

УДК 612.741.91

АНАЛИЗ РОЛИ КАНАЛОВ Piezo1 В МЕХАНОАНАБОЛИЧЕСКОМ СОПРЯЖЕНИИ В КАМБАЛОВИДНОЙ МЫШЦЕ КРЫСЫ

© 2023 г. К. В. Сергеева^а, С. А. Тыганов^а, В. Е. Калашников^а,
Б. С. Шенкман^а, Т. М. Мирзоев^{а, *}

^аГосударственный научный центр Российской Федерации –
Институт медико-биологических проблем РАН, Москва, 123007 Россия

*e-mail: tmirzoev@yandex.ru

Поступила в редакцию 28.04.2023 г.

После доработки 05.05.2023 г.

Принята к публикации 10.05.2023 г.

Известно, что активация синтеза белка и гипертрофия мышечных волокон в ответ на механическую нагрузку реализуется через анаболический mTORC1-зависимый сигнальный путь. Однако до сих пор не выявлены механосенсоры, посредством которых механический сигнал может восприниматься и далее передаваться на mTORC1-зависимый сигнальный путь (механотрансдукция). Механоактивируемые (МА) ионные каналы являются претендентами на роль таких сарколеммальных механосенсоров. В связи с этим цель работы состояла в исследовании потенциальной роли МА каналов (Piezo1) в активации mTORC1-зависимого пути в изолированной камбаловидной мышце (*m. soleus*) крысы в ответ на механическую нагрузку. Крысы Wistar были разделены на 3 группы: 1) “Контроль” (мышцы животных не подвергались действию ингибитора МА каналов или активатора каналов Piezo1), 2) “Гадолиний” (мышцы животных инкубировались с ингибитором МА каналов – хлоридом гадолиния), 3) “Yoda” (мышцы животных инкубировались с активатором МА каналов Piezo1 – Yoda1). У крыс из каждой группы *m. soleus* из левой конечности инкубировалась в соответствующем растворе без механической нагрузки в виде серии растяжений (resting), а *m. soleus* из правой конечности подвергалась серии растяжений (stretch), а затем инкубировалась в соответствующем растворе. Фосфорилирование мишеней mTORC1 (p70S6K, rpS6, 4E-BP1) в *m. soleus* крысы определяли с помощью электрофореза в ПААГ и иммуноблотинга. Серия растяжений/укорочений изолированной *m. soleus* привела к увеличению фосфорилирования p70S6K, ее субстрата rpS6, а также 4E-BP1 на 38.5, 168 и 112% соответственно по сравнению с мышцей, которая не подвергалась механическому воздействию. Инкубация мышц с гадолинием полностью предотвратила вызванную серией растяжений активацию маркеров mTORC1. Инкубация *m. soleus* в растворе с Yoda1 привела к снижению механозависимого фосфорилирования p70S6K, rpS6 и 4E-BP1 по сравнению с мышцей, которая не подвергалась действию Yoda1. Таким образом, использовавшийся в настоящей работе методический подход не выявил участия Piezo1 в механоанаболическом сопряжении в *m. soleus* крысы.

Ключевые слова: скелетная мышца, механотрансдукция, пассивное растяжение, Piezo1, гадолиний, Yoda1, mTORC1, p70S6K, rpS6, 4E-BP1

DOI: 10.31857/S0233475523050080, **EDN:** NXXYRK

ВВЕДЕНИЕ

Поддержание мышечной массы, имеющее важное значение для здоровья человека и качества его жизни [1], главным образом зависит от динамического баланса синтеза и распада мышечных белков (протеостаз) [2, 3]. Хорошо известно, что механическое напряжение скелетных мышц, наблюдаемое, например, при выполнении резистивных тренировок, увеличивает скорость синтеза мышечных белков и при регулярных тренировках приводит к увеличению количества миофибриллярных белков и гипертрофии мышечных волокон [4]. При этом важно отметить, мышечная ра-

бота/механическая нагрузка *per se* способна смещать протеостаз в сторону синтеза белка и вызывать гипертрофию мышц вне зависимости от действия гормонов (гормон роста, инсулин) и наличия в крови питательных веществ (эксперименты с голодающими животными) [5]. Следовательно, волокна скелетных мышц млекопитающих обладают специальными механосенсорными структурами, которые воспринимают механическое напряжение и преобразуют его в биохимические каскады, регулирующие белковый синтез (анаболическая механотрансдукция). Исследования показывают, что ключевая роль в активации

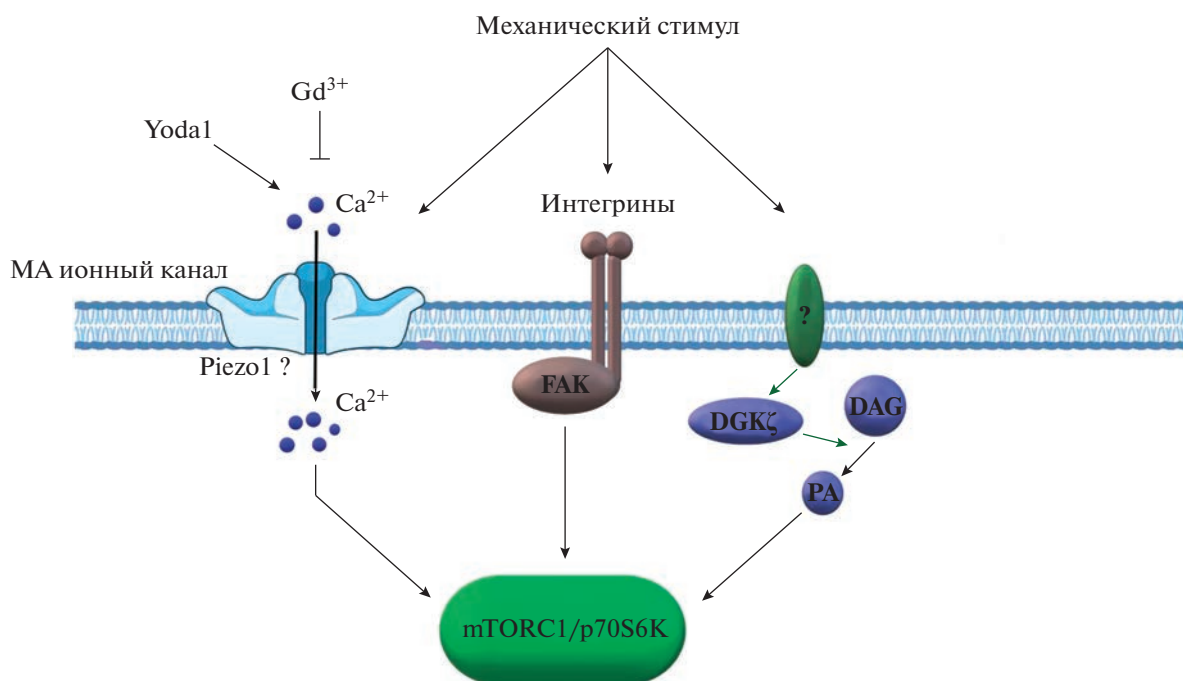


Рис. 1. Схема, иллюстрирующая возможные механизмы механоанаболического сопряжения в скелетной мышце млекопитающих. В настоящее время роль каналов Piezo1 в механоанаболическом сопряжении в скелетной мышце не установлена. Обозначения: МА — механоактивируемый, FAK — киназа фокальных контактов, DAG — диацилглицерин, DGK ζ — диацилглицеролкиназа (изоформа дзета), PA — фосфатидная кислота, mTORC1 — мишень рапамицина у млекопитающих (комплекс 1), p70S6K — киназа p70 рибосомального белка S6.

синтеза белка в скелетной мышце в ответ на механические стимулы принадлежит белковому комплексу mTORC1 (мишени рапамицина у млекопитающих, комплекс 1) [6–8]. Об активности mTORC1 судят по фосфорилированию его ключевых субстратов — p70S6K (рибосомальная киназа p70) и 4E-BP1 (белок, связывающий фактор инициации трансляции 4E) [9]. В свою очередь, активность p70S6K определяется путем оценки фосфорилирования рибосомального белка S6 (rpS6) [9]. Комплекс mTORC1 считается ключевым звеном в передаче механического сигнала к процессам, связанным с синтезом мышечных белков, что подтверждается серией элегантных экспериментов, показавших, что активация mTORC1 прежде всего зависит от механических воздействий и не зависит от влияния системных ростовых факторов [10, 11]. На сегодняшний день идентифицировано несколько различных механосенсорных структур/механизмов, обеспечивающих механочувствительность мышечных волокон (рис. 1). Тем не менее, консенсуса в рамках научного сообщества относительно полного понимания молекулярного механизма передачи механического сигнала в мышечных клетках (волокнах) до сих пор не достигнуто. Предыдущие исследования показали, что механическое напряжение может стимулировать синтез мышечного белка посредством еще не идентифицированных механосенсорных структур, действующих на дзета-изофор-

му диацилглицеролкиназы (DGK ζ), что приводит к превращению диацилглицерина (DAG) в фосфатидную кислоту (PA), которая непосредственно активирует mTORC1 [12] (рис. 1). Существуют также данные о том, что в активации анаболического сигналинга в мышечных волокнах в ответ на механическую нагрузку может принимать участие связанная с белками интегринами киназа фокальных контактов (FAK) [13] (рис. 1). При этом, вероятно, решающую роль в быстрой передаче механических сигналов в живых клетках играют механоактивируемые ионные каналы. Работая в миллисекундном масштабе времени, они находятся в самом начале сигнальных путей, участвующих в процессе механотрансдукции. Наше внимание привлекли каналы Piezo1, поскольку ранее было показано, что механоактивируемые каналы (stretch-activated channels) с неустановленной молекулярной природой могут участвовать в передаче механических стимулов к mTORC1-зависимому анаболическому сигнальному пути [14]. Одним из наиболее вероятных претендентов на роль таких механоактивируемых (МА) ионных каналов является недавно идентифицированный в скелетной мышце мембранный белок Piezo1 [15] (рис. 1). В связи с этим, цель работы состояла в исследовании потенциальной роли МА каналов (Piezo1) в активации mTORC1-зависимого пути в изолированной камбаловидной мышце (*m. soleus*) крысы в ответ на механическую нагрузку.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Организация эксперимента. В исследовании использовались самцы крыс Wistar массой 190 ± 10 г. Животные содержались в виварных условиях, получая стандартный корм и воду *ad libitum*. Крысы были разделены на 3 группы (по 7 животных в каждой группе): 1) группа без добавления ингибитора или активатора механоактивируемых каналов в раствор с изолированной мышцей (“Контроль”), 2) группа животных с добавлением хлорида гадолиния (ингибитор механоактивируемых каналов) в раствор с изолированной мышцей (“Гадолиний”) и 3) группа с добавлением активатора каналов Piezo1 в раствор с изолированной мышцей (“Yoda”). В качестве активатора каналов Piezo1 использовался препарат Yoda1 (CAS 448947-81-7, Tocris Bioscience, Великобритания) с конечной концентрации в растворе 10 мкМ. Конечная концентрация хлорида гадолиния (sc-224004, Santa Cruz Biotechnology, США) в растворе также составляла 10 мкМ. Под изофлурановым наркозом у животных извлекались левая и правая камбаловидные мышцы. В каждой группе мышца из левой конечности оставалась в растворе Рингера–Кребса в состоянии покоя (resting), а мышца из правой конечности подвергалась механической нагрузке в виде цикла пассивных растяжений (stretch) согласно протоколу, изложенному в работе [16]. Yoda1 и хлорид гадолиния добавлялись в растворы с обеими мышцами соответствующей группы. Программа эксперимента и все манипуляции с животными были одобрены комиссией по биомедицинской этике Института медико-биологических проблем РАН (протокол № 632 от 18.01.2023 г.).

Механическая нагрузка изолированной мышцы в виде цикла пассивных растяжений. Перед экстирпацией *m. soleus* измерялась оптимальная длина данной мышцы *in situ* с помощью цифрового штангенциркуля, располагая коленный и голеностопный суставы под прямым углом. Далее мышцу извлекали из животного и помещали в охлажденный раствор Рингера–Кребса (138 мМ NaCl, 5 мМ KCl, 1 мМ NaH_2PO_4 , 2 мМ CaCl_2 , 2 мМ MgCl_2 , 24 мМ NaHCO_3 , 11 мМ глюкозы) с постоянной перфузией карбогеном (95% O_2 + 5% CO_2) и инкубировали в течение 30 мин. После чего на одной из мышц завязывали двойной простой узел вокруг дистального и проксимального концов мышцы вблизи мышечно-сухожильного соединения для прикрепления мышцы к датчику силы с одного конца и к фиксированному крючку с другого конца в ванночке с регулируемой температурой (28°C) (Aurora Scientific Bath 809C, Канада). Оптимальную длину мышцы (L_0) заново определяли с помощью серии одиночных сокращений (0.5 мс, 10 В). Вторая мышца при этом все время находилась в тех же условиях, но не прикреплялась к

устройству растяжения и все время теста находилась в покое. Мышцу растягивали в автоматическом режиме в течении 300 мс на 5 мм от L_0 , эта длина мышцы удерживалась 1 с после чего возвращалась к L_0 . Между повторами растяжения был задан перерыв в 10 с. После 6 таких повторов вводился дополнительный перерыв в 300 с. После 300 с весь цикл повторялся еще 9 раз, длительность всего теста составляла 55 мин. После всего этого цикла обе мышцы помещались на 1 ч в раствор Рингера–Кребса. Это время необходимо для активации mTORC1-зависимого сигнального пути в изолированных мышцах крыс в ответ на серию пассивных растяжений [16]. После этого обе мышцы (покоящаяся и подвергавшаяся растяжениям) быстро высушивались на фильтровальной бумаге и замораживались в жидком азоте для последующего анализа.

Гель-электрофорез в ПААГ и иммуноблоттинг. Для выделения тотальной белковой фракции был использован набор реагентов RIPA Lysis Buffer System (Santa Cruz Biotechnology, США). При этом дополнительно использовались ингибиторы протеаз Complete Protease Inhibitor Cocktail (Santa Cruz Biotechnology), 10 мкг/мл апротинин (Sigma, США), 10 мкг/мл лейпептин (Sigma), 10 мкг/мл пепстатин (Sigma), 20 мкл Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail (Roche, Швейцария), 40 мкл фосфоингибиторный коктейль (Santa Cruz Biotechnology).

Для проведения электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ) образцы разводились в двукратном буфере для образцов (5.4 мМ Tris-HCl (pH 6.8), 4% Ds-Na, 20% глицерин, 10% β -меркаптоэтанол, 0.02% бромфеноловый синий). Электрофорез был проведен в 10% разделяющем ПААГ. Образцы каждой группы загружались на один гель с контрольными образцами. Электрофорез проводили при силе тока 17 мА на гель в мини-системе (Bio-Rad Laboratories, США) при комнатной температуре. Электроперенос белков проводили на нитроцеллюлозную мембрану при 100 В при температуре 4°C в течение 120 мин в системе mini Trans-Blot (Bio-Rad Laboratories). Для контроля ровной загрузки белка мембрана окрашивалась красителем Ponceau S. После электропереноса мембраны инкубировали в растворе 5% сухого молока (Bio-Rad Laboratories) в PBST (PBS + 0.1% Tween 20) в течение 1 ч при комнатной температуре. Инкубация мембран с первичными антителами проводилась в течение ночи при 4°C, со вторичными антителами 1 ч при комнатной температуре. В работе использовались следующие первичные антитела: p-p70S6K (Thr 389) с разведением 1 : 1000 (sc-11759, Santa-Cruz Biotechnology), p70S6K (#9202, 1 : 3000, Cell Signaling, США), p-4E-BP1 (Thr37/46) с разведением 1 : 1000 (#2855, Cell Signaling), 4E-BP-1 (1 : 1000, #9452,

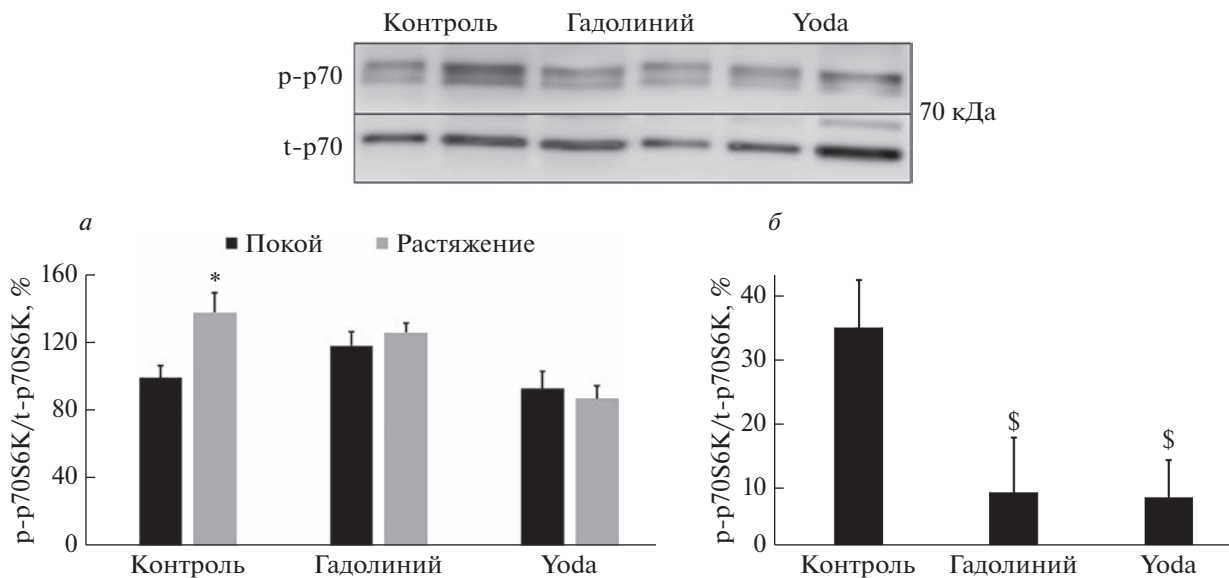


Рис. 2. Фосфорилирование p70S6K (Thr 389) после нахождения изолированной *m. soleus* мышцы в покое (“Покой”), а также через час после серии пассивных растяжений (“Растяжение”) (а). Разница в степени фосфорилирования между покоящейся и растягиваемой мышцей в каждой группе (б). Данные представлены в виде среднего значения $\pm$ стандартная ошибка среднего. “Контроль” — камбаловидные мышцы не подвергались инкубации с гадолинием или Yoda1; “Гадолиний” — камбаловидные мышцы инкубировали с гадолинием; “Yoda” — камбаловидные мышцы инкубировали с Yoda1. * — статистически значимые отличия между покоящейся и растягиваемой мышцей в каждой группе ($p < 0.05$); \$ — статистически значимые отличия от группы “Контроль” ($p < 0.05$).

Cell Signaling), p-rpS6 (Ser 240/244) с разведением 1 : 2000 (#2215, Cell Signaling), rpS6 (#2217, 1 : 3000, Cell Signaling), Anti-GAPDH (#2118, Cell Signaling) в разведении 1 : 10000. В качестве вторичных антител использовали антитела goat anti-rabbit, конъюгированные с пероксидазой хрена (Santa Cruz Biotechnology) в разведении 1 : 50000. Выявление белковых полос осуществляли с помощью набора Clarity Max ECL Western Blotting Substrates (BioRad Laboratories). Анализ белковых полос проводили с использованием C-DiGit Blot Scanner (LI-COR Biosciences, США). Статистическая обработка полученных изображений проводилась с помощью программы Image Studio Digits Ver4.0 (LI-COR Biosciences).

Статистический анализ. Для определения различий между покоящейся мышцей и мышцей, которая подвергалась механической нагрузке (из одного животного) применялся парный *t*-тест. Для установления различий между группами применялся дисперсионный анализ (ANOVA) с последующим тестом Тьюки (Tukey post-hoc test). Статистически значимыми считались различия при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Через час после окончания серии пассивных растяжений в изолированной *m. soleus* крысы наблюдалось достоверное увеличение фосфорилирования киназы p70S6 и ее субстрата рибосомаль-

ного белка S6 (rpS6), а также 4E-BP1 на 38.5%, 168% и 112% соответственно по сравнению с интактной мышцей, которая не подвергалась механическому воздействию (рис. 2а, 3а, 4а). Полученные данные хорошо согласуются с ранее опубликованными работами, в которых исследовалось влияние цикла пассивных растяжений или эксцентрических сокращений скелетных мышц на активацию mTORC1-зависимого сигнального пути. Так, Rindom et al. (2019) показали, что через час после цикла пассивных растяжений изолированной *m. extensor digitorum longus* произошло достоверное увеличение фосфорилирования mTOR (Ser 2448) и rpS6 (Ser235/236) [16]. Активация mTORC1-зависимой сигнализации наблюдалась также через час после окончания серии эксцентрических сокращений изолированных *m. extensor digitorum longus* у мышей [17] и *m. soleus* у крыс [18]. Примечательно, что активация mTORC1 (судя по уровню фосфорилирования его мишеней) в ответ на серию пассивных растяжений, проводившихся в настоящем исследовании, оказалась сопоставима с уровнем активации mTORC1 в *m. vastus lateralis* человека (молодых мужчин) после выполнения произвольных максимальных эксцентрических упражнений [19, 20], несмотря на более гетерогенный состав мышечных волокон в *m. vastus lateralis* по сравнению с *m. soleus*.

Как видно на рис. 2, 3, 4, инкубация изолированных мышц в растворе с хлоридом гадолиния (группа “Гадолиний”) полностью предотвратила

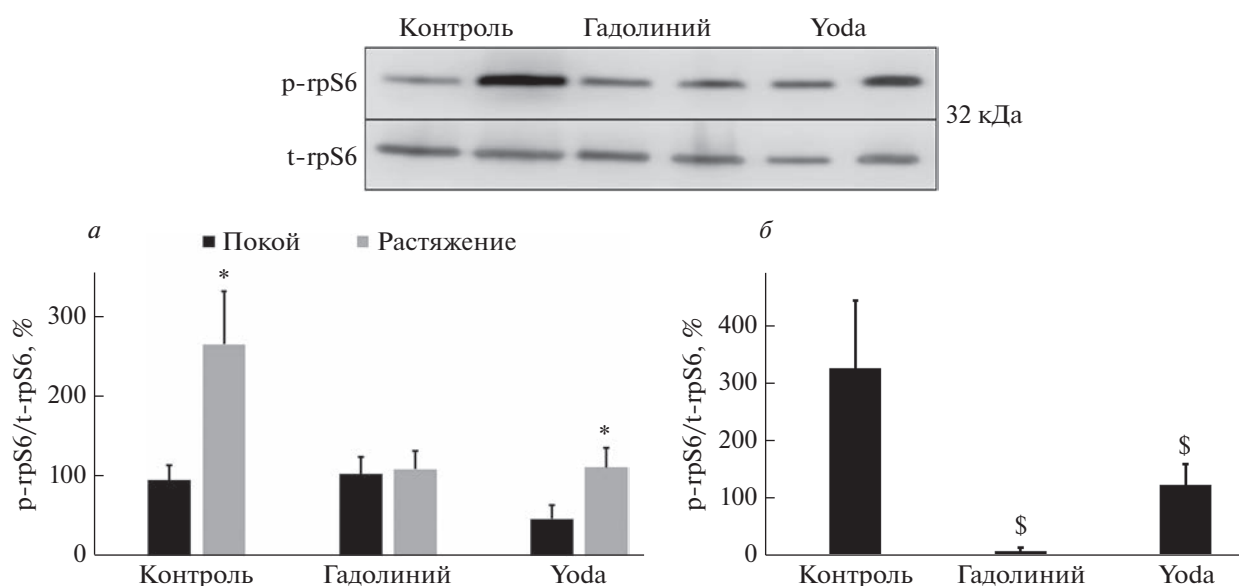


Рис. 3. Фосфорилирование grS6 (Ser 240/244) после нахождения изолированной *m. soleus* мышцы в покое (“Покой”), а также через час после серии пассивных растяжений (“Растяжение”) (а). Разница в степени фосфорилирования между покоящейся и растягиваемой мышцей в каждой группе (б). Данные представлены в виде среднего значения $\pm$ стандартная ошибка среднего. “Контроль” — камбаловидные мышцы не подвергались инкубации с гадолинием или Yoda1; “Гадолиний” — камбаловидные мышцы инкубировались с гадолинием; “Yoda” — камбаловидные мышцы инкубировались с Yoda1. * — статистически значимые отличия между покоящейся и растягиваемой мышцей в каждой группе ($p < 0.05$); \$ — статистически значимые отличия от группы “Контроль” ($p < 0.05$).

вызванную серией растяжений активацию (активирующее фосфорилирование) маркеров mTORC1-зависимого сигнального пути. Такого рода снижение фосфорилирования мишеней mTORC1 в скелетных мышцах крысы в ответ на механические воздействия (серия эксцентрических сокращений) ранее было отмечено после воздействия гадолиния, стрептомицина [14], а также в камбаловидной мышце после функциональной разгрузки [18]. Действительно, исследуя влияние функциональной разгрузки *m. soleus* у крыс на процесс передачи механического сигнала к анаболическим сигнальным путям, был обнаружен интересный феномен: уже после 24 ч функциональной разгрузки задних конечностей анаболический ответ *m. soleus* (интенсивность синтеза белка и уровень фосфорилирования p70S6K) на эксцентрическую нагрузку был значительно ниже, чем у мышцы контрольного животного [18]. При этом обработка солью гадолиния *m. soleus*, изолированной у животного, подвергнутого функциональной разгрузке, не приводило к углублению эффекта снижения анаболического ответа на эксцентрическую нагрузку [18]. Эти результаты могли быть связаны с тем, что механизмы, затронутые действием функциональной разгрузки, сходны с механизмами, измененными под действием гадолиния, и, по-видимому, обусловлены нарушением работы МА ионных каналов. Более того, применение гадолиния способствовало предотвращению активации mTORC1-сигналинга и синтеза

белка в *m. soleus* крысы в период острой 12-часовой реадaptации (которая “воспринимается” атрофированной *m. soleus* как эксцентрическая нагрузка) после функциональной разгрузки [21]. Однако в описанных выше экспериментах не была выявлена молекулярная природа МА каналов. Использование гадолиния, к сожалению, не позволяет установить, какие именно каналные белки могли выступать в роли механосенсора. Более того, гадолиний является относительно неспецифичным ингибитором, поскольку способен блокировать также кальциевые каналы L-типа и депо-управляемые кальциевые каналы, хотя и с меньшей эффективностью [22]. Однако в 2010 году в мышечных клетках нейробластомы [23] и несколько лет назад в мышечных клетках [15, 24] и волокнах [15] были обнаружены трансмембранные белки Piezo1, являющиеся основным компонентом МА ионного канала. Более того, в 2015 году был открыт селективный агонист каналов Piezo1 под названием Yoda1 [25]. В настоящем исследовании инкубация интактных (не подвергавшихся растяжениям) камбаловидных мышц в растворе с Yoda1 в течение 1.5 ч не привела к каким-либо значимым изменениям фосфорилирования mTORC1-зависимых субстратов (рис. 2, 3, 4). Однако инкубация *m. soleus* в растворе со специфическим активатором каналов Piezo1 во время серии пассивных растяжений привела к достоверному снижению механозависимого фосфорилирования p70S6K (рис. 2), grS6 (рис. 3) и 4E-BP1

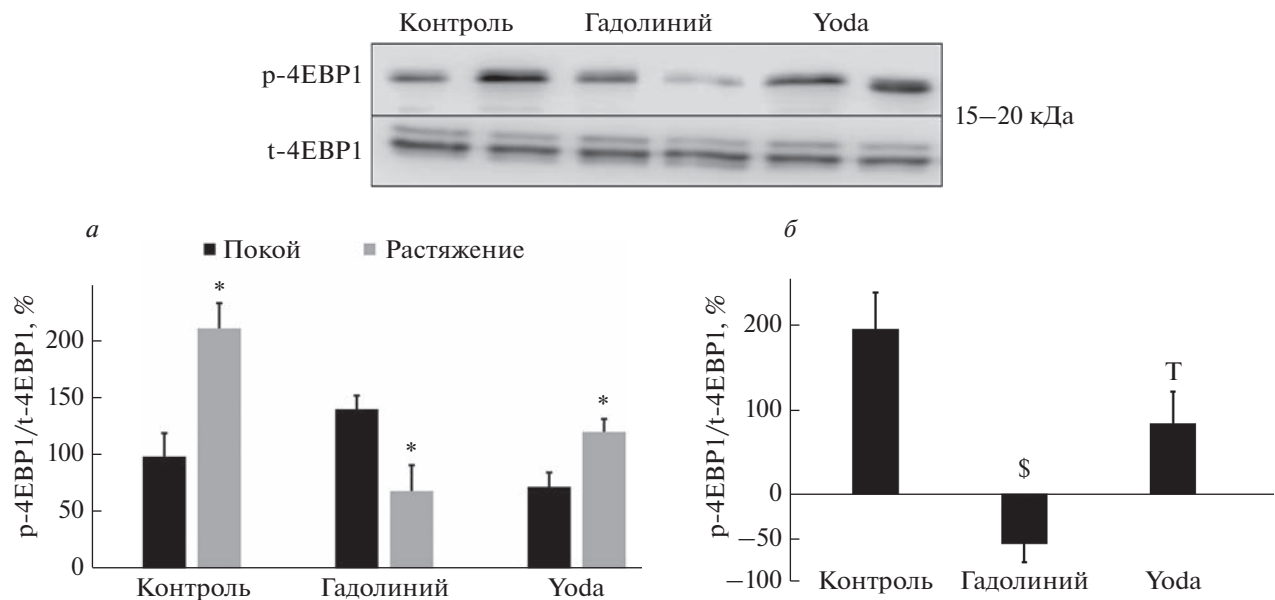


Рис. 4. Фосфорилирование 4EBP1 (Thr 37/46) после нахождения изолированной *m. soleus* мышцы в покое (“Покой”), а также через час после серии пассивных растяжений (“Растяжение”) (а). Разница в степени фосфорилирования между покоящейся и растягиваемой мышцей в каждой группе (б). Данные представлены в виде среднего значения $\pm$ стандартная ошибка среднего. “Контроль” — камбаловидные мышцы не подвергались инкубации с гадолинием или Yoda1; “Гадолиний” — камбаловидные мышцы инкубировались с гадолинием; “Yoda” — камбаловидные мышцы инкубировались с Yoda1. * — статистически значимые отличия между покоящейся и растягиваемой мышцей в каждой группе ($p < 0.05$); \$ — статистически значимые отличия от группы “Контроль” ($p < 0.05$). Т — тенденция к отличию от группы “Контроль” ($p < 0.1$).

(рис. 4) по сравнению с контрольной мышцей (т.е. без инкубации с активатором каналов Piezo1). Установить точные причины наблюдаемого эффекта пока не представляется возможным, однако можно предположить, что между различными механосенсорными элементами (например, механоактивируемыми каналами TRPC (канонические каналы TRP), Piezo1 и FAK (киназа фокальных контактов) мышечного волокна могут устанавливаться “конкурентные” отношения. Ранее в нашей лаборатории было обнаружено, что применение ингибитора FAK предотвращало снижение анаболического ответа (активность mTORC1) в атрофированной *m. soleus* после серии эксцентрических сокращений [26]. Принимая во внимание, что передача сигнала от FAK к анаболическим сигнальным путям может быть связана с активацией актиновых стресс-фибрилл, которые могут влиять на активность МА каналов [27, 28], ответы сигнальных мишеней этих механосенсорных структур могут быть реципрокны. То есть может иметь место взаимозависимость между разными механосенсорными элементами, при которой активация одного механосенсорного элемента подавляет активность другого механосенсорного элемента и наоборот. Мы также предполагаем, что инкубация *m. soleus* в растворе с Yoda1 во время серии пассивных растяжений могла привести к снижению фосфорилирования p70S6K вслед-

ствие активации некоего “предохранительного” механизма, направленного на предотвращение гиперактивации анаболического сигналинга. Кроме того, нельзя исключать возможности того, что непосредственное механическое растяжение и химическая активация (с помощью Yoda1) участвуют в открытии МА канала Piezo1 путем разных механизмов. В связи с этим, влияние Yoda1 не исчерпывает всех эффектов Piezo1. Высказанные выше предположения, несомненно, требуют дальнейших исследований.

Таким образом, инкубация изолированных камбаловидных мышц крысы в растворе с ингибитором механоактивируемых каналов (гадолинием) и активатором канала Piezo1 (Yoda1) после серии механических воздействий в виде мышечных растяжений привела к снижению механозависимой активации mTORC1-зависимого сигнального пути. При применяемом в настоящем исследовании виде механического воздействия, каналы Piezo1, по-видимому, не участвуют в проведении механического сигнала к сигнальному пути mTORC1/p70S6K в изолированной *m. soleus* крысы.

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

Источники финансирования. Работа выполнена за счет гранта Российского научного фонда (проект № 22-75-10046).

Соответствие принципам биоэтики. Все эксперименты, описанные в настоящей статье, были проведены с соблюдением всех биоэтических норм и одобрены комиссией по биомедицинской этике Института медико-биологических проблем РАН (протокол № 632 от 18.01.2023 г.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Srikanthan P., Karlamangla A.S. 2014. Muscle mass index as a predictor of longevity in older adults. *Am. J. Med.* **127** (6), 547–553.
2. Phillips B.E., Hill D.S., Atherton P.J. 2012. Regulation of muscle protein synthesis in humans. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care.* **15** (1), 58–63.
3. Atherton P.J., Greenhaff P.L., Phillips S.M., Bodine S.C., Adams C.M., Lang C.H. 2016. Control of skeletal muscle atrophy in response to disuse: Clinical/preclinical contentions and fallacies of evidence. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **311** (3), E594–E604.
4. Damas F., Phillips S., Vechin F.C., Ugrinowitsch C. 2015. A review of resistance training-induced changes in skeletal muscle protein synthesis and their contribution to hypertrophy. *Sports Med.* **45** (6), 801–807.
5. Goldberg A.L., Etlinger J.D., Goldspink D.F., Jablonski C. 1975. Mechanism of work-induced hypertrophy of skeletal muscle. *Med. Sci. Sports.* **7** (3), 185–198.
6. Bodine S.C., Stitt T.N., Gonzalez M., Kline W.O., Stover G.L., Bauerlein R., Zlotchenko E., Scrimgeour A., Lawrence J.C., Glass D.J., Yancopoulos G.D. 2001. Akt/mTOR pathway is a crucial regulator of skeletal muscle hypertrophy and can prevent muscle atrophy in vivo. *Nat. Cell Biol.* **3** (11), 1014–1019.
7. Drummond M.J., Fry C.S., Glynn E.L., Dreyer H.C., Dhanani S., Timmerman K.L., Volpi E., Rasmussen B.B. 2009. Rapamycin administration in humans blocks the contraction-induced increase in skeletal muscle protein synthesis. *J. Physiol.* **587** (Pt 7), 1535–1546.
8. Goodman C.A., Frey J.W., Mabrey D.M., Jacobs B.L., Lincoln H.C., You J.S., Hornberger T.A. 2011. The role of skeletal muscle mTOR in the regulation of mechanical load-induced growth. *J. Physiol.* **589** (Pt 22), 5485–5501.
9. Goodman C.A. 2019. Role of mTORC1 in mechanically induced increases in translation and skeletal muscle mass. *J. Appl. Physiol.* (1985). **127** (2), 581–590.
10. Hornberger T.A., Stuppard R., Conley K.E., Fedele M.J., Fiorotto M.L., Chin E.R., Esser K.A. 2004. Mechanical stimuli regulate rapamycin-sensitive signalling by a phosphoinositide 3-kinase-, protein kinase B- and growth factor-independent mechanism. *Biochem. J.* **380** (Pt 3), 795–804.
11. Hornberger T.A., Chu W.K., Mak Y.W., Hsiung J.W., Huang S.A., Chien S. 2006. The role of phospholipase D and phosphatidic acid in the mechanical activation of mTOR signaling in skeletal muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **103** (12), 4741–4746.
12. You J.S., Lincoln H.C., Kim C.R., Frey J.W., Goodman C.A., Zhong X.P., Hornberger T.A. 2014. The role of diacylglycerol kinase zeta and phosphatidic acid in the mechanical activation of mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling and skeletal muscle hypertrophy. *J. Biol. Chem.* **289** (3), 1551–1563.
13. Graham Z.A., Gallagher P.M., Cardozo C.P. 2015. Focal adhesion kinase and its role in skeletal muscle. *J. Muscle Res. Cell Motil.* **36** (4–5), 305–315.
14. Spangenburg E.E., McBride T.A. 2006. Inhibition of stretch-activated channels during eccentric muscle contraction attenuates p70S6K activation. *J. Appl. Physiol.* (1985). **100** (1), 129–135.
15. Bosutti A., Giniatullin A., Odnoshivkina Y., Giudice L., Malm T., Sciancalepore M., Giniatullin R., D'Andrea P., Lorenzon P., Bernareggi A. 2021. “Time window” effect of Yoda1-evoked Piezo1 channel activity during mouse skeletal muscle differentiation. *Acta. Physiol. (Oxf).* **233** (4), e13702.
16. Rindom E., Kristensen A.M., Overgaard K., Vissing K., de Paoli F.V. 2019. Activation of mTORC1 signalling in rat skeletal muscle is independent of the EC-coupling sequence but dependent on tension per se in a dose-response relationship. *Acta. Physiol. (Oxf).* **227** (3), e13336.
17. O’Neil T.K., Duffy L.R., Frey J.W., Hornberger T.A. 2009. The role of phosphoinositide 3-kinase and phosphatidic acid in the regulation of mammalian target of rapamycin following eccentric contractions. *J. Physiol.* **587** (Pt 14), 3691–3701.
18. Tyganov S., Mirzoev T., Shenkman B. 2019. An anabolic signaling response of rat soleus muscle to eccentric contractions following hindlimb unloading: A potential role of stretch-activated ion channels. *Int. J. Mol. Sci.* **20** (5), 1165.
19. Gehlert S., Suhr F., Gutsche K., Willkomm L., Kern J., Jacko D., Knicker A., Schiffer T., Wackerhage H., Bloch W. 2015. High force development augments skeletal muscle signalling in resistance exercise modes equalized for time under tension. *Pflügers Arch.* **467** (6), 1343–1356.
20. Rahbek S.K., Farup J., Moller A.B., Vendelbo M.H., Holm L., Jessen N., Vissing K. 2014. Effects of divergent resistance exercise contraction mode and dietary supplementation type on anabolic signalling, muscle protein synthesis and muscle hypertrophy. *Amino Acids.* **46** (10), 2377–2392.
21. Mirzoev T.M., Tyganov S.A., Petrova I.O., Shenkman B.S. 2019. Acute recovery from disuse atrophy: The role of stretch-activated ion channels in the activation of anabolic signaling in skeletal muscle. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **316** (1), E86–E95.
22. Yeung E.W., Allen D.G. 2004. Stretch-activated channels in stretch-induced muscle damage: Role in muscular dystrophy. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **31** (8), 551–556.
23. Coste B., Mathur J., Schmidt M., Earley T.J., Ranade S., Petrus M.J., Dubin A.E., Patapoutian A. 2010. Piezo1 and Piezo2 are essential components of distinct mechanically activated cation channels. *Science.* **330** (6000), 55–60.
24. Tsuchiya M., Hara Y., Okuda M., Itoh K., Nishioka R., Shiomi A., Nagao K., Mori M., Mori Y., Ikenouchi J.,

- Suzuki R., Tanaka M., Ohwada T., Aoki J., Kanagawa M., Toda T., Nagata Y., Matsuda R., Takayama Y., Tomi-naga M., Umeda M. 2018. Cell surface flip-flop of phosphatidylserine is critical for PIEZO1-mediated myotube formation. *Nat. Commun.* **9** (1), 2049.
25. Syeda R., Xu J., Dubin A.E., Coste B., Mathur J., Huynh T., Matzen J., Lao J., Tully D.C., Engels I.H., Petrassi H.M., Schumacher A.M., Montal M., Bandell M., Patapoutian A. 2015. Chemical activation of the mechanotransduction channel Piezo1. *Elife.* **4**, e07369.
 26. Tyganov S.A., Mirzoev T.M., Rozhkov S.V., Shenkman B.S. 2019. Role of the focal adhesion kinase in the anabolic response to the mechanical stimulus in rat's atrophied postural muscle. *Aviakosm. Ekolog. Med.* **53** (4), 74–79.
 27. Sbrana F., Sassoli C., Meacci E., Nosi D., Squecco R., Paternostro F., Tiribilli B., Zecchi-Orlandini S., Francini F., Formigli L. 2008. Role for stress fiber contraction in surface tension development and stretch-activated channel regulation in C2C12 myoblasts. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **295** (1), C160–C172.
 28. Martino F., Perestrelo A.R., Vinarsky V., Pagliari S., Forte G. 2018. Cellular mechanotransduction: From tension to function. *Front. Physiol.* **9**, 824.

Analysis of the Role of Piezo1 Channels in Mechano-Anabolic Coupling in Rat Soleus Muscle

K. V. Sergeeva¹, S. A. Tyganov¹, V. E. Kalashnikov¹, B. S. Shenkman¹, T. M. Mirzoev¹, *

¹*Institute of Biomedical Problems, Russian Academy of Sciences, Moscow, 123007 Russia*

*e-mail: tmirzoev@yandex.ru

It is known that mTORC1-dependent pathway is involved in the activation of muscle protein synthesis and hypertrophy in response to mechanical stress. However, mechanosensors that mediate sensing and transmission of mechanical signals to the mTORC1 signaling pathway (mechanotransduction) are not yet identified. Mechanically activated (MA) ion channels are viewed as potential candidates for the role of such sarcolemmal mechanosensors. The aim of our work was to investigate the potential role of MA channels (Piezo1) in the activation of the mTORC1 pathway in the isolated rat soleus muscle in response to mechanical stress. Wistar rats were divided into 3 groups: 1) "Control" (isolated muscles were not exposed to MA channel inhibitor or Piezo1 channel activator); 2) "Gadolinium" (muscles were incubated with MA channel inhibitor, gadolinium chloride); 3) "Yoda" (muscles were incubated with Yoda1, Piezo1 activator). In rats from each group, the soleus from the left limb was incubated in the appropriate solution without mechanical stress in the form of a passive stretching, and the soleus from the right limb was subjected to passive stretching and then incubated in the appropriate solution. Phosphorylation of mTORC1 targets (p70S6K, rpS6, 4E-BP1) in rat soleus was determined by PAGE and immunoblotting. After passive stretching of the isolated soleus muscle there was an increase in phosphorylation of p70S6K, its substrate, rpS6, as well as 4E-BP1, by 38.5%, 168%, and 112%, respectively, compared to the soleus muscle that was not subjected to stretching. Incubation of the muscles with gadolinium completely prevented the activation of mTORC1 markers caused by stretching. Incubation of the soleus muscle in the solution with Yoda1 resulted in a decrease in the mechano-dependent phosphorylation of p70S6K, rpS6, and 4E-BP1 compared to a muscle that was not exposed to Yoda1. Thus, Piezo1 channels do not appear to play a role in the activation of mTORC1 signaling in rat soleus muscle in response to passive stretching.

Keywords: skeletal muscle, mechanotransduction, passive stretch, Piezo1 channels, gadolinium, Yoda1, mTORC1, p70S6K, rpS6, 4E-BP1