РОССИЙСКИЙ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ им. И.М. СЕЧЕНОВА 2025, том 111, № 4, с. 625–636

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

ДИНАМИКА ЭКСПРЕССИИ МЕХАНОЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ ИОННЫХ КАНАЛОВ В ПОСТУРАЛЬНОЙ МЫШЦЕ КРЫСЫ В УСЛОВИЯХ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ РАЗГРУЗКИ

© 2025 г. Н. А. Вильчинская[1], Б. С. Шенкман[1], Т. М. Мирзоев[1, *]

[1]Институт медико-биологических проблем РАН, Москва, Россия
**E-mail: tmirzoev@yandex.ru*

Поступила в редакцию 23.12.2024 г.
После доработки 31.01.2025 г.
Принята к публикации 03.02.2025 г.

При функциональной разгрузке (невесомость, гипокинезия) происходит атония и атрофия постуральных мышц млекопитающих. Есть основания полагать, что кальций-проницаемые механочувствительные каналы могут вносить вклад в развитие мышечной атрофии, вызванной функциональной разгрузкой. Цель исследования состояла в оценке динамики экспрессии ключевых механочувствительных каналов в камбаловидной мышце крысы в условиях функциональной разгрузки. Самцы крыс Вистар подвергались вывешиванию задних конечностей в течение 1, 3, 7 и 14 суток. Экспрессия мРНК Piezo1, TRPC1, TRPC3, TRPC6, TRPM3, TRPM7 и TMEM63B определялась с помощью ПЦР. Содержание белка Piezo1 оценивалось с помощью Вестерн-блоттинга. Экспрессия мРНК Piezo1 временно увеличилась спустя 24 ч разгрузки, но не отличалась от контроля после 3, 7 и 14 суток разгрузки. Снижение содержания белка Piezo1 относительно контроля наблюдалось после 3, 7 и 14 суток функциональной разгрузки. На ранних стадиях разгрузки наблюдалось значительное увеличение экспрессии мРНК TRPC3, TRPM3, TRPM7 и TMEM63B, при этом экспрессия TRPC6 была понижена. Уровень экспрессии мРНК TRPC1 был повышен только после трехсуточной разгрузки. Семисуточная разгрузка не вызвала изменений в экспрессии мРНК TRPC1, TRPC3, TRPM3 и TMEM63B, но привела к повышенной экспрессии TRPM7. После двухнедельной разгрузки в камбаловидной мышце наблюдалось снижение экспрессии мРНК TRPC1, TRPC6, TRPM3 и TMEM63B. Таким образом, на ранней стадии функциональной разгрузки (первые и третьии сутки) наблюдалось транзиторное увеличение экспрессии мРНК Piezo1, TRPC1, TRPC3 и TMEM63B, но на более поздней стадии разгрузки (14 суток) отмечалась пониженная экспрессия TRPC1, TRPC6, TRPM3, TMEM63B на уровне мРНК и Piezo1 на уровне белка.

Ключевые слова: камбаловидная мышца, функциональная разгрузка, Piezo1, TRPC, TRPM, TMEM63B

DOI: 10.31857/S0869813925040053, **EDN:** UEYBBI

ВВЕДЕНИЕ

Одной из важных характеристик мышечных волокон является их способность реагировать на изменение механической нагрузки/сократительной активности путем перестройки своего структурно-метаболического профиля. Так, в условиях функцио-

нальной/механической разгрузки (длительный постельный режим, иммобилизация конечностей, условия невесомости) наблюдается значительная атония и атрофия постуральных мышц (особенно камбаловидной мышцы), а также существенное уменьшение силы мышц [1, 2]. В основе атрофии мышц, вызванной пониженной механической нагрузкой, лежат процессы, связанные со снижением синтеза белка и увеличением протеолиза [3]. При этом степень механических нагрузок, испытываемых мышцей, детектируется с помощью сарколеммальных и саркомерных механосенсоров мышечных волокон [4]. Механоактивируемые (механочувствительные) катионные каналы являются ключевыми сарколеммальными механосенсорами мышечных волокон, которые непосредственно реагируют на механическое состояние клеточной мембраны, вызывая быстрые электрохимические изменения в клетках [5]. В частности, физиологические и биохимические изменения, обусловленные работой механочувствительных каналов, могут быть связаны с поступлением в клетку различных ионов и, прежде всего, ионов кальция (Ca^{2+}). Действительно, изменение внутриклеточной концентрации ионов Ca^{2+} может оказывать существенное влияние на Ca^{2+}-зависимые сигнальные пути, регулирующие важнейшие физиологические процессы в мышечных клетках/волокнах (дифференцировка и слияние миобластов, регенерация мышечной ткани, процессы синтеза и распада белка, регуляция миозинового фенотипа, работа митохондрий и др.) [6–10]. При этом нарушение кальциевой регуляции в мышечных волокнах может вносить вклад в развитие мышечной атрофии и атонии в условиях функциональной разгрузки, в частности, посредством активации Ca^{2+}-зависимых протеаз кальпаинов [9, 11]. Ранее было показано, что механоактивируемые каналы принимают участие в активации комплекса mTORC1 (мишень рапамицина у млекопитающих, комплекс 1 – ключевой регулятор синтеза белка) [12–14], развитии гипертрофии мышц [15], а также повышенной продукции оксида азота (NO) [16] в ответ на механическую нагрузку. Более того, данные, полученные в нашей лаборатории, дают основания полагать, что снижение индуцированного эксцентрическими сокращениями анаболического ответа (синтеза белка) в атрофированной камбаловидной мышце крысы может быть связано с инактивацией механоактивируемых ионных каналов [14].

Обсуждая механочувствительные ионные каналы, нельзя не затронуть вопрос о молекулярной природе данных каналов в скелетных мышцах млекопитающих. В литературе обсуждается несколько семейств мембранных белков, претендующих на роль первичных (непосредственных) механосенсоров. В частности, ряд исследователей показали, что белки семейства TRP (Transient receptor potential) (TRPC1, TRPC3, TRPC6) могут формировать механочувствительные каналы [17, 18]. Кроме того, в литературе содержатся данные об активации каналов TRPM3 [19] и TRPM7 [20] в ответ на механические сигналы. Однако другие исследователи оспаривают роль каналов семейства TRP в качестве подлинных механоактивируемых каналов [21]. В 2010 г. было открыто новое семейство белков Piezo (Piezo1 и Piezo 2), формирующих пору механоактивируемого ионного канала, активирующегося непосредственно в ответ на растяжение плазматической мембраны [22, 23]. В последние годы изучение функции каналов Piezo1 в скелетных мышцах получило большое внимание среди исследователей. Так, была установлена их роль в регуляции постнатального миогенеза [24, 25], регенерации мышцы после повреждения [26, 27] и мышечной атрофии, вызванной иммобилизацией конечности [28]. Сравнительно недавно в клетках животных были также идентифицированы белки семейства TMEM63 (Transmembrane protein 63), характеризующиеся активацией в ответ на механическое растяжение мембраны и осмотический стресс [29–31]. Электрофизиологические свойства каналов TMEM63 отличаются от каналов семейства Piezo более высоким порогом активации и более медленной кинетикой активации/инактивации [29, 31, 32].

Не исключено, что различные Ca^{2+}-проницаемые механочувствительные каналы могут быть вовлечены в процессы, лежащие в основе атрофии скелетных мышц в от-

вет на снижение механической нагрузки. Однако изменение экспрессии механочувствительных катионных каналов в постуральных мышцах млекопитающих на разных этапах функциональной разгрузки остается малоисследованной проблемой. В связи с этим цель настоящей работы состояла в выявлении динамики экспрессии ключевых механочувствительных каналов (Piezo1, TRPC1, TRPC3, TRPC6, TRPM3, TRPM7 и TMEM63B) в постуральной камбаловидной мышце крысы в течение функциональной разгрузки.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Организация экспериментов

Эксперименты выполнялись на самцах крыс Вистар массой 180–200 г. Крысы пребывали в стандартных условиях вивария, имея свободный доступ к корму и воде. Функциональная разгрузка моделировалась с помощью стандартного метода вывешивания задних конечностей (англ. hindlimb suspension/unloading) по Ильину–Новикову в модификации Morey–Holton [33, 34]. Данная методика позволяет создавать функциональную разгрузку для мышц задних конечностей, приводя к атонии и атрофии мышц голени, в частности, постуральной камбаловидной мышцы (*m. soleus*). Подробное описание методики вывешивания задних конечностей грызунов опубликовано нами ранее [35, 36]. Анализировались камбаловидные мышцы крыс после 1-, 3-, 7- и 14-суточного вывешивания. Каждая группа вывешивания (n = 8) сравнивалась с группой контрольных животных (n = 8), которые не подвергались действию функциональной разгрузки. После каждого эксперимента с вывешиванием из задних конечностей под наркозом выделялась камбаловидная мышца, взвешивалась, замораживались в жидком азоте и помещалась в морозильник (–80 °C) до последующего биохимического анализа. Эвтаназия животных проводилась путем введения летальной дозы авертина (750 мг/кг).

Анализ экспрессии генов методом ПЦР

Выделение тотальной РНК из камбаловидной мышцы крыс проводили с помощью реагента ExtractRNA (Евроген, Россия) согласно рекомендациям производителя. Обратную транскрипцию осуществляли с использованием 0.5 мкг РНК и набора для проведения обратной транскрипции RevertAid RT Kit (# K1691, Thermo Fisher Scientific, США) согласно стандартному протоколу. Полученные образцы кДНК использовались для проведения ПЦР в реальном времени с использованием интеркалирующего красителя SYBR Green I в амплификаторе CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System, (Bio-Rad Laboratories, США). Для проведения ПЦР в реальном времени использовали праймеры, последовательности которых представлены в табл. 1. В качестве референсных генов использовали *Gapdh* и *Ywhaz*. Анализ полученных данных осуществлялся по методу Ливака (2–ΔΔCt).

Таблица 1. Последовательности использованных в работе праймеров

Ген	Последовательность (5'- > 3')	Ссылка на GenBank
Piezo1	5'- ttctgggacaaaacggtagcc - 3' 5'- agcctggtggtgttaaagatgtc - 3'	NM_001434583.1
TRPC1	5'- cgtgcgacaagggtgactat - 3' 5'- tccataagtttctgacaaccgt - 3'	NM_001413355.1

Таблица 1. Окончание

TRPC3	5'- accctgcttttaccacggttg - 3' 5'- gccagagtttggaacgagca - 3'	NM_001415005.1
TRPC6	5'- atgaagtgaacgaaggggagc - 3' 5'- cagtctctccccaagctttct - 3'	NM_053559.2
TMEM63B	5'- gagcgagtggaacaggaatatgt - 3' 5'- ccagaggaggttattccctga - 3'	NM_001427713.1
TRPM3	5'- aaaggttaagttccaagcaggg - 3' 5'- agatactcggacatacatggctt - 3'	NM_001191562.1
TRPM7	5'- agtctccataggcctcccttt - 3' 5'tcagaccagatcattcctaagacc - 3'	NM_053705.2
Ywhaz	5'-cccactccggacacagaata- 3' 5'-tgtcatcgtatcgctctgcc- 3'	NM_013011.4
Gapdh	5'- cggtgtgaacggatttggc-3' 5'- ttgaggtcaatgaaggggtcg-3'	NM_017008.4

Гель-электрофорез в ПААГ и иммуноблоттинг

Для выделения тотальной белковой фракции из камбаловидной мышцы использовался RIPA буфер согласно рекомендациям производителя (sc-24948, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, США). Концентрацию белка в полученных пробах определяли при помощи набора Quick Start Bradford Protein Assay (Bio-Rad Laboratories, США). Электрофорез проводился в 10%-ном ПААГ при 17 мА на гель в мини-системе фирмы Bio-Rad Laboratories при комнатной температуре. Электроперенос белков проводился на нитроцеллюлозную мембрану при 100 В и температуре 4 ºС в течение 120 мин в системе mini Trans-Blot (Bio-Rad Laboratories). По окончанию электропереноса мембраны блокировались в EveryBlot Blocking Buffer (#12010020, Bio-Rad Laboratories), а затем инкубировались с первичными антителами против белка Piezo1 (1:1000, Affinity, China, # DF12083) на протяжении ночи. Инкубация со вторичными антителами (goat-anti-rabbit, 1:60000, # 111-035-003, Jackson Immuno Research, Великобритания) проводилась в течение 1 ч при комнатной температуре. Выявление белковых полос осуществлялось с помощью набора ImmunStar Substrate Kit (BioRad Laboratories) и сканера C-DiGit Blot Scanner (LI-COR Biotechnology, США). Белковые полосы анализировались с помощью программы Image Studio Digits Ver. 4.0 (LI-COR Biotechnology). Количественный контроль производился методом нормализации по общему белку путем окрашивания мембраны красителем Ponceau S [37].

Статистическая обработка данных

Анализ полученных экспериментальных данных проведен в программе GraphPad Prism 8. Данные приведены в виде среднего значения ± стандартная ошибка среднего значения. Достоверность различий между группами определяли с помощью *t*-теста с поправкой Уэлча (Welch's t-test). Достоверными считали различия при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Функциональная разгрузка в течение 24 ч привела к увеличению экспрессии мРНК Piezo1 в *m. soleus* крыс на 25% ($p < 0.05$) по сравнению с контрольными животными (рис. 1a). После 3-, 7- и 14-суточной функциональной разгрузки экспрессия мРНК Piezo1 в *m. soleus* не отличалась от контрольных значений (рис. 1a). Относительное содержание белка Piezo1 в *m. soleus* после 1-суточного вывешивания не отличалось от контрольных животных, однако к 3 суткам вывешивания содержание этого белка уменьшилось на 64% ($p < 0.05$) по сравнению с контрольными крысами (рис. 1b). Содержание белка Piezo1 в *m. soleus* крыс было также понижено после 7-суточного (–64%, $p < 0.05$) и 14-суточного (–2%, $p < 0.05$) вывешивания относительно контрольных значений (рис. 1b).

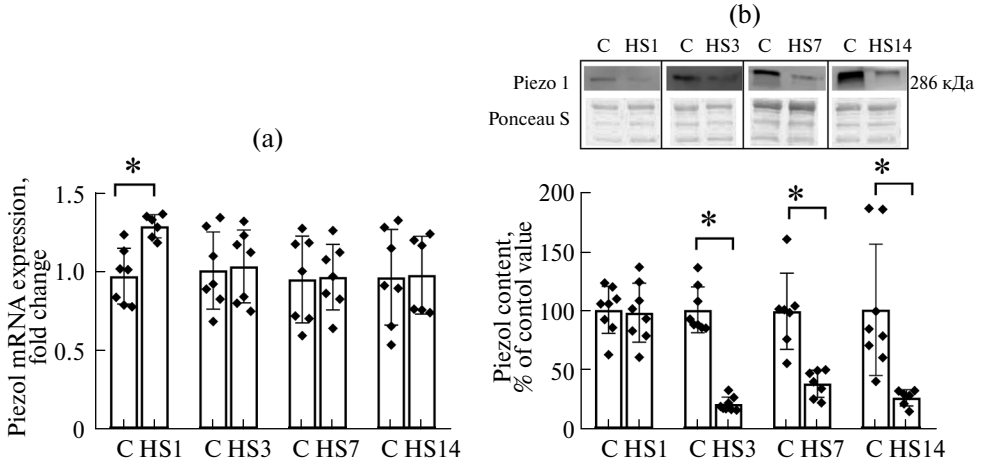


Рис. 1. Уровень экспрессии мРНК Piezo1 (a) и белковое содержание Piezo1 (b) в *m. soleus* крысы в течение функциональной разгрузки. C – контроль; HS1, HS3, HS7, HS14 – 1-, 3-, 7-, 14-суточное вывешивание задних конечностей; * – достоверное отличие от C ($p < 0.05$).

Экспрессия гена *TRPC1* в *m. soleus* была достоверно повышена после 3-суточного вывешивания (+44%, $p < 0.05$), не менялась после 1 и 7 суток функциональной разгрузки и достоверно снизилась (–38%, $p < 0.05$) к 14 суткам вывешивания (рис. 2a). Экспрессия гена *TRPC3* в *m. soleus* была достоверно повышена после 1- и 3-суточного вывешивания (+46%, $p < 0.05$), но не изменилась после 7- и 14-суточной функциональной разгрузки (рис. 2b). Экспрессия мРНК TRPC6 в *m. soleus* была снижена на всех сроках вывешивания относительно контрольных значений (рис. 2c).

Транскрипционная активность гена *TMEM63B* в *m. soleus* оказалась достоверно повышенной после 1- и 3-суточной разгрузки на 41 и 100% ($p < 0.05$) соответственно (рис. 3a). Семисуточная разгрузка не вызвала изменений экспрессии гена *TMEM63B*, при этом вывешивание в течение 14 суток привело к снижению экспрессии мРНК TMEM63B на 33% ($p < 0.05$) относительно контроля (рис. 3a). Экспрессия мРНК TRPM3 (рис. 3b) и TRPM7 (рис. 3c) в *m. soleus* крыс была достоверна повышена после 1- и 3-суточного вывешивания по сравнению с контролем. После 7-суточного вывешивания экспрессия мРНК наблюдалась только для TRPM7 (рис. 3c). Двухнедельная функциональная разгрузка привела к достоверному снижению экспрессии мРНК TRPM3 в *m. soleus* крыс на 70% ($p < 0.05$) (рис. 3b), но не повлияла на экспрессию мРНК TRPM7 (рис. 3b).

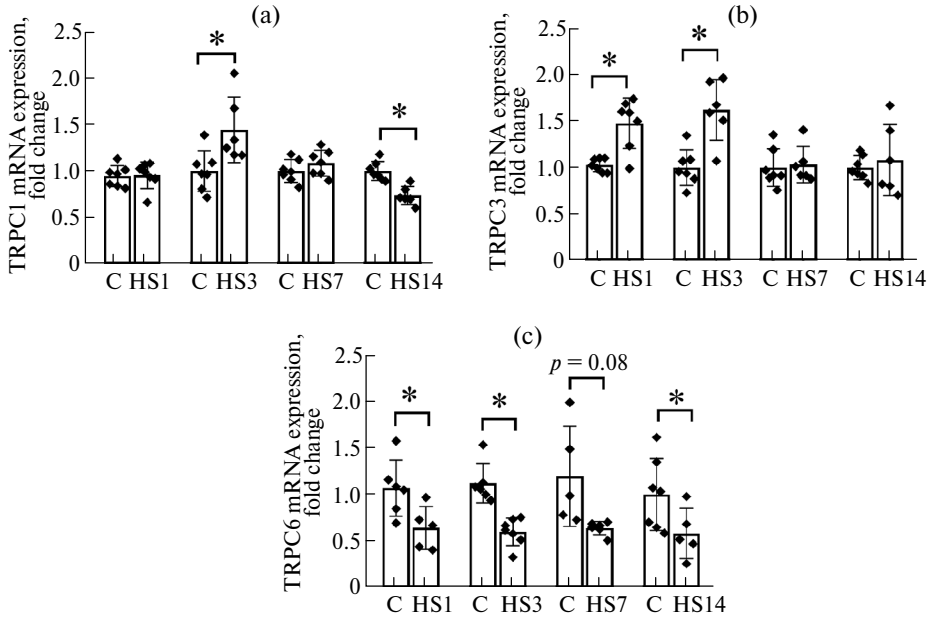


Рис. 2. Уровень экспрессии мРНК TRPC1 (a), TRPC3 (b) и TRPC6 (c) в *m. soleus* крысы в течение функциональной разгрузки. С – контроль; HS1, HS3, HS7, HS14 – 1-, 3-, 7-, 14-суточное вывешивание задних конечностей; * – достоверное отличие от С ($p < 0.05$).

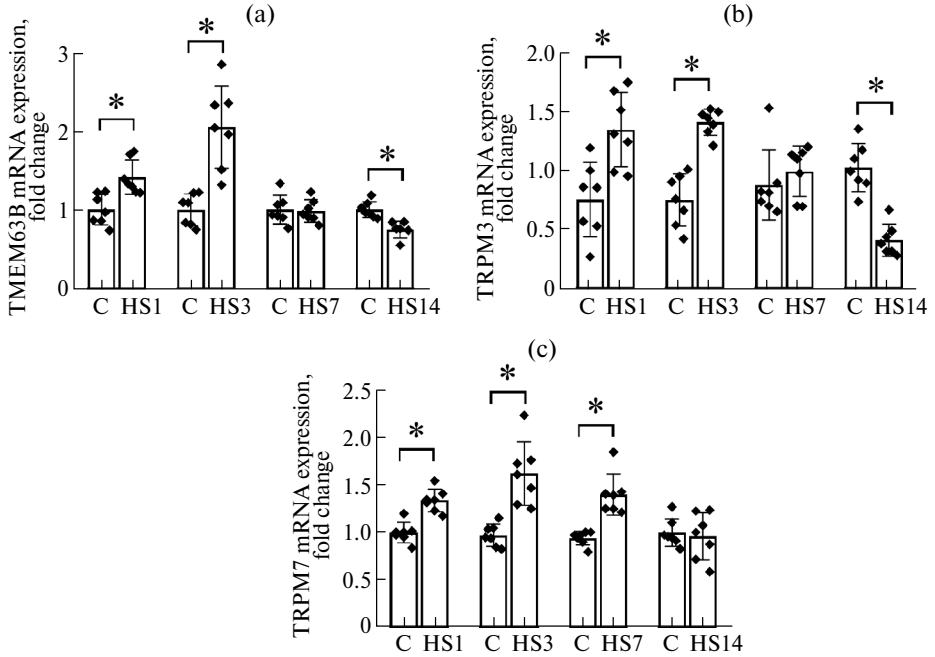


Рис. 3. Уровень экспрессии мРНК TMEM63B (a), TRPM3 (b) и TRPM7 (c) в *m. soleus* крысы в течение функциональной разгрузки. С – контроль; HS1, HS3, HS7, HS14 – 1-, 3-, 7-, 14-суточное вывешивание задних конечностей; * – достоверное отличие от С ($p < 0.05$).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В настоящей работе впервые исследована динамика транскрипционной активности генов кальций-проницаемых механоактивируемых каналов (Piezo1, TRPC, TRPM3, TRPM7 и TMEM63B) в постуральной камбаловидной мышце крысы в процессе 14-суточной функциональной разгрузки (вывешивания задних конечностей).

Уровень экспрессии мРНК Piezo1 в *m. soleus* крыс значительно не менялся в течение всего периода функциональной разгрузки за исключением транзиентного повышения экспрессии гена Piezo1 после 24 ч вывешивания задних конечностей. При этом наблюдалось достоверное снижение содержания Piezo1 в *m. soleus* крыс после 3-, 7- и 14-суточного вывешивания. В связи с этим стоит отметить, что в атрофирующейся мышце изменения на уровне экспрессии мРНК не всегда отражают изменения, происходящие на белковом уровне, поскольку при развитии атрофии синтез мышечных белков подавлен, а деградация белков, напротив, увеличена. В частности, хорошо известно, что во время функциональной разгрузки в цитоплазме мышечных волокон *m. soleus* грызунов накапливается кальций [38–40], что может приводить к активации кальций-зависимых протеаз кальпаинов [41] и процессам деструкции цитоскелетных белков в данной мышце [42, 43]. Не исключено, что именно активация кальпаинов могла внести вклад в снижение содержания белка Piezo1 в *m. soleus* крысы, наблюдавшееся при функциональной разгрузке в настоящем исследовании. Снижение экспрессии гена белка Piezo1 в скелетных мышцах мышей (*m. gastrocnemius*) после 3-суточной иммобилизации задних конечностей, а также в мышцах человека после гипсовой иммобилизации конечностей было показано в недавней публикации японских авторов [28]. Кроме того, в исследовании нашей лаборатории была показана тенденция к снижению содержания белка Piezo1 в *m. soleus* крысы после двухнедельной функциональной разгрузки [44]. Важно отметить, что обработка изолированной *m. soleus* хлоридом гадолиния (неспецифический ингибитор механочувствительных каналов, включая Piezo1) может приводить к достоверному снижению механозависимого ответа анаболических маркеров (фосфо-p90RSK, c-Myc, 45S pre-рРНК, rpS6, фосфорилированные формы p70S6K, 4E-BP1 и rpS6) после серии пассивных растяжений мышцы [45, 46] и синтеза белка после эксцентрических сокращений [14]. И напротив, обработка изолированной *m. soleus* крысы Yoda1 (специфический активатор Piezo1) вызывает увеличение экспрессии/содержания маркеров биогенеза рибосом (c-Myc, 45S pre-рРНК, rpS6) [46]. Эти данные дают основание полагать, что механочувствительные каналы (включая Piezo1) могут вносить вклад в регуляцию внутриклеточных анаболических сигнальных путей в *m. soleus* крысы при изменении механической нагрузки.

Данные литературы демонстрируют, что каналы семейства TRPC также могут быть вовлечены в регуляцию анаболических процессов и мышечной массы. Так, показана роль TRPC1 для дифференцировки первичных миобластов, а также во время регенерации скелетной мышцы после повреждения посредством кальций-зависимой активации сигнального пути PI3K/Akt/mTOR/p70S6K [47]. Более того, нокаут/нокдаун гена TRPC1 приводил к уменьшению размеров мышечных волокон и массы скелетных мышц у мышей [47, 48]. Xia с соавт. с помощью siRNA-индуцированного нокдауна гена TRPC1 показали важную роль каналов TRPC1 в восстановлении размеров мышечных волокон *m. soleus* у мышей в период возобновления двигательной активности после 14-суточного вывешивания задних конечностей [48]. Также важно отметить, что нахождение миобластов C2C12 в условиях моделируемой невесомости приводило к снижению экспрессии TRPC1, что сопровождалось замедлением пролиферации и задержкой клеточной дифференцировки [49]. При этом было продемонстрировано, что блокирование каналов TRPC с помощью ингибитора SKF 96365 также приостанавливает пролиферацию миобластов [49]. Эти данные свидетельствуют о том, что каналы TRPC1 реагируют на изменения механической/гравитационной нагрузки и принимают участие в процессе миогенеза.

Полученное в настоящем исследовании снижение экспрессии мРНК TRPC1, TRPC3 и TRPC6 в *m. soleus* крыс после 14-суточной функциональной разгрузки вполне согласуется с ранее опубликованными данными о снижении относительного содержания белков TRPC1 и TRPC3 в *m. soleus* мышей после двухнедельного вывешивания задних конечностей [48, 50]. Снижение содержания белка TRPC1 в *m. soleus* мышей в результате функциональной разгрузки Zhang с соавт. связывают как с уменьшением механической нагрузки на механочувствительные TRPC1 каналы при вывешивании, так и с ролью данных каналов в качестве звена в петле отрицательной обратной связи в ответ на повышение концентрации кальция при разгрузке [50]. Действительно, дополнительная экспрессия (overexpression) кальций-связывающего белка кальмодулина может приводить к снижению опосредованного TRPC1 депо-управляемого входа кальция (store-operated calcium entry, SOCE) путем взаимодействия кальмодулина с одним из доменов в С-концевой части белка TRPC1 [51]. Основываясь на вышеизложенных данных о роли TRPC1 в мышечных клетках, можно предположить, что эти каналы могут принимать участие в реализации анаболического сигнала в ответ на механические воздействия.

Транскрипционная активность Piezo1, TRPC1, TRPC3, TRPM3, TRPM7, а также TMEM63B в *m. soleus* крыс была повышена после 1 и/или 3 суток вывешивания задних конечностей. Можно предположить, что в данном случае имеет место компенсаторная активация экспрессии механоактивируемых каналов в ответ на резкое снижение активности *m. soleus* вследствие механической разгрузки задних конечностей животных.

Таким образом, наше исследование впервые выявило различные паттерны экспрессии генов ключевых механоактивируемых катионных каналов в камбаловидной мышце крысы в процессе функциональной разгрузки. Если на ранней стадии разгрузки (1–3 дня) наблюдалось транзиторное увеличение экспрессии мРНК Piezo1, TRPC1, TRPC3, TRPM7 и TMEM63B, то на более поздней стадии разгрузки (14 дней) наблюдалась пониженная экспрессия TRPC1, TRPC6, TRPM3, TMEM63B на уровне мРНК и Piezo1 на уровне белка.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают признательность сотрудникам лаборатории миологии Института медико-биологических проблем РАН К.В. Сергеевой, К.А. Зариповой, С.П. Беловой и С.А. Тыганову за оказанную помощь при проведении исследования.

ВКЛАДЫ АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента (Н. А. В., Б. С. Ш., Т. М. М.), сбор данных (Н. А. В.), обработка данных (Н. А. В.), написание манускрипта (Т. М. М.), редактирование манускрипта (Н. А. В., Б. С. Ш., Т. М. М.).

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект № 22-75-10046).

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 биомедицинской этике Института медико-биологических проблем РАН (протокол № 579 от 28.05.2021 г. и протокол № 639 от 18.04.2023 г.).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Fitts RH, Riley DR, Widrick JJ* (2001) Functional and structural adaptations of skeletal muscle to microgravity. J Exp Biol 204 (Pt 18): 3201–3208. https://doi.org/ 10.1242/jeb.204.18.3201
2. *Deane CS, Piasecki M, Atherton PJ* (2024) Skeletal muscle immobilisation-induced atrophy: Mechanistic insights from human studies. Clin Sci 138 (12): 741–756. https://doi.org/10.1042/CS20231198
3. *Bodine SC* (2013) Disuse-induced muscle wasting. Int J Biochem Cell Biol 45 (10): 2200–2208. https://doi.org/10.1016/j.biocel.2013.06.011
4. *Mirzoev TM, Shenkman BS* (2023) Mechanosensory Structures in the Mechanotransduction System of Muscle Fibers. J Evol Biochem Physiol 59 (4): 1341–1359. https://doi.org/10.1134/s0022093023040269
5. *Kefauver JM, Ward AB, Patapoutian A* (2020) Discoveries in structure and physiology of mechanically activated ion channels. Nature 587 (7835): 567–576. https://doi.org/10.1038/s41586-020-2933-1
6. *Benavides Damm T, Egli M* (2014) Calcium's role in mechanotransduction during muscle development. Cell Physiol Biochem 33(2): 249–272. https://doi.org/10.1159/000356667
7. *Michelucci A, Liang C, Protasi F, Dirksen RT* (2021) Altered $Ca^{(2+)}$ Handling and Oxidative Stress Underlie Mitochondrial Damage and Skeletal Muscle Dysfunction in Aging and Disease. Metabolites 11(7): 424. https://doi.org/ 10.3390/metabo110704248.
8. *Valentim MA, Brahmbhatt AN, Tupling AR* (2022) Skeletal and cardiac muscle calcium transport regulation in health and disease. Biosci Rep 42(12): BSR20211997. https://doi.org/ 10.1042/BSR20211997
9. *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
10. *Ito N, Ruegg UT, Kudo A, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S* (2013) Activation of calcium signaling through Trpv1 by nNOS and peroxynitrite as a key trigger of skeletal muscle hypertrophy. Nat Med 19(1): 101–106. https://doi.org/10.1038/nm.3019
11. *Hyatt HW, Powers SK* (2020) The Role of Calpains in Skeletal Muscle Remodeling with Exercise and Inactivity-induced Atrophy. Int J Sports Med 41(14): 994–1008. https://doi.org/ 10.1055/a-1199-7662
12. S*pangenburg EE, McBride TA* (2006) Inhibition of stretch-activated channels during eccentric muscle contraction attenuates p70S6K activation. J Appl Physiol 100(1): 129–135. https://doi.org/10.1152/japplphysiol.00619.2005
13. *Mirzoev TM, Tyganov SA, Petrova IO, Shenkman BS* (2019) Acute recovery from disuse atrophy: The role of stretch-activated ion channels in the activation of anabolic signaling in skeletal muscle. Am J Physiol Endocrinol Metab 316(1): 86–95. https://doi.org/10.1152/ajpendo.00261.2018
14. *Tyganov S, Mirzoev T, Shenkman B* (2019) An Anabolic Signaling Response of Rat Soleus Muscle to Eccentric Contractions Following Hindlimb Unloading: A Potential Role of Stretch-Activated Ion Channels. Int J Mol Sci 20(5): 1165. https://doi.org/ 10.3390/ijms20051165
15. *Butterfield TA, Best TM* (2009) Stretch-activated ion channel blockade attenuates adaptations to eccentric exercise. Med Sci Sports Exerc 41(2): 351–356. https://doi.org/10.1249/MSS.0b013e318187cffa
16. *Juffer P, Bakker AD, Klein-Nulend J, Jaspers RT* (2014) Mechanical loading by fluid shear stress of myotube glycocalyx stimulates growth factor expression and nitric oxide production. Cell Biochem Biophys 69(3): 411–419. https://doi.org/10.1007/s12013-013-9812-4
17. *Maroto R, Raso A, Wood TG, Kurosky A, Martinac B, Hamill OP* (2005) TRPC1 forms the stretch-activated cation channel in vertebrate cells. Nat Cell Biol 7(2): 179–185. https://doi.org/10.1038/ncb1218
18. *Yamaguchi Y, Iribe G, Nishida M, Naruse K* (2017) Role of TRPC3 and TRPC6 channels in the myocardial response to stretch: Linking physiology and pathophysiology. Prog Biophys Mol Biol 130(Pt B): 264–272. https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2017.06.010

19. *Grimm C, Kraft R, Sauerbruch S, Schultz G, Harteneck C* (2003) Molecular and functional characterization of the melastatin-related cation channel TRPM3. J Biol Chem 278(24): 21493-21501.
https://doi.org/10.1074/jbc.M300945200
20. *Numata T, Shimizu T, Okada Y* (2007) Direct mechano-stress sensitivity of TRPM7 channel. Cell Physiol Biochem 19(1–4): 1–8.
https://doi.org/10.1159/000099187
21. *Nikolaev YA, Cox CD, Ridone P, Rohde PR, Cordero-Morales JF, Vasquez V, Laver DR, Martinac B* (2019) Mammalian TRP ion channels are insensitive to membrane stretch. J Cell Sci 132(23): jcs238360.
https://doi.org/ 10.1242/jcs.238360
22. *Coste B, Mathur J, Schmidt M, Earley TJ, Ranade S, Petrus MJ, Dubin AE, Patapoutian A* (2010) Piezo1 and Piezo2 are essential components of distinct mechanically activated cation channels. Science 330(6000): 55–60.
https://doi.org/10.1126/science.1193270
23. *Coste B, Xiao B, Santos JS, Syeda R, Grandl J, Spencer KS, Kim SE, Schmidt M, Mathur J, Dubin AE, Montal M, Patapoutian A* (2012) Piezo proteins are pore-forming subunits of mechanically activated channels. Nature 483(7388): 176–181.
https://doi.org/10.1038/nature10812
24. *Tsuchiya M, Hara Y, Okuda M, Itoh K, Nishioka R, Shiomi A, Nagao K, Mori M, Mori Y, Ikenouchi J, Suzuki R, Tanaka M, Ohwada T, Aoki J, Kanagawa M, Toda T, Nagata Y, Matsuda R, Takayama Y, Tominaga M, Umeda M* (2018) Cell surface flip-flop of phosphatidylserine is critical for PIEZO1-mediated myotube formation. Nat Commun 9(1): 2049.
https://doi.org/10.1038/s41467-018-04436-w
25. *Bosutti A, Giniatullin A, Odnoshivkina Y, Giudice L, Malm T, Sciancalepore M, Giniatullin R, D'Andrea P, Lorenzon P, Bernareggi A* (2021) “Time window” effect of Yoda1-evoked Piezo1 channel activity during mouse skeletal muscle differentiation. Acta Physiol (Oxf) 233(4): e13702.
https://doi.org/ 10.1111/apha.13702.26
26. *Ma N, Chen D, Lee JH, Kuri P, Hernandez EB, Kocan J, Mahmood H, Tichy ED, Rompolas P, Mourkioti F* (2022) Piezo1 regulates the regenerative capacity of skeletal muscles via orchestration of stem cell morphological states. Sci Adv 8(11): eabn0485.
https://doi.org/10.1126/sciadv.abn0485
27. *Hirano K, Tsuchiya M, Shiomi A, Takabayashi S, Suzuki M, Ishikawa Y, Kawano Y, Takabayashi Y, Nishikawa K, Nagao K, Umemoto E, Kitajima Y, Ono Y, Nonomura K, Shintaku H, Mori Y, Umeda M, Hara Y* (2023) The mechanosensitive ion channel PIEZO1 promotes satellite cell function in muscle regeneration. Life Sci Alliance 6(2): e202201783.
https://doi.org/ 10.26508/lsa.202201783
28. *Hirata Y, Nomura K, Kato D, Tachibana Y, Niikura T, Uchiyama K, Hosooka T, Fukui T, Oe K, Kuroda R, Hara Y, Adachi T, Shibasaki K, Wake H, Ogawa W* (2022) A Piezo1/KLF15/IL-6 axis mediates immobilization-induced muscle atrophy. J Clin Invest 132(10): 1–13.
https://doi.org/10.1172/JCI154611
29. *Chen X, Wang N, Liu JW, Zeng B, Chen GL* (2023) TMEM63 mechanosensitive ion channels: Activation mechanisms, biological functions and human genetic disorders. Biochem Biophys Res Commun 683: 149111.
https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2023.10.043
30. *Zhao X, Yan X, Liu Y, Zhang P, Ni X* (2016) Co-expression of mouse TMEM63A, TMEM63B and TMEM63C confers hyperosmolarity activated ion currents in HEK293 cells. Cell Biochem Funct 34(4): 238–241.
https://doi.org/10.1002/cbf.3185
31. *Murthy SE, Dubin AE, Whitwam T, Jojoa-Cruz S, Cahalan SM, Mousavi SAR, Ward AB, Patapoutian A* (2018) OSCA/TMEM63 are an Evolutionarily Conserved Family of Mechanically Activated Ion Channels. Elife 7: e41844.
https://doi.org/ 10.7554/eLife.41844
32. *Zheng W, Rawson S, Shen Z, Tamilselvan E, Smith HE, Halford J, Shen C, Murthy SE, Ulbrich MH, Sotomayor M, Fu TM, Holt JR* (2023) TMEM63 proteins function as monomeric high-threshold mechanosensitive ion channels. Neuron 111(20): 3195–3210.
https://doi.org/ 10.1016/j.neuron.2023.07.006
33. *Novikov VE, Ilyin EA* (1981) Age-related reactions of rat bones to their unloading. Aviat Space Environ Med 52(9): 551–553.
34. *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

35. *Mirzoev TM, Tyganov SA, Shenkman BS* (2017) Akt-dependent and Akt-independent pathways are involved in protein synthesis activation during reloading of disused soleus muscle. Muscle Nerve 55(3): 393–399. https://doi.org/10.1002/mus.25235
36. *Tyganov SA, Mochalova EP, Melnikov IY, Vikhlyantsev IM, Ulanova AD, Sharlo KA, Mirzoev TM, Shenkman BS* (2021) NOS-dependent effects of plantar mechanical stimulation on mechanical characteristics and cytoskeletal proteins in rat soleus muscle during hindlimb suspension. FASEB J 35(10): e21905. https://doi.org/10.1096/fj.202100783R
37. *Sander H, Wallace S, Plouse R, Tiwari S, Gomes AV* (2019) Ponceau S waste: Ponceau S staining for total protein normalization. Anal Biochem 575: 44–53. https://doi.org/10.1016/j.ab.2019.03.010
38. *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
39. *Ingalls CP, Wenke JC, Armstrong RB* (2001) Time course changes in [Ca^{2+}]i, force, and protein content in hindlimb-suspended mouse soleus muscles. Aviat Space Environ Med 72(5): 471–476.
40. *Mukhina AM, Altaeva EG, Nemirovskaya TL, Shenkman BS* (2008) The role of L-type calcium channels in the accumulation of Ca^{2+} in soleus muscle fibers in the rat and changes in the ratio of myosin and serca isoforms in conditions of gravitational unloading. Neurosci Behav Physiol 38(2): 181–188. https://doi.org/10.1007/s11055-008-0027-x
41. *Enns DL, Belcastro AN* (2006) Early activation and redistribution of calpain activity in skeletal muscle during hindlimb unweighting and reweighting. Can J Physiol Pharmacol 84(6): 601–609. https://doi.org/10.1139/y06-013
42. *Mirzoev TM, Shenkman BS, Ushakov IB, Ogneva IV* (2012) Desmin and alpha-actinin-2 content in rat soleus muscle in the dynamics of gravitational unloading and subsequent reloading. Dokl Biochem Biophys 444: 144–146. https://doi.org/10.1134/S1607672912030052
43. *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
44. *Sergeeva KV, Tyganov SA, Zaripova KA, Bokov RO, Nikitina LV, Konstantinova TS, Kalamkarov GR, Shenkman BS* (2024) Mechanical and signaling responses of unloaded rat soleus muscle to chronically elevated β-myosin activity. Arch Biochem Biophys 754: 109961. https://doi.org/ 10.1016/j.abb.2024.109961
45. *Sergeeva KV, Tyganov SA, Kalashnikov VE, Shenkman BS, Mirzoev TM* (2023) Analysis of the Role of Piezo1 Channels in Mechano-Anabolic Coupling in Rat Soleus Muscle. Biol Membrany 40(5): 362–369. https://doi.org/10.31857/S0233475523050080
46. *Vilchinskaya NA, Sergeeva KV, Tyganov SA, Shenkman BS, Mirzoev TM* (2024) Role of the Mechanically Activated Channels in the Regulation of Anabolic Markers in the Isolated Rat Postural Muscle in Response to Passive Stretching. Aviakosm Ekolog Med 58(4): 44–51. https://doi.org/10.21687/0233-528x-2024-58-4-44-51
47. *Zanou N, Schakman O, Louis P, Ruegg UT, Dietrich A, Birnbaumer L, Gailly P* (2012) Trpc1 ion channel modulates phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway during myoblast differentiation and muscle regeneration. J Biol Chem 287(18): 14524–14534. https://doi.org/10.1074/jbc.M112.341784
48. *Xia L, Cheung KK, Yeung SS, Yeung EW* (2016) The involvement of transient receptor potential canonical type 1 in skeletal muscle regrowth after unloading-induced atrophy. J Physiol 594(11): 3111–3126. https://doi.org/10.1113/JP271705
49. *Damm TB, Richard S, Tanner S, Wyss F, Egli M, Franco-Obregón A* (2013) Calcium-dependent deceleration of the cell cycle in muscle cells by simulated microgravity. The FASEB J 27(5): 2045–2054. https://doi.org/10.1096/fj.12-218693
50. *Zhang BT, Yeung SS, Cheung KK, Chai ZY, Yeung EW* (2014) Adaptive responses of TRPC1 and TRPC3 during skeletal muscle atrophy and regrowth. Muscle Nerve 49(5): 691–699. https://doi.org/10.1002/mus.23952
51. *Singh BB, Liu X, Tang J, Zhu MX, Ambudkar IS* (2002) Calmodulin Regulates Ca2+-Dependent Feedback Inhibition of Store-Operated Ca^{2+} Influx by Interaction with a Site in the C Terminus of TrpC1. Mol Cell 9(4): 739–750. https://doi.org/10.1016/s1097-2765(02)00506-3

Time-course Expression of Mechanosensitive Ion Channels in Rat Postural Muscle under Hindlimb Unloading

N. A. Vilchinskaya[a], B. S. Shenkman[a], and T. M. Mirzoev[a, *]

[a]Institute of Biomedical Problems of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia
[*]e-mail: tmirzoev@yandex.ru

Atony and atrophy of mammalian postural muscles can occur due to mechanical unloading (weightlessness, hypokinesia). There is reason to believe that calcium-permeable mechanosensitive channels may contribute to the development of muscle atrophy caused by mechanical unloading. The aim of the study was to assess time-course changes in the expression of key mechanosensitive channels in rat soleus muscle under conditions of mechanical unloading. Male Wistar rats were subjected to hindlimb suspension (HS) for 1, 3, 7 and 14 days. Expression of Piezo1, TRPC1, TRPC3, TRPC6, TRPM3, TRPM7 and TMEM63B mRNA was determined using PCR. Piezo1 protein content was assessed using Western blotting. Piezo1 mRNA expression transiently increased after 24 h of HS, but did not differ from the control after 3, 7 and 14 days of unloading. A decrease in Piezo1 protein content was observed after 3, 7 and 14 days of HS relative to the control. At the early stages of HS, there was a significant increase in the mRNA expression of TRPC3, TRPM3, TRPM7 and TMEM63B, while TRPC6 expression was reduced. The level of TRPC1 mRNA expression was increased only after 3 days of HS. Seven-day unloading did not cause changes in the mRNA expression of TRPC1, TRPC3, TRPM3 and TMEM63B but led to increased TRPM7 expression. After two weeks of HS in the soleus muscle, a decrease in the mRNA expression of TRPC1, TRPC6, TRPM3 and TMEM63B was observed. Thus, at an early stage of mechanical unloading (1 and 3 days), a transient increase in the mRNA expression of Piezo1, TRPC1, TRPC3 and TMEM63B is observed, then at a later stage of unloading (14 days), reduced expression of TRPC1, TRPC6, TRPM3, TMEM63B at the mRNA level and Piezo1 at the protein level is observed.

Keywords: soleus muscle, mechanical unloading, Piezo1, TRPC, TRPM, TMEM63B