

ВКЛАД АКТИВНОСТИ SERCA В ИЗМЕНЕНИЕ СОКРАТИТЕЛЬНЫХ
ХАРАКТЕРИСТИК *M. SOLEUS* КРЫС ПРИ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ РАЗГРУЗКЕ

© 2023 г. К. А. Шарло¹, И. Д. Львова¹, С. А. Тыганов¹, К. А. Зарипова¹,
С. П. Белова¹, Т. Л. Немировская¹, *

¹Институт медико-биологических проблем, Москва, Россия

*E-mail: Nemirovskaya@bk.ru

Поступила в редакцию 05.05.2023 г.

После доработки 29.05.2023 г.

Принята к публикации 29.05.2023 г.

Нарушение функций скелетных мышц и их атрофия при функциональной разгрузке сопровождаются накоплением избыточного кальция в миоплазме мышечных волокон. Мы предположили, что накопление кальция может происходить, кроме прочих механизмов, из-за ингибирования работы Ca^{2+} -АТФазы сарко/эндоплазматического ретикулума (SERCA) при разгрузке мышц. В этом случае применение активатора SERCA будет снижать уровень кальция в миоплазме и предотвращать последствия функциональной разгрузки. Самцы крыс были распределены на 3 группы – виварный контроль с введением плацебо (С, $n = 8$), группа 7-суточного вывешивания с введением плацебо (7HS, $n = 8$) и группа 7-суточного вывешивания с введением внутрибрюшинно активатора SERCA CDN1163 (50 мг/кг (7HS+CDN), $n = 8$). Одну *m. soleus* каждой крысы замораживали в жидком азоте, вторую тестировали на функциональные свойства. В группе 7HS обнаружили повышенную утомляемость *soleus* в тесте *ex vivo*, существенное увеличение мРНК и количества быстрых мышечных волокон, рост уровня кальций-зависимого фосфорилирования СаМК II и уровня окисления тропониона, а также снижение содержания митохондриальной ДНК и белка. Все эти изменения были предотвращены в группе с введением активатора SERCA CDN1163. Вывод: 7-суточное введение активатора SERCA предотвращает снижение индекса утомления *m. soleus*, вероятно, за счет предотвращения снижения количества волокон I типа и маркеров митохондриального биогенеза. Введение активатора SERCA не замедляет развития атрофии *m. soleus*.

Ключевые слова: функциональная разгрузка *m. soleus*, атрофия, утомляемость *m. soleus*, типы мышечных волокон, NFATC1, митохондриальная ДНК, митохондриальный $\frac{1}{2}$

DOI: 10.31857/S0869813923070117, **EDN:** XILLSY

ВВЕДЕНИЕ

При длительной гипокинезии, гравитационной разгрузке, иммобилизации конечности, а также при длительном лишении человека обычной двигательной активности скелетные мышцы подвергаются атрофии в результате нарушения баланса между синтезом и деградацией белка. Параллельно с развитием атрофических процессов при функциональной разгрузке в мышцах снижается содержание митохондриальных белков и ДНК [1–3], и происходит изменение паттерна экспрессии миозиновых генов, что ведет к повышению доли “быстрых” гликолитических во-

локон, обладающих слабой устойчивостью к утомлению [4–7]. В результате происходит снижение работоспособности мышц.

При ряде моделей функциональной разгрузки скелетных мышц было обнаружено повышение уровня кальция в миоплазме [8–10]. Этот эффект связывают с нарушением функций Na,K-АТФазы и деполяризацией сарколеммы на ранних этапах разгрузки, которое приводит к активации дигидропиридиновых каналов и входу кальция в миоплазму через рианодиновые рецепторы [11]. Избыточное накопление кальция в миоплазме наблюдается также при ряде патологических состояний скелетных мышц, например, при миодистрофии Дюшенна и при старении [12, 13]. Высокий уровень кальция в миоплазме может способствовать активации кальций-зависимых протеаз кальпаинов, что ведет к усилению протеолиза [12, 13], а также провоцировать нарушение функций митохондрий [14]. Нарушение кальциевого гомеостаза в скелетной мышце также приводит к изменениям в экспрессии генов, включая маркеры протеолиза и гены, определяющие тип мышечного волокна (“быстрый” или “медленный”) [15, 16].

Известно, что ключевую роль в удалении кальция из миоплазмы играет SERCA (Ca^{2+} -АТФаза сарко/эндоплазматического ретикулума), которая откачивает ионы кальция из миоплазмы в саркоплазматический ретикулум (СПР). В условиях функциональной разгрузки скелетных мышц функция SERCA нарушается. Обнаружено снижение интенсивности закачивания ионов кальция в СПР на фоне иммобилизации мышц и денервации [17]. Ранее также показано, что в условиях функциональной разгрузки мышц наблюдается изменение паттерна экспрессии изоформ SERCA, что может приводить к изменениям в перераспределении ионов кальция между СПР и миоплазмой [18–20].

Избыточное накопление кальция в миоплазме способно также приводить к накоплению активных форм кислорода, которые, в свою очередь, нарушают функционирование рианодиновых каналов, что ведет к истощению кальциевого депо СПР и повышению утомляемости мышц: данный механизм был описан для условий старения, а также для трансгенных животных [21–25]. Поскольку в условиях функциональной разгрузки скелетных мышц также наблюдается избыточное накопление кальция и активных форм кислорода в миоплазме [26, 27], нельзя исключать, что кальций-зависимые процессы вносят вклад в повышение утомляемости и в этих условиях. Это подтверждается и недавней работой, где обнаружено функциональное взаимодействие между SERCA и митохондриальным окислительным фосфорилированием [28]. В этой работе также показано предотвращение развития утомления *m. soleus* при введении мышам пищевого нитрата в качестве активатора SERCA.

Мы предположили, что при функциональной разгрузке в камбаловидной мышце происходит снижение функций SERCA, что может быть причиной избыточного накопления ионов кальция в миоплазме. В свою очередь, кальций активирует сигнальные пути, запускающие процессы протеолиза и трансформации миозинового фенотипа в “быструю” сторону, и способствует снижению устойчивости мышцы к утомлению. Камбаловидная мышца принимает участие в ходьбе и беге, у человека она отвечает за поддержание вертикального положения тела в пространстве и является особенно подверженной негативным изменениям, происходящим при функциональной разгрузке, поэтому эта мышца была выбрана для исследования в данной работе [29].

Для проверки гипотезы о роли снижения активности SERCA при ограничении функциональной активности мышц в регуляции клеточных сигнальных путей и снижении сократительных характеристик мышц был применен CDN1163 (специфический аллостерический активатор насоса SERCA) в модели вывешивания крыс по Morey-Holton. Если наша гипотеза верна, активирование SERCA при функцио-

нальной разгрузке *soleus* должна привести к снижению утомляемости и изменению паттерна миозинового фенотипа.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Проведение эксперимента

Функциональная разгрузка моделировалась вывешиванием задних конечностей по стандартной методике Ильина–Новикова в модификации Morey-Holton [30]. Вывешивание проводилось 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. Пищу и воду животные получали *ad libitum*. Взято 24 самца крыс Wistar массой 180–200 г в возрасте 2.5 мес. Активатор SERCA CDN1163 (InvivoChem, cat. V17787, Китай) вводился в дозе 50 мг/кг в 10%-ном растворе DMSO, 10%-ном Tween 80 в 0.9%-ном растворе NaCl, как было описано ранее [31].

Животные были распределены на 3 группы – виварный контроль с введением плацебо (С, $n = 8$), группа вывешивания с введением плацебо (7HS, $n = 8$) и группа вывешивания с введением CDN1163 (7HS + CDN, $n = 8$). Через 7 дней эксперимента крыс наркотизировали авертином (5 мл/кг веса 10%-ного раствора), выделяли *m. soleus*, одну из них немедленно замораживали в жидком азоте и хранили при -85°C , вторую использовали для определения утомляемости в *ex vivo* тесте. Эвтаназия крыс осуществлялась введением сверхдозы авертина (10 мл/кг массы тела 10%-ного раствора).

Определение утомляемости m. soleus крыс

Камбаловидные мышцы экспериментальных животных были помещены в охлажденный раствор Рингера–Кребса с постоянным продуванием 95%-ным карбогеном (95% O_2 + 5% CO_2) и инкубированы в течение 15 мин. В это время на сухожилиях были завязаны узлы, необходимые для крепления мышцы. После 15 мин мышца была помещена в ванночку для теста с фиксированной температурой 37°C , прикреплена за сухожилия к датчику силы с одного конца и к фиксированному крючку с другого, после чего была определена оптимальная длина мышцы с помощью подачи короткого электрического импульса (супра-максимальные квадратные импульсы прямоугольной формы 1 мс, 20 В) и замера силы сокращения мышцы (наибольшая сила одиночного сокращения соответствует оптимальной длине мышцы (L0) [32, 32]. L0 была измерена с помощью цифрового штангенциркуля. После одиночных сокращений был проведен тест на тетаническое изометрическое сокращение. Мышца была установлена на длину L0, после чего была начата стимуляция (1-миллисекундные квадратные импульсы прямоугольной формы, 40 Гц, продолжительность стимуляции 2 с), в процессе чего фиксировалась максимальная сила тетанического сокращения. Для тестирования индекса утомления камбаловидной мышцы проводилась серия из 20 тетанических сокращений за 1 мин, с перерывом в 1 с между сокращениями. За индекс утомления принималась сила последнего сокращения, поделенная на силу первого сокращения [33–35]. Показатели нормировали на физиологическое поперечное сечение мышцы (pCSA). Измерение силовых показателей проводили с помощью Aurora Scientific Dual Mode Lever System 305C-LR (Aurora Scientific, США) с частотой сбора данных 10 кГц. Обработку данных проводили с помощью программного обеспечения Aurora Scientific 615A Analysis Software Suite.

Электрофорез и Вестерн-блоттинг

Анализ содержания белков-маркеров в *m. soleus* проводился с помощью электрофореза с последующим Вестерн-блоттингом.

Для этого с каждого из образцов *m. soleus* были сделаны срезы толщиной 20 мкм (40–60 мг) на микротоме-криостате фирмы Leica. Для выделения тотальной фракции белка с образца *m. soleus* были сделаны срезы толщиной 20 мкм (10–15 мг) и немедленно прогомогенизированы в шариковом гомогенизаторе TissueLyser LT (QIAGEN, Германия) в течение 25 мин в 100 мкл лизирующего буфера RIPA (Santa-Cruz, США), содержащего (в мМ) 50 Tris (pH 7.4), 150 NaCl, 0.1% Triton X-100, 0.1% SDS, 5 EDTA (pH 8.0) 1 DTT, 1 PMSF, 1 Na₃VO₄, 1 PMSF, апротинин (10 мкг/мл), леупептин (10 мкг/мл), пепстатин А (10 мкг/мл), протеазный ингибиторный коктейль (Santa-Cruz, США) и фосфатазный ингибиторный коктейль (Santa-Cruz, США). Затем образцы центрифугировали при 20000 g в течение 15 мин. Супернатант отбирали, разаликвотировали и убирали на хранение при –85°C. Для определения уровня окисленного и тотального тропомиозина проводили выделение белка с помощью реагента RIPA фирмы Cell signaling Technology с добавлением 1 мМ PMSF, протеазного ингибиторного коктейля (Santa-Cruz, США) и фосфатазного ингибиторного коктейля (Santa-Cruz, США).

Часть мышечных лизатов отбирали для определения концентрации общего белка с помощью реактива Бредфорда (Bio-Rad Laboratories, США). Определения проводились на планшетном фотометре Epoch при длине волны 595 нм. Пробы для нанесения разводились в 2-кратном Laemly-буфере для образцов (5.4 мМ Tris-HCl, pH 6.8, 4%-ный Ds-Na, 20%-ный глицерин, 10%-ный β-меркаптоэтанол, 0.02%-ный бромфеноловый синий) за исключением проб для анализа уровня окисленного тропомиозина, которые разводили в 2-кратном Laemly-буфере без добавления меркаптоэтанол. Заливку и подготовку ПААГ гелей проводили с помощью заливочных столов и стекол фирмы “Bio-Rad Laboratories”. Гели устанавливали в камеры mini-Protean 3 Cell “Bio-Rad Laboratories”. Электрофорез проводили в 10%-ном разделяющем 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 TEMED) 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 TEMED). 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 и маркерами молекулярных весов. Образцы загружались из расчета 20 мкг общего белка на дорожку и нормировались относительно уровня GAPDH, содержащегося в той же пробе. Электрофорез проводился при 15 мА на гель в мини-системе (“Bio-Rad Laboratories”) при комнатной температуре. После электрофореза гели переносились в установку для электропереноса белков на мембрану. Электроперенос 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 ч. После электропереноса НЦ-мембраны инкубировались в течение 5 мин в 0.3%-ном растворе Ponceau Red в 5%-ной уксусной кислоте, затем отмывались в PBS (Биолот) с 0.1%-ным Tween 20 (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%-ного сухого молока (“Bio-Rad Laboratories”) в PBST в течение 1 ч при комнатной температуре, затем помещались в раствор первичных антител на ночь при 4°C. Условия работы антител проверялись и подбирались экспериментально.

Для выявления белковых полос были использованы первичные антитела против р-СаМКПb (1 : 1000, #12716), СаМКП (1 : 1000, #3362), NFATc1 (1:1000, # ab2796), фирмы "Abcam" (США); GapDH (1 : 10000, G041) фирмы "АВМ", тропомиозина (sc-58868) фирмы Santa Cruz BT (1 : 0).

На следующий день мембрана отмывалась от первичных антител в PBST 3 раза по 5 мин на шейкере и инкубировалась 1 ч со вторичными антителами goat-anti-rabbit (1 : 30000, "Jackson Immuno Research", США) или goat-anti-mouse (1 : 20000 "Bio-Rad Laboratories", США). Потом мембрана отмывалась от вторичных антител в PBST 3 раза по 5 мин на шейкере. Выявление проводилось с помощью Clarity Western ECL Substrate (Bio-Rad Laboratories, США). Хемилюминесцентный сигнал детектировался с помощью сканера C-DiGit Blot Scanner (LI-COR, США). Белковые полосы были анализированы с использованием Image Studio Software (LI-COR). Данный прибор и его аналоги вместе с программным обеспечением широко используются во всем мире для детекции сигнала в иммуноблоттинге, делая эту методику гораздо производительнее и экономичнее. Для каждого параметра электрофорез с последующим иммуноблоттингом был повторен не менее 3 раз. Затем полученные на сканере изображения обрабатывались с помощью прилагаемого программного обеспечения Image Studio Software (LI-COR) для получения количественных данных для анализа. 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.

ПЦР в реальном времени

Для исследования экспрессии генов и содержания митохондриальной ДНК методом ПЦР в реальном времени проводили выделение РНК и ДНК из образцов мышечной ткани. Для выделения РНК из скелетных мышц был использован набор HiPure Fibrous DNA/RNA Kit (Magen, Китай) согласно рекомендациям производителя.

Определение концентрации мРНК и ДНК производилось по поглощению раствора мРНК при помощи спектрофотометра NanoPhotometer IMPLN. 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, это указывает на то, что они являлись достаточно чистыми от углеводов, пептидов, фенолов или ароматических соединений [35]. Для проведения обратной транскрипции были использованы реагенты фирмы "Синтол" (Россия). Для подготовки кДНК водный раствор, содержащий 1 мкг тотальной РНК, 30 мкМ случайных гексануклеотидов и 17.4 мкМ олиго-d(T)15, инкубировался 3 мин при 70°C и немедленно переносился на лед. Далее к смеси было добавлено 11.5 мкл мастер-микса (1.3 мМ дНТФ, 0.02 ед./мкл ингибитора РНКазы, 6 ед./мкл M-MLV-ревертазы, 4 мкл 5×-буфера для M-MLV-ревертазы, "Синтол"). После этого пробы были помещены в амплификатор (iQ5 Multicolor Real-Time PCR Detection System, "Bio-Rad Laboratories") для проведения обратной транскрипции: 10 мин при 25°C, 60 мин при 37°C, 5 мин при 95°C, 30 мин при 4°C. После проведения реакции образцы, содержащие кДНК, хранились при -25°C. Праймеры сконструированы с помощью программы Primer3 v.0.4.0, находящейся в свободном доступе (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>) (табл. 1). Для проведения ПЦР в реальном времени смешивалось 2 мкл кДНК или ДНК, 2 мкл праймеров с концентрацией 10 мкМ и 21 мкл мастер-микса (0.3 мМ дНТФ, 3 мМ MgCl₂, 2.5 мкл 10× ПЦР-буфера Б, pH 8.8, 0.06 ед./мкл Taq ДНК-полимеразы, "Синтол"). Затем пробы были помещены в амплификатор для проведения реакции: 1-й цикл: 5 мин

Таблица 1. Используемые в работе праймеры.

Ген	Последовательность праймера
<i>SERCA1</i>	5'-GACTGAGTTTGGGGAACAGCT-3' 5'-GAGGTGGTGATGACAGCAGG-3'
<i>SERCA2</i>	5'-GAAGCAGTTCATCCGCTACCTCA-3' 5'-GCAGACCATCCGTCACCAGA-3'
<i>Rcan1 (MCIP1.4)</i>	5'-CCGTTGGCTGGAAACAAG-3' 5'-GGTCACTCTCACACACGTGG-3'
<i>RPL19</i>	5'-GTACCCTTCCTCTCCCTATGC-3' 5'-CAATGCCAACTCTCGTCAACAG-3'
<i>mtDNA</i>	5'-ATTGGAGGCTTCGGGAACTG-3' 5'-AGATAGAAGACACCCCGGCT-3'
<i>Mitofusin-1</i>	5'-CCACAGAGCTGGACATCTGG-3' 5'-GAGAGCCGCTCATTCACCTT-3'
<i>Mitofusin-2</i>	5'-AGTCGGTTGGAAGTCACTGT-3' 5'-TGTA CTGGGCTGAAAGGAG-3'

при 95°C; 2-й цикл по 44 повтора: 15 с при 93°C, 15 с при Tm (табл. 3), 15 с при 72°C; 3-й цикл: 6 мин 45 с при 72°C, 30 с при 65°C; 4-й цикл по 61 повтору: 15 с при 65°C; 5-й цикл: 10 мин при 15°C. Нормирование данных ПЦР проводили на экспрессию гена “домашнего хозяйства” RPL19. Обсчет данных проводили по методу Pfaffl и соавт. [36].

Для каждого гена мишени ПЦР-реакция проводилась не менее 3 раз.

Иммуногистохимический анализ мышечных волокон

С помощью криомикротомы изготавливали поперечные срезы замороженной мышцы толщиной 9 мкм. Срезы высушивали на воздухе и хранили на –20°. Перед окрашиванием срезы оттаивали и регидратировали при комнатной температуре в фосфатно-буферном растворе (PBS) в течение 20 мин, а затем инкубировали с антителами против тяжелых цепей миозина быстрого или медленного типов (МНСI и МНСII, Sigma, США) 1 : 400 в PBS во влажной камере при 37°C в течение 1 ч (или при 4°C на ночь). Затем антитела отмывали в PBS 3 раза по 5 мин. Инкубацию со вторичными антителами, конъюгированными с AlexaFluor, 1 : 500 в PBS проводили в течение 40 мин при комнатной температуре. В раствор для отмывки при необходимости окрашивания ядер добавляли DAPI. После отмывки вторичных антител срезы заключали в среду, стабилизирующую флуоресцентную метку. Срезы анализировали с использованием флуоресцентного микроскопа LeicaQ500MC с встроенной цифровой фотокамерой (TCM 300F, Leica, Германия), с увеличением ×200. Анализ изображений проводился с помощью программы ImageJ. Измеряли площадь поперечного сечения по крайней мере 100 волокон, подсчитывали число волокон медленного и быстрого типов и их количественное соотношение.

Для определения локализации NFATc1 в миоцарах было проведено тройное иммуногистохимическое окрашивание транскрипционного фактора NFATc1, сарколеммного белка дистрофина и DAPI на поперечных срезах *m. soleus*. Поперечные срезы *m. soleus* толщиной 7 мкм, выполненные с помощью микротомы в криостате помещали по 3–5 срезов на стекло. Затем стекла со срезами замораживали при –20°C и просушивали при комнатной температуре в течение 10 мин. Затем стекла инкубировали при –20°C в 100%-ном ацетоне в течение 10 мин, и стекла обводили гидрофобным карандашом для удержания промывочных растворов. Срезы промывали от ацетона буфером PBS, 200 мкл на стекло, инкубировали 5 мин, промывка

повторялась 3 раза. Затем срезы помещали на 1 ч в блокирующий раствор (1% BSA – бычий сывороточный альбумин и 0.1% Tween 20 в PBS – фосфатно-солевой буфер, pH 7.4) при комнатной температуре. Первичные антитела NFATc1 (“Santa Cruz”, rabbit, 1 : 100) и дистрофина в (“Abcam”, mouse, 1 : 100) в блокирующем растворе добавляли по 150 мкл на стекло с инкубацией на ночь при 4°C. Одновременно ставился отрицательный контроль (блокирующий раствор без первичных антител) для проверки неспецифичного связывания вторичных антител со срезами. На следующий день срезы отмывали 200 мкл PBS на стекло 3 раза по 5 мин и добавляли 150 мкл вторичных антител (1 : 500 goat anti-mouse, Alexa 488 + goat anti-rabbit, Alexa 546, “Molecular Probes”, США), разведенных в PBS, при комнатной температуре в течение 1 ч. После инкубации срезы отмывали 5 мин 200 мкл PBS и выдерживали 20 мин с интеркалирующим красителем нуклеиновых кислот DAPI (“Molecular Probes”, 1 : 10 000 в PBS). Срезы отмывали от DAPI при помощи 200 мкл PBS на стекло 2 раза по 5 мин. Далее срезы высушивали фильтрованной бумагой, заключали в раствор для флуоресценции Vectashield (“Vector”, США) и покрывали покровным стеклом с фиксацией лаком. Срезы анализировали с помощью микроскопа Leica DMR Upright Microscope с камерой Leica DC 300F. После этого осуществляли наложение полученных фотографий, снятых под разными фильтрами, и проводили статистический анализ результатов с помощью программы ImageJ.

Статистическая обработка данных

Данные проверяли на нормальность распределения по критерию Колмогорова–Смирнова, после чего проводили анализ ANOVA с post hoc анализом Тьюки на множественные сравнения. Достоверными считали отличия при $p < 0.05$. Данные представлены в виде средних значений \pm стандартная ошибка среднего.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Масса *m. soleus* обеих вывешенных групп (7HS и 7HS + CDN) не различалась между собой и была достоверно ниже, чем в группе контроля (67.5 ± 2.9 и 65.3 ± 4.2 мг соответственно против 109.4 ± 4.3 мг в группе контроля, $p < 0.05$).

Активные механические характеристики m. soleus при введении активатора SERCA

Сила максимального тетанического сокращения достоверно снизилась в группах 7HS и 7HS + CDN до 77% и 60% соответственно от группы контроля. При этом нормированная на физиологическое поперечное сечение мышцы (фППС) сила тетанического сокращения не изменялась.

Мы также наблюдали достоверное снижение индекса утомления в группе 7HS на 17% относительно группы контроля. Это снижение отсутствовало в группе 7HS + CDN (табл. 2, рис. 1). Мы не наблюдали достоверной разницы увеличения времени полурасслабления между экспериментальными группами.

Влияние активатора SERCA на кальцевую сигнализацию и окисление тропомиозина в камбаловидной мышце

После 7 суток вывешивания уровень фосфорилирования кальций-кальмодулинкиназы II (β) (CaMK II β) по Thr287 в группе 7HS достоверно ($p < 0.05$) увеличился втрое по сравнению со значениями группы С. В группе с введением активатора SERCA уровень фосфорилирования CaMK II β составлял 184% от среднего значения группы С и не имел достоверных отличий ни от группы С, ни от группы 7HS (рис. 2а). Экспрессия мРНК SERCA1 достоверно выросла на 32% в группе 7HS и на

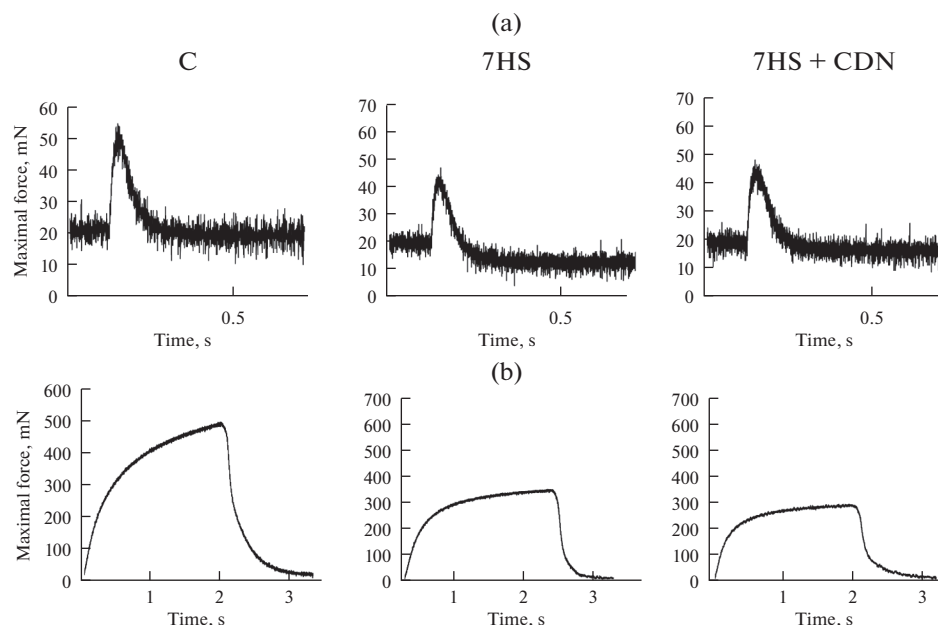


Рис. 1. Репрезентативные механограммы одиночных и тетанических сокращений. С – виварный контроль, 7HS – группа 7-суточного вывешивания, 7HS + CDN – группа 7-суточного вывешивания с введением активатора SERCA. (а) – записи одиночных сокращений, (б) – записи тетанических сокращений.

98% в группе 7HS + CDN по сравнению с группой С: показатели обеих вывешенных групп достоверно отличались от контроля, при этом значения группы 7HS + CDN также достоверно превышали значения группы 7HS ($p < 0.05$) (рис. 2б). Экспрессия мРНК SERCA2a не имела достоверных различий между группами С и 7HS, однако в группе 7HS + CDN экспрессия SERCA2a была достоверно выше, чем в группе С и 7HS, составляя 132% от значений группы С ($p < 0.05$) (рис. 2с). Уровень окисленного тропомиозина в группе 7HS достоверно вырос на 55% в сравнении с группой

Таблица 2. Активные механические свойства *m. soleus* при недельном вывешивании крыс

	С	7HS	7CDN
Длина мышцы, мм	19.1 ± 0.6	19.5 ± 0.2	19.8 ± 0.3
Физиологическое поперечное сечение мышцы (ФППС), мм ²	5.1 ± 0.3	3.2 ± 0.2*	3.0 ± 0.2*
Максимальная сила тетанического сокращения, мН	518.2 ± 27.1	398.6 ± 47.8*	310.6 ± 25.5*
Удельная максимальная сила тетанического сокращения, мН/мм ²	102.3 ± 6.4	127.4 ± 16.2	105.8 ± 9.3
Время полурасслабления в начале теста на утомление, мс	184.5 ± 6.7	205.9 ± 29.7	249.8 ± 35.0
Время полурасслабления в конце теста на утомление, мс	252.1 ± 7.3	287.2 ± 15.6	298.7 ± 12.2
Индекс утомления, % от максимума	63.1 ± 2.8	49.8 ± 4.8*	66.6 ± 4.0**

* – отличие от контроля, $p < 0.05$; ** – отличие от HS, $p < 0.05$. Данные представлены в виде средних ± стандартная ошибка среднего. С – виварный контроль, 7HS – вывешивание 7 суток, 7CDN – вывешивание 7 суток + введение CDN1163.

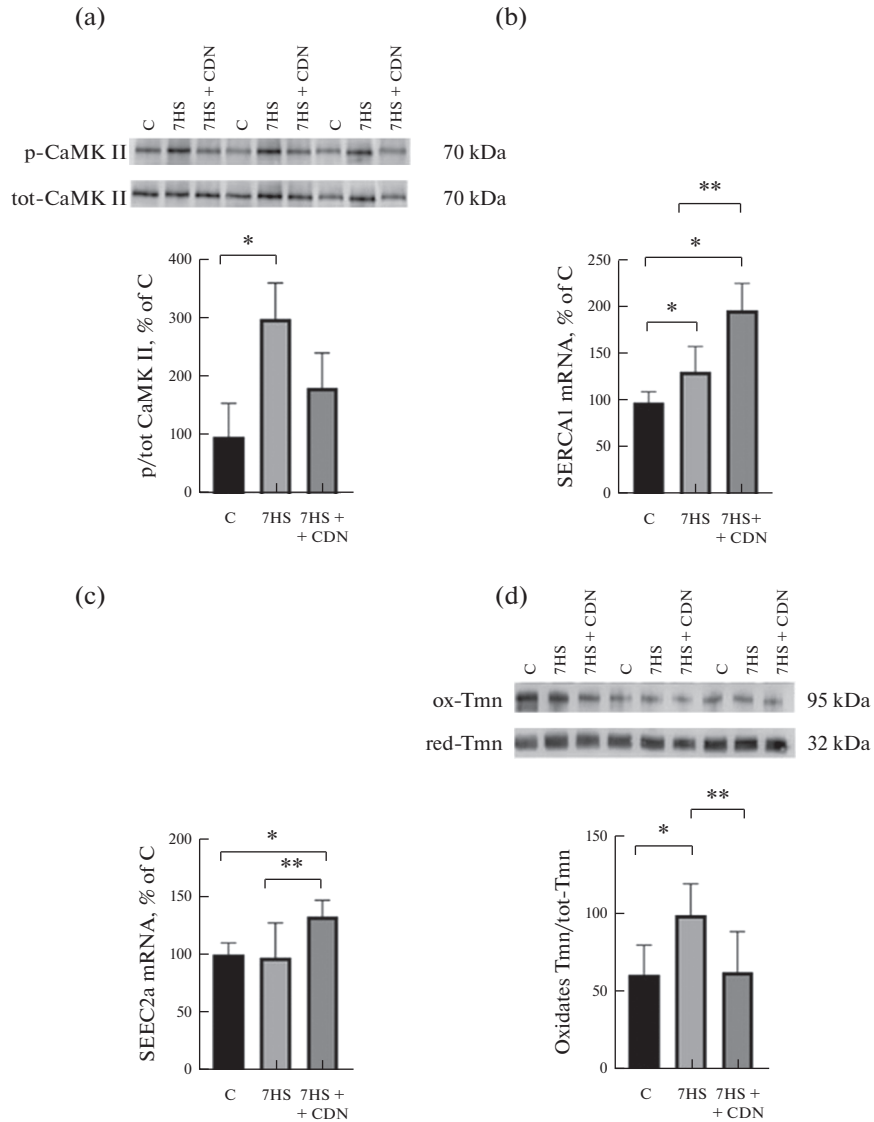


Рис. 2. Уровень фосфорилирования CaMK II (β) (a), экспрессия мРНК SERCA1 (b), экспрессия мРНК SERCA2A (c), соотношение окисленного тропомиозина к общему тропомиозину (d). C – виварный контроль, 7HS – группа 7-суточного вывешивания, 7HS + CDN – группа 7-суточного вывешивания с введением активатора SERCA. Данные представлены в виде среднего \pm стандартная ошибка среднего. * – отличия от группы C, $p < 0.05$; ** – отличия от группы 7HS, $p < 0.05$.

C, тогда как в группе 7HS + CDN уровень окисленного тропомиозина составлял 93% от значений группы C и был достоверно ниже значений группы 7HS (рис. 2d).

Влияние активатора SERCA на миозиновый фенотип и размеры мышечных волокон

После 7 суток вывешивания процент мышечных волокон медленного типа в группе 7HS был ниже, а процент “быстрых” мышечных волокон существенно вы-

Таблица 3. Процент и площадь поперечного сечения медленных (МВ I) и быстрых (МВ II) волокон скелетных мышц

Тип волокон	МВ I			МВ II		
	С	7HS	7HS + CDN	С	7HS	7HS + CDN
Группа	С	7HS	7HS + CDN	С	7HS	7HS + CDN
% МВ	75.1 ± 2.1	58.6 ± 1.4*	68.3 ± 2.0* [§]	18.4 ± 2.6	30.7 ± 2.0*	19.33 ± 2.5 [§]
ППС МВ (мкм ²)	2397 ± 111	2070 ± 75*	2003 ± 44*	2174 ± 132	1560 ± 53*	1283 ± 81*

С – виварный контроль, 7HS – группа 7-суточного вывешивания, 7HS + CDN – группа 7-суточного вывешивания с введением активатора SERCA. % МВ – процент мышечных волокон, ППС МВ – площадь поперечного сечения мышечных волокон (в микронах квадратных). Данные представлены в виде среднего ± стандартная ошибка среднего. * – достоверные отличия от группы С; § – достоверные отличия от группы 7HS при $p < 0.05$.

ше по сравнению с группой С на 22% и 60% соответственно (табл. 3), ($p < 0.05$). Введение активатора SERCA предотвратило эти изменения. В группе 7HS + CDN процент “быстрых” мышечных волокон был достоверно ниже чем в группе 7HS и не имел достоверных отличий от группы С, а процент “медленных” мышечных волокон был достоверно выше, чем в группе 7HS, но несколько отличался от группы С (табл. 3), ($p < 0.05$).

Площадь поперечного сечения (CSA) волокон “быстрого” и “медленного” типов достоверно снизилась в обеих вывешенных группах по сравнению с группой С ($p < 0.05$). Существенных различий между группами 7HS и 7HS + CDN не наблюдалось (табл. 3).

Активатор SERCA и сигнальный путь кальцинейрин-NFAT

Содержание транскрипционного фактора NFATc1 в мышечных ядрах после 7 сут вывешивания в группе 7HS было достоверно снижено в сравнении с группой С и составляло 37% от уровня контрольной группы. Содержание NFATc1 в миоцарах в группе 7HS + CDN было выше чем в группе 7HS, но достоверно ниже чем в группе С, и составляло 68% от нее ($p < 0.05$) (рис. 3).

Экспрессия мРНК изоформы гена *MCIP1.4*, являющегося показателем транскрипционной активности NFATc1, достоверно снизилась в группе 7HS в сравнении с контролем на 70%, однако этот параметр не имел достоверных отличий от контроля в группе 7HS + CDN ($p < 0.05$) (рис. 4).

Активатор SERCA и параметры биогенеза митохондрий

Содержание митохондриальной ДНК в группе 7HS было на 55% ниже, чем в группе С ($p < 0.05$). В группе 7HS + CDN содержание митохондриальной ДНК не имело достоверных отличий ни от группы С, ни от группы 7HS (рис. 5a). Содержание структурного белка митохондрий TOM20 в группе 7HS составляло 52% от группы С ($p < 0.05$), тогда как в группе 7HS + CDN содержание TOM20 не имело достоверных отличий от других экспериментальных групп (рис. 5b).

Экспрессия мРНК митофузина-1 в группе 7HS составляло 66% от группы С ($p < 0.05$). В группе 7HS + CDN экспрессия мРНК митофузина-1 составляла 93% от группы С, что было достоверно выше значений группы 7HS и не отличалось от контрольной группы (рис. 5c). Экспрессия мРНК митофузина-2 была также достоверно снижена в группе 7HS в сравнении с контролем (73% от контрольной группы), но не имела достоверных отличий от группы С в группе 7HS + CDN (83% от контроля) (рис. 5d).

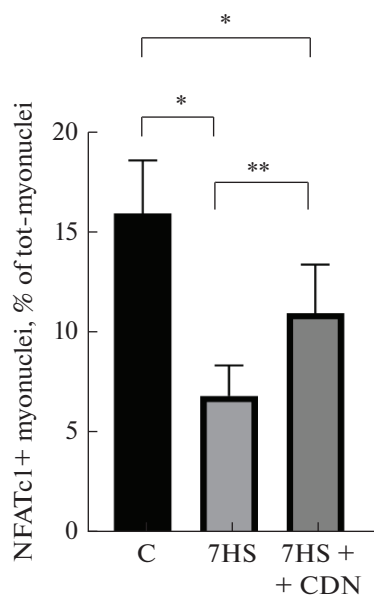


Рис. 3. Содержание NFATc1 в миоцарах камбаловидных мышц экспериментальных животных. C – виварный контроль, 7HS – группа 7-суточного вывешивания, 7HS + CDN – группа 7-суточного вывешивания с введением активатора SERCA. Данные представлены в виде среднего \pm стандартная ошибка среднего. * – отличия от группы C, $p < 0.05$; ** – отличия от группы 7HS, $p < 0.05$.

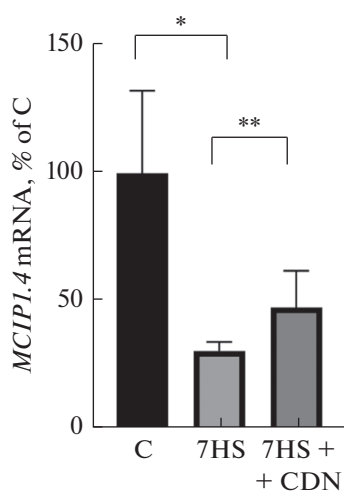


Рис. 4. Экспрессия мРНК *MCIPI.4*. C – виварный контроль, 7HS – группа 7-суточного вывешивания, 7HS + CDN – группа 7-суточного вывешивания с введением активатора SERCA. Данные представлены в виде среднего \pm стандартная ошибка среднего. * – отличия от группы C, $p < 0.05$; ** – отличия от группы 7HS, $p < 0.05$.

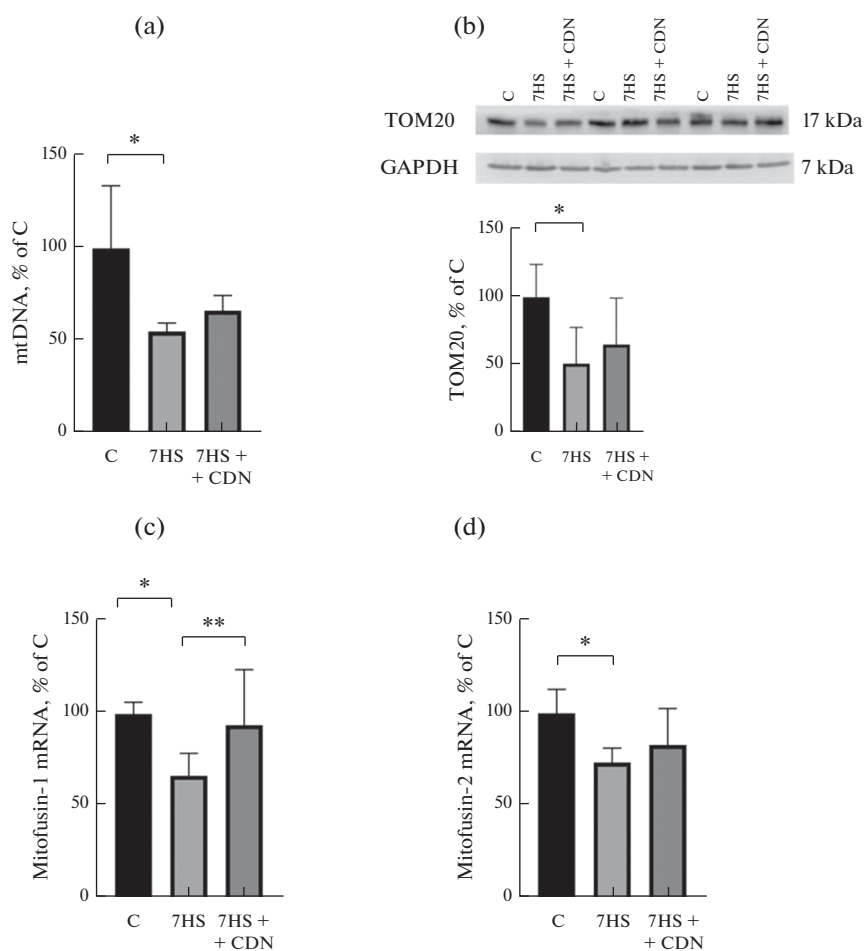


Рис. 5. Содержание мтДНК (а), содержание TOM20 (б), экспрессия мРНК митофузина-1 (с) и мРНК митофузина-2 (д). С – виварный контроль, 7HS – группа 7-суточного вывешивания, 7HS + CDN – группа 7-суточного вывешивания с введением активатора SERCA. Данные представлены в виде среднего \pm стандартная ошибка среднего. * – отличия от группы С, $p < 0.05$; ** – отличия от группы 7HS, $p < 0.05$.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Мы не обнаружили предотвращение атрофии *soleus* в обеих вывешенных группах. Сила максимального тетанического сокращения *soleus* в этих группах также снизилась относительно группы контроля. 7-суточная функциональная разгрузка *soleus* крыс привела к достоверному росту утомляемости этой мышцы. Аналогичные результаты получены ранее при разгрузке мышц человека и животных [37, 38]. Введение активатора SERCA на фоне 7-суточного вывешивания предотвратило снижение индекса утомления *soleus*. Аналогичные эффекты CDN1163 на функциональные характеристики скелетных мышц были получены ранее на мышцах *Sod1*^{-/-} и мышцах с саркопенией [21, 22]. Увеличение субмаксимальной активности SERCA при введении нитрата также предотвращало развитие утомления в *m. soleus* [28]. Авторы заметили, что эти свойства проявляются в экспрессирующих волокна ти-

па I (*soleus*), но не волокон типа II (EDL). Причины, предотвращающие снижение утомляемости *soleus* в нашем эксперименте, могут быть следующие.

1. Введение активатора SERCA экспериментальным животным успешно предотвратило увеличение уровня фосфорилирования СаМК II β по Thr 287, происходящее на фоне 7 суток вывешивания задних конечностей крыс. Увеличение фосфорилирования СаМК II β на фоне вывешивания было обнаружено ранее [39]. Аутофосфорилирование СаМК II β по Thr 287 происходит в ответ на повышение содержания ионов кальция [40]. Можно предположить, что предотвращение роста фосфорилирования СаМК II β в группе 7HS+CDN связано с предотвращением повышения уровня миоплазматического кальция в этой группе. В группе с введением активатора SERCA также было выявлено достоверное увеличение уровня экспрессии мРНК SERCA1 и SERCA2A, которое могло внести вклад в усиление транспорта ионов кальция из миоплазмы в СПР. Результаты свидетельствуют о специфическом влиянии препарата на обе изоформы SERCA. По-видимому, одним из факторов, способствующих предотвращению снижения индекса утомления *soleus* в группе 7HS + CDN, могло быть уменьшение содержания ионов кальция в миоплазме.

2. Наблюдаемые эффекты 7-суточного вывешивания на изменение долей “быстрых” и “медленных” мышечных волокон в группе 7HS согласуются с ранее полученными данными [41]. Вклад в увеличение устойчивости *soleus* к утомлению в группе 7HS + CDN может вносить предотвращение снижения медленных мышечных волокон и увеличения количества быстрых мышечных волокон в этой группе. Механизмы, приводящие к такому эффекту, могут быть следующие. Транскрипционный фактор NFATc1 является активатором экспрессии медленной изоформы ТЦМ [42, 43], при фосфорилировании он покидает мышечные ядра и не может активировать экспрессию медленной изоформы миозина [44]. Снижение его содержания (и экспрессии *MCIP1.4* – гена, маркера активности NFATC1) в миоядрах в группе 7HS согласуется с ранее полученными данными [45, 46]. При введении CDN1163 уровень NFATc1 и экспрессия мРНК *MCIP1.4* в группе 7HS + CDN были выше, чем в группе вывешивания без препарата. Итак, введение активатора SERCA на фоне вывешивания способствует предотвращению снижения уровня NFATc1 и экспрессии мРНК *MCIP1.4* в миоядрах, что может вносить вклад в предотвращение трансформации миозинового фенотипа MB.

3. Введение активатора SERCA предотвратило увеличение доли окисленного тропомиозина (рис. 1d). Этот белок миофиламентов ранее был использован как показатель индекса окислительного стресса карбоксилирования/декарбоксилирования мышечных белков и маркера окислительного повреждения тканей [47–49]. Эти результаты согласуются с данными о снижении уровня окислительного стресса при введении CDN1163 на мышах *Sod1*–/– [22] и в тучных клетках [50]. Эта модификация тропомиозина может также изменять чувствительность к кальцию и максимальную способность миофиламентов генерировать силу [47]. Известен прямой эффект действия избыточного миоплазматического кальция на повышение утомляемости, связанный с усилением генерации активных форм кислорода митохондриями, которое приводит к окислению рианодиновых рецепторов, утечке (leakage) кальция из СПР и истощению кальциевого депо СПР [23, 51]. Введение CDN1163 может предотвращать снижение индекса утомления *soleus* за счет предотвращения накопления избытка кальция и активных форм кислорода в миоплазме.

4. Вклад в увеличение устойчивости *soleus* к утомлению в группе 7HS + CDN может вносить предотвращение снижения в ней содержания митохондриальных белков и ДНК. Снижение содержания митохондриальной ДНК и белка TOM20, являющегося маркером митохондрий [52, 53], а также экспрессии митофузинов-1 и 2 в группе 7HS согласуется с характерными для 7-суточного вывешивания показателя-

ми ухудшения состояния митохондрий [54–57]. Истощение Mfn1 и 2 приводит к снижению потенциала мембран митохондрий, для компенсации происходит снижение работы дыхательной цепи. Влияние CDN1163 в группе 7HS + CDN на содержание митохондриальных белков, их мРНК и ДНК согласуется с данными об активации им утилизации жирных кислот и биогенеза митохондрий [31, 58]. Положительный эффект CDN1163 в группе 7HS + CDN может быть связан со снижением уровня активных форм кислорода, вызывающих митохондриальный стресс [59]. Другие авторы также обнаружили увеличение скорости дыхания митохондрий и снижение утомления *soleus* при введении пищевого нитрата в качестве активатора SERCA [28]. Предотвращение снижения содержания мтДНК и белка в группе 7HS + + CDN может вносить вклад в предотвращение падения индекса утомления *soleus*.

Итак, введение активатора SERCA CDN1163 на фоне 7-суточной функциональной разгрузки привело к снижению уровня кальций-зависимого фосфорилирования CaMK II и окисления тропомиозина (показателя окислительного стресса), способствовало сохранению доли “медленных” устойчивых к утомлению мышечных волокон, а также митохондриальной ДНК и белка, и предотвратило снижение индекса утомления *soleus* на фоне вывешивания. Однако введение активатора SERCA не привело к предотвращению ее атрофии.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены. Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием животных, соответствовали этическим стандартам, утвержденным правовыми актами РФ, принципам Базельской декларации и рекомендациям Комиссии по биоэтической этике ГНЦ РФ ИМБП РАН (протокол от 31 мая 2021 г. № 584).

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке фонда РФФ, грант № 21-15-00228.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

К.А.З. — проведение эксперимента с животными, взятие и выделение проб белка и РНК, проведение форезов, блотов, ПЦР, статистическая обработка результатов; С.П.Б. — организация проведения эксперимента, взятие и выделение проб белка и РНК, проведение форезов, блотов, ПЦР, статистическая обработка результатов, обсуждение результатов; К.А.Ш. — организация проведения эксперимента, взятие и выделение проб белка и РНК, проведение форезов, блотов, ПЦР, статистическая обработка результатов, обсуждение результатов; С.А.Т. — определение функциональных свойств *m. soleus* крыс; И.Д.Л. — проведение форезов, блотов, ПЦР, статистическая обработка результатов; Т.Л.Н. — планирование эксперимента, обсуждение результатов, работа со статьей.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Cannavino J, Brocca L, Sandri M, Bottinelli R, Pellegrino MA (2014) PGC1-alpha over-expression prevents metabolic alterations and soleus muscle atrophy in hindlimb unloaded mice. *J Physiol* 592 (20): 4575–4589. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2014.275545>
2. Fernandez-Gonzalo R, Tesch PA, Lundberg TR, Alkner BA, Rullman E, Gustafsson T (2020) Three months of bed rest induce a residual transcriptomic signature resilient to resistance exercise countermeasures. *FASEB J* 34 (6): 7958–7969. <https://doi.org/10.1096/fj.201902976R>

3. *Leermakers PA, Kneppers AEM, Schols A, Kelders M, de Theije CC, Verdijk LB, van Loon LJC, Langen RCJ, Gosker HR* (2019) Skeletal muscle unloading results in increased mitophagy and decreased mitochondrial biogenesis regulation. *Muscle & Nerve* 60 (6): 769–778. <https://doi.org/10.1002/mus.26702>
4. *Desaphy JF, Pierno S, Liantonio A, De Luca A, Didonna MP, Frigeri A, Nicchia GP, Svelto M, Camerino C, Zallone A, Camerino DC* (2005) Recovery of the soleus muscle after short- and long-term disuse induced by hindlimb unloading: effects on the electrical properties and myosin heavy chain profile. *Neurobiol Dis* 18 (2): 356–365. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2004.09.016>
5. *Pette D, Staron RS* (2000) Myosin isoforms, muscle fiber types, and transitions. *Microsc Res Tech* 50 (6): 500–509. [https://doi.org/10.1002/1097-0029\(20000915\)50:6<500::AID-JEMT7>3.0.CO;2-7](https://doi.org/10.1002/1097-0029(20000915)50:6<500::AID-JEMT7>3.0.CO;2-7)
6. *Stevens L, Sultan KR, Peuker H, Gohlsch B, Mounier Y, Pette D* (1999) Time-dependent changes in myosin heavy chain mRNA and protein isoforms in unloaded soleus muscle of rat. *Am J Physiol* 277 (6): C1044–1049. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1999.277.6.C1044>
7. *Trappe S, Costill D, Gallagher P, Creer A, Peters JR, Evans H, Riley DA, Fitts RH* (2009) Exercise in space: human skeletal muscle after 6 months aboard the International Space Station. *J Appl Physiol* 106 (4): 1159–1168. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.91578.2008>
8. *Ingalls CP, Warren GL, Armstrong RB* (1999) Intracellular Ca^{2+} transients in mouse soleus muscle after hindlimb unloading and reloading. *J Appl Physiol* 87 (1): 386–390. <https://doi.org/10.1152/jappl.1999.87.1.386>
9. *Booth FW, Giannetta CL* (1973) Effect of hindlimb immobilization upon skeleton muscle calcium in rat. *Calcified Tissue Res* 13 (4): 327–330. <https://doi.org/10.1007/BF02015423>
10. *Tomiya S, Tamura Y, Kouzaki K, Kotani T, Wakabayashi Y, Noda M, Nakazato K* (2019) Cast immobilization of hindlimb upregulates sarcolipin expression in atrophied skeletal muscles and increases thermogenesis in C57BL/6J mice. *Am J Physiol Regulat Integrat Compar Physiol* 317 (5): R649–R661. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00118.2019>
11. *Nemirovskaya TL, Sharlo KA* (2022) Roles of ATP and SERCA in the Regulation of Calcium Turnover in Unloaded Skeletal Muscles: Current View and Future Directions. *Int J Mol Sci* 23 (13): 6937.
12. *Turner PR, Westwood T, Regen CM, Steinhardt RA* (1988) Increased protein degradation results from elevated free calcium levels found in muscle from mdx mice. *Nature* 335 (6192): 735–738. <https://doi.org/10.1038/335735a0>
13. *Shenkman BS, Belova SP, Lomonosova YN, Kostrominova TY, Nemirovskaya TL* (2015) Calcipain-dependent regulation of the skeletal muscle atrophy following unloading. *Arch Biochem Biophys* 584: 36–41. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2015.07.011>
14. *Matuz-Mares D, Gonzalez-Andrade M, Araiza-Villanueva MG, Vilchis-Landeros MM, Vazquez-Meza H* (2022) Mitochondrial Calcium: Effects of Its Imbalance in Disease. *Antioxidants* 11 (5): 801. <https://doi.org/10.3390/antiox11050801>
15. *Berchtold MW, Brinkmeier H, Muntener M* (2000) Calcium ion in skeletal muscle: its crucial role for muscle function, plasticity, and disease. *Physiol Rev* 80 (3): 1215–1265. <https://doi.org/10.1152/physrev.2000.80.3.1215>
16. *Shimizu H, Langenbacher AD, Huang J, Wang K, Otto G, Geisler R, Wang Y, Chen JN* (2017) The Calcineurin-FoxO-MuRF1 signaling pathway regulates myofibril integrity in cardiomyocytes. *eLife* 6: 27955. <https://doi.org/10.7554/eLife.27955>
17. *Midrio M, Danielli-Betto D, Megighian A, Betto R* (1997) Early effects of denervation on sarcoplasmic reticulum properties of slow-twitch rat muscle fibres. *Pflugers Arch* 434 (4): 398–405. <https://doi.org/10.1007/s004240050413>
18. *Altaeva EG, Ogneva IV, Shenkman BS* (2010) Dynamics of calcium levels and changes SERCA content in muscle fibers of rats and Mongolian gerbils during hind limb unloadings of various duration. *Tsitologiya* 52 (9): 770–775.
19. *Мухина АМ, Алтаева ЕГ, Немировская ТЛ, Шенкман БЕ* (2006) Роль кальциевых каналов L-типа в накоплении Ca^{2+} в волокнах *m. soleus* крысы и изменении соотношения изоформ миозина и SERCA при гравитационной разгрузке. *Рос физиол журн им ИМ Сеченова* 92(11): 1285–1295. [*Mukhina AM, Altaeva EG, Nemirovskaia TL, Shenkman BS* (2006) Role of L-type Ca channels in Ca^{2+} accumulation and changes in distribution of myosin heavy chain and SERCA isoforms in rat *m. soleus* under gravitational unloading. *Russ J Physiol* 92 (11): 1285–1295. (In Russ)].

20. Schulte L, Peters D, Taylor J, Navarro J, Kandarian S (1994) Sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} pump expression in denervated skeletal muscle. *Am J Physiol* 267 (2 Pt 1): C617–C622. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1994.267.2.C617>
21. Qaisar R, Pharaoh G, Bhaskaran S, Xu H, Ranjit R, Bian J, Ahn B, Georgescu C, Wren JD, Van Remmen H (2020) Restoration of Sarcoplasmic Reticulum Ca^{2+} ATPase (SERCA) Activity Prevents Age-Related Muscle Atrophy and Weakness in Mice. *Int J Mol Sci* 22 (1): 37. <https://doi.org/10.3390/ijms22010037>
22. Qaisar R, Bhaskaran S, Ranjit R, Sataranatarajan K, Premkumar P, Huseman K, Van Remmen H (2019) Restoration of SERCA ATPase prevents oxidative stress-related muscle atrophy and weakness. *Redox Biol* 20: 68–74. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2018.09.018>
23. Andersson DC, Betzenhauser MJ, Reiken S, Meli AC, Umanskaya A, Xie W, Shiomi T, Zalk R, La-campagne A, Marks AR (2011) Ryanodine receptor oxidation causes intracellular calcium leak and muscle weakness in aging. *Cell Metab* 14 (2): 196–207. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2011.05.014>
24. Andersson DC, Meli AC, Reiken S, Betzenhauser MJ, Umanskaya A, Shiomi T, D'Armiento J, Marks AR (2012) Leaky ryanodine receptors in beta-sarcoglycan deficient mice: a potential common defect in muscular dystrophy. *Skelet Muscle* 2 (1): 9. <https://doi.org/10.1186/2044-5040-2-9>
25. Umanskaya A, Santulli G, Xie W, Andersson DC, Reiken SR, Marks AR (2014) Genetically enhancing mitochondrial antioxidant activity improves muscle function in aging. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111 (42): 15250–15255. <https://doi.org/10.1073/pnas.1412754111>
26. Ingalls CP, Wenke JC, Armstrong RB (2001) Time course changes in $[\text{Ca}^{2+}]_i$, force, and protein content in hindlimb-suspended mouse soleus muscles. *Aviat Space Environ Med* 72 (5): 471–476.
27. Derbre F, Ferrando B, Gomez-Cabrera MC, Sanchis-Gomar F, Martinez-Bello VE, Olasso-Gonzalez G, Diaz A, Gratas-Delamarche A, Cerda M, Vina J (2012) Inhibition of xanthine oxidase by allopurinol prevents skeletal muscle atrophy: role of p38 MAPKinase and E3 ubiquitin ligases. *PLoS One* 7 (10): e46668. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046668>
28. Petrick HL, Brownell S, Vachon B, Brunetta HS, Handy RM, van Loon LJC, Murrant CL, Holloway GP (2022) Dietary nitrate increases submaximal SERCA activity and ADP transfer to mitochondria in slow-twitch muscle of female mice. *American journal of physiology Endocrinol Metabol* 323 (2): E171–E184. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00371.2021>
29. Shenkman BS, Vikhlyantsev IM, Litvinova KS, Udaltsov SN, Nemirovskaya TL (2004) Contractile characteristics and sarcomeric cytoskeletal proteins of human soleus fibers in muscle unloading: role of mechanical stimulation from the support surface. *Biophysics* 49: 807–815.
30. Morey-Holton ER, Globus RK (2002) Hindlimb unloading rodent model: technical aspects. *J Appl Physiol* 92 (4): 1367–1377. <https://doi.org/10.1152/japplphysiol.00969.2001>
31. Kang S, Dahl R, Hsieh W, Shin A, Zsebo KM, Buettner C, Hajjar RJ, Lebeche D (2016) Small Molecular Allosteric Activator of the Sarco/Endoplasmic Reticulum Ca^{2+} -ATPase (SERCA) Attenuates Diabetes and Metabolic Disorders. *J Biol Chem* 291 (10): 5185–5198. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.705012>
32. Gordon AM, Huxley AF, Julian FJ (1966) The variation in isometric tension with sarcomere length in vertebrate muscle fibres. *J Physiol* 184 (1): 170–192. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1966.sp007909>
33. Burke RE, Levine DN, Saleman M, Tsairis P (1974) Motor units in cat soleus muscle: physiological, histochemical and morphological characteristics. *J Physiol* 238 (3): 503–514. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1974.sp010540>
34. Roy RR, Zhong H, Monti RJ, Vallance KA, Edgerton VR (2002) Mechanical properties of the electrically silent adult rat soleus muscle. *Muscle & Nerve* 26 (3): 404–412. <https://doi.org/10.1002/mus.10219>
35. Nouvel A, Laget J, Duranton F, Leroy J, Desmetz C, Servais MD, de Preville N, Galtier F, Nocca D, Builles N, Rebuffat S, Lajoix AD (2021) Optimization of RNA extraction methods from human metabolic tissue samples of the COMET biobank. *Sci Rep* 11 (1): 20975. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-00355-x>
36. Pfaffl MW (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29 (9): e45. <https://doi.org/10.1093/nar/29.9.e45>
37. Matoba TWY, Ohira Y (1993) β -Guanidinopropionic acid suppresses suspension-induced changes in myosin expression in rat skeletal muscle. *Med Sci Sports Exer* 25: 157.

38. Mulder ER, Kuebler WM, Gerrits KH, Rittweger J, Felsenberg D, Stegeman DF, de Haan A (2007) Knee extensor fatigability after bedrest for 8 weeks with and without countermeasure. *Muscle Nerve* 36 (6): 798–806.
<https://doi.org/10.1002/mus.20870>
39. Sharlo KA, Lvova ID, Belova SP, Zaripova KA, Shenkman BS, Nemirovskaya TL (2022) Metformin Attenuates Slow-to-Fast Fiber Shift and Proteolysis Markers Increase in Rat Soleus after 7 Days of Rat Hindlimb Unloading. *Int J Mol Sci* 24 (1): 503.
<https://doi.org/10.3390/ijms24010503>
40. Rostas JAP, Skelding KA (2023) Calcium/Calmodulin-Stimulated Protein Kinase II (CaMKII): Different Functional Outcomes from Activation, Depending on the Cellular Microenvironment. *Cells* 12 (3): 401.
<https://doi.org/10.3390/cells12030401>
41. Lomonosova YN, Turtikova OV, Shenkman BS (2016) Reduced expression of MyHC slow isoform in rat soleus during unloading is accompanied by alterations of endogenous inhibitors of calcineurin/NFAT signaling pathway. *J Muscle Res Cell Motility* 37 (1-2): 7–16.
<https://doi.org/10.1007/s10974-015-9428-y>
42. Kubis HP, Scheibe RJ, Meissner JD, Hornung G, Gros G (2002) Fast-to-slow transformation and nuclear import/export kinetics of the transcription factor NFATc1 during electrostimulation of rabbit muscle cells in culture. *J Physiol* 541 (Pt 3): 835–847.
43. Meissner JD, Umeda PK, Chang KC, Gros G, Scheibe RJ (2007) Activation of the beta myosin heavy chain promoter by MEF-2D, MyoD, p300, and the calcineurin/NFATc1 pathway. *J Cell Physiol* 211 (1): 138–148.
<https://doi.org/10.1002/jcp.20916>
44. Shen T, Cseresnyes Z, Liu Y, Randall WR, Schneider MF (2007) Regulation of the nuclear export of the transcription factor NFATc1 by protein kinases after slow fibre type electrical stimulation of adult mouse skeletal muscle fibres. *J Physiol* 579 (Pt 2): 535–551.
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.2006.120048>
45. Sharlo KA, Paramonova II, Lvova ID, Mochalova EP, Kalashnikov VE, Vilchinskaya NA, Tyganov SA, Konstantinova TS, Shevchenko TF, Kalamkarov GR, Shenkman BS (2021) Plantar Mechanical Stimulation Maintains Slow Myosin Expression in Disused Rat Soleus Muscle via NO-Dependent Signaling. *Int J Mol Sci* 22 (3): 1372.
<https://doi.org/10.3390/ijms22031372>
46. Sharlo KA, Paramonova II, Lvova ID, Vilchinskaya NA, Bugrova AE, Shevchenko TF, Kalamkarov GR, Shenkman BS (2020) NO-Dependent Mechanisms of Myosin Heavy Chain Transcription Regulation in Rat Soleus Muscle After 7-Days Hindlimb Unloading. *Front Physiol* 11: 814.
<https://doi.org/10.3389/fphys.2020.00814>
47. van der Velden J (2006) Functional significance of myofilament protein oxidation. *Eur Heart J* 27 (7): 764–765.
<https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehi742>
48. Lechado ITA, Vitadello M, Traini L, Namuduri AV, Gastaldello S, Gorza L (2018) Sarcolemmal loss of active nNOS (Nos1) is an oxidative stress-dependent, early event driving disuse atrophy. *J Pathol* 246 (4): 433–446.
<https://doi.org/10.1002/path.5149>
49. Jackson MJ (2016) Recent advances and long-standing problems in detecting oxidative damage and reactive oxygen species in skeletal muscle. *J Physiol* 594 (18): 5185–5193.
<https://doi.org/10.1113/JP270657>
50. Hunter KD, Crozier RWE, Braun JL, Fajardo VA, MacNeil AJ (2023) Acute activation of SERCA with CDN1163 attenuates IgE-mediated mast cell activation through selective impairment of ROS and p38 signaling. *FASEB J* 37 (2): e22748.
<https://doi.org/10.1096/fj.202201272R>
51. Yutaka Kano TS, Tadakatsu Inagaki, Mizuki Sudo, David C Poole (2012) Mechanisms of exercise-induced muscle damage and fatigue: Intracellular calcium accumulation. *J Phys Fitness Sports Med* 1 (3): 505–512.
<https://doi.org/10.7600/jpfs.1.505>
52. Buso A, Comelli M, Picco R, Isola M, Magnesa B, Pisot R, Rittweger J, Salvadego D, Simunic B, Grassi B, Mavelli I (2019) Mitochondrial Adaptations in Elderly and Young Men Skeletal Muscle Following 2 Weeks of Bed Rest and Rehabilitation. *Front Physiol* 10: 474.
<https://doi.org/10.3389/fphys.2019.00474>
53. Wei F, Xiao H, Hu Z, Zhang H, Wang C, Dai H, Tang J (2015) [Subcellular localization of ataxin-3 and its effect on the morphology of cytoplasmic organoids]. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi* 32 (3): 353–357.
<https://doi.org/10.3760/cma.j.issn.1003-9406.2015.03.011>
54. Liu J, Peng Y, Cui Z, Wu Z, Qian A, Shang P, Qu L, Li Y, Liu J, Long J (2012) Depressed mitochondrial biogenesis and dynamic remodeling in mouse tibialis anterior and gastrocnemius induced by 4-week hindlimb unloading. *IUBMB Life* 64 (11): 901–910.
<https://doi.org/10.1002/iub.1087>

55. Wagatsuma A, Kotake N, Kawachi T, Shiozuka M, Yamada S, Matsuda R (2011) Mitochondrial adaptations in skeletal muscle to hindlimb unloading. *Mol Cell Biochem* 350 (1-2): 1–11. <https://doi.org/10.1007/s11010-010-0677-1>
56. Theeuwes WF, Gosker HR, Langen RCJ, Verhees KJP, Pansters NAM, Schols A, Remels AHV (2017) Inactivation of glycogen synthase kinase-3beta (GSK-3beta) enhances skeletal muscle oxidative metabolism. *Bioch Biophys Acta Mol Basis Dis* 1863 (12): 3075–3086. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2017.09.018>
57. Sharlo K, Lvova I, Turtikova O, Tyganov S, Kalashnikov V, Shenkman B (2022) Plantar stimulation prevents the decrease in fatigue resistance in rat soleus muscle under one week of hindlimb suspension. *Arch Biochem Biophys* 718: 109150. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2022.109150>
58. Mengeste AM, Lund J, Katare P, Ghobadi R, Bakke HG, Lunde PK, Eide L, Mahony GO, Gopel S, Peng R, Kase ET, Thoresen GH, Rustan AC (2021) The small molecule SERCA activator CDN1163 increases energy metabolism in human skeletal muscle cells. *Current Res Pharmacol Drug Discover* 2: 100060. <https://doi.org/10.1016/j.crphar.2021.100060>
59. Heher P, Ganassi M, Weidinger A, Engquist EN, Pruller J, Nguyen TH, Tassin A, Declèves AE, Mamchaoui K, Banerji CRS, Grillari J, Kozlov AV, Zammit PS (2022) Interplay between mitochondrial reactive oxygen species, oxidative stress and hypoxic adaptation in facioscapulohumeral muscular dystrophy: Metabol stress as potential therapeutic target. *Redox Biol* 51: 102251. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2022.102251>

Influence of the SERCA Activity on Rat's Soleus Contractile Properties during Functional Unloading

**K. A. Sharlo^a, I. D. Lvova^a, S. A. Tyganov^a, K. A. Zaripova^a,
S. P. Belova^a, and T. L. Nemirovskaya^{a,*}**

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

^{*}*e-mail: Nemirovskaya@bk.ru*

Dysfunction of skeletal muscles and their atrophy during unloading are accompanied by excess calcium accumulation in the myoplasm of muscle fibers. We hypothesized that calcium accumulation may occur, among other reasons, due to inhibition of SERCA activity under muscle unloading. In this case, the use of a SERCA activator will reduce the calcium level in the myoplasm and prevent the consequences of unloading. Male Wistar rats were divided into 3 groups: vivarium control with placebo administration (C, $n = 8$), 7-day suspension group with placebo administration (7HS, $n = 8$) and 7-day suspension group with intraperitoneal administration of SERCA CDN1163 activator (50 mg/kg (7HS + CDN), $n = 8$). One *m. soleus* of each rat was frozen in liquid nitrogen, the second was tested for functional properties. In the 7HS group, increased *soleus* fatigue was found in the *ex vivo* test, a significant increase in mRNA and the number of fast muscle fibers, an increase in the level of calcium-dependent CaMK II phosphorylation and the level of tropomyosin oxidation, as well as a decrease in the content of mitochondrial DNA and protein. All these changes were prevented in the SERCA CDN1163 activator group. Conclusion: 7-day SERCA activator administration does not delay of *soleus* atrophy, but prevents the development of its fatigue, probably by preventing a decrease in the number of type I fibers and markers of mitochondrial biogenesis.

Keywords: soleus unloading, atrophy, soleus fatigue, muscle fiber types, NFATC1, mitochondrial DNA, mitofusin ½