

РЕАЛИЗАЦИЯ МЕХАНИЧЕСКОГО СИГНАЛА НА ФОНЕ ГРАВИТАЦИОННОЙ РАЗГРУЗКИ: РЕАКЦИЯ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МИШЕНЕЙ mTORC1 НА ЭКСЦЕНТРИЧЕСКИЕ СОКРАЩЕНИЯ

© 2016 г. Т.М. Мирзоев, С.А. Тыганов, И.О. Петрова, Б.С. Шенкман

ГНЦ РФ Институт медико-биологических проблем РАН, 123007, Москва, Хорошевское шоссе, 76а

E-mail: tmirzoev@yandex.ru

Поступила в редакцию 24.06.16 г.

Целью работы была оценка ответа ключевых субстратов mTORC1 на серию сократительных стимулов на фоне различных сроков функциональной разгрузки. Функциональную разгрузку мышц задних конечностей осуществляли методом антиортостатического вывешивания. 28 крыс Wistar были разделены на четыре группы: контрольная, одно-, трех- и семисуточное вывешивание). После окончания вывешивания изолированные камбаловидные мышцы крыс были подвергнуты серии эксцентрических сокращений *ex vivo*. Затем методом вестерн-блоттинга было определено содержание фосфорилированных p70s6k и 4E-BP1. Было обнаружено, что эксцентрическая нагрузка вызывает значительное увеличение фосфорилирования рибосомальной киназы p70s6k, а также снижение фосфорилирования белка 4E-BP1 как в контроле, так и в случае антиортостатического вывешивания, однако в случае вывешивания ответ был резко сниженным. Таким образом, можно заключить, что серия эксцентрических сокращений изолированной *m. soleus* крысы на фоне функциональной разгрузки вызывает более слабую активацию сигнального пути Akt-mTORC1-p70s6k по сравнению с контролем. Это может свидетельствовать о необходимости сохранения мышечного тонуса для более эффективного восприятия мышцей внешнего механического сигнала и последующей активации анаболических сигнальных путей.

Ключевые слова: гравитационная разгрузка, камбаловидная мышца, эксцентрические сокращения, p-p70s6k, 4E-BP1.

Актуальной проблемой космической физиологии и реабилитационной медицины является разработка эффективных профилактических мер, которые позволят снизить негативные последствия глубокого снижения сократительной активности мышц экстензоров, вызывающих их атонию и атрофию как в условиях космического полета, так и при неврологических и ортопедических заболеваниях. Однако до сих пор не существует убедительных данных о молекулярных механизмах, реализующих внешний механический сигнал в мышечном волокне в ответ на функциональную разгрузку. Исследования последних лет показали важность изучения механотрансдукции, т.е. преобразования внешнего механического сигнала в биохимический ответ в виде внутриклеточных сигнальных каскадов [1]. Одним из признанных механизмов, контролирующих мышечную массу, является механическое напряжение. Подтверждение этому дают

многочисленные исследования *in vivo*, которые показали, что хроническое действие механической нагрузки на скелетные мышцы приводит к увеличению их массы, в то время как хроническая механическая разгрузка ведет к снижению массы мышц [2]. При этом основную роль в механической регуляции мышечной массы играют изменения в синтезе белка. На сегодняшний день гипотетическими механосенсорами мышечной клетки являются стретч-чувствительные ионные каналы, а также фокальная адгезивная киназа, ассоциированная с комплексами фокальной адгезии и интегринами [3]. При этом предполагается, что механосенсорные элементы не функционируют независимо, а интегрированы с цитоскелетом, а также связаны с работой сократительных элементов мышечного волокна [4]. Ключевым анаболическим сигнальным путем, активирующимся в ответ на механические стимулы, является сигнальный каскад mTORC1/p70S6k [5–7]. Активность mTORC1 обычно оценивают по фосфорилированию его основных субстратов – рибосомальной киназы p70 (p70s6k) и белку, связывающему фактор 4E (4E-BP1). В связи с вышесказанным цель на-

Сокращения: p70s6k – рибосомальная киназа p70, 4E-BP1 – белок, связывающий фактор инициации трансляции 4E, ЭС – эксцентрические сокращения.

стоящего исследования заключалась в оценке ответа ключевых мишеней mTORC1 на серию эксцентрических сокращений (ЭС) *m. soleus* крысы на фоне различных сроков функциональной разгрузки. Мы предположили, что многочисленные изменения сигнальных путей и организации цитоскелета в условиях функциональной разгрузки могут привести к нарушениям реализации механического сигнала в постуральной мышце.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследовании были использованы 28 самцов крыс породы Wistar массой 220 ± 5 г, которые были случайным образом разделены на четыре группы (по семь животных в каждой группе): «Контроль», «1HS» (вывешивание в течение суток), «3HS» (вывешивание в течение трех суток), «7HS» (вывешивание в течение семи суток). Животные группы «Контроль» содержались в виварных условиях, получая стандартный корм и воду *ad libitum*. Антиортостатическое вывешивание задних конечностей с целью моделирования гравитационной разгрузки проводили по стандартной методике Ильина–Новикова в модификации Morey–Holton [8]. Материалом исследования служила камбаловидная мышца (*m. soleus*) крысы.

Программа эксперимента и все манипуляции, выполняемые с животными, были одобрены комиссией по биомедицинской этике ГНЦ РФ Института медико-биологических проблем РАН (протокол № 421 от 14.04.2016 г.).

Эксцентрические сокращения изолированной камбаловидной мышцы. Данная методика основана на протоколе, изложенном в работе [9]. Выделенную из крысы камбаловидную мышцу помещали в раствор Кребса–Ханзеляйта (120 mM NaCl, 4,8 mM KCl, 25 mM NaHCO₃, 2,5 mM CaCl₂, 1,2 mM KH₂PO₄, 2 mM MgSO₄, 5 mM HEPES) с постоянной перфузией карбогеном (95% O₂ + 5% CO₂) и поддержанием температуры на уровне 37°C. Мышцу присоединяли шелковыми нитками за сухожилия одним концом к динамометру/генератору усилия, а другим – к неподвижному фиксатору. Затем мышцу растягивали на оптимальную длину (L_0). Эксцентрические сокращения осуществляли с помощью стимуляции электрическим полем (80 В, 50 Гц, в течение 3 с). Во время стимуляции мышца растягивалась на 15% от L_0 (время растяжения и возврата на прежнюю длину – 100 мс) [10]. Каждое сокращение сопровождалось 10-секундным перерывом, во время которого мышца находилась при L_0 . Измерения параметров сокращения и растяжения мышцы

проводили с использованием DMC/DMA software (Aurora Scientific, США). Показатели максимального тетанического сокращения нормировали на площадь поперечного сечения мышцы (отношение веса мышцы к оптимальной длине, умноженной на плотность мышцы – 1,07 г/см³) [11]. Схематичное изображение тетанического эксцентрического сокращения, полученное с помощью датчика силы и датчика длины, показано на рис. 1.

Определение содержания фосфорилированных форм p70s6k и 4E-BP1 с помощью вестерн-блоттинга. С помощью криостата делали срезы мышечной ткани *m. soleus* толщиной 20 мкм, которые затем помещали в охлажденный раствор RIPA Lysis Buffer System (с добавлением 0,5 М EDTA – 24 мкл/мл, Na₃VO₄ – 20 мкл/мл, дитиотреитола – 4 мкл/мл, фенилметилсульфонилфторида – 20 мкл/мл, аprotинина – 5 мкл/мл, леупептина – 5 мкл/мл; пепстатина А – 5 мкл/мл, Phosphatase Inhibitor Cocktail B – 40 мкл/мл) из расчета 130 мкл буфера на одну пробу. Затем проводили гомогенизацию и центрифугирование (в течение 15 мин, при температуре +4°C и 12000 об/мин). После этого отбирали надосадочную жидкость и определяли концентрацию белка на спектрофотометре UV-2450 (Shimadzu, Япония), измеряя поглощение при длине волны 595 нм. Концентрацию белка в пробах рассчитывали по калибровочной кривой. Электрофорез по методу Лэммли [12] проводили в 10%-м разделяющем полиакриламидном геле в мини-системе Bio-Rad (США) в течение часа при силе тока 17 мА на один гель. Перенос белков на нитроцеллюлозную мембрану (Bio-Rad, США) осуществляли в системе mini Trans-Blot (Bio-Rad, США) в течение 2 ч при температуре +4°C и постоянном напряжении 100 В. Затем, для проверки равной загрузки белка на все дорожки, нитроцеллюлозную мембрану окрашивали красителем Ponceau S. После этого мембрану отмывали от красителя и блокировали в 4%-м растворе сухого молока в фосфатно-солевом буфере, содержащем 0,1% твин 20) при комнатной температуре в течение часа. Затем проводили инкубацию (15 ч, +4°C) с первичными антителами против p-p70s6k (Thr 389) с разведением 1:2000 (Santa-Cruz, США), p-4E-BP-1 (Thr37/46) с разведением 1:1000 (Cell Signaling, США), а также моноклональными антителами к глициральдегид-3-фосфатдегидрогеназе (Abm, Канада) в разведении 1:10000. После этого отмывали мембраны пять раз по 5 мин в фосфатно-солевом буфере с 0,1% твин 20. Затем мембраны инкубировали в течение часа с биотинилированными вторичными антителами goat anti-rabbit

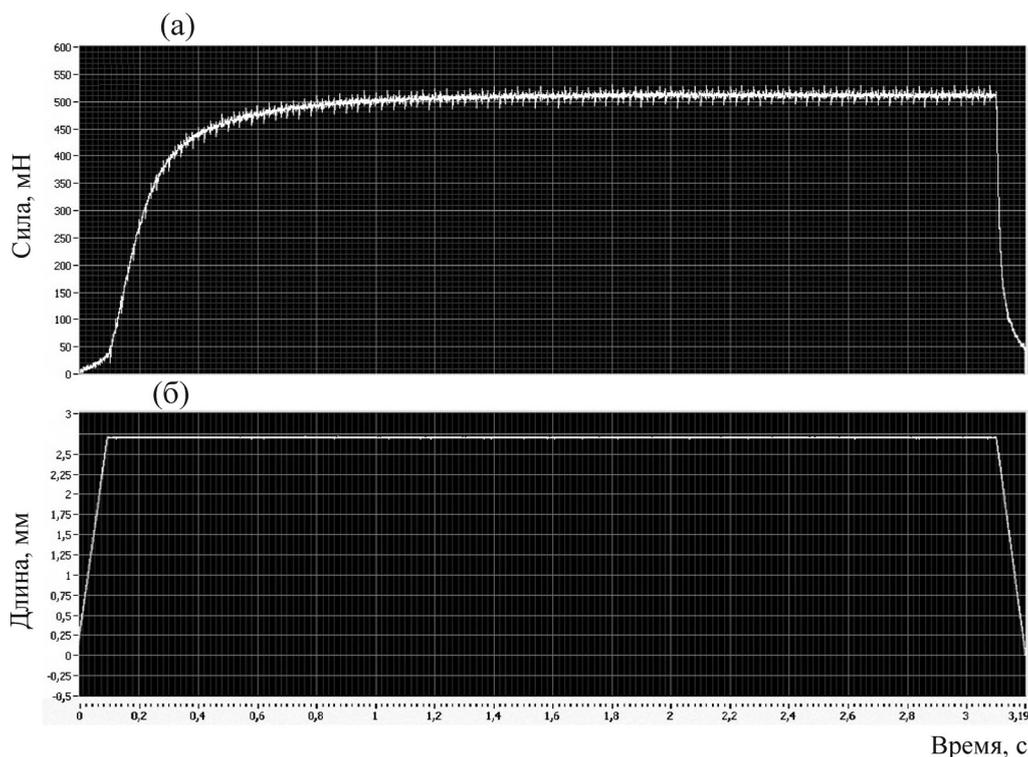


Рис. 1. Схематичное изображение тетанического эксцентрического сокращения, полученное с помощью датчика силы (а) и датчика длины (б).

(Santa Cruz, США) в разведении 1:1000. Для выявления глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы и пурамицина использовали вторичные антитела goat anti-mouse в разведении 1:20000 Kit (Bio-Rad, США). Далее проводили отмывку пять раз по 5 мин в фосфатно-солевом буфере с 0,1% твин 20. Белковые полосы выявляли на мембране с помощью Star TM Substrate Kit (Bio-Rad, США). Анализ белковых полос проводили с использованием блот-сканера C-DiGit (LI-COR Biotechnology, США) и соответствующей программы Image Studio Digits. Полученный от белковых полос сигнал был нормализован к референсному белку глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназе.

Статистическая обработка. Данные представлены как среднее значение \pm стандартная ошибка среднего ($M \pm SEM$). Достоверность различий между группами определяли с помощью дисперсионного анализа (метод ANOVA). Достоверность между интактной мышцей и мышцей, подвергшейся эксцентрическим сокращениям, была установлена с помощью парного t -критерия. Достоверными считали отличия с уровнем значимости $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Масса животных и камбаловидной мышцы.

Масса крыс из экспериментальных групп (1HS, 3HS и 7HS) достоверно не отличалась от массы контрольных животных (табл. 1). Масса камбаловидной мышцы, нормированная к массе тела животного, достоверно снизилась на 16% ($p < 0,05$) после 7-суточного вывешивания относительно контроля.

Механические показатели мышечного сокращения и площадь поперечного сечения камбаловидной мышцы. В табл. 2 представлены такие параметры, как площадь поперечного сечения мышцы, оптимальная длина мышцы (L_0), нормированное к площади поперечного сечения удельное напряжение мышцы. Площадь поперечного сечения *m. soleus* достоверно изменилась ($p < 0,05$) только после 7-суточной гравитационной разгрузки. Нормированные к площади поперечного сечения показатели силы сокращения (удельного напряжения) не отличались ни в одной из экспериментальных групп.

Содержание фосфорилированных форм p70s6k и 4E-BP1 в камбаловидной мышце крысы. Фосфорилирование субстрата mTORC1 – p70s6k – достоверно увеличилось во всех группах с ЭС ($p < 0,05$) относительно групп с

Таблица 1. Масса крыс и отношение массы *m. soleus* к массе тела крысы. Данные представлены в виде средних значений \pm стандартная ошибка среднего

| Группа | Масса животных, г | Масса <i>m. soleus</i> , мг/масса животного, г |
|----------|-------------------|--|
| Контроль | 220 \pm 8 | 0,40 \pm 0,011 |
| 1HS | 214 \pm 3 | 0,42 \pm 0,013 |
| 3HS | 222 \pm 10 | 0,372 \pm 0,015 |
| 7HS | 210 \pm 7 | 0,336 \pm 0,018* |

Примечание. * – $p < 0,05$ по сравнению с группой «Контроль».

Таблица 2. Механические и физические параметры камбаловидной мышцы. Данные представлены в виде средних значений \pm стандартная ошибка среднего

| | Контроль | 1HS | 3HS | 7HS |
|---|-------------------|-------------------|-------------------|--------------------|
| Оптимальная длина мышцы – L_0 , см | 1,99 \pm 0,06 | 2,01 \pm 0,04 | 1,89 \pm 0,03 | 1,87 \pm 0,04 |
| Площадь поперечного сечения мышцы, см^2 | 0,042 \pm 0,002 | 0,041 \pm 0,002 | 0,037 \pm 0,002 | 0,033 \pm 0,001* |
| Средняя сила сокращения, мН | 777,4 \pm 17,9 | 723,3 \pm 23,6 | 742,5 \pm 20,7 | 660,75 \pm 24,4* |
| Нормированная средняя сила сокращения, мН/см ² | 19368 \pm 1405 | 18229 \pm 1045 | 20195 \pm 1044 | 20244 \pm 1122 |

Примечание.* – Достоверное отличие от группы «Контроль» ($p < 0,05$).

интактными мышцами (рис. 2). Однако в самих группах с ЭС (1HS, 3HS, 7HS + эксцентрика) наблюдалось достоверное ($p < 0,05$) снижение содержания фосфорилированной p70s6k одновременно с увеличением длительности вывешивания: первые сутки – 15%; третьи сутки – 46%; седьмые сутки – 60%. В случае с интактной мышцей достоверное ($p < 0,05$) снижение фосфорилирования на 40% наблюдалось только на седьмые сутки вывешивания (рис. 2).

Для другого субстрата системы mTORC1 – 4E-BP1 – наблюдалось прямо противоположное изменение фосфорилирования. Во всех группах с ЭС наблюдалось достоверное ($p < 0,05$) снижение фосфорилирования относительно групп с интактными мышцами (рис. 3). Вместе с этим было зафиксировано достоверное ($p < 0,05$) снижение уровня фосфорилирования 4E-BP1 во всех группах с ЭС и вывешиванием (1HS, 3HS, 7HS + эксцентрика) относительно контроля (контроль + эксцентрика): первые сутки – 49%, третьи сутки – 51%, седьмые сутки – 47% (рис. 3). Для групп с интактной мышцей было также показано достоверное ($p < 0,05$) снижение фосфорилирования 4E-BP1 на те же показатели, что и в группах с ЭС.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Важным результатом настоящего исследования явилось то, что впервые показано прогрессирующее снижение активации системы

mTORC1 (судя по фосфорилированной p70S6k) в *m. soleus* крысы в ответ на ЭС *ex vivo* в течение функциональной разгрузки задних конечностей. Можно предположить, что снижение анаболического ответа после ЭС могло быть связано со значительным уменьшением силы сокращения *m. soleus* в результате гравитационной разгрузки. Однако нормированная к площади поперечного сечения средняя сила сокращения достоверно не отличалась между исследуемыми группами животных, что говорит о том, что снижение ответа mTORC1 не было связано с потерей удельного напряжения камбаловидной мышцей. Поэтому можно предположить, что снижение анаболического ответа с течением функциональной разгрузки могло быть обусловлено нарушением как непосредственно механосенсорных структур мышечного волокна, так и сигнальных молекул, вовлеченных в механотрансдукцию и функционирующих «выше» mTORC1. В частности, ранее была показана роль интегрин-ассоциированной киназы фокальных контактов в восприятии внешнего механического сигнала и дальнейшем запуске внутриклеточного сигнального каскада, приводящего к гиперфосфорилированию p70S6k и активации инициации трансляции белка [13–15]. Стоит отметить, что в *m. tibialis anterior* мыши с оверэкспрессией киназы фокальных контактов было обнаружено значительное увеличение фосфорилированных форм p70S6k, при этом содержание фосфо-4E-BP1 оставалось без изме-

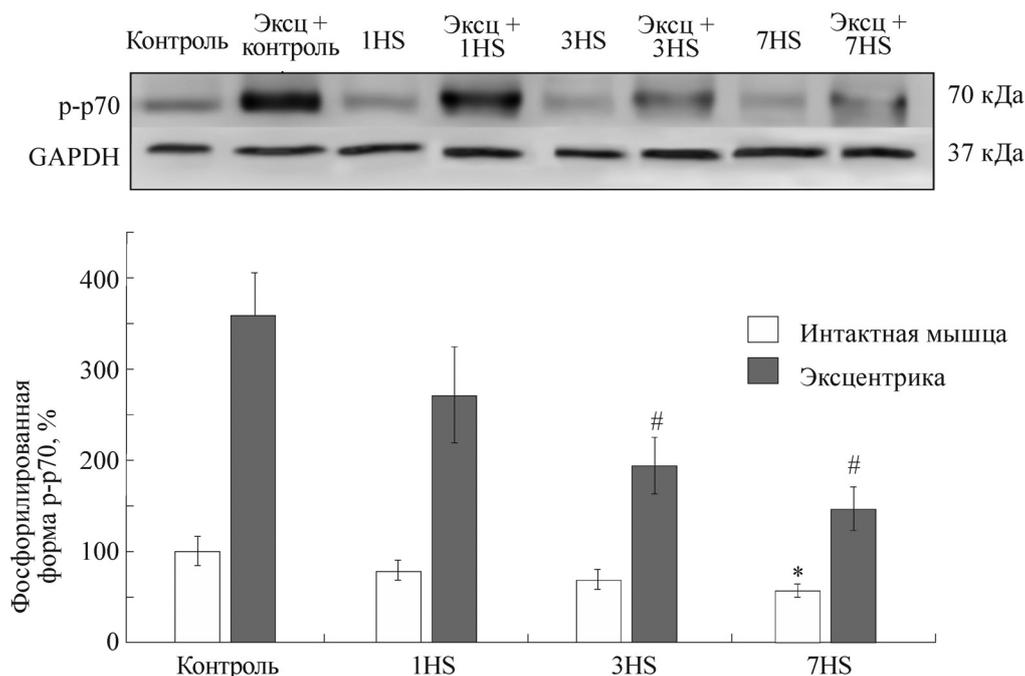


Рис. 2. Содержание фосфорилированной формы р70s6k. Данные представлены в виде средних значений ± стандартная ошибка среднего. * – Достоверное отличие групп «вывешивание» от контрольной группы ($p < 0,05$); # – достоверное отличие контрольной группы с эксцентрикой от групп «вывешивание» с эксцентрикой ($p < 0,05$).

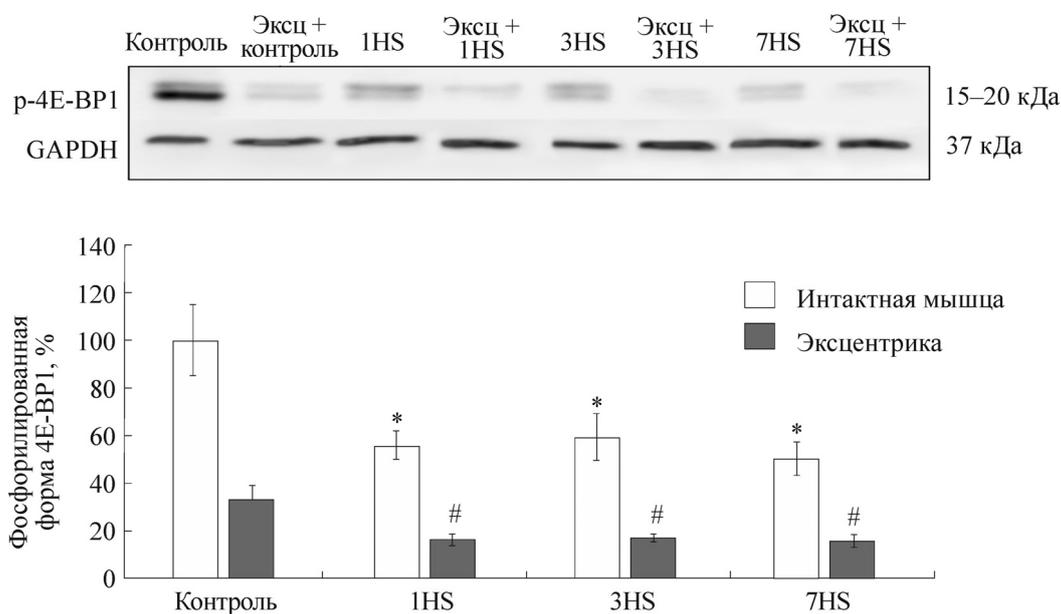


Рис. 3. Содержание фосфорилированной формы 4E-BP1. Данные представлены в виде средних значений ± стандартная ошибка среднего. * – Достоверное отличие групп «вывешивание» от контрольной группы ($p < 0,05$); # – достоверное отличие контрольной группы с эксцентрикой от групп «вывешивание» с эксцентрикой ($p < 0,05$).

нений [16]. Другим потенциальным регулятором синтеза белка в ответ на механические сигналы могут являться митоген-активируемые протеин-

киназы – p54JNK и ERK1/2, активация которых наблюдалась в скелетной мышце крысы в ответ на серию изометрических и эксцентрических

сокращений [17,18]. Однако есть данные о том, что ингибирование киназы ERK1/2 не привело к снижению активации mTORC1 и синтеза белка в изолированной мышце мыши в ответ на растяжение [19]. При этом было показано, что ключевая роль в механо-зависимой активации mTORC1 и синтеза белка в скелетной мышце принадлежит фосфатидной кислоте, которая способна напрямую связываться с комплексом mTORC1 [9,19,20]. Кроме того, снижение реакции субстрата mTORC1 на эксцентрические сокращения на фоне функциональной разгрузки могло быть связано с нарушением экспрессии стретч-чувствительных кальциевых каналов. Так, было показано, что применение ингибитора данных каналов – соли гадолия – приводило к уменьшению концентрации Ca^{2+} и снижению активности mTORC1 в ответ на ЭС [21,22]. Кроме того, важная роль в передаче механического сигнала от поверхности мышечного волокна к сигнальным молекулам, контролирующим синтез белка, может принадлежать цитоскелету [23]. В частности, в литературе есть данные о множестве регуляторных функциях белка промежуточных филаментов десмина [24,25]. Ранее было показано достоверное снижение содержания десмина в *m. soleus* крысы после 3- и 7-суточной гравитационной разгрузки [26,27]. Можно предположить, что деструкция цитоскелетных белков могла внести вклад в нарушение проведения механического сигнала к mTORC1 в камбаловидной мышце крысы на фоне гравитационной разгрузки.

Таким образом, серия эксцентрических сокращений изолированной *m. soleus* крысы на фоне функциональной разгрузки вызывает более слабую активацию сигнального пути Akt-mTORC1-p70s6k по сравнению с контролем. Это может свидетельствовать о необходимости сохранения мышечного тонуса для более эффективного восприятия мышцей внешнего механического сигнала и последующей активации анаболических сигнальных путей.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 16-34-60055 мол_а_дк).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. T. A. Hornberger, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **43** (9), 1267 (2011).
2. A. L. Goldberg, J. D. Etlinger, D. F. Goldspink, and C. Jablecki, *Med. Sci. Sports* **7** (3), 185 (1975).
3. J. W. Frey, E. E. Farley, T. K. O'Neil, et al., *Biophys. J.* **97** (1), 347 (2009).
4. E. E. Spangenburg, *Appl. Physiol. Nutr. Metab.* **34** (3), 328 (2009).
5. K. Baar and K. Esser, *Am. J. Physiol.* **276**, 120 (1999).
6. T. A. Hornberger, R. Stuppard, K. E. Conley, et al., *Biochem. J.* **380**, 795 (2004).
7. M. J. Drummond, C. S. Fry, E. L. Glynn, et al., *J. Physiol.* **587**, 1535 (2009).
8. E. Morey-Holton, R. K. Globus, A. Kaplansky, et al., *Adv. Space Biol. Med.* **10**, 7 (2005).
9. T. K. O'Neil, L. R. Duffy, J. W. Frey, and T.A. Hornberger, *J. Physiol.* **587**, 3691 (2009).
10. M. Burry, D. Hawkins, and E. E. Spangenburg, *Eur. J. Appl. Physiol.* **100**, 409 (2007).
11. P. D. Gollnick, B. F. Timson, R. L. Moore, and M. Riedy, *J. Appl. Physiol.* **50** (5), 936 (1981).
12. U. K. Laemmli, *Nature* **227** (5259), 680 (1970).
13. M. Flück, J. A. Carson, S. E. Gordon, et al., *Am. J. Physiol.* **277**, 152 (1999).
14. M. Flück, A. Ziemiecki, R. Billeter, and M. Muntener, *J. Exp. Biol.* **205**, 2337 (2002).
15. A. C. Durieux, D. Desplanches, D. Freyssenet, and M. Fluck, *Biochem. Soc. Trans.* **35**, 1312 (2007).
16. S. Klossner, A. C. Durieux, D. Freyssenet, and M. Fluck, *Eur. J. Appl. Physiol.* **106** (3), 389 (2009).
17. D. Aronson, M. A. Violan, S. D. Dufresne, et al., *J. Clin. Invest.* **99**, 1251 (1997).
18. L. C. Martineau and P. F. Gardiner, *J. Appl. Physiol.* **91** (8), 693 (2001).
19. J. S. You, J. W. Frey, and T. A. Hornberger, *PLoS One* **7**, e47258 (2012).
20. J. S. You, H. C. Lincoln, C. R. Kim, et al., *J. Biol. Chem.* **289**, 1551 (2014).
21. T. Sonobe, T. Inagaki, D. C. Poole, and Y. Kano, *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **294**, 1329 (2008).
22. E. E. Spangenburg and T. A. McBride, *J. Appl. Physiol.* **100**, 129 (2006).
23. D. E. Ingber, *FASEB J.* **20** (7), 811 (2006).
24. D. J. Milner, M. Mavroidis, N. Weisleder, et al., *J. Cell. Biol.* **150** (6), 1283 (2000).
25. M. G. Palmisano, S. N. Bremner, T. A. Hornberger, et al., *J. Cell. Sci.* **128** (2), 219 (2015).
26. I. V. Ogneva, *J. Appl. Physiol.* **109** (6), 1702 (2010).
27. Т. М. Мирзоев, Н. С. Бирюков, О. М. Веселова и др., *Биофизика* **57** (3), 509 (2012).

Realization of Mechanical Signal during Gravitational Unloading: a Response of mTORC1 Targets to Eccentric Contractions

T.M. Mirzoev, S.A. Tyganov, I.O. Petrova, and B.S. Shenkman

Institute of Biomedical Problems, Russian Academy of Sciences, Khoroshevskoe shosse 76a, Moscow, 123007 Russia

The aim of the study was to assess the response of key mTORC1 substrates to a bout of contractile stimuli at different times of functional unloading. Functional unloading of hindlimb muscles was carried out by the method of «antiorthostatic suspension». 28 Wistar rats were divided into four groups: control, hindlimb suspension for 1, 3 and 7-days. After hindlimb suspension, isolated soleus muscles of rats were subjected to a bout of *ex vivo* eccentric contractions. Using western blotting, we determined the content of phosphorylated forms of p70S6K and 4E-BP1. We discovered that an eccentric load resulted in a significant increase in p70S6K phosphorylation and reduced 4E-BP1 phosphorylation both in control and HS rats, but in the HS rats these changes were less pronounced. We can conclude that a bout of eccentric contractions during functional unloading causes a weaker activation of Akt-mTORC1-p70S6K pathway in isolated rat soleus muscle compared to control. This may indicate that it is important to maintain muscle tone for better muscle mechanical signal perception and subsequent activation of anabolic signaling pathways.

Key words: gravitational unloading, soleus muscle, eccentric contractions, p-p70S6K, 4E-BP1