**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ –
ИНСТИТУТ МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКИХ ПРОБЛЕМ
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК
(ГНЦ РФ – ИМБП РАН)**

**ШЕНКМАН БОРИС СТИВОВИЧ**

**АКТОВАЯ ЛЕКЦИЯ**

# ГРАВИТАЦИОННАЯ ФИЗИОЛОГИЯ ПОСТУРАЛЬНОЙ МЫШЦЫ

**Москва 2024 г.**

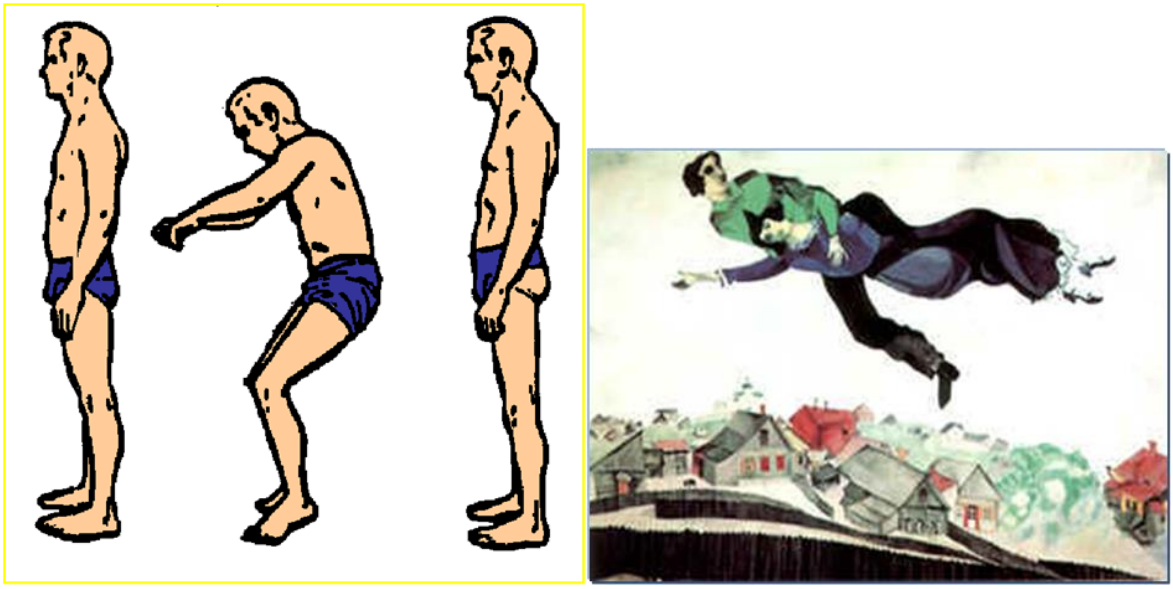
## Введение

В этой лекции будет изложена краткая версия результатов исследований последних лет, полученных при последовательном экспериментальном анализе изменений активности, механических свойств, структуры и работы сигнальных механизмов камбаловидной мышцы, основной постуральной мышцы человека и других млекопитающих, наблюдаемых при изменении действия гравитационных сил в условиях реальной и моделируемой невесомости.

По представлениям школы профессора И.Б. Козловской стабильное положение тела и локомоции животных на суше обеспечиваются существованием двух функциональных компонентов двигательной системы: тоническим (медленным) и фазным (быстрым). Одной из главных гравитационно обусловленных функций двигательной системы является поддержание в гравитационном поле вертикальной стойки и положения отдельных частей тела. Эти функции обеспечиваются тонической мышечной системой. Локомоторные движения носят динамический характер и выполняются преимущественно фазными мышцами, работающими ритмически, с существенно более высокой энергетикой. Очевидно, что истинно гравитационно-зависимой является работа статическая, выполняемая тоническими мышцами. Тонические сокращения отличаются большой длительностью, относительно малой утомляемостью и окислительным энергетическим метаболизмом. Тонические движения выполняются специальной мускулатурой, представленной медленными, малыми двигательными единицами (ДЕ) и медленными мышечными волокнами. У большинства млекопитающих основной медленной мышцей, выполняющей антигравитационную работу, является камбаловидная мышца (m. soleus). В ее составе от 70 до 90 % волокон медленного типа. Эта мышца является одним из тыльных (dorsal) экстензоров голеностопного сустава

Камбаловидная мышца у млекопитающих очень активна. Она работает не меньше, чем 11 часов в сутки. Именно она наряду с другими «осевыми» мышцами (например, мышцами спины) обеспечивает устойчивость организма млекопитающего в гравитационном поле Земли. В первые годы освоения космоса ученые обнаружили, что в невесомости поза человека напоминает эмбриональную позу и характеризуется напряжением флексоров и ослаблением экстензоров, среди которых важное место занимает камбаловидная мышца. W. Thornton назвал эту позу позой «усталой обезьяны» (рис.1А). Однако и до этого люди интуитивно представляли себе именно такую позу для «летящего» человека. Что хорошо видно на известной картине Марка Шагала (рис. 1Б).

А Б



До полета В полете После полета

Рис.1. Поза человека в условиях безопорности. А. Поза человека до космического полета, в невесомости и после приземления (по W. Thornton, 1977). Характерная флексорная установка. Б. Флексорная установка у «летящего» человека. Картина Марка Шагала Влюбленные над городом.

В чем же причина «ослабления» камбаловидной мышцы в космическом полете? Каковы механизмы этого «ослабления» и последующей атрофии мышцы? Ответы на эти вопросы и составляют содержание данной лекции. Но прежде, чем приступить к основному содержанию лекции, необходимо вкратце напомнить о строении скелетной мышцы.

## Строение ткани скелетной мышцы

Мышца состоит из пучков волокон, каждый из которых покрыт перимизием соединительно-тканной природы. Мышечные волокна отделены друг от друга эндомизием, который представляет собой базальную мембрану (ламину), в основе которой лежит гликопротеиновый комплекс с главным белком – ламинином. Каждое мышечное волокно обеими концами закрепляется на сухожилиях, формируя мышечно-сухожильное сочленение (muscle-tendinous junction – MTJ). Контакт между мышечной тканью и плотной соединительной тканью сухожилия осуществляется через внеклеточный матрикс

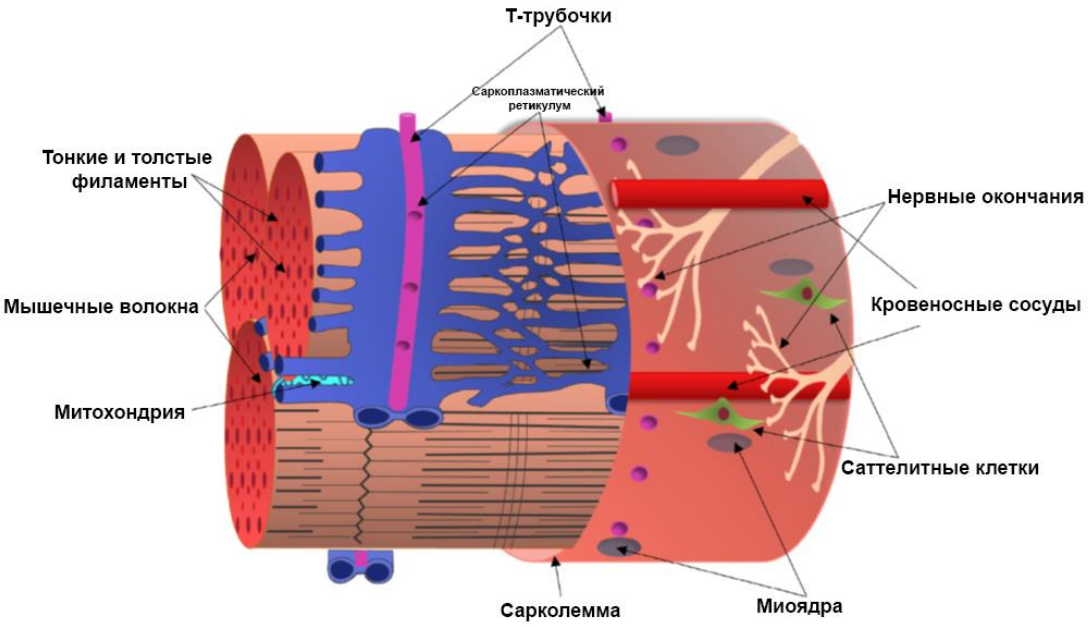



Рис. 2. Схема строения скелетного мышечного волокна и связанных с ним структур (по Mukund & Subramaniam, 2020 в модификации)

На схеме (рис. 2) видно, как под базальную мембрану мышечного волокна проникают терминали аксонов двигательных и симпатических нейронов. В месте контакта моторных окончаний с мышечным волокном образуются нервно-мышечные сочленения (neuromuscular junctions – NMJ) или нервно-мышечные синапсы, иначе называемые концевыми пластинками (end-plates). Именно через них осуществляется передача основных электрических сигналов, управляющих сократительной активностью мышцы. Через них также передаются химические вещества, влияющие на регуляцию мышечного метаболизма (нейротрофины и нейрегулины). Между мышечными волокнами проходят кровеносные капилляры, образованные эндотелиоцитами, венулы и резистивные сосуды – артериолы.

Мышечное волокно является клеточной структурой, но не является клеткой. Это многоядерная структура, симпласт. В продольном измерении мышечное волокно, точнее комплекс миофибрилл, двигательных органелл, занимающих до 90% объема волокна, составляет структурные единицы, называемые саркомерами. Границами саркомера являются цитоскелетные пластинки, именуемые Z-дисками. Длина саркомера от Z до Z составляет 2,0–2,8 микрон. Посередине саркомера расположена еще одна цитоскелетная структура – М-диск. В саркомере чередуются оптически активные и прозрачные участки. Мышечное волокно покрыто клеточной мембраной, называемой сарколеммой.

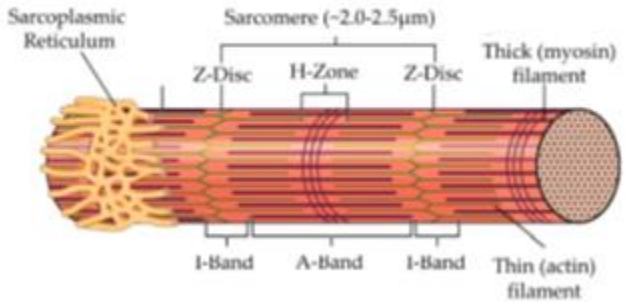



Рис. 3 Структура саркомера и его компонентов.

Основное место в мышечном волокне занимают миофибриллы с расположенными по периферии ядрами (миоядра). Рядом располагается кровеносный капилляр, выстланный эндотелиальными клетками. Один из самых важных компонентов мышечного волокна – цитоскелет. Цитоскелетные белки мышечного волокна разделены на отдельные зоны (компартменты). Различают белки саркомерного, внесаркомерного и субсарколеммального (кортикального) цитоскелета. Между миофибриллами находится сеть митохондрий, липидные и углеводные включения, лизосомы. Между миофибриллами также имеется специализированная мембранная структура (Т-система), депонирующая ионы кальция и принимающая участие в регуляции мышечного сокращения.

В мышечном волокне, активированном нервными импульсами, происходит высвобождение ионов кальция из внутриклеточных депо, которое запускает взаимодействие тонких (актиновых) и толстых (миозиновых) филаментов в миофибриллах, в ходе которого генерируется механическое усилие и осуществляется мышечное сокращение.

Скелетные мышцы образованы волокнами разного типа, которые располагаются мозаичным образом и различаются функциональными свойствами. «Медленные» волокна отличаются высокой степенью устойчивости к утомлению и большой продолжительностью сокращения, но пониженной максимальной силой и скоростью сокращения. «Быстрые» волокна обладают высокой скоростью и силой сокращения, но высокой утомляемостью. В последние десятилетия стало известно, что все эти свойства определяются преобладанием быстрой или медленной изоформы тяжелых цепей миозина (ТЦМ) в данном волокне, т. е. миозиновым фенотипом.

**Гравитационно-зависимые механические факторы, действующие на двигательную систему. Наземные модели гравитационной разгрузки.**

Почти постоянная сократительная активность определяется двумя основными биомеханическими факторами, действующими на двигательную систему животного и человека на нашей планете: осевой нагрузкой и силой реакции опоры. Оба фактора оказывают свое влияние в условиях земной гравитации и устраняются в условиях невесомости (рис. 4). Большая часть данных, обсуждаемых в этой лекции, получена в условиях безопорности, т. е. в экспериментах с использованием моделей «сухой» иммерсии и вывешивания задних конечностей (у грызунов). Используется также и модель антиортостатической постельной гипокинезии. Перед тем, как перейти непосредственно к рассмотрению обсуждаемой проблемы имеет смысл кратко охарактеризовать упомянутые экспериментальные подходы.

«Сухая» иммерсия – модель, разработанная в 70-е годы XX века в России, предполагает полное погружение испытуемого в воду в открытой ванне [Шульженко, Виль-Вильямс, 1975]. При этом поверхность тела человека отделена от воды водонепроницаемой пленкой, свободно покрывающей поверхность воды и бортики ванны. Для имитации действия невесомости в наземных исследованиях также часто применяется антиортостатическая гипокинезия (head-down tilt bed rest) т. е. пребывание испытателя в постели в положении «голова ниже горизонтальной плоскости на 6 градусов».

Вывешивание задних конечностей является одной из самых распространенных стандартных моделей микрогравитации на лабораторных грызунах. Животное подвешивается к потолку клетки либо за хвост, либо за кожу спины, либо с помощью тканевого жилета так, чтобы передние конечности опирались на грунт, задние не касались его, находясь под углом 30–40 градусов от пола (рис. 5). При правильном использовании модели животное может свободно передвигаться по клетке. Уровень кортикостерона, указывающий на степень стрессированности животного, редко превышает уровень интактного грызуна виварного контроля.

При моделировании невесомости у крыс методом вывешивания задних конечностей действие силы реакции опоры и осевой нагрузки на заднюю часть тела животного пренебрежительно мало.

Изменения активности мышц, обусловленные изменением действия гравитационно-зависимых биомеханических факторов, реализуются через супраспинальные и спинальные нейрональные механизмы в большой степени регулируемые афферентными путями (системами вестибулярной, проприоцептивной и опорной афферентации).

| | Аксиальная нагрузка (А) | Реакция опоры (Б) |
|---|---|---|
| **Точка приложения** | Аксиальная мускулатура | Опорные зоны стопы (при вертикальной позе) |
| **Сенсорные структуры** | Проприоцепторы (???), молекулярные сенсоры мышечных волокон | Рецепторы глубокой кожной чувствительности |
| Физиологический эффект | Механическое напряжение | Сократительная активность |

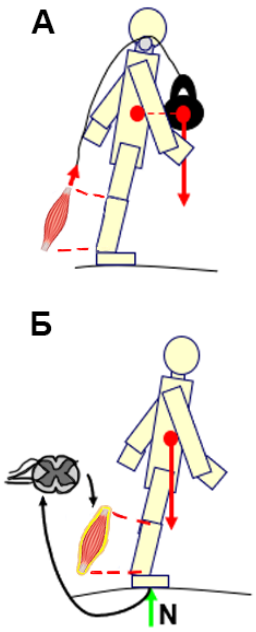



Рис. 2. Биомеханические факторы, действующие на двигательную систему млекопитающих в условиях земной гравитации. Слева – сравнительная таблица, указывающая на различия точек приложения, соответствующих сенсорных структур и физиологического эффекта аксиальной (осевой) нагрузки и реакции опоры. Справа – схематическое изображение векторов веса (А) и силы реакции опоры (Б) и их физиологическое действие (пояснение в тексте)

Рис. 5. Экспериментальная модель вывешивания задних конечностей грызунов

**Принципы нейронального контроля скелетной мышцы.**

Существует 2 механизма нейронального контроля за состоянием иннервированной мышцы. Это импульсный контроль, в основе которого лежит ритмическая последовательность потенциалов действия, генерируемых мотонейроном. При этом частота, характер и длительность импульсации специфичны для данного вида двигательных единиц. Для камбаловидной мышцы млекопитающих частота импульсации колеблется в пределах 10–20 Гц. Такая частота импульсов, поступающих к мышце, диктует и паттерн ее сократительной активности. Это режим низкоинтенсивных длительных сокращений. Посредниками в осуществлении импульсного контроля являются внутриклеточные сигнальные механизмы самой мышцы, трансформирующие механические и химические результаты сократительной активности в последовательность сигнальных химических реакций, контролирующих пластический и энергетический обмен волокна. Другой механизм нейронального контроля – нейротрофический, реализуемый через нервно-мышечный синапс путем высвобождения нейротрофических факторов (нейротрофинов и нейрегулинов), которые, взаимодействуя с соответствующими рецепторами, осуществляют регуляцию белкового и энергетического метаболизма скелетной мышцы. Экспериментальные данные свидетельствуют, что основную роль в поддержании структуры камбаловидной мышцы играет импульсный нейрональный контроль, реализуемый через долговременную тоническую активность мышцы.

**Опорные влияния на тоническую активность**

Накопление данных о роли опорного сигнала в поддержании тонической активности мышц привело к появлению гипотезы о роли опорной афферентации в регуляции импульсной активности медленных мотонейронов и мышечных волокон. Предполагалось, что при отрыве опорной поверхности тела (например стопы) от субстрата афферентный сигнал от рецепторов глубокой кожной чувствительности перестает поступать, и это снижает интенсивность эндогенной импульсации мотонейронов, вплоть до ее исчезновения (рис. 6, А, В). Прямое влияние опорной афферентации на двигательные функции человека было впервые показано в совместном советско-кубинском эксперименте на борту советского космического аппарата [Хернандец и соавт., 1983]. В этом эксперименте применили механическую стимуляцию опорных зон стопы. Впоследствии в экспериментах с «сухой» иммерсией использовали модифицированные устройства, позволяющие проводить длительные сеансы опорной стимуляции (рис. 6, Б).

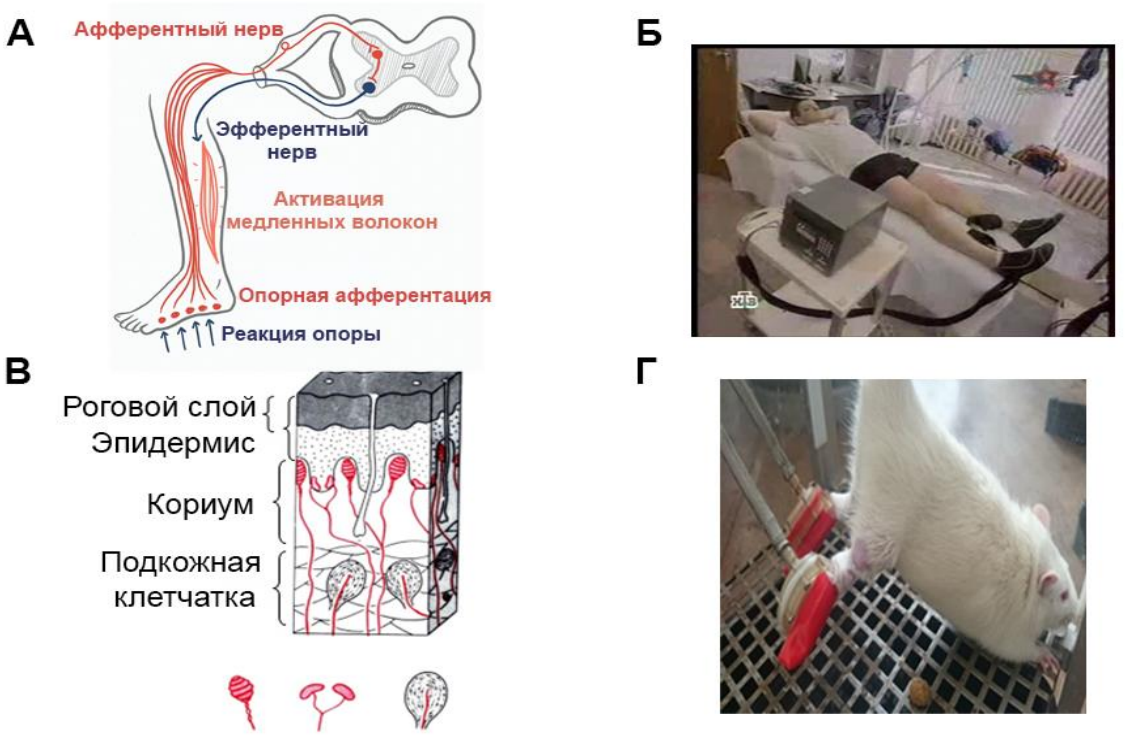



Рис. 6. Механизмы опорной афферентации и механостимуляция опорных афферентов: А – схема, показывающее влияние раздражения опорных афферентов на активность медленных мотонейронов и медленных мышечных волокон; Б – локализация телец Фатер – Паччини (капсульная структура) в глубоких слоях кожи; В – механостимуляция опорных зон стопы человека; Г – механостимуляция опорных зон стопы вывешенной крысы

В этих исследованиях, в частности, обнаружено, что опорная стимуляция (ежедневное воздействие с давлением на стопу 40 кПа, в течение 6 часов по 20 минут в начале каждого часа в режимах естественной локомоции) на фоне иммерсии позволяет поддержать нормальный уровень электрической активности и рефлекторной поперечной жесткости m. soleus. Результаты исследований роли опорной афферентации в поддержании структуры и функции постуральной мышцы на Земле позволили И.Б. Козловской сформировать представления о механизмах адаптации двигательной системы к условиям гравитационной разгрузки, запускаемых устранением опорной афферентации. На схеме (рис. 7) представлены такие механизмы. Устранение реакции опоры приводит к инактивации медленных мотонейронов, что влечет за собой инактивацию преимущественно медленных мышечных волокон и соответственно механорецепторов постуральной мышцы.

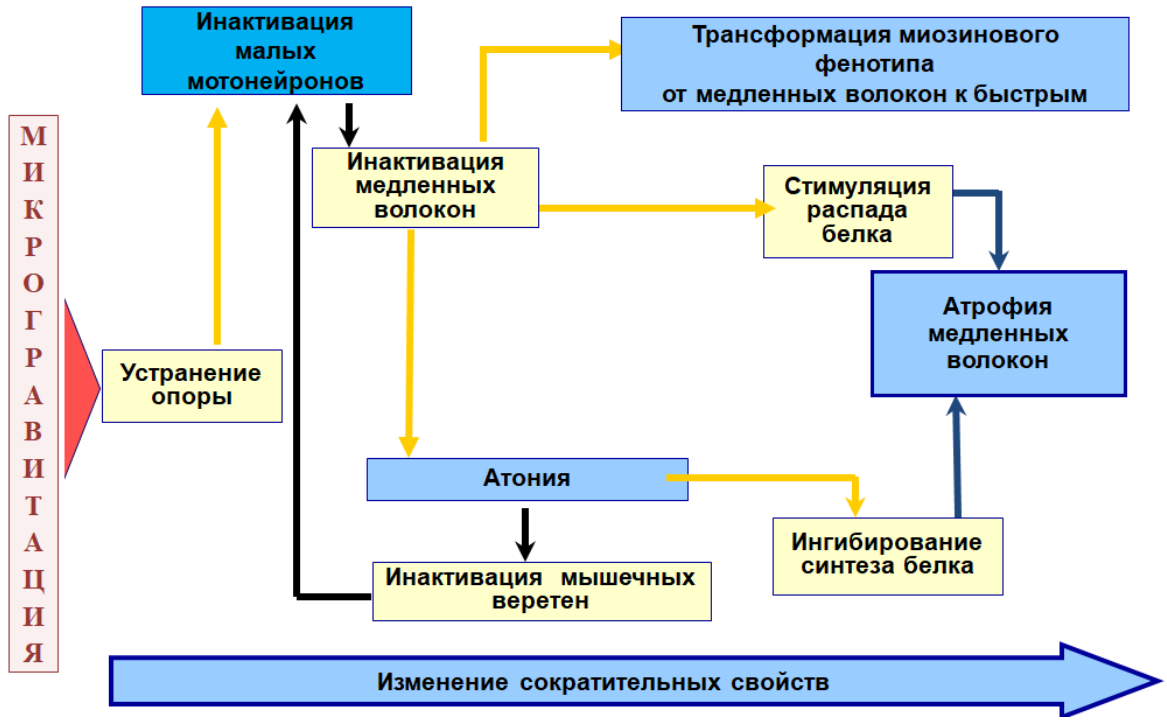



Рис. 7. Гипотетическая схема И.Б. Козловской и Б.С. Шенкмана. Роль устранения опоры в процессе изменений в нервно-мышечной системе в условиях микрогравитации. Пояснения в тексте

Такая инактивация обусловливает потерю мышечного тонуса (жесткости – см. ниже), снижение интенсивности синтеза белка и увеличение интенсивности его распада. При этом наблюдается изменение экспрессии изоформ тяжелых цепей миозина, что приводит к превращению части медленных волокон в волокна быстрого типа. Как в исследованиях с участием человека, так и в экспериментах на животных было неоднократно показано, что все перечисленные и показанные на схеме эффекты находятся в прямой зависимости от активности опорных афферентов.

**Динамика активности камбаловидной мышцы в условиях безопорности**

В экспериментах с вывешиванием задних конечностей и с кратковременной невесомостью при полете по параболе Кеплера у крыс было неоднократно показано драматическое снижение, иногда вплоть до полного подавления, электрической активности камбаловидной мышцы [Alford et al., 1987; Kawano et al., 2002;2004; DeDoncker et al., 2005] (рис. 8). Таким образом, устранение гравитационно-зависимых механических влияний приводит к «отключению» электрической и, соответственно, механической активности камбаловидной мышцы, основной антигравитационной мышцы млекопитающих. С

уверенностью можно утверждать, что причиной этого «отключения» является инактивация мотонейронов передних рогов спинного мозга.

Интересно, что снижение электрической активности мышцы сопровождается снижением афферентной нейрограммы [De Doncker et al, 2005]. Т.е. радикально снижается поток информации от проприоцепторов и опорных рецепторов. Этот факт косвенно может свидетельствовать о том, что в этот ранний период снижается не только электрическая, но и сократительная активность мышцы.

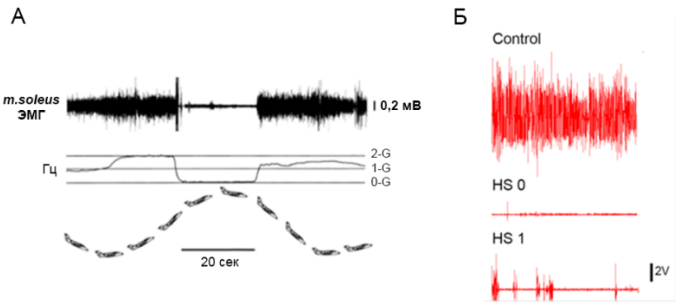



Рис. 8. Прекращение электрической активности m. soleus крысы при устранении реакции опоры: А – электромиограмма камбаловидной мышцы крысы при полете по параболе Кеплера (Kawano et al., 2002); Б – электромиограмма камбаловидной мышцы крысы при вывешивании задних конечностей (данные С. Тыганова). HS0 – регистрация ЭМГ сразу после устранения опоры, HS1 – регистрация через 24 ч после устранения опоры

В результате мы можем констатировать состояние физиологического покоя постуральной мышцы, которое продолжается более 2 суток. Такая продолжительность полного «покоя» совершенно не характерна для нормального функционирования постуральной мышцы [Hodgson et al., 2005; Lomo et al., 2003]. Поэтому можно предположить, что мышца переходит в иное состояние – состояние бездействия [Шенкман, 2023]. В дальнейшем мы подробно остановимся на том, как это состояние сказывается на работе внутриклеточных сигнальных механизмов.

Если первые трое суток мы можем с полным основанием утверждать, что камбаловидная мышца находится в состоянии бездействия (disuse), то после третьих суток это утверждение становится не совсем верным.

Примерно через трое суток моделируемой гравитационной разгрузки в камбаловидной мышце возобновляется электромиографическая (ЭМГ) активность.

Амплитуда и соответственно интегральные показатели ЭМГ постепенно нарастают и к 14-м суткам вывешивания достигают значений, сопоставимых с показателями виварного контроля. Это явление можно назвать спонтанной активностью.

В последующих работах различных авторов [Kawano et al., 2004; DeDoncker et al., 2005 и др.] неоднократно наблюдался рост электромиографической активности камбаловидной мышцы крысы в условиях долговременного антиортостатического вывешивания, однако сам феномен спонтанной активности оставался неисследованным, и, в частности, оставался открытым вопрос о природе этого феномена и лежащих в его основе молекулярных механизмах. Была предпринята попытка оценить функциональную значимость этой активности [Ohira et al., 2006] с помощью денервации камбаловидной мышцы у вывешенных крыс. Денервация не привела к углублению атрофического процесса, что позволило сделать осторожный вывод о том, что спонтанная активность для атрофирующейся мышцы не является компенсаторной, по крайней мере, на начальном этапе развития процесса. Наблюдая постепенное повышение электрической активности мышцы, не стоит сомневаться в том, что повышается также и ее сократительная активность. Об этом свидетельствует повышение афферентной нейрограммы [Kawano et al., 2004].

Во всех случаях спонтанная электромиографическая активность камбаловидной мышцы регистрировалась при использовании имплантируемых электродов на модели вывешивания задних конечностей грызунов. Регистрация поверхностной ЭМГ мышц человека во время экспериментов с «сухой» иммерсией, как правило, показывала значительное снижение базальной ЭМГ камбаловидной мышцы (обычно, не ниже 30–40 % от уровня контроля), при этом не наблюдалось подъема этого показателя, по крайней мере, на протяжении первых 5–7 суток сухой иммерсии [Григорьев и соавторы, 2004], и, по-видимому, снижение тонической активности при разгрузке у человека выражено в меньшей степени, чем у грызунов, несмотря на высокую схожесть структурных, метаболических, сигнальных и сократительных эффектов сухой иммерсии у человека и вывешивания задних конечностей крысы. В некоторой степени различия в изменениях интегральной ЭМГ в ответ на гравитационную разгрузку могут быть объяснены разницей в методологии постановки экспериментов. Регистрация электрической активности мышц у человека производится, обычно, посредством накожного наложения электродов, что не позволяет быть полностью уверенными в строгой фиксации характеристик электрического поля исключительно исследуемой мышцы, в особенности глубоко локализованной в задней группе мышц голени камбаловидной мышцы.

В ходе исследований феномена спонтанной активности и ее механизмов, мы обратили внимание на весьма сходные явления, наблюдающиеся при нарушении целостности спинного мозга.

Известно, что нервно-мышечные изменения, вызванные хирургической изоляцией спинного мозга, устраняющей супраспинальную и в определенной степени афферентную активацию мотонейронов и связанных с ними мышц, весьма сходны с таковыми при реальной или моделируемой посредством разгрузки задних конечностей микрогравитации. [Baldwin et al.,2013]. Относительная схожесть сигнальных процессов, обуславливающих функциональную перестройку тонической мускулатуры при различных видах гравитационной разгрузки, заставляет обратить внимание на достаточно хорошо исследованный феномен повышенной возбудимости мотонейронов и обусловленной ею мышечной спастичности при спинальных травмах.

Повреждение спинного мозга в ряде случаев приводит к проявлению непроизвольных мышечных сокращений и развитию мышечной спастичности, локализованной ниже места повреждения [Edgerton., Roy. 2010]. Спастичность характеризуется повышением мышечного тонуса, возникающим в результате повышения возбудимости мотонейронов и усиления синаптических входов в ответ на инактивацию тормозных механизмов.

Механизм, приводящий к развитию спастичности при повреждениях спинного мозга, был впервые описан в работе Паскаль Буланже и соавторов. На модели спинальной травматизации животных ими было показано, что посттравматическая мышечная спастичность обусловлена изменением профилей экспрессии двух мембранных котранспортёров ионов: калий-хлоридного котранспортёра KCC2 и натрий-калий-хлоридного котранспортёра NKCC1 в мотонейронах спинного мозга. [Boulenguez et al., 2010]. Как теперь известно, в травмированном спинном мозге содержание калий-хлоридного котранспортёра KCC2 и отток хлорид-ионов из клетки снижаются, тогда как содержание натрий-калий-хлоридного котранспортёра NKCC1 и приток хлорид-ионов в клетку, напротив, увеличивается. Это приводит к сдвигу равновесного потенциала покоя в положительную сторону (с -75 до -65 мВ), что, в свою очередь, заменяя тормозные эффекты глицина и ГАМК возбуждающими вызывает спонтанное развитие потенциала действия, повышение мышечной активности, и, впоследствии, мышечную спастичность (рис. 9).

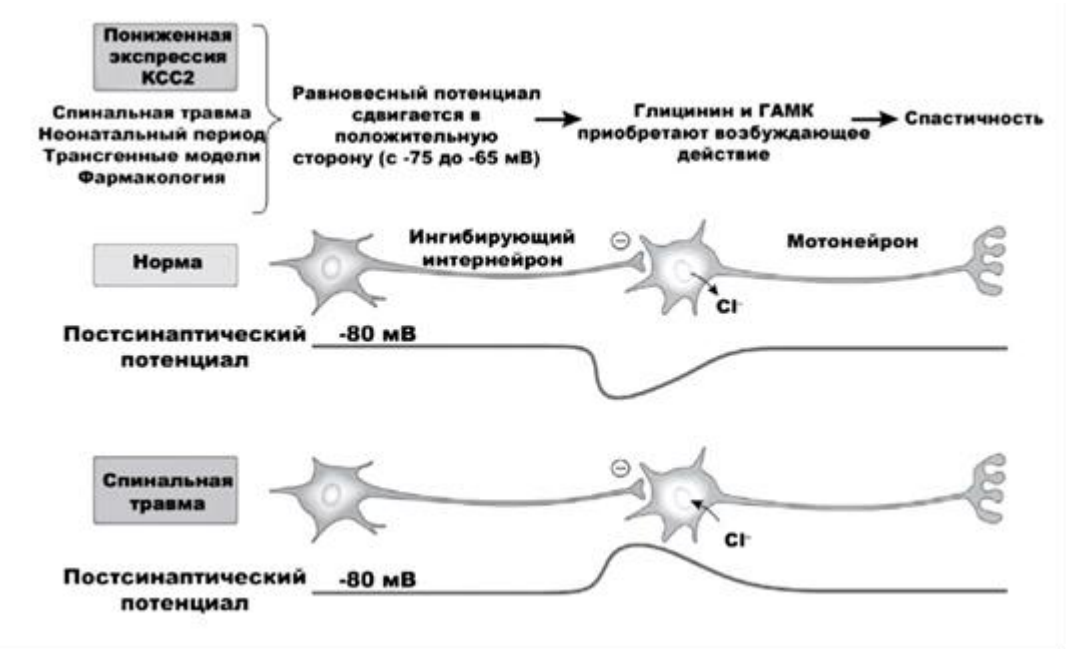



Рис.9. Возникновение спастичности в результате изменений в регуляции содержания ионов хлора в мотонейронах. Адаптировано из Edgerton & Roy (2010)

Понятно, что исследователей интересует вопрос о причине изменений хлоридного гомеостаза и последующих событий в мотонейронах спинного мозга и о механизмах, снижающих содержание KCC2 в этих клетках.

В эксперименте Li et al., часть животных с частично нарушенной целостностью спинного мозга была подвергнута локомоторной тренировке на тредбане. В условиях такой тренировки снижения содержания KCC2 в спинном мозгу крыс не наблюдалось. Однако, если животным с повреждением спинного мозга на фоне такой тренировки вводили антитела против рецепторов BDNF (TRKB), то эффект тренировки полностью устранялся, а в спинном мозге содержание KCC2 снижалось, что предполагает поддержание спонтанной активности мышц, приводящей к спастичности [Li et al., 2023].

Таким образом, одним из основных регуляторов содержания калий-хлоридного ко-транспортера в мотонейронах спинного мозга можно считать активность нервно-мышечного аппарата. При «отключении» мотонейронов в случае спинномозговых травм, нарушении мозгового кровообращения и некоторых других патологических изменений наблюдается снижение содержания KCC2 с последующим изменением хлоридного гомеостаза клетки и значительного повышения ее возбудимости. В результате этих изменений мотонейроны генерируют спонтанную активность мышц, приводящую в дальнейшем к мышечной спастичности. Однако, если на фоне нарушения центральной регуляции мотонейронов животному навязывается двигательная активность, изменений

содержания KCC2, хлоридного гомеостаза и возбудимости не происходит. Не исключено, что медиатором, передающим в мотонейроны сигнал об активном состоянии мышц является BDNF, секретируемый сокращающейся мышцей.

Сходство динамики электрической активности мышц-разгибателей голени и спинальных мотонейронов при развитии спинальных поражений и при гравитационной разгрузке позволило нам сформулировать и экспериментально проверить гипотезу, предполагающую развитие гипервозбудимости и спонтанной активности мотонейронов поясничного отдела спинного мозга при гравитационной разгрузке вследствие снижения экспрессии калий-хлоридного ко-транспортера KCC2 [Kalashnikov et al., 2021] (рис.10).

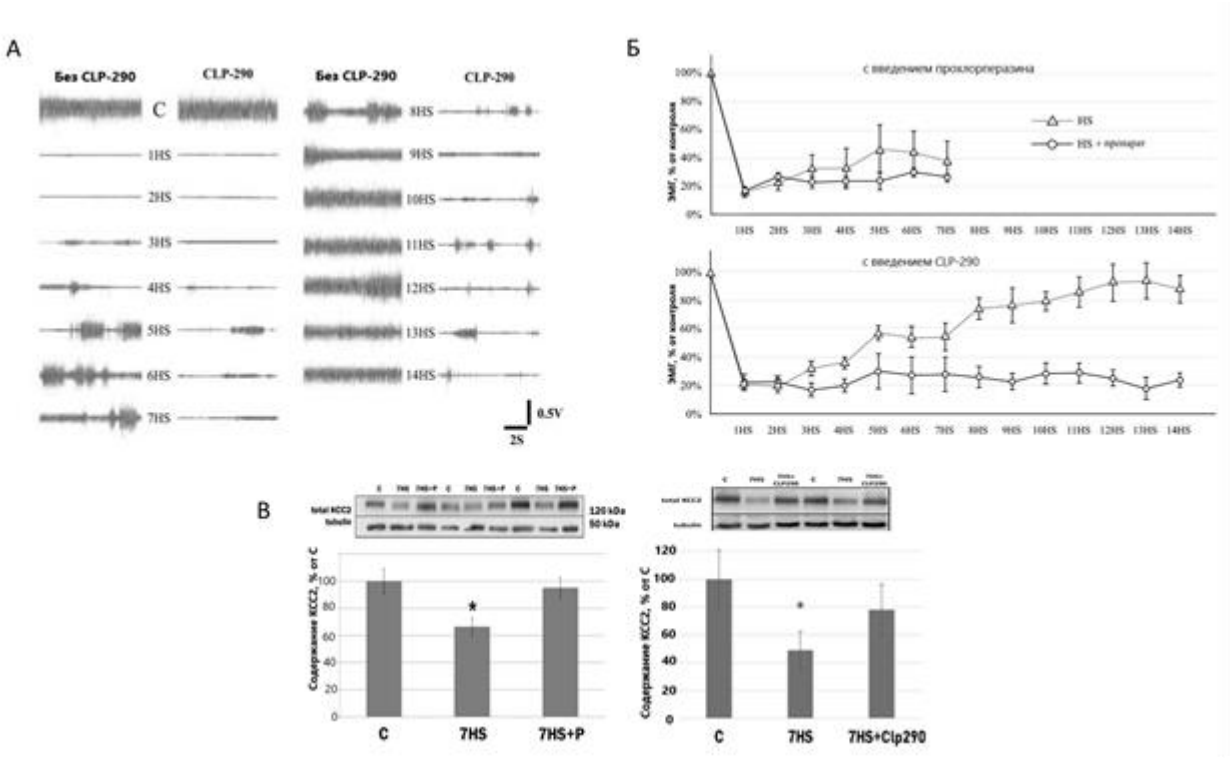



Рис.10. Типичные паттерны ЭМГ-активности m. soleus крысы перед антиортостатическим вывешиванием и во время 14-суточного вывешивания без введения и с введением CLP-290 (А). Интегральная ЭМГ-активность m. soleus крысы во время антиортостатического вывешивания с введением и без введения прохлорперазина и CLP290 (Б). Содержание KCC2 в поясничном отделе спинного мозга крысы после введения прохлорперазина или CLP290 (В). С ¬¬– контроль, HS – антиортостатическое вывешивание, 1HS – 14HS – сутки вывешивания, 7HS+P – 7-суточное вывешивание с введением прохлорперазина, 7HS+Clp290 – 7-суточное вывешивание с введением CLP290, * – достоверное отличие от контроля ($p < 0,05$).

Оказалось, что уже 7-суточное вывешивание задних конечностей крысы приводит к снижению содержания KCC2 и увеличению содержания NKCC в поясничном отделе

спинного мозга. При этом, начиная со вторых суток воздействия, как обычно, наблюдается повышение электрической активности камбаловидной мышцы при ее регистрации имплантированными электродами (рис.10). При введении препаратов, активирующих экспрессию KCC2 (прохлорперазина или CLP290) на фоне вывешивания задних конечностей изменений содержания хлоридных ко-транспортеров не выявляется, одновременно электрическая активность камбаловидной мышцы снижается и достигает минимальных значений (рис.10). Таким образом, было показано, что предотвращение снижения экспрессии калий-хлоридного ко-транспортера в поясничном отделе спинного мозга фармакологическими агентами различной природы приводит к почти полному устранению спонтанной активности разгруженной камбаловидной мышцы животного. При этом необходимо отметить, что в большинстве экспериментов нам не удалось выявить достоверных отличий мышечной массы или размеров мышечных волокон у животных с выраженной и фармакологически подавленной спонтанной активностью. Таким образом, при 7-14 суточном воздействии можно говорить об отсутствии свидетельств компенсаторного эффекта спонтанной сокаратительной активности по отношению в атрофическим изменениям. Очевидно, дальнейшие эксперименты помогут выявить причины отсутствия компенсаторного эффекта.

**Фундаментальные направления мышечной перестройки при гравитационной разгрузке..**

Долгосрочными следствиями отключения тонической импульсации и соответственно хронической инактивации камбаловидной мышцы при гравитационной разгрузке являются:

1. Глубокое функциональное снижение силы и жесткости мышцы (атония).
2. Драматическое уменьшение мышечной/белковой массы (атрофия).
3. Изменение миозинового фенотипа волокон (превращение части медленных волокон в быстрые).
4. Прогрессирующая дисфункция митохондриального аппарата.
5. Разрастание соединительной ткани (фиброз) и жировая инфильтрация мышцы (миостеатоз).
6. Перепрограммирование сателлитных клеток

Эти фундаментальные направления мышечной эволюции в условиях устранения (или значительного снижения) реакции опоры и осевой нагрузки, которые в русскоязычной литературе чаще всего называют гравитационной разгрузкой, в свою очередь приводят к глубоким функциональным изменениям скелетной мышцы. Происходит снижение

максимальных и субмаксимальных значений произвольной и электрически вызванной мышечной силы, устойчивости мышц к утомлению и общей двигательной работоспособности, регенераторного потенциала мышц.

Эти функциональные изменения больше выражены в мышцах-экстензорах, чем во флексорах, в мышцах с преобладанием волокон медленного типа, чем в быстрых и смешанных мышцах. Они неизбежно обусловливают развитие глубоких нарушений интегральных двигательных функций: позы, локомоций, точностных движений.

## Гипогравитационная атония и ее физиологические механизмы

Загадочные механизмы поддержания и снижения мышечного тонуса всегда привлекали внимание физиологов. Sir Charles Scott Sherrington писал о тонусе так «Буквальное значение, приписываемое слову «тонус» это, конечно, механическое напряжение. В этом смысле оно вполне соответствует небольшому постоянному продолжительному напряжению, столь характерному для мышц в их состоянии рефлекторной тоничности». Здесь важно то, классики физиологии (не только Шеррингтон) считали, что мышечный тонус имеет рефлекторную природу, т.е. определяется активностью соответствующих мотонейронов и обусловливается афферентными и супраспинальными влияниями. Похожие мысли высказывала и И.Б. Козловская, однако она считала нужным отметить функциональные особенности тонических мышечных сокращений: «Мышечный тонус - это длительное напряжение скелетных мышц, которое отличается малой утомляемостью и большой экономичностью». Она также, вслед за Н.А. Бернштейном указывала на огромное значение мышечного тонуса, без которого невозможно нормальное осуществление ни одного из компонентов двигательной функции организма позвоночного животного.

Изменение тонуса можно оценивать по изменению жесткости мышцы. Под жесткостью биофизики понимают приращение механического напряжения, т.е. растягивающей силы, отнесенной к площади поперечного сечения, в ответ на деформацию (относительное удлинение) мышечных волокон При использовании тензометрических и виброметрических методов оценки поперечной жесткости мышц человека in vivo было показано, что в условиях как реальной (космический полет), так и моделируемой невесомости наблюдается значительная потеря мышечной жесткости уже в первые дни воздействия (рис. 11). Этот феномен получил название гипогравитационной атонии.

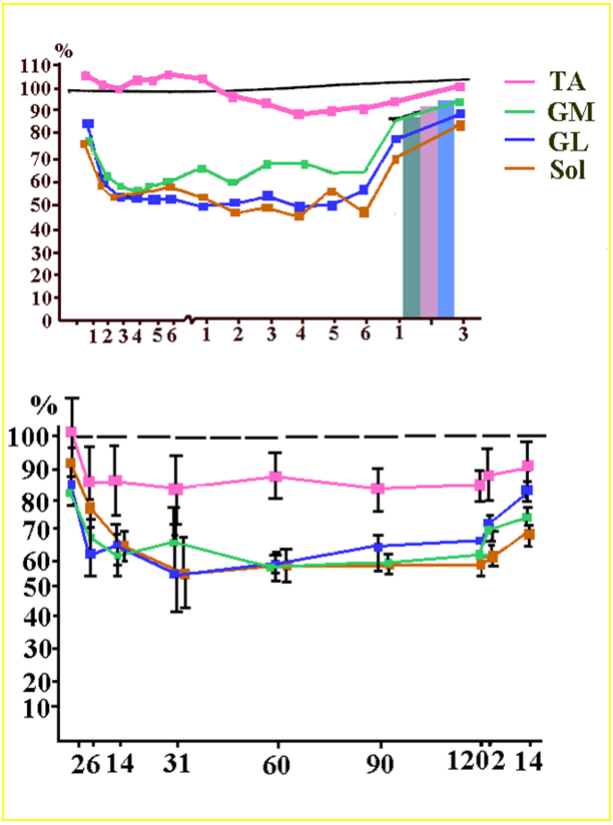
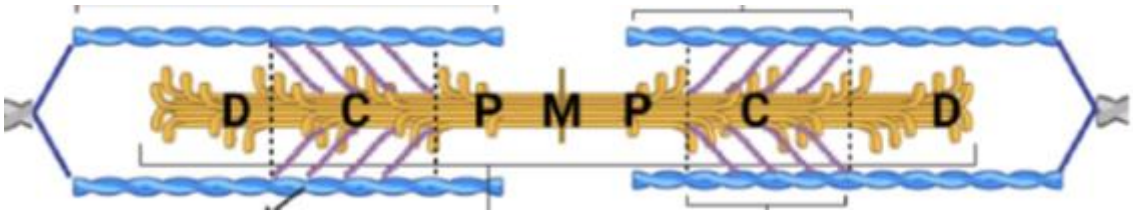



Рис. 11. Динамика поперечной жесткости мышц голени человека в условиях иммерсии и после космического полета (вверху), после антиортостатической гипокинезии (внизу). Вверху: по оси абсцисс – продолжительность воздействия (часы и дни), столбики – три дня после космического полета. По оси ординат – снижение в процентах от исходного уровня. Цветом обозначены мышцы: розовый – m. tibialis anterior, зеленый – m. gastrocnemius medialis, синий – m. gastrocnemius lateralis, коричневым – m. soleus. Внизу – по оси абсцисс – продолжительность воздействия, дни; по оси ординат – снижение в процентах от исходного уровня. Цветовые обозначения мышц такие же

Такая потеря жесткости оказалась связанной с инактивацией медленных мышечных волокон, поддерживающих фоновую механическую активность мышц на Земле даже в покое, что, в свою очередь, и отражается на жесткостных параметрах мышцы in vivo. Очевидно, что этот компонент жесткости является рефлекторным. Однако величина такого рефлекторного тонуса будет в значительной степени зависеть от работоспособности миофибриллярного аппарата, т.е. от его способности длительное время формировать поперечные мостики, связывающие актиновые и миозиновые филаменты и генерирующие механическое усилие. В свою очередь эта работоспособность зависит от межфиламентного расстояния и от количества активных миозиновых головок [MacIntosh, 2003]. В последние годы усилиями итальянских, британских, американских и нидерландских исследователей

на основе многочисленных экспериментов было сформировано представление о трех состояниях, в которых могут находиться головки молекулы миозина [Marcucci, 2023; Brunello, Fusi, 2023]. На толстом (миозиновом) филаменте различают три зоны: зона P (ближайшая к М-диску), в которой не образуются актомиозиновые связи, зона D, ближайшая к периферии саркомера), где значительная часть миозиновых головок не погружены в толщу филаменты и находятся в беспорядочном состоянии (Disorder Relaxation DRX), будучи в готовности при высокой концентрации ионов кальция сформировать актомиозионовые поперечные мостики и зона С. В зоне С миозиновые головки глубоко инактивированы, погружены в толщу толстого филамента и в каждой димерной миозиновой молекуле сцеплены друг с другом (рис.12). Третье состояние миозиновых готовок – это состояние связанности с актином в ходе мышечного сокращения.

А




Б

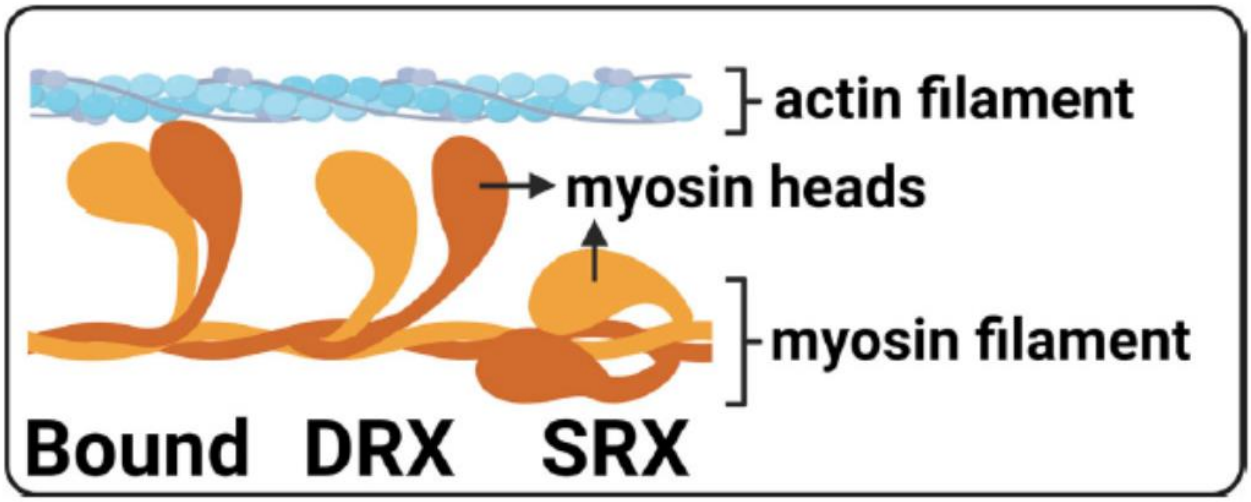



Рис. 12. Состояние миозиновых головок и формирование поперечных мостиков. А. Три зоны в структуре толстых филаментов. – небольшое количество головок, зона С головки погружены в толщу филаментак и головки каждого димера сцеплены между собой – состояние суперрелаксации (SRX); зона D – головки свободно флюктуируют в межфйиламентной зоне в готовности к связыванию, состояние «беспорядочной (disorder) релаксации (DRX); Б. Положение миозиновых головок в трех состояниях: в активном связывании с актином, при DRX и SRX.

Понятно, что работоспособность миофибриллярного аппарата зависит от способности мышцы рекрутировать максимальное количество поперечных мостиков путем максимальной активации миозиновых головок, находящихся в состоянии SRX.

Именно это позволяет делать омекамтив мекарбил один из представителей нового семейства относительно низколекулярных соединений, позволяющих рекрутировать новые поперечные мостики, увеличивать интенсивность и продолжительность их работы.

Нам совместно с учеными Института иммунологии и физиологии Уральского отделения РАН удалось добиться существенного частичного предотвращения снижения жесткости и силы камбаловидной мышцы путем введения омекамтива мекарбила на фоне 14-суточного вывешивания задних конечностей крысы [Sergeeva et al., 2024].

Существуют ли собственные периферические механизмы снижения жесткости мышцы при ее инактивации?

В конце XX века появилось много данных о том, что даже изолированная мышца и изолированное волокно обладают функционально значимой жесткостью, которая постепенно утрачивается после прекращения сократительной активности. Эта собственная жесткость мышцы (intrinsic stiffness) определяется как активным компонентом, т. е. способностью формировать некоторое количество актомиозиновых связей (поперечных мостиков) при растяжении и сокращении, так и «параллельным упругим/эластичным компонентом», а именно молекулами структурных белков цитоскелета и внеклеточного матрикса, способными оказывать механическое сопротивление как при растяжении мышцы/волокна, так и при их сокращении. Различают динамическую или мгновенную жесткость, которую можно измерить, прикладывая очень быструю деформацию, и статическую жесткость, которую характеризуют уровнем напряжения, установившегося при относительно продолжительном растяжении (passive tension).

К настоящему времени известно, что при гравитационной разгрузке происходит существенное снижение как пассивной, так и активной жесткости мышц и волокон. Методом атомной силовой микроскопии оценивали поперечную жесткость изолированных волокон m. soleus человека после 7 суток «сухой» иммерсии (рис. 13, А). При исследовании этим методом сократительного аппарата (после устранения мембранных структур с помощью детергента) удалось установить, что поперечная жесткость миофибриллярного аппарата на участке от М-линии до Z-диска статистически значимо снижалась (рис. 13, Б). При этом следует отметить, что поскольку до иммерсии жесткость активированного волокна была почти в 2 раза больше, чем расслабленного, то снижение жесткости активированного волокна, выраженной в абсолютных значениях, было существенно более глубоким.

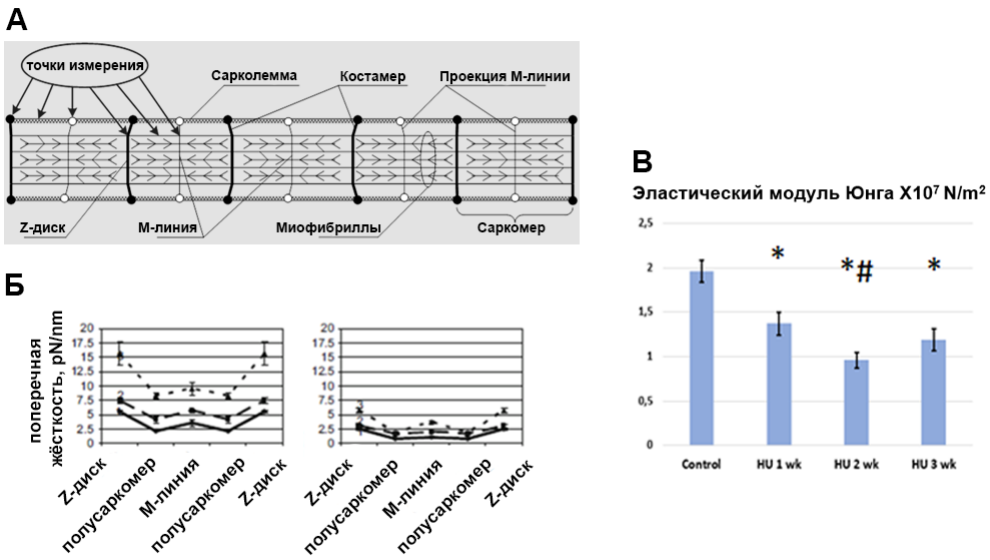



Рис. 13. Собственная жесткость мышечных волокон m. soleus при гравитационной разгрузке: А – точки измерения поперечной жесткости зон саркомера датчиками атомного силового микроскопа (по данным И.В. Огневой); Б – поперечная жесткость зон саркомера камбаловидной мышцы человека до (слева) и после (справа) 7-суточной «сухой» иммерсии; В – модуль Юнга (показатель динамической жесткости) сокращающихся волокон m. soleus крысы на различных сроках вывешивания (по данным R.Fitts)

При рассмотрении этих данных приходится учитывать ограниченные возможности метода атомной силовой микроскопии, который не позволяет оценивать сопротивление материала в продольном измерении, а также оценивать жесткость целого волокна, а тем более целой мышцы, так как глубина проникновения датчика ограничена. В условиях моделируемой гравитационной разгрузки (вывешивания) показано, что снижение модуля Юнга (интегрального показателя жесткости) уже после 7 суток разгрузки составило 30 %, а после 2 недель вывешивания значение модуля Юнга (меры жесткости) было вполовину меньше, чем у контрольных животных (рис. 13, В). Интересно, что после 3 недель его значение оставалось таким же, как и после 2 недель разгрузки.

Известные к настоящему времени данные не ставят под сомнение снижение собственной (intrinsic) продольной и поперечной, динамической и статической, пассивной и активной жесткости мышцы, ее волокон и их компонентов при моделируемой гравитационной разгрузке млекопитающих. В то же время неясными остаются молекулярные механизмы, определяющие это снижение жесткости.

На жесткость целой мышцы или пучков ее волокон влияют и компоненты межволоконного матрикса, в частности коллагеновые фибриллы. Недавно было показано,

что жесткость внеклеточного матрикса существенно больше, чем у изолированных волокон [Marcucci et al., 2020]. Вклад коллагена в пассивную жесткость целой мышцы несомненен, однако насколько деструкция или пониженный синтез коллагена в условиях разгрузки влияют на снижение жесткостных параметров в настоящее время неясно. В скелетной мышце локализованы несколько изоформ коллагена, вместе с тем наибольший вклад в механические свойства мышцы вносят коллагены I и III. При этом коллаген III характеризуется меньшей жесткостью и большей эластичностью. После 14-суточного вывешивания наблюдали интересный феномен: сдвиг соотношения экспрессии коллагена типа I (более жесткой изоформы) и коллагена типа III (более эластичной изоформы) в пользу коллагена типа III [Delp et al., 1998]. Каким образом этот феномен может влиять на жесткостные характеристики мышцы – не установлено.

Изменения количества, структуры или свойств белков саркомерного цитоскелета в условиях гравитационной разгрузки могут приводить к изменениям жесткостных параметров мышцы, наблюдаемых в эксперименте. В последние годы наибольший интерес в этом отношении вызывает гигантский белок саркомерного цитоскелета титин, вклад которого в определение пассивной жесткости мышечных волокон признается очень существенным. Несколько доменов гигантской молекулы титина в большей или меньшей степени обладают свойствами пружины и могут сжиматься и растягиваться. Снижение относительного содержания титина в условиях вывешивания задних конечностей впервые обнаружено Christine Kasper в 2000 г. Аналогичные данные получены в нашей стране, при этом показано снижение относительного содержания еще одного белка саркомерного цитоскелета, небулина, ассоциированного с тонкими миофиламентами. Есть большие основания считать, что деструкция титина и небулина в условиях моделируемой гравитационной разгрузки может внести существенный вклад в снижение пассивной жесткости мышцы.

Итак, имеющиеся в настоящее время данные позволяют связывать собственную жесткость мышцы главным образом с состоянием белков саркомерного цитоскелета. Поэтому мы рассматриваем здесь те представления о механизмах снижения жесткости инактивированной мышцы, которые основаны на знаниях о распаде этих белков. Известно, что деградация ряда цитоскелетных белков, в частности титина, осуществляется с помощью цистеиновых кальций-зависимых протеаз – кальпаинов. Активность кальпаина значительно повышается в первые дни вывешивания, что должно способствовать интенсивному распаду цитоскелетных и регуляторных белков саркомера и снижению жесткости мышцы. И действительно, применение специфического ингибитора кальпаина PD150606 позволило не

только предотвратить распад цитоскелетных белков (титина, небулина, альфа-актинина-2 и телетонина), но и снижение пассивной жесткости камбаловидной мышцы.

Активация кальпаина в мышечном волокне обусловлена повышением физиологической концентрации ионов кальция, которая действительно наблюдается в камбаловидной мышце уже на 2-е–3-и сутки вывешивания.

Активность кальпаина зависит не только от концентрации ионов кальция. Эндогенным ингибитором кальпаина является оксид азота, продукция которого находится в зависимости от сократительной активности мышечного волокна. В условиях разгрузки продукция оксида азота снижается. При этом повышение уровня оксида азота в атрофирующейся мышце с помощью введения L-аргинина позволяет предотвратить распад ряда цитоскелетных белков и несколько уменьшить выраженность атрофии мышцы. Недавно были получены данные, свидетельствующие о предотвращении распада титина в условиях гравитационной разгрузки при введении L-аргинина. Можно предположить, что снижение уровня оксида азота в условиях гравитационной разгрузки является фактором, способствующим снижению жесткости мышцы в результате кальпаин-зависимого распада белков цитоскелета.

Известно, что продукция оксида азота в мышечных волокнах в большой степени зависит от сократительной активности мышцы. Соответственно при снижении этой активности продукция оксида азота также снижается. Накопление ионов кальция и снижение концентрации оксида азота – два ведущих фактора, обусловливающих активацию кальпаина, деструкцию цитоскелетных белков и вследствие этого снижение собственной жесткости, – связаны со снижением тонической сократительной активности постуральной мышцы в результате временной инактивации «малых» тонических мотонейронов спинного мозга.

Как и было предсказано в теории, описывающей пусковую роль устранения опорного афферентного сигнала в условиях реальной и моделируемой микрогравитации, у испытуемых, подвергнутых действию сухой иммерсии и механостимуляции опорных зон стопы, наблюдали полное или частичное поддержание электрической активности и рефлекторного тонуса постуральной мышцы и ее синергистов. Что касается исследований поперечной жесткости миофибриллярного аппарата, то по данным атомной силовой микроскопии [Ogneva et al., 2011] в расслабленных волокнах после применения опорной стимуляции на фоне 7-суточной иммерсии достоверное снижение жесткости (на 30 %) обнаружено только в плоскости Z-диска. Во всех остальных зонах саркомера поперечная жесткость не отличалась статистически значимо от предиммерсионных значений. Вероятно, мышечная активность позволила сохранить почти неизмененными показатели

жесткости миофибриллярного аппарата преимущественно за счет предотвращения распада белков саркомерного цитоскелета. Последнее предположение подкрепляется данными о содержании титина и небулина в m. soleus человека, полученными с применением опорной стимуляции на фоне пребывания в условиях «сухой» иммерсии. Возможно, опорная афферентация, в естественных условиях в полной мере реализуемая только в гравитационном поле Земли, стимулируя тоническую активность мышцы поддерживает целостность ее цитоскелета и собственную жесткость, действуя, по-видимому, через NO-зависимые механизмы.

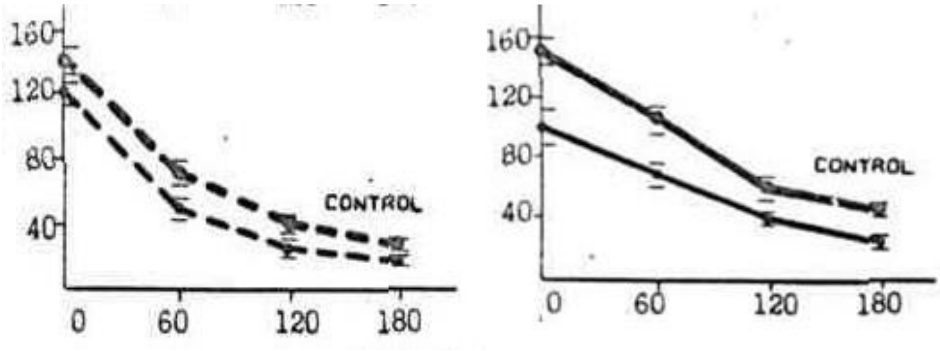
Следует отметить, что снижение жесткости (тонуса) мышцы вносит существенный вклад в изменение ее функциональных характеристик. Так, показано, что атония является одной из причин нарушения координации движений, устойчивости позы и эффективности локомоций в условиях реальной или моделируемой микрогравитации.

Стоит отметить, что снижение максимальной и субмаксимальной произвольной силы мышц (прежде всего, постуральных) наблюдается раньше и с большей выраженностью, чем уменьшение мышечной массы (атрофия). И.Б. Козловская наблюдала этот феномен еще в 80-е годы XX века (рис.14). Она связывала его с изменением характера активности медленных двигательных единиц, которое также приводит к изменению жесткости мышцы. По мнению представителей школы И.Б. Козловской, невозможность полноценного рекрутирования медленных ДЕ на фоне гравитационной разгрузки препятствует развитию силовых свойств мышцы. Однако физиологические механизмы этой взаимосвязи жесткости и силы мышц в условиях гравитационной разгрузки еще предстоит исследовать.

Вопрос о природе снижения силы мышц в условиях микрогравитации в последние годы привлек внимание ряда европейских ученых (Marco Narici и др.). Опираясь на результаты ряда экспериментов с использованием моделей сухой иммерсии и одностороннего вывешивания ноги у человека, эти авторы обращают внимание на повышшенную неспецифическую экспрессию некоторых синаптических белков (NCAM и др), которая , по их мнению, свидетельствует о нарушении нервно-мышечной передачи [Monti et al.,2021]. Действительно, в условиях вывешивания площадь концевых пластинок камбаловидной мышцы крысы достоверно уменьшается уже после 12 часов воздействия [Chibalin et al., 2018]. Как было показано в нашей работе совместно с лабораторией проф. И.И. Кривого (С.-Петербургский университет), это снижение обусловлено снижением уровня фосфорилирования АМФ-активируемой протеинкиназы ( АМПК) (см. ниже). В той же лаборатории проф. И.И. Кривого совместно с учеными Казанского медицинского

Изокинетическая сила разгибателей голеностопного сустава

7-сут. Космический полет 7-сут. Сухая иммерся




Угловая скорость движения в суставе град/с

Рис. 14. Кривые «сила-скорость», полученные при произвольной изокинетической динамометрии у членов экипажей после 7-суточного космического полета и у испытателей после 7-суточного пребывания в условиях сухой иммерсии [Grigorieva, Kozlovskaya, 1983]..

университета в постсинаптической мембране была обнаружена дезинтеграция холестериновых рафтов, ассоциированных с холинорецепторами после 12-часового вывешивания [Petrov et al., 2017]. Дальнейшие исследования с участием ученых из Ижевской медицинской академии показали, что дезинтеграция холестериновых рафтов в постсинаптической мембране при вывешивании сопровождается накоплением в рафтах сфинголипида церамида [Bryndina et al., 2018]. Известно, при ряде заболеваний (например, при диабете-2) церамиды оказывают деструктивное действие на клеточные мембраны В литературе нет данных о значительном и раннем нарушении проведения моторного сигнала к мышце в условиях гравитационной разгрузки. В условиях иммерсии наблюдали лишь некоторое снижение скорости распространения потенциала по мышце [Христова и соавт., 1986, 1988]. Поэтому пока нет оснований говорить о существенном нарушении нервно-мышечной передачи, а тем более денервации в условиях гравитационной разгрузки.

Вместе с тем, на наш взгляд, стоит обратить внимание на изменения структуры и функции саркомерного аппарата в условиях разгрузки. При уменьшении относительного количества нормально организованных актиновых филаментов (без нарушений структуры) межфиламентное расстояние должно увеличиваться, а вероятность образования поперечных мостиков снижаться. В работах группы Fitts и Riley показано, что после 14-суточного вывешивания крыс [Riley et al., 1998-2005], 17-суточной постельной гипокинезии и 17-суточного космического полета в камбаловидной мышце человека уменьшается количество актиновых филаментов и наблюдается укорочение некоторых из них. Такие изменения сопровождаются снижением максимальной силы и мощности сокращения одиночных пермеабилизированных волокон, а также их кальциевой чувствительности.

Обнаруженный феномен может иметь прямое отношение к снижению активной жесткости мышечных волокон. Причина таких изменений до сих пор не установлена. Ранее мы обнаружили снижение содержания белка тонких нитей небулина в m. soleus крыс после 7–14-суточного вывешивания [Shenkman et al., 2004; Подлубная и соавт., 2004]. Не исключено, что причиной «выпадения» актиновых филаментов может быть снижение относительного содержания небулина.

В наших недавних исследованиях было показано, что работа кальциевых механо-управляемых каналов Piezo-1 вносит свой вклад в интенсивность кальциевой стимуляции мышечного сокращения (образования поперечных мостиков). С другой стороны, нами обнаружено снижение содержание белка Piezo-1 в камбаловидной мышце после 14-суточного вывешивания задних канечностей [Sergeeva et al., 2024]. Понятно, что снижение содержания механо-управляемых кальциевых каналов может вносить сущесмтвенный вклад в снижение максимальной силы мышц в условиях гравитационной разгрузки.

**Миозиновый фенотип мышцы и его гипогравитационная перестройка**

Типы волокон скелетных мышц исследуются физиологами с 1873 г., когда Луи Антуаном Ранвье (рис. 15, А) было установлено, что в состав мышц входят волокна с различными функциональными свойствами, которые располагаются мозаичным образом (рис. 15, Б). «Медленные» волокна характеризуются высокой устойчивостью к утомлению и большей продолжительностью сокращения, но пониженной максимальной силой и скоростью сокращения. «Быстрые» волокна обладают высокой скоростью и большой силой сокращения, но быстрой утомляемостью. Впервые появляются термины «медленные и быстрые мышечные волокна». Эта работа не была «открытием типов мышечных волокон», но она выявила их базисные функциональные особенности, и таким образом поставила вопрос о функциях медленных и быстрых волокон, о фундаментальных механизмах, детерминирующих и поддерживающих медленный и быстрый «сократительный» фенотип.

Многолетние исследования энергетического метаболизма и паттерна распределения изоформ сократительных и регуляторных белков мышечных волокон показали, что медленные волокна в целом характеризуются повышенным содержанием митохондрий, высокой активностью ферментов окислительного метаболизма, преимущественным использованием жировых энергосубстратов. В то же время, быстрые волокна содержат

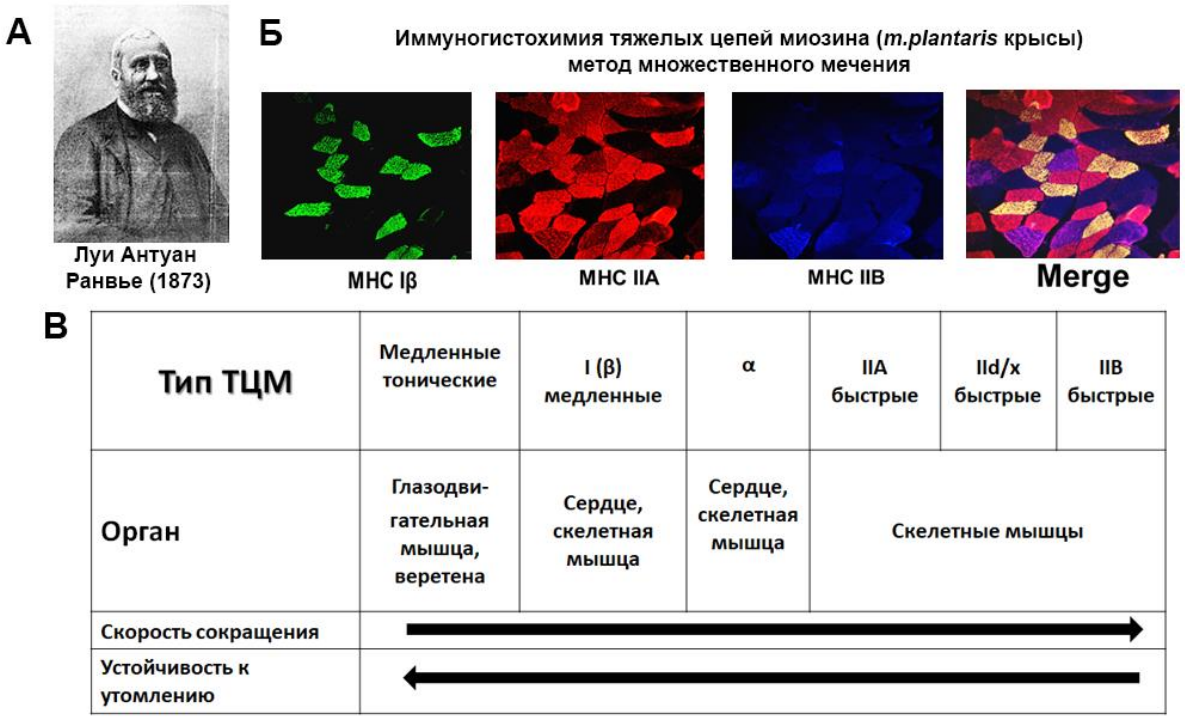


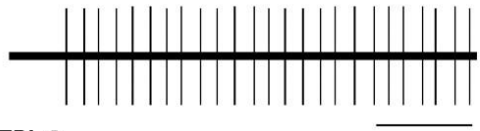
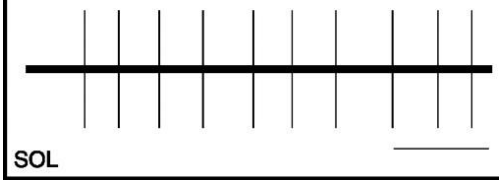

Рис. 15. Миозиновый фенотип мышечных волокон: А – Луи Антуан Ранвье, обнаруживший функциональные различия волокон «красных» и «белых» мышц позвоночных животных; Б – иммуногистохимия тяжелых цепей миозина выявляет в мышце различные типы волокон с разными доминирующими изоформами ТЦМ; В – локализация и характеристики различных изоформ ТЦМ и соответствующих мышечных волокон

меньше митохондрий, но больше гликолитических ферментов и более интенсивно используют углеводные энергосубстраты. Различается и изоферментный состав миофибриллярных, цитоскелетных (титин, обскурин и др.) и регуляторных белков (SERCA) [см. обзор Schiaffino, Reggiani, 2011]. Оказалось также, что часть быстрых волокон характеризуется более окислительным метаболическим профилем, чем другие и в этом отношении приближается к свойствам медленных волокон (быстрые окислительно-гликолитические). При анализе свойств одиночных изолированных пермеабилизированных волокон выяснилось, что медленные волокна обладают большей чувствительностью к ионам кальция и характеризуются более выраженной пассивной жесткостью [см. обзор Schiaffino, Reggiani, 2011].

В то же время выяснилось, что у медленных и быстрых двигательных единиц разные частотные характеристики импульсации. Медленные мотонейроны (низкопороговые) генерируют импульсы с частотой 10 Гц у грызунов и 15-20 Гц у человека. Быстрые мотонейроны (высокопороговые) генерируют импульсы пачками, частота импульсов в каждой пачке 60-100 Гц. Различаются и продолжительность импульса (у медленных ДЕ

она больше) и время импульсации в сутки для мышц с преобладанием медленных волокон оно существеннно больше (до 11 часов в сутки для камбаловидной мышцы) [ref. Schiaffino, Reggiani, 2011]. В таблице взятой из работы Lomo приведены основные характеристики ДЕ медленных и быстрых мышц [Lomo et al.]. (табл.1).

**Основные характеристики двигательных единиц быстрых и медленной мышц**

| Firing patterns | Median firing frequency (Hz) | Longest train duration (s) | Impulses per 24 hrs | Time on per 24 hrs |
|---|---|---|---|---|
| | 69-91 | 0.8-3.9 | 2600-11200 | 0.5-3 min |
|  | 48-83 | 59-141 | 89500-243100 | 23-72 min |
|  | 18-21 | 290-548 | 309500-495800 | 5.3-8.4 hrs |

При анализе функции медленных и быстрых двигательных единиц оказалось , что ДЕ камбаловидной мышцы крысы демонстрируют свою активность в течение 8-13 часов в сутки [Lomo et al.,2003;Hodgson et al., 2000]. При этом ДЕ медленного типа обычно рекрутируются при выполнении низко-интенсивных динамических или статических усилий, выполняемых в течение длительного периода времени.

Самым важным открытием, сделанным при сравнительном анализе характеристик медленных и быстрых мышечных волокон, было выявление различного паттерна изоформ легких и, особенно, тяжелых цепей мышечного миозина-II [Schiaffino, Reggiani, 2011].

Для взрослых млекопитающих известно четыре изоформы и соответственно четыре типа волокон: I – «медленный»; IIA – «быстрый»; IId/x – «быстрый» и самый «быстрый» – IIB, представленный только в мышцах мелких млекопитающих (рис. 10, B, таблица).

Медленная изоформа ТЦМ также экспрессируется в кардиомиоцитах желудочков сердца, определяя их высокую устоячивость к утомлению. В кардиомиоцитах предсердий доминирует другая, тоже медленная изоформа, именуемая α (альфа). Так называемая «медленная тоническая» изоформа экспрессируется в эмбриональных мышцах,

глазодвинательной мышце и в интрафузщальных волокнах мышечных веретен (рис. 15, В, таблица). Кроме того, у млекопитающих выделяют еще несколько изоформ миозина, две из которых характерны для эмбриональных мышц (эмбриональный и неонатальный), а весьма важная экстраокулярная или супербыстрая изоформа характерна для глазодвигательных мышц и мышц гортани. Гены изоформ миозина организованы в генетические кластеры, локализованные на разных хромосомах (рис.16). По генетической номенклатуре гены изоформ миозина обозначаются:

α – сердечный миозин myh6

β - сердечный миозин, он же MyHC I(β) медленная изоформа myh7

эмбриональный миозин – myh3

MyHC IIA – myh2

MyHC IIX – myh1

MyHC IIB – myh4

Экстраокулярный супер-быстрый миозин –myh13

Медленный тонический – myh7b или myh14

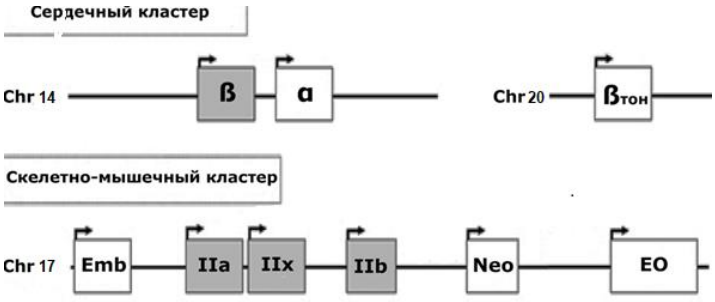



Рис.16. Кластеры миозиновых генов и их локализация на хромосомах человека.

Изоформы миозина, преобладающие в волокне, определяют его миозиновый фенотип, а соотношение волокон различного типа составляет композицию целой мышцы или ее миозиновый фенотип. Помимо волокон, в которых доминирует какой-либо определенный тип изоформ ТЦМ, в мышцах присутствуют волокна, содержащие две (или больше) разные изоформы ТЦМ. Такие волокна называют гибридными. Экспрессия каждой из изоформ миозина детерминируется иннервацией волокон. Волокна, иннервированные одним мотонейроном, составляют двигательную единицу и в подавляющем большинстве случаев характеризуются единым миозиновым фенотипом. Позно-тонические, или постуральные мышцы, имеющие высокий тонус и поддерживающие позу организма в условиях

нормального гравитационного поля, содержат наибольшее количество волокон медленного типа I. Согласно современным представлениям, мотонейрон, управляя волокнами с помощью паттерна импульсации и секреции соответствующих нейротрофических агентов, влияет на экспрессию миозиновых генов, т. е. на миозиновый фенотип волокна. Миозиновый фенотип весьма стабилен, однако существуют воздействия, способные существенно изменить экспрессию миозиновых генов и обусловить тем самым трансформацию медленных волокон в быстрые или наоборот. В большинстве случаев ведущую роль в изменении миозинового фенотипа приписывают изменению паттерна сократительной активности мышцы в результате изменения характера импульсации мотонейрона.

Хроническая активность «медленных» волокон сопровождается двумя феноменами: постоянно повышенным уровнем ионов кальция в миоплазме и сниженным уровнем макроэргических фосфатов. Поэтому поиск сигнальных механизмов, регулирующих экспрессию генов ТЦМ, сводился к выявлению путей, зависимых от концентрации ионов кальция и макроэргических фосфатов. Наиболее важным сигнальным каскадом, влияющим на экспрессию «медленных» изоформ ТЦМ (а также регулирующим экспрессию многих других генов), считают путь кальцинейрин/NFAT. Кальцинейрин – это белок, локализованный в Z-диске саркомера. При взаимодействии с комплексом кальций-кальмодулин он проявляет фосфатазную активность и дефосфорилирует NFATc1 (ядерный фактор активированных Т-клеток), который получает возможность проникновения в миоядра (рис. 17, А).

В ядре этот фактор либо накапливается в гетерохроматине (откуда постепенно переносится в эухроматин), либо непосредственно взаимодействует с MEF-2, транскрипционным фактором, специфически связывающим промотор гена медленных ТЦМ. Тем самым запускается интенсивная транскрипция гена «медленных» ТЦМ. Дефосфорилирование сигнального белка GSK-3β (киназа гликогенсинтазы) способствует экспорту NFAT из ядра и сдвигает равновесие в сторону «быстрых» изоформ (рис. 17, А).

При этом ингибирующая активность GSK-3β может супрессироваться Akt или оксидом азота (через cGMP-сигнальный путь) [Drenning et al., 2008]. Это происходит путем фосфорилирования ингибирующего сайта Ser9 молекулы GSK-3β. Такое фосфорилирование блокирует киназную активность GSK-3β в том числе и по отношению к NFATc1. Однако только фосфорилированная Akt будет блокировать активность GSK-3β.

Кроме того, оказалось, что аналогичную роль выполняет другой сигнальный фермент митоген-активируемая (МАП) киназа p38, активность которой регулируется ионами кальция и активными формами кислорода [Sharlo et al., 2020].

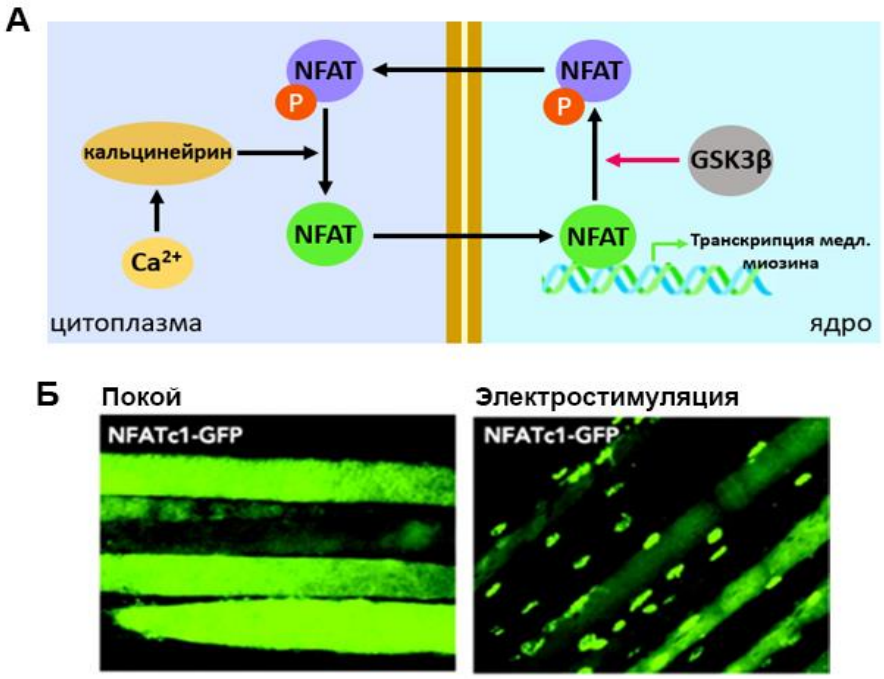



Рис. 17. Кальций-зависимый механизм транслокации NFATc1 в миоядра и инициации экспрессии медленной изоформы миозина: А – схема, показывающая дефосфорилирование NFATc1, его поступление в миоядро, запуск экспрессии медленного миозина и работу протеинкиназ, фосфорилирующих NFATc1 в ядре и способствующих его экспорту в цитоплазму; Б – эксперимент на мышечных волокнах in vitro, показывающий транслокацию меченого NFATc1 в миоядра при активации волокон электростимулятором (по Schiaffino, в модификации)

Другой механизм регуляции миозинового фенотипа, также кальций-зависимый, реализуется через киназную активность кальций-кальмодулин-киназы (CaMK). При активации комплексом кальций-кальмодулин этот фермент фосфорилирует гистондеацетилазу 4 (HDAC4). Траффик фосфорилированной HDAC4 в миоядра в этом случает затруднен, и экспрессия медленного миозина не снижается. Интересно, что и в этом случае существует «сдерживающий» механизм: попавшая в ядро вследствие недостаточной

активности СаМК HDAC4 может быть убиквитинирована и разрушена. При этом сохраняется медленный характер миозинового фенотипа.

Соотношение фосфорилированных и нефосфорилированных макроэргических фосфатов, другой физиологический триггер сигнальных процессов, регулирует активность АМР-зависимой протеинкиназы (АМПК), контролирующей основные пути энергетического метаболизма мышечного волокна. АМПК фосфорилирует гистондеацетилазы HDAC4 и 5, что существенно облегчает экспрессию «медленной» изоформы ТЦМ и ряда генов, контролирующих регуляторные белки окислительного метаболизма. При этом активность АМПК может модулироваться (стимулироваться) оксидом азота.

Существуют и более устойчивые механизмы сдерживания экспрессии гена медленного миозина. Это так называемые конститутивные ингибиторы (SOX6, Thrap и другие). Для «освобождения» гена медленного миозина необходимо предотвратить экспрессию этих ингибиторов. Эту функцию выполняет сигнальный путь, запускаемый активацией гена «медленного тонического» миозина (myh7b). Этот ген в мышцах млекопитающих практически не экспрессируется, однако из интронов его первичного транскрипта освобождается микроРНК miR499, которая препятствует экспрессии конститутивных ингибиторов гена медленного миозина myh7 [Maccarthy, Dupont-Versteegden, 2010]. В этом процессе участвуют и другие виды микроРНК miR208 и miR208b. (см. рис.18).

Интересно, что та же самая микроРНК miR499 способствует активации АМПК и последующему сдвигу энергетического метаболизма в сторону преобладания митохондриального окисления.

Долгое время господствовали представления о том, что если основной функцией быстрых ДЕ является выполнение мощных взрывных и точностных усилий, то главными функциями медленных ДЕ является поддержание позы и выполнение длительной работы, связанной с проявлением выносливости.

В 80-е и 90-е годы прошлого столетия в результате интенсивного развития инструментария и методических подходов гравитационной физиологии, в понимании роли и механизмов регуляции активности медленных ДЕ произошли существенные изменения.

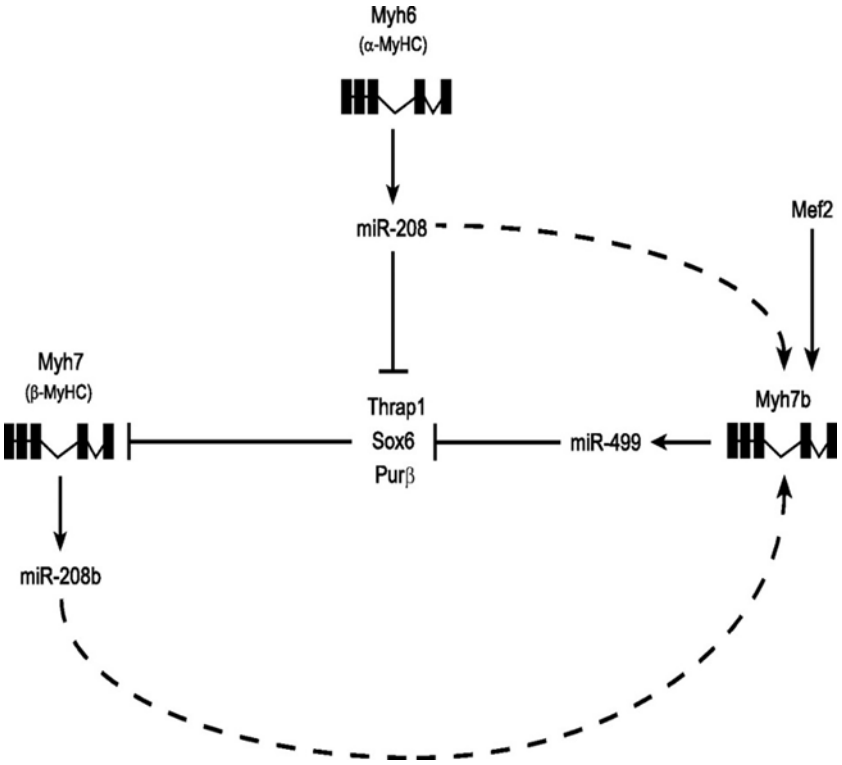



Рис. 18. Роль микро РНК в регуляции экспрессии медленного миозина. МикроРНК 208 и 208b экспрессируемые генами myh6 и myh7 активируют ген myh7b и способствуют экспрессии микроРНК miR499, которая препятствуе экспрессии конститутивных блокаторов промотора гена myh7 (по MacCarthy, Dupon-Versteegden, 2010).

Тот факт, что медленные двигательные единицы характеризуются низким порогом возбуждения, низкой частотой импульсации, но большой длительностью сократительной деятельности, позволил уже в первой половине XX века связывать функцию этих ДЕ с долговременной базальной активностью мышц – т.е. с мышечным тонусом [Sherrington]. С другой стороны, мышечный тонус является необходимым компонентом поддержания вертикальной позы. Однако до эры космических полетов эти представления никак не связывали с влиянием гравитационных сил на двигательную систему организма млекопитающего. Однако уже в начале космической эры стало ясно, что в невесомости существенно меняются мышечные синергии, обеспечивающие как позу [Thornton et al., 1977], так и локомоторную активность человека и животных [Hodgson et al., 2006]. Эти и другие факты заставили исследователей задуматься о гравитационной зависимости механизмов управления позой, механизмов изменения мышечного тонуса и, наконец, механизмов управления активностью двигательных единиц, особенно ДЕ медленного типа.

Хорошо известно видовое разнообразие миозинового фенотипа (т.е. соотношения мышечных волокон, экспрессирующих медленные и быстрые изоформы МуНС) среди млекопитающих. При этом наблюдается зависимость доли медленных волокон в мышцах

задних конечностей от видового значения массы тела животного [Queenoet al. 2023]. Одна из возможных интерпретаций этой зависимости связана с необходимостью длительного противодействия гравитации с целью поддержания вертикальной позы. Эта антигравитационная функция требует длительного низкоинтенсивного изометрического напряжения мышц, что обычно обеспечивается работой медленных двигательных единиц.

Это предположение находит свое косвенное подтверждение при рассмотрении результатов сравнительного исследования миозинового фенотипа человека и человекообразных приматов [Queeno et al., 2023]. Оказалось, что доля волокон медленного типа в мышцах задних/нижних конечностей у человека вдвое больше, чем у гориллы и шимпанзе. Авторы этого исследования считают, что причиной поддержания такого медленного (самого медленного среди высших приматов) миозинового фенотипа у человека является переход и поддержание бипедальной позы и локомоции у человека. По мнению этих авторов именно большая доля (преобладание!) медленных волокон обеспечивают удержание относительно большой массы тела в вертикальном положении, что требует постоянного мышечного напряжения, противодействующего действию гравитации.

Изменения миозинового фенотипа волокон при гравитационной разгрузке зарегистрированы во многих лабораториях [см. обзор Шенкман, 2016], в частности, обнаружено, что в m. soleus крыс при вывешивании увеличивается содержание (%) волокон типа II и уменьшается доля волокон типа I. После семидневного космического полета наблюдали сдвиг соотношения типов волокон от «медленных» к «быстрым» в m. soleus и m. extensor digitorum longus крыс. В 12,5–14-дневном полете обнаружено снижение на 20–25 % содержания волокон типа I в m. soleus и m. adductor longus. В нашей лаборатории впервые выявлено увеличение относительного содержания волокон типа II в m. soleus и m. vastus lateralis у обезьян после 12,5-суточного космического полета на биоспутнике «КОСМОС-2229».

Неоднократно при вывешивании или после космического полета наблюдали увеличение доли «гибридных» волокон, содержащих как «медленные», так и «быстрые» формы ТЦМ. Уменьшение доли волокон, экспрессирующих «медленную» изоформу ТЦМ и увеличение доли волокон, экспрессирующих «быстрые» изоформы, наблюдали и в пробах m. soleus, взятых у астронавтов и российских космонавтов (рис. 19, А) после 6-месячного полета. Сдвиг соотношения изоформ ТЦМ в «быструю» сторону обнаружен в m. vastus lateralis у астронавтов после 11-суточного полета при помощи электрофоретического анализа. По данным исследователей ИМБП уменьшение доли волокон с ТЦМ «медленного» типа в m. soleus наблюдали уже после 7-суточной экспозиции в условиях

«сухой» иммерсии. Увеличение доли «быстрых» волокон и уменьшение доли «медленных» волокон в мышце при гравитационной разгрузке обусловлено изменениями экспрессии соответствующих генов. Так при вывешивании крыс наблюдается неуклонное снижение содержания мРНК медленной изоформы ТЦМ (рис. 19, Г).

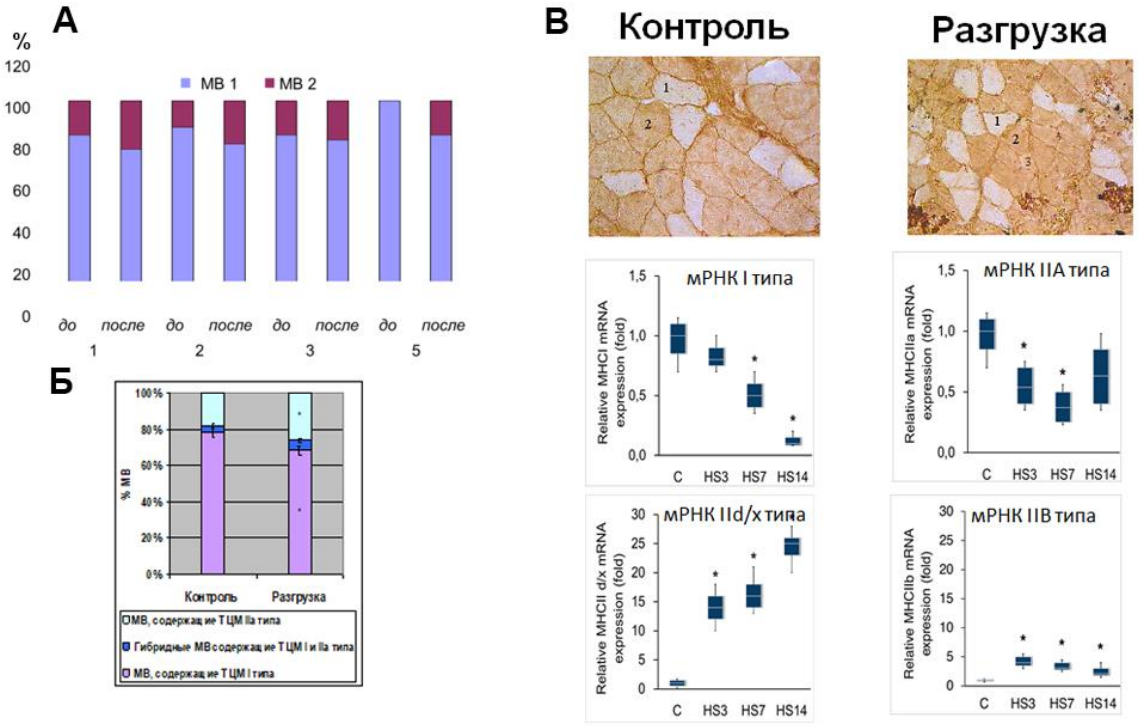



Рис. 19. Трансформация части медленных волокон в быстрые в условиях гравитационной разгрузки: А – снижение доли медленных волокон и возрастание доли быстрых в m. soleus у 4 российских космонавтов после 6-месячного полета на МКС; Б – изменение соотношения волокон в сторону волокон быстрого типа в m. soleus в условиях 14-суточного вывешивания задних конечностей крысы; В – иммуногистохимическая окраска поперечных срезов m. soleus с помощью антител против ТЦМ медленного типа. Бурая окраска – медленные волокна. Светлые волокна – быстрые. Слева – контроль, справа – 14-суточное вывешивание задних конечностей; Г – экспрессия мРНК медленных и быстрых изоформ ТЦМ в m. soleus крысы после 3, 7 и 14 суток вывешивания задних конечностей

Применение механической стимуляции опорных зон стопы на фоне экспозиции в условиях «сухой» иммерсии позволило избежать снижения доли «медленных» волокон [Sharlo et al., 2021]. При вывешивании крыс, у которых подошва одной из задних ног взаимодействовала с искусственной опорой, в m. soleus этой ноги, в отличие от контралатеральной конечности, не наблюдалась трансформация миозинового фенотипа в быструю сторону [Nemirovskaya, Shenkman, 2002]. Низкочастотная хроническая

электростимуляция m. soleus крысы на фоне традиционной модели вывешивания также позволяет предотвратить трансформацию миозинового фенотипа [Falempin, Mounier., 1998; Dupont et al., 2011]. Такие же эффекты наблюдали и при хроническом растяжении мышцы или при использовании резистивных упражнений на фоне гравитационной разгрузки (вывешивание или 84-суточная гипокинезия) [Falempin, Mounier, 1998; Подлубная и др.,2004; Gallagher et al., 2005]. Результаты этих работ свидетельствуют о том, что длительная низкоинтенсивная мышечная активность и резистивные воздействия предотвращают изменение миозинового фенотипа. На основе приведенных наблюдений можно считать весьма вероятным, что именно «отключение» медленных двигательных единиц приводит к изменению миозинового фенотипа во всех перечисленных случаях. Изменениям миозинового фенотипа при гравитационной разгрузке предшествует изменение паттерна экспрессии мРНК, кодирующих соответствующие изоформы ТЦМ, поэтому поиск молекулярных механизмов трансформации миозинового фенотипа в большой степени сводится к изучению механизмов регуляции экспрессии миозиновых генов.

Что касается роли сигнального пути кальцинейрин/NFATc1, то снижение количества NFATc1 в миоядрах наблюдается уже в первые сутки вывешивания [Sharlo et al., 2019]. Как было упомянуто выше, при гравитационной разгрузке содержание оксида азота в m. soleus крысы значительно снижено [Lomonosova et al., 2011]. При этом введение L-аргинина, повышающего продукцию оксида азота, предотвращало снижение содержания мРНК ТЦМ Iβ [Lomonosova et al, 2011; Sharlo et al., 2020]. По-видимому, снижение содержания оксида азота в волокне в условиях разгрузки можно рассматривать как один из факторов стабилизации быстрого фенотипа, который действует через GSK-3β [Sharlo et al., 2018].

Как мы помним, ингибирующее фосфорилирование GSK3β может осуществляться Akt. Это фосфорилирование при разгрузке, как правило, снижено. Сотрудниками Ижевской медицинской академии обнаружено, что одной из причин снижения уровня фосфорилирования Akt является накопление сфинголипида церамида в сарколемме мышечных волокон [Bryndina, 2024]. Это приводит к активации GSK-3β, вытеснению NFATc1 из миоядер и снижению экспрессии гена медленного миозина. Описанная гипотеза подтверждается экспериментальными данными, свидетельствующими о том, что фармакологическое ингибирование синтеза церамида способствует сохранению содержания NFATc1 в миоядрах и поддержанию экспрессии гена myh7.

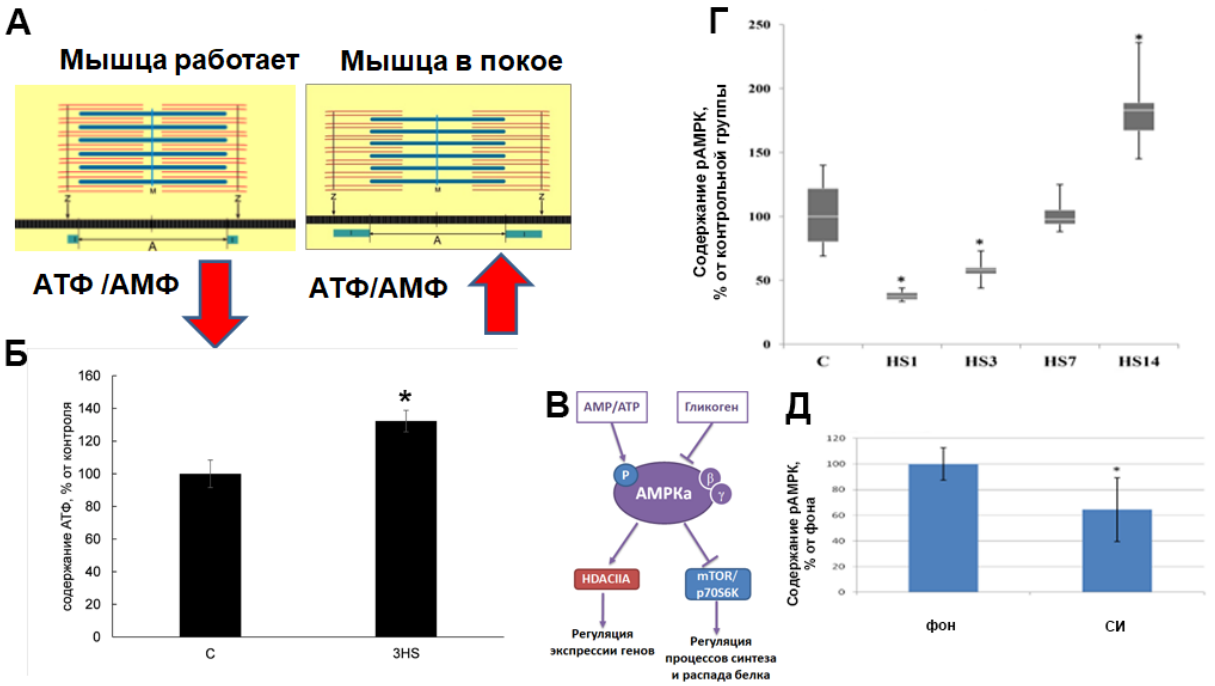



Рис. 20. Накопление АТФ в m. soleus в первые дни разгрузки вследствие снижения ее расходования миофибриллами (А, Б); В – схема, показывающая механизмы регуляции активности АМФ-активируемой протеинкиназ (AMPK) в первые дни разгрузки и некоторые важнейшие AMPK-зависимые сигнальные пути; Г – уровень фосфорилирования AMPK в m. soleus на различных сроках (1, 3, 7 и 14 суток) вывешивания задних конечностей крысы; Д – снижение уровня фосфорилирования AMPK в m. soleus человека после 3 суток «сухой» иммерсии

О роли соотношения макроэргических фосфатов в контроле миозинового фенотипа в условиях разгрузки можно судить лишь в том случае, если на том или ином этапе процесса наблюдается значимое изменение этого соотношения. Совсем недавно нами обнаружено достоверное накопление АТФ в волокнах камбаловидной мышцы крысы уже в первые трое суток вывешивания [Zaripova et al., 2021]. Этот результат легко объясняется снижением расходования АТФ при почти полном прекращении сократительной активности мышцы в 1-е сутки гравитационной разгрузки (рис. 20, А, Б). Правда, затем концентрация АТФ снижается и к 14-м суткам воздействия оказывается ниже уровня виварного контроля [Gupta et al., 1987]. Эту интересную динамику можно связать со спонтанной нервно-мышечной активностью мышцы, наблюдаемой после 2–3 суток разгрузки. В молекулярной физиологии известен остроумный метод модуляции соотношения макроэргических фосфатов. Он основан на применении β-гуанидинпропионовой кислоты (βGPA), которая, будучи конкурентным ингибитором креатинфосфокиназы, способствует уменьшению

интенсивности образования АТФ из АМФ и АДФ, примерно так, как это происходит при интенсивной физической нагрузке. Оказалось, что снижение уровня фосфорилированных макроэргических фосфатов при введении β-гуанидинпропионовой кислоты предотвращает трансформацию миозинового фенотипа в быструю сторону у вывешенных животных. Результаты этих экспериментов свидетельствуют о том, что в условиях гравитационной разгрузки на фоне повышения уровня АТФ происходит снижение фосфорилирования и активности АМПК. Это снижение действительно зарегистрировано в первые сутки вывешивания задних конечностей крысы. Пониженная активность АМПК приводит к снижению уровня фосфорилирования гистондеацетилазы 4 (HDAC4), облегчая ее импорт в миоядра. В ядрах этот фермент деацетилирует некоторые транскрипционные факторы и гистоны, снижая тем самым уровень экспрессии мРНК медленного миозина (рис.21)

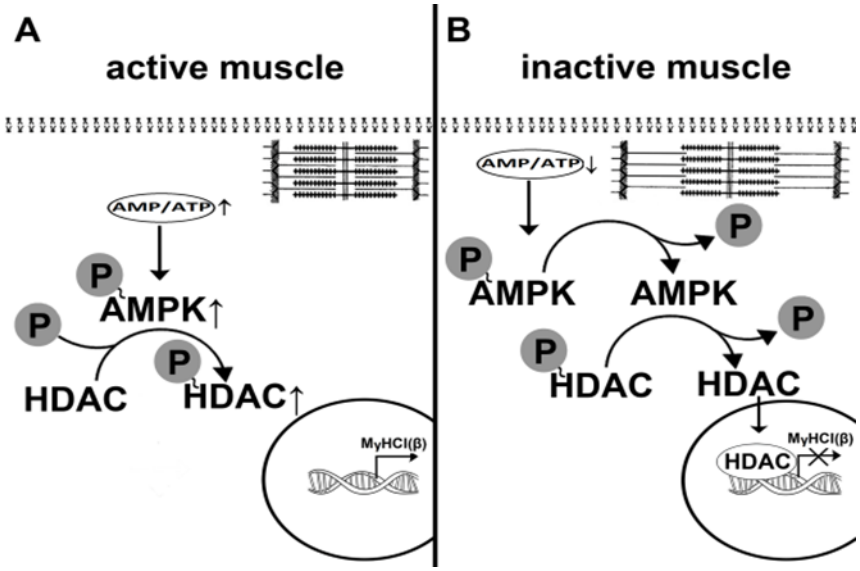



Рис. 21. Роль АМПК и гистондеацетилаз в регуляции экспрессии медленного миозина в активной и «отключенной» мышце. В активной мышце при интенсивном расходовании АТФ, накопленная АМФ способствует фосфорилированию и активации АМПК, а АМПК фосфорилирует гистондеацетилазу, не позволяя ей войти в миоядро. При этом свободно осуществляется экспрессия медленного миозина. В инактивированной мышце при избытке АТФ происходит дефосфорилирование и соответственно инактивация АМПК, которая приводит к дефосфорилированию гистондеацетилаз и их импорту в миоядро. В результате деацетилируются транскрипционные факторы и гистоны, а экспрессия медленного миозина существенно замедляется [по Vilchinskaya et al., 2017].

Итак, мы видим, что при гравитационной разгрузке действуют несколько механизмов, препятствующих экспрессии медленного миозина. Обращает на себя внимание то, что эти

механизмы запускаются изменениями концентрации сигнальных молекул, которые являются непосредственными следствиями снижения или прекращения сократительной активности постуральной мышцы.

Судя по результатам эксперимента с опорной стимуляцией крысы, в камбаловидной мышце на фоне вывешивания в мышце стимулируемой конечности увеличивается экспрессия микроРНК miR499 и снижается экспрессия промоторного ингибитора SOX6 [Sharlo et al., 2022]. Очевидно, что механизм, связанный с активацией myh7b и miR499 также зависит от опорной афферентации и тонической активности мышцы.

Не так много известно о том, какие механизмы стимулируют работу промоторов генов «быстрых» изоформ ТЦМ. Предполагают, что в отсутствие стимуляторов «медленной» изоформы ТЦМ связывание ДНК с транскрипционным регулятором MyoD усиливает экспрессию генов «быстрого» миозина. При этом у вывешенных животных с нокаутом MyoD не происходит трансформации в быструю сторону. Этот факт позволяет предположить, что MyoD существенно влияет на экспрессию генов быстрых изоформ ТЦМ при гравитационной разгрузке [Ekmark et al., 2007]. Важно отметить, что стимулирующее действие MyoD на экспрессию «быстрых» изоформ миозина ингибируется NFATc1 [Ehlers et al., 2014].

Недавно было показано, что экспрессию быстрых изоформ ТЦМ регулирует суперинхансерный сайт, расположенный в пределах «скелетно-мышечного» генного кластера, рядом с геном эмбрионального миозина [Dos Santos et al., 2022]. Механизмы его работы, и особенно, зависимость от сократительной активности волокна, остаются предметом будущих исследований.

Мы показали, что в результате блокирования экспрессии медленной изоформы ТЦМ и стимулирования экспрессии быстрых изоформ в ходе гравитационной разгрузки происходит трансформация части медленных волокон в быстрые, что, как правило, приводит к снижению устойчивости мышц к утомлению и, следовательно, их работоспособности.

## Гипогравитационная дисфункция митохондрий и ее механизмы

Широко известно, что основная роль в энергетическом обмене клетки принадлежит митохондриям. В гравитационной физиологии исследования митохондрий также занимают важное место. Интерес к митохондриям возникает тогда, когда мы обращаемся к весьма заметным изменениям энергетических процессов на организменном уровне, наблюдаемым в условиях космического полета. Уже в первых исследованиях американских астронавтов

на станции SKYLAB было зарегистрировано примерно 30 % снижение базального потребления кислорода организмом. Эти данные, несомненно, указывают на снижение сократительной активности одних мышц и части ДЕ других мышц, «отключенных» в условиях гравитационной разгрузки. Вместе с тем эти же данные свидетельствуют о снижении активности митохондриального аппарата. В условиях разгрузки меняется не только потребление кислорода, но и расходование энергосубстратов и макроэргических фосфатов. Так известно, что в первые трое суток вывешивания задних конечностей крыс происходит накопление гликогена и АТФ в миоплазме мышечных волокон камбаловидной мышцы [Henriksen, Tischler, 1988; Zaripova et al, 2021]. При более продолжительном воздействии эти изменения нивелируются, и к 7-м суткам воздействия концентрация АТФ уже не отличается от таковой у контрольных животных [Gupta et al., 1989]. Очевидно, устанавливается какой-то баланс между потреблением АТФ и ее образованием в митохондриях. Этот баланс можно связать с существованием спонтанной мышечной активности (см. выше). В то же время, к 14-м суткам разгрузки, содержание АТФ в мышце достоверно снижается относительно контроля на фоне увеличивающейся спонтанной активности [Gupta et al., 1989]. Это может свидетельствовать о том, что митохондрии не справляются с возросшим энергозапросом сократительного аппарата. Для того чтобы понять, как нарушается работа митохондрий в условиях гравитационной разгрузки, необходимо познакомиться с особенностями организации митохондрий в скелетной мышце. В мышечном волокне существует 2 популяции митохондрий. Одна находится в основном в субсарколеммальной зоне, другая популяция – интерфибриллярная.

Субсарколеммальные митохондрии по форме и по биохимическим параметрам похожи на митохондрии других тканей. В их составе высокая концентрация компонентов цикла трикарбоновых кислот и электронно-транспортной цепи, однако содержание АТФ-синтазы существенно ниже, чем в митохондриях, располагающихся между миофибриллами. В 70-е годы прошлого века Лора Евгеньевна Бакеева, сотрудница МГУ, под руководством профессоров В.П. Скулачева и Ю.С. Ченцова обнаружила, что интерфибриллярные митохондрии образуют единую митохондриальную сеть, которая расположена по обе стороны Z-диска и образует «бабочку» [Бакаеева и др., 1975; Bakeeva et al.,] (рис. 22, А). Эти «бабочки» соединены друг с другом продольными извилистыми митохондриальными трубками, которые на срезах любой ориентации выглядят как отдельные бобовидные митохондрии. Функция такой митохондриальной сети (ретикулума) – передача химической энергии в виде митохондриального мембранного ψ-потенциала, необходимого для синтеза АТФ. Например, жирная кислота окисляется в одном месте клетки, а АТФ синтезируется в другом – там, где в этом есть необходимость [Skulachev,

1975]. Такой митохондриальный ретикулум является динамической структурой. Его рост (митохондриальный биогенез) обеспечивается слиянием отдельных митохондриальных структур (fusion). В случае, если по той или иной причине мембранный ψ-потенциал не может распространиться на какую-либо часть ретикулума, активируются специальные ферменты, осуществляющие отщепление этой части (fission).

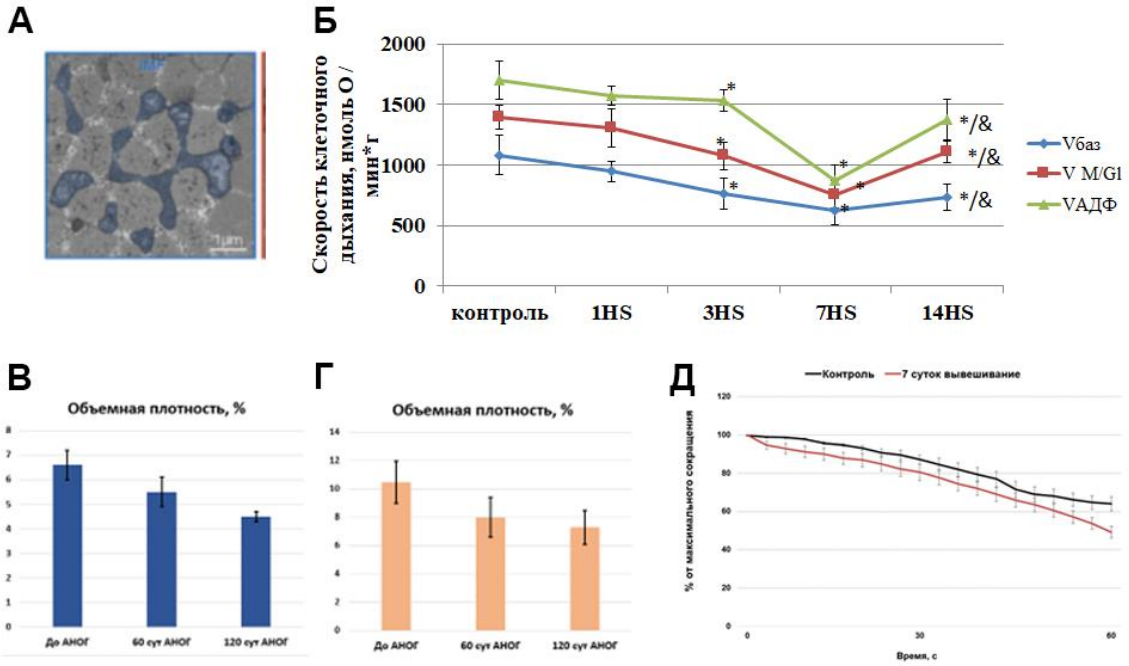



Рис. 22. Митохондриальный ретикулум и дисфункция митохондрий при моделируемой гравитационной разгрузке: А – электронная микрофотография мышечных митохондрий человека (по S. Powers, 2012). Видны мембранные соединения между профилями митохондрий; Б – скорость дыхания митохондрий в мышечных волокнах при различных условиях (базальное дыхание – зеленая кривая; дыхание при добавлении маллат-глутаматного субстрата – красная кривая; дыхание при добавлении АДФ – зеленая кривая) в m. soleus крысы при различной продолжительности вывешивания задних конечностей (1, 3, 7 и 14 суток); В, Г – объемная плотность субсарколеммальных (слева) и интермиофибриллярных (справа) митохондрий в m. soleus человека после 60 и 120 суток постельной антиортостатической гипокинезии; Д – кривая утомления при тетанических сокращениях m. soleus крысы в контроле и после 7 суток вывешивания задних конечностей (синяя кривая – контроль, красная кривая – вывешивание)

Затем отпавшие фрагменты ретикулума поглощаются специальными мембранными структурами – аутофагосомами и претерпевают направленную деструкцию – митофагию [см. обзор Glancy, Balaban, 2021]. В нормальном работающем мышечном волокне

поддерживается баланс между процессами слияния и расщепления митохондриального ретикулума. При повышенной физической нагрузке интенсифицируются оба процесса. При этом скорость биогенеза митохондрий выше, чем скорость процессов митофагии.

Уже в первые дни пребывания в условиях гравитационной разгрузки наблюдается снижение экспрессии мРНК сигнальных белков-регуляторов, контролирующих процессы биогенеза митохондрий, прежде всего, важнейшего транскрипционного кофактора – PGC1α, что приводит к снижению содержания митохондриальной ДНК и белка. На ультраструктурном уровне уже на более поздних этапах разгрузки снижается объемная плотность митохондриального ретикулума [Desplanches et al., 1990; Шенкман и соавт., 2003](рис. 22, В).

Каковы же механизмы развития дисфункции митохондрий при гравитационной разгрузке, каковы механизмы снижения экспрессии мРНК центрального регулятора биогенеза митохондрий PGC1α? К сожалению, совершенно определенно сказать об этом в настоящее время невозможно. Существует несколько гипотез. Во-первых, известно, что одним из регуляторов экспрессии гена *pgc1* является АМФ-активируемая протеинкиназа (АМПК), которая снижает свою активность уже в первые сутки вывешивания на фоне накопления АТФ в мышечном волокне. Именно это снижение активности приводит к дефосфорилированию гистондеацетилаз HDAC4/5 и их транспорту в мышечные ядра. В ядерном пространстве (как предполагает эта гипотеза) эти ферменты, деацетилируя гистоны, локализованные на промоторе гена PGC1α, полностью или частично блокируют его транскрипцию. Согласно второй гипотезе, неизвестные нам молекулярные механизмы, зависящие от тонической активности волокна, при снижении такой активности в условиях разгрузки метилируют ДНК промотора данного гена, также блокируя его экспрессию. Показано, что применение механостимуляции стопы вывешенной крысы значительно снижало уровень метилирования ДНК промотора гена PGC1α[Standley et al., 2020; Sharlo et al, 2022,2023].. Третья гипотеза предполагает, что снижение содержания NO уже в первые сутки разгрузки способствует активации GSK3β, центрального негативного регулятора сигнальных процессов, которая уменьшает сродство специфического транскрипционного фактора к гену PGC1α и тем самым снижает его экспрессию. Эти гипотезы не противоречат друг другу, а описанные механизмы могут работать или одновременно, или последовательно, взаимодействуя друг с другом.

На раннем этапе гравитационной разгрузки снижается максимальное дыхание митохондрий и активность ряда митохондриальных ферментов [Mirzoev et al., 2011; Motanova et al., 2023] (рис. 22, Б). В то же время, повышается концентрация свободных

радикалов – активных форм кислорода (АФК) митохондриального происхождения [Powers et al., 2012, Sidorenko et al., 2024].

В 2012 г. Скотт Пауэрс [Powers, 2012] предложил «кальциевую» гипотезу для объяснения механизма дисфункции митохондрий мышц при снижении их сократительной активности. Согласно этой гипотезе постепенное накопление ионов кальция в миоплазме мышечных волокон при разгрузке приводит к соответственному накоплению ионов кальция в митохондриях, которые избыточно стимулируя окислительное фосфорилирование способствуют накоплению АФК, что отрицательно сказывается на электрических свойствах митохондриальной мембраны и соответственно на синтезе АТФ. Не исключено, что эти процессы обусловлены не только избыточным поступлением ионов кальция в митохондрии, но и действием внемитохондриальных АФК.

Некоторые авторы полагают, что накопление АФК в результате дисфункции митохондрий, а также сниженная экспрессия PGC1α являются основными факторами, способствующими развитию атрофических процессов в мышечном волокне [Romanello, Sandri, 2021]. Однако в ряде экспериментов с антиоксидантами не удалось добиться сколько-нибудь значимого уровня атрофии при вывешивании [Cannavino et al., 2014]. Применение специфического антиоксиданта, препятствующего образованию митохондриальных АФК в нашей лаборатории позволило только частично уменьшить потерю мышечной массы m. soleus крысы после 7-суточного вывешивания задних конечностей [Sidorenko et al., 2024].

В то же время, снижение биогенеза митохондрий и их функциональных возможностей при разгрузке приводят к изменениям экспрессии физиологически-активных пептидов митохондриального происхождения. Так, в нашей лаборатории совсем недавно в условиях вывешивания в камбаловидной мышце было обнаружено снижение экспрессии MOTS-C, одного из самых активных членов этого семейства. При этом, введение MOTS-C вывешенным животным позволило почти полностью предотвратить потерю мышечной массы.

Понятно, что дисфункция митохондрий сопровождается снижением устойчивости мышц к утомлению и повышению физиологической «стоимости» выполнения стандартной нагрузки (рис. 22, Д). Например, после 60-суточной постельной гипокинезии стандартное упражнение на мышцы-разгибатели коленного сустава у человека выполняется при большей концентрации лактата в крови, т. е. в большей степени за счет гликолитической, а не аэробной энергопродукции [Шенкман и др., 2002]. Следует отметить, что в начальном периоде разгрузки (примерно, до 7 суток вывешивания задних конечностей крысы), повышение утомляемости камбаловидной мышцы удалось предотвратить с помощью

опорной механостимуляции стопы животного. При этом не наблюдалось снижения экспрессии белков, регулирующих биогенез митохондрий и снижения содержания митохондриальной ДНК. Поскольку известно, что опорная механостимуляция стопы повышает тоническую активность мышцы, то можно утверждать, что состояние митохондриального аппарата, как и утомляемость мышцы, находятся в прямой зависимости от этой активности.

Итак, в условиях гравитационной разгрузки наблюдается снижение биогенеза и дисфункция митохондрий, а также повышается утомляемость постуральной мышцы. В научном сообществе активно обсуждается вопрос о значении этих процессов для развития других функционально значимых последствий разгрузки в скелетных мышцах.

## Общая характеристика гипогравитационной атрофии мышц

Одним из наиболее значимых последствий гравитационной разгрузки, как реальной так и моделируемой, является мышечная атрофия, традиционно называемая «атрофия от бездействия». И.Б. Козловская в своих лекциях предпочитала называть этот феномен гипогравитационной атрофией. В гравитационной физиологии, как и в целом в экологической физиологии, атрофией мышц принято называть уменьшение мышечной массы, снижение содержания белка. Атрофию мышц при гравитационной разгрузке обычно регистрируют при измерении массы мышц и/или размеров (площади поперечного сечения) мышечных волокон. Часто используют данные по объему отдельных мышечных головок и их групп, полученные с помощью ультразвуковой или магнитно-резонансной томографии мышц. Гипогравитационная атрофия мышц наблюдается после пребывания в условиях космического полета, после постельной гипокинезии и иммерсии у человека и вывешивании задних конечностей у животных. Гипогравитационная атрофия в наибольшей степени выражена в постуральных мышцах с преобладанием волокон медленного типа по сравнению с быстрыми локомоторными мышцами и мышцами верхних/передних конечностей. Как правило, в большей степени атрофируются медленные волокна и быстрые окислительно-гликолитические волокна IIA типа (рис. 23, А, Б).

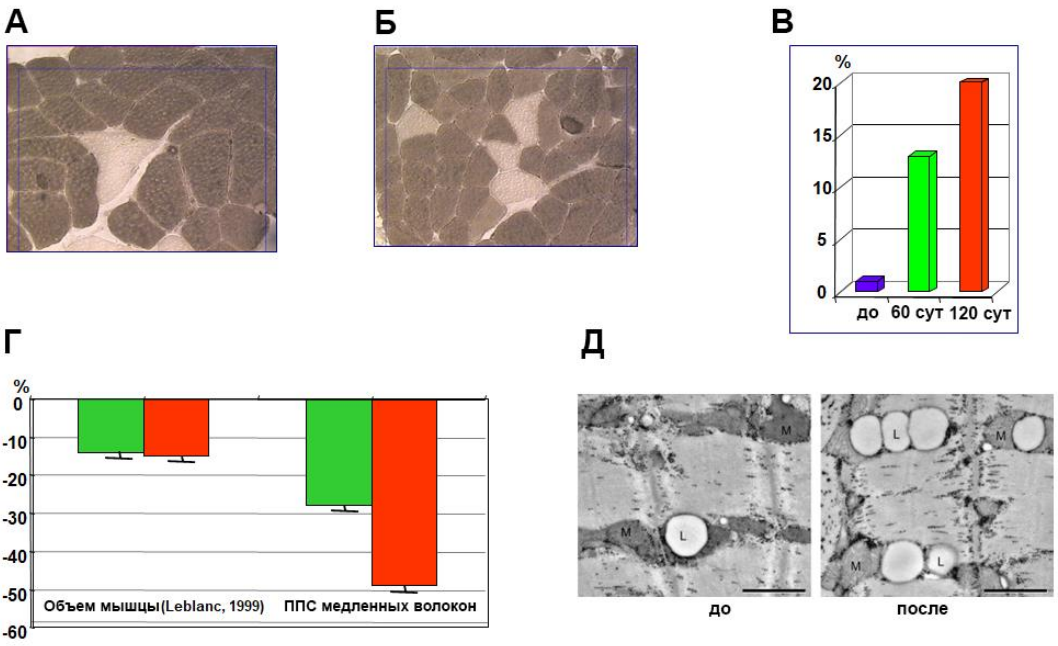



Рис. 23. Атрофия камбаловидной мышцы, фиброз и миостеатоз (жировая инфильтрация у человека при антиортостатической гипокинезии и иммерсии): А – поперечный срез m. soleus человека. До воздействия. АТФаза миозина. Темноокрашенные – медленные волокна; Б – то же после 60 суток гипокинезии; В – доля неволоконного компонента m. soleus (гистоморфометрия) после 60 и 120 суток гипокинезии; Г – изменения объема мышцы (по данным магнитно-резонансной томографии) и площади поперечного сечения волокон «медленного» типа после 60 (зеленые столбики) и 120 (красные столбики) суток антиортостатической гипокинезии; Д – миостеатоз у человека. Электронные микрофотографии m. soleus человека до и после 21-суточной «сухой» иммерсии. Видны жировые включения. (Электронная микроскопия В.В. Рогачевского)

Атрофия мышечных волокон сопровождается разрастанием соединительной и жировой тканей, которые частично замещают потерю сократительного компонента мышцы (рис. 23, В, Д). При этом уменьшение размеров мышечных волокон, прогрессивно углубляющееся при увеличении продолжительности гипокинетического воздействия, всегда оказывается более выражено, чем изменение объема целой мышцы (измеренное методами ультразвуковой или магнитно-резонансной томографии) (рис. 23, Г). В настоящее время можно считать доказанным, что потеря мышечной массы постуральной камбаловидной мышцы обусловлена изменением (снижением!) тонической активности, вызванной снижением импульсной активности медленных мотонейронов. В то же время существуют разные точки зрения на то, какие механические характеристики тонической сократительной активности достаточны для того, чтобы мышца избежала атрофических

изменений. В 90-е годы прошлого столетия Морис Фалемпан и Ивонн Мунье выступили с утверждением, что камбаловидная, основная постуральная мышца, может избежать атрофии в условиях безопорности, если навязанная ей активность носит резистивный характер, т. е. сопровождается значительным механическим напряжением, связанным с наличием существенной нагрузки. Такая нагрузка моделировалась путем пассивного растяжения мышцы вывешенного животного [Falempin, Mounier, 1998]. При использовании пассивного растяжения чаще всего удается предотвратить снижение мышечной массы и силы у вывешенной крысы. При этом не удалось предотвратить развитие атрофических изменений в камбаловидной мышце вывешенной крысы с помощью хронической непрерывной низкочастотной электростимуляции. Результаты этих экспериментов и легли в основу представлений Мориса Фалемпана и Ивонн Мунье о необходимости резистивных воздействий для поддержания мышечной массы. Этот вывод противоречил данным, полученным в лаборатории профессора И.Б. Козловской. Оказалось, что если к испытуемому-добровольцу, находящемуся в условиях «сухой» иммерсии в течение недели, ежедневно применять опорную механостимуляцию стопы (без всяких резистивных мышечных нагрузок), то степень атрофии камбаловидной мышцы будет достоверно ниже [Григорьев и соавт. 2004]. Аналогичные результаты были получены и в экспериментах с вывешенными крысами [Шенкман и др. 2020]. Мало того, преодоления атрофических изменений удалось достичь и в экспериментах с хронической низкочастотной электростимуляцией разгруженной камбаловидной мышцы крысы, применяемой не в непрерывном, а в повторном режиме (с перерывами) [Yeung et al., 2010]. В связи с этим можно считать, что, по крайней мере, при пребывании в условиях гравитационной разгрузки в течение непродолжительного времени, поддержания мышечной массы можно добиться и без использования резистивного режима мышечной активности.

Нами было высказано предположение о том, что в начальный период разгрузки, когда еще не разрушена значительная часть цитоскелетных белков (в частности, в течение целой недели вывешивания не найдено признаков распада титина [Вихлянцев и соавт. 2004], эти белки составляют «внутреннее» сопротивление мышечному сокращению, оказывая влияние на механо-сенсорные сигнальные структуры. Возможно, после длительного пребывания в условиях гравитационной разгрузки, когда упруго-эластические белки будут подвергнуты существенной деструкции, поддержание необходимого уровня белкового синтеза можно будет поддерживать только с помощью резистивных нагрузок (или высокго сопротивления субстрата при беге).

Из сказанного следует то, что для понимания процессов механо-зависимой регуляции белкового синтеза нужны глубокие экспериментальные исследования механо-сенсорных структур и сигнальных путей [Мирзоев, Шенкман, 2023].

Во многом дискуссионным остается вопрос о том, какие внутримышечные, функционально-зависимые процессы лежат в основе мышечной атрофии. В последние годы большинство исследователей сходятся на том, что потеря мышечной массы при инактивации мышц связана с глубоким нарушением баланса между процессами синтеза и распада белка в мышечных волокнах. При этом интенсивность синтетических процессов снижается, а интенсивность процессов белкового распада увеличивается.

Вместе с тем группа исследователей (Майкл Ренни, Стюарт Филлипс и др.) настаивает на том, что характер атрофии от бездействия в мышцах человека принципиально отличается от аналогичных процессов у лабораторных животных. Они считают, что у человека разгрузка приводит к мышечной атрофии вследствие снижения интенсивности синтеза белка. Увеличение интенсивности протеолиза в ходе атрофии у человека незначительно [Phillips et al., 2014]. Эти утверждения базируются на данных, полученных в экспериментах с постельной гипокинезией при участии добровольцев, у которых пробы мышечной ткани забирали из латеральной головки четырехглавой мышцы бедра, доли быстрых и медленных волокон в которой в среднем примерно одинаковы.

Биоптаты медленной камбаловидной мышцы изучаются в этих экспериментах крайне редко. В экспериментах на вывешенных грызунах, напротив, чаще всего анализируют ответы камбаловидной мышцы. В дискуссии на страницах научных журналов в 2014 г. другая группа ученых (Sue Bodine и др.) выступила с противоположной точкой зрения. По их мнению, различия в соотношении синтеза и распада белка носят не межвидовой, а межмышечный характер. В медленной m. soleus атрофия происходит как за счет снижения синтеза белка, так и за счет интенсификации его распада. Атрофия быстрых мышц идет преимущественно за счет торможения синтеза белка. В последнее время эта точка зрения получила подтверждение в экспериментах с участием добровольцев в ИМБП, в которых биопсию брали как из камбаловидной мышцы, так и из латеральной головки четырехглавой мышцы бедра. Если в пробах камбаловидной мышцы после 21-дневной (короткой!!) постельной гипокинезии экспрессия наиболее важных протеолитических ферментов Е3-убиквитин лигаз достоверно повышалась примерно в той же степени, как в экспериментах с вывешиванием крыс, то в локомоторной мышце-разгибателе в коленном суставе этот эффект был гораздо менее выражен. Как видим, в постуральной медленной мышце, как у человека, так и у лабораторных грызунов, атрофические процессы сопровождаются как активацией протеолитических систем, так и подавлением процессов синтеза белка Мы в

этом убедимся в полной мере при рассмотрении молекулярных механизмов атрофии. В локомоторной мышце со значительной долей волокон быстрого типа роль протеолиза в атрофических процессах гораздо меньше [Belova et al., 2023].

Хорошо известно, что при использовании в качестве модели гравитационной разгрузки «сухой» иммерсии, атрофические процессы идут намного быстрее [Shenkman, Kozlovskaya, 2019], чем в условиях постельной гипокинезии. В этом смысле 21 день гипокинезии можно считать ранним этапом развития процесса, 21 день сухой иммерсии – уже длительным воздействием.

В ИМБП при содействии специалистов Волынской больницы Медицинского центра Управления делами президента РФ был проведен уникальный эксперимент с 21-дневным пребыванием добровольцев в условиях «сухой» иммерсии. Биоптаты камбаловидной мышцы были взяты у 8 испытателей. У участников исследования было выявлено снижение размеров медленных волокон на 20%. При этом полногеномный анализ последовательностей РНК (RNA seq) и исследования методом полимеразной цепной реакции показали отсутствие изменений экспрессии ключевых ферментов протеолиза Е3-убиквитин лигаз MuRF-1 и Mafbx/atrogin-1 в камбаловидной мышце по сравнению с пред-иммерсионным уровнем [Bokov et al., 2024]. Эти результаты подтверждают представление о том, что в камбаловидной мышце как человека, так и других млекопитающих, увеличение интенсивности протеолиза характерно преимущественно для более ранних этапов атрофического процесса.

Важно отметить, что уже в первые 3 суток после вывешивания задних конечностей животного существенно снижается уровень белкового синтеза в медленной камбаловидной мышце. Снижение белкового синтеза в «быстрых» мышцах обнаруживают немного позднее.

Принято считать, что основными системными регуляторами синтеза белка в физиологических условиях являются гипофизарный пептидный гормон роста (соматотропный гормон – СТГ или GH) и инсулиноподобный фактор роста-1 (IGF-1). Показано, что как у животных, так и у человека содержание GH в крови в условиях невесомости снижается [McCall et al., 1999; Bigbee et al.,2006]. Особенно это касается его биологически активной формы. Известно, что при физических нагрузках секреция гормона роста увеличивается, и это увеличение обусловлено работой мышечных механорецепторов (проприоцепторов IA типа), запускающих работу гипоталамо-гипофизарной нейроэндокринной системы. Ученые НАСА и Калифорнийского университета (Лос Анджелес) установили, что при выполнении физических упражнений в космическом полете (на борту космического корабля «Спейс шаттл») увеличения секреции гормона роста не

наблюдается [McCall et al., 1999]. Причиной этого, по мнению авторов открытия и российских ученых, является инактивация проприоцепторов вследствие гипогравитационной атонии мышц.

Как известно, гормон роста стимулирует экспрессию и секрецию инсулиноподобного фактора роста-1 (IGF-1) в клетках печени и в волокнах скелетных мышц, преимущественно смешанных или быстрых. Экспрессия IGF-1 может быть также связана с сократительной активностью мышцы. Содержание IGF-1 в крови животных в условиях моделируемой гравитационной разгрузки снижается. Это является следствием снижения экспрессии IGF-1 в клетках печени, т. к. степень снижения его экспрессии в камбаловидной мышце невелика. Некоторые авторы связывают атрофию мышц в невесомости со снижением содержания системных регуляторов (GH и IGF-1) в крови [Grindeland et al, 1990]. Тем не менее, многочисленные попытки предотвратить развитие атрофических процессов путем введения в мышцу или в кровь препаратов, содержащих гормон роста или инсулиноподобный фактор роста, оказались неудачными.

Обращает на себя внимание то, что наиболее эффективными средствами, обеспечивающими полное или частичное предотвращение атрофических изменений в условиях разгрузки являются произвольные физические упражнения, резистивного или локомоторного характера, опорная механостимуляция или электростимуляция, индуцирующие тоническую сократительную активность камбаловидной мышцы и в определенной степени других постуральных и локомоторных мышц. Об этом свидетельствуют результаты многочисленных экспериментов и весь огромный опыт мировой и отечественной космической и реабилитационной медицины. Поскольку большинство (или все) внутри- и внеклеточные молекулярные механизмы, работа которых направлена на поддержание мышечной массы, являются функционально-зависимыми, т. е. зависимыми от различных проявлений сократительной активности мышц, то соответственно нарушение или прекращение работы этих механизмов и служит причиной развития гипогравитационной атрофии скелетных мышц.

### Молекулярные сигнальные механизмы, регулирующие синтез и распад белка

В последние годы постоянство и сбалансированность синтеза и распада белковых молекул принято обозначать термином «протеостаз» (от англ. protein – белок, homeostasis – постоянство внутренней среды). Интенсивность синтеза и распада белка (речь идет преимущественно о сократительных белках, составляющих до 90% массы мышцы) регулируется многочисленными сигнальными путями, тесно взаимодействующими друг с

другом. Эти пути представляют собой цепи сигнальных ферментов, активирующих или подавляющих друг друга, работа каждого из которых определяется входным сигналом, который является продуктом энергетических, механических или электрических процессов формирующих сократительную деятельность мышцы.

Синтез белка в скелетной мышце происходит в период покоя после сократительной активности, а не во время нее. Во время интенсивных мышечных сокращений в мышце не происходит ничего кроме самих сокращений, процессов их регуляции и непосредственного обеспечения (прежде всего энергетического!). Для мышцы сократительная активность – главная функция, она ее и выполняет [Rennie, 2004].. Постуральная камбаловидная мышца активна в течение большей части периода бодрствования животного и человека. Но непрерывная сократительная активность может быть характерна только для целой мышцы. В связи с тем, что для каждого волокна рано или поздно наступает период утомления, двигательные единицы камбаловидной мышцы в условиях земной гравитации сменяют друг друга, но в целом поддерживают антигравитационную функцию мышцы. Синтез белка при этом реализуется в периоды между сокращениями волокон и в период инактивации большинства волокон во время отдыха. Какие же процессы контролируют синтез белка в волокнах скелетной мышцы?

Основным системным химическим регулятором синтеза и распада белка в мышце является инсулиноподобный фактор роста-1 (рис. 24). Рецептор IGF1 встроен в сарколемму и очень похож на инсулиновый рецептор. Промежуточный посредник у них тоже один, это молекула IRS1 – субстрат инсулинового рецептора. Он дает толчок нескольким сигнальным путям [Boller et al., 2002]. Центральное место занимает молекула протеинкиназы В или (другое название) Akt. Эта протеинкиназа через фосфорилирование следующих звеньев сигнального пути передает сигнал не только на усиление белкового синтеза, но и на блокирование распада белка [Sartori et al., 2021]. Сигнал Akt регулирует активность центрального диспетчера анаболических процессов (т. е. процессов, обеспечивающих синтез белка) – mTORc1. Регуляция осуществляется путем ингибирующего фосфорилирования молекул TSC2, эндогенного ингибитора mTOR [см. обзор Goodman, 2019] Следует отметить, что mTORc1 может быть активирован не только сигналом от каскада IGF1/Akt, но и напрямую, от механочувствительных молекул (механосенсоров), которые трансформируют механические изменения волокна и его окружения (мышечное сокращение, растяжение, взаимодействие с потоками жидкой среды вне волокна) в молекулярные сигналы, т. е. в химическую модификацию сигнальных ферментов [См. обзор, Мирзоев, Шенкман, 2023].

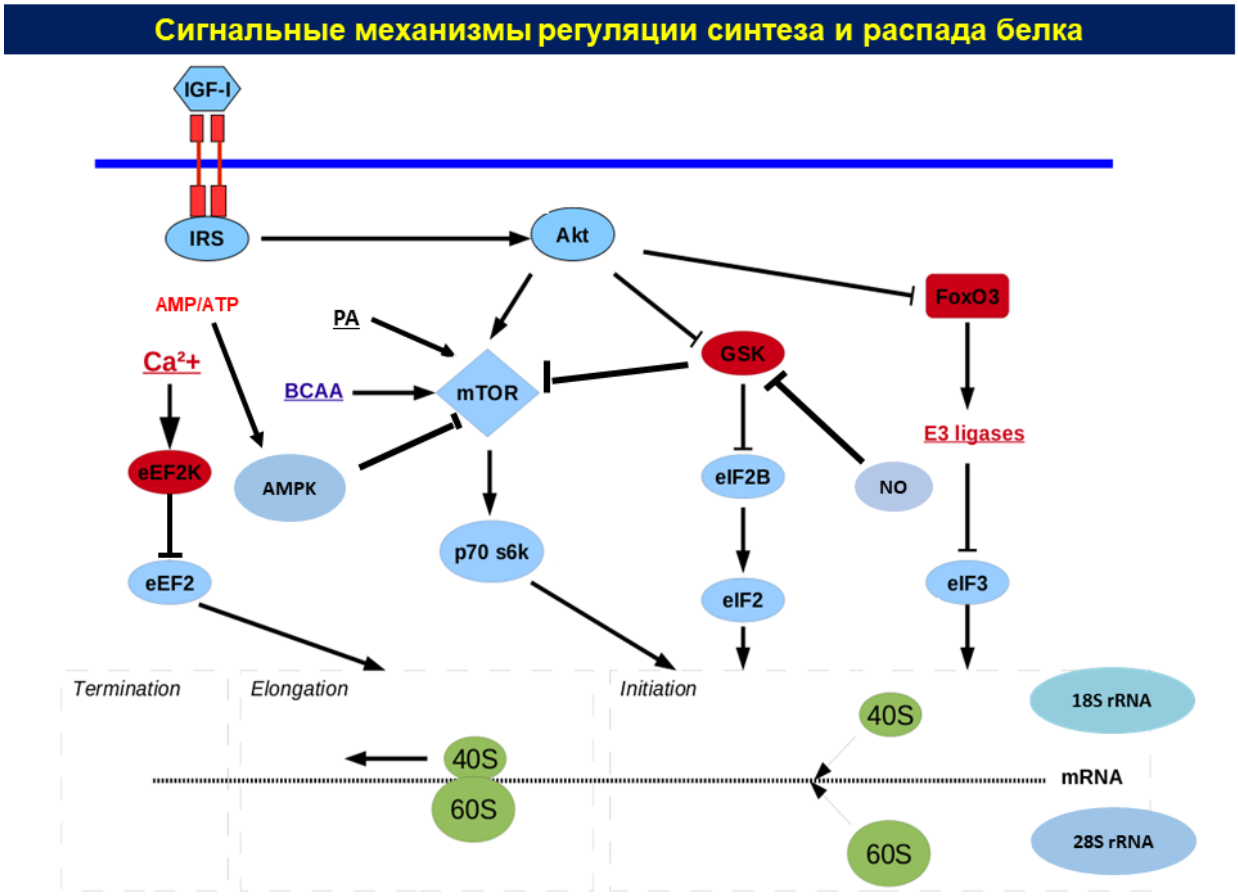



Рис. 24. Сигнальные механизмы регуляции синтеза и распада белка в скелетной мышце (mTORc1 – механозависимая мишень рапамицина; рапамицин – антибиотик, являющийся самым эффективным и специфичным ингибитором mTORc1)

В последние годы установлено, что основным передатчиком таких сигналов является молекула фосфатидной кислоты, которая способствует ассоциации mTORc1 с наружной мембраной лизосомы и освобождает его от действия клеточных ингибиторов [Brittany, Hornberger et al., 2013] (рис.25).

Именно mTORc1 является основным координатором сигналов, активирующих синтез белковых молекул на рибосомах после физических нагрузок и в процессе силовой (резистивной) тренировки. Итак, от IGF1 идет канонический путь через Akt1 и mTOR на синтез белка. Однако активность mTOR регулируется не только IGF1 и Akt. Если мышца только что интенсивно работала, то соотношение АТФ/АМФ сдвигается в сторону АМФ, что приводит к активации АМФ-активируемой протеинкиназы (AMPK), которая эффективно ингибирует, подавляет активность mTORc1 [Mounier et al., 2014]. Отсюда следует, что mTORc1 сможет эффективно стимулировать белковый синтез только когда

Состояние покоя После механического сигнала Активное состояние

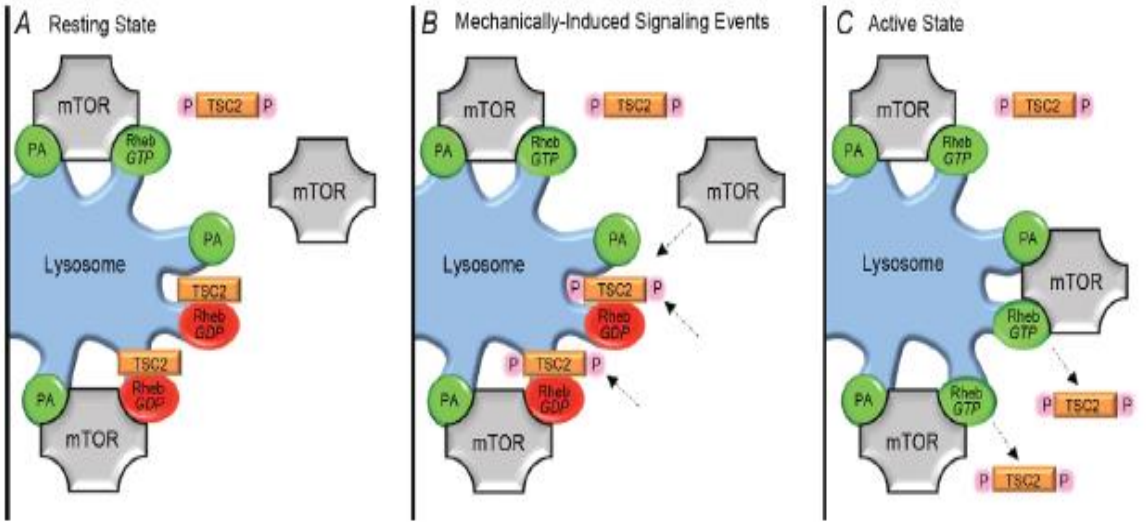



Рис.25. Активация mTORc1 на лизосомальной мембране. [по Drittany, Hornberger, 2013]. mTORc1 связывается с мембраной лизосом с помощбю фосфатидной кислоты и сигнальной молекулы Rheb/ATP. Если ингибитор TSC2 фосфорилирован по позитивному сайту, он не позволяет фосфорилировать молекулу ADP в составе комплекса Rheb/ADP и связывать комплекс mTORc1 с мембраной лизосомы. При получении механического сигнала TSC2 покидает мембрану, Rheb/ADP фосфорилируется и связывает mTORc1, который начинает работать.

мышца перешла в состояние покоя и соотношение АТФ/АМФ оказалось снова уравновешенным, а AMPK снизила свою активность. В целом инициация синтеза белка на рибосоме активируется с помощью целого класса инициаторных факторов, зависимых и независимых от mTORc1 [см. обзор Drittany, Hornberger, 2013 и обзор Мирзоев, Шенкман, 2018]. Один из них, eIF2b активно работает и способствует синтезу белка только в том случае, если к нему не присоединяется фосфатная группа под действием универсального негативного сигнального регулятора GSK3β. Этот регулятор в свою очередь может быть подавлен Akt (если она активирована сигналом от IGF1) или ферментами, активируемыми оксидом азота (NO) (например, протеинкиназой G) [Drenning et al., 2008].

Следует отметить, что в условиях вывешивания снижение уровня фосфорилирования (активности) основного эффектора mTORc1 рибосомальной киназы p70S6K, которая в норме и активирует инициацию белкового синтеза на рибосоме, в быстрых мышцах наблюдается уже в первую неделю воздействия, а в камбаловидной мышце – только к концу 2-й недели. В первые же дни экспозиции в условиях моделируемой невесомости исследователи в нашей лаборатории регистрировали даже увеличение активности

сигнального пути mTORc1/p70S6K [Mirzoev et al., 2015]. Этот феномен можно связать с тем, что в первые дни разгрузки на фоне накопления АТФ в мышечном волокне снижается активность AMPK, подавляющей активность mTORc1, что позволяет этой молекуле активироваться. Эта гипотеза в последние годы получила экспериментальное подтверждение [Vilchinskaya et , 2017; Lvova et al., 2023]. В то же время активность универсального негативного сигнального регулятора GSK3β возрастает уже к третьим суткам вывешивания, что способствует снижению эффективности белкового синтеза [Rozhkov et al., 2021].

Есть еще один путь регуляции белкового синтеза на рибосоме, и это уже другая стадия синтеза белка – элонгация. Элонгация начинается, когда к одной аминокислоте присоединяется другая. Регулирует эту элонгацию элонгационный фактор 2 (eEF2). Если он фосфорилирован, то как бы ни был активен mTOR с инициацией, процесс элонгации обрывается в самом начале. А как он регулируется? Оказывается, что EF2 фосфорилирует его собственная киназа, которая регулируется двумя путями: кальций-зависимой киназой и действием AMPK. Если мышца работает, то подавляется не только инициация синтеза белка, но и элонгация. Но если сократительная активность мышцы снижается (при моделировании невесомости), то накопление ионов кальция в волокне также способствует фосфорилированию элонгационного фактора и снижению эффективности белкового синтеза на стадии элонгации [Красный и соавт., 2015; Vilchinskaya et al., 2023] .

Описанные здесь сигнальные пути влияют на эффективность белкового синтеза, т. е. на количество белковых молекул, синтезированных в пересчете на 1 рибосому. Однако интенсивность белкового синтеза в расчете на волокно зависит еще и от его емкости, иными словами, от количества образующихся рибосом. А здесь ведущая роль принадлежит механизмам, регулирующим экспрессию 18 и 28S рибосомальных РНК на рибосомных генах в районе т. н. ядрышка. Среди факторов, регулирующих биогенез рибосом, следует назвать два основных фактора, активность которых приводит к подавлению биогенеза. Это mTORc1 и универсальный негативный регулятор GSK3β. Протеинкиназный комплекс mTORc1 может проникать в ядра и взаимодействовать с промоторами рибосомных генов, стимулируя их экспрессию. Это часто происходит на фоне низкой протеинкиназной активности mTORc1 на лизосомах. Предполагается, что в этом случае свободный от работы на лизосомах mTORc1 может активировать биогенез рибосом [von Walden et al., 2016]. При высокой активности GSK3β блокируется сигнал транскрипционного фактора c-Myc, что приводит к снижению уровня экспрессии рибосомальных РНК и биогенеза рибосом [см. обзор Мирзоев, Шенкман, 2018]. Необходимо напомнить, что активность GSK3β может быть значительно снижена при действии протеинкиназы Akt и протеинкиназ, зависимых от

содержания NO в мышце. Поэтому можно считать, что необходимый уровень емкости белкового синтеза может обеспечиваться при его умеренной эффективности и достаточной концентрации оксида азота.

Наиболее важной для скелетных мышц сигнальной системой, регулирующей распад белковых молекул, является убиквитин-протеасомная система. Это классический сигнальный путь. Есть белок – убиквитин. Его название произошло от слова «убиквитас» – всеобщий, так как этот белок нашли практически во всех клетках. Он пришивается к молекуле так называемой Е1, которая взаимодействует с молекулой Е2, передавая убиквитин по цепочке, в которой третья молекула – это убиквитин-лигаза. Эта молекула перехватывает убиквитин от Е2 и сажает на его субстрат. В данном случае субстрат – это белок, который надо расщепить (рис.26 ).

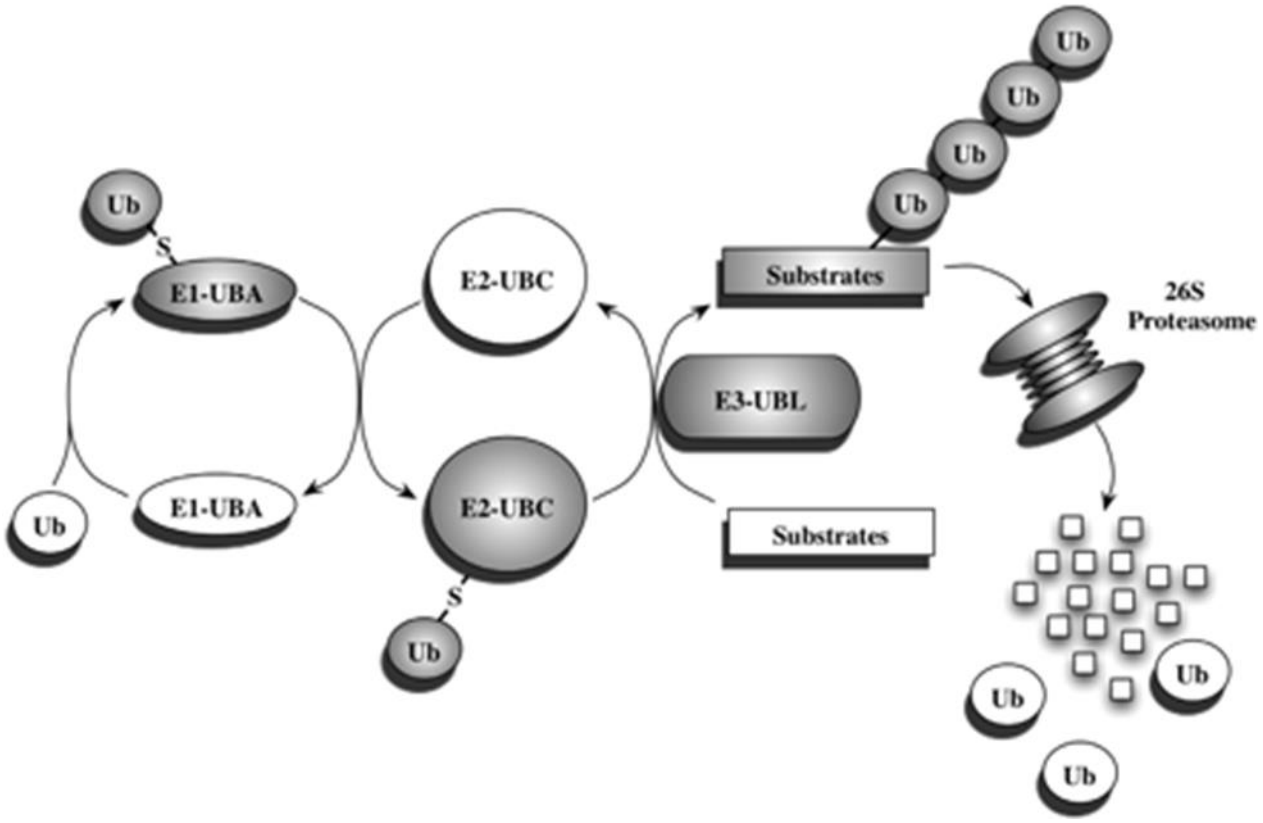



Рис. 26 Механизм работы убиквитин-протеасомной системы. Объяснения в тексте.

Когда на субстратном белке оказывается не 2, и не 3, а 4 молекулы убиквитина, то он направляется в специальную структуру – протеасому, которая узнает сигнальные последовательности аминокислот убиквитина и расщепляет белок до мелких фрагментов. Каждая убиквитин-лигаза имеет строго определенный набор своих субстратных белков. Есть хорошо известная специалистам молекула MuRF-1. Это очень важная убиквитин-лигаза и она работает с огромным количеством белков, в частности, с актином и миозином.

Другая, специфичная для мышечной ткани Е3-убиквитин лигаза Mafbx/atrogin-1 регулирует распад некоторых сигнальных белков (в частности, MyoD). Есть несколько механизмов регуляции экспрессии убиквитин-лигаз, один из них наиболее распространен. Мы знаем, что АКТ (протеин-киназа В) регулирует синтез белка, но помимо этого, если она фосфорилирована, она блокирует работу транскрипционного фактора FOXO3. Когда FOXO3 фосфорилирован, он остается в цитоплазме. Дефосфорилированный FOXO3 идет в ядро и запускает экспрессию убиквитин-лигаз. Если АКТ фосфорилирован, что определяется IGF-1-зависимыми механизмами, то экспрессия генов мышечных убиквитин лигаз (и интенсивность протеолиза!) остается на низком уровне (рис.27). В условиях гравитационной разгрузки было показано, что в камбаловидной мышце как крысы, так и человека уже с первых дней воздействия значительно увеличивается экспрессия мышечных Е3 убиквитин лигаз [Bodine et al., 2022]. При этом вклад этого процесса в уменьшение мышечной массы в начальный период воздействия оказывается весьма существенным.

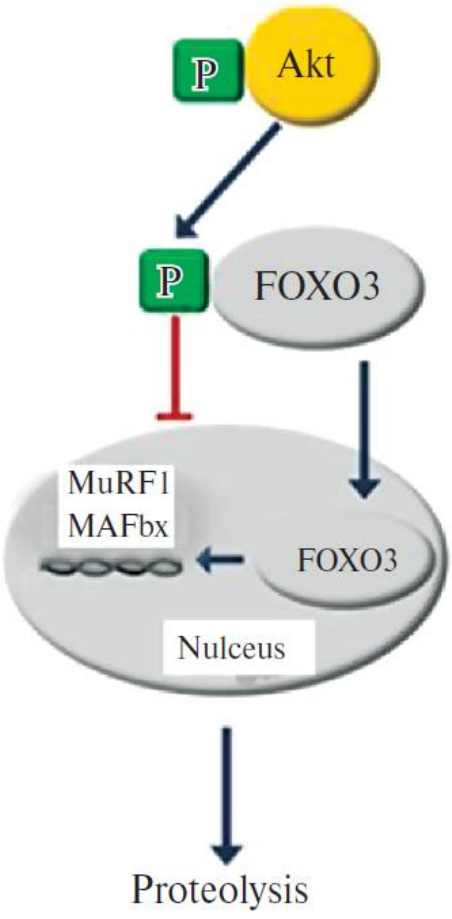



Рис 27. Механизм регуляции экспрессии мышечных Е3-убиквитин лигаз (по Немировской).

**Новые данные о молекулярных механизмах развития гипогравитационной атрофии**

В течение долгого времени основной рабочей гипотезой при исследовании механизмов гипогравитационной атрофии мышц были представления о том, что основной причиной деструктивных изменений является снижение содержания системных регуляторов GH и IGF-1 в крови человека или животного в условиях реальной или моделируемой невесомости. Многочисленные попытки введения их в кровь или в мышцу не приводили к сколько-нибудь заметному предотвращению атрофических изменений. Сейчас уже можно назвать причину этих неудач. Этот механизм открыли японские ученые на той же модели вывешивания. Затем показали то же самое на животных, находившихся в невесомости на борту космической станции. Оказывается, существует специализированная убиквитин-лигаза Cbl-b. Она начинает экспрессироваться уже с первого дня разгрузки [Belova et al., 2019] и убиквитинировать субстрат инсулинового рецептора IRS-1, который в результате работы протеасомных ферментов распадается [Nakao et al., 2009]. При этом будет подавляться активность AKT и, соответственно, FOXO3 будет проникать в ядро и запускать экспрессию мышечных убиквитин-лигаз (рис. 28).

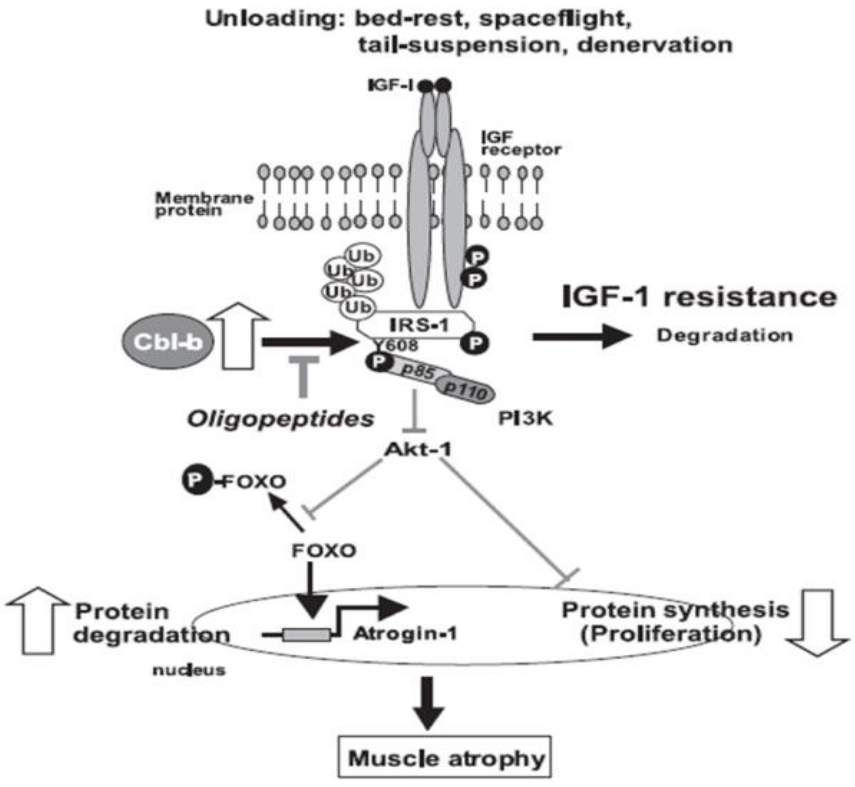



Рис.28 Механизм регуляции экспрессии убтквитин лигаз на начальной стадии разгрузки [Nakao et al, 2009].

То есть распад IRS-1 приведет к активации всей системы белкового распада. Ясно, что при таком существенном уменьшении содержания IRS-1 инсулиноподобный фактор роста-1 не сможет регулировать ни синтез, ни распад белка. К сожалению, пока не удается

выявить механизм интенсификации экспрессии Cbl-b при вывешивании задних конечностей или в космическом полета. Японские исследователи считают, что увеличение экспрессии этого фермента связано с накоплением активных форм кислорода. Однако требуются экспериментальные подтверждения этой гипотезы. Другая новая глава в исследовании молекулярных механизмов развития атрофии постуральной мышцы в условиях гравитационной разгрузки связана с раскрытием важнейшей роли оксида азота и NO-зависимых сигнальных путей. В нашей лаборатории совместно с лабораторией профессора Г.Р. Каламкарова (Институт биохимической физики РАН им. Н.М. Эммануэля) методом электронно-парамагнитной резонансной спектроскопии было обнаружено достоверное снижение содержания NO в камбаловидной мышце крысы после 14-суточного вывешивания задних конечностей [Lomonosova et al, 2011] (рис. 29).

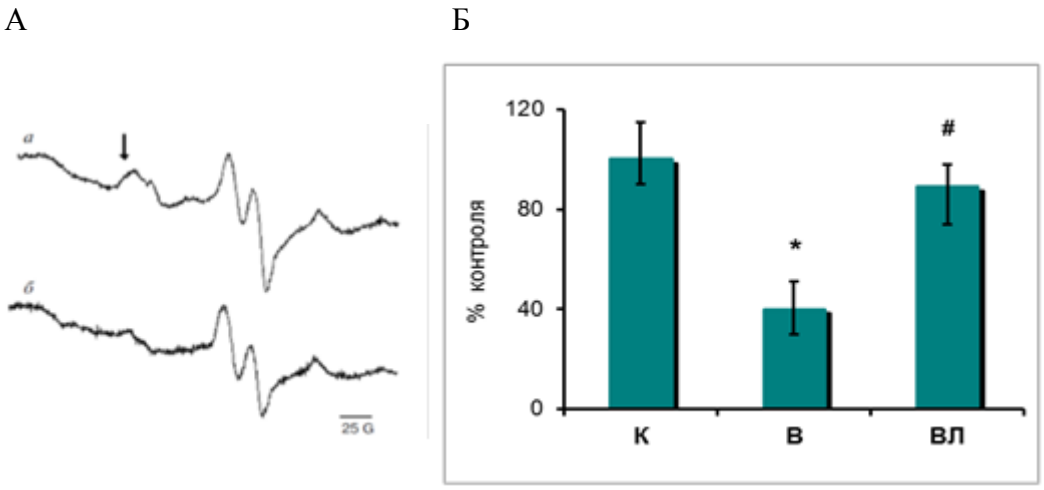



Рис. 29. Содержание NO в камбаловидной мышце крысы после 14 суток вывешивания задних конечностей. А. ЭПР-спектрограмма вверху – контроль, внизу – после вывешивания, сайт NO указан стрелкой; Б количественные данные по содержанию NO в мышце. К – контроль, В –вывешивание, ВЛ – вывешивание с введением L-аргинина.

Как известно, оксид азота продуцируется ферментом синтазой оксида азота NOS. Этот фермент существует в большом количестве изоформ, однако в скелетно-мышечных волокнах наиболее распространенной изоформой является нейрональная NOS – nNOS, μ-изоформа. Она располагается в примембранной зоне и связана со структурами дистрофин-саркогликанового цитоскелетного комплекса. Среди активаторов nNOS одним из наиболее эффективных является L-аргинин, его субстратный регулятор. Продукция NO может стимулироваться при активации механосенсоров (при растяжении мышцы или при увеличении т.н. напряжения сдвига) [Juffer et al.,2014]. Возможно, что механоуправляемые каналы открываются под действием механического стимула и пропускают поток ионов

кальция, которые в свою очередь активируют продукцию NO. nNOS также активируется при фосфорилировании, которое может осуществляться как ферментами инсулинового каскада, так и АМФ-активируемой протеинкиназой (АМПК) [Chen et al., 2000]. Не исключено, что снижение продукции NO в первые сутки вывешивания (до 40% по нашим данным) обусловлено дефосфорилированием АМПК в этот период. Однако показано, что экспрессия nNOS продолжает снижаться и далее. Есть данные о том, что, по крайней мере, частично это снижение обусловлено метилированием промотора его гена [Tomiga et al., 2019].

Сигнальное значение оксида азота веьма велико. Он способствует активации сателлитных клеток, предшественников мышечной регенерации [Tatsumi et al., 2006]. Оксид азота является эффективным ингибитором кальций-зависимых цистеиновых протеаз кальпаинов, что позволяет ему препятствовать деструкции цитоскелетных белков. Оксид азота инициирует работу cGMP-зависимого сигнального пути, приводящего к активации протеинкиназы G [Drenning et al, 2009] (рис. 30). Важно, что эта NO-зависимая протеинкиназа фосфорилирует ингибирующий сайт молекулы ключевого негативного регулятора белкового синтеза и экспрессии генов GSK3β. Именно этот фермент в начальный период разгрузки блокирует биогенез рибосом [Rozhkov et al., 2022], экспрессию PGC1α и медленной изоформы миозина [Sharlo et al., 2020]. Применение субстрата nNOS L-аргинина позволило предотвратить описанные деструктивные события. Таким образом, можно сказать, что снижение продукции оксида азота является важнейшим пусковым механизмом, запускающим целый ряд атрофических событий. Этот вывод был также подтвержден в серии исследований с механостимуляцией опорных афферентов в на фоне вывешивания (см. ниже).

Мы рассмотрели основные сигнальные механизмы, которые при нормальной активности постуральной мышцы обеспечивают стабильный баланс процессов синтеза и распада белка (протеостаз), не допуская снижения мышечной белковой массы. При изменении характера тонической активности мышцы, ее снижения или прекращения, наблюдается радикальная перестройка этих механизмов, приводящая к потере мышечной массы и соответствующим функциональным сдвигам, угрожающим качеству жизни и профессиональной деятельности космонавтов. В то же время изменения сигнальных путей анаболической и катаболической направленности в условиях гравитационной разгрузки, характеризуются специфической динамикой, которую мы рассмотрим в следующем разделе.

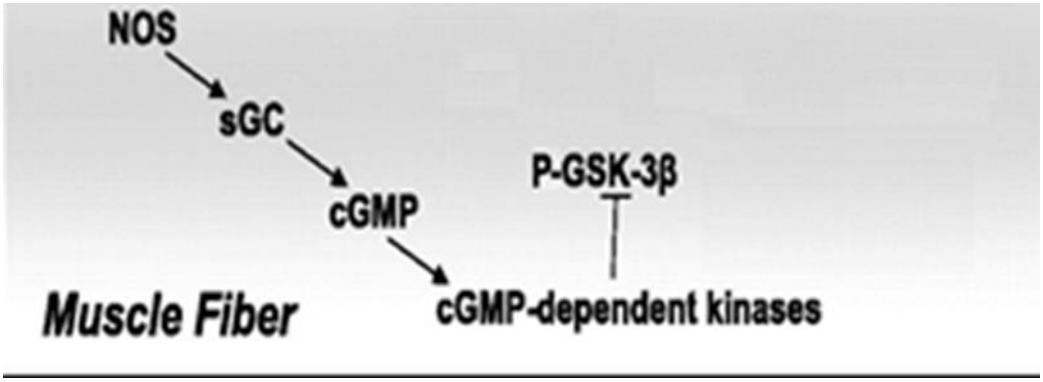



Рис.30. NO-зависимый цГМФ-сигнальный путь. NOS – сината оксида азота; sGC-гуанилатциклаза; cGMP –циклический гуанозин фосфат; cGMP-dependent kinase –протеин киназа G.

**Динамика внутриклеточных сигнальных процессов при развитии гипогравитационной атрофии и атонии постуральной мышцы**

Когда работа основной антигравитационной камбаловидной мышцы, активной в течение более 11 часов в сутки прекращается в результате устранения опорного сигнала, уже в первые сутки наблюдается накопление нерастраченной АТФ в цитоплазме мышечных волокон [Zaripova et al., 2021].. Это накопление приводит к снижению уровня фосфорилирования АМФ-активируемой протеинкиназы, что оказывает множественное действие на сигнальные процессы в мышечном волокне (рис. 31) [Mirzoev et al., 2015].. Таким образом, снимается суппрессия с работы mTORc1 и соответственно повышается фосфорилирование рибосомальной киназы p70, которая является эффектором mTORc1, но это приводит не к повышению синтеза белка, а к противоположному эффекту: снижается синтез компонентов рибосом, повышается экспрессия убиквитинлигаз, что приводит к снижению интенсивности синтеза белка и повышению интенсивности его распада [Belova et al., 2019; Rozhkov et al., 2022]. Эти, на первый взгляд, парадоксальные феномены были обнаружены в нашей лаборатории в последние годы.

В этот же начальный период разгрузки происходит частичный распад субстрата инсулинового рецептора (IRS-1) с последующим дефосфорилированием Akt и усилением экспрессии протеолитических ферментов.

Параллельно, очевидно, в результате нарушения работы Na,K–АТФазы (помпы), наблюдается снижение мембранного потенциала покоя (деполяризация), причиной которого, скорее всего, также является снижение активности АМПК[Kravtsova et al., 2019].

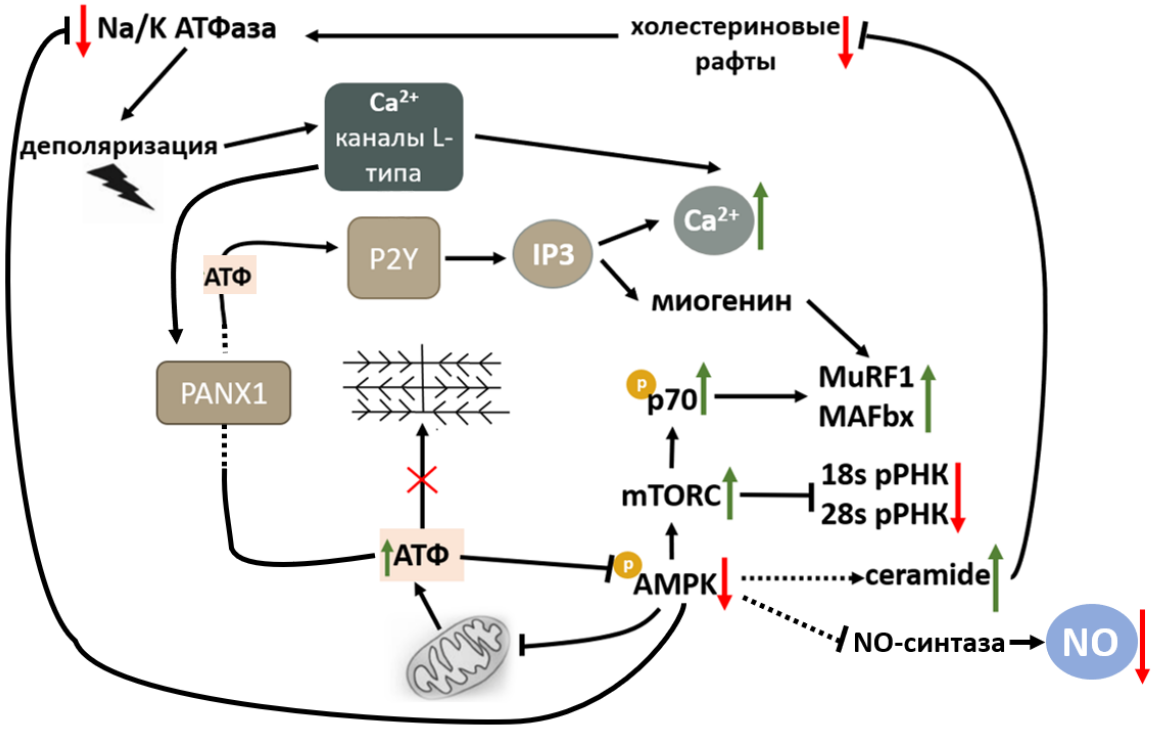



Рис. 31. Изменения сигнальных путей в m. soleus в 1-е–3-и сутки вывешивания задних конечностей крысы

Следовательно, уже в первые двое суток вывешивания появляются предпосылки к накоплению ионов кальция в мышечное волокно. Накопление ионов кальция в мышечном волокне при разгрузке было предсказано Григорием Александровичем Наследовым из Института эволюционной физиологии и биохимии РАН им. И.М. Сеченова на основании результатов серии экспериментов проведенныз на камбаловидной мышце крысы после вывешивания [Arutyunyan et al., 1995]. Увеличение содержания ионов кальция было показано Кристофером Ингаллсом уже после 2 суток вывешивания мышей в 1999 году [Ingalls et al., 1991-2001].

Это накопление ионов кальция уже на раннем этапе разгрузки обусловлено работой потенциал-чувствительных дигидропиридиновых кальциевых каналов, активируемых снижением мембранного потенциала покоя мышцы при гравитационной разгрузке. В лаборатории профессора И.И. Кривого из Санкт-Петербургского университета было показано, что применение даже кратковременной электростимуляции «отключенной» камбаловидной мышцы устраняют эту спонтанную деполяризацию и, очевидно, ее последствия. Поэтому, можно считать, что накопление ионов кальция на ранних этапах разгрузки скорее всего обусловлено снижением или устранением тонической мышечной активности.

В результате повышения активности потенциал-чувствительных дигидропиридиновых каналов запускается и другой сигнальный процесс: открываются паннексиновые каналы, и по градиенту концентрации молекулы АТФ, содержание которых уже значительно повышено (см. выше) по этим каналам выходят в интерстициальное пространство и взаимодействуют с пуринорецепторами. Запускается пурин-зависимый сигнальный путь, в результате которого синтезируются молекулы инозитол-три-фосфата [Zaripova et al, 2021-2024]. Эти молекулы способствуют открытию инозитол-три-фосфатных рецепторов (ионных каналов) на м ембранах саркоплазматического ретикулума и на ядерной мембране. При этом ионы кальция поступают в цитоплазму и в ядро.

Еще один источник ионов кальция это «подтекание» (leakage) рианодиновых каналов саркоплазматического ретикулума [Sidorenko et al, 2024] . Это «подтекание», открытое еще в 1995 году [Yoshioka et al., 1995] также способствует повышению концентрации ионов кальция в мышечном волокне. Ионы кальция не только активируют кальций-зависимые протеазы (кальпаины), способствуют нарушению сопряжения окисления и фосфорилирования в митохондриях, стимулируют снижение экспрессии медленной изоформы ТЦМ (видимо, через активацию митогенактивируемых протеинкиназ – p38 [Sharlo et al, 2020 и др).

В первые же сутки гравитационной разгрузки, как было показано учеными Падуанского университета [Gorza et al., 2021], накопление активных форм кислорода в результате нарушения работы митохондрий приводит к выходу синтазы оксида азота из зоны субсарколеммального цитоскелета и появлению высокотоксичных побочных продуктов этого фермента, стимулирующих протеолитические процессы. При этом, по невыясненным пока причинам, концентрация оксида азота в постуральной мышце значительно снижается. Уже на 3-и сутки гравитационной разгрузки на фоне сниженного уровня оксида азота и повышенной концентрации ионов кальция активируются кальций-зависимые протеазы (кальпаины), деятельность которых приводит к постепенной деградации цитоскелетных белков. В результате наблюдается снижение жесткости (тонуса) мышцы. Уже на самом раннем этапе разгрузки наблюдается также уменьшение размеров моторных синапсов и дезинтеграция холестериновых рафтов, что, вероятно сказывается на структуре и чувствительности α-холинорецепторов [Chibalin et al., 2018; Petrov et al., 2019]. Эти изменения могут быть обусловлены снижением уровня фосфорилирования и соответственно активности АМПК [Kravtsova et al, 2019].

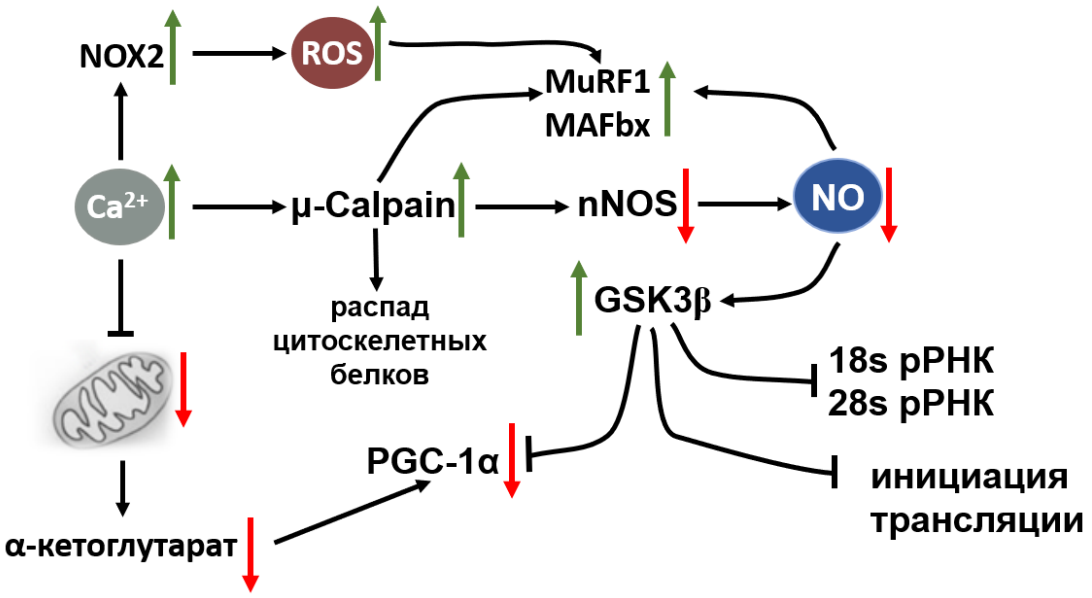



Рис. 32. Изменения сигнальных путей в m. soleus в течение 3–7 суток вывешивания задних конечностей крысы

И хотя к 7-м суткам воздействия концентрация АТФ уменьшается (а фосфорилирование АМПК увеличивается) и становится неотличимой от нормы, сигнальная «обстановка» в волокне уже существенно изменена (рис. 32). В результате снижения содержания NO [Lomonosova et al., 2011] активность универсального негативного регулятора сигнальных процессов GSK3β повышается, что приводит к дальнейшему блокированию процессов биогенеза рибосом [Rozhkov et al., 2022] и митохондрий, а также способствует деградации цитоскелетных белков, включая титин и небулин [Vikhlyantsev et al, 2004].

Таким образом, анализ сигнальных событий начального этапа разгрузки позволяет придти к выводу о том, что последовательные (хотя и перекрывающееся по времени) изменения концентрации низкомолекулярных мессенджеров, непосредственно зависящее от снижения сократительной (тонической) активности постуральной мышцы – накопление АТФ, а затем ионов кальция и снижение продукции оксида азота – создают необходимые предпосылки для развития атрофического процесса.

К концу первой недели гравитационной разгрузки в экспериментах на крысах в условиях традиционной модели вывешивания задних конечностей уже проявляются все феномены, характерные для состояния продолжительной безопорности. В их числе: снижение интенсивности синтеза белка и увеличение его распада, трансформация части медленных волокон в быстрые, снижение уровня окислительного фосфорилирования митохондриями, снижение содержания основных цитоскелетных и матриксных белков. На

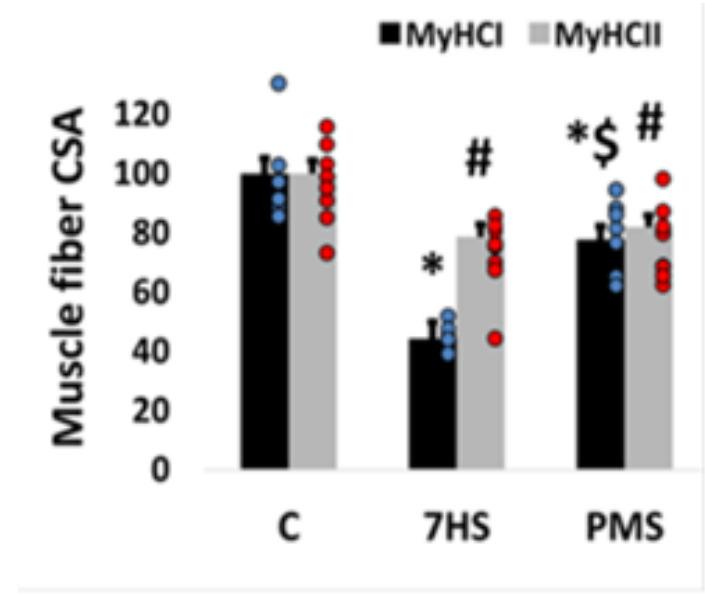
примере первой недели мы видим, что изменения основных сигнальных процессов, наблюдаемые в постуральной мышце при вывешивании, носят стадийные характер. Каждый этап процесса развивается на базе предыдущего этапа, при этом меняются механизмы, обеспечивающие последовательное развитие атрофических процессов, которое носит, очевидно, нелинейный характер. Уже к концу первой недели становятся видны структурные и функциональные результаты гипогравитационной перестройки постуральной мышцы: теряется масса мышцы, снижается ее сила, устойчивость к утомлению и жесткость. В дальнейшем эти процессы углубляются на протяжении первого месяца моделируемой микрогравитации.

**Как тоническая активность поддерживает структуру и функцию постуральной мышцы. Механизмы протеостаза в опытах со стимуляцией опорных афферентов.**

Как уже подчеркивалось выше, поддержание мышечной массы невозможно без сохранения на стабильном и сбалансированном уровне процессов синтеза и распада мышечных белков, т.е. сохранения протеостаза. Регуляция протеостаза реализуется через многочисленные, взаимодействующие между собой сигнальные пути. работа каждого из которых определяется входным сигналом, представляющим собой продукт энергетических, механических или электрических процессов, формирующих сократительную деятельность мышцы. В экспериментах разной продолжительности мы проверяли, насколько тоническая активность, вызванная механостимуляцией опорных афферентов, позволяет предотвратить значительные изменения активности ключевых маркеров анаболических и катаболических сигнальных путей, вызванные гравитационной разгрузкой в камбаловидной мышце крысы.

Как мы поняли в ходе этой экспериментальной серии, опорная стимуляция способствует частичному предотвращению атрофических изменений медленных волокон камбаловидной мышцы после 7-суточной разгрузки. Глубокое (на 56%) снижение площади поперечного сечения медленных волокон у группы животных, вывешенных без дополнительных воздействий, примерно наполовину достоверно компенсировалось при использовании опорной стимуляции (рис. 33) [Tyganov et al., 2020].

Эти данные хорошо согласовывались с ранее полученными данными коллег из НАСА по действию опорной стимуляции на вывешенных крысах при более продолжительной экспозиции [Kyparos et al., 2004].




.

Рис. 33. Площадь поперечного сечения медленных (MyHC I) и быстрых (MyHC II) мышечных волокон в камбаловидной мышце крысы после эксперимента со стимуляцией опорных афферентов. С – контроль, 7HS – вывешивание задних конечностей без дополнительных воздействий в течение 7 суток, PMC – вывешивание задних конечностей крысы со применением ритмического давления пневматическим аппаратом. Предотвращение атрофических изменений примерно на 45% только для волокон медленного типа.

Какие же механизмы лежат в основе частичного предотвращения атрофии медленных волокон при опорной стимуляции? После 24 час разгрузки наблюдалось достоверное снижение уровня ингибирующего фосфорилирования киназы гликогенсинтазы 3β (GSK3β) [Tyganov et al., 2019]. Это снижение свидетельствует о повышении активности этого фермента, подавляющего синтез белка. Применение даже одного 4-часового сеанса механостимуляции стопы животного позволило полностью предотвратить это снижение и соответственно удержать активность GSK3β на уровне виварного контроля. Аналогичные эффекты были получены после 3 и 7 суток разгрузки. Таким образом, можно считать, что тоническая активность постуральной мышцы, вызванная механостимуляцией опорных афферентов, подавляет активность мощного эндогенного блокатора белкового синтеза. Белковый синтез зависит не только от интенсивности процессов образования пептидных связей на рибосоме, но и от интенсивности синтеза самих рибосом. Нами ранее было показано, что уже в первые сутки вывешивания драматически снижается экспрессия 28S и 18S рибосомальных РНК. Этот пониженный уровень синтеза сохраняется до 7 суток разгрузки. Только 7-суточное

ежедневное применение опорной стимуляции позволило предотвратить это снижение, очевидно, путем сохранения высокого уровня экспрессии одного из основных регуляторов синтеза рибосомальных РНК протоонкогена c-Myc [Tyganov et al., 2020]. После 7 суток вывешивания наблюдается также снижение фосфорилирования основного регулятора синтеза белка на рибосоме – рибосомальной киназы p70S6K, которая является основным эффектором ключевого фактора, контролирующего анаболические процессы в мышечном волокне – белкового комплекса mTORC1. Снижение фосфорилирования (т.е. активности) p70S6K при разгрузке также предотвращается при использовании опорной стимуляции. Понятно, что в условиях разгрузки снижение активности основных сигнальных путей, регулирующих синтез белка, должно сказываться и на интенсивности самого синтеза. И действительно, уже после 24 часов вывешивания наблюдается тенденция к снижению включения пуромициновой метки, отражающей интенсивность синтеза белка в мышце. В дальнейшем, этот показатель продолжал снижение. Однако применение механостимуляции стопы животного позволило частично предотвратить такое снижение. Понятно, что полученные эффекты можно рассматривать как результат интеграции процессов поддержания стабильности основных анаболических сигнальных путей.

Интересно, что раннее увеличение экспрессии ключевого фермента убиквитин-протеасомной системы (УПС) белкового распада E3 убиквитин-лигазы MuRF-1 в первые 3-е суток вывешивания предотвращается действием опорной стимуляции [Tyganov et al., 2019]. Этот фермент убиквитинирует (т.е. «пришивает» молекулярную метку для последующего распада) основные сократительные белки мышечного волокна: актин и миозин. В нашей лаборатории ранее было установлено, что уже в первый день вывешивания в результате дефосфорилирования АМФ-активируемой протеинкиназы (AMPK) и последующего гиперфосфорилирования p70S6K, происходит резкая активация экспрессии MuRF-1 (см. выше). После 3 суток опорной стимуляции удается предотвратить дефосфорилирование AMPK и гиперфосфорилирование p70S6K [51]. Поэтому становится понятно, почему с помощью индуцированной тонической активности удается поддержать экспрессию MuRF-1 на более низком контрольном уровне в первые дни разгрузки. Однако при опорной стимуляции на фоне вывешивания в течение 7 суток повышение экспрессии MuRF-1 не предотвращается, и содержание соответствующей мРНК не отличается от уровня животных, вывешенных без дополнительных воздействий . Не исключено, что такой эффект обусловлен тем, что на разных этапах атрофического процесса регуляция экспрессии E3 убиквитин-лигаз осуществляется разными механизмами. И на более позднем этапе (7 дней) эти механизмы не находятся в непосредственной зависимости от тонической активности. Есть и другое объяснение полученного эффекта. Возможно, для

предотвращения повышенной экспрессии MuRF-1 в течение недели разгрузки необходимо более продолжительное воздействие опорного стимула (например, не 4, а 6-8 часов). Эти предположения предстоит проверить в новых экспериментах.

В то же время, регуляция катаболических процессов не исчерпывается регуляцией экспрессии Е3 убиквитин-лигаз. Существуют другие механизмы, обеспечивающие защиту белковых молекул от убиквитинирования. Это белки теплового шока, деубиквитиназы и др. Исследования зависимости этих механизмов в камбаловидной мышце от тонической сократительной активности – дело будущего.

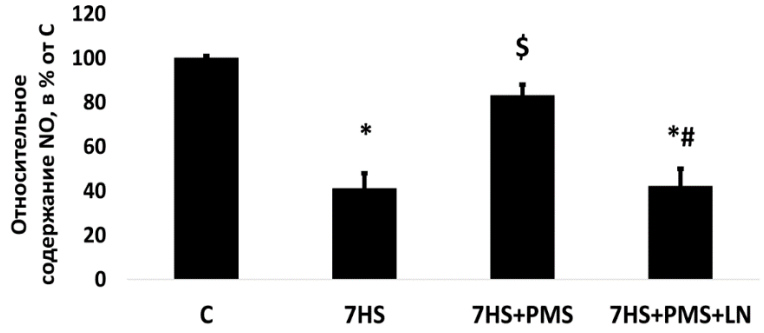
Один из интереснейших вопросов, вытекающих из результатов описываемой экспериментальной серии – вопрос о вторичном мессенджере, зависящим от тонической активности и запускающим комплекс сигнальных механизмов, предотвращающих развитие атрофических изменений при механостимуляции опорных афферентов. Мы предположили, что одним из таких низкомолекулярных посредников может быть оксид азота. Действительно, при использовании механостимуляции на фоне 7-суточного вывешивания в отличие от вывешивания без дополнительных воздействий снижения содержания оксида азота не наблюдалось (рис.34). Для оценки роли оксида азота при опорной стимуляции был разработан специальный экспериментальный протокол, предусматривающий дополнительную группу животных, которым на фоне комбинированного действия вывешивания и опорной стимуляции вводили ингибитор синтазы оксида азота L-Name. У животных этой группы в камбаловидной мышце содержание оксида азота было таким же низким, как у животных, вывешенных без дополнительного воздействия (Рис.34).

Почти все профилактические эффекты опорной стимуляции (предотвращение атрофии, предотвращение трансформации части медленных волокон в быстрые, предотвращение снижения синтеза белка, снижения биогенеза рибосом, предотвращение распада цитоскелетных белков, включая титин и небулин и др.) не были зафиксироованы у животных, получавших ингибитор NOS [Tyganov et al., 2021]. Большинство изучаемых параметров не отличались от показателей животных, вывешенных без дополнительного воздействия.

Оказалось, что для реализации эффектов опорной стимуляции необходим оксид азота в концентрации, характерной для контрольных животных.

Нами была предложена схема, отражающая возможные механизмы NO-зависимых протеостатических процессов при сохранении тонической активности на фоне стимуляции опорных афферентов (рис.35).

А




Б

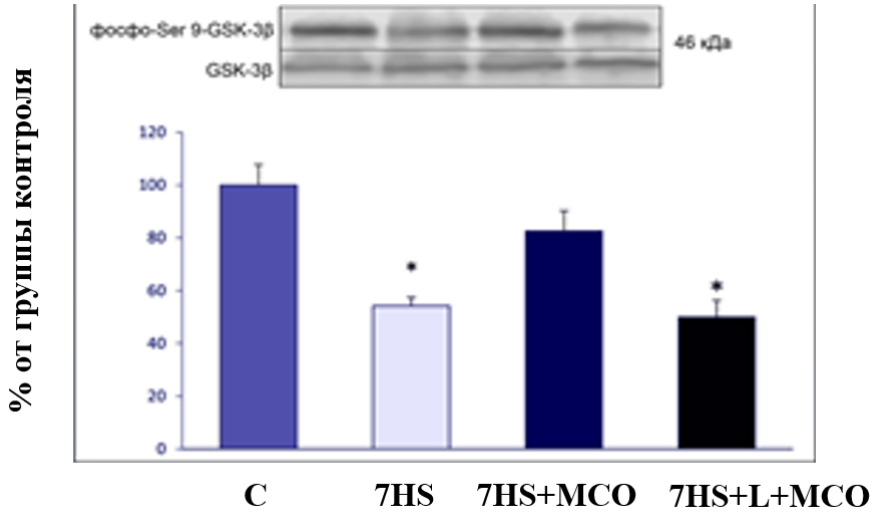



Рис.34. Уровень содержания оксида азота (А) и фосфорилирования киназы гликогенсинтазы GSK3β в камбаловиднойц мышце крысы в эксперименте с 7-суточнымс вывешиванием, механостимуляцией опорных афферентов и введением ингибитора синтазы оксида азота. С –контроль, 7HS – 7-сут. вывешивание без дополнительных воздействий; 7HS+MCO – вывешивание с ежедневной механостимуляцией опорных афферентов; 7HS+L+MCO – вывешивание с механостимуляцией опорных афферентов и введением L-NAME, ингибитора синтазы оксида азота.

При обсуждении NO-зависимых механизмов поддерживающей функции тонической активности необходимо учитывать не только обеспечение анаболических процессов, но и важную роль оксида азота в предотвращении кальпаин-зависимого распада цитоскелетных белков. Не исключено, что эти белки, реализуя свои упруго-эластические свойства, создают внутреннее сопротивление мышечному сокращению и тем самым стимулируют механо-сенсорные структуры, участвующие в механо-анаболической трансдукции (см. выше)

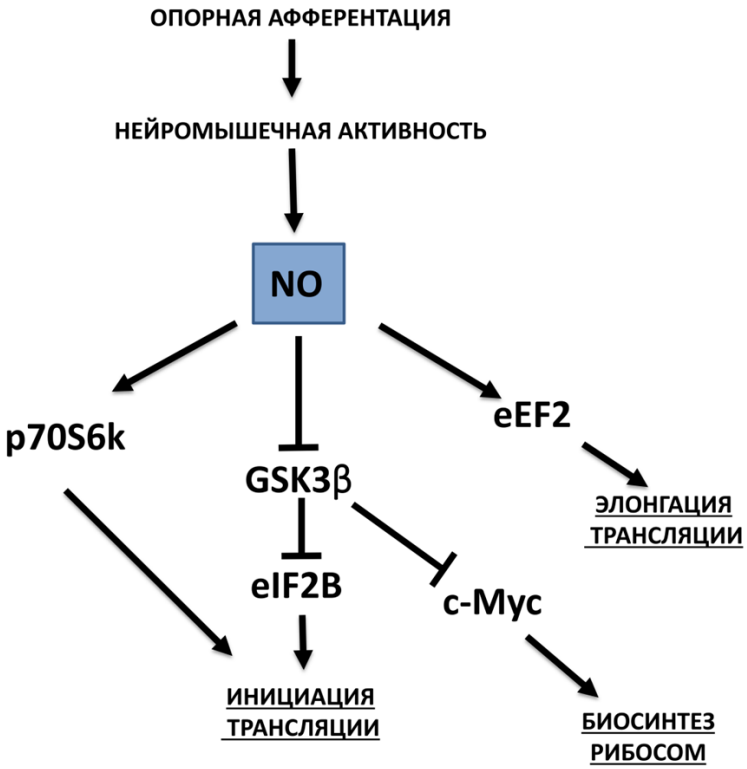



Рис. 35. Гипотетические NO-зависимые механизмы поддержания анаболических процессов на фоне тонической активности.

На наш взгляд, полученные результаты позволяют приблизиться к пониманию того, каким образом тоническая сократительная активность постуральной мышцы поддерживает ее протеостаз и нормальную структуру в условиях земной гравитации.

Итак, мы можем сказать, что ключевая роль тонической активности в поддержании протеостаза и массы постуральной мышцы экспериментально подтверждается и требует дальнейших исследований для раскрытия тонких механизмов регуляции.

## Заключение

В этом кратком очерке гравитационной физиологии скелетных мышц мы познакомились с системными гравитационно-зависимыми факторами, обеспечивающими нормальное поддержание структуры, метаболизма и функции скелетной мышцы в условиях земной гравитации. Изменение действия этих факторов в условиях измененной гравитации (реального или моделируемого устранения гравитационных сил) запускает целый каскад молекулярных событий, приводящих к атрофическим изменениям, потере тонуса, трансформации миозинового фенотипа, фиброзу и репрограммированию прогениторных клеток. Эти последствия гравитационной разгрузки находят свое функциональное выражение в снижении работоспособности мышцы, ее силы, нарушении системных моторных функций (позы, локомоции, точностных движений). Сегодня представляется, что основной причиной развития негативных изменений скелетных мышц и всей двигательной системы в условиях реальной и моделируемой невесомости является снижение сократительной активности. Особенно это характерно для постуральной медленной мышцы, ключевая роль которой в формировании позы и обеспечении локомоций не подлежит сомнению. Функциональные последствия снижения общего тонуса большинства быстрых и смешанных мышц в условиях невесомости изучены пока недостаточно, хотя по мнению представителей школы И.Б. Козловской должны в полной мере сказываться в моторном поведении целого организма.

В арсенале современной космической медицины есть немало средств, направленных на предотвращение негативных изменений в двигательной системе в условиях невесомости. Важно отметить, что их действие, как правило, связано с поддержанием тонической и/или резистивной сократительной активности мышц-мишеней. К сожалению, в настоящее время в арсенале практической космической медицины отсутствуют фармакологические средства, предотвращающие изменения внутриклеточных сигнальных путей в невесомости, обусловленные дефицитом сократительной активности мышц. Однако разработка таких фармакологических подходов ведется во многих лабораториях мира.

Сегодня развитие фундаментальных и прикладных исследований в области гравитационной физиологии мышц базируется на внедряемых прорывных технологиях и остроумных экспериментальных подходах. Это позволит в ближайшем будущем ожидать решения старых и новых загадок нашей увлекательной области науки и появления новых методов борьбы с негативными проявлениями гравитационно-зависимой и патологической дисфункции мышц в космосе и на Земле.

## Рекомендуемая литература


1. Козловская И.Б. Гравитационная физиология движений. Современное состояние и перспективы развития. Актовая речь. ИМБП. М., 2011.

2. Шенкман Б.С., Мирзоев Т.М., Козловская И.Б. Тоническая активность и гравитационный контроль постуральной мышцы // Авиакосмическая и экологическая медицина. 2020. Т. 54. № 6. С. 58–72. DOI: 10.21687/0233-528X-2020-54-6-58-72.

3. Schiaffino S., Reggiani C. Fiber types in mammalian skeletal muscles // Physiol. Rev. 2011. V. 91. № 4. P. 1447–1531. DOI: 10.1152/physrev.00031.2010.

4. Шенкман Б.С.. От медленных к быстрым. Гипогравитационная перестройка миозинового фенотипа мышечных волокон // Acta Naturae. Т. 8 № 4 (31). 2016.

5. Шенкман Б.С. Типы мышечных волокон. Физиология сокращения скелетных мышц. В книге «Актуальные проблемы современной физиологии» / Под редакцией М.А. Островского и А.Л. Зефирова. Казань, 2016. С. 237–270.

6. Shenkman B.S. How postural muscle senses disuse? Early Signs and Signals. Int. J. Mol. Sci. 2020. 21. № 14. 5037; doi:10.3390/ijms21145037.

7. Шенкман Б.С., Шарло К.А. Как мышечная активность контролирует экспрессию медленного миозина // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. 2021. Т. 107. № 6–7, с. 669–694. DOI: 10.31857/S086981392106011X.

8. Шенкман Б.С., Цатурян А.К., Вихлянцев И.М., Козловская И.Б., Григорьев А.И. Молекулярные механизмы изменений мышечного тонуса в условиях космического полета и при его моделировании // Acta Naturae. Т. 13. № 2 (49). 2021. С.85–97. DOI: 10.32607/actanaturae.10953 8.

9. Scott M. Ebert, Asma Al-Zougbi, Sue C. Bodine and Christopher M. Adams. Skeletal Muscle Atrophy: Discovery of Mechanisms and Potential Therapies // Physiology. 34: 232–239, 2019.; doi:10.1152/physiol.00003.2019.

10. Б.С. Шенкман. От активности к бездействию, и снова к активности. Сигнальные процессы в постуральной мышце в переходный период // Авиакосмическая и экологическая медицина. 2023. Т. 57. № 5. С. 101–118 DOI: 10.21687/0233-528X-2023-57-5-103-118.