

## КЛЮЧЕВЫЕ АНАБОЛИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ В *M. SOLEUS* ЧЕЛОВЕКА ПОСЛЕ 21-СУТОЧНОЙ АНТИОРТОСТАТИЧЕСКОЙ ГИПОКИНЕЗИИ

© 2024 г. С. П. Белова<sup>1</sup>, С. А. Тыганов<sup>1</sup>, К. А. Зарипова<sup>1</sup>, Б. С. Шенкман<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт медико-биологических проблем РАН, Москва, Россия

\*E-mail: swetbell@mail.ru

Поступила в редакцию 27.02.2024 г.

После доработки 21.03.2024 г.

Принята к публикации 24.03.2024 г.

Длительный постельный режим может оказать существенное негативное воздействие на скелетные мышцы, приводя к мышечной атрофии и снижению силы. Потеря мышечной массы и силы особенно выражена в первую неделю иммобилизации. Антиорто-статическая гипокинезия (АНОГ) – один из способов моделирования гравитационной разгрузки скелетных мышц, при котором человек пребывает на постельном режиме с углом наклона головного конца кровати на  $-6^\circ$ . При АНОГ наблюдается развитие мышечной атрофии, являющейся результатом снижения синтеза белка и усиления его распада. Данная работа посвящена анализу ключевых анаболических маркеров камбаловидной мышцы (*m. soleus*) при 21-суточной АНОГ. Эксперимент с антиорто-статической гипокинезией был проведен на базе Института медико-биологических проблем РАН. Шестеро здоровых мужчин добровольцев в возрасте 25–35 лет в течение 21 суток находились на строгом постельном режиме с углом наклона головного конца кровати  $-6^\circ$ . Игольчатая биопсия *m. soleus* проводилась по методу Бергстрема до гипокинезии и на 21-е сутки гипокинезии. Полученный в ходе биопсии материал немедленно замораживался в жидком азоте для дальнейших вестерн-блот и ПЦР анализов. Изучение субстратов mTORC1 показало достоверное снижение фосфорилирования p70 и 4EBP1 после АНОГ. Также наблюдалось достоверное снижение фосфорилирования рибосомальной киназы p90RSK, достоверное увеличение фосфорилирования eEF2 и увеличение экспрессии мРНК eEF2K. Помимо этого, после АНОГ снижалось фосфорилирование AMPK и ее субстрата ACC. Полученные данные подтверждают гипотезу о том, что снижение синтеза белка вносит вклад в развитие атрофии *m. soleus* человека после 21-суточной АНОГ наряду с увеличением протеолиза.

**Ключевые слова:** постельный режим, гипокинезия, камбаловидная мышца, атрофия, синтез белка

**DOI:** 10.31857/S0869813924050055, **EDN:** BLEGYB

### ВВЕДЕНИЕ

Скелетные мышцы чрезвычайно пластичны. Снижение или полное прекращение сократительной активности приводит к их атрофии, что выражается в снижении мышечной массы, размера мышечных волокон, максимальной силы сокращения и снижении работоспособности [1, 2]. К атрофии мышц приводит иммобилизация конечностей, гравитационная разгрузка или постельный режим, которым сопровождаются различные патологические состояния [3]. Антиорто-статическая гипокинезия (АНОГ)

является, наряду с «сухой» иммерсией, моделью, с помощью которой воспроизводится механическая и функциональная разгрузка скелетных мышц человека. АНОГ – это состояние, при котором человек пребывает на постельном режиме с углом наклона головного конца кровати на  $-6^\circ$ , имитируя условия микрогравитации. Это состояние изучалось на предмет его воздействия на организм человека и, в частности, на развитие атрофии и изменение функциональных свойств скелетных мышц. В экспериментах с АНОГ зафиксирована атрофия мышц с различным миозиновым фенотипом [3]. Гипокинезия в течение 60 суток приводила к уменьшению площади поперечного сечения (ППС) мышц поясницы, тогда как 120-суточная гипокинезия – к уменьшению ППС камбаловидной мышцы (*m. soleus*); в обоих случаях атрофия коррелировала с уменьшением силы сокращения этих мышц [4, 5]. Кратковременная длительность АНОГ (17–20 суток) также приводила к снижению ППС мышц голени на 10–12% [3, 6, 7]. Однако, как указывают работы Шенкмана и Козловской, атрофические изменения при гипокинезии развиваются медленнее, чем при «сухой» иммерсии, так как при АНОГ сохраняются, хоть и небольшое, опорное воздействие в результате перераспределения силы реакции опоры с подошв ног на заднюю поверхность тела человека [8–12]. Если АНОГ минимизирует силы, действующие на мышцы нижних конечностей человека в вертикальном или сидячем положении, то «сухая» иммерсия нейтрализует эти силы с помощью гидростатической подъемной силы [13]. При этом до сих пор совершенно неизученным остается вопрос о привязке кожных сенсорных полей глубокой механо-чувствительности различных участков тела к активности определенных мышц и мышечных групп. Поэтому вопрос о влиянии опорных реакций, приходящихся на поверхность спины и ягодиц, на активность камбаловидной мышцы по-прежнему остается неясным. Таким образом, при АНОГ наблюдается значительная зависящая от времени воздействия мышечная атрофия и снижение мышечной силы. Установлено, что снижение силы в два раза превышает снижение мышечной массы и размеров волокон [14]. Это может свидетельствовать о том, что при хронической разгрузке скелетные мышцы становятся слабее, и некоторая часть этой функциональной потери происходит в самой мышце, но также значительная часть наблюдающихся перемен, по-видимому, объясняется изменениями иннервации мышцы, действующими на центральном и периферическом уровнях [14]. Понимание механизмов предотвращения уменьшения мышечной массы, вызванного функциональной разгрузкой скелетных мышц, по-прежнему является актуальной научной проблемой, решение которой имеет клиническое применение (иммобилизация, саркопения и кахексия) [15]. Будущие исследования должны обобщить воздействие АНОГ на людей и оценить, в какой степени эти эффекты можно смягчить с помощью различных контрмер [3]. Также должны быть изучены типы и продолжительность восстановления, необходимого для успешного поддержания двигательных функций.

Принято считать, что атрофия является результатом снижения синтеза белка и усиления его распада [16, 17]. Однако соотношение вклада этих процессов в развитие атрофии давно является предметом дискуссий. Phillips и McGlory в своей работе приходят к выводу, что у людей в условиях функциональной разгрузки скелетных мышц наблюдается минимальное увеличение интенсивности протеолиза, а снижение синтеза белка является преобладающим механизмом, лежащим в основе снижения массы и площади поперечного сечения мышечных волокон [18]. Reid и соавт. высказывают другую точку зрения [19], указывая на то, что доминирующим механизмом, вызывающим мышечную атрофию, является протеолиз. В своем обзоре они ссылаются на работы, показывающие, что практически при всех атрофических состояниях увеличивается экспрессия мРНК ключевых мышечных E3-убиквитинлигаз MAFbx и MuRF-1. Увеличение экспрессии этих убиквитинлигаз было зарегистрировано в диафрагме людей [20–22] и грызунов [23], находящихся на искусственной вентиляции легких, в мышцах конечностей человека после постельного режима, иммобилизации нижних конечностей

тей [24–29], а также в мышцах грызунов после вывешивания задних конечностей, иммобилизации и при космическом полете [30–32]. Возникшие противоречия можно связать с тем, что в исследованиях на животных и человеке часто рассматриваются разные по функциям и миозинового фенотипу мышцы [33, 34]. Кроме того, некоторые авторы показывают, что атрофия *m. vastus lateralis* происходит неравномерно – одни области атрофируются сильнее, чем другие [35]. При этом данные о молекулярных событиях в *m. soleus* у человека при разгрузке обрывочны, в то время как на модельных экспериментах с грызунами в *m. soleus* сигнальные процессы исследованы намного лучше, но они плохо соотносятся с имеющимися данными по *m. vastus lateralis* людей при гипокинезии и «сухой» иммерсии. В нашей недавней работе было показано, что 21-суточная АНОГ приводит к достоверному снижению площади поперечного сечения волокон как в *m. vastus lateralis*, так и в *m. soleus* [7]. При этом мы также наблюдали рост экспрессии мРНК MAFbx и MuRF-1, который был более выражен в *m. soleus* [7]. Также нами были зафиксированы изменения в экспрессии мРНК IL-6 и фосфорилировании протеинкиназы В (АКТ) [7].

Синтез белка скелетных мышц регулируется сложной сетью молекулярных механизмов, которые можно разделить на mTORC1-зависимые и -независимые пути. Эти пути влияют на инициацию и элонгацию трансляции и биогенез рибосом, которые имеют решающее значение для синтеза белка в мышечных волокнах [36, 37]. Путь mTORC1, включающий путь АКТ/mTOR, является важнейшим регулятором гипертрофии скелетных мышц и может предотвращать мышечную атрофию. Этот путь активируется различными анаболическими стимулами и участвует в регуляции инициации рибосомальной трансляции, что является ключевым этапом синтеза белка [37, 38]. Рибосомальная протеинкиназа P70 (p70S6k) и 4E-связывающий белок 1 (4E-BP1) являются субстратами mTORC1 [39]. Для того чтобы составить полную картину изменений протеостаза при АНОГ, в данной работе мы провели анализ ключевых анаболических маркеров в *m. soleus* человека после 21-суточной антиортостатической гипокинезии с целью выяснения роли синтеза белка в развитии атрофии.

## МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

*Антиортостатическая гипокинезия.* Эксперимент с антиортостатической гипокинезией был проведен на базе Института медико-биологических проблем РАН. Шестеро здоровых мужчин добровольцев в возрасте 25–35 лет в течение 21 суток находились на строгом постельном режиме с углом наклона головного конца кровати  $-6^\circ$ . Игольчатая биопсия *m. soleus* проводилась по методу Бергстрема [29] до гипокинезии (на рисунках данные обозначены как Pre) и на 21-е сутки гипокинезии (на рисунках данные обозначены как Post). В горизонтальном положении в помещении, предназначенном для хирургических манипуляций, проводили местную анестезию путем внутривенной инъекции 2%-ного раствора лидокаина над поверхностью задней группы мышц голени. Затем выполняли кожный разрез с помощью хирургического лезвия и производили стерильный забор ткани с помощью биопсийной аспирационной иглы Бергстрема. После извлечения иглы рану обрабатывали гемостатической губкой и закрывали бактерицидным лейкопластырем. Образцы мышечной ткани были заморожены в жидком азоте и хранились в холодильнике при  $-85^\circ\text{C}$ .

*Анализ экспрессии генов.* Для анализа экспрессии мРНК генов из мышечной ткани с помощью набора RNeasy micro kit (Qiagen, США) была выделена тотальная фракция РНК и использована в качестве матрицы для проведения обратной транскрипции с последующей ПЦР-реакцией. Для проведения обратной транскрипции были использованы компоненты набора RevertAid RT Kit (Thermo Fisher Scientific, США). Обратную транскрипцию проводили в амплификаторе (CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System, Bio-Rad Laboratories, США). Для проведения ПЦР в реальном времени исполь-

зовали полученную в результате обратной транскрипции кДНК, праймеры с концентрацией 10 мкМ и мастер-микс (0.3 мМ дНТФ, 3 мМ MgCl<sub>2</sub>, 2.5 мкл 10-кратного ПЦР-буфера Б (рН 8.8), 0.06 ед./мкл Taq ДНК-полимеразы, Синтол, Россия). Нормирование данных ПЦР проводили на экспрессию housekeeping гена GAPDH. Все праймеры, использовавшиеся в эксперименте, представлены в табл. 1.

**Таблица 1.** Список использованных в работе праймеров

Gene	Primers
<i>eEF2K</i>	F AGAAGCTGGTGACAGGCAGT R GGGTCTCTGTCCAGTCCAAA
<i>GAPDH</i>	F CCAGTATGATTCTACCCACGGC R CGGAGATGATGACCCTTTTGGC

*Анализ содержания белков в тотальной фракции камбаловидной мышцы.* Для выделения тотальной белковой фракции был использован набор реагентов RIPA Lysis Buffer System (Santa Cruz, США). При этом дополнительно использовались ингибиторы протеаз Complete Protease Inhibitor Cocktail (Santa Cruz, США), 10 мкг/мл апротинина (SIGMA, США), 10 мкг/мл лейпептина (SIGMA, США), 10 мкг/мл пепстатина (SIGMA, США), 10 мкг/мл «complete Mini Protease Inhibitor Cocktail» (Roche, Швейцария), 20 мкг/мл фосфоингибиторного коктейля (Santa Cruz, США). Для проведения электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ) образцы разводились в двукратном буфере (5.4 мМ Tris-HCl (рН 6.8), 4%-ный Ds-Na, 20%-ный глицерин, 10%-ный β-меркаптоэтанол, 0.02%-ный бромфеноловый синий). Электрофорез был проведен в 10%-ном разделяющем ПААГ при силе тока 17 мА на гель в мини-системе (Bio-Rad Laboratories) при комнатной температуре. Электроперенос белков проводили на нитроцеллюлозную мембрану при 100 В и температуре 4 °С в течение 120 мин в системе mini Trans-Blot (Bio-Rad Laboratories). После электропереноса НЦ-мембраны инкубировали в растворе 5%-ного сухого молока (Bio-Rad Laboratories) в PBST (PBS + 0.1% Tween 20) в течение 1 ч при комнатной температуре. Для выявления белковых полос использовали первичные поликлональные антитела: p-p70S6k (Thr389) (1:500; Santa Cruz Biotechnology, США, sc-11759), p-4E-BP1 (Thr37/46) (1:1000, Cell Signaling Technology, США, #2855) и 4E-BP1 (1:2000, Cell Signaling Technology, США, #9452), p-p90RSK (Ser380) (1:1000, Cell Signaling, США, #9341) и p90RSK (1:2000, Cell Signaling Technology, США, #8408), p-eEF2 (Thr56) (1:1000, Cell Signaling, США, #2331) и eEF2 (1:2000, Cell Signaling Technology, США, #2332), p-АМПК (Thr172) (1:500, Cell Signaling, США, #2535) и АМПК (1:1000, Cell Signaling Technology, США, #2532), p-ACC (Ser79) (1:1000, Cell Signaling, США, #3661) и ACC (1:1000, Cell Signaling Technology, США, #3676). В качестве вторичных антител использовали антитела goat anti-rabbit, конъюгированные с пероксидазой хрена (Santa Cruz, США) в разведении 1:50000. Инкубация блотов с первичными антителами проводилась в течение ночи при 4 °С, со вторичными антителами 1 ч при комнатной температуре. Анализ белковых полос проводили с использованием C-DiGit Blot Scanner (LI-COR Biotechnology, США). Все измерения плотности изображений проводились в линейном диапазоне проявляющего реагента и сканера. Медиану оптического поглощения (ОП) полос вывешенной группы делили на медиану ОП полос соответствующей контрольной группы, отличия выражали в процентах. Медиану ОП полос контрольной группы принимали за 100%. Статистическая обработка данных вестерн-блота производилась с помощью программы Image Studio Digits Ver4.0.

*Статистическая обработка данных.* Данные по содержанию белков представлены как средние ± SEM, данные о содержании мРНК представлены в виде максимума, минимума и интерквартильной широты (0.25–0.75). Средние значения всех групп показаны

ны в % от группы Pre. Для проверки достоверности различий между группами использовался непараметрический Т-критерий Уилкоксона. Значение  $p < 0.05$  расценивали как статистически значимое.

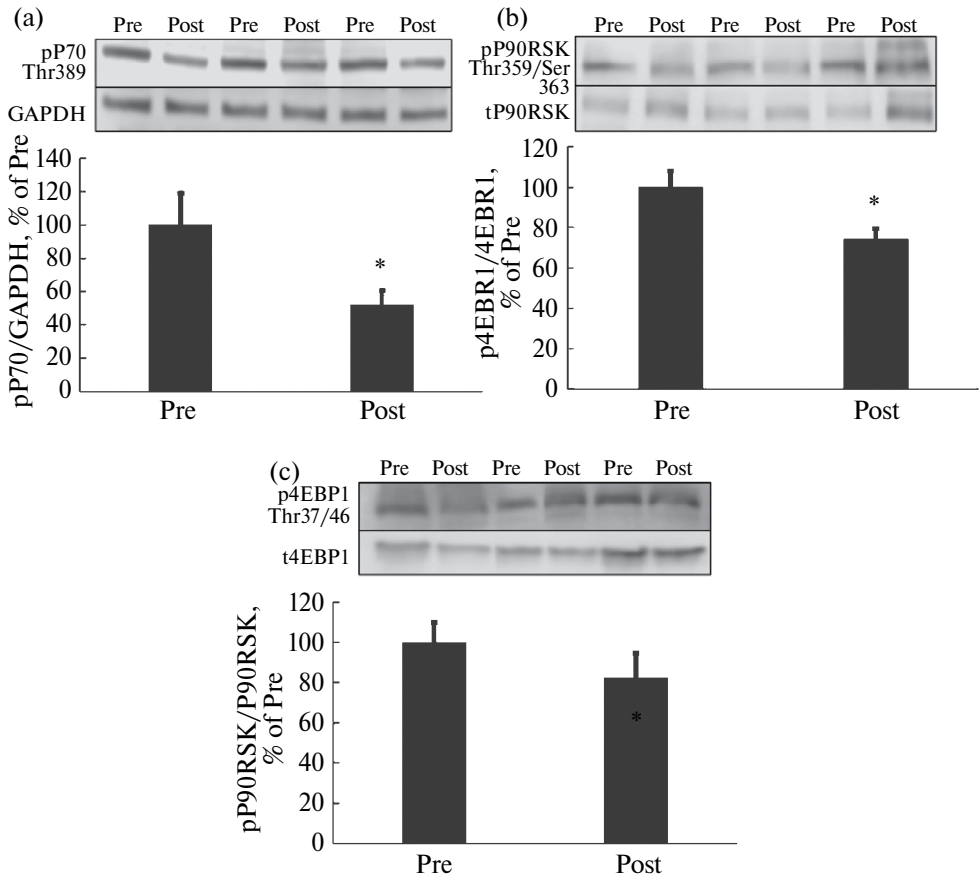
## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее в эксперименте с 24-суточным постельным режимом был проведен анализ фосфорилирования p70S6k в *m. vastus lateralis*, и авторы не обнаружили изменений по сравнению с контролем [40]. В нашем исследовании фосфорилирование p70S6k (Thr389) в *m. soleus* после 21 суток АНОГ снижалось на 48% ( $p < 0.05$ ) (рис. 1a), а фосфорилирование 4E-BP1 (Thr37/46) на 18% ( $p < 0.05$ ) (рис. 1b), что было ожидаемо, так как именно *m. soleus*, важнейшая познотоническая мышца, больше всего и страдает от безопорности. Субстраты mTORC1 ингибируются при многих состояниях, вызывающих атрофию, таких как сепсис, голодание, диабет и антиортостатическое вывешивание грызунов [41–43]. Но также известно, что в условиях иммобилизации и денервации активность mTORC1 увеличивается, а не снижается, по крайней мере, на ранних стадиях процесса атрофии, что, однако, не приводит к увеличению синтеза белка [42].

Сигнальный каскад ERK/p90RSK, который может участвовать в регуляции инициации трансляции независимо от mTORC1, также может изменяться в ответ на снижение сократительной активности скелетных мышц. 21-суточная гипокинезия привела к снижению фосфорилирования p90RSK (Thr359/Ser363) в *m. soleus* на 18% ( $p < 0.05$ ) (рис. 1c). Наблюдаемое нами снижение фосфорилирования p70S6k, 4E-BP1 и p90RSK в *m. soleus* хорошо согласуется с результатами экспериментов с антиортостатическим вывешиванием грызунов в течение 7 суток [43, 44], причем в некоторых исследованиях показано снижение p90RSK *m. soleus* уже на третьи сутки вывешивания [45]. Таким образом, мы наблюдали снижение фосфорилирования и, соответственно, снижение активности рибосомальных киназ p70S6k и p90RSK после 21-суточной АНОГ, что должно приводить к снижению синтеза белка на рибосоме.

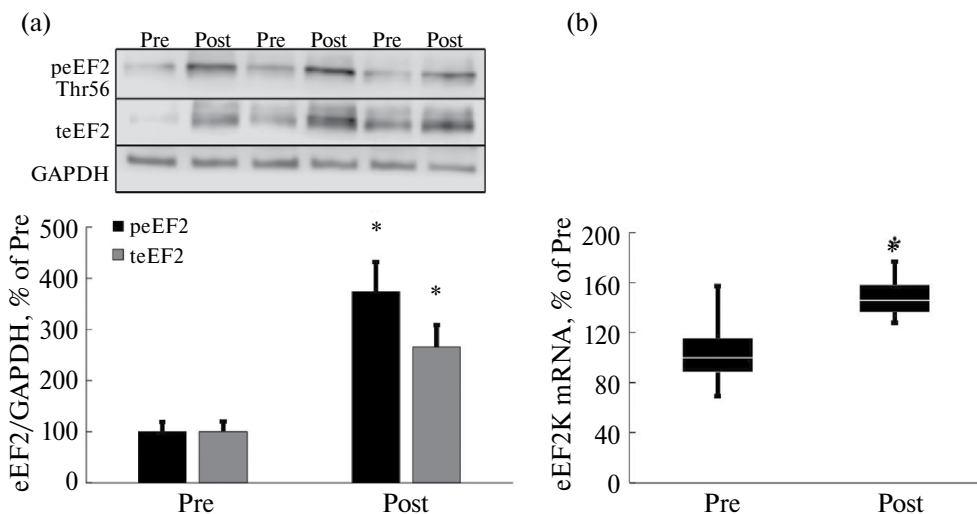
Фактор элонгации трансляции 2 (eEF2) играет ведущую роль в регуляции процесса наращивания полипептидной цепи, катализируя процесс транслокации (перемещение рибосомы по мРНК) [39]. Киназа eEF2 также является непосредственной мишенью mTORC1. Фосфорилирование eEF2 приводит к ингибированию ее активности, что снижает интенсивность элонгации трансляции [46, 47]. Несмотря на его важную роль в регуляции синтеза белка, активность eEF2 в мышцах человека при функциональной разгрузке ранее не исследовалась. В данной работе впервые показано увеличение в *m. soleus* после 21-суточной АНОГ содержания тотальной eEF2 на 165% ( $p < 0.05$ ) и его фосфорилированной формы (Thr56), которая не способна связываться с рибосомой, на 275% ( $p < 0.05$ ) (рис. 2a). Это ингибирующее фосфорилирование осуществляет киназа элонгационного фактора 2 (eEF2K) [48,49], экспрессия которой после АНОГ была увеличена на 45% ( $p < 0.05$ ) (рис. 2b). Аналогичные изменения происходят в *m. soleus* крыс при вывешивании как на ранних (1-е – 3-и сутки), так и на более поздних (7- – 14-е сутки) этапах разгрузки [50]. Известно, что p70S6K и p90RSK могут фосфорилировать (по Ser366 и Ser359) и таким образом ингибировать eEF2K, что может приводить к увеличению синтеза белка [39, 51]. В нашем эксперименте ингибирование активности eEF2 наблюдается вместе со снижением фосфорилирования p70S6K и p90RSK, что замедляет процесс удлинения полипептидной цепи на рибосоме.

Хорошо известно, что АМФ-зависимая протеинкиназа (АМПК) может снижать анаболические процессы через фосфорилирование TSC2 и Raptor, ингибируя таким образом mTORC1 и синтез белка [52–55]. Помимо ингибирующего действия на mTORC1, АМПК также может регулировать синтез белка посредством ингибирования активности eEF2 через фосфорилирование eEF2K [56]. Мы проанализировали уровень фосфорилирования АМПК (Thr172) и ее субстрата ацетил-КоА-карбоксилазы (АСС) в мыш-

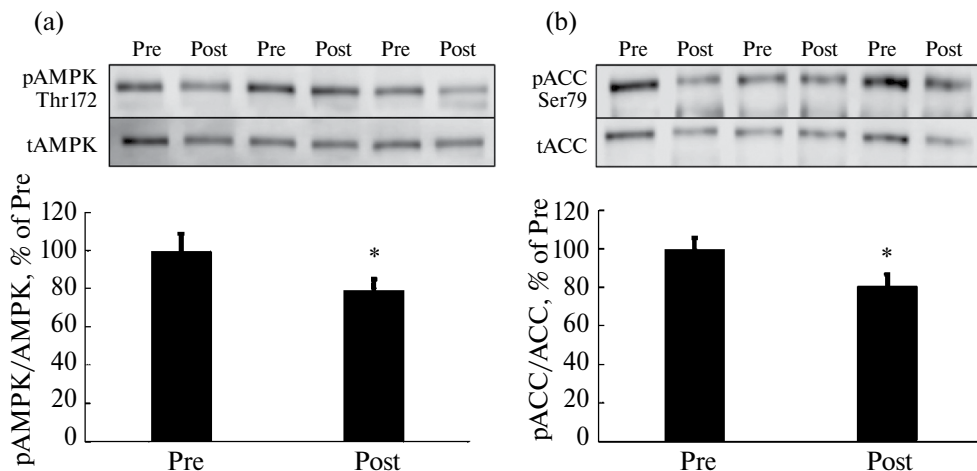


**Рис. 1.** Уровень фосфорилирования P70 (a), P90RSK (b) и 4EBP1 (c). Pre – до АНОГ, Post – после АНОГ. \* – достоверное отличие от Pre.

цах после 21-суточной гипокинезии. Фосфорилирование АМПК (Thr172) снижалось после гипокинезии в *m. soleus* на 21% ( $p < 0.05$ ) (рис. 3а). При этом фосфорилирование ацетил-КоА-карбоксилазы (АСС) (Ser79) также достоверно снижалось в *m. soleus* на 19.5% ( $p < 0.05$ ) (рис. 3б). В литературе нет данных об исследовании АМПК в *m. soleus* при гипокинезии, при этом в *m. vastus lateralis* при гипокинезии не наблюдалось каких либо изменений на 5- [57], 7- [58] и 14-й день гипокинезии [59]. При этом в *m. soleus* человека после 3 суток «сухой» иммерсии наблюдалось достоверное снижение фосфорилирования АМПК [60], а в экспериментах с вывешиванием на грызунах показано, что фосфорилирование АМПК в *m. soleus* снижалось только на начальных этапах функциональной разгрузки [61]. Учитывая тот факт, что при гипокинезии атрофические процессы развиваются медленнее, чем в условиях «сухой» иммерсии, поскольку при АНОГ сохраняется, хоть и небольшое, опорное воздействие [8], полученные нами данные хорошо согласуются с имеющимися сведениями из литературы по фосфорилированию АМПК в *m. soleus* и указывают на важную роль АМПК в сигнальных событиях при разгрузке именно в познотонических мышцах. Изначально мы предполагали,



**Рис. 2.** Уровень фосфорилирования и содержания тотальной формы eEF2 (а). Экспрессия мРНК eEF2K (б). Pre – до АНОГ, Post – после АНОГ. \* – достоверное отличие от Pre.

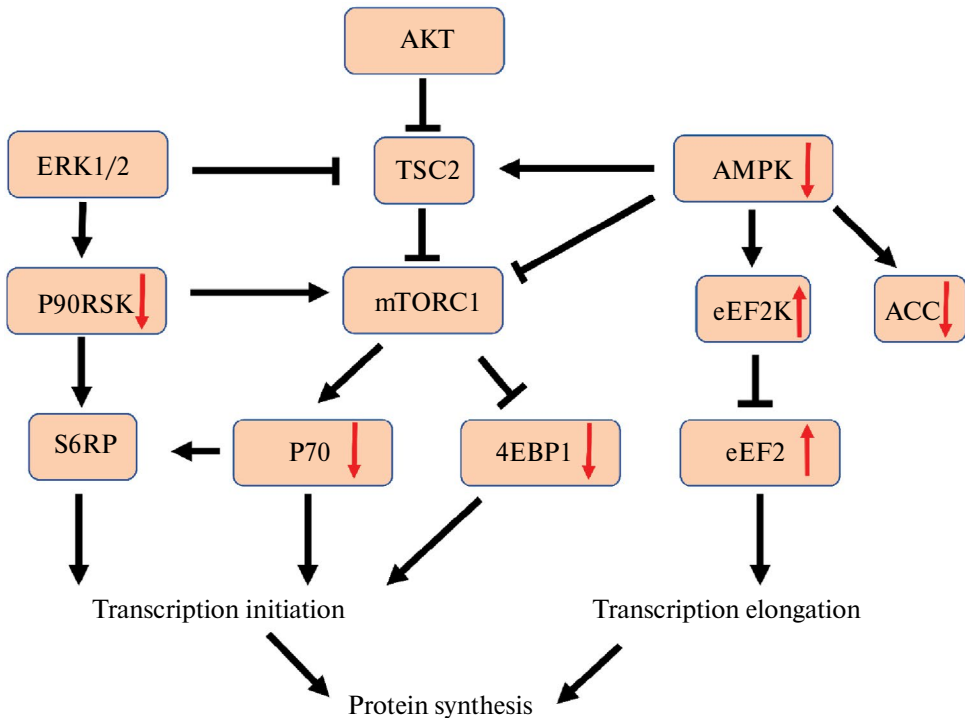


**Рис. 3.** Уровень фосфорилирования AMPK (а) и ACC (б). Pre – до АНОГ, Post – после АНОГ. \* – достоверное отличие от Pre.

что снижение фосфорилирования p70S6K связано с ростом фосфорилирования AMPK. Полученные нами данные это предположение опровергли. Другим возможным активатором mTORC1 является протеинкиназа В (АКТ), которая фосфорилирует и инактивирует TSC2, блокирующий работу mTORC1 [39, 62]. Поскольку нами ранее было показано снижение фосфорилирования АКТ (Ser473) в условиях АНОГ [7], мы пред-

полагаем, что снижение активности p70S6k после 21-суточной АНОГ связано именно со снижением фосфорилирования АКТ.

Проведенное нами исследование показало, что атрофические изменения в *m. soleus* человека при 21-суточной АНОГ сопровождаются снижением активности ключевых анаболических маркеров p70S6k, p90RSK, 4EBP1, eEF2 и AMPK (рис. 4), что в большей степени соотносится с данными, полученными на *m. soleus* грызунов при моделировании функциональной разгрузки.



**Рис. 4.** Факторы регуляции инициации и элонгации трансляции (адаптировано из Mirzoev и соавт. [63]). АКТ – протеинкиназа В; АМФК – АМФ-активируемая протеинкиназа; eEF2K – киназа фактора элонгации эукариот 2; mTORC1 – мишень рапамицина у млекопитающих – комплекс 1; p70S6K – рибосомальная киназа p70; p90RSK – рибосомальная киназа p90; gpS6 – рибосомальный белок S6; TSC2 – комплекс туберозного склероза 2; 4EBP1 – белок, связывающий фактор инициации трансляции 4E. Красными стрелками обозначены изменения фосфорилирования и содержания, изученные в данной статье.

Таким образом, наше исследование вносит вклад в понимание механизмов развития мышечной атрофии человека и применимости полученных на животных данных в поиске возможных фармакологических мишеней для ее предотвращения при космическом полете, клиническом постельном режиме и иммобилизации.

#### БЛАГОДАРНОСТИ

Мы глубоко благодарим Е. С. Томиловскую, А. В. Шпакова, Д. В. Попова за организацию и проведение экспериментов и содействие в получении образцов мышечной ткани, а также Е. М. Леднева и Т. Ф. Вепхвадзе за проведение игольчатой биопсии.



## ВКЛАДЫ АВТОРОВ

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

## ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Данная работа финансировалась за счет средств РФФИ в рамках научного проекта № 22–75–00065. Никаких дополнительных грантов на проведение или руководство данным конкретным исследованием получено не было.

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все исследования проводились в соответствии с принципами биомедицинской этики, изложенными в Хельсинкской декларации 1964 г. и последующих поправках к ней. Они также были одобрены Комитетом по биомедицинской этике Института медико-биологических проблем РАН, протокол № 621 от 8 августа 2022 г.

Каждый участник исследования дал добровольное письменное информированное согласие после получения разъяснений о потенциальных рисках и преимуществах, а также о характере предстоящего исследования.

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Baldwin KM, Haddad F (2002) Skeletal muscle plasticity: cellular and molecular responses to altered physical activity paradigms. *Am J Phys Med Rehabil* 81(11 Suppl): S40–51. <https://doi.org/10.1097/01.PHM.0000029723.36419.0D>
2. Fluck M, Hoppeler H (2003) Molecular basis of skeletal muscle plasticity – from gene to form and function. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 146:159–216. <https://doi.org/10.1007/s10254-002-0004-7>
3. Sharlo K, Tyganov SA, Tomilovskaya E, Popov DV, Saveko AA, Shenkman BS (2021) Effects of Various Muscle Disuse States and Countermeasures on Muscle Molecular Signaling. *Int J Mol Sci* 23(1): <https://doi.org/10.3390/ijms23010468>
4. Koryak YA (2014) Influence of simulated microgravity on mechanical properties in the human triceps surae muscle in vivo. I: effect of 120 days of bed-rest without physical training on human muscle musculo-tendinous stiffness and contractile properties in young women. *Eur J Appl Physiol* 114(5): 1025–1036. <https://doi.org/10.1007/s00421-014-2818-9>
5. Holt JA, Macias BR, Schneider SM, Watenpaugh DE, Lee SMC, Chang DG, Hargens AR (2016) WISE2005: Aerobic and resistive countermeasures prevent paraspinal muscle deconditioning during 60-day bed rest in women. *J Appl Physiol* 120(10): 1215–1222. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00532.2015>
6. Akima H, Kubo K, Imai M, Kanehisa H, Suzuki Y, Gunji A, Fukunaga T (2001) Inactivity and muscle: effect of resistance training during bed rest on muscle size in the lower limb. *Acta Physiol Scand* 172(4): 269–278. <https://doi.org/10.1046/j.1365-201x.2001.00869.x>
7. Belova SP, Zaripova KA, Tyganov SA, Turtikova OV, Shenkman BS (2023) Expression of E3-ubiquitin ligases MuRF-1 and Mafk in human postural and locomotor muscles during head-down hypokinesia. *Aviakosmi Ekol Medi* 57(3): 29–36. <https://doi.org/10.21687/0233-528X-2023-57-3-29-36>
8. Shenkman BS, Kozlovskaya IB (2019) Cellular Responses of Human Postural Muscle to Dry Immersion. *Front Physiol* 10: 187. <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.00187>

9. *Hikida RS, Gollnick PD, Dudley GA, Convertino VA, Buchanan P* (1989) Structural and metabolic characteristics of human skeletal muscle following 30 days of simulated microgravity. *Aviat Space Environ Med* 60(7): 664–670.  
<https://doi.org/>
10. *Bamman MM, Clarke MS, Feeback DL, Talmadge RJ, Stevens BR, Lieberman SA, Greenisen MC* (1998) Impact of resistance exercise during bed rest on skeletal muscle sarcopenia and myosin isoform distribution. *J Appl Physiol* (1985) 84(1): 157–163.  
<https://doi.org/10.1152/jappl.1998.84.1.157>
11. *Clarke MS, Bamman MM, Feeback DL* (1998) Bed rest decreases mechanically induced myofiber wounding and consequent wound-mediated FGF release. *J Appl Physiol* (1985) 85(2): 593–600.  
<https://doi.org/10.1152/jappl.1998.85.2.593>
12. *Shenkman BS, Belozeroва IN, Matveeva OA, Mazin MG, Nemirovskaya TL, Kiseleva VN* (2003) Plasticity of cellular and tissue structures of human m. soleus under conditions of prolonged hypokinesia. *Biological Membranes* 20(1): 78–87.  
<https://doi.org/>
13. *Watenpaugh DE* (2016) Analogs of microgravity: head-down tilt and water immersion. *J Appl Physiol* (1985) 120(8): 904–914.  
<https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00986.2015>
14. *Marusic U, Narici M, Simunic B, Pisot R, Ritzmann R* (2021) Nonuniform loss of muscle strength and atrophy during bed rest: a systematic review. *J Appl Physiol* (1985) 131(1): 194–206.  
<https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00363.2020>
15. *Demangel R, Treffel L, Py G, Brioche T, Pagano AF, Bareille MP, Beck A, Pessemesse L, Candau R, Gharib C, Chopard A, Millet C* (2017) Early structural and functional signature of 3-day human skeletal muscle disuse using the dry immersion model. *J Physiol* 595(13): 4301–4315.  
<https://doi.org/10.1113/JP273895>
16. *Jackman RW, Kandarian SC* (2004) The molecular basis of skeletal muscle atrophy. *Am J Physiol Cell Physiol* 287(4): C834–843.  
<https://doi.org/10.1152/ajpcell.00579.2003>
17. *Bodine SC* (2013) Disuse-induced muscle wasting. *Int J Biochem Cell Biol* 45(10): 2200–2208.  
<https://doi.org/10.1016/j.biocel.2013.06.011>
18. *Phillips SM, McGlory C* (2014) CrossTalk proposal: The dominant mechanism causing disuse muscle atrophy is decreased protein synthesis. *J Physiol* 592(24): 5341–5343.  
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.2014.273615>
19. *Reid MB, Judge AR, Bodine SC* (2014) CrossTalk opposing view: The dominant mechanism causing disuse muscle atrophy is proteolysis. *J Physiol* 592(24): 5345–5347.  
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.2014.279406>
20. *Levine S, Nguyen T, Taylor N, Friscia ME, Budak MT, Rothenberg P, Zhu J, Sachdeva R, Sonnad S, Kaiser LR, Rubinstein NA, Powers SK, Shrager JB* (2008) Rapid disuse atrophy of diaphragm fibers in mechanically ventilated humans. *N Engl J Med* 358(13): 1327–1335.  
<https://doi.org/10.1056/NEJMoa070447>
21. *Levine S, Biswas C, Dierov J, Barsotti R, Shrager JB, Nguyen T, Sonnad S, Kucharchuk JC, Kaiser LR, Singhal S, Budak MT* (2011) Increased proteolysis, myosin depletion, and atrophic AKT-FOXO signaling in human diaphragm disuse. *Am J Respir Crit Care Med* 183(4): 483–490.  
<https://doi.org/10.1164/rccm.200910-1487OC>
22. *Hussain SN, Mofarrah M, Sigala I, Kim HC, Vassilakopoulos T, Maltais F, Bellenis I, Chaturvedi R, Gottfried SB, Metrakos P, Danialou G, Matecki S, Jaber S, Petrof BJ, Goldberg P* (2010) Mechanical ventilation-induced diaphragm disuse in humans triggers autophagy. *Am J Respir Crit Care Med* 182(11): 1377–1386.  
<https://doi.org/10.1164/rccm.201002-0234OC>
23. *DeRuisseau KC, Kavazis AN, Deering MA, Falk DJ, Van Gammeren D, Yimlamai T, Ordway GA, Powers SK* (2005) Mechanical ventilation induces alterations of the ubiquitin-proteasome pathway in the diaphragm. *J Appl Physiol* (1985) 98(4): 1314–1321.  
<https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00993.2004>
24. *Jones SW, Hill RJ, Krasney PA, O'Conner B, Peirce N, Greenhaff PL* (2004) Disuse atrophy and exercise rehabilitation in humans profoundly affects the expression of genes associated with the regulation of skeletal muscle mass. *FASEB J* 18(9): 1025–1027.  
<https://doi.org/10.1096/fj.03-1228fje>
25. *De Boer MD, Selby A, Atherton P, Smith K, Seynnes OR, Maganaris CN, Maffulli N, Movin T, Narici MV, Rennie MJ* (2007) The temporal responses of protein synthesis, gene expression and cell signalling in human quadriceps muscle and patellar tendon to disuse. *J Physiol* 585(Pt 1): 241–251.  
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.2007.142828>

26. *Abadi A, Glover EI, Isfort RJ, Raha S, Safdar A, Yasuda N, Kaczor JJ, Melov S, Hubbard A, Qu X, Phillips SM, Tarnopolsky M* (2009) Limb immobilization induces a coordinate down-regulation of mitochondrial and other metabolic pathways in men and women. *PLoS One* 4(8): e6518. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006518>
27. *Gustafsson T, Osterlund T, Flanagan JN, von Walden F, Trappe TA, Linnehan RM, Tesch PA* (2010) Effects of 3 days unloading on molecular regulators of muscle size in humans. *J Appl Physiol* (1985) 109(3): 721–727. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00110.2009>
28. *Reich KA, Chen YW, Thompson PD, Hoffman EP, Clarkson PM* (2010) Forty-eight hours of unloading and 24 h of reloading lead to changes in global gene expression patterns related to ubiquitination and oxidative stress in humans. *J Appl Physiol* (1985) 109(5): 1404–1415. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00444.2010>
29. *Wall BT, Dirks ML, Snijders T, Senden JM, Dolmans J, van Loon LJ* (2014) Substantial skeletal muscle loss occurs during only 5 days of disuse. *Acta Physiol (Oxf)* 210(3): 600–611. <https://doi.org/10.1111/apha.12190>
30. *Senf SM, Dodd SL, McClung JM, Judge AR* (2008) Hsp70 overexpression inhibits NF-kappaB and Foxo3a transcriptional activities and prevents skeletal muscle atrophy. *FASEB J* 22(11): 3836–3845. <https://doi.org/10.1096/fj.08-110163>
31. *Nikawa T, Ishidoh K, Hirasaka K, Ishihara I, Ikemoto M, Kano M, Kominami E, Nonaka I, Ogawa T, Adams GR, Baldwin KM, Yasui N, Kishi K, Takeda S* (2004) Skeletal muscle gene expression in space-flown rats. *FASEB J* 18(3): 522–524. <https://doi.org/10.1096/fj.03-0419fje>
32. *Andrianjafinony T, Dupre-Aucouturier S, Letexier D, Couchoux H, Desplanches D* (2010) Oxidative stress, apoptosis, and proteolysis in skeletal muscle repair after unloading. *Am J Physiol Cell Physiol* 299(2): C307–315. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00069.2010>
33. *Phillips SM, McGlory C* (2014) Rebuttal from Stuart M. Phillips and Chris McGlory. *J Physiol* 592(24): 5349. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2014.284406>
34. *Reid MB, Judge AR, Bodine SC* (2014) Rebuttal from Michael B. Reid, Andrew R. Judge and Sue C. Bodine. *J Physiol* 592(24): 5351. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2014.284398>
35. *Miokovic T, Armbrecht G, Felsenberg D, Belavy DL* (2012) Heterogeneous atrophy occurs within individual lower limb muscles during 60 days of bed rest. *J Appl Physiol* (1985) 113(10): 1545–1559. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00611.2012>
36. *Goodman CA, Mabrey DM, Frey JW, Miu MH, Schmidt EK, Pierre P, Hornberger TA* (2011) Novel insights into the regulation of skeletal muscle protein synthesis as revealed by a new non-radioactive in vivo technique. *FASEB J* 25(3): 1028–1039. <https://doi.org/10.1096/fj.10-168799>
37. *Hodson N, West DWD, Philp A, Burd NA, Moore DR* (2019) Molecular regulation of human skeletal muscle protein synthesis in response to exercise and nutrients: a compass for overcoming age-related anabolic resistance. *Am J Physiol Cell Physiol* 317(6): C1061–C1078. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00209.2019>
38. *Schiaffino S, Reggiani C, Akimoto T, Blaauw B* (2020) Molecular Mechanisms of Skeletal Muscle Hypertrophy. *J Neuromuscul Dis* 10.3233/JND-200568
39. *Mirzoev TM, Shenkman BS* (2018) Regulation of Protein Synthesis in Inactivated Skeletal Muscle: Signal Inputs, Protein Kinase Cascades, and Ribosome Biogenesis. *Biochemistry (Mosc)* 83(11): 1299–1317. <https://doi.org/10.1134/S0006297918110020>
40. *Brocca L, Cannavino J, Coletto L, Biolo G, Sandri M, Bottinelli R, Pellegrino MA* (2012) The time course of the adaptations of human muscle proteome to bed rest and the underlying mechanisms. *J Physiol* 590(20): 5211–5230. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2012.240267>
41. *Gordon BS, Kelleher AR, Kimball SR* (2013) Regulation of muscle protein synthesis and the effects of catabolic states. *Int J Biochem Cell Biol* 45(10): 2147–2157. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2013.05.039>
42. *Bodine SC* (2022) The role of mTORC1 in the regulation of skeletal muscle mass. *Fac Rev* 11:32. <https://doi.org/10.12703/r/11-32>
43. *Tyganov SA, Mochalova E, Belova S, Sharlo K, Rozhkov S, Kalashnikov V, Turtikova O, Mirzoev T, Shenkman B* (2021) Plantar mechanical stimulation attenuates protein synthesis decline in disused skeletal muscle via modulation of nitric oxide level. *Sci Rep* 11(1): Art n 9806 <https://doi.org/10.1038/S41598-021-89362-6>

44. *Lysenko EA, Turtikova OV, Kachaeva EV, Ushakov IB, Shenkman BS* (2010) Time course of ribosomal kinase activity during hindlimb unloading. *Dokl Biochem Biophys* 434:223–226.  
<https://doi.org/10.1134/S1607672910050017>
45. *Zaripova KA, Kalashnikova EP, Belova SP, Kostrominova TY, Shenkman BS, Nemirovskaya TL* (2021) Role of Pannexin 1 ATP-Permeable Channels in the Regulation of Signaling Pathways during Skeletal Muscle Unloading. *Int J Mol Sci* 22(19): 10.3390/ijms221910444
46. *Goodman CA* (2019) Role of mTORC1 in mechanically induced increases in translation and skeletal muscle mass. *J Appl Physiol* (1985) 127(2): 581–590.  
<https://doi.org/10.1152/jappphysiol.01011.2018>
47. *Browne GJ, Proud CG* (2004) A novel mTOR-regulated phosphorylation site in elongation factor 2 kinase modulates the activity of the kinase and its binding to calmodulin. *Mol Cell Biol* 24(7): 2986–2997.  
[https://doi.org/10.1128/MCB.24.7.2986–2997.2004](https://doi.org/10.1128/MCB.24.7.2986-2997.2004)
48. *Ryazanov AG, Davydova EK* (1989) Mechanism of elongation factor 2 (EF-2) inactivation upon phosphorylation. Phosphorylated EF-2 is unable to catalyze translocation. *FEBS Lett* 251(1–2): 187–190.  
<https://doi.org/>
49. *Ryazanov AG, Spirin AS* (1990) Phosphorylation of elongation factor 2: a key mechanism regulating gene expression in vertebrates. *New Biol* 2(10): 843–850.  
<https://doi.org/>
50. *Vilchinskaya N, Lim WF, Belova S, Roberts TC, Wood MJA, Lomonosova Y* (2023) Investigating Eukaryotic Elongation Factor 2 Kinase/Eukaryotic Translation Elongation Factor 2 Pathway Regulation and Its Role in Protein Synthesis Impairment during Disuse-Induced Skeletal Muscle Atrophy. *Am J Pathol* 193(6): 813–828.  
<https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2023.02.009>
51. *Wang X, Li W, Williams M, Terada N, Alessi DR, Proud CG* (2001) Regulation of elongation factor 2 kinase by p90(RSK1) and p70 S6 kinase. *EMBO J* 20(16): 4370–4379.  
<https://doi.org/10.1093/emboj/20.16.4370>
52. *Bolster DR, Crozier SJ, Kimball SR, Jefferson LS* (2002) AMP-activated protein kinase suppresses protein synthesis in rat skeletal muscle through down-regulated mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling. *J Biol Chem* 277(27): 23977–23980.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.C200171200>
53. *Mounier R, Lantier L, Leclerc J, Sotiropoulos A, Pende M, Daegelen D, Sakamoto K, Foretz M, Viollet B* (2009) Important role for AMPK $\alpha$ 1 in limiting skeletal muscle cell hypertrophy. *FASEB J* 23(7): 2264–2273.  
<https://doi.org/10.1096/fj.08-119057>
54. *Wood LK, Kayupov E, Gumucio JP, Mendias CL, Clafflin DR, Brooks SV* (2014) Intrinsic stiffness of extracellular matrix increases with age in skeletal muscles of mice. *J Appl Physiol* (1985) 117(4): 363–369.  
<https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00256.2014>
55. *Moller AB, Vendelbo MH, Christensen B, Clasen BF, Bak AM, Jorgensen JO, Moller N, Jessen N* (2015) Physical exercise increases autophagic signaling through ULK1 in human skeletal muscle. *J Appl Physiol* (1985) 118(8): 971–979.  
<https://doi.org/10.1152/jappphysiol.01116.2014>
56. *Thomson DM* (2018) The Role of AMPK in the Regulation of Skeletal Muscle Size, Hypertrophy, and Regeneration. *Int J Mol Sci* 19(10): 10.3390/ijms19103125
57. *Marshall RN, Smeuninx B, Seabright AP, Morgan PT, Atherton PJ, Philp A, Breen L* (2022) No effect of five days of bed rest or short-term resistance exercise prehabilitation on markers of skeletal muscle mitochondrial content and dynamics in older adults. *Physiol Rep* 10(13): e15345.  
<https://doi.org/10.14814/phy2.15345>
58. *Ringholm S, Bienso RS, Kuilerich K, Guadalupe-Grau A, Aachmann-Andersen NJ, Saltin B, Plomgaard P, Lundby C, Wojtaszewski JF, Calbet JA, Pilegaard H* (2011) Bed rest reduces metabolic protein content and abolishes exercise-induced mRNA responses in human skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 301(4): E649–658.  
<https://doi.org/10.1152/ajpendo.00230.2011>
59. *Buso A, Comelli M, Picco R, Isola M, Magnesa B, Piset R, Rittweger J, Salvadego D, Simunic B, Grassi B, Mavelli I* (2019) Mitochondrial Adaptations in Elderly and Young Men Skeletal Muscle Following 2 Weeks of Bed Rest and Rehabilitation. *Front Physiol* 10: 474.  
<https://doi.org/10.3389/fphys.2019.00474>
60. *Vilchinskaya NA, Mirzoev TM, Lomonosova YN, Kozlovskaya IB, Shenkman BS* (2015) Human muscle signaling responses to 3-day head-out dry immersion. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 15(3): 286–293.  
<https://doi.org/>

61. *Mirzoev T, Tyganov S, Vilchinskaya N, Lomonosova Y, Shenkman B* (2016) Key Markers of mTORC1-Dependent and mTORC1-Independent Signaling Pathways Regulating Protein Synthesis in Rat Soleus Muscle During Early Stages of Hindlimb Unloading. *Cell Physiol Biochem* 39(3): 1011–1020.  
<https://doi.org/10.1159/000447808>
62. *Glass DJ* (2010) PI3 kinase regulation of skeletal muscle hypertrophy and atrophy. *Curr Top Microbiol Immunol* 346:267–278.  
[https://doi.org/10.1007/82\\_2010\\_78](https://doi.org/10.1007/82_2010_78)
63. *Мирзоев ТМ, Тыганов СА, Ломоносова ЯН, Мусиенко ПЕ, Шенкман ВС* (2015) Сигнальные пути, регулирующие синтез белка в камбаловидной мышце крысы на ранних сроках гравитационной разгрузки. *Рос физиол журн им ИМ Сеченова* 101(11): 1299–1308. [*Mirzoev TM, Tyganov SA, Lomonosova YN, Musienko PE, Shenkman BS* (2015) Signaling Pathways Regulating Protein Synthesis in Rat Soleus Muscle during Early Stages of Hindlimb Unloading. *Russ J Physiol* 101(11): 1299–1308. (In Russ)].  
<https://doi.org/0097-0549/17/4703-0359>

### Key Anabolic Markers in Human *M. Soleus* after 21-Day Head-Down Tilt Bedrest

S. P. Belova<sup>a,\*</sup>, S. A. Tyganov<sup>a</sup>, K. A. Zaripova<sup>a</sup>, and B. S. Shenkman<sup>a</sup>

<sup>a</sup> *Institute of Biomedical Problems, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia*

\**e-mail: swetbell@mail.ru*

Prolonged bed rest can have a significant negative effect on skeletal muscle, leading to muscle wasting and reduced strength. This process can occur in as little as 10 days in healthy individuals, with the loss of muscle mass and strength being particularly pronounced during the first week of immobilization. Head-down tilt bed rest (HDT) is a method used to simulate the physiological changes that occur in weightlessness during spaceflight. This technique involves lying in bed with the head tilted downward. This paper is dedicated to the analysis of key anabolic markers of the soleus muscle during 21 days of HDT BR. The HDT BR experiment was conducted at the Institute of Biomedical Problems, Russian Academy of Sciences. Six healthy male volunteers, aged 25–35 years, were subjected to 21 days of strict bed rest with a tilt angle of  $-6^\circ$ . A needle biopsy of the *m. soleus* was performed using the Bergström method before the start of HDT BR and on day 21 of HDT BR. The biopsy material was immediately frozen in liquid nitrogen for further Western blot and PCR analysis. Examination of mTORC1 substrates showed a significant decrease in p70 and 4EBP1 phosphorylation after HDT BR. We also observed a significant decrease in the phosphorylation of another ribosomal kinase, p90RSK, a significant increase in eEF2 phosphorylation and an increase in eEF2k mRNA expression. In addition, the phosphorylation of AMPK and its substrate ACC decreased after HDT BR. The data obtained in this work support the hypothesis that a decrease in protein synthesis, together with an increase in proteolysis, contributes to the development of human *m. soleus* atrophy after 21 days of HDT BR.

*Keywords:* bedrest, hypokinesia, *m. soleus*, atrophy, protein synthesis