

2-АРВ ПРЕДОТВРАЩАЕТ АТРОФИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ И МЕНЯЕТ КЛЕТОЧНЫЙ СИГНАЛИНГ ПРИ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ РАЗГРУЗКЕ

M. SOLEUS КРЫС

© 2024 г. К. А. Зарипова¹, Р. О. Боков¹, К. А. Шарло¹, С. П. Белова¹,
Т. Л. Немировская^{1,*}

¹Институт медико-биологических проблем РАН, Москва, Россия

*E-mail: Nemirovskaya@bk.ru

Поступила в редакцию 11.07.2024 г.

После доработки 15.08.2024 г.

Принята к публикации 15.08.2024 г.

IP3-рецепторы (IP3R) находятся в значительном количестве в мышечных волокнах в саркоплазматическом ретикулуме, ядре и митохондриях. Мы предположили, что активация IP3R при разгрузке мышц может вызывать слабый сигнал высвобождения кальция как цитозольный, так и нуклеоплазматический, который способствует (возможно, с другими сигнальными каскадами) активации транскрипционных факторов, что приводит к экспрессии или репрессии генов, участвующих в фенотипе мышц. Эту гипотезу проверяли, применив блокирование IP3R во время функциональной разгрузки мышц крыс путем введения 2-АРВ (2-aminoethoxydiphenyl borate). Мы обнаружили, что состояние IP3R влияет на развитие атрофических процессов постуральной *m. soleus* при вывешивании крыс. Введение блокатора IP3R2-АРВ животным успешно предотвращало снижение площади поперечного сечения *m. soleus* как быстрых, так и медленных мышечных волокон. Замедление снижения площади поперечного сечения мышечных волокон *m. soleus* при введении ингибитора IP3R на фоне 7-суточной функциональной разгрузки связано с предотвращением снижения рибосомального биогенеза и повышения экспрессии маркера аутофагии ULK-1 и IL-6.

Ключевые слова: скелетная мышца, атрофия, IP3-рецепторы

DOI: 10.31857/S0869813924090062, **EDN:** AJUMSN

ВВЕДЕНИЕ

Функциональная разгрузка скелетных мышц включает в себя отсутствие или же значительное снижение активности мышц, а также механической нагрузки на мышцу. Такое состояние в той или иной степени наблюдается в условиях постельной гипокинезии, гипсовой иммобилизации конечностей при травмах, а также в условиях микрогравитации при космическом полете. В лабораторных условиях функциональную разгрузку изучают с использованием модели вывешивания задних конечностей грызунов [1]. Функциональная разгрузка приводит к развитию атрофии и слабости мышц, которые сохраняются достаточно долгое время после возвращения к нормальному режиму активности. Молекулярные механизмы развития этих процессов изучены не-

достаточно, в частности, роль кальций-зависимых сигнальных путей. При функциональной разгрузке мышц обнаружено накопление ионов Ca^{2+} в мышечных волокнах [2, 3] и в миоядрах [4], а активация кальций-зависимых протеаз кальпаинов вносит существенный вклад в деградацию цитоскелетных белков камбаловидной мышцы [5]. Похожее накопление кальция в миоплазме происходит при ряде патологических состояний, таких как старение или различные миодистрофии [6, 7], и может вносить вклад в развитие атрофических процессов. Помимо непосредственного участия в атрофии за счет активации протеолиза, кальций может работать и как регулятор транскрипции генов [8].

Ионы кальция при разгрузке мышц поступают в саркоплазму из саркоплазматического ретикулума (СР) в ответ на деполяризацию мышечной мембраны через механизм сопряжения DHPR/RyR (дигидропиридиновые рецепторы/рианодиновые каналы) [9]. IP3-рецепторы (IP3R) также находятся в СР, митохондриях, а также в ядре и в дополнение к поглощению Ca^{2+} в СР, регулируют обмен кальция с ядром [10, 11]. Пропускная способность IP3R регулируется ионами Ca^{2+} и IP3, при этом в зависимости от концентрации IP3 IP3R варьируют силу кальциевого сигнала [12]. IP3 вырабатывается после активации различных рецепторов плазматической мембраны клетки внеклеточными сигналами [13]. SERCA (саркоплазматическая Ca^{2+} АТФаза) играет ключевую роль в удалении ионов кальция из СР и ее активность при разгрузке мышц снижена [14, 15]. Мы полагаем, что снижение ее активности при разгрузке мышц может вносить дополнительный вклад в накопление кальция в мышечных волокнах. Высвобождение Ca^{2+} , вызванное деполяризацией клеток скелетных мышц, можно разделить на два независимых компонента: быстрый транзитный Ca^{2+} , равномерно распределенный по клетке, что соответствует сопряжению возбуждения и сокращения, и медленный транзитный Ca^{2+} с отчетливым ядерным компонентом, генерируемый IP3 [16]. «Медленный» Ca^{2+} может стимулировать активацию внутриклеточных сигнальных путей и мышечную атрофию, а также участвует в сопряжении возбуждения и транскрипции [17–19]. Термин «медленный» кальций относится к ионам Ca^{2+} , повышенная концентрация которых не связана с сокращением и сохраняется в саркоплазме в течение длительного времени (пик достигается через 60–100 с и в основном связан с ядрами клеток). В работах [20, 21] в экспериментах на культуре миотуб было обнаружено, что медленные кальциевые процессы опосредованы IP3, но не RyR. В работах с участием Jaimovich (2000–2023 гг.) показано, что IP3R необходимы для нормальной активности скелетных мышц, оказывая свое действие путем регулирования экспрессии генов, энергетического обмена и активности митохондрий. Мы полагаем, что при функциональной разгрузке скелетных мышц механизм генерации IP3 может осуществляться посредством активации метаболитных пуриnergических рецепторов P2Y внеклеточным АТФ, высвобождаемым через механизм, зависимый от паннексина 1, сопряженного с работой сенсора напряжения DHPR. Ранее аналогичный механизм был описан в лаборатории Jaimovich в экспериментах на культуре миотуб, мышечных волокон, а также в модели mdx мышцей [20, 22–24]. Инактивация Na, K-АТФазы при разгрузке мышц приводит к деполяризации сарколеммы [9], что, в свою очередь, вызывает активацию DHPR [25] и открытие RyR. DHPR соединены в сарколемме с паннексинами каналами. Нами показано, что при функциональной разгрузке АТФ из мышцы через паннексинами каналы может выходить во внеклеточное пространство [26]. Эти нуклеотиды затем могут взаимодействовать с каналами P2Y (G protein Y-coupled receptors) [27]. Известно, что они активируют P13 K gamma (P13K) (в Т-каналах мембраны) и в конечном итоге запускают образование инозитол-1,4,5-трифосфата (IP3). Затем IP3 может связываться с IP3R, присутствующими в саркоплазматической сети, митохондриях и в ядерной мембране, вызывая высвобождение кальция в нуклеоплазме, что способствует (вероятно, вместе с другими сигнальными каскадами) активации факторов транскрипции, приводящей

к экспрессии или репрессии генов, вовлеченных в регуляцию фенотипа мышечных клеток. Отмечено, что IP3-опосредованный кальциевый сигнал вызывал активацию ряда транскрипционных факторов и генов [17, 28]. Гипотеза о роли кальций-зависимой регуляции экспрессии генов при разгрузке скелетных мышц была выдвинута Kandarian и Stevenson в 2002 г. [29].

Мы полагаем, что накопление ионов кальция и IP3 в миоплазме при функциональной разгрузке может вызвать активацию IP3R, что может способствовать (возможно, совместно с другими сигнальными каскадами) активации транскрипционных факторов и стимулировать запуск атрофических процессов при разгрузке мышц. К настоящему времени не было изучено, какую роль играют IP3R при функциональной разгрузке мышц в контроле атрофических процессов. Мы впервые проверяли эту гипотезу в нашем исследовании, применив ингибирование IP3R при функциональной разгрузке *m. soleus* в модели вывешивания задних конечностей крыс в течение 7 суток, т.к. известно, что после 7 суток вывешивания происходит достоверное снижение размеров волокон камбаловидной мышцы и трансформация миофибриллярного фенотипа волокон из «медленного» в «быстрый». Если наша гипотеза верна, то ингибирование IP3R при функциональной разгрузке должно снизить развитие протеолитических процессов и предотвратить усиление распада белка в мышце.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Проведение эксперимента

Функциональная разгрузка моделировалась вывешиванием задних конечностей по стандартной методике Ильина – Новикова в модификации Morey-Holton [1]. Вывешивание проводилось под углом 45 градусов к полу клетки так, что задние конечности крыс не касались пола, а передние свободно опирались на пол, и животные свободно передвигались. Пищу и воду животные получали *ad libitum*. 32 самца крыс линии Wistar были распределены на 4 группы – виварный контроль с введением плацебо (7C, $n = 8$), виварный контроль с введением препарата 2-APB (2-aminoethoxydiphenyl borate) (7CA, $n = 8$), группа вывешивания с введением плацебо (7HS, $n = 8$) и группа вывешивания с введением препарата 2-APB (7HSA, $n = 8$). Препарат вводился внутривентрикулярно в дозе 10 мг/кг в 5%-ном растворе ДМСО ежедневно. Применение этого ингибитора *in vivo* было описано ранее [30]. 2-APB, широко применяемый в качестве ингибитора IP3R препарат [31], ингибирует IP3-зависимые сигналы [19]. Известные для него неспецифические эффекты вызывались большими концентрациями в разы, а в некоторых случаях на порядки [32], чем используемая нами для ингибирования IP3R доза препарата.

Через 7 дней эксперимента крыс наркотизировали авертином (5 мл/кг массы тела 10%-ного раствора), выделяли *m. soleus* и немедленно замораживали в жидком азоте и хранили при -85°C до проведения анализов. Эвтаназия крыс осуществлялась дислокацией шейных позвонков под авертиновым наркозом.

Электрофорез и Вестерн-блоттинг

Для выделения тотальной фракции белка с образцов *m. soleus* на микротоме-криостате фирмы Leica были сделаны срезы толщиной 20 мкм (общей массой 15–20 мг на 1 пробу) и немедленно прогомогенизированы в шариковом гомогенизаторе TissueLyser LT (QIAGEN, Германия) в течение 25 мин в 100 мкл лизирующего буфера RIPA (Santa-Cruz, США), содержащего 50 мМ Tris (pH 7.4), 150 мМ NaCl, 0.1% Triton X-100, 0.1% SDS, 5 мМ EDTA (pH 8.0), 1 мМ DTT, 1 мМ PMSF, 1 мМ Na_3VO_4 , 1 мМ PMSF, апротинин (10 мкг/мл), леупептин (10 мкг/мл), пепстатин А (10 мкг/мл), протеазный ингибиторный коктейль (Santa-Cruz, США) и фосфатазный ингиби-

торный коктейль (Santa-Cruz, США). Затем образцы центрифугировали при 20000 *g* в течение 15 мин. Супернатант отбирали, разаликвотировали и убирали на хранение при -85°C .

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 Laemli-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). Заливку и подготовку ПААГ гелей проводили с помощью заливочных столов фирмы и стекол «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 ТЕМЕД) и в 5%-ном концентрирующем ПААГ (0.2%-ный метилбисакриламид, 0.1%-ный Ds-Na, 125 мМ Tris-HCl (pH 6.8), 0.5%-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 и маркерами молекулярных весов. Образцы загружались из расчета 20 мкг общего белка на дорожку. Уровень фосфорилирования белков определяли, нормируя содержание фосфорилированной формы белка на содержание тотальной формы этого же белка в образце. 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 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 количество 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 . Для выявления белковых полос были использованы первичные антитела против p-CaMKII β (1: 1000, #12716), CaMKII (1: 1000, #3362) фирмы «Cell Signaling Technology». 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). 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). Мембраны, на которых детектировали данные белки, после детекции содержания фосфорилированной формы белка отмывали в восстанавливающем растворе Restore Western Blot Stripping Buffer (Thermo Scientific), после чего анализировали содержание тотальной формы на этих же мембранах путем инкубирования с первичными антителами к тотальным формам белков в течение ночи при 4°C . Затем мембраны отмывали и инкубировали со вторичными антителами и проявляли, как описано выше. Для каждого параметра электрофорез с последующим иммуноблоттингом был повторен не менее 3 раз. Белковые полосы были анализированы с использованием Image Studio Software (LI-COR). 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 методом ПЦР в реальном времени проводили выделение РНК из образцов мышечной ткани. Для выделения РНК из скелетных мышц была использована методика выделения РНК на микроколонках «RNeasy Micro» («Qiagen», Германия) согласно рекомендациям производителя. Определение концентрации мРНК осуществлялось по поглощению раствора мРНК при помощи спектрофотометра NanoPhotometer IMPLN. Измерение каждой пробы проводилось не менее 3 раз. Для проведения обратной транскрипции были использованы реагенты фирмы «Синтол» (Россия) согласно рекомендациям производителя. Праймеры сконструированы с помощью программы Primer3 v.0.4.0, находящейся в свободном доступе (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>). В работе были использованы следующие праймеры: 5'-gcccaatttggtgctttttgt-3' и 5'-aaatcagtcctctccccgt-3' для MuRF-1; 5'-ctacgatgttcagccaaga-3' и 5'-ggcagtcgagaagtccagtc-3' для MAFbx; 5'-cassaagaaggtcaaacagga-3' и 5'-gcaagaacttattcaaaag-tgcaa-3' для убиквитина; 5'-ccggagaggagacttcacag-3' и 5'-acagtgcacatcgctgttc-3' для IL6, 5'-cat-gac-ctc-cct-tgc-atg-taa-c-3' и 5'-acc-agg-tgg-tgg-gta-agg-aac-3' для ULK1, 5'-cag-gaa-cgt-ggg-cca-taa-ca-3' и 5'-tcc-aga-gct-tca-tcg-cca-tc-3' для IP3R, 5'-gta-ccc-ttc-ctc-ttc-cct-atg-c-3' и 5'-caa-tgc-saa-ctc-tcg-tca-aca-g-3' для RPL19. Для проведения ПЦР в реальном времени использовали набор для проведения ПЦР в реальном времени с добавлением SYBR Green фирмы «Синтол» (Россия) согласно рекомендациям производителя.

Электрофорез РНК

Для проведения электрофореза РНК, выделенную как описано ранее, смешивали с равным объемом денатурирующего буфера для нанесения (Thermo Scientific, США) и нагревали 10 мин при 70 °С согласно рекомендациям производителя. Для электрофореза использовали 1.2%-ный агарозный гель с использованием бромистого этидия (0.5 мкг/мл), приготовленный на буфере TBE (89 мМ ТРИС, 89 мМ борная кислота, 2 мМ ЭДТА, рН 8.0). Электрофорез проводили при напряжении 10 В/см длины геля в буфере TBE. Для определения длин полос РНК использовали маркеры RiboRuler (Thermo Scientific, США). Результаты электрофореза визуализировали на Gel Doc EZ Imager (Biorad, США). Для обчета результатов использовали программное обеспечение Image Studio Digits v. 4.0. Степень дегградации РНК определяли по вычислению соотношения 28S РНК к 18S РНК.

Иммуногистохимический анализ

С помощью криомикротома изготавливали поперечные срезы замороженной мышцы толщиной 9 мкм. Срезы высушивали на воздухе и хранили при -20 °С. 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 °С в течение часа (или при 4 °С 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. 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 x200. Анализ изображений

проводился с помощью программы Image J. Измеряли площадь поперечного сечения по крайней мере 100 волокон.

Статистическая обработка данных

Для анализа данных полученных с помощью ПЦР в реальном времени, применялось относительное количественное определение исследуемого гена, нормализованное к референсному, метод 2- $\Delta\Delta C_t$ (метод Ливака). В качестве референсного гена был использован RPL19, экспрессия которого постоянна в *m. soleus* в условиях эксперимента. Статистическая обработка данных производилась с помощью программы REST 2009 v.2.0.12, пакета SigmaPlot 11.0 (Systat Software, Inc., 2008). Достоверность отличий между группами определялась с помощью критерия Краскела – Уоллиса. В тексте и на гистограммах результаты ПЦР представлены в виде медианы и интерквартильной широты. Количество (n) в выборках равно 8. Статистически достоверными различия считали при уровне значимости $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Мы не обнаружили различий в массе *m. soleus* и индексе сырой массы *m. soleus* между вывешенными HS и HSA группами (они были ниже, чем у контрольных групп С и СА), рис. 1.

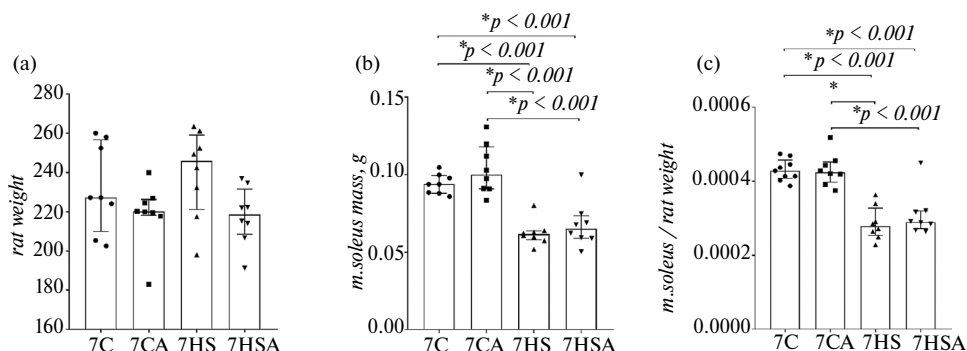


Рис. 1. Масса тела животных (а), масса *m. soleus* (б) и индекс сырой массы *m. soleus* (с). 7С – виварный контроль с введением плацебо, 7СА – виварный контроль с введением 2-АРВ, 7HS – 7-суточное вывешивание с введением плацебо, 7HSA – 7-суточное вывешивание с введением 2-АРВ. * – значимые отличия между группами ($p < 0.001$).

В то же время мы обнаружили, что площадь поперечного сечения как медленных, так и быстрых мышечных волокон *m. soleus* в группе 7-суточного вывешивания (7HS) была достоверно ниже значений групп контроля (7С и 7СА) ($p < 0.05$), рис. 2. Введение ингибитора IP3R при вывешивании (7HSA) предотвратило снижение площади поперечного сечения медленных и быстрых мышечных волокон (их значения не отличались от групп контроля и были достоверно выше, чем в группе 7HS ($p < 0.001$)).

Мы обнаружили существенное снижение содержания маркеров рибосомального биогенеза рРНК 18S (малая субъединица рибосомы) и рРНК 28S (большая субъединица рибосомы) только у вывешенных без введения ингибитора IP3R животных (группа 7HS, рис. 3) относительно контрольных групп.

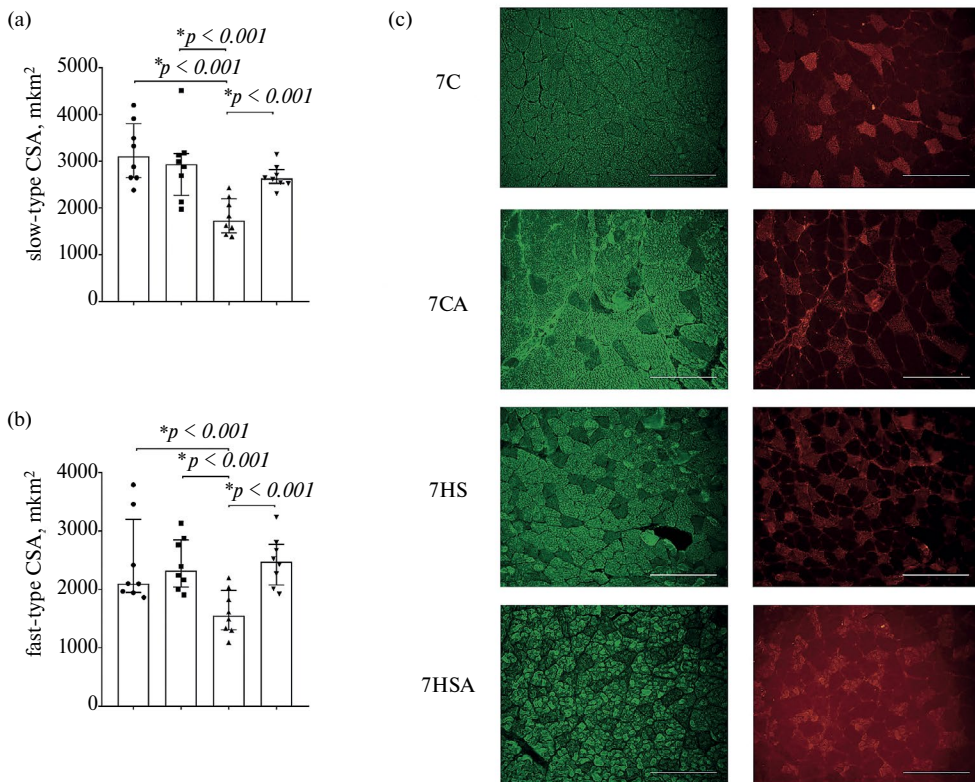


Рис. 2. Площадь поперечного сечения медленных волокон (а), быстрых волокон (б) и микрофотографии иммуногистохимической окраски медленного миозина (зеленые) и быстрого миозина (красные) (с). 7С – виварный контроль с введением плацебо, 7СА – виварный контроль с введением 2-АРВ, 7НС – 7-суточное вывешивание с введением плацебо, 7НСА – 7-суточное вывешивание с введением 2-АРВ. * – значимые отличия между группами. Размерная полоса равна 200 мкм.

Экспрессия маркеров убиквитин-протеасомной системы E3 лигаз MuRF1 и MAFbx/Atrogin-1, а также убиквитина была существенно повышена в обеих вывешенных группах крыс (относительно групп контроля), рис. 4. Введение ингибитора IP3R не выявило отличий по сравнению с группой вывешивания без препарата 7НС.

Уровень экспрессии мРНК маркера аутофагии ULK1 (серин-пролиновая киназа, участвующая в аутофагии) был повышен только в группе вывешивания без препарата (7НС), но не в группе с введением ингибитора IP3R (7НСА) относительно групп контроля, рис. 5а. Аналогичные результаты были получены и для экспрессии мРНК интерлейкина 6 (IL6) и рецепторов IL6 (IL6R). Мы обнаружили предотвращение увеличения экспрессии мРНК IL6 (рис. 5б) в группе 7НСА при введении ингибитора IP3R во время вывешивания крыс относительно группы 7С.

Содержание маркеров кальций-зависимых сигнальных путей IP3R и p-CaMK при 7-дневном вывешивании крыс. Фосфорилирование кальций-кальмодулинкиназы IIb (CaMKIIb) было увеличено в ненагруженной камбаловидной мышце (гр. НС) относительно группы контроля, рис. 6. Введение ингибитора IP3R предотвратило эти изменения. Аналогичные результаты получены для содержания мРНК IP3R, рис. 7.

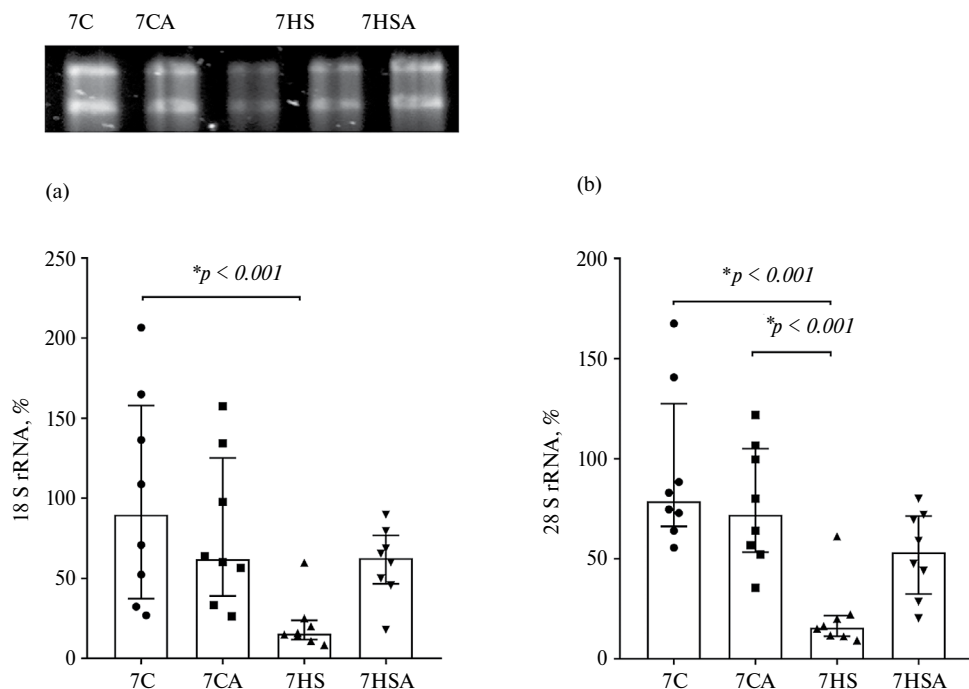


Рис. 3. Содержание 18S рНК (а), 28S рНК (б) в *m. soleus* при введении 2-АРВ на фоне 7-суточного вывешивания. 7С – виварный контроль с введением плацебо, 7СА – виварный контроль с введением 2-АРВ, 7HS – 7-суточное вывешивание с введением плацебо, 7HSA – 7-суточное вывешивание с введением 2-АРВ, * – значимые отличия между группами.

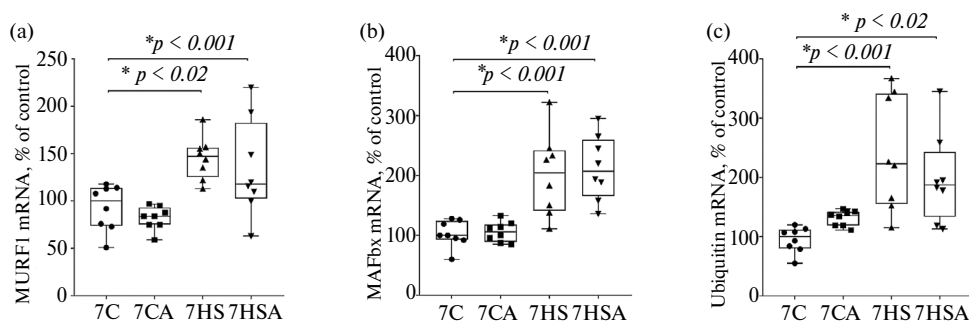


Рис. 4. Экспрессия мРНК MuRF1 (а), MAFbx (б), убиквитина (с) в *m. soleus* при введении 2-АРВ на фоне 7-суточного вывешивания. 7С – виварный контроль с введением плацебо, 7СА – виварный контроль с введением 2-АРВ, 7HS – 7-суточное вывешивание с введением плацебо, 7HSA – 7-суточное вывешивание с введением 2-АРВ. * – значимые отличия между группами.

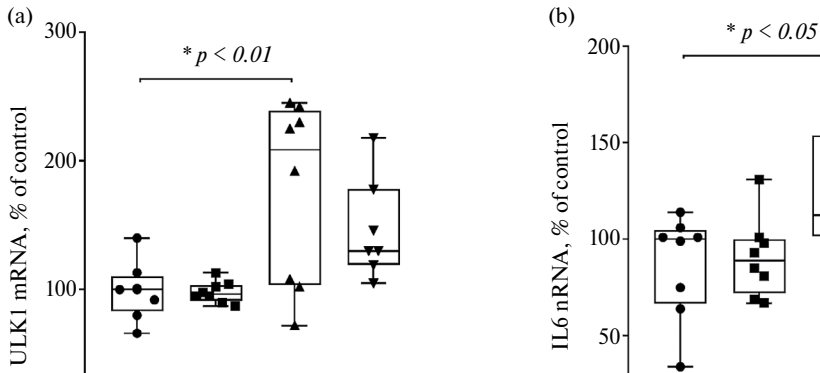


Рис. 5. Экспрессия мРНК ULK1 (a) и IL6 (b) в *m. soleus* при введении 2-APB на фоне 7-суточного вывешивания. 7C – виварный контроль с введением плацебо, 7CA – виварный контроль с введением 2-APB, 7HS – 7-суточное вывешивание с введением плацебо, 7HSA – 7-суточное вывешивание с введением 2-APB. * – значимые отличия между группами.

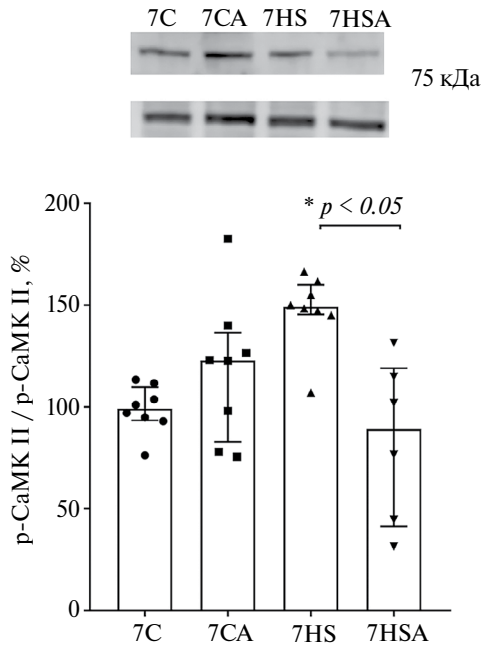


Рис. 6. Уровень фосфорилирования CaMKII в *m. soleus* при введении 2-APB на фоне 7-суточного вывешивания. 7C – виварный контроль с введением плацебо, 7CA – виварный контроль с введением 2-APB, 7HS – 7-суточное вывешивание с введением плацебо, 7HSA – 7-суточное вывешивание с введением 2-APB. * – значимые отличия между группами.

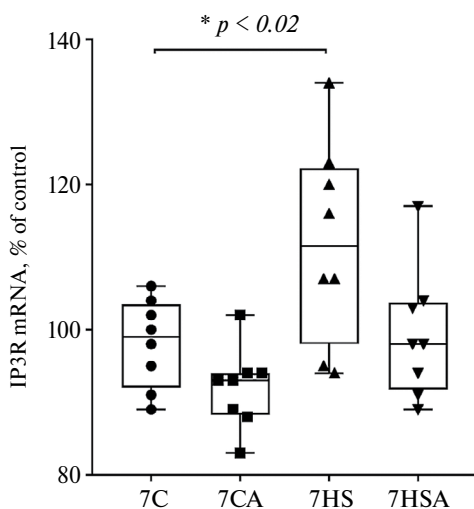


Рис. 7. Экспрессия мРНК IP3R в *m. soleus* при введении 2-АРВ на фоне 7-суточного вывешивания. 7С – виварный контроль с введением плацебо, 7СА – виварный контроль с введением 2-АРВ, 7HS – 7-суточное вывешивание с введением плацебо, 7HSA – 7-суточное вывешивание с введением 2-АРВ. * – значимые отличия между группами.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Введение блокатора IP3R2-АРВ вывешенным животным успешно предотвращало снижение площади поперечного сечения как быстрых, так и медленных волокон камбаловидной мышцы. В то же время возникает вопрос, по каким причинам предотвращение атрофии волокон камбаловидной мышцы не отражается на изменении массы мышц экспериментальных животных (рис. 1). Расхождение данных по площади поперечного сечения волокон и массы мышц может быть связано с неволоконными компонентами мышц, такими как внеклеточный матрикс и жидкость (вода, кровь, лимфа). В частности, известно, что в условиях вывешивания снижается мышечный кровоток и, соответственно, кровенаполнение камбаловидной мышцы [33], что могло повлиять на массу мышц. Причины снижения степени атрофии *m. soleus* при функциональной разгрузке могут быть в следующем: гипокинезия приводит к атрофии скелетных мышц из-за нарушения баланса между синтезом белка и его деградацией [34].

Маркеры анаболического сигналинга. рРНК осуществляют трансляцию – считывание информации с мРНК и катализ образования пептидных связей между присоединенными к тРНК аминокислотами. В группе 7HSA (с введением ингибитора IP3R) существенных отличий от групп контроля по этим параметрам не наблюдалось. Таким образом, введение 2-АРВ вывешенным животным (7HSA) приводит к предотвращению снижения содержания рибосомальных РНК 18S и 28S. Можно предположить, что предотвращение снижения площади поперечного сечения медленных и быстрых мышечных волокон *m. soleus* животных, вывешенных 7 суток с ингибированием IP3R, могло быть связано с улучшениями в работе рибосом.

Механизм, за счет которого введение 2-АРВ регулирует содержание 18S и 28S рибосомальных РНК, может быть связан с 2-АРВ-зависимой регуляцией уровня миоплазматиче-

ского и, возможно, ядерного кальция. Ранее было показано, что активность рибосомальных генов, с которых происходит транскрипция рРНК, регулируется метилированием CpG-островков [35, 36]. Рост CpG-метилирования ведет к блокированию экспрессии генов; данному процессу противодействуют транслоказы, деметилирующие CpG [37]. Транслоказы TET могут подвергаться протеолизу со стороны кальций-зависимых протеаз кальпаинов [38]. Таким образом, накопление кальция может приводить к активации кальпаинов, деградации TET и росту метилирования CpG-островков на промоторах рибосомальных генов: введение 2-APB может противодействовать данному процессу, предотвращая накопление кальция, активацию кальпаинов и деградацию транслоказ TET.

Маркеры белковой деградации. Для исследования сигналинга деградации белка мы определили содержание маркеров убиквитин-протеасомной системы: E3-убиквитинлигазы MuRF1 и MAFbx/Atrogin-1, а также убиквитина. Их экспрессия была существенно повышена в обеих вывешенных группах крыс (относительно групп контроля). Увеличение экспрессии этих маркеров при функциональной разгрузке показано ранее [39]. Итак, мы не обнаружили взаимосвязи между частичным снижением атрофии *m. soleus* в группе 7HSA крыс и содержанием маркеров убиквитин-протеасомной системы.

Однако кроме убиквитин-протеасомной системы, деградацию белка контролирует лизосомально-протеасомная система, поэтому мы определили экспрессию маркера ULK1. В группе вывешенных крыс ее уровень был повышен, что согласуется с предыдущими исследованиями [9, 40]. Ингибирование IP3R на фоне вывешивания привело к частичному предотвращению роста экспрессии мРНК ULK1. Наши результаты согласуются с ранними исследованиями, где обнаружено, что активность IP3R1 в мышцах mdx мышей повышала уровень аутофагии, тогда как нокаут IP3R1 возвращал его к базальному уровню [24]. IP3R могут как стимулировать, так и ингибировать аутофагию [41] посредством нескольких механизмов, таких как изменение цитозольного и/или митохондриального уровня Ca^{2+} [42]. В работе [24] описано влияние уровня кальция и АТФ на экспрессию ULK-1, в регуляции которых участвуют IP3R. При разгрузке мышц уровень кальция и АТФ в цитоплазме также повышен, что могло быть стимулом повышения ULK-1.

Аналогичные результаты были получены и для экспрессии мРНК IL6 на 7-е сутки вывешивания при введении 2-APB. Известно, что содержание миокина IL-6 увеличивается при функциональной разгрузке мышц [27, 43, 44]. IL-6 способен влиять на генную экспрессию через эпигеномную модификацию [45–47]. Блокирование рецепторов IL-6 предотвращает развитие атрофии *m. soleus* [43], а введение IL-6 в мышцу, напротив, ведет к ее атрофии [48]. Ранее показано, что IP3-опосредованный кальциевый сигнал индуцирует активацию гена IL-6 [17, 28]. Повышенный уровень IP3 в *m. soleus* вывешенных крыс обнаружен ранее [4]. При блокировании DHPR во время вывешивания уровень IL-6 в *m. soleus* крыс снижался [44], что свидетельствует о кальций-зависимых процессах, регулирующих его экспрессию. IP3R регулируют гомеостаз в том числе внутриядерного кальция [30], за счет чего они способны регулировать экспрессию генов.

Можно заключить, что к частичному предотвращению снижения площади поперечного сечения волокон камбаловидной мышцы при введении ингибитора IP3R на фоне 7-дневного вывешивания крыс могло привести предотвращение повышения уровня экспрессии мРНК IL6 и мРНК маркера аутофагии ULK1. Мы не обнаружили влияния маркеров убиквитин-протеасомной системы на регуляцию этого процесса.

Содержание кальций-зависимых маркеров при 7-суточном вывешивании крыс. Мы определили уровень фосфорилирования по Thr-286 кальций-зависимого маркера CaMKII β (кальций-кальмодулинкиназы) в тотальной белковой фракции. Внутриклеточный кальций является одним из регуляторов активности CaMKII β [49, 50]; аминокислотный остаток Thr-286 молекулы CaMKII β фосфорилируется при повышении содержания ионов кальция [46, 47]. Фосфорилирование CaMKII β было увеличено в ненагруженной камбаловидной мышце (группа HS) относительно группы контроля (рис. 6), однако введение ингибитора IP3R предотвратило эти изменения. Эти результаты

хорошо согласуются с ранее обнаруженным накоплением ионов кальция в миоплазме на фоне вывешивания [2], а также свидетельствуют в пользу того, что применение ингибитора IP3R2-АРВ на фоне вывешивания может быть связано со снижением кальциевого сигнала в мышечных волокнах.

Также в работе было обнаружено повышенное содержание мРНК IP3R в ненагруженной камбаловидной мышце по сравнению с контрольной группой. Увеличенный уровень IP3R был обнаружен ранее в *m. soleus* вывешенных крыс [4]. Такого повышения не наблюдалось в группе с введением 2-АРВ. Хотя 2-АРВ ингибирует IP3R за счет связывания с их активным центром, в литературе есть данные о снижении экспрессии IP3R в тканях при введении 2-АРВ [51], что согласуется с результатами наших исследований.

IP3R находятся в мембране саркоплазматического ретикулума, ядра, а также митохондрий, активируются IP3 и Ca^{2+} [10, 11, 52], а также регулируют гомеостаз кальция в клетке [53]. СаМКП – кальций-зависимая киназа [54]. Наблюдаемое снижение экспрессии IP3R в группе 7HSA, наряду с ингибирующим действием 2-АРВ на активные центры рецепторов, могло внести вклад в снижение кальций-зависимого фосфорилирования СаМКП в данной экспериментальной группе.

Можно заключить, что к снижению степени атрофии *m. soleus* при введении ингибитора IP3R на фоне 7-дневного вывешивания крыс могло привести предотвращение снижения рибосомального биогенеза, а также предотвращение повышения уровня экспрессии маркера аутофагии ULK1 и PL6. Мы не обнаружили включения маркеров убиквитин-протеасомной системы в регуляцию этого процесса. Эффекты введения ингибитора IP3R2 – АРВ могут быть связаны с IP3-зависимой регуляцией внутриядерного кальция.

ВКЛАДЫ АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента – Н. Т. Л., сбор данных – З. К. А., Б. Р. О., Ш. К. А., обработка данных – З. К. А., Б. Р. О., Ш. К. А., Б. С. П., написание и редактирование манускрипта – Н. Т. Л., Б. С. П.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Данная работа финансировалась за счет средств бюджета РФ в рамках научного проекта № 24–15–00088. Никаких дополнительных грантов на проведение или руководство данным конкретным исследованием получено не было.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Эксперименты с животными проводились в соответствии с международными рекомендациями по проведению биомедицинских исследований с лабораторными животными и были одобрены Комиссией по биомедицинской этике Института медико-биологических проблем РАН (протокол № 627 от 6 декабря 2022 г.).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы данной работы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Morey-Holton E, Globus RK, Kaplansky A, Durnova G (2005) The hindlimb unloading rat model: literature overview, technique update and comparison with space flight data. *Adv Space Biol Med* 10: 7–40.
[https://doi.org/10.1016/s1569-2574\(05\)10002-1](https://doi.org/10.1016/s1569-2574(05)10002-1)
2. Ingalls CP, Warren GL, Armstrong RB (1999) Intracellular Ca^{2+} transients in mouse soleus muscle after hindlimb unloading and reloading. *J Appl Physiol* (1985) 87(1): 386–390.
<https://doi.org/10.1152/jappl.1999.87.1.386>

3. *Shenkman BS, Nemirovskaya TL* (2008) Calcium-dependent signaling mechanisms and soleus fiber remodeling under gravitational unloading. *J Muscle Res Cell Motil* 29(6–8): 221–230. <https://doi.org/10.1007/s10974-008-9164-7>
4. *Yang H, Wang H, Pan F, Guo Y, Cao L, Yan W, Gao Y* (2023) New Findings: Hindlimb Unloading Causes Nucleocytoplasmic Ca²⁺ Overload and DNA Damage in Skeletal Muscle. *Cells* 12(7): <https://doi.org/10.3390/cells12071077>
5. *Melnikov IY, Tyganov SA, Sharlo KA, Ulanova AD, Vikhlyantsev IM, Mirzoev TM, Shenkman BS* (2022) Calpain-dependent degradation of cytoskeletal proteins as a key mechanism for a reduction in intrinsic passive stiffness of unloaded rat postural muscle. *Pflugers Arch* 474(11): 1171–1183. <https://doi.org/10.1007/s00424-022-02740-5>
6. *Mijares A, Allen PD, Lopez JR* (2020) Senescence Is Associated With Elevated Intracellular Resting [Ca²⁺] in Mice Skeletal Muscle Fibers. An in vivo Study. *Front Physiol* 11: 601189. <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.601189>
7. *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>
8. *Carafoli E, Krebs J* (2016) Why Calcium? How Calcium Became the Best Communicator. *J Biol Chem* 291(40): 20849–20857. <https://doi.org/10.1074/jbc.R116.735894>
9. *Chibalin AV, Benziane B, Zakyryanova 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>
10. *Georgiev T, Svirin M, Jaimovich E, Fink RH* (2015) Localized nuclear and perinuclear Ca(2+) signals in intact mouse skeletal muscle fibers. *Front Physiol* 6: 263. <https://doi.org/10.3389/fphys.2015.00263>
11. *Taylor CW, Tovey SC* (2010) IP(3) receptors: toward understanding their activation. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2(12): a004010. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a004010>
12. *Foskett JK, White C, Cheung KH, Mak DO* (2007) Inositol trisphosphate receptor Ca²⁺ release channels. *Physiol Rev* 87(2): 593–658. <https://doi.org/10.1152/physrev.00035.2006>
13. *Berridge MJ* (2016) The Inositol Trisphosphate/Calcium Signaling Pathway in Health and Disease. *Physiol Rev* 96(4): 1261–1296. <https://doi.org/10.1152/physrev.00006.2016>
14. *Midrio M, Danieli-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>
15. *Sharlo KA, Lvova ID, Tyganov SA, Zaripova KA, Belova SP, Kostrominova TY, Shenkman BS, Nemirovskaya TL* (2023) The Effect of SERCA Activation on Functional Characteristics and Signaling of Rat Soleus Muscle upon 7 Days of Unloading. *Biomolecules* 13(9): <https://doi.org/10.3390/biom13091354>
16. *Jaimovich E, Reyes R, Liberona JL, Powell JA* (2000) IP(3) receptors, IP(3) transients, and nucleus-associated Ca(2+) signals in cultured skeletal muscle. *Am J Physiol Cell Physiol* 278(5): C998–C1010. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.2000.278.5.C998>
17. *Arias-Calderon M, Almaraz G, Diaz-Vegas A, Contreras-Ferrat A, Valladares D, Casas M, Toledo H, Jaimovich E, Buvinic S* (2016) Characterization of a multiprotein complex involved in excitation-transcription coupling of skeletal muscle. *Skelet Muscle* 6: 15. <https://doi.org/10.1186/s13395-016-0087-5>
18. *Casas M, Altamirano F, Jaimovich E* (2012) Measurement of calcium release due to inositol trisphosphate receptors in skeletal muscle. *Methods Mol Biol* 798: 383–393. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-343-1_22
19. *Cardenas C, Liberona JL, Molgo J, Colasante C, Mignery GA, Jaimovich E* (2005) Nuclear inositol 1,4,5-trisphosphate receptors regulate local Ca²⁺ transients and modulate cAMP response element binding protein phosphorylation. *J Cell Sci* 118(Pt 14): 3131–3140. <https://doi.org/10.1242/jcs.02446>
20. *Araya R, Liberona JL, Cardenas JC, Riveros N, Estrada M, Powell JA, Carrasco MA, Jaimovich E* (2003) Dihydropyridine receptors as voltage sensors for a depolarization-evoked, IP3R-mediated, slow calcium signal in skeletal muscle cells. *J Gen Physiol* 121(1): 3–16. <https://doi.org/10.1085/jgp.20028671>

21. Powell JA, Carrasco MA, Adams DS, Drouet B, Rios J, Muller M, Estrada M, Jaimovich E (2001) IP(3) receptor function and localization in myotubes: an unexplored Ca(2+) signaling pathway in skeletal muscle. *J Cell Sci* 114(Pt 20): 3673–3683.
<https://doi.org/10.1242/jcs.114.20.3673>
22. Altamirano F, Valladares D, Henriquez-Olguin C, Casas M, Lopez JR, Allen PD, Jaimovich E (2013) Nifedipine treatment reduces resting calcium concentration, oxidative and apoptotic gene expression, and improves muscle function in dystrophic mdx mice. *PLoS One* 8(12): e81222.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0081222>
23. Casas M, Buvinic S, Jaimovich E (2014) ATP signaling in skeletal muscle: from fiber plasticity to regulation of metabolism. *Exerc Sport Sci Rev* 42(3): 110–116.
<https://doi.org/10.1249/JES.0000000000000017>
24. Valladares D, Utreras-Mendoza Y, Campos C, Morales C, Diaz-Vegas A, Contreras-Ferrat A, Westermeier F, Jaimovich E, Marchi S, Pinton P, Lavandero S (2018) IP(3) receptor blockade restores autophagy and mitochondrial function in skeletal muscle fibers of dystrophic mice. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* 1864(11): 3685–3695.
<https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2018.08.042>
25. Kravtsova VV, Paramonova II, Vilchinskaya NA, Tishkova MV, Matchkov VV, Shenkman BS, Krivoi II (2021) Chronic Ouabain Prevents Na, K-ATPase Dysfunction and Targets AMPK and IL-6 in Disused Rat Soleus Muscle. *Int J Mol Sci* 22(8):
<https://doi.org/10.3390/ijms22083920>
26. Zaripova KA, Kalashnikova EP, Belova SP, Kostrominova TY, Shenkman BS, Nemirovskaya TL (2021) Role of Pannexin 1 ATP-Permeable Channels in the Regulation of Signaling Pathways during Skeletal Muscle Unloading. *Int J Mol Sci* 22(19):
<https://doi.org/10.3390/ijms221910444>
27. Zaripova KA, Belova SP, Kostrominova TY, Shenkman BS, Nemirovskaya TL (2024) P2Y1 and P2Y2 receptors differ in their role in the regulation of signaling pathways during unloading-induced rat soleus muscle atrophy. *Arch Biochem Biophys* 751: 109844.
<https://doi.org/10.1016/j.abb.2023.109844>
28. Carrasco MA, Riveros N, Rios J, Muller M, Torres F, Pineda J, Lantadilla S, Jaimovich E (2003) Depolarization-induced slow calcium transients activate early genes in skeletal muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 284(6): C1438–C1447.
<https://doi.org/10.1152/ajpcell.00117.2002>
29. Kandarian SC, Stevenson EJ (2002) Molecular events in skeletal muscle during disuse atrophy. *Exerc Sport Sci Rev* 30(3): 111–116.
<https://doi.org/10.1097/00003677-200207000-00004>
30. Ye L, Zeng Q, Ling M, Ma R, Chen H, Lin F, Li Z, Pan L (2021) Inhibition of IP3R/Ca²⁺ Dysregulation Protects Mice From Ventilator-Induced Lung Injury via Endoplasmic Reticulum and Mitochondrial Pathways. *Front Immunol* 12: 729094.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.729094>
31. Gambardella J, Morelli MB, Wang X, Castellanos V, Mone P, Santulli G (2021) The discovery and development of IP3 receptor modulators: an update. *Expert Opin Drug Discov* 16(6): 709–718.
<https://doi.org/10.1080/17460441.2021.1858792>
32. Bilmen JG, Wootton LL, Godfrey RE, Smart OS, Michelangeli F (2002) Inhibition of SERCA Ca²⁺ pumps by 2-aminoethoxydiphenyl borate (2-APB). 2-APB reduces both Ca²⁺ binding and phosphoryl transfer from ATP, by interfering with the pathway leading to the Ca²⁺-binding sites. *Eur J Biochem* 269(15): 3678–3687.
<https://doi.org/10.1046/j.1432-1033.2002.03060.x>
33. Kimura S, Inaoka PT, Yamazaki T (2012) Influence of passive stretching on inhibition of disuse atrophy and hemodynamics of rat soleus muscle. *J Jpn Phys Ther Assoc* 15(1): 9–14.
https://doi.org/10.1298/jjpta.Vol15_002
34. Baldwin KM, Haddad F (2002) Skeletal muscle plasticity: cellular and molecular responses to altered physical activity paradigms. *Am J Phys Med Rehabil* 81(11 Suppl): S40–S51.
<https://doi.org/10.1097/01.PHM.0000029723.36419.0D>
35. D'Aquila P, Montesano A, Mandala M, Garasto S, Mari V, Corsonello A, Bellizzi D, Passarino G (2017) Methylation of the ribosomal RNA gene promoter is associated with aging and age-related decline. *Aging Cell* 16(5): 966–975.
<https://doi.org/10.1111/acer.12603>
36. Grummt I, Langst G (2013) Epigenetic control of RNA polymerase I transcription in mammalian cells. *Biochim Biophys Acta* 1829(3–4): 393–404.
<https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2012.10.004>
37. Williams K, Christensen J, Helin K (2011) DNA methylation: TET proteins-guardians of CpG islands? *EMBO Rep* 13(1): 28–35.
<https://doi.org/10.1038/embor.2011.233>

38. Wang Y, Zhang Y (2014) Regulation of TET protein stability by calpains. *Cell Rep* 6(2): 278–284. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.12.031>
39. Bodine SC, Baehr LM (2014) Skeletal muscle atrophy and the E3 ubiquitin ligases MuRF1 and MAFbx/atrogen-1. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 307(6): E469–E484. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00204.2014>
40. Belova SP, Zaripova K, Sharlo K, Kostrominova TY, Shenkman BS, Nemirovskaya TL (2022) Metformin attenuates an increase of calcium-dependent and ubiquitin-proteasome markers in unloaded muscle. *J Appl Physiol* (1985) <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00415.2022>
41. Parys JB, Decuyper JP, Bultynck G (2012) Role of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor/Ca²⁺-release channel in autophagy. *Cell Commun Signal* 10(1): 17. <https://doi.org/10.1186/1478-811X-10-17>
42. Criollo A, Vicencio JM, Tasdemir E, Maiuri MC, Lavandero S, Kroemer G (2007) The inositol trisphosphate receptor in the control of autophagy. *Autophagy* 3(4): 350–353. <https://doi.org/10.4161/auto.4077>
43. Yakabe M, Ogawa S, Ota H, Iijima K, Eto M, Ouchi Y, Akishita M (2018) Inhibition of interleukin-6 decreases atrogenic expression and ameliorates tail suspension-induced skeletal muscle atrophy. *PLoS One* 13(1): e0191318. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191318>
44. Вильчинская НА, Парамонова ИИ, Немировская ТЛ, Ломоносова ЮН, Шенкман БС (ред) (2020) Экспрессия интерлейкина-6 в камбаловидной мышце крысы в условиях функциональной разгрузки. Динамика процесса и роль кальциевых каналов L-типа. *Авиакосм экол мед* 54(3): 70–78. [Vil'chinskaya NA, Paramonova II, Nemirovskaya TL, Lomonosova YN, Shenkman BS (2020) Expression of interleukin-6 in the rat soleus muscle under conditions of functional unloading. Dynamics of the process and the role of L-type calcium channels. *Aviakosm ecol med* 54(3): 70–78. (In Russ)]. <https://doi.org/10.21687/0233-528X-2020-54-3-70-78>
45. Hodge DR, Cho E, Copeland TD, Guszczynski T, Yang E, Seth AK, Farrar WL (2007) IL-6 enhances the nuclear translocation of DNA cytosine-5-methyltransferase 1 (DNMT1) via phosphorylation of the nuclear localization sequence by the AKT kinase. *Cancer Genomics Proteomics* 4(6): 387–398. <https://doi.org/>
46. Rose AJ, Kiens B, Richter EA (2006) Ca²⁺-calmodulin-dependent protein kinase expression and signalling in skeletal muscle during exercise. *J Physiol* 574(Pt 3): 889–903. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2006.111757>
47. 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): <https://doi.org/10.3390/cells12030401>
48. Sun H, Sun J, Li M, Qian L, Zhang L, Huang Z, Shen Y, Law BY, Liu L, Gu X (2021) Transcriptome Analysis of Immune Receptor Activation and Energy Metabolism Reduction as the Underlying Mechanisms in Interleukin-6-Induced Skeletal Muscle Atrophy. *Front Immunol* 12: 730070. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.730070>
49. Witczak CA, Sharoff CG, Goodyear LJ (2008) 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* 65(23): 3737–3755. <https://doi.org/10.1007/s00018-008-8244-6>
50. Raney MA, Turcotte LP (2008) 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* (1985) 104(5): 1366–1373. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.01282.2007>
51. Liang Q, Zhang Y, Zeng M, Guan L, Xiao Y, Xiao F (2018) The role of IP3R-SOCCs in Cr(vi)-induced cytosolic Ca(2+) overload and apoptosis in L-02 hepatocytes. *Toxicol Res (Camb)* 7(3): 521–528. <https://doi.org/10.1039/c8tx00029h>
52. Hohendanner F, Maxwell JT, Blatter LA (2015) Cytosolic and nuclear calcium signaling in atrial myocytes: IP3-mediated calcium release and the role of mitochondria. *Channels (Austin)* 9(3): 129–138. <https://doi.org/10.1080/19336950.2015.1040966>
53. Gomes DA, Leite MF, Bennett AM, Nathanson MH (2006) Calcium signaling in the nucleus. *Can J Physiol Pharmacol* 84(3–4): 325–332. <https://doi.org/10.1139/y05-117>
54. Park S, Scheffler TL, Gerrard DE (2011) Chronic high cytosolic calcium decreases AICAR-induced AMPK activity via calcium/calmodulin activated protein kinase II signaling cascade. *Cell Calcium* 50(1): 73–83. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2011.05.009>

2-Apb Prevents Atrophic Changes and alters Cellular Signalling During Unloading of Rat *M. Soleus***K. A. Zaripova^a, R. O. Bokov^a, K. A. Sharlo^a, S. P. Belova^a, and T. L. Nemirovskaya^a***^aInstitute of Biomedical Problems RAS, Moscow, Russia***e-mail: Nemirovskaya@bk.ru*

IP3 receptors are found in significant quantities in muscle fibers in the sarcoplasmic reticulum, nucleus and mitochondria. We hypothesized that activation of IP3 receptors (IP3Rs) during muscle unloading may induce a weak calcium release signal, both cytosolic and nucleoplasmic, that promotes (possibly with other signaling cascades) the activation of transcription factors, leading to the expression or repression of genes involved in muscle phenotype. This hypothesis was tested by blocking IP3R during unloading of rat muscles by administering 2-APB (2-aminoethoxydiphenyl borate). Wistar rats were administered intraperitoneally at a dose of 10 mg/mg in 5% DMSO daily. We found that the IP3R state influences the development of atrophic processes in the postural *m. soleus* during unloading. Administration of the IP3R blocker 2-APB to animals successfully prevented a decrease in *m. soleus* cross-sectional area (CSA) of both fast and slow muscle fibers. The slowdown in CSA decrease upon administration IP3R inhibitor during 7 days *m. soleus* unloading is associated with the prevention of a decrease in ribosomal biogenesis and an increase in the expression of autophagy markers ULK-1 and IL-6.

Keywords: skeletal muscle, atrophy, IP3-receptors