin-6 decreases atrogene expression and ameliorates tail suspension-induced

skeletal muscle atrophy // PLoS One. 2018. V. 13. № 1. e0191318. doi: 10.1371/journal.pone.0191318