

**ВЛИЯНИЕ СПОНТАННОЙ НЕРВНО-МЫШЕЧНОЙ АКТИВНОСТИ
НА РАЗВИТИЕ АТРОФИИ КАМБАЛОВИДНОЙ МЫШЦЫ В УСЛОВИЯХ
ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ РАЗГРУЗКИ**

© 2023 г. К. В. Сергеева¹, *, К. А. Шарло¹, В. Е. Калашников¹, О. В. Тургикова¹,
С. А. Тыганов¹, Б. С. Шенкман¹

¹Институт Медико-биологических проблем Российской академии наук, Москва, Россия

*E-mail: sergeeva_xenia@mail.ru

Поступила в редакцию 27.07.2023 г.

После доработки 04.09.2023 г.

Принята к публикации 04.09.2023 г.

Хорошо известно, что бездействие скелетных мышц млекопитающих приводит к прекращению их электрической активности и сопровождается атрофическими изменениями мышечных волокон. Однако неоднократно отмечалось, что начиная с 3 суток функциональной разгрузки появляется спонтанная ритмическая нервно-мышечная активность, являющаяся результатом снижения экспрессии калий-хлоридного ко-транспортера КСС-2 в нейронах поясничного отдела спинного мозга. Снижение экспрессии КСС-2 и возникновение автономной электрической активности мышцы в условиях разгрузки может быть предотвращено введением нейрелептика прохлорперазина. Таким образом, целью настоящего исследования было оценить структурные и сигнальные эффекты снижения спонтанной активности разгруженной камбаловидной мышцы крыс. Обнаружено, что ежедневное введение крысам прохлорперазина на фоне 7-суточного антиортостатического вывешивания предотвратило снижение содержания основных маркеров биогенеза рибосом (с-Мус, 18S рРНК и 28S рРНК), а также частично предотвратило уменьшение площади поперечного сечения быстрых и медленных мышечных волокон в камбаловидной мышце. Морфофункциональные изменения, вызванные снижением спонтанной активности разгруженной мышцы, сопровождались полным или частичным предотвращением активации экспрессии ключевых маркеров протеолитических систем (MuRF-1, MAFbx/atrogen-1, убиквитин). Таким образом, мы предполагаем, что именно спонтанная нервно-мышечная активность может являться фактором, углубляющим атрофические процессы в течение первой недели функциональной разгрузки.

Ключевые слова: скелетная мышца, гравитационная разгрузка, прохлорперазин, спонтанная активность, распад белка, убиквитинлигазы

DOI: 10.31857/S0869813923100102, EDN: XRLLUW

ВВЕДЕНИЕ

Камбаловидная мышца (*m. soleus*) млекопитающих демонстрирует электрическую активность (ЭМГ) в течение 11–16 ч в сутки [1]. Однако если устраняется опора задних конечностей, то активность этой мышцы резко снижается или полностью прекращается [2, 3]. Этот эффект наблюдается при невесомости, создаваемой в ходе полета по параболе Кепплера, или при отрыве задних ног от субстрата в модели вывешивания задних конечностей [4]. При использовании этой модели

электрическое и, очевидно, механическое “молчание” мышцы наблюдается в течение 2–3 сут [3]. Однако в дальнейшем применение в отношении камбаловидной мышцы термина “бездействие” (disuse) становится затруднительным. При регистрации ЭМГ начинают спонтанно появляться электрические сигналы, свидетельствующие о появлении и постепенном увеличении мышечной активности [2, 5, 6]. Эта электрическая активность, которую можно было бы назвать спонтанной нервно-мышечной активностью, непрерывно регистрируется и постепенно возрастает, достигая значений амплитуды, близких к контрольным к 14 суткам вывешивания. До сих пор остается неизвестным, какие изменения в процессе развития гипогравитационной атрофии, атонии и фенотипической трансформации, характерных для функциональной разгрузки, вносит спонтанная активность постуральной мышцы. В последнее время стало известно, что при гравитационной разгрузке, как и в экспериментальных моделях спинальной травмы, спонтанная активность является следствием снижения содержания калий-хлоридного котранспортера KCC2 в нейронах поясничного отдела спинного мозга, приводящего к повышенной возбудимости спинальных мотонейронов [7–9]. Оказалось, что применение нейролептика прохлорперазина (PCPZ) позволяет предотвратить снижение уровня KCC-2 и тем самым снизить спонтанную электрическую активность постуральной мышцы. Таким образом, при использовании фармакологической коррекции, снизив интенсивность спонтанной электрической активности мышцы, можно оценить молекулярные последствия этой активности.

Целью настоящего исследования было оценить развитие структурной атрофии и сигнальные эффекты при редукции спонтанной активности разгруженной камбаловидной мышцы крысы с тем, чтобы выявить сигнальные последствия такой активности, наблюдаемой в условиях моделируемой гравитационной разгрузки.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Дизайн эксперимента. В экспериментах использовали самцов крыс Вистар в возрасте 1.5–2 мес. и массой тела 180–200 г. Температуру в помещении вивария поддерживали на уровне 24°C и влажности 50% при 12/12-часовом цикле свет/темнота. Все крысы имели доступ к стандартной диете и воде. Эвтаназия животных проводилась посредством внутрибрюшинного введения 10%-ного раствора авергина (10 мл/кг). Крысы были разделены на три группы по 8 животных в каждой: группа виварного контроля (С); группа, подвергнутая разгрузке задних конечностей на протяжении 7 дней (HS); группа разгрузки, совмещенная с введением прохлорперазина (HS + PCPZ). Дималеатную соль прохлорперазина (#P9178; Sigma-Aldrich, Сент-Луис, Миссури, США) вводили два раза в день (каждая инъекция содержала 5 мг/кг в физиологическом растворе + 0.1% ДМСО). Применяемая доза рассчитывалась, исходя из эквивалента человеческой терапевтической дозы (112 мг/кг) [10]. Крысы из группы HS получали эквивалентный объем физиологического раствора + 0.1% ДМСО без прохлорперазина.

Механическая разгрузка производилась с использованием стандартной модели вывешивания задних конечностей (HS, hindlimb suspension) [4]. Вкратце, полоска клейкой ленты была прикреплена к хвосту животного, которое вывешивалось, пропуская ленту через шарнирный механизм, прикрепленный к металлической планке наверху клетки. Это позволяло передним конечностям животных касаться пола решетки и перемещаться по клетке для свободного доступа к пище и воде. Высота подвешивания регулировалась таким образом, чтобы задние конечности не касались какой-либо опорной поверхности.

Анализ экспрессии генов. Для анализа экспрессии мРНК генов из мышечной ткани с помощью набора RNeasy micro kit (Qiagen, США) была выделена тотальная

Таблица 1. Список использованных в работе праймеров

Ген	Белок	Последовательность праймеров
<i>MYC</i>	c-Мyc	5'-TTGATGGGGATGACCCTGAC-3' 5'-CTCGCCCAAATCCTGTACCT-3'
<i>TRIM63</i>	MuRF-1	5'-GCCAATTTGGTGCTTTTGT-3' 5'-AAATTCAGTCCTCTCCCGT-3'
<i>FBXO32</i>	MAFbx	5'-CTACGATGTTGCAGCCAAGA-3' 5'-GGCAGTCGAGAAGTCCAGTC-3'
<i>UBB</i>	Ubiquitin	5'-CACCAAGAAGGTCAAACAGGA-3' 5'-GCAAGAACTTTATTCAAAAGTGCAA-3'
<i>RPL19</i>		5'-GTACCCTTCCTCTCCCTATGC-3' 5'-CAATGCCAACTCTCGTCAACAG-3'

фракция РНК и использована в качестве матрицы для проведения обратной транскрипции с последующей ПЦР-реакцией. Для проведения обратной транскрипции были использованы компоненты фирмы “Синтол” (Россия): 30 мкМ случайных гексануклеотидов, 17.4 мкМ олиго-d(T)15, 1.3 мМ дНТФ, 0.02 ед./мкл ингибитора РНКазы, 6 ед./мкл M-MLV-ревертазы, 5×-буфер для M-MLV-ревертазы. Обратную транскрипцию проводили в амплификаторе (CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System, “Bio-Rad Laboratories”, США). Для проведения ПЦР в реальном времени использовали полученную в результате обратной транскрипции кДНК, праймеры с концентрацией 10 мкМ мастер-микс (0.3 мМ дНТФ, 3 мМ MgCl₂, 2.5 мкл 10-кратного ПЦР-буфера Б (рН 8.8), 0.06 ед./мкл Taq ДНК-полимеразы, “Синтол”). В качестве референсного гена с помощью базы EST Database был выбран ген *rpl19*. Все праймеры, использовавшиеся в эксперименте, представлены в табл. 1.

Анализ содержания белков в тотальной фракции камбаловидной мышцы. Для выделения тотальной белковой фракции был использован набор реагентов RIPA Lysis Buffer System (“Santa Cruz”, США). При этом дополнительно использовались ингибиторы протеаз Complete Protease Inhibitor Cocktail (“Santa Cruz”, США), 10 мкг/мл апротинина (“SIGMA”, США), 10 мкг/мл лейпептина (“SIGMA”, США), 10 мкг/мл пепстатина (“SIGMA”, США), “complete Mini Protease Inhibitor Cocktail” (Roche, Швейцария) 20 мкл, фосфоингибиторный коктейль (Santa Cruz, США) 40 мкл.

Для проведения электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ) образцы разводились в двукратном буфере для образцов (5.4 мМ Tris-HCl (рН 6.8), 4%-ный Ds-Na, 20%-ный глицерин, 10%-ный β-меркаптоэтанол, 0.02%-ный бромфеноловый синий). Электрофорез был проведен в 10%-ном разделяющем ПААГ. Образцы каждой группы загружались на один гель с контрольными образцами. Электрофорез проводили при силе тока 17 мА на гель в мини-системе (“Bio-Rad Laboratories”) при комнатной температуре. Электроперенос белков проводили на нитроцеллюлозную (НЦ) мембрану при 100 В и силе тока 150–250 мА при температуре 4°C в течение 120 мин в системе mini Trans-Blot (“Bio-Rad Laboratories”). После электропереноса НЦ-мембраны инкубировали в растворе 5%-ного сухого молока (“Bio-Rad Laboratories”) в TBST (TBS + 0.1% Tween 20) в течение 1 ч при комнатной температуре или блокирующем буфере EveryBlot. Для выявления белковых полос использовали первичные поликлональные антитела: фосфорилированной (Thr180/Tyr182) p38 (“GeneTex”, GTX59567, 1 : 500, США), тотальной p38 (“Cell signalling”, #9212, 1 : 500, США), фосфорилированной (Ser9) GSK3β (“Cell signalling”, #9323, 1 : 1000, США), тотальной GSK3β (“Cell signalling”, #9315, 1 : 1000, США), фосфорилированной

(Ser641) GS (“Cell signalling”, #3891, 1 : 1000, США), тотальной GS (“Cell signalling”, #3893, 1 : 1000, США), фосфорилированной (Thr183/Tyr185) JNK1/2 (“Thermo Fisher Scientific”, 44-682G, 1 : 1000, США), тотальной JNK1/2 (“Sigma-Aldrich”, SAB4200176, 1 : 1000, США), фосфорилированной (Thr389) p70S6K (“Santa Cruz”, sc-11759, 1 : 2000, США), тотальной p70S6K (“Cell signaling”, #9202, 1 : 1000, США). В качестве вторичных антител использовали антитела goat anti-rabbit, конъюгированные с пероксидазой хрена (“Jakson Immuno Research”, Великобритания) в разведении 1 : 25000. Инкубация блотов с первичными антителами проводилась в течение ночи при 4°C, со вторичными антителами 1 ч при комнатной температуре. Иммунореактивные полосы визуализировали с помощью усиленной хемилюминесценции с использованием C-DiGit Blot Scanner (LI-COR Biotechnology, США) и количественно оценивали с помощью программного обеспечения Image Studio C-DiGit.

Анализ содержания рибосомальной РНК. Образцы РНК разводили в 2× денатурирующем буфере loading dye (Thermo fisher, США), после чего наносили на 1.2%-ный агарозный гель с добавлением бромистого этидия. Объем нанесения рассчитывали исходя из объема мышечной ткани, из которой был выделен образец РНК. Электрофорез проводился при напряжении 5 В на см длины между электродами в буфере TBE. Содержание РНК оценивали с помощью оптической плотности полос на геле, проанализированных на сканере Gel Doc (Bio-Rad, США).

Анализ площади поперечного сечения волокон. С помощью микротомы Leica CM1900 изготавливали поперечные срезы замороженной мышцы толщиной 9 мкм. Срезы высушивали на воздухе и хранили при –20°C. 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 часа (или при 4°C на ночь). Затем антитела отмывали в PBS 3 × 5 мин. Инкубацию со вторичными антителами, конъюгированными с AlexaFluor, 1 : 500 в PBS проводили в течение 40 мин при комнатной температуре. После отмывки вторичных антител срезы заключали в среду, стабилизирующую флуоресцентную метку. Срезы анализировали с использованием флуоресцентного микроскопа LeicaQ500MC с встроенной цифровой фотокамерой (ТСМ 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.

Статистическая обработка данных. Все значения представлены как средние ± σ для восьми животных. Для проверки различий между группами, учитывая небольшой размер выборки, был использован непараметрический критерий Краскела–Уоллиса с последующим *post-hoc* анализом Данна. Значение *p* менее 0.05 расценивали как статистически значимое.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

После 7 сут вывешивания мы не наблюдали значимой разницы в массе тела животных среди экспериментальных групп (табл. 2). Масса камбаловидной мышцы статистически значимо снижалась на 28 и 15% в группах HS и HS + PCPZ относительно группы контроля (табл. 2).

Площадь поперечного сечения (ППС) быстрых волокон снижалась в группах HS и HS + PCPZ на 44 и 34% соответственно. Схожим образом снижалась ППС медленных волокон на 38 и 20%. При этом мы наблюдали значимую разницу между двумя группами с вывешиванием задних конечностей (рис. 1).

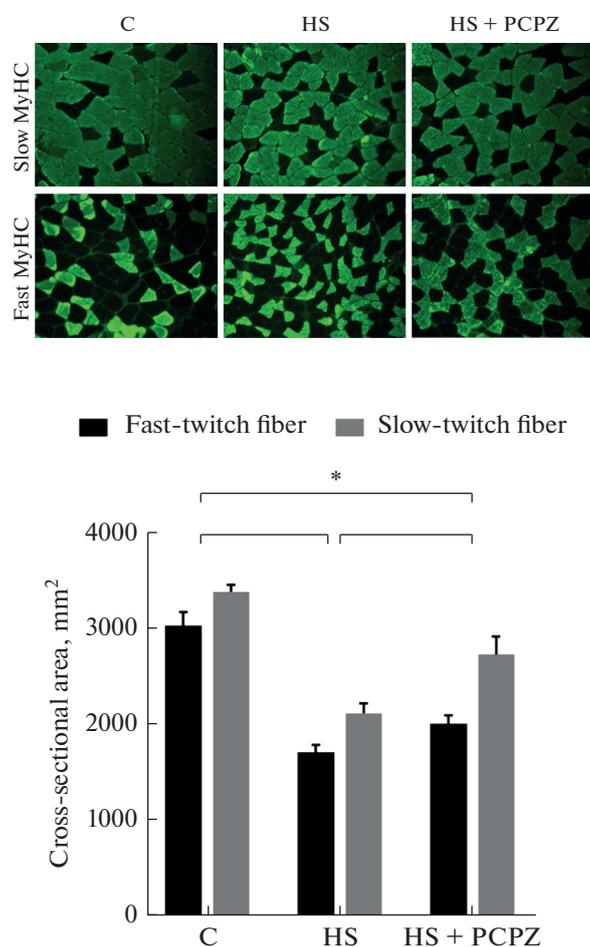


Рис. 1. Площадь поперечного сечения (cross-sectional area) быстрых (fast-twitch) и медленных (slow-twitch) волокон *m. soleus*. C – контроль; HS – вывешивание в течение 7 сут; HS + PCPZ – вывешивание в течение 7 сут с ежедневным введением прохлорперазина. * – $p < 0.05$. MyHC (myosin heavy chain) – тяжёлые цепи миозина.

Статус фосфорилирования p70S6K – ключевого субстрата протеинкиназы mTORc1 – не имел различий между тремя исследуемыми группами (рис. 2).

Функциональная разгрузка привела к снижению содержания ключевых рибосомальных РНК (18S и 28S рРНК) в *m. soleus* крысы в группе 7-суточного вывешива-

Таблица 2. Масса тела животных и масса *m. soleus*

	C	HS	HS + PCPZ
Масса тела крыс, г	191.4 ± 2.4	198.5 ± 3.4	194.0 ± 6.6
Масса <i>m. soleus</i> , мг	92.9 ± 2.2	73.6 ± 1.7*	85.4 ± 3.6*

C – контроль; HS – вывешивание в течение 7 сут; HS + PCPZ – вывешивание в течение 7 сут с ежедневным введением прохлорперазина. Данные представлены как среднее ± σ. * – $p < 0.05$.

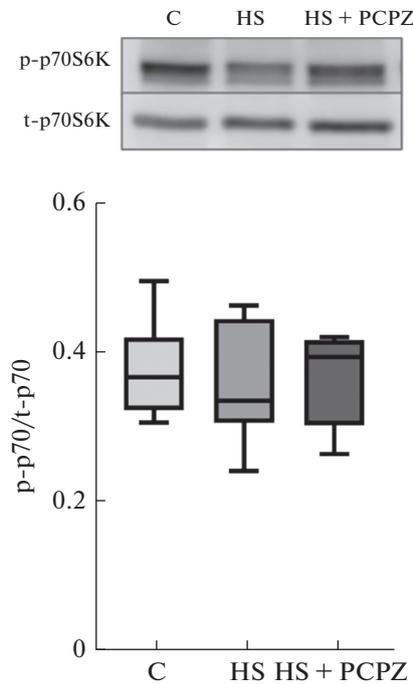


Рис. 2. Содержание фосфорилированной (Thr³⁸⁹) формы p70S6K в *m. soleus*. C – контроль; HS – вывешивание в течение 7 сут; HS + PCPZ – вывешивание в течение 7 сут с ежедневным введением прохлорперазина. * – $p < 0.05$.

ния по сравнению с контрольной группой (рис. 3а, 3б). Введение животным прохлорперазина предотвратило снижение 18S и 28S рРНК в *m. soleus* крысы (рис. 3а, б). Содержание мРНК транскрипционного фактора рибосомальных генов с-Мус демонстрировало сходную динамику: снижение в группе “чистого” вывешивания, но при этом существенный рост в группе вывешивания с препаратом (рис. 3с).

Ферментативная активность киназы гликогенсинтазы 3β (GSK- 3β) в камбаловидной мышце крысы была значительно увеличена в обеих группах антиортостатического вывешивания, о чем свидетельствует снижение степени ее негативного фосфорилирования (рис. 4а). Активация GSK- 3β также подтверждается значительным увеличением фосфорилирования ее ключевого субстрата – гликогенсинтазы-1 (GS-1) (рис. 4б).

Содержание транскриптов убиквитинлигаз MuRF1, MAFbx и убиквитина было значительно повышено в группе с вывешиванием задних конечностей (рис. 5а–с). При этом введение прохлорперазина на фоне функциональной разгрузки позволило предотвратить увеличение экспрессии данных протеолитических маркеров (рис. 5а–с).

После 7 сут разгрузки наблюдалось значимое увеличение содержания фосфорилированной формы p38 на 160% в группе HS относительно контрольной группы. Введение прохлорперазина животным из группы HS + PCPZ предотвращало это увеличение (рис. 6а). Прохлорперазин также значимо снижал фосфорилирование JNK1/2 в группе вывешивания с препаратом (рис. 6б).

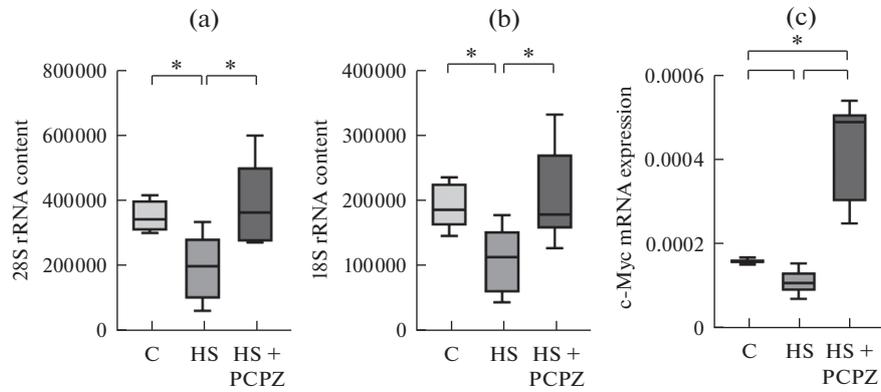


Рис. 3. Содержание 28S рРНК (а), содержание 18S рРНК (б) и экспрессия мРНК с-Мус в *m. soleus*. С – контроль; HS – вывешивание в течение 7 сут; HS + PCPZ – вывешивание в течение 7 сут с ежедневным введением прохлорперазина. * – $p < 0.05$.

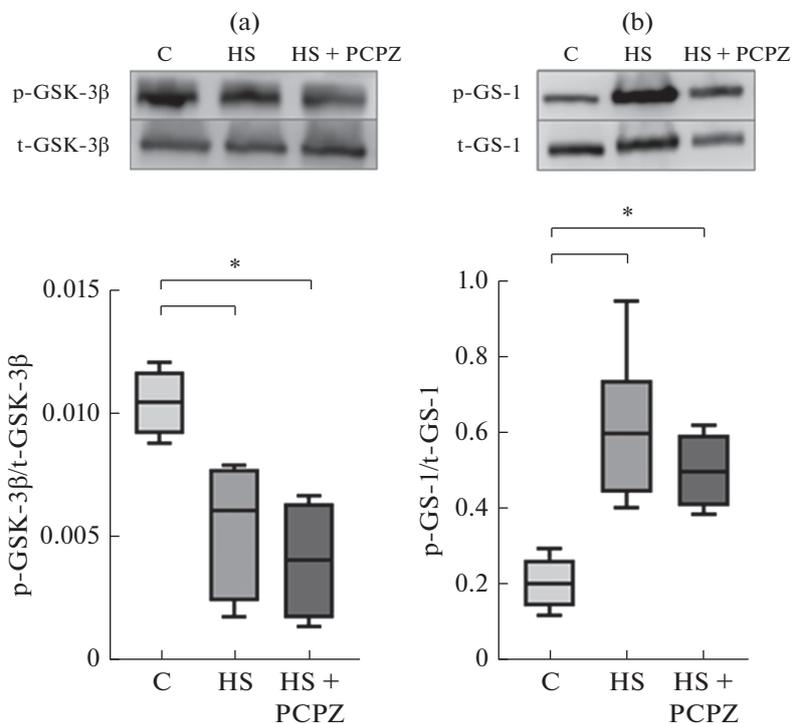


Рис. 4. Содержание фосфорилированной (Ser⁹) формы GSK3β (а) и фосфорилированной (Ser⁶⁴¹) формы GS-1 (б) в *m. soleus*. С – контроль; HS – вывешивание в течение 7 суток; HS + PCPZ – вывешивание в течение 7 суток с ежедневным введением прохлорперазина. * – $p < 0.05$.

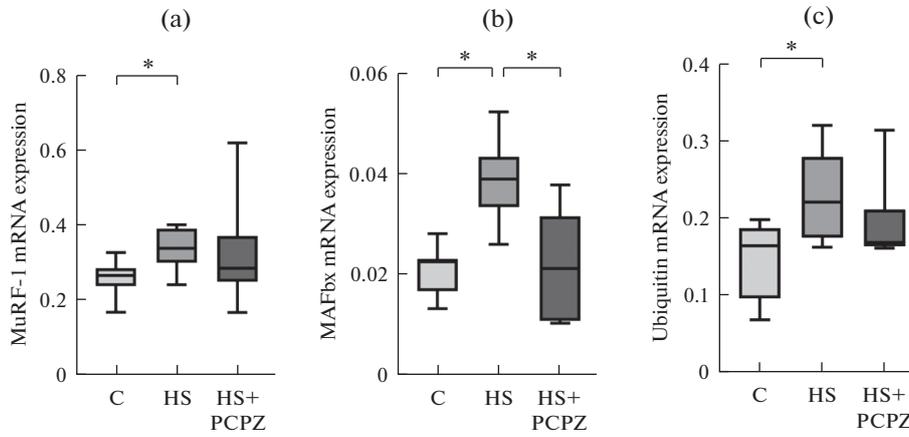


Рис. 5. Экспрессия мРНК показателей протеолиза MuRF-1 (a), MAFbx (b) и убиквитина (c) в *m. soleus*. C – контроль; HS – вывешивание в течение 7 сут; HS + PCPZ – вывешивание в течение 7 сут с ежедневным введением прохлорперазина. * – $p < 0.05$.

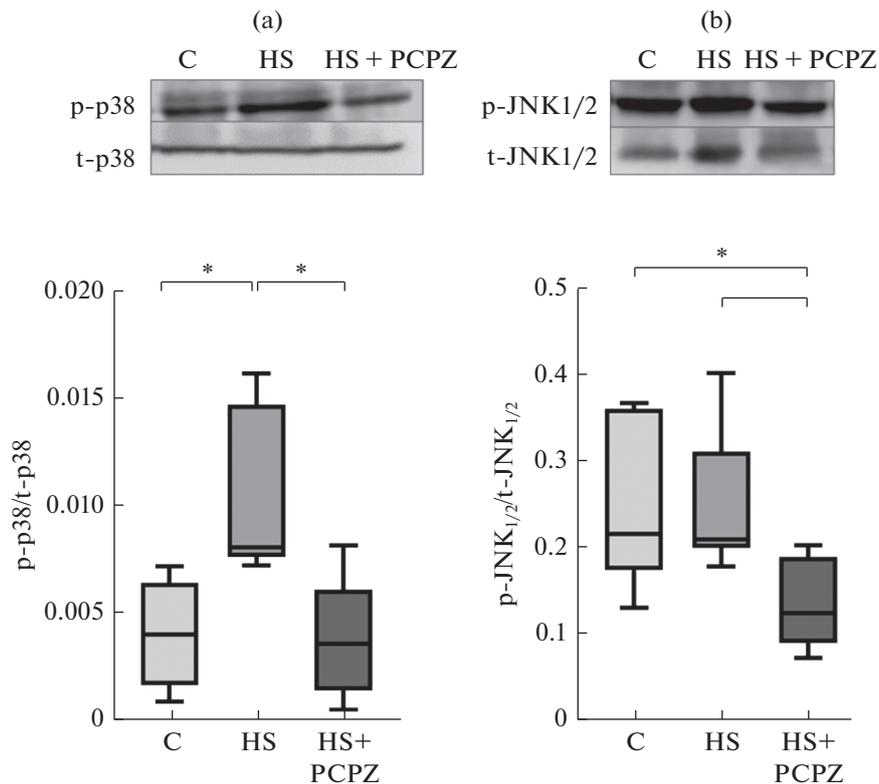


Рис. 6. Содержание фосфорилированной (Thr^{180/182}) формы p38 (a) и фосфорилированной (Thr^{183/185}) формы JNK1/2 (b) в *m. soleus*. C – контроль; HS – вывешивание в течение 7 сут; HS + PCPZ – вывешивание в течение 7 сут с ежедневным введением прохлорперазина. * – $p < 0.05$.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

До сих пор никому не удавалось оценить физиологические, структурные, метаболические и сигнальные эффекты спонтанной нервно-мышечной активности на фоне опорной разгрузки постуральной мышцы, так как в арсенале исследователей не было инструментов, позволяющих устранить или существенно уменьшить эту активность. Однако, когда нам удалось связать такую активность на фоне опорной разгрузки со снижением белковой экспрессии калий-хлоридного котранспортера КСС-2 в нейронах поясничного отдела спинного мозга и с последующим значительным повышением возбудимости мотонейронов [9], появилась возможность существенно снизить спонтанную нервно-мышечную активность с помощью фармакологического воздействия, активирующего КСС-2. Такой эффект достигается при использовании нейролептика прохлорперазина или активатора КСС-2 животных CLP-257/290. При действии прохлорперазина удалось существенно снизить спонтанную нервно-мышечную активность у животных, подвергнутых опорной разгрузке с использованием модели вывешивания задних конечностей [9]. В настоящем исследовании оценивали атрофические изменения камбаловидной мышцы и изменения маркеров сигнальных путей анаболической и катаболической направленности в камбаловидной мышце у вывешенных животных с обычным уровнем спонтанной нервно-мышечной активности и у животных, получавших прохлорперазин и характеризующихся значительно сниженным уровнем спонтанной активности.

Согласно нашей первоначальной гипотезе, при устранении спонтанной активности на фоне функциональной разгрузки степень атрофии мышц должна быть глубже, а метаболические и сигнальные изменения должны быть более выраженными, чем у вывешенных животных, принимавших плацебо, электромиограмма которых демонстрирует повышенную активность. Именно такую тенденцию мы выявили при исследовании маркеров регуляции биогенеза митохондрий в камбаловидной мышце вывешенных крыс, получавших прохлорперазин (PGC-1 α , TFAM и др.) [11]. Снижение экспрессии этих маркеров оказалось более глубоким у животных, получавших прохлорперазин на фоне разгрузки, по сравнению с вывешенными животными без препарата.

В настоящем исследовании аналогичной тенденции при анализе сырой массы камбаловидной мышцы и площади поперечного сечения мышечных волокон не было отмечено. Напротив, у вывешенных животных, получавших прохлорперазин, снижение сырой массы и площади поперечного сечения мышечных волокон было менее выражено, чем у вывешенных животных, получавших плацебо. И эти различия между двумя группами были статистически значимы. Ранее в эксперименте с вывешиванием в попытке оценить роль спонтанной активности у вывешенных животных проводили денервацию камбаловидной и подошвенной мышцы в разных группах [12]. Денервация камбаловидной мышцы не привела к углублению атрофического ответа этой мышцы. Напротив, атрофия быстрой мышцы у денервированных животных была более выражена, чем у вывешенных животных, не подвергавшихся денервации. Поскольку при денервации прекращается не только импульсная регуляция мышечной активности, но и передача нейротрофических сигналов, которая более характерна для быстрых мышц, то углубление атрофии быстрой мышцы можно считать следствием прекращения этой передачи.

Этот эксперимент со всей очевидностью свидетельствует, что устранение нейронной импульсной регуляции мышечных сокращений на фоне функциональной разгрузки, как и в нашем эксперименте, не приводит к углублению атрофии. Мы обнаружили даже уменьшение ее выраженности. Причем это происходит в условиях большего “бездействия”, чем в условиях сохраняющейся спонтанной активности. Для того, чтобы приблизиться к пониманию причин этого парадокса, мы про-

анализировали состояние некоторых ключевых маркеров сигнальной регуляции белкового синтеза и распада.

Прежде всего исследовали уровень фосфорилирования рибосомальной киназы p70S6K, основной мишени и одновременно основного эффектора киназного комплекса mTORc1, ключевого фактора трансляционной эффективности, т.е. фактора, способного увеличить количества пептидных продуктов на одну рибосому в единицу времени [13]. Ранее при исследовании динамики этого показателя было обнаружено первоначальное повышение уровня фосфорилирования p70S6K после 12 и 24 ч вывешивания [14, 15] и последующее его снижение до уровня контроля после 7 сут вывешивания [14]. В настоящем исследовании в полном согласии с этими результатами после 7 сут воздействия у вывешенных животных уровень фосфорилирования рибосомальной киназы p70S6K не отличался от контрольного уровня. При этом различий между двумя группами вывешенных крыс (HS и HS + PCPZ) не было отмечено. Таким образом, можно считать, что прием прохлорперазина (и редукция спонтанной нервно-мышечной активности) не оказал влияния на ключевой параметр трансляционной эффективности камбаловидной мышцы. Естественно предположить, что снижение уровня фосфорилирования p70S6K в течение примерно пяти суток после первоначального повышения никак не обусловлено появлением после 2–3 сут спонтанной нервно-мышечной активности.

Совершенно иначе ведут себя параметры так называемой трансляционной емкости (т.е. параметры, способствующие биогенезу рибосом). Ранее в нашей лаборатории было показано, что уже в первые сутки вывешивания интенсивность экспрессии 18S и 28S рибосомальной РНК значимо снижается и поддерживается на уровне ниже контрольного как минимум до 7 сут вывешивания [16]. В настоящем исследовании у вывешенных животных, получавших плацебо, также наблюдали снижение экспрессии рибосомальных РНК. У животных, получавших прохлорперазин такого снижения не было обнаружено. Более того, у этих животных оказалась многократно повышенной экспрессия одного из центральных регуляторов транскрипции рибосомальных генов протоонкогенного белка с-Мус. Экспрессия с-Мус обычно регулируется β -катенином, активность которого может быть заблокирована некоторыми киназами, например, GSK3 β или IKK β [17, 18]. В нашем случае сниженный уровень негативного фосфорилирования GSK3 β по сайту Ser9 примерно одинаков у животных двух вывешенных групп. Однако про влияние спонтанной сократительной активности мышцы на киназную активность IKK β пока ничего не известно. Итак, мы можем констатировать, что именно спонтанная активность подавляет механизмы рибосомального биогенеза при разгрузке. При редукции этой активности уровень экспрессии маркеров трансляционной емкости не демонстрирует значимых отличий от контроля. Таким образом, способствуя снижению трансляционной емкости, спонтанная нервно-мышечная активность может оказаться фактором, углубляющим атрофические процессы в течение первой недели воздействия.

Что касается маркеров сигнальных путей катаболической направленности, то наиболее важными из них являются мРНК основных мышечных E3-убиквитин лигаз — MuRF1 и MAFbx/atrogen-1. Известно, что при вывешивании экспрессия мРНК этих важнейших ферментов значительно возрастает на 3-и и 7-е сутки воздействия [19, 20]. В нашем исследовании этот феномен был также воспроизведен для тех животных, которые в ходе вывешивания получали плацебо. У вывешенных животных, получавших прохлорперазин значимых изменений экспрессии мРНК по сравнению с виварным контролем не было. Поэтому не исключено, что повышенная экспрессия мышечных E3-убиквитин лигаз в данном случае является результатом спонтанной нервно-мышечной активности. Какие же конкретные механизмы, запущенные этой активностью, могут стимулировать экспрессию мРНК

MuRF1 и MAFbx/atrogen-1? В нашем предыдущем исследовании с таким же экспериментальным дизайном [11] у животных, получавших прохлорперазин в ходе разгрузки, наблюдали снижение уровня активных форм кислорода и снижение активности кальций-кальмодулин киназы II (что указывает на снижение содержания ионов кальция) по сравнению с группой вывешенных крыс, получавших плацебо. На этом основании мы предположили, что при возникновении спонтанной активности в камбаловидной мышце накапливаются активные формы кислорода и ионы кальция, способствующие активации митоген-активируемых протеинкиназ, а также сигнального пути NFκB, которые, в свою очередь, стимулируют экспрессию мРНК мышечных E3-убиквитинлигаз [21]. И действительно, в настоящем исследовании уровень фосфорилирования p38 у животных, получавших прохлорперазин, оказывался сниженным по сравнению с вывешенными животными, получавшими плацебо, что может свидетельствовать об активации p38 и JNK при спонтанной нервно-мышечной активности. Не исключено, что такая активация и приводит к повышенной экспрессии убиквитинлигаз и способствует углублению атрофического процесса.

Таким образом, в настоящем исследовании впервые получены результаты, свидетельствующие о том, что у крыс в условиях моделируемой гравитационной разгрузки при использовании прохлорперазина, способствующего активации калий-хлоридного котранспортера KCC-2 и существенно уменьшающего спонтанную электрическую активность постуральной камбаловидной мышцы, наблюдается достоверно меньшая выраженность атрофических изменений в мышце, чем при разгрузке без дополнительных воздействий. При этом почти не наблюдается снижения параметров рибосомального биогенеза и повышения экспрессии убиквитинлигаз по сравнению с интактным контролем. Установить точные причины наблюдаемого эффекта пока не представляется возможным, так же, как и исключить вероятность того, что данные изменения являются следствием прямого специфического действия прохлорперазина на мышцу. Тем не менее, мы склонны придерживаться гипотезы, предполагающей некоторое углубление развития атрофии в результате генерации спонтанной нервно-мышечной ритмической активности. Возможно, что такое развитие событий обусловлено низкой амплитудой и непрерывным характером электрической импульсации (и, вероятно, сократительной активности).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Исследование на животных проводили в соответствии с рекомендациями Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых в экспериментальных и научных целях (Совет Европы № 123, Страсбург, 1986 г.). Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием животных, соответствовали этическим стандартам, утвержденным правовыми актами РФ, принципам Базельской декларации и рекомендациям Комиссией по биомедицинской этике ГНЦ РФ – ИМБП РАН (протокол № 638, от 18.04.2023 г.).

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект 22-15-00151).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией данной статьи.

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента – Б.С.Ш. Сбор данных – К.В.С., К.А.Ш., В.Е.К. Обработка данных – С.А.Т., К.В.С., К.А.Ш. Написание и редактирование манускрипта – Б.С.Ш., К.В.С., С.А.Т., К.А.Ш.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Hodgson JA, Roy RR, Higuchi N, Monti RJ, Zhong H, Grossman E, Edgerton VR* (2005) Does daily activity level determine muscle phenotype? *J Exp Biol* 208 (Pt 19): 3761–3770. <https://doi.org/10.1242/jeb.01825>
2. *Alford EK, Roy RR, Hodgson JA, Edgerton VR* (1987) Electromyography of rat soleus, medial gastrocnemius, and tibialis anterior during hind limb suspension. *Exp Neurol* 96(3): 635–649. [https://doi.org/10.1016/0014-4886\(87\)90225-1](https://doi.org/10.1016/0014-4886(87)90225-1)
3. *Kawano F, Nomura T, Ishihara A, Nonaka I, Ohira Y* (2002) Afferent input-associated reduction of muscle activity in microgravity environment. *Neuroscience* 114(4): 1133–1138. [https://doi.org/10.1016/s0306-4522\(02\)00304-4](https://doi.org/10.1016/s0306-4522(02)00304-4)
4. *Morey-Holton ER, Globus RK* (2002) Hindlimb unloading rodent model: technical aspects. *J Appl Physiol* 92(4): 1367–1377. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00969.2001>
5. *De-Doncker L, Kasri M, Picquet F, Falempin M* (2005) 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* 208(Pt 24): 4585–4592. <https://doi.org/10.1242/jeb.01931>
6. *Baltina TV, Ereemeev AA, Pleshchinskii IN* (2006) The state of the contralateral neuromotor apparatus of the rat in conditions of unilateral tenotomy. *Neurosci Behav Physiol* 36(4): 385–389. <https://doi.org/10.1007/s11055-006-0029-5>
7. *Boulenguez P, Liabeuf S, Bos R, Bras H, Jean-Xavier C, Brocard C, Stil A, Darbon P, Cattaert D, Delpire E, Marsala M, Vinay L* (2010) Down-regulation of the potassium-chloride cotransporter KCC2 contributes to spasticity after spinal cord injury. *Nat Med* 16(3): 302–307. <https://doi.org/10.1038/nm.2107>
8. *Hubner CA, Stein V, Hermans-Borgmeyer I, Meyer T, Ballanyi K, Jentsch TJ* (2001) Disruption of KCC2 reveals an essential role of K-Cl cotransport already in early synaptic inhibition. *Neuron* 30(2): 515–524. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(01\)00297-5](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(01)00297-5)
9. *Kalashnikov VE, Tyganov SA, Turtikova OV, Kalashnikova EP, Glazova MV, Mirzoev TM, Shenkman BS* (2021) Prochlorperazine Withdraws the Delayed Onset Tonic Activity of Unloaded Rat Soleus Muscle: A Pilot Study. *Life* 11(11): 1161. <https://doi.org/10.3390/life11111161>
10. *Nair AB, Jacob S* (2016) A simple practice guide for dose conversion between animals and human. *JBCP* 7(2): 27–31. <https://doi.org/10.4103/0976-0105.177703>
11. *Sharlo KA, Lvova ID, Tyganov SA, Sergeeva KV, Kalashnikov VY, Kalashnikova EP, Mirzoev Kh M, Kalamkarov GR, Shevchenko TF, Shenkman BS* (2023) A Prochlorperazine-Induced Decrease in Autonomous Muscle Activity during Hindlimb Unloading Is Accompanied by Preserved Slow Myosin mRNA Expression. *Curr Issues Mol Biol* 45(7): 5613–5630. <https://doi.org/10.3390/cimb45070354>
12. *Ohira Y, Yoshinaga T, Ohara M, Kawano F, Wang XD, Higo Y, Terada M, Matsuoka Y, Roy RR, Edgerton VR* (2006) The role of neural and mechanical influences in maintaining normal fast and slow muscle properties. *Cells Tissues Organs* 182(3–4): 129–142. <https://doi.org/10.1159/000093963>
13. *Mahoney SJ, Dempsey JM, Blenis J* (2009) Cell signaling in protein synthesis ribosome biogenesis and translation initiation and elongation. *Prog Mol Biol Transl Sci* 90: 53–107. [https://doi.org/10.1016/S1877-1173\(09\)90002-3](https://doi.org/10.1016/S1877-1173(09)90002-3)
14. *Mirzoev T, Tyganov S, Vilchinskaya N, Lomonosova Y, Shenkman B* (2016) 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* 39 (3): 1011–1020. <https://doi.org/10.1159/000447808>
15. *Chibalin AV, Benziane B, Zakyrganova GF, Kravtsova VV, Krivoi, II* (2018) Early endplate remodeling and skeletal muscle signaling events following rat hindlimb suspension. *J Cell Physiol* 233(10): 6329–6336. <https://doi.org/10.1002/jcp.26594>
16. *Rozhkov SV, Sharlo KA, Shenkman BS, Mirzoev TM* (2022) The Role of Glycogen Synthase Kinase-3 in the Regulation of Ribosome Biogenesis in Rat Soleus Muscle under Disuse Condi-

- tions. *Int J Mol Sci* 23(5): 2751.
<https://doi.org/10.3390/ijms23052751>
17. Hu D, Bi X, Fang W, Han A, Yang W (2009) GSK3beta is involved in JNK2-mediated beta-catenin inhibition. *PLoS One* 4(8): e6640.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006640>
 18. Sui Y, Liu Z, Park SH, Thatcher SE, Zhu B, Fernandez JP, Molina H, Kern PA, Zhou C (2018) IKKbeta is a beta-catenin kinase that regulates mesenchymal stem cell differentiation. *JCI Insight* 3(2): e96660.
<https://doi.org/10.1172/jci.insight.96660>
 19. Bodine SC, Latres E, Baumhueter S, Lai VK, Nunez L, Clarke BA, Poueymirou WT, Panaro FJ, Na E, Dharmarajan K, Pan ZQ, Valenzuela DM, DeChiara TM, Stitt TN, Yancopoulos GD, Glass DJ (2001) Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. *Science* 294(5547): 1704–1708.
<https://doi.org/10.1126/science.1065874>
 20. Kachaeva EV, Shenkman BS (2012) Various jobs of proteolytic enzymes in skeletal muscle during unloading: facts and speculations. *J Biomed & Biotechnol* 2012 493618.
<https://doi.org/10.1155/2012/493618>
 21. Zhang BT, Whitehead NP, Gervasio OL, Reardon TF, Vale M, Fatkin D, Dietrich A, Yeung EW, Allen DG (2012) Pathways of Ca²⁺ entry and cytoskeletal damage following eccentric contractions in mouse skeletal muscle. *J Appl Physiol* 112(12): 2077–2086.
<https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00770.2011>

The Effect of Spontaneous Neuromuscular Activity on the Development of Atrophy of the Functionally Unloaded *m. soleus*

**K. V. Sergeeva^{a,*}, K. A. Sharlo^a, V. E. Kalashnikov^a, O. V. Turtikova^a,
S. A. Tyganov^a, and B. S. Shenkman^a**

^a*Institute of Biomedical Problems, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia*

^{*}*e-mail: Sergeeva_xenia@mail.ru*

It is well known that the inactivity of mammalian skeletal muscles leads to the cessation of their electrical activity and is accompanied by atrophic changes in muscle fibers. However, it has been repeatedly noted that starting from the 3rd day of functional unloading, spontaneous rhythmic neuromuscular activity appears, which is the result of a decrease in the expression of the potassium chloride co-transporter KCC-2 in neurons of the lumbar spinal cord. A decrease in the expression of KCC-2 and the onset of autonomous electrical activity of the unloaded muscle can be prevented by the administration of the neuroleptic prochlorperazine. Thus, the aim of this study was to evaluate the structural and signaling effects of the reduced spontaneous activity of the unloaded *m. soleus*. It was found that daily administration of prochlorperazine to rats under conditions of 7-day simulated gravitational unloading prevented a decrease in the content of the main markers of ribosome biogenesis (*c-Myc*, 18S rRNA and 28S rRNA), and also partially prevented a decrease in the cross-sectional area of fast and slow muscle fibers in the *m. soleus*. Morphofunctional changes caused by a decrease of spontaneous activity of the unloaded muscle were accompanied by complete or partial prevention of activation of key proteolytic markers expression (*MuRF-1*, *MAFbx/atrogen-1*, ubiquitin). Thus, we assume that spontaneous neuromuscular activity may be a factor that augments muscle atrophy during the first week of functional unloading.

Keywords: skeletal muscle, gravitational unloading, prochlorperazine, spontaneous activity, protein breakdown, ubiquitinligase