

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Государственный научный центр Российской Федерации
Институт медико-биологических проблем РАН

На правах рукописи

Калашников Виталий Евгеньевич

**ХАРАКТЕР И ФИЗИОЛОГИЧЕСКАЯ ПРИРОДА СПОНТАННОЙ АКТИВНОСТИ
ВОЛОКОН ПОСТУРАЛЬНОЙ МЫШЦЫ КРЫСЫ В УСЛОВИЯХ ГРАВИТАЦИОННОЙ
РАЗГРУЗКИ**

1.5.5 – Физиология человека и животных
Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор биологических наук, профессор Б.С. Шенкман

Москва – 2026

Оглавление

ВВЕДЕНИЕ.....	4
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	10
1.1. Постуральная мускулатура и камбаловидная мышца	10
1.2. Нейрональный контроль тонической активности	11
1.3. Реальная и моделируемая гравитационная разгрузка	13
1.4. Влияние гравитационной разгрузки на нейрохимию спинного мозга.	16
1.5. Электромиография скелетной мышцы	17
1.6. Спонтанная активность камбаловидной мышцы.....	20
1.7. Нарушение спинального контроля и феномен гиперрефлексии у космонавтов	23
1.8. Нервно-мышечная активность при нарушении целостности спинного мозга	24
1.9. Электростимуляция скелетной мышцы	28
1.10. Фармакологическая модуляция содержания мембранных ионных котранспортёров в мотонейронах спинного мозга	30
1.11. Роль нейротрофина BDNF в регуляции нейрональных функций и его связь с ионными котранспортёрами.....	32
1.12. Фармакологическая модуляция TrkB-опосредованной сигнализации в нейронах	33
2. ОРГАНИЗАЦИЯ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	36
2.1. Объект исследований.....	36
2.2. Антиортостатическое вывешивание	37
2.3. Электромиография камбаловидной мышцы крысы	38
2.4. Электростимуляция мышц голени крысы	40
2.5. Фармакологическая модуляция содержания KCC2/NKCC1 в мотонейронах спинного мозга	42
2.6. Фармакологическое ингибирование BDNF-чувствительных TRKb- рецепторов в мотонейронах спинного мозга	42
2.7. Анализ содержания белков	43
2.8. Анализ содержания тотальной и рибосомальной РНК.....	44
2.9. Статистический анализ.....	45
3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	46

3.1. Исследование содержания мембранных ионных котранспортёров KCC2 и NKCC1 в мотонейронах поясничного отдела спинного мозга крыс при функциональной разгрузке и модуляция их содержания в мотонейронах с помощью фармакологических средств.	46
3.2. Регистрация и фармакологическая модуляция биоэлектрической активности камбаловидной мышцы крысы на разных сроках функциональной разгрузки различной продолжительности.	49
3.3. Исследование эффекта применения электромиостимуляции в периоды пониженной электрической активности m.soleus крысы в условиях гравитационной разгрузки.	52
3.4. Исследование роли TRKb-рецепторов в регуляции содержания KCC2 в мотонейронах поясничного отдела спинного мозга крысы.	53
3.5. Анализ ответов сигнальных путей камбаловидной мышцы крысы при фармакологической блокировке спонтанной электрической активности.	60
4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ	66
4.1. Исследование содержания мембранных ионных котранспортёров KCC2 и NKCC1 в мотонейронах поясничного отдела спинного мозга крыс при функциональной разгрузке и модуляция их содержания в мотонейронах с помощью фармакологических средств.	66
4.2. Регистрация и фармакологическая модуляция биоэлектрической активности камбаловидной мышцы крысы на разных сроках функциональной разгрузки различной продолжительности.	68
4.3. Исследование эффекта применения электромиостимуляции в периоды пониженной электрической активности m.soleus крысы в условиях гравитационной разгрузки.	70
4.4. Исследование роли TRKb-рецепторов в регуляции содержания KCC2 в мотонейронах поясничного отдела спинного мозга крысы	71
4.5. Анализ ответов сигнальных путей камбаловидной мышцы крысы при фармакологической блокировке спонтанной электрической активности.	73
5. ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ	76
5.1. Заключение	76
5.2. Выводы.	79
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ	80

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность

Исследование нейромоторной адаптации скелетной мускулатуры человека и других млекопитающих к условиям длительной гравитационной разгрузки остаётся одним из ключевых направлений авиакосмической физиологии в контексте современных орбитальных и планируемых долговременных космических полётов. Это обстоятельство обусловлено известной ролью скелетной мускулатуры не только в осуществлении локомоторной функции, регуляции притока крови к органам, депонировании глюкозы и аминокислот, но и в секреции ряда миокинов, что позволяет рассматривать скелетную мышцу как значимый эндосекреторный орган и важный регулятор метаболизма организма в целом. Выявление молекулярных сигнальных путей, опосредующих функциональную перестройку постуральной мускулатуры в условиях гипогравитации, помимо сугубо прикладного значения, представляет интерес и для фундаментальной физиологической науки, поскольку позволяет глубже понять механизмы, в равной степени регулирующие как нормальную, так и патологическую физиологию скелетной мышцы, в том числе в условиях естественной земной гравитации. Важную роль в изучении таких механизмов играет известная схожесть между нервно-мышечными изменениями, наблюдаемыми при функциональной разгрузке постуральной мускулатуры («сухая иммерсия», параболический полёт, антиортостатическое вывешивание), и в моделях хирургической изоляции спинного мозга, устраняющей нейронную активацию двигательных единиц. Вместе с тем, до последнего времени оставался практически неизученным известный с 80-х годов XX века феномен развития у лабораторных животных спонтанной активности камбаловидной мышцы в условиях функциональной разгрузки задней конечности.

Степень разработанности проблемы

В различных экспериментах, моделирующих условия гравитационной разгрузки на грызунах, неоднократно демонстрировалось, что первоначально наблюдаемое радикальное снижение электромиографической активности камбаловидной мышцы через некоторое время (примерно на третьих сутках разгрузки) сменяется постепенным появлением и последующим нарастанием электрической активности, к 14-м суткам достигающей значений, сопоставимых с показателями виварного контроля [9, 34, 69]. Это явление, вызывающее интерес у различных авторов, до сих пор не подвергалось обстоятельному исследованию, в связи с чем физиологический смысл спонтанной активности мотонейронов в условиях гравитационной разгрузки и лежащие в её основе молекулярные механизмы оставались неясны.

В последнее время получил известность не так давно открытый феномен повышенной возбудимости мотонейронов вследствие изменения характера работы хлоридного транспорта [19]. В результате снижения экспрессии калий-хлоридного котранспортера KCC2 поток хлорид-ионов через канал инвертируется, и мембрана приобретает свойства возбуждаться при действии тормозных медиаторов ГАМК или глицина [19]. Установлено, что именно эта повышенная возбудимость и является причиной развития спастической активности после нарушения целостности спинного мозга [19,41]. Интересно, что аналогичное снижение содержания KCC2 было обнаружено не только из-за повреждения спинного мозга выше поясничной области [19], но и после аксотомии как следствие повреждения периферических нервов [8], т.е. из-за нарушения двигательной иннервации скелетных мышц.

В настоящем исследовании мы выдвинули гипотезу о том, что длительная функциональная разгрузка задних конечностей может аналогичным образом приводить к снижению экспрессии белка KCC2 в мотонейронах спинного мозга, что рассматривается нами в качестве гипотетической причины развития спонтанной активности в камбаловидной мышце крысы.

Цель и задачи исследования

Целью данной работы является изучение механизмов спонтанной ЭМГ-активности в разгруженной постуральной мышце крысы и анализ её сигнальных последствий. Для достижения этой цели были сформулированы следующие **задачи**:

1. Исследование биоэлектрической активности камбаловидной мышцы крысы на разных сроках функциональной разгрузки.
2. Исследование роли калий-хлоридного котранспортёра KCC2 в спонтанной генерации импульсов в условиях гравитационной разгрузки.
3. Исследование маркеров внутриклеточных сигнальных путей камбаловидной мышцы при снижении/устранении спонтанной активности в результате фармакологической активации KCC2.
4. Исследование эффекта применения электромиостимуляции в периоды пониженной электрической активности m.soleus крысы в условиях гравитационной разгрузки.
5. Исследование роли BDNF-зависимого метаботропного сигналинга в регуляции содержания KCC2 в мотонейронах поясничного отдела спинного мозга крысы в условиях гравитационной разгрузки.

Научная новизна работы

1. Впервые обнаружено снижение содержания калий-хлоридного котранспортёра KCC2 и повышение содержания натрий-калий-хлоридного котранспортёра NKCC1 в поясничном отделе спинного мозга крысы при длительной функциональной разгрузке задней конечности животного.
2. Впервые показана связь между содержанием KCC2 в поясничном отделе спинного мозга крысы и спонтанной электрической активностью камбаловидной мышцы.
3. Впервые показано влияние электростимуляции камбаловидной мышцы на баланс содержания ионных котранспортёров (KCC2 и NKCC1) в мотонейронах поясничного отдела спинного мозга.
4. Впервые показана роль BDNF в поддержании нормального содержания KCC2 в спинном мозге.

Научно-практическая значимость работы

Значимость работы состоит в получении новых фундаментальных знаний о природе спонтанной активности постуральной мышцы в условиях гравитационной разгрузки и лежащих в её основе физиологических механизмах. Новые данные позволят не только расширить представления о фундаментальной физиологии мышечной ткани, но и могут найти применение в космической и реабилитационной медицине, поскольку спонтанная активность камбаловидной мышцы является важной моделью для изучения внутримышечных сигнальных путей, регулирующих непрерывную антигравитационную работу этой мышцы.

Положения, выносимые на защиту

1. Наблюдаемое при длительной (более трёх суток) функциональной разгрузке задней конечности крысы увеличение электрической активности камбаловидной мышцы связано со снижением содержания калий-хлоридного котранспортёра KCC2 в мотонейронах поясничного отдела спинного мозга.
2. Сократительная активность постуральной мышцы (в частности, низкочастотная хроническая электростимуляция) значительно уменьшает степень снижения содержания KCC2 в поясничном отделе спинного мозга на фоне 7- и 14- суточной моделируемой гравитационной разгрузки.
3. BDNF-зависимая сигнализация вносит определенный вклад в поддержание стабильности KCC2 поясничном отделе спинного мозга в условиях нормальной активности постуральной мышцы.
4. Разнонаправленные изменения сигнальных механизмов камбаловидной мышцы при фармакологическом предотвращении спонтанной мышечной активности свидетельствуют об отсутствии выраженной компенсаторной роли спонтанной мышечной активности при гравитационной разгрузке.

Степень достоверности и апробация результатов

Основные результаты и положения диссертационной работы были представлены и обсуждены на: XIX Конференции молодых ученых, специалистов и студентов, посвященной 60-летию первого полета человека в космос (Москва, 2021); Всероссийской конференции с международным участием «Интегративная физиология» (Санкт-Петербург, 2021); IX Российской конференции с международным участием по управлению движением, посвященной 95-летию со дня рождения И. Б. Козловской (Казань, 2022); XXI Конференции молодых учёных, специалистов и студентов, посвящённой 60-летию Института медико-биологических проблем. (Москва, 2023); XI Всероссийской с международным участием школы-конференции по физиологии мышц и мышечной деятельности, посвященной 70-летию открытия механизма мышечного сокращения (Москва, 2024).

По теме диссертации работы опубликовано 7 статей в журналах, рекомендованных ВАК, а также 8 тезисов докладов конференций.

Структура и объем диссертации

Работа включает в себя введение, обзор литературы, описание материалов и методов исследования, изложение результатов и их обсуждение, а также выводы. Диссертационная работа изложена на 89 страницах, содержит 31 рисунок и список цитируемой литературы из 122 источников.

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Постуральная мускулатура и камбаловидная мышца

По представлениям школы профессора Козловской, эволюционное развитие опорно-двигательной системы в условиях постоянного действия гравитационных сил приводит к формированию в ней двух функциональных компонентов: фазного и тонического [5,74]. Фазная мускулатура отвечает, главным образом, за локомоторную функцию, обеспечивая совершение динамических движений; задачей же тонической мускулатуры является, в свою очередь, поддержание в гравитационном поле вертикальной позы и положения отдельных частей тела [5, 58]. Работа тонической системы отличается большой длительностью мышечных сокращений, относительно малой утомляемостью мускулатуры и окислительным энергетическим метаболизмом [60]. Мускулатура, выполняющая тонические движения, в норме представлена так называемыми медленными (малыми) двигательными единицами и медленными мышечными волокнами [21].

Мышечный тонус, как частный случай тонического мышечного сокращения, представляет собой состояние длительного стойкого низкоинтенсивного напряжения скелетных мышц, не сопровождающегося утомлением. Это состояние скелетной мышцы, позволяющее телу обеспечивать определенное положение в пространстве, является необходимым условием осуществления любого целенаправленного движения в условиях нормальной земной гравитации [85]. Тонус определяет соответственно заданным параметрам движения начальную длину и механические свойства мышц-эффекторов, ограничивает лишние степени свободы, и, таким образом, играет ключевую роль в облегчении управления движением [5].

Одной из ключевых мышц, участвующих в удержании туловища на расстоянии от опорной поверхности и обеспечивающей устойчивость организма в гравитационном поле Земли у большинства млекопитающих является камбаловидная мышца [108]. Камбаловидная мышца (*m. soleus*), состоящая из

одного пучка мышечных волокон, располагается на задней стороне голени под головками икроножной мышцы, совместно с ней образуя трехглавую мышцу голени. Вместе с икроножной, камбаловидная мышца прикрепляется к пяточной кости посредством ахиллова сухожилия [94]. Являясь важным сгибателем голеностопного сустава и супинатором подтаранного и таранно-пяточного суставов, *m. soleus* постоянно задействуется во время движения ноги и для стабилизации голеностопного сустава при положении стоя, у человека в ряде случаев полностью принимая на себя опорную нагрузку [1, 5].

Ключевая роль камбаловидной мышцы в поддержании устойчивой позы животного предполагает её длительную (не менее 11 часов в сутки) непрерывную активность [63, 81], которая становится возможной благодаря наличию её составе у человека, крысы и большинства млекопитающих от 70 до 90 % волокон медленного типа [35, 68]. Функциональная разгрузка камбаловидной мышцы, обусловленная пребыванием в невесомости или длительной иммобилизацией вызывает в ней существенные физиологические изменения, включающие потерю мышечной массы и сдвиг миозинового фенотипа в быструю сторону [48, 107]. Камбаловидная мышца, таким образом, представляет собой один из наиболее репрезентативных модельных объектов для изучения физиологических и сигнальных эффектов микрогравитации на тоническую мышечную систему [5, 72].

1.2. Нейрональный контроль тонической активности

Известны два основных способа нейронального контроля состояния мышцы со стороны иннервирующего её мотонейрона: импульсный и нейротрофический [5]. Импульсный контроль осуществляется посредством генерации мотонейроном ритмической последовательности потенциалов действия различной частоты и длительности, специфичных для данного вида двигательных единиц и определяющих паттерн сократительной активности иннервируемой мышцы [5, 61]. Так, для камбаловидной мышцы млекопитающих, функционирующей в режиме низкоинтенсивных длительных сокращений, характерна частота импульсации в

диапазоне от 10 до 20 Гц [53]. При этом, биохимическая перестройка мышечного волокна в ответ на изменение характера импульсации контролируется последовательностью сигнальных механизмов, как реакция на механические и химические эффекты сократительной активности. Ключевую роль в этом процессе играет кальций-зависимая сигнальная трансдукция, опосредованная через такие сенсоры, как кальмодулин и кальций-кальмодулин-зависимая протеинкиназа (CaMKII), которые регулируют экспрессию медленных миозинов и окислительных ферментов [14, 106].

Альтернативой импульсному механизму нейронального контроля является нейротрофический контроль, осуществляемый посредством высвобождения нейротрофинов и нейрорегулинов через нервно-мышечный синапс [80]. Эти сигнальные факторы, взаимодействуя со специфическими рецепторами скелетной мышцы, осуществляют, таким образом, регуляцию её белкового и энергетического метаболизма [5].

В частности, нейрорегулин-1, высвобождаемый из мотонейрона, через активацию рецепторов семейства ErbB оказывает прямое влияние на экспрессию генов, кодирующих никотиновые ацетилхолиновые рецепторы, тем самым поддерживая стабильность постсинаптической мембраны [44]. Считается, что нейротрофический механизм может играть ключевую роль в долгосрочной адаптации и поддержании фенотипической специфичности мышечных волокон, особенно в условиях измененной нервной импульсации, в частности, при гипокинезии или денервации [18].

При этом, вклад импульсного и нейротрофического механизмов контроля в поддержание мышечной массы не одинаков для различных типов мышц. В эксперименте Ohira et al. (2006) [97] исследована атрофия *m. soleus* и *m. plantaris* крысы с использованием модели функциональной разгрузки задних конечностей в сочетании с денервацией указанных мышц. Показано, что степень снижения мышечной массы и размеров мышечных волокон камбаловидной мышцы на фоне функциональной разгрузки конечности достоверно не различались в группах с

денервацией и без таковой, в то время как атрофия *m. plantaris* оказалась существенно более выраженной в группе с денервацией. Предполагается, что основную роль в поддержании структуры камбаловидной мышцы играет именно импульсный нейрональный контроль, а длительное устранение такой импульсации и, соответственно, хроническая инактивация камбаловидной мышцы при гравитационной разгрузке приводит к глубокой потере жесткости мышцы, выражающейся в её атонии [74], сдвигу миозинового фенотипа мышечных волокон путём трансформации части медленных волокон в быстрые [107] и мышечной атрофии [12].

1.3. Реальная и моделируемая гравитационная разгрузка

Исследование процессов, происходящих при функциональной разгрузке тонической мускулатуры, может производиться не только в условиях непосредственно космического полёта, но и на Земле, с использованием специально разработанных моделей микрогравитации, применяемых как на животных, так и в экспериментах с участием человека. Для моделирования воздействия микрогравитации на мускулатуру человека применяются полёты по параболе Кеплера [49], а также наземные модели сухой иммерсии [6] и антиортостатической гипокинезии [104].

Эксперименты на животных производятся с применением таких методов как иммобилизация задних конечностей, рассечение спинного мозга, или паралич тетродоксином [9], позволяющих воспроизвести отдельные эффекты гипогравитации, посредством устранения афферентного сигнала опоры. Практическая ценность наземных моделей обусловлена тем, что они позволяют изучать специфические последствия разгрузки скелетных мышц, изолируя этот фактор от других факторов космического полета, таких как радиация [7]. Одной из наиболее широко используемых в экспериментальной практике моделей микрогравитации является антиортостатическое вывешивание крыс (*Hindlimb suspension*). Эта модель, изначально разработанная в Советском Союзе Е. А.

Ильиным и В. Е. Новиковым [95], и впоследствии распространившаяся за рубежом в модификации американской исследовательницы Морей-Холтон [90], предполагает поддержание задних конечностей крысы в состоянии длительной безопорности, что приводит к развитию соответствующих физиологических изменений. Для этого к хвосту животного при помощи клейкой ленты прикрепляется металлическая петля, за которую крыса подвешивается к шарнирному механизму, подвижно закреплённому в верхней части клетки (Рисунок 1).



Рисунок 1. Антиортостатическое вывешивание крысы по Ильину-Новикову в модификации Морей-Холтон.

Задние конечности животного, таким образом, оказываются оторванными от дна клетки, и не испытывают опорной нагрузки. Передние конечности, при этом, касаются пола, позволяя животному произвольно перемещаться по клетке и иметь свободный доступ к пище и воде. Высота подвешивания регулируется таким образом, чтобы задние конечности не касались какой-либо опорной поверхности, при этом угол наклона тела животного к плоскости пола составляет приблизительно 30° [90, 95].

Ключевым следствием антиортостатического вывешивания для скелетной мускулатуры, как и в условиях космического полета, является атрофия мышечных волокон, снижение массы и силы, причём эти изменения наиболее выражены в антигравитационных мышцах, в частности, в *m. soleus* [47]. Эта модель, характеризующаяся состоянием гиподинамии и гипокинезии, вызывает снижение синтеза белка, усиление протеолиза и окислительного стресса, а также снижение чувствительности к инсулину [47].

Функциональная разгрузка задних конечностей в первые сутки антиортостатического вывешивания приводит к перераспределению тонической активности между мышцами-разгибателями и мышцами-сгибателями голеностопного сустава на фоне полного угасания электромиографической (ЭМГ) активности в камбаловидной мышце [5]. Это быстрое угасание тонической ЭМГ-активности является одним из самых ранних и значимых признаков разгрузки, что указывает на критическую роль проприоцептивной афферентации с опорных поверхностей в поддержании тонуса постуральных мышц [108]. Более того, исследования показывают, что разгрузка приводит к быстрым изменениям в состоянии нейромышечных контактов, инициируя каскад внутриклеточных сигналов, которые в конечном итоге приводят к атрофии [108].

1.4. Влияние гравитационной разгрузки на нейрохимию спинного мозга

Свидетельства перестройки нейрохимического баланса в спинном мозге в условиях гравитационной разгрузки были получены в работе Treffort et al. (2006) [114]. Авторы показали, что 7-дневное антиортостатическое вывешивание крыс приводит к значительному увеличению концентрации ключевых нейромедиаторов — как тормозных (ГАМК, глицин), так и возбуждающих (глутамат, аспартат) — в вентральных рогах сегмента L5 спинного мозга, где расположены тела мотонейронов, иннервирующих камбаловидную мышцу, что согласуется с ранее наблюдаемым снижением афферентной импульсации на уровне L5 в первую неделю разгрузки. Важно отметить, что к 14-му дню разгрузки уровни нейромедиаторов возвращались к контрольным значениям, что указывает на сложную временную динамику пластических перестроек в двигательных цепях [114].

Помимо изменений в уровне классических нейромедиаторов, гравитационная разгрузка оказывает комплексное воздействие на нейромодуляторные системы. Исследования демонстрируют, что антиортостатическое вывешивание сопровождается значительным снижением экспрессии и содержания моноаминов (норадреналина и серотонина) в поясничном отделе спинного мозга [29]. Это снижение связывают с уменьшением нисходящей активирующей стимуляции от стволовых структур мозга, которая в норме модулирует возбудимость спинальных мотонейронов и интернейронов. Данный механизм может вносить существенный вклад в развитие синдрома «моторной депрессии», наблюдаемого в условиях гипогравитации.

Важным аспектом адаптации является модуляция системы нейротрофинов. Показано, что в условиях вывешивания уровни мРНК и белка нейротрофина-3 (NT-3) и мозгового нейротрофического фактора (BDNF) значимо повышаются в поясничном отделе спинного мозга и камбаловидной мышце, причём экспрессия NT-3 в крупных мотонейронах нарастает к 14-му дню разгрузки [118]. Повышение содержания нейротрофинов, в частности NT-3, может способствовать

наблюдаемому в условиях гипогравитации усилению синаптической передачи между мышечными афферентами и мотонейронами, поскольку NT-3 и BDNF, как известно, потенцируют амплитуду возбуждающих постсинаптических потенциалов, вызываемых в мотонейронах Ia-афферентами [87]. Интересно, что временная динамика изменений в содержании нейротрофинов (постепенное нарастание) не совпадает с таковой для афферентной импульсации, которая снижается в первую неделю вывешивания, а затем возрастает к 14-му дню [70]. На белковом уровне также обнаружено значительное увеличение рецептора NT-3 – TrkC – в спинном мозге и мышце, в то время как уровни рецептора BDNF — TrkB, не подвергались статистически значимым изменениям [118]. Эти данные согласуются с концепцией, что физическая активность является ключевым фактором, регулирующим уровень нейротрофинов [52], однако механизмы этой регуляции в условиях гипогравитации могут отличаться от таковых при физических тренировках. Повышение нейротрофинов, особенно NT-3, на фоне сниженной проприоцептивной импульсации на ранних сроках вывешивания, позволяет предположить, что оно может быть компенсаторной реакцией, направленной на поддержание синаптического гомеостаза и усиление эффективности оставшихся синаптических связей в двигательных цепях [10].

1.5. Электромиография скелетной мышцы

Электромиография (ЭМГ) служит основным методом функциональной диагностики состояния нервно-мышечного аппарата в экспериментальной физиологии, позволяя регистрировать и количественно анализировать электрическую активность скелетных мышц [13]. У лабораторных крыс метод применяется для оценки нейромышечной передачи, изучения механизмов контроля движений и диагностики нарушений мышечного тонуса при различных патологических состояниях и экспериментальных воздействиях [76].

В экспериментальной практике применяются два принципиально различных подхода к регистрации мышечной активности. Поверхностная (накожная) ЭМГ, при

которой электроды накладываются на кожу над исследуемой мышцей, является неинвазивной, но её применение у мелких лабораторных грызунов сильно ограничено из-за малых размеров мышц, густого шерстяного покрова и невозможности изолированно регистрировать активность глубоко расположенных мышц [33]. Наиболее информативным и широко используемым методом является инвазивная внутримышечная регистрация с помощью игольчатых или имплантированных электродов. Игольчатые электроды, вводимые чрескожно, оптимальны для кратковременных регистраций у анестезированных животных и оценки вызванных потенциалов (М-ответа, Н-рефлекса) при электростимуляции нерва [54]. Для долгосрочного мониторинга спонтанной и произвольной ЭМГ-активности в условиях свободного поведения животных используются хронические внутримышечные электроды, которые представляют собой тонкие биосовместимые проволочки, хирургически имплантируемые в исследуемую мышцу и подведенные к разъему, закрепляемому, обычно, на черепе животного [79].

Качественный и количественный анализ ЭМГ-сигнала у крыс включает оценку ряда ключевых параметров, несущих различную физиологическую информацию. Амплитуда ЭМГ, отражающая общее количество рекрутированных двигательных единиц и частоту их разрядов, является прямым индикатором уровня нейрональной активации мышцы [5, 45]. Снижение амплитуды ЭМГ в условиях гравитационной разгрузки служит электромиографическим коррелятом снижения функциональной активности мотонейронов [5, 37, 51].

Спектральный анализ ЭМГ-сигнала, в частности смещение медианной частоты спектра, используется как маркер развития мышечного утомления и изменения композиции мышечных волокон [75]. Медианная частота спектра ЭМГ является ключевым индикатором метаболического состояния мышечных волокон и скорости проведения потенциалов действия. Её снижение в условиях развивающегося утомления является классическим электромиографическим маркером замедления проведения возбуждения по мышечным волокнам вследствие накопления

метаболитов (ионов калия, лактата), снижения рН, а также смещения рекрутирования в сторону медленных (окислительных) двигательных единиц, изначально имеющих более низкочастотные характеристики. При длительной гравитационной разгрузке, наряду со снижением амплитуды, также может наблюдаться тенденция к снижению медианной частоты покоящейся мышцы, что связывают с атрофией быстрых мышечных волокон (Type II) и общим снижением метаболической и электрической активности [4, 32].

Показатель интегральной ЭМГ представляет собой усредненную или суммарную электрическую активность мышцы за заданный временной интервал и находится в прямой зависимости от амплитуды сигнала. Таким образом, он также отражает уровень нейрональной активации. В динамике повторяющегося или непрерывного сокращения рост интегральной ЭМГ при одновременном снижении медианной частоты является диагностическим признаком компенсаторного увеличения нейромышечной активности для поддержания заданной силы на фоне прогрессирующего локального утомления. В условиях же гипокинезии и гравитационной разгрузки снижение интегральной ЭМГ, как и амплитуды, будет коррелировать с уменьшением функционального состояния и силы мышцы [4, 32].

Метод хронической электромиографии является важным инструментом в исследованиях нейромышечной адаптации к условиям микрогравитации, моделируемым посредством антиортостатического вешивания, поскольку позволяет наблюдать в реальном времени динамику эфферентной стимуляции разгруженных мышц. Быстрое подавление тонической ЭМГ-активности служит объективным индикатором "выключения" антигравитационной функции постуральной мускулатуры, приводящего к метаболическим и структурным изменениям в мышечных волокнах [46, 113]. Таким образом, электромиография крысы, и, в частности, метод хронической внутримышечной регистрации, предоставляет важные данные для комплексного изучения механизмов нейромышечной пластичности, обеспечивая прямую связь между нейрональной активностью и мышечной функцией [40].

1.6. Спонтанная активность камбаловидной мышцы

Электромиографическая активность камбаловидной мышцы при нормальных условиях в значительной степени зависит от опорной нагрузки задней конечности [5, 56]. Специфика выполняемой этой мышцей работы предполагает практически непрерывную активность, направленную на осуществление тыльного разгибания голеностопного сустава при локомоции и поддержание стабильности его угла при статической позе животного. При этом функциональная разгрузка конечности приводит к моментальному угасанию ЭМГ-активности в камбаловидной мышце до нуля [5], и в первые 24-48 часов разгрузки ЭМГ-активность в камбаловидной мышце крысы практически полностью подавлена [43]. Однако, как показали проведённые в конце прошлого века исследования электромиографической активности мышц задней конечности крысы [9], ЭМГ-активность камбаловидной мышцы на фоне антиортостатического вывешивания отсутствует только в первые двое - трое суток (Рисунок 2). Уже на третьи сутки этого воздействия электромиографическая активность *m. soleus* возобновляется и начинает нарастать, достигая уровня, характерного для контрольных животных, приблизительно к 14-м суткам вывешивания. Это явление можно назвать спонтанной активностью

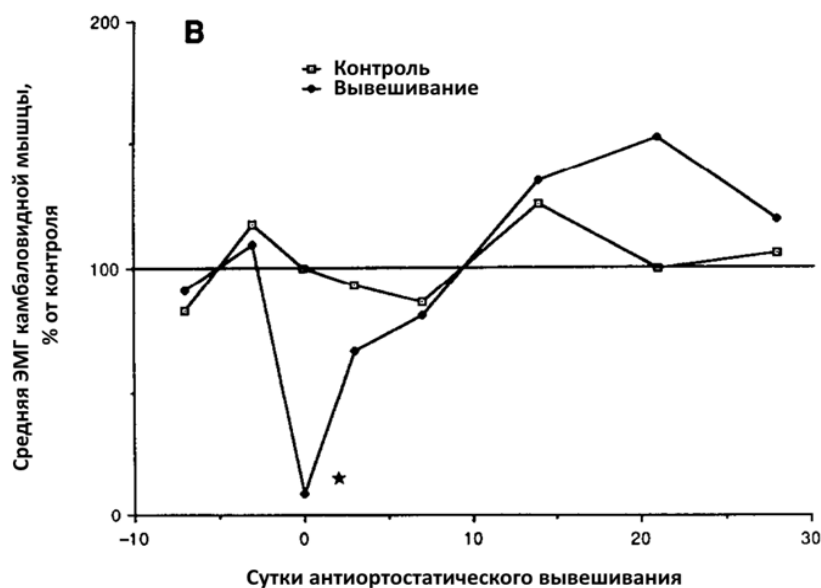


Рисунок 2. ЭМГ-активность камбаловидной мышцы крысы на фоне антиортостатического вывешивания. Адаптировано из Alford et al., 1987.

камбаловидной мышцы. В последующих работах различных авторов [17, 34, 70] неоднократно наблюдался рост электромиографической активности камбаловидной мышцы крысы в условиях длительного 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.

Функциональная значимость этой активности исследовалась [96] на модели денервации камбаловидной мышцы у вывешенных крыс. Отсутствие усиления атрофического процесса при денервации позволяет сделать осторожный вывод о том, что спонтанная активность для атрофирующейся мышцы не является компенсаторной, по крайней мере, на начальном этапе развития процесса. Этот вывод хорошо согласуется с данными, показывающими, что денервация камбаловидной мышцы на фоне 14-суточного вывешивания не усугубляет атрофию [96]. В этом контексте интересен вопрос о влиянии уровня афферентной активации нейронов спинного мозга на изменения ЭМГ-активности камбаловидной мышцы во время длительного вывешивания. Об отсутствии компенсаторной функции у спонтанной активности свидетельствует и неуклонно прогрессирующий атрофический процесс, сопровождающий нарастание интегральной ЭМГ в камбаловидной мышце [70]. Кроме того, ограничение распространения потенциала действия мотонейронов поясничного отдела спинного мозга путём денервации *m. soleus* на фоне 14-суточного вывешивания не оказывает влияния на степень атрофии мышцы [97].

В этом контексте интересен вопрос о влиянии физиологически адаптивных изменений уровня афферентной активации нейронов спинного мозга на изменения ЭМГ-активности камбаловидной мышцы во время длительного антиортостатического вывешивания. Радикальное снижение ЭМГ-активности камбаловидной мышцы непосредственно после вывешивания сопровождается уменьшением афферентной нейрограммы на уровне сегмента L5 спинного мозга во время 14-суточного антиортостатического вывешивания и в процессе

восстановления после него [34]. Активность афферентного сигнала, наряду с электромиографической активностью камбаловидной мышцы, остаётся ниже уровня записанных перед вывешиванием контрольных значений до шестого дня вывешивания и достигает контрольных значений между шестым и девятым днём.

На двенадцатый и четырнадцатый дни вывешивания ЭМГ-активность камбаловидной мышцы, равно как и афферентная активность L5, превышает уровни, характерные для контрольных животных (Рисунок 3). На первый день восстановления эти показатели значительно превышают характерные для четырнадцатых суток вывешивания, и возвращаются к уровням, характерным для контрольных животных, между третьим и шестым днями восстановления. Эти данные позволяют сделать вывод о том, что антиортостатическое вывешивание нельзя рассматривать как полную функциональную деафферентацию, и в этом контексте правильнее говорить лишь о снижении афферентной сигнализации в начале периода вывешивания.

Регистрация поверхностной ЭМГ мышц человека во время экспериментов с «сухой» иммерсией, как правило, показывает значительное снижение базальной

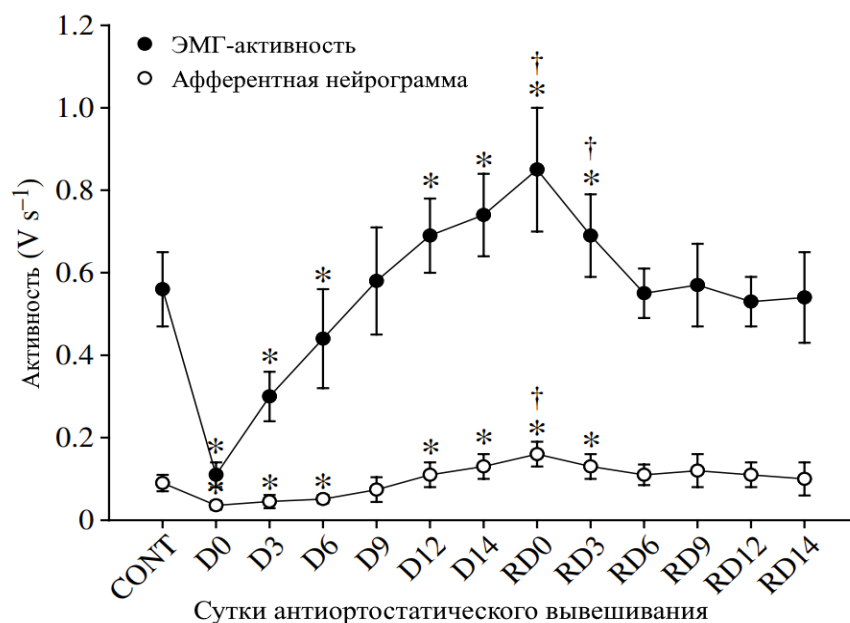


Рисунок 3. Физиологически адаптивные изменения нервно-мышечной активности в течение 14 дней разгрузки задних конечностей и после неё. Изменения значений усиленной ЭМГ камбаловидной мышцы и афферентной нейрограммы ($V \cdot s^{-1}$) выражены как среднее значение $\pm S.D.$ ($N=11$). Адаптировано из De-Donker et al., 2005.

ЭМГ камбаловидной мышцы (обычно, не ниже 30–40 % от уровня контроля), при этом, подъема этого показателя, по крайней мере, на протяжении первых 5–7 суток сухой иммерсии не наблюдается [56]. По-видимому, снижение ЭМГ-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, однако в значительной 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 кожного 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 [3].

1.7. Нарушение спинального контроля и феномен гиперрефлексии у космонавтов

Помимо хорошо изученных изменений в самой скелетной мышце, гравитационная разгрузка оказывает глубокое воздействие на функции связанных с ней отделов центральной нервной системы, в частности – спинного мозга. Одним из существенных клинических проявлений этого воздействия является развитие гиперрефлексии — повышенной рефлекторной возбудимости спинальных мотонейронов, задокументированной у членов экипажей космических аппаратов после длительных полетов. Нарушение нормального проприоцептивного афферентного потока от опорных мышц нижних конечностей в условиях невесомости приводит к дисбалансу возбуждающих и тормозных влияний на мотонейроны растяжения [56, 96, 101]. В норме нисходящие супраспинальные пути и аутохтонные спинальные интернейроны оказывают тоническое тормозное воздействие на рефлекторные дуги. Снижение афферентации и изменение нисходящего контроля депривируют мотонейроны,

что, в соответствии с принципом денервационной гиперчувствительности, повышает их возбудимость и приводит к усилению рефлекторных ответов.

Экспериментально это подтверждается данными по изучению Н-рефлекса (моносинаптического рефлекса растяжения, эквивалента сухожильного рефлекса) у космонавтов. После длительного пребывания в условиях микрогравитации отмечается значительное повышение амплитуды Н-рефлекса камбаловидной мышцы по сравнению с дополетными значениями, а также изменение его нормального подавления при парной стимуляции (Н-рефлекс восстановления) [3, 20, 97].

Эти данные однозначно указывают на повышение возбудимости мотонейронального пула и снижение пресинаптического торможения.

Гиперрефлексия, таким образом, является одним из проявлений нейропластической перестройки спинальных сетей при длительном отсутствии сигнала опорных афферентов [19, 41] и может быть рассмотрена в ряду иных физиологических последствий функциональной разгрузки, связанных с изменением тормозного контроля над мотонейронами, как феномен имеющий сходные черты с процессами, обуславливающими развитие спонтанной активности в камбаловидной мышце.

1.8. Нервно-мышечная активность при нарушении целостности спинного мозга

Известно, что нервно-мышечные изменения, вызванные хирургической изоляцией спинного мозга, устраняющей нейронную активацию мотонейронов и связанных с ними мышц, весьма сходны с последствиями реальной или моделируемой микрогравитации [12]. Относительная схожесть сигнальных процессов, обуславливающих функциональную перестройку тонической мускулатуры при различных видах гравитационной разгрузки, позволяет в контексте вопроса о физиологической природе спонтанной активности 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 произвольных мышечных сокращений и развитию мышечной спастичности, локализованной ниже места повреждения [41]. Спастичность характеризуется повышением мышечного тонуса, возникающим в результате повышения возбудимости мотонейронов и усиления синаптических входов в ответ на инактивацию тормозных механизмов [20].

Механизм, приводящий к развитию спастичности при повреждениях спинного мозга, был впервые описан в работе Паскаль Буланже и соавторов [19]. На модели спинальной травматизации животных ими было показано, что посттравматическая мышечная спастичность обусловлена изменением профилей экспрессии в мотонейронах спинного мозга двух мембранных котранспортёров ионов: калий-хлоридного котранспортёра KCC2 и натрий-калий-хлоридного котранспортёра NKCC1.

В незрелых нейронах центральной нервной системы (ЦНС) активно экспрессируется натрий-калий-хлоридный котранспортер NKCC1, тогда как экспрессия калий-хлоридного котранспортера KCC2 минимальна. Высокая активность NKCC1 приводит к накоплению хлорид-ионов внутри нейрона. Связываясь со своим рецептором ($GABA_A R$), ГАМК запускает ионный ток через хлоридные каналы, и ионы хлора, в соответствии с градиентом концентрации, покидают клетку, что приводит к деполяризации мембраны нейронов и развитию потенциала действия. (Рисунок 4, А). В зрелых нейронах ЦНС экспрессия, а равно и активность NKCC1 низка, тогда как KCC2, напротив, активно экспрессируется. Это приводит к значительному снижению внутриклеточной концентрации ионов Cl^- (<10 ммоль/л). В этом случае, связывание ГАМК специфическими рецепторами и открытие ионных каналов на мембране вызывает перемещение хлорид-ионов в цитоплазму и гиперполяризацию мембраны нейрона (Рисунок 4, В) [71].

Гиперполяризация мембраны мотонейронов подавляет воздействующие на мотонейрон потенциалы действия, увеличивая стимул, необходимый для смещения мембранного потенциала до порогового значения потенциала действия. ГАМК и глицин, таким образом, играют роль основных тормозных нейротрансмиттеров в зрелом спинном мозге млекопитающих.

Как теперь известно, [19], в травмированном спинном мозге происходят изменения, до некоторой степени воспроизводящие ситуацию, характерную для незрелых мотонейронов, а именно: 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 (Рисунок 5), вызывает спонтанное развитие потенциала действия, повышение мышечной активности, и, впоследствии, мышечную спастичность. Этот механизм был обнаружен не только у людей и животных с нарушением целостности спинного мозга, но и в случаях нарушения мозгового кровообращения и при моделировании детского церебрального паралича [102, 122].

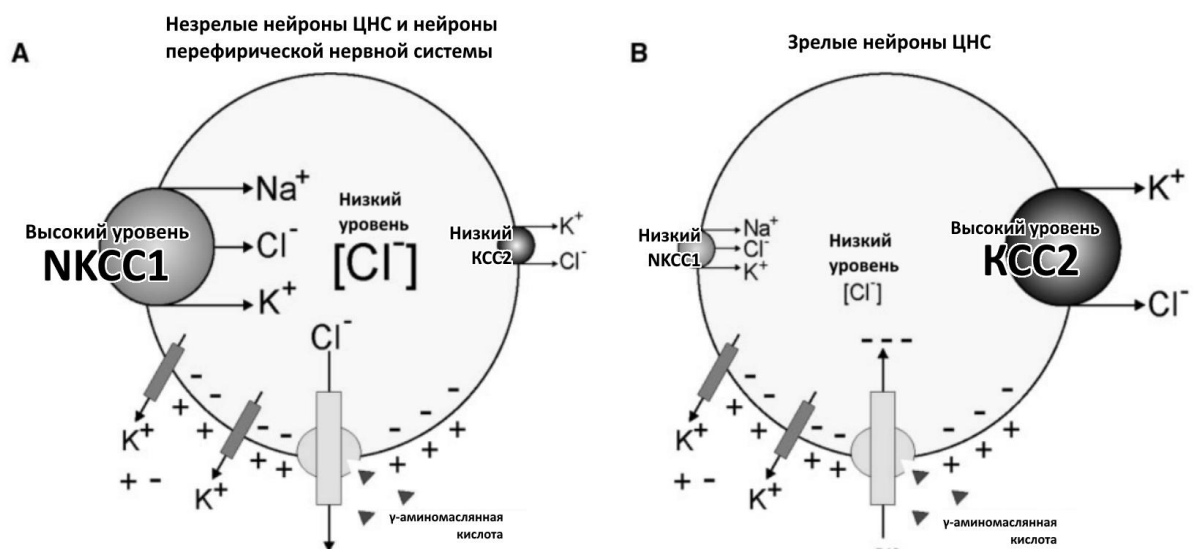


Рисунок 4. Регуляция внутриклеточного содержания хлорид-ионов в нейронах и её влияние на функцию ГАМК-рецепторов. Адаптировано из Kouyama et al, 2021.

Известно, что после аксотомии мотонейронов спинного мозга экспрессия, а вместе с ней и содержание КСС2 существенно снижается во всей соматодендритной мембране [8]. Показано, при этом, что у животных с нарушением целостности спинного мозга инактивация гена кальпаина-1, хорошо известной кальций-зависимой цистеиновой протеазы, предотвращает снижение содержания КСС2 и последующую спастичность мышц [65], что позволяет делать вывод о ключевой роли кальпаин-зависимого протеолиза в снижении содержания КСС2 в поясничном отделе спинного мозга. Кроме того, имеются данные и о регуляции содержания КСС2 в мотонейронах через снижение экспрессии его мРНК [27]. Снижение содержания КСС2 было обнаружено также в мотонейронах спинного мозга при их аксотомии [27]. Сообщается также, что фармакологическое повышение активности КСС2 позволяет за счет восстановления гомеостаза хлорид-ионов в мотонейронах устранить симптомы спастичности и гиперрефлексии, вызванные спинальной травматизацией [16].

В последние годы появились работы, в которых было показано, что применение произвольных физических упражнений (бег на тредбане) на фоне биологического

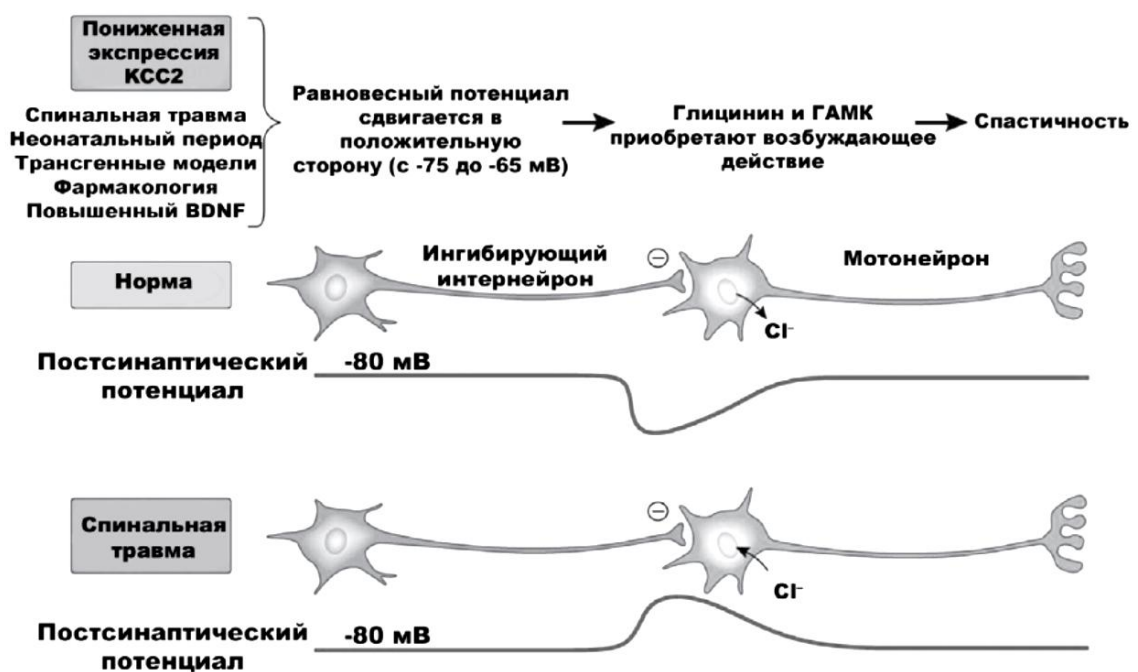


Рисунок 5. Возникновение спастичности в результате изменений в регуляции содержания ионов хлора в мотонейронах. Адаптировано из Edgerton & Roy, 2010.

моделирования спинальной травмы или нарушения мозгового кровообращения предотвращают снижение содержания KCC2 в мотонейронах спинного мозга животных [31, 91].

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 [77], что позволяет предположить зависимость экспрессии KCC2 от активности TrkB-зависимого сигнального пути [91].

1.9. Электростимуляция скелетной мышцы

Электростимуляция представляет собой распространённый методологический подход в экспериментальной нейрофизиологии и мышечной физиологии, позволяющий целенаправленно активировать нервные стволы, нервно-мышечные синапсы или непосредственно скелетные мышцы [55]. В исследованиях на крысах метод используется для решения широкого спектра задач: от оценки функционального состояния нервно-мышечного аппарата до предотвращения развития атрофии в условиях гипокинезии и микрогравитации [38, 110].

В экспериментальной практике применяются различные протоколы электростимуляции, выбор которых определяется конкретными исследовательскими задачами. Прямая электростимуляция мышцы применяется для оценки собственных функциональных свойств мышечных волокон, минуя нервную систему. Стимуляция через интактный нерв (например, седалищный или большеберцовый) позволяет оценить функцию нервно-мышечной передачи и вызвать рефлекторные ответы [28]. Для хронической стимуляции в условиях длительных экспериментов используются имплантированные электроды, подведенные к целевым нервам, что позволяет проводить регулярные тренировочные сессии без необходимости повторных анестезий и хирургических

вмешательств [42]. Наиболее физиологичным подходом считается функциональная электростимуляция (ФЭС), при которой стимуляция нерва осуществляется в режиме, имитирующем естественную активность мотонейронов, что способствует эффективному поддержанию массы и функции мышц в условиях разгрузки [99].

Эффективность и физиологическая адекватность электростимуляции определяются тщательным подбором её параметров. Частота стимуляции является критическим параметром: низкочастотная стимуляция (1-20 Гц) применяется для изучения утомления и синаптической передачи, в то время как высокочастотная стимуляция (50-100 Гц) используется для достижения тетанического сокращения и оценки максимальной силы мышцы [62]. Интенсивность стимуляции подбирается для обеспечения рекрутирования всех волокон целевой мышцы без активации соседних мышечных групп [115]. Важное значение имеет форма импульса: биполярные прямоугольные импульсы продолжительностью 0.1-1.0 мс обеспечивают селективную стимуляцию нервных волокон с минимальным повреждением тканей [11]. Длительность сессий и общая продолжительность стимуляционного протокола варьируют в зависимости от экспериментальных целей - от коротких ежедневных сессий до практически непрерывной стимуляции в течение нескольких недель.

Электростимуляция нашла широкое применение в исследованиях, направленных на противодействие негативным эффектам гипогравитации и гипокинезии. Регулярная низкочастотная стимуляция камбаловидной мышцы в условиях антиортостатического вывешивания позволяет эффективно предотвращать развитие атрофии и сохранять силовые характеристики мышечных волокон [39, 93]. Показано, что хроническая электростимуляция способствует поддержанию окислительного потенциала мышц, предотвращая характерный для разгрузки сдвиг в сторону гликолитического фенотипа [67,109]. Важно отметить, что эффективность различных протоколов стимуляции неодинакова: ритмическая стимуляция, имитирующая естественную постуральную активность, оказывается более эффективной в поддержании массы медленных мышечных волокон по

сравнению с тонической стимуляцией [103]. Таким образом, метод электростимуляции представляет собой важный инструмент не только для исследования физиологических механизмов адаптации нервно-мышечного аппарата, но и для разработки эффективных контрмер против негативных последствий гипогравитации.

1.10. Фармакологическая модуляция содержания мембранных ионных котранспортёров в мотонейронах спинного мозга

Ключевая роль баланса хлоридных котранспортёров KCC2/NKCC1 в патогенезе различных неврологических расстройств, в том числе детской рефрактерной эпилепсии, невропатической боли [111] и мышечной спастичности, обусловленной травматизацией спинного мозга [19], делает их важной терапевтической мишенью при лечении соответствующих заболеваний, что способствует накоплению данных об эффективных методах фармакологической модуляции экспрессии KCC2 и NKCC1. Дисфункция KCC2, ведущая к нарушению градиента хлоридов и ослаблению ГАМКергического торможения, является общим патогенетическим механизмом для целого ряда состояний, от эпилепсии до невропатической боли и спастичности [15, 83]. Функциональная активность KCC2 регулируется на множественных уровнях, включая транскрипцию, посттрансляционные модификации (такие как фосфорилирование) и олигомеризацию, что создает как сложности, так и широкие возможности для его фармакологической модуляции [36].

При этом, экспериментальное и клиническое лечение заболеваний, ассоциированных с дисфункцией или инверсией гамкергического сигналинга лучше изучено с позиции ингибирования NKCC1 [83], главным образом по причине плохой фармакокинетики соединений, повышающих активность KCC2 [117]. В частности, одним из многообещающих препаратов, применяемых на животных моделях, а также в клинических случаях ряда неврологических расстройств, является диуретик буметанид [15]. Проблема терапевтического применения

ингибиторов NKCC1 заключается, однако, в том, что в отличие от KCC2, экспрессия которого специфически локализована в нейронах [50, 117], NKCC1 более широко экспрессируется в других органах, включая почки и дыхательную систему, и, вероятно, играет важную роль во внутреннем ухе, поскольку нокаут соответствующего гена у мышей приводит к глухоте и нарушению работы вестибулярного аппарата [116]. Подобные побочные эффекты представляют собой причину, по которой фармакологическая активация KCC2 (специфически локализованного в нервной ткани) представляется более перспективной стратегией коррекции дисбаланса ионных котранспортёров на мембранах мотонейронов.

В настоящее время в литературе описано применение для повышения экспрессии KCC2 в мотонейронах поясничного отдела спинного мозга ряда фармакологических препаратов: прохлорперазина [78] и препаратов семейства CLP: CLP-257 и CLP 290 [50]. Общей особенностью этих препаратов является способность усиливать экспрессию KCC2 в мотонейронах, уменьшать гиперрефлексию и предотвращать развитие спастичности после хронической травматизации спинного мозга.

Прохлорперазин представляет собой нейролептик, по химической структуре схожий с аминазином и относящийся к антипсихотическим препаратам первого поколения. В исследовании 2017 года показана способность прохлорперазина устранять ряд негативных последствий травматизации спинного мозга: восстанавливать реципрокное торможение, уменьшать спастичность у взрослых крыс с эффективностью, эквивалентной антиспастическому средству баклофену, восстанавливать вызванное травматизацией спинного мозга снижение KCC2 в мотонейронах ниже очага поражения [78]. Приведённые в работе данные свидетельствуют о высокой перспективности прохлорперазина в лечении неврологических расстройств, связанных с дисфункцией KCC2.

CLP-257, является агонистом KCC2. Данные показывают, что CLP-257 снижает концентрацию Cl^- за счет селективной модуляции KCC2. CLP-257 эффективно усиливает транспорт Cl^- в нейронах ЦНС при сниженной функции KCC2.

Показано отсутствие активности препарата в отношении NKCC1, KCC1, KCC3 или KCC4 [50].

Для улучшения фармакокинетики CLP-257 было разработано карбаматное пролекарство CLP-290, защищающее гидроксильную группу от глюкуронизации. Фармакокинетический профиль CLP-257, образующегося в результате метаболизма CLP-290, был значительно улучшен по сравнению с таковым у нативного CLP-257 [50].

Показано, что у мышей, подвергавшихся лечению при помощи CLP-290, функциональное восстановление после частичного перерезания спинного мозга, оцениваемое по шаганию с отягощением, было сравнимо с таковым при экспрессии экзогенного KCC2 [25].

1.11. Роль нейротрофина BDNF в регуляции нейрональных функций и его связь с ионными котранспортёрами

Нейротрофины представляют собой семейство белков-факторов роста, критически важных для развития, пластичности, выживания и поддержания функций нейронов центральной и периферической нервной системы. Основные эффекты нейротрофинов опосредованы их взаимодействием с высокоаффинными рецепторами тирозинкиназного типа (Trk-рецепторы). При этом наблюдается высокая специфичность лиганд-рецепторных взаимодействий: фактор роста нервов (NGF) преимущественно связывается с TrkA, нейротрофический фактор мозга (BDNF) и нейротрофин-4/5 (NT-4/5) — с TrkB, а нейротрофин-3 (NT-3) — с TrkC. Все нейротрофины также способны взаимодействовать с низкоселективным рецептором p75NTR, который часто модулирует сигнальный ответ Trk-рецепторов, в некоторых случаях инициируя про-апоптотические сигналы [64]. Связывание BDNF с рецептором TrkB запускает его димеризацию и аутофосфорилирование по внутриклеточным тирозиновым остаткам. Это, в свою очередь, приводит к рекрутированию адаптерных белков и активации нескольких ключевых внутриклеточных сигнальных каскадов. Основными из них являются путь

Ras/MAPK (регулирующий транскрипцию и рост), путь PI3K/Akt (отвечающий за выживание клеток и метаболизм) и путь фосфолипазы C- γ (PLC γ), который приводит к мобилизации внутриклеточного кальция и активации протеинкиназы C [88].

Одной из фундаментальных функций BDNF является регуляция синаптической передачи и пластичности. BDNF выступает ключевым скульптором нейромедиаторных систем [120]. Показано, что BDNF модулирует эффективность как возбуждающих (глутаматергических), так и тормозных (ГАМКергических) синапсов, в том числе и за счёт регуляции экспрессии и активности ионных транспортеров, определяющих градиенты хлора и бикарбоната в нейронах [30, 82].

В последние годы накоплены свидетельства того, что сигнальный путь BDNF/TrkB оказывает влияние на гомеостаз хлоридов в нейронах через посттрансляционный контроль котранспортеров KCC2 и NKCC1. Активация TrkB-рецепторов может приводить к фосфорилированию KCC2, влияя на его мембранную стабильность и функциональную активность [102]. Дисрегуляция сигнального пути BDNF-TrkB является общим патогенетическим звеном не только при спастичности, но и при ряде нейродегенеративных и нейропсихиатрических заболеваний [57, 59]. Именно этот механизм рассматривается как одна из ключевых причин развития патологической гиперактивности нейронов и спастичности при различных повреждениях нервной системы, включая травмы спинного мозга.

1.12. Фармакологическая модуляция TrkB-опосредованной сигнализации в нейронах

Несмотря на высокий потенциал ингибирования сигнальных путей опосредованных тропомиозиновым тирозинкиназным рецептором (TrkB) в терапевтической и научно-исследовательской практике, низкомолекулярные (<500 Да) селективные антагонисты этого массивного (145 кДа) комплекса были до некоторых пор неизвестны, поскольку их разработка была сопряжена с рядом известных трудностей. В первую очередь, предпринимались попытки разработать

высокоэффективный малый пептид, аллостерически ингибирующий сигнализацию TrkB в нейронах, и в 2010 году была описана одна из таких молекул – Циклотраксин-В, активная *in vivo* после системной доставки в нейроны [23]. Однако использование лигандов, полученных из пептидов, сталкивается с проблемой их протеолитической нестабильности, что потенциально снижает эффективность их применения в терапевтических условиях. В том же году методом скрининга *in silico* был обнаружен ряд низкомолекулярных непептидных агонистов TrkB, обладающих нейротрофической активностью [66] и способных путём активации TrkB предотвращать нейродегенерацию у крыс [84]. Показанная в этих работах эффективность поиска лигандов TrkB методом скрининга *in silico* привела к тому, что в 2011 году аналогичным способом был идентифицирован первый селективный низкомолекулярный неконкурентный антагонист TrkB – ANA-12 [24].

ANA-12 селективно связывается с TrkB, не влияя на активность родственных рецепторов TrkA или TrkC. Показано, что ANA-12 эффективно проникает через гематоэнцефалический барьер после системного введения. Фармакологическое действие проявляется в течение 30 минут после внутрибрюшинной инъекции, при этом препарат в рабочих концентрациях не оказывает токсического воздействия на выживаемость нейронов [98].

Механизм действия ANA-12 основан на блокировании передачи сигналов от BDNF через рецептор TrkB: показана его способность вызывать выраженные анксиолитические и антидепрессантные эффекты у мышей, блокируя BDNF-зависимую пластичность в прилежащем ядре [78, 98], подавлять влияние ограничения калорий на когнитивные способности и блокировать вызванный физическими упражнениями нейрогенез в гиппокампе [73, 70].

В экспериментах на самцах крыс стандартной практикой является внутрибрюшинное введение ANA-12 в дозе 0.5 мг/кг дважды в день, с использованием 1% раствора ДМСО в качестве растворителя [121].

Таким образом, ANA-12 представляет собой хорошо описанный высокоселективный фармакологический инструмент для ингибирования

сигнального пути BDNF/TrkB *in vivo*, что позволяет использовать его для изучения роли этого пути в регуляции возбудимости мотонейронов, в том числе через контроль экспрессии ионного котранспортера KCC2.

2. ОРГАНИЗАЦИЯ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

2.1. Объект исследований

В экспериментах использовались самцы крыс линии Вистар, весом 200 ± 10 г. Разведение крыс производилось при температуре около $20-22^{\circ}\text{C}$, а их питание соответствовало рациону для лабораторных животных. Все эксперименты проводились в соответствии с нормами биоэтики проведения исследований на животных и были утверждены Физиологической секцией Национального комитета по биомедицинской этике.

В рамках исследования было проведено четыре серии экспериментов:

1. В первой серии (изучение содержания котранспортеров KCC2 и NKCC1) проведено два эксперимента:

- в первом использованы группы «С» (контроль, $n=8$), «7HS» (7-суточное антиортостатическое вывешивание, $n=8$) и «7HS+Phpz» (вывешивание с введением прохлорперазина, $n=8$);
- во втором — группы «С» (контроль, $n=8$), «7HS» (7-суточное вывешивание, $n=8$) и «7HS+CLP290» (вывешивание с введением CLP-290, $n=8$).

На материалах первой серии дополнительно проведён анализ ответов сигнальных путей камбаловидной мышцы крысы при фармакологической блокировке спонтанной электрической активности.

2. Во второй серии (регистрация биоэлектрической активности) проведено два эксперимента:

- в первом эксперименте изучали группы «7HS» (вывешивание, $n=8$) и «7HS+PHPZ» (вывешивание с введением прохлорперазина, $n=8$);
- во втором — группы «14HS» (вывешивание, $n=10$) и «14HS+CLP290» (вывешивание с введением CLP-290, $n=10$).

3. В третьей серии (изучение эффекта электромиостимуляции) животные были разделены на группы «С» (контроль, n=10), «7HS» (7-суточное вывешивание, n=10) и «7HStim» (7-суточное вывешивание с применением электромиостимуляции, n=10).

4. В четвёртой серии (исследование роли TrkB-рецепторов) использованы следующие группы: «CSO» (контроль с ложной операцией, n=10), «HSO» (14-суточное вывешивание с ложной операцией, n=10), «HStim» (14-суточное вывешивание с вживлением электродов и электромиостимуляцией, n=8) и «HStimBDNF-» (14-суточное вывешивание с вживлением электродов, электромиостимуляцией и введением блокатора TrkB-рецепторов, n=8).

После проведения экспериментов животных усыпляли 10%-ным раствором авертина, затем, в отдельных экспериментах, извлекали камбаловидные мышцы из обеих ног и поясничные отделы спинного мозга. Мышцы и поясничные отделы спинного мозга замораживались в жидком азоте и помещались в холодильник для хранения при температуре -85°C и последующей обработки.

2.2. Антиортостатическое вывешивание

Функциональная разгрузка задних конечностей экспериментальных животных производилась путём создания условий моделируемой микрогравитации методом антиортостатического вывешивания. Крысы размещались в индивидуальных клетках для вывешивания. К хвосту крысы при помощи пластыря прикреплялась металлическая петля, позволяющая подвесить хвост к поворотному механизму специально сконструированной тележки, свободно перемещающейся по расположенному в верхней части клетки рельсу (Рисунок 1). Передние конечности при этом опираются на пол клетки, позволяя животному передвигаться по клетке и иметь неограниченный доступ к воде и пище. Температуру и влажность в помещении с животными поддерживали на уровне 24°C и 50% соответственно при 12/12-часовом цикле свет/темнота. Все крысы имели доступ к стандартной диете и воде.

2.3. Электромиография камбаловидной мышцы крысы

Электромиограмму камбаловидной мышцы крысы регистрировали посредством внутримышечных электродов. В качестве электродов использовались многожильные провода из нержавеющей стали с тефлоновым покрытием PFA (A-M Systems, Sequim, WA, USA). Провода в мышце были подкожно подсоединены к разъёму, расположенному на спине крысы (Рисунок 6а). Для разъёмов с помощью 3D-принтера были изготовлены держатели (Рисунок 6б). Отверстия по широким краям держателя разъёма позволяли плотно прикрепить разъём к коже хирургическим швом. Для защиты разъёма от возможных повреждений был использован съёмный защитный колпачок (Рисунок 6с).

Имплантация электрода проводилась под общей анестезией (Золетил 100, 28 мг/кг веса животного + ксилазин, 0,28 мл/кг веса, внутримышечно) в соответствии с принципами асептики и антисептики. Для доступа к камбаловидной мышце, на боковой поверхности задней конечности сделан разрез длиной около 1,5 см. Для

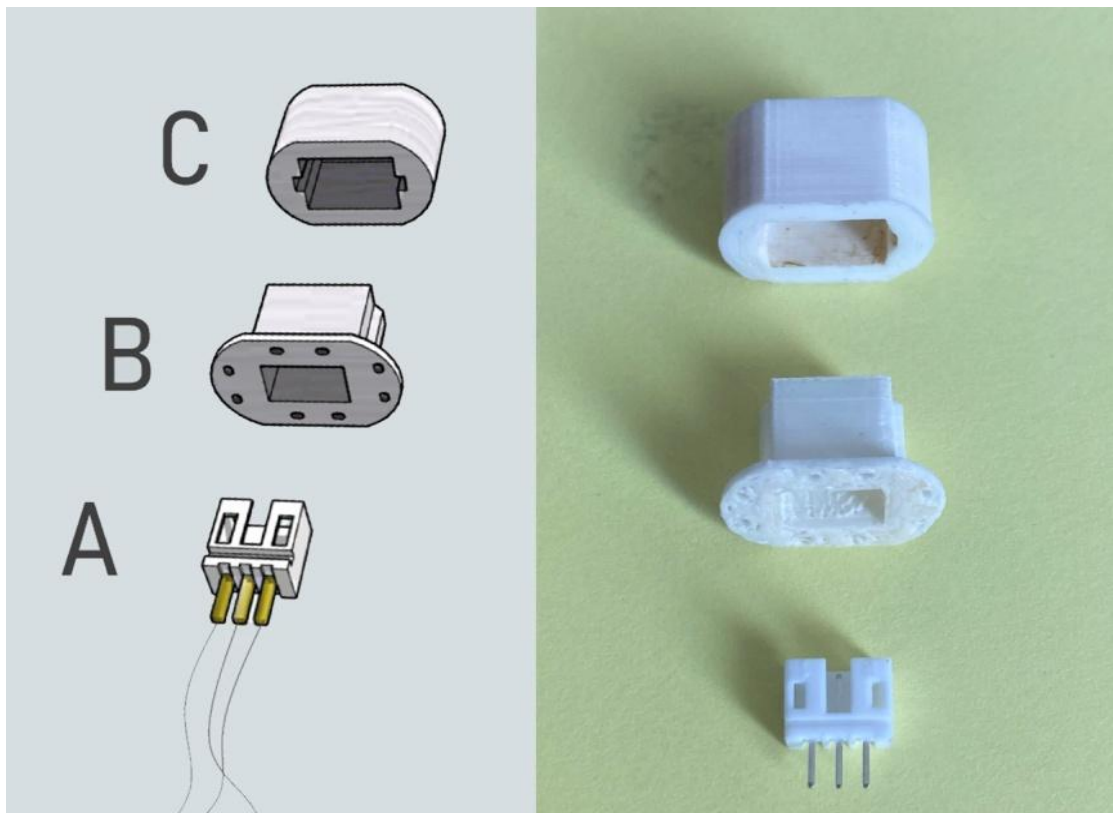


Рисунок 6. Штекерный разъём с защитным колпачком, использованный в эксперименте: (а) внутренняя часть разъёма; (б) держатель разъёма; (с) съёмный защитный колпачок

установки штекерного разъема сделан разрез примерно на 1,5 см выше поясничного отдела позвоночника. Кровотечение из сосудов останавливалось при помощи электрокоагуляции.

Провода вставлялись путём продевания нити через иглу 23-го калибра, пропущенную через мышцу. Отрезок провода со снятой изоляцией (~1,5 мм) имплантирован в среднюю часть камбаловидной мышцы правой задней конечности. Два провода вставлены параллельно мышечным волокнам (на расстоянии ~2 мм друг от друга). Каждая проволока закреплена узлами (этилоновый шов 4-0) на входе и выходе из мышцы, при этом мышца могла свободно сокращаться. Штекерный разъем с держателем и прикрепленным силиконовым овалом был вставлен в разрез над поясничным отделом позвоночника и пришит к коже с помощью этилона 4-0 (Рисунок 7). Разрез на задней конечности был зашит викрилом 5-0, а кожа зашита этилоном 4-0. После операции каждая крыса получила 5 мл физиологического раствора и инъекцию бициллина-3 (120 000 ЕД/кг, подкожно) для предотвращения возможной инфекции. Перед проведением электрофизиологических исследований животные проходили



Рисунок 7. Крыса со штекерным разъемом, закреплённым на поясничном отделе позвоночника

послеоперационный реабилитационный период в течение 7 дней. Электромиографический сигнал усиливался при помощи дифференциального усилителя переменного тока AM-Systems 1700 с частотой дискретизации 5 кГц. Первоначально необработанный сигнал был отфильтрован с использованием фильтров низкой частоты (100 Гц) и высокой частоты (5000 Гц). После этого полученный сигнал был дополнительно отфильтрован в программе PowerGraph с использованием полосового фильтра 100 Гц – 1000 Гц. Полученный сигнал обработан с помощью модуля АЦП L-CARD E14-440D и соответствующего программного обеспечения (LGRAPH2 и Powergraph 3.3). Для оценки спектральных характеристик принимаемого сигнала использовалось быстрое преобразование Фурье (FFT), после чего применялись дополнительные цифровые полосовые фильтры. Анализ амплитуды ЭМГ-сигнала проводился по среднеквадратичной огибающей (RMS). Скелетные мышцы во время записи ЭМГ не подвергались стимуляции. Перед началом антиортостатического вывешивания регистрировали ЭМГ-активность камбаловидной мышцы у крысы в состоянии покоя без функциональной разгрузки конечностей (крыс помещали в маленькие клетки и оставляли одних для ограничения движений) в течение 15 мин 3 раза в день в течение 2 дней подряд. Несмотря на то, что крысы время от времени двигались, в целом они вели малоподвижный образ жизни. Анализировались электромиограммы, полученные в состоянии покоя. Затем крысам разгружали задние конечности на 7 дней. В условиях разгрузки активность ЭМГ регистрировалась ежедневно (3 раза в день по 15 мин).

2.4. Электростимуляция мышц голени крысы

На латеральной поверхности бедра седалищный нерв делится на большеберцовый нерв, общий малоберцовый нерв и медиальный кожный нерв икры. Большеберцовый нерв спускается по подколенной ямке в заднюю поверхность голени [2]. Спиралевидные электроды устанавливали с обеих сторон большеберцового нерва руководствуясь методикой Kim Y (Kim Y et al., 2018). Крыс

анестезировали золетилом в дозе 28 мг/кг и ксилазина гидрохлоридом (XylaVET 20 мг/мл) в дозе 0, 28 мл/кг массы внутримышечно. Шерстный покров в местах доступа к мышцам удаляли ветеринарным триммером Codos. При необходимости применяли 1-3% изофлуран в смеси с кислородом. Операции проводились со строгим соблюдением правил асептики и антисептики. Кожу оперируемых областей обрабатывали этиловым спиртом и йодом. Провода протягивались под кожей к мышце от головной розетки, которая фиксировалась к черепу с помощью 3х винтов и стоматологического цемента. В положении животного на правом боку делали надрез на коже левой задней конечности длиной примерно 2 см в районе середины бедра. Тупыми хирургическими ножницами отделяли кожу от подлежащих тканей и делали небольшой разрез на двуглавой мышце бедра чуть ниже середины. Затем мышцы раздвигали тупо, пока не становился виден седалищный нерв и место его разделения на 3 ветви. С помощью скальпеля зачищали изоляцию на краях проводов примерно на 2 см и обворачивали вокруг иглы 21 G. Полученные спирали фиксировали к мышцам тонким ПГА (6-0) на расстоянии 1,5 мм от большеберцового нерва с обеих сторон от него. Делали 3-4 шва с каждой стороны. Затем в рану наносили 2-3 капли раствора бициллина-5 в физиологическом растворе и зашивали мышцы двойным швом при помощи ПГА (6-0). Оставшиеся провода убирали в карман под кожей, который делали на бедре над областью разреза. Затем снова наносили раствор антибиотика и зашивали кожу этилоном (4-0). Проверяли работу системы, присоединяя розетку к стимулятору 3800 Multistim: 8-channel stimulator. Подвергали крысу действию нескольких импульсов тока и наблюдали сокращение мышц тазовой конечности в ответ на стимуляцию. Применяли мелоксикам трижды в дозе 1мг/ кг подкожно каждые 24 часа после операции и бициллин 5 в дозе 20000 ед/крысу после операции и далее 1 раз в 10 дней. После операции тщательно наблюдали за состоянием каждого животного, проводили обработку швов настойкой йода. С момента операции до введения в эксперимент восстановление составляло не менее 5-7 дней. В ходе электростимуляции биполярные импульсы с длительностью 0,4 мс, частотой 20 герц и амплитудой от 0,2 до 0,4 Ампер подбирались индивидуально для крыс, пока

не было видимого сокращения. Стимуляция проводилась в течение 7 суток по 8 часов в сутки в соответствии с протоколом Francis Canon et al. [22].

2.5. Фармакологическая модуляция содержания KCC2/NKCC1 в мотонейронах спинного мозга

В экспериментах с прохлорперазином препарат (#P9178; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) вводили внутривентрикулярно дважды в день в концентрации 5 мкг на килограмм веса животного в физрастворе с 0.1% DMSO. Применяемая доза была высчитана [92] на основе эквивалентной человеческой терапевтической дозы (112 mg/kg). Крысы из групп С и 7HS получали эквивалентную дозу физраствора с 0.1% DMSO без прохлорперазина.

В экспериментальных сериях с введением CLP-290 (Macklin, Китай) препарат вводили внутривентрикулярно один раз в день в дозировке 100 мг/кг в 15%- ном растворе циклодекстрина. Раствор фильтровали через бактериальный фильтр с размером пор 0.22 мкм.

2.6. Фармакологическое ингибирование BDNF-чувствительных TRKb-рецепторов в мотонейронах спинного мозга

В рамках экспериментального исследования эффектов фармакологического ингибирования BDNF-чувствительных TRKb-рецепторов самцы крыс Wistar с массой тела 180–210 г и возрастом 1,5-2 месяца были разделены на 4 группы: 1) «CSO» – группа сидячего контроля с ложной операцией и ежедневным введением плацебо (n = 10); 2) «HSO» – группа антиортостатического 14- суточного вывешивания с ложной операцией и ежедневным введением плацебо (n = 10); 3) «HStim» – группа антиортостатического 14-суточного вывешивания с электростимуляцией одной задней конечности и ежедневным введением плацебо (n = 8); 4) «HStimBDNF-» – группа антиортостатического 14-суточного вывешивания электростимуляцией одной задней конечности и ежедневным введением ингибитора TrkB ANA-12 (n = 8). В качестве плацебо использовали

физиологический раствор, который вводили внутривентриально два раза в день. Ингибитор TrkB ANA-12 (Macklin, Китай) вводили внутривентриально два раза в день. Каждая инъекция содержала вещества 0,5 мг/кг в физиологическом растворе с 2,4% ДМСО.

2.7. Анализ содержания белков

Содержание KCC2, NKCC1, белков-компонентов ГАМКэргического сигнального пути, а также уровень фосфорилирования p70 S6 исследовали при помощи *вестерн-блотинга*.

Замороженные образцы тканей крысы гомогенизировали в буферной лизисной системе RIPA. Лизированные образцы центрифугировали в течение 15 минут при температуре +4°C и 12000 оборотах в минуту. Отобран супернатант; концентрация белка в супернатанте измерена методом брэтфорда

Электрофорез проводили в 10% полиакриламидном геле, в мини-системе Bio-Rad (США) в течение 1 ч при силе тока 17 мА на один гель. Перенос белков на нитроцеллюлозную мембрану (Bio-Rad, США) осуществляли в системе mini Trans-Blot (Bio-Rad, США) в течение 2 ч при температуре +4 °C и постоянном напряжении 100 В. Затем, для проверки равной загрузки белка на все дорожки, нитроцеллюлозная мембрана красилась краской Ponceau S. После этого мембрану отмывали от Ponceau S и блокировали в 4%-ном растворе сухого молока в PBST (PBS + 0,1 % Tween 20) при комнатной температуре в течение 1 ч. Затем проводили инкубацию (в течение 15 ч, +4 °C) с первичными антителами против исследуемых белков и пуромицина. После этого отмывали мембраны в PBST 3 раза по 5 мин. Затем мембраны инкубировали в течение 1 ч с биотинилированными вторичными антителами. Далее проводили отмывку в PBST 3 раза по 5 мин. Белковые полосы выявляли на мембране с помощью Star TM Substrate Kit (Bio-Rad, USA).

Анализ белковых полос проводили с использованием блот-сканера C-DiGit (LI-COR Biotechnology, USA) и соответствующей программы Image Studio Digits. В

качестве референсного белка для нормализации полученного сигнала использовался тубулин.

При анализе белковых полос использовались блот-сканер C-DiGit (LI-COR Biotechnology, США) и программа Image Studio Digits. Нормирование фосфорилированных формы белков производилось на соответствующие тотальные формы белков. Хемилюминесцентный сигнал полосы контрольной группы на анализируемой мембране принимали за 100%, а сигнал полос других групп сравнивали с сигналом полос контрольной группы, расположенных на одной и той же мембране.

Анализ содержания BDNF в поясничном отделе спинного мозга крысы производился при помощи иммуноферментного анализа. Иммуноферментный анализ выполнялся при помощи набора Rat BDNF ELISA Kit («Elabscience Bionovation Inc.», США) в соответствии с инструкцией производителя.

2.8. Анализ содержания тотальной и рибосомальной РНК

Для выделения РНК из мышечной ткани использовался набор RNeasy Micro Kit (Qiagen, США). Нарезанные на криостате Leica образцы ткани были измерены на электронных весах. Концентрация тотальной РНК определялась на планшетном спектрофотометре. Общий объем пробы нормировался на вес ткани, из которой была выделена данная проба. Аликвота тотальной РНК денатурировалась равным объемом буфера для нанесения (Thermo Scientific, США) и нагревали в течение 10 минут при 70°C. Для проведения обратной транскрипции были использованы компоненты фирмы «Синтол» (Россия): 30 мкМ случайных гексануклеотидов, 17,4 мкМ олиго-d(T)15, 1,3 мМ дНТФ, 0,02 ед./мкл ингибитора РНКазы, 6 ед./мкл М-MLV-ревертазы, 5х-буфер для М-MLV-ревертазы. Обратную транскрипцию проводили в амплификаторе (CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System, «Bio-Rad Laboratories», США). Для проведения ПЦР в реальном времени использовали полученную в результате обратной транскрипции кДНК, праймеры с концентрацией 10 мкМ мастер-микс (0,3 мМ дНТФ, 3 мМ MgCl₂, 2,5 мкл 10-

кратного ПЦР-буфера Б (рН 8,8), 0,06 ед./мкл Taq ДНК-полимеразы, «Синтол»). Для оценки содержания кДНК различных генов в каждой пробе были использованы значения $C_t(\text{тест})$ и $C_t(\text{реф})$, где $C_t(\text{реф})$ – точка пересечения базовой линии и графика амплификации референсного гена в пробе, а $C_t(\text{тест})$ – точка пересечения базовой линии и графика амплификации изучаемого гена в той же пробе. В качестве референсного гена с помощью базы EST Database был выбран ген *rp119*.

2.9. Статистический анализ

Так как нормальное распределение выборки было подтверждено не во всех случаях, для сравнения групп между собой был использован непараметрический тест Крускала-Уоллиса. Для статистического анализа использовался программный пакет SigmaPlot 12.5. Данные представлены в виде среднего значения $\pm$ стандартной ошибки среднего (выраженного в процентах от среднего значения контрольной группы). Уровень значимости $p < 0,05$ считался статистически значимым.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

3.1. Исследование содержания мембранных ионных котранспортёров KCC2 и NKCC1 в мотонейронах поясничного отдела спинного мозга крыс при функциональной разгрузке и модуляция их содержания в мотонейронах с помощью фармакологических средств

В двух экспериментах исследовано влияние 7-суточного антиортостатического вывешивания на содержание KCC2 и NKCC1 в мотонейронах поясничного отдела спинного мозга при функциональной разгрузке конечностей. 7-суточное антиортостатическое вывешивание привело к значимому снижению содержания KCC2 в мотонейронах поясничного отдела спинного мозга крысы до 65% (в первом эксперименте) и 50% (во втором эксперименте) от уровня контрольных животных. При этом, в группах с внутрибрюшинным введением активаторов KCC2 прохлорперазина (Рисунок 8) и CLP-290 (Рисунок 9) на фоне 7-суточного антиортостатического вывешивания не наблюдалось значимых отличий содержания KCC2 от контрольных животных.

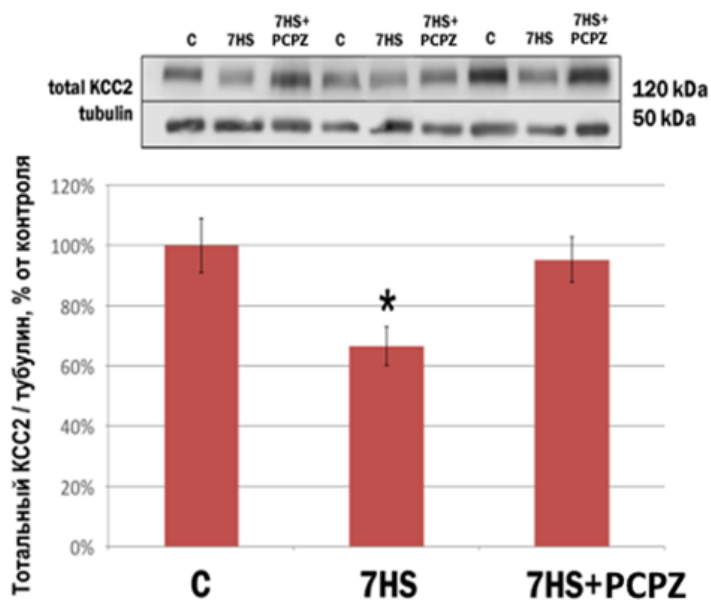


Рисунок 8. Содержание калий-хлоридного котранспортёра KCC2 в мотонейронах поясничного отдела спинного мозга крысы на фоне 7-суточного вывешивания. С – контроль, 7HS – семисуточное вывешивание, 7HS+PCPZ – семисуточное вывешивание с введением прохлорперазина

Снижение содержания КСС2 в поясничном отделе спинного мозга сопровождалось значимым (свыше 140% от уровня контроля) повышением содержания его антагониста NKCC1. В эксперименте с введением прохлорперазина на фоне антиортостатического вывешивания содержание NKCC1 в поясничном отделе спинного мозга сохранилось на уровне значений контрольной группы (Рисунок 10). В эксперименте с CLP-290 введение препарата на фоне антиортостатического вывешивания сопровождалось статистически значимым снижением содержания NKCC1 в поясничном отделе спинного мозга относительно значений контрольной группы (Рисунок 11).

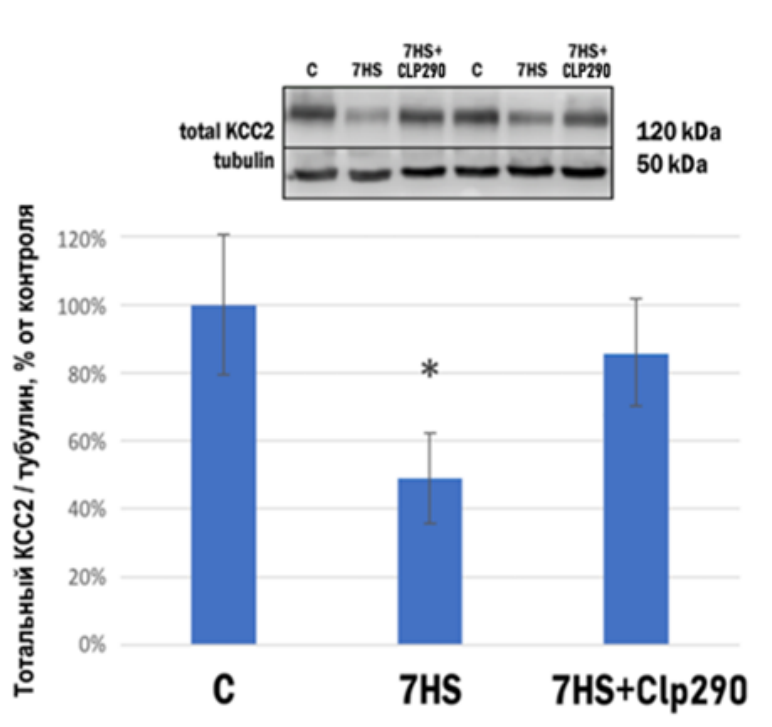


Рисунок 9. Содержание калий-хлоридного котранспортёра КСС2 в мотонейронах поясничного отдела спинного мозга крысы на фоне 7-суточного вывешивания. С – контроль, 7HS – семисуточное вывешивание с введением плацебо, 7HS+CLP290 – семисуточное вывешивание с введением CLP.290, * – статистически значимое отличие от уровня контроля.

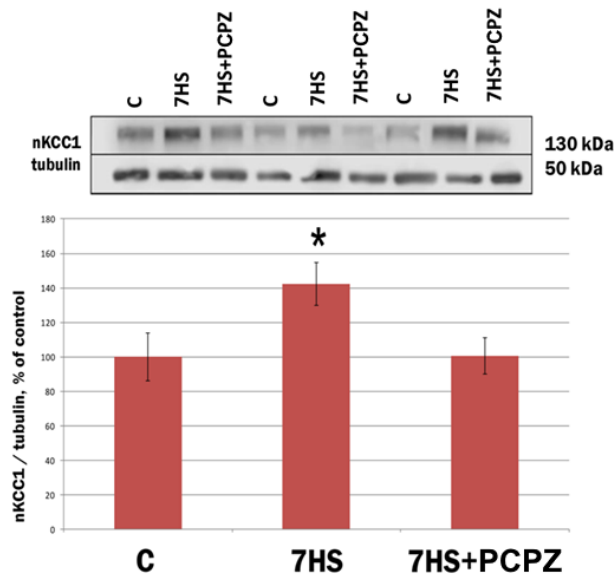


Рисунок 10. Содержание натрий-калий-хлоридного котранспортёра NKCC1 в мотонейронах поясничного отдела спинного мозга крысы на фоне 7-суточного вывешивания. C – контроль, 7HS – семисуточное вывешивание с введением плацебо, 7HS+PHPZ – семисуточное вывешивание с введением прохлорперазина, * – статистически значимое отличие от уровня контроля.

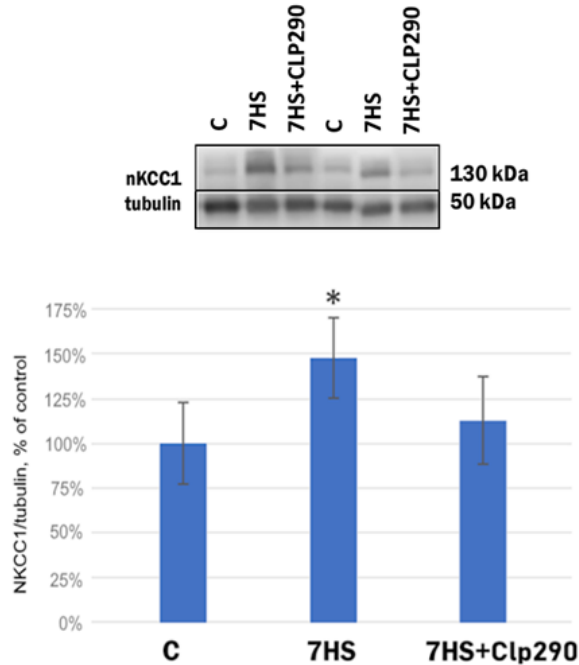


Рисунок 11. Содержание натрий-калий-хлоридного котранспортёра NKCC1 в мотонейронах поясничного отдела спинного мозга крысы на фоне 7-суточного вывешивания. C – контроль, 7HS – семисуточное вывешивание с введением плацебо, 7HS+CLP290 – семисуточное вывешивание с введением CLP.290, * – статистически значимое отличие от уровня контроля.

3.2. Регистрация и фармакологическая модуляция биоэлектрической активности камбаловидной мышцы крысы на разных сроках функциональной разгрузки различной продолжительности

В двух экспериментах (с 7-суточным и 14-суточным антиортостатическим вывешиванием) интегральная ЭМГ-активность камбаловидной мышцы в первые сутки антиортостатического вывешивания снизилась до 20% от контрольных значений. Начиная с третьих суток вывешивания, в обоих экспериментах отмечался рост интегральной ЭМГ в группе «чистого» вывешивания: в первом эксперименте до 40% к пятым суткам вывешивания; во втором эксперименте до 50% к пятым суткам и до 90% к двенадцатым суткам антиортостатического вывешивания (Рисунок 12).

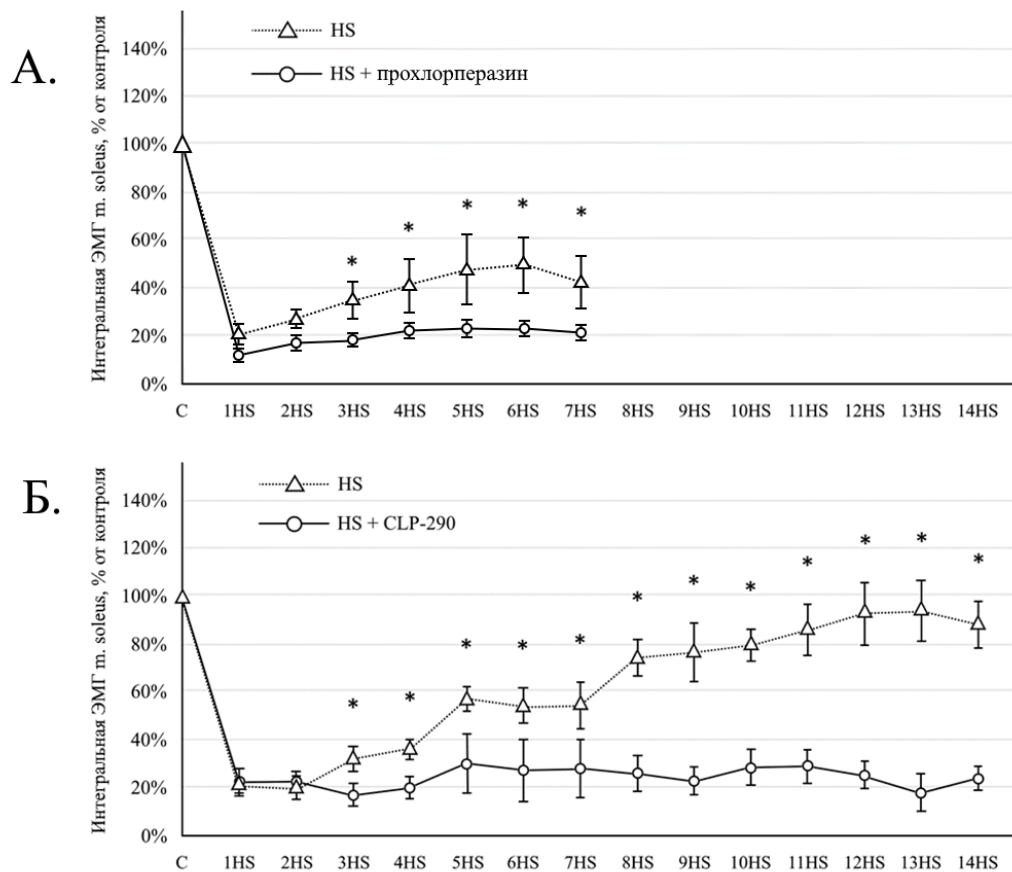


Рисунок 12. Динамика интегральной ЭМГ-активности камбаловидной мышцы на фоне 7-суточного (с введением и без введения прохлорперазина) и 14-суточного (с введением и без введения CLP-290) антиортостатического вывешивания. * - статистически значимое между группами с введением и без введения препарата ($p < 0,05$).

В обоих экспериментах в группах с внутривенным введением фармакологических активаторов КСС2 на фоне антиортостатического вывешивания (прохлорперазина в эксперименте с 7-суточным вывешиванием и CLP-290 в эксперименте с 14-суточным вывешиванием) наблюдалось статистически значимое отличие в уровне интегральной ЭМГ-активности от групп «чистого» вывешивания начиная с третьих суток вывешивания, при этом в группах с внутривенным введением активаторов КСС2 уровень интегральной ЭМГ-активности за всё время антиортостатического вывешивания не превышал 25% от уровня контроля (в эксперименте с прохлорперазином) и 30% от уровня контроля (в эксперименте с CLP-290). Анализ ЭМГ-сигнала камбаловидной мышцы также показал, что средние значения величины медианной частоты (Рисунок 13) существенно не отличались между группами с введением и без введения

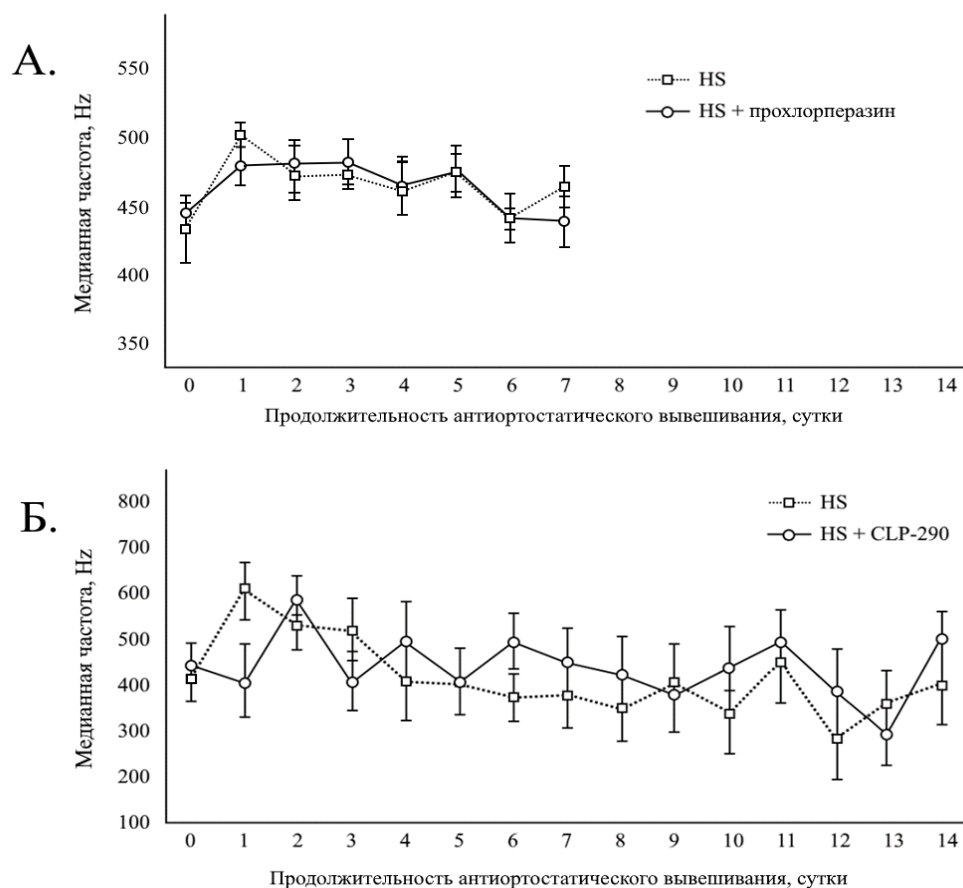


Рисунок 13. Медианная частота ЭМГ камбаловидной мышцы на фоне 7-суточного (с введением и без введения прохлорперазина) и 14-суточного (с введением и без введения CLP-290) антиортостатического вывешивания. * статистически значимое между группами с введением и без введения препарата ($p < 0,05$).

активаторов КСС2 в обоих экспериментах в течение всего периода антиортостатического вывешивания. Примеры записи ЭМГ-активности камбаловидной мышцы приведены на рисунке 14.

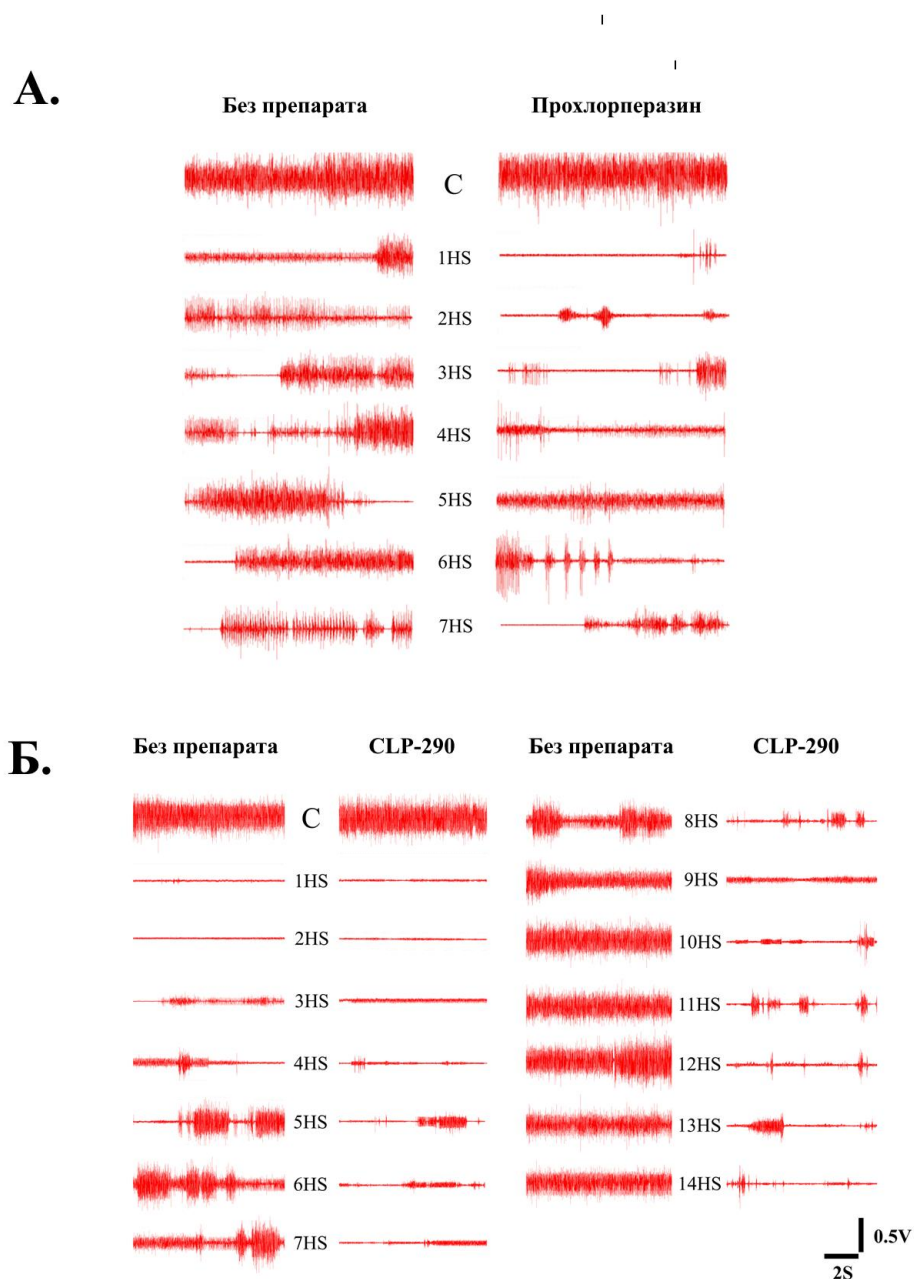


Рисунок 14. Примеры записи ЭМГ-активности камбаловидной мышцы перед антиортостатическим вывешиванием (С) и во 7-суточного (с введением и без введения прохлорперазина) и 14-суточного (с введением и без введения CLP-290) антиортостатического вывешивания. * статистически значимое между группами с введением и без введения препарата ($p < 0,05$).

3.3. Исследование эффекта применения электромиостимуляции в периоды пониженной электрической активности *m.soleus* крысы в условиях гравитационной разгрузки

В эксперименте с электростимуляцией большеберцового нерва крысы на фоне 7-суточного вывешивания зарегистрировано снижение содержания KCC2 (Рисунок 15) и увеличение содержания его антагониста NKCC1 (Рисунок 16) в поясничном отделе спинного мозга животных из группы чистого вывешивания в сравнении с группой контроля. Электростимуляция предотвратила снижение содержания KCC2 и рост содержания NKCC1 в спинном мозге вывешенных животных.

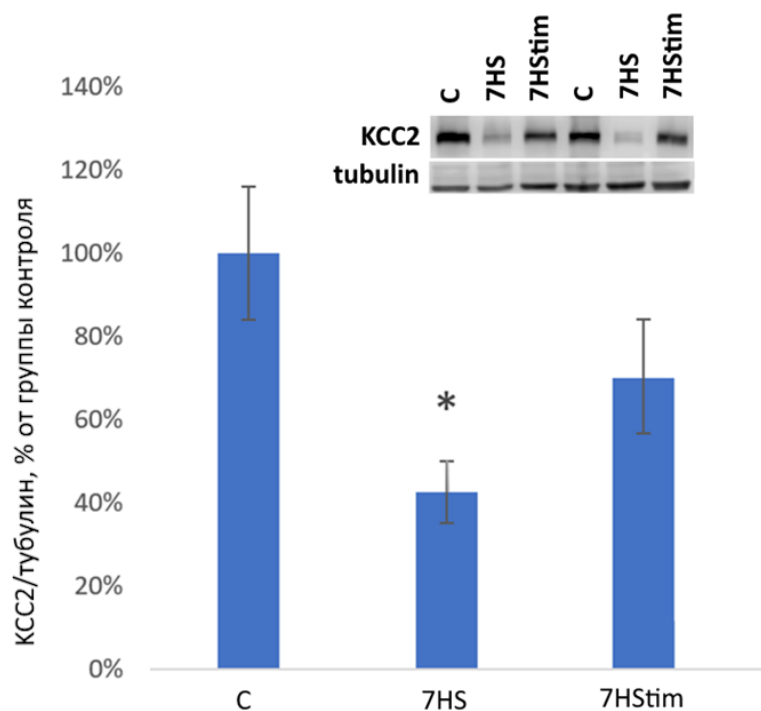


Рисунок 15. Содержание KCC2 в поясничном отделе спинного мозга крысы при 7-суточной электростимуляции. C – виварный контроль; 7HS – семисуточная гравитационная разгрузка; 7HStim – семисуточная гравитационная разгрузка в сочетании с электростимуляцией, * – статистически значимое отличие от группы контроля.

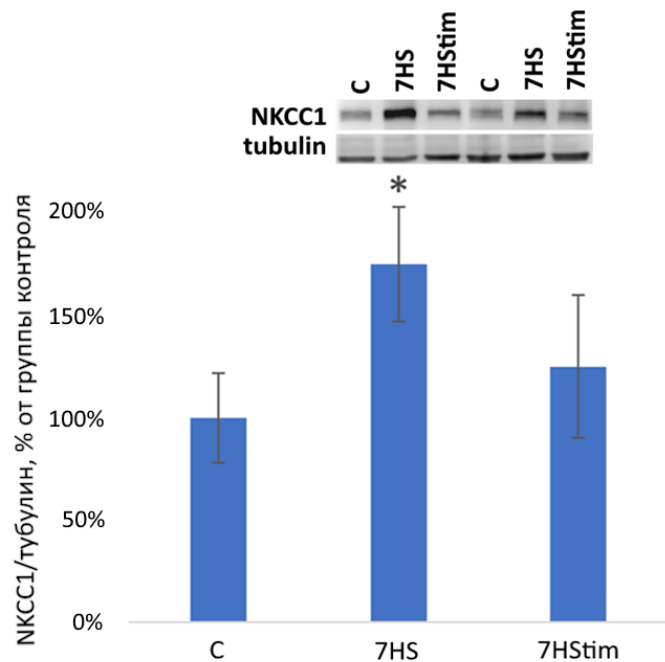


Рисунок 16. Содержание NKCC1 в поясничном отделе спинного мозга крысы при 7-суточной электростимуляции. C – виварный контроль; 7HS – семисуточная гравитационная разгрузка; 7Hstim – семисуточная гравитационная разгрузка в сочетании с электростимуляцией, * – статистически значимое отличие от группы контроля.

3.4. Исследование роли TRKb-рецепторов в регуляции содержания KCC2 в мотонейронах поясничного отдела спинного мозга крысы

Анализ компонентов ГАМК-эргической системы в поясничном отделе спинного мозга крыс производился путём оценки содержания в мотонейронах поясничного отдела спинного мозга глутаматдекарбоксилазы (GAD 65/67), тирозинкиназного рецептора B (TrkB), рецепторов ГАМК (GABA A α 1, GABA A β 1, GABA BR1), и везикулярного транспортера ГАМК VGAT, как показателя активности выброса ГАМК.

Содержание калий-хлоридного котранспортёра KCC2 в поясничном отделе спинного мозга экспериментальных животных при 14-суточном

антиортостатическом вывешивании (HSO) статистически значимо снизилось до уровня 47% от значений группы контроля (CSO), что соответствует ранее полученным результатам. При этом в группе вывешивания с электростимуляцией (Hstim) не наблюдалось отличий от группы контроля, а внутрибрюшинное введение ингибитора TRKb-рецепторов ANA-12 на фоне антиортостатического вывешивания с электростимуляцией (HstimBDNF-) привело к снижению содержания KCC2 до уровня «чистого» вывешивания (рисунок 17).

Содержание натрий-калий-хлоридного котранспортёра NKCC1 в поясничном отделе спинного мозга животных при 14-суточном антиортостатическом вывешивании (HSO) статистически значимо увеличилось до уровня 209% от значений группы контроля (CSO). В группе с электростимуляцией на фоне антиортостатического вывешивания (Hstim) не наблюдалось значимых отличий от группы контроля. В группе с внутрибрюшинным введением ингибитора TRKb-рецепторов ANA-12 на фоне антиортостатического вывешивания с

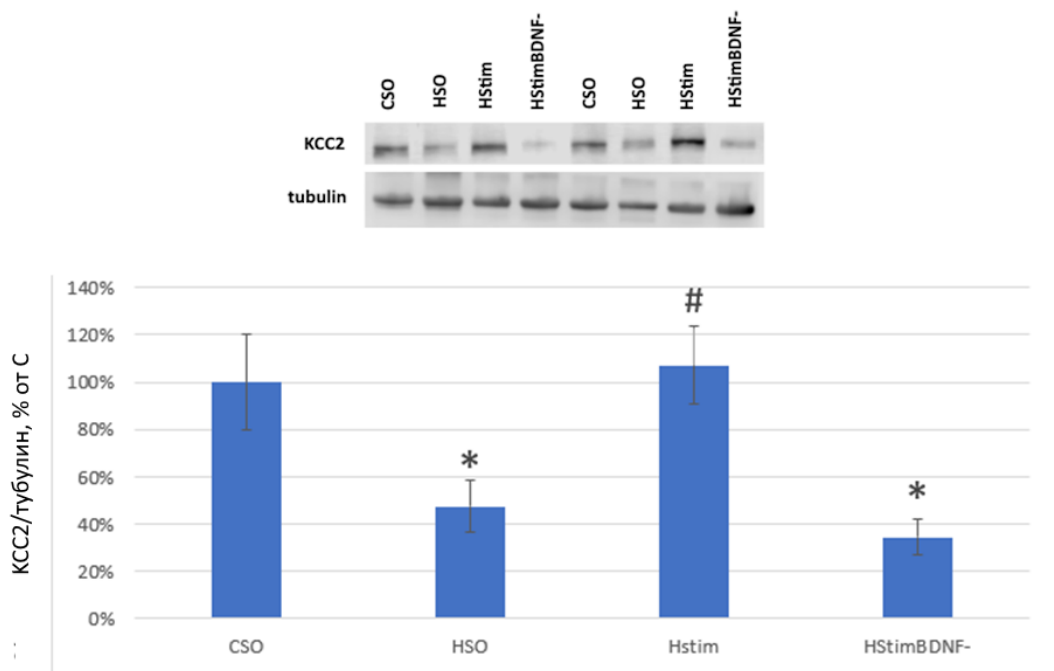


Рисунок 17. Содержание KCC2 в поясничном отделе спинного мозга крысы при 14-суточной электростимуляции с введением и без введения ANA-12. CSO – ложнооперированный виварный контроль; HSO – 14-суточная гравитационная разгрузка с ложной операцией; Hstim – 14-суточная гравитационная разгрузка в сочетании с электростимуляцией; HstimBDNF- – электростимуляция в сочетании с введением ANA-12 на фоне 14-суточной гравитационной разгрузки; * - достоверное отличие от группы контроля

электростимуляцией (HstimBDNF-) наблюдалось достоверное снижение содержания NKCC1 в поясничном отделе спинного мозга относительно группы «чистого» вывешивания (HSO) (рисунок 18).

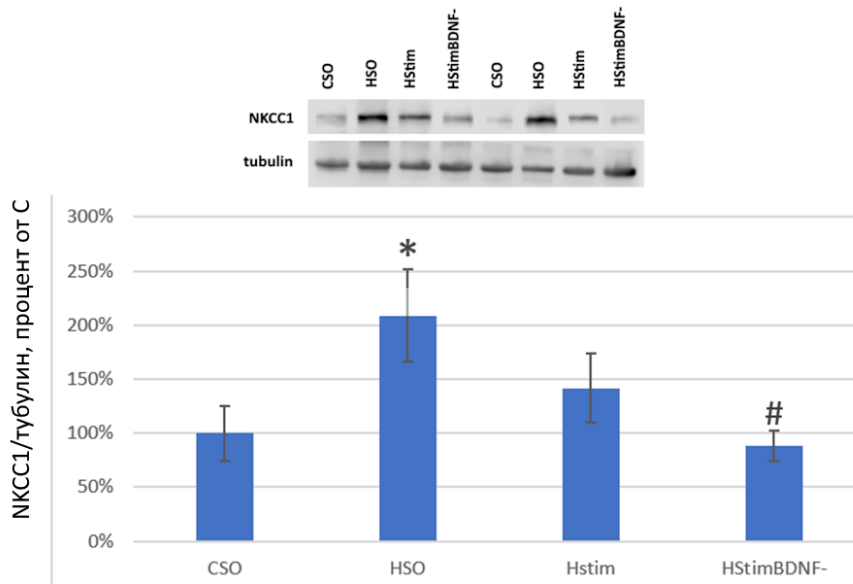


Рисунок 18. Содержание NKCC1 в поясничном отделе спинного мозга крысы при 14-суточной электростимуляции с введением и без введения ANA-12. CSO – ложнооперированный виварный контроль; HSO – 14-суточная гравитационная разгрузка с ложной операцией; Hstim – 14-суточная гравитационная разгрузка в сочетании с электростимуляцией; HstimBDNF- - электростимуляция в сочетании с введением ANA-12 на фоне 14-суточной гравитационной разгрузки; * - статистически значимое отличие от группы контроля.

Содержание TRKb (рецепторов BDNF) в поясничном отделе спинного мозга животных при 14-суточном антиортостатическом вывешивании (HSO) достоверно увеличилось относительно группы CSO. В группе вывешивания с электростимуляцией (группа Hstim) не обнаружено отличий от группы контроля (CSO). Внутривентрикулярное введение ингибитора ANA-12 на фоне вывешивания с электростимуляцией (группа HstimBDNF-) достоверно снизило содержание TRKb

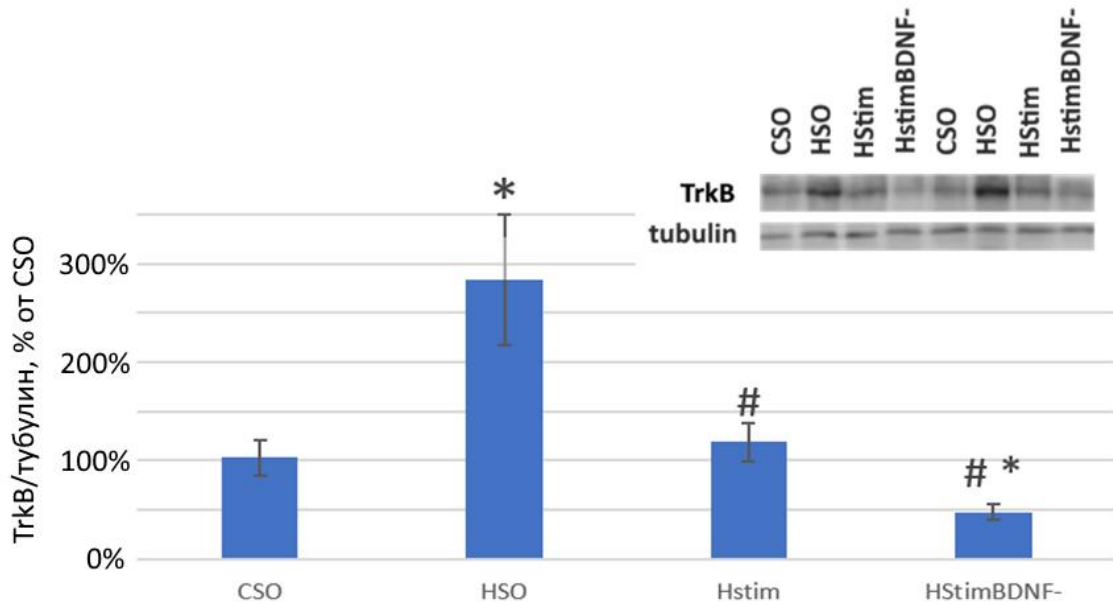


Рисунок 19. Содержание TRKb в поясничном отделе спинного мозга крысы при 14-суточной электростимуляции с введением и без введения ANA-12. CSO – ложнооперированный виварный контроль; HSO – 14-суточная гравитационная разгрузка с ложной операцией; Hstim – 14-суточная гравитационная разгрузка в сочетании с электростимуляцией; HstimBDNF- - электростимуляция в сочетании с введением ANA-12 на фоне 14-суточной гравитационной разгрузки; * - статистически значимое отличие от группы контроля.

в мотонейронах поясничного отдела спинного мозга крысы относительно группы CSO (Рисунок 19).

Внутрибрюшинное введение ингибитора TRKb-рецепторов ANA-12 на фоне антиортостатического вывешивания с электростимуляцией (HstimBDNF-) достоверно снизило содержание α -субъединицы рецептора ГАМК (GABA A α) в поясничном отделе спинного мозга животных до уровня 43% от значений группы контроля (CSO), при этом не наблюдалось изменения содержания GABA A α в остальных группах (рисунок 20). Содержание GABA A β в поясничном отделе спинного мозга животных при 14-суточном антиортостатическом вывешивании (HSO) статистически значимо увеличилось до уровня 200% от значений группы контроля (CSO), при этом в группах вывешивания с электростимуляцией (Hstim) и с введением ANA-12 на фоне антиортостатического вывешивания и электростимуляции (HstimBDNF-) не наблюдалось отличий от группы «чистого» контроля (рисунок 21).

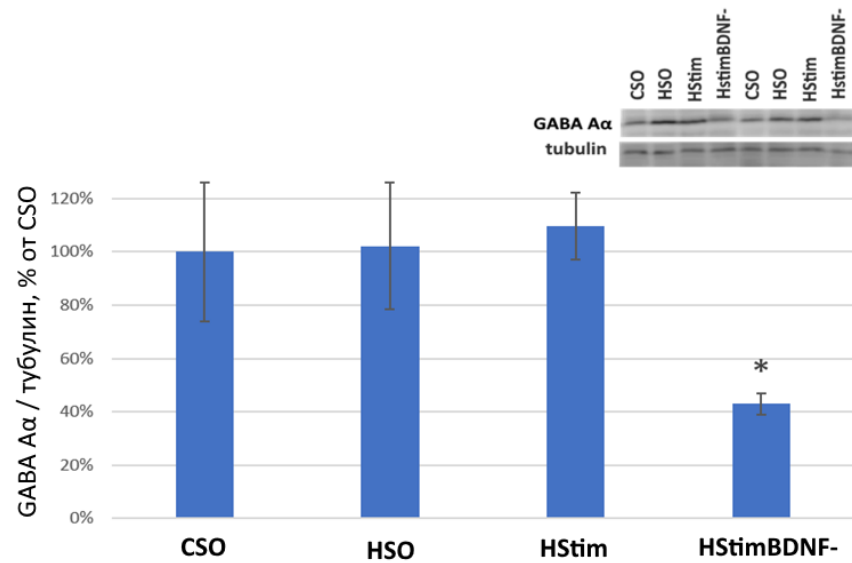


Рисунок 20. Содержание GABA Aα в поясничном отделе спинного мозга крысы при 14-суточной электростимуляции с введением и без введения ANA-12. CSO – ложнооперированный виварный контроль; HSO – 14-суточная гравитационная разгрузка с ложной операцией; HStim – 14-суточная гравитационная разгрузка в сочетании с электростимуляцией; HStimBDNF- - электростимуляция в сочетании с введением ANA-12 на фоне 14-суточной гравитационной разгрузки; * - статистически значимое отличие от группы контроля.

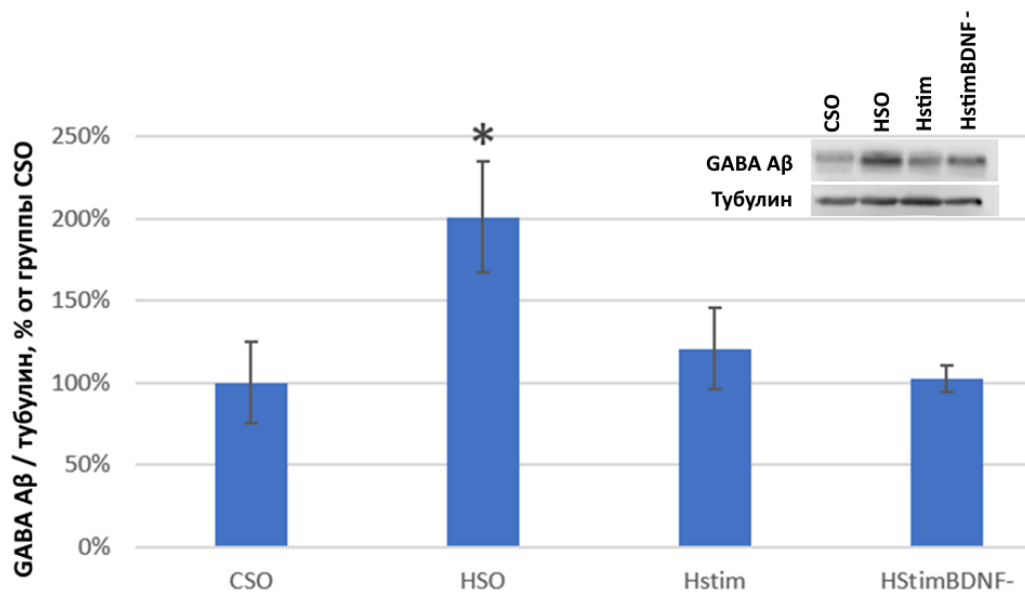


Рисунок 21. Содержание GABA Aβ в поясничном отделе спинного мозга крысы при 14-суточной электростимуляции с введением и без введения ANA-12. CSO – ложнооперированный виварный контроль; HSO – 14-суточная гравитационная разгрузка с ложной операцией; HStim – 14-суточная гравитационная разгрузка в сочетании с электростимуляцией; HStimBDNF- - электростимуляция в сочетании с введением ANA-12 на фоне 14-суточной гравитационной разгрузки; * - статистически значимое отличие от группы контроля.

Внутрибрюшинное введение ANA-12 на фоне антиортостатического вывешивания с электростимуляцией (HstimBDNF-) статистически значимо снизило содержание рецептора ГАМК GABA BR1 в поясничном отделе спинного мозга животных до уровня 61% от значений группы контроля (CSO), при этом не наблюдалось изменения содержания GABA BR1 в остальных группах (рисунок 22).

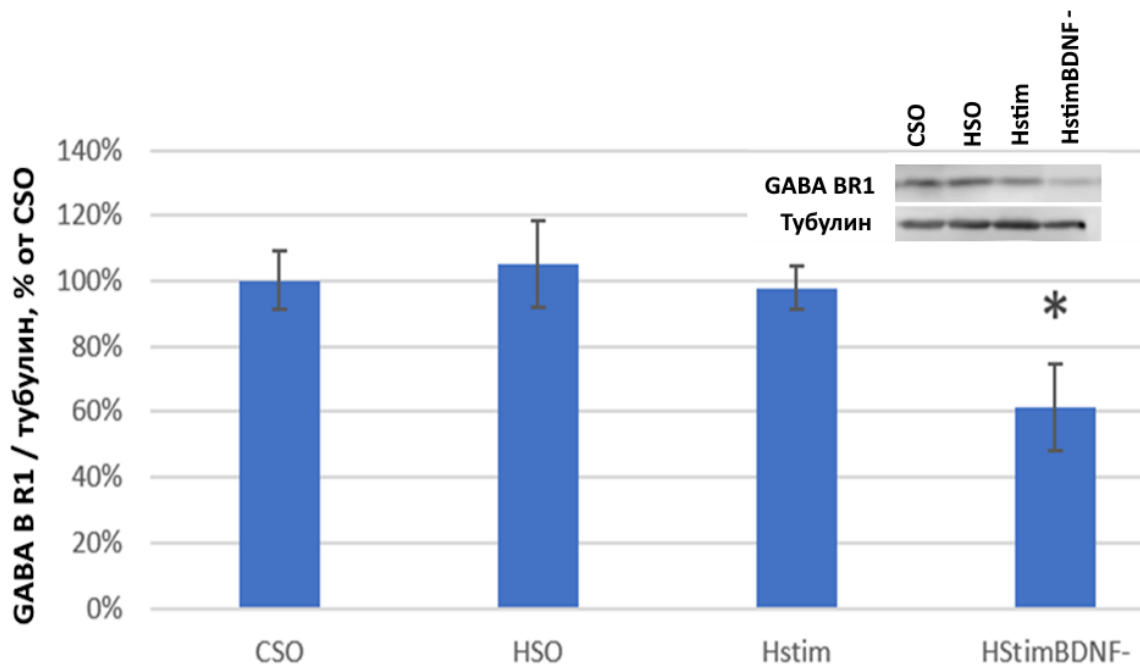


Рисунок 22. Содержание GABA BR1 в поясничном отделе спинного мозга крысы при 14-суточной электростимуляции с введением и без введения ANA-12. CSO – ложнооперированный виварный контроль; HSO – 14-суточная гравитационная разгрузка с ложной операцией; HStim – 14-суточная гравитационная разгрузка в сочетании с электростимуляцией; HStimBDNF- - электростимуляция в сочетании с введением ANA-12 на фоне 14-суточной гравитационной разгрузки; * - статистически значимое отличие от группы контроля.

В ходе 14-суточного антиортостатического вывешивания не обнаружено достоверного изменения содержания в поясничном отделе спинного мозга везикулярного котранспортёра глутамата (VGAT) относительно уровня контроля ни в одной из исследуемых групп животных (Рисунок 23).

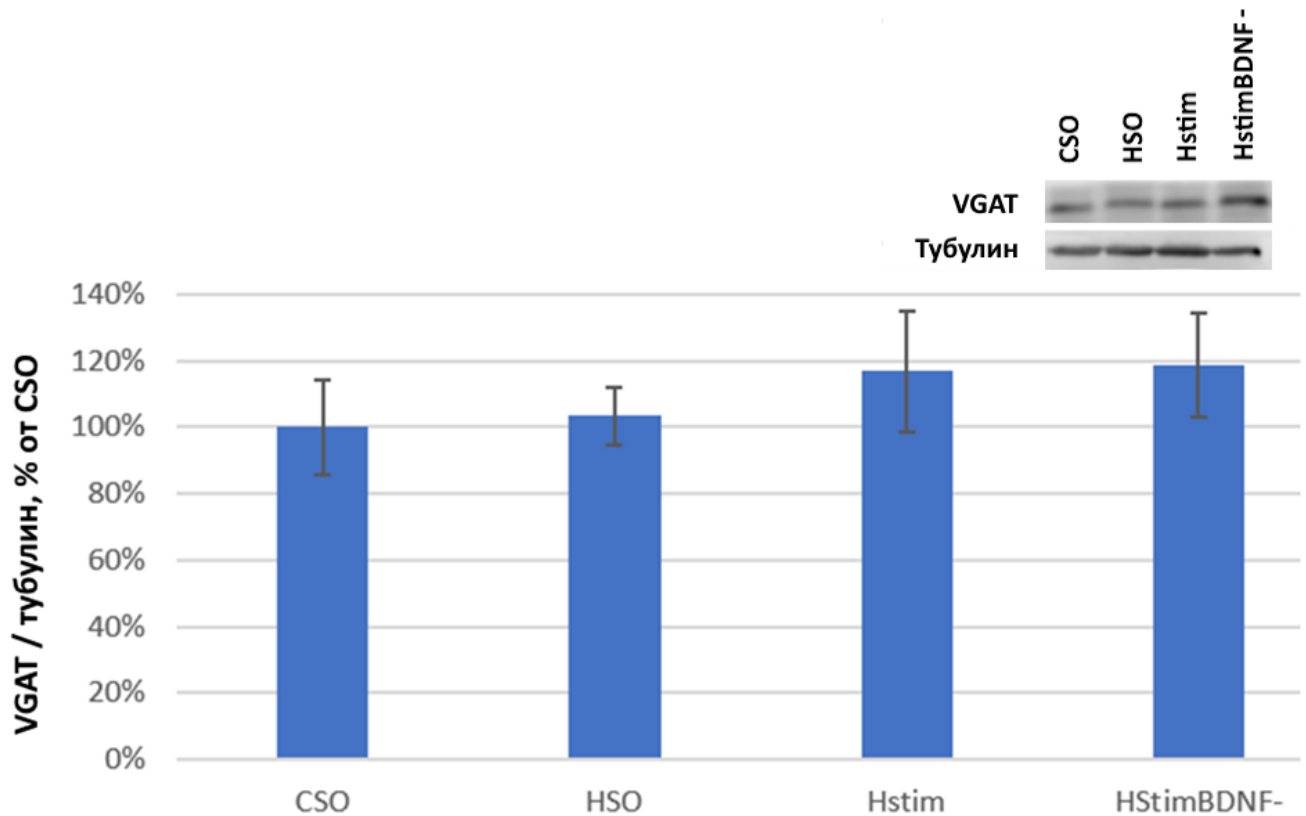


Рисунок 23. Содержание VGAT в поясничном отделе спинного мозга крысы при 14-суточной электростимуляции с введением и без введения ANA-12. CSO – ложнооперированный виварный контроль; HSO – 14-суточная гравитационная разгрузка с ложной операцией; HStim – 14-суточная гравитационная разгрузка в сочетании с электростимуляцией; HStimBDNF- - электростимуляция в сочетании с введением ANA-12 на фоне 14-суточной гравитационной разгрузки; * - статистически значимое отличие от группы контроля.

В ходе эксперимента не обнаружено достоверного изменения содержания в поясничном отделе спинного мозга глутаматдекарбоксилазы (GAD 65/67) относительно уровня контроля ни в одной из исследуемых групп животных (рисунок 24).

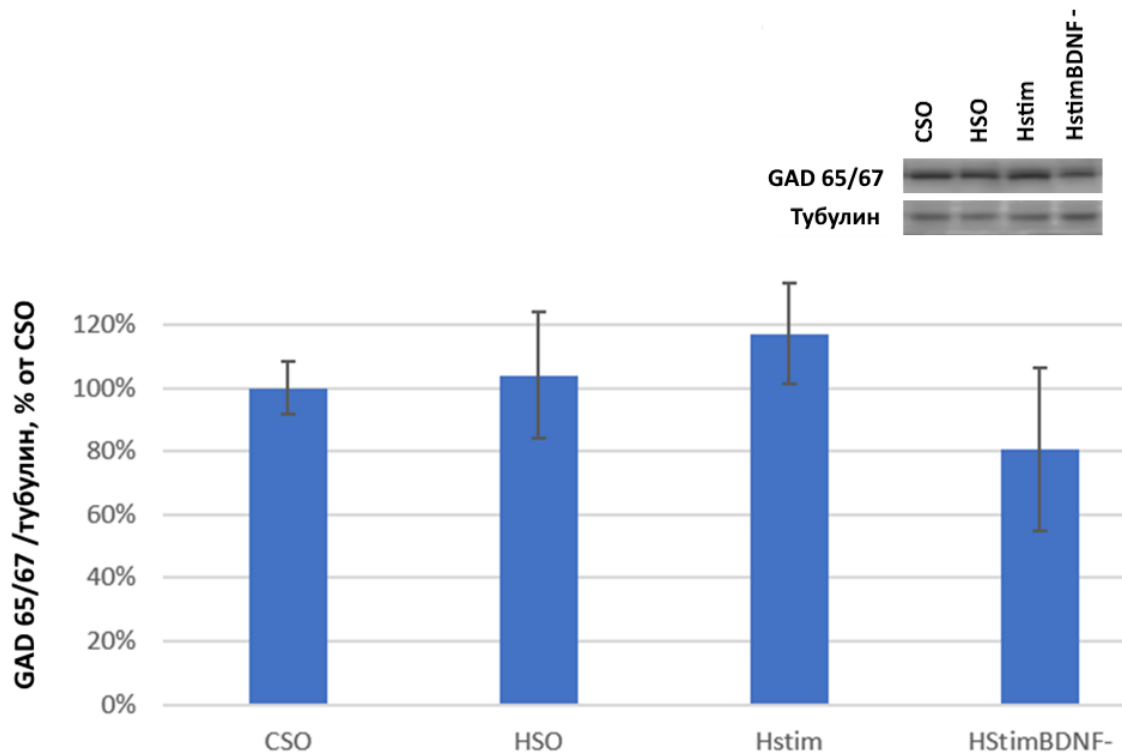


Рисунок 24. Содержание GAD 65/67 в поясничном отделе спинного мозга крысы при 14-суточной электростимуляции с введением и без введения ANA-12. CSO – ложнооперированный виварный контроль; HSO – 14-суточная гравитационная разгрузка с ложной операцией; Hstim – 14-суточная гравитационная разгрузка в сочетании с электростимуляцией; HstimBDNF- - электростимуляция в сочетании с введением ANA-12 на фоне 14-суточной гравитационной разгрузки; * - статистически значимое отличие от группы контроля.

3.5. Анализ ответов сигнальных путей камбаловидной мышцы крысы при фармакологической блокировке спонтанной электрической активности

В наших экспериментах были проанализированы ответы сигнальных путей камбаловидной мышцы крысы при фармакологической блокировке спонтанной электрической активности на фоне вывешивания. При хроническом введении прохлорперазина, на фоне полного отсутствия сократительной активности были обнаружены парадоксальные изменения маркеров сигнальных путей:

предотвращение повышения при разгрузке экспрессии мышечных убиквитин-лигаз – MuRF-1 и Mafbx/atrogin-1 (Рисунок 25) и предотвращение снижения экспрессии рибосомальных РНК (Рисунок 26). При этом у животных со сниженной спонтанной активностью наблюдается снижение степени атрофии медленных и быстрых волокон камбаловидной мышцы (Рисунок 27).

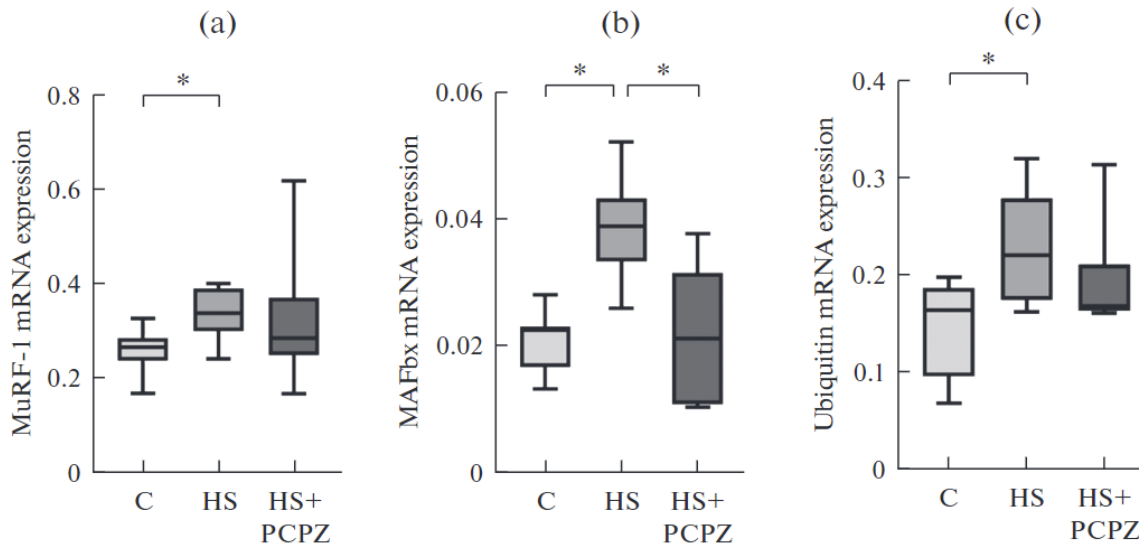


Рисунок 25. Экспрессия мРНК показателей протеолиза MuRF-1 (a), MAFbx (b) и убиквитина (c) в *m. soleus*. C – контроль; HS – вывешивание в течение 7 сут; HS + PCPZ – вывешивание в течение 7 сут с ежедневным введением прохлорперазина. * – $p < 0.05$.

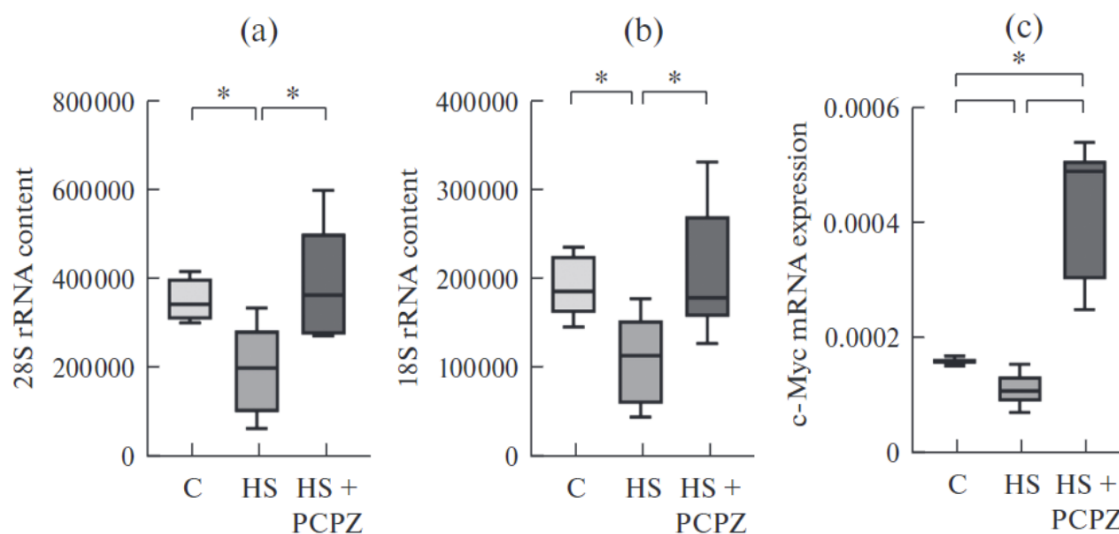


Рисунок 26. Содержание 28S рРНК (a), содержание 18S рРНК (b) и экспрессия мРНК c-Мус в *m. soleus*. C – контроль; HS – вывешивание в течение 7 сут; HS + PCPZ – вывешивание в течение 7 сут с ежедневным введением прохлорперазина. * – $p < 0.05$

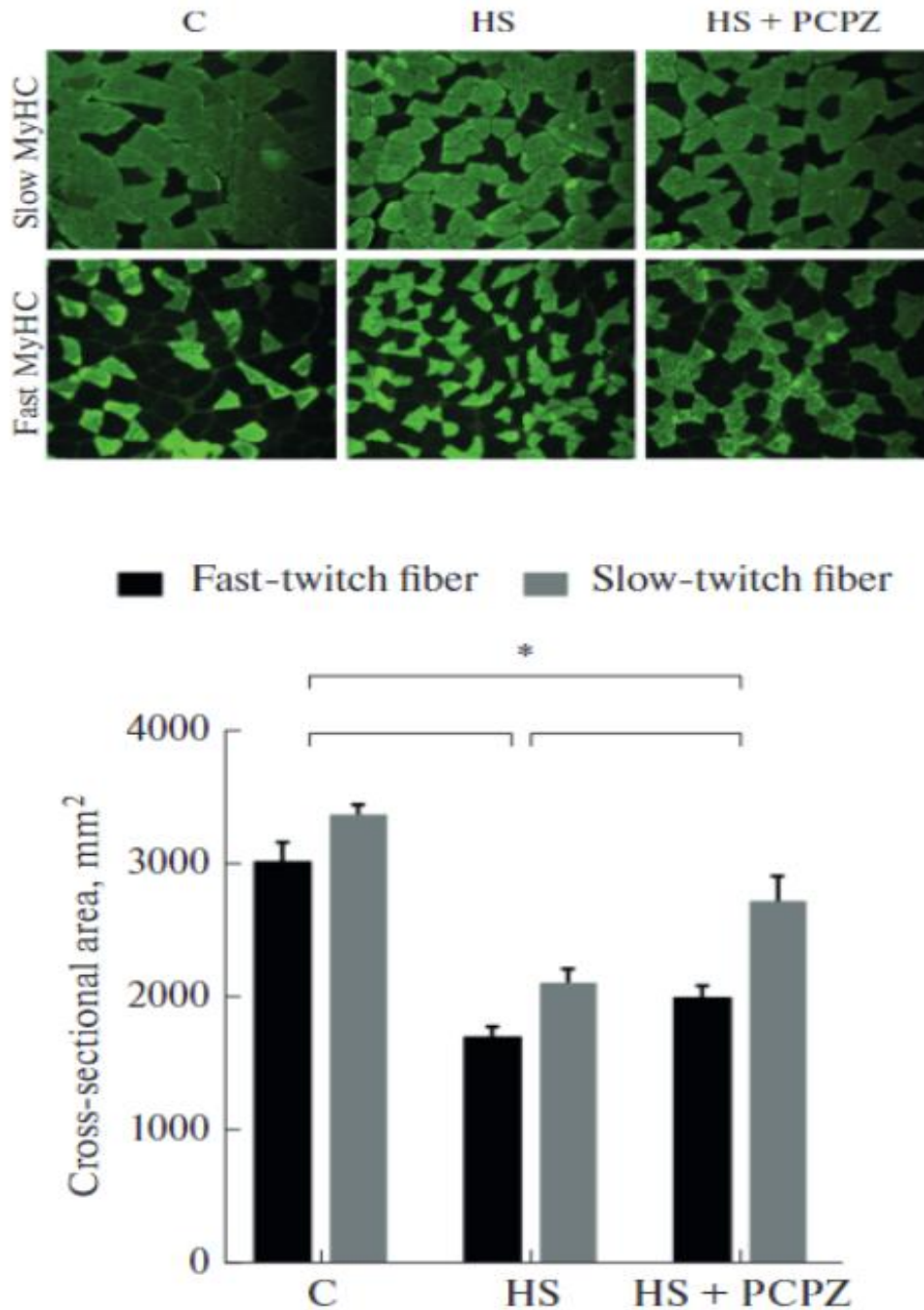


Рисунок 27. Площадь поперечного сечения (cross-sectional area) быстрых (fast-twitch) и медленных (slow-twitch) волокон *m. soleus*. C – контроль; HS – вывешивание в течение 7 сут; HS + PCPZ – вывешивание в течение 7 сут с ежедневным введением прохлорперазина. * – $p < 0.05$. MyHC (myosin heavy chain) – тяжелые цепи миозина.

При использовании CLP290 для предотвращения снижения экспрессии KCC2 в поясничном отделе спинного мозга перечисленные эффекты не были обнаружены (Рисунки 28, 29). Также в этом эксперименте не было выявлено изменений размеров медленных и быстрых мышечных волокон и их соотношения

(Рисунок 30). В то же время, как при введении прохлорперазина, так и при использовании CLP290, глубокое снижение спонтанной активности сопровождалось еще более глубоким по сравнению с «чистым» вывешиванием снижением экспрессии мРНК ключевого регулятора митохондриального биогенеза PGC1 α и некоторых ферментов окислительного фосфорилирования (рисунок 31 А). У животных, у которых спонтанная активность камбаловидной мышцы подавлена под влиянием CLP290, в этой мышце значительно повышен уровень фосфорилирования рибосомальной киназы p70S6K (рисунок 31 Б). При этом уровень фосфорилирования этого фермента у животных группы «чистого» вывешивания, не демонстрирует достоверных отличий от животных группы виварного контроля.

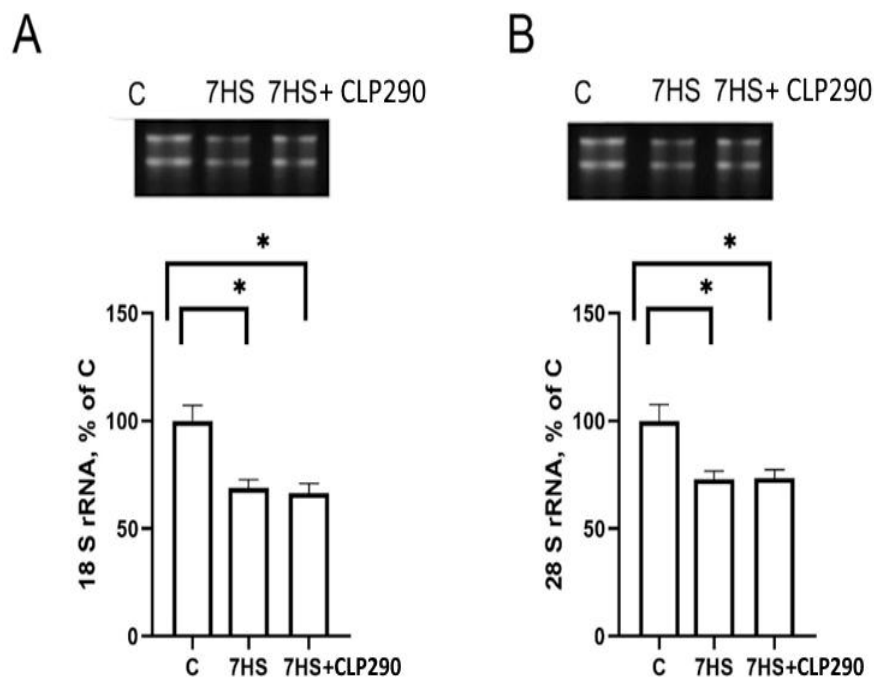


Рисунок 28. Содержание 18S рРНК (А) и 28S рРНК (В) в камбаловидной мышце экспериментальных животных. Данные представлены в процентах от среднего значения группы С. С— виварный контроль, 7HS—7-суточное антиортостатическое вывешивание, 7HSL—7-суточное антиортостатическое вывешивание с введением CLP-290. *— статистически значимое отличие от группы С.

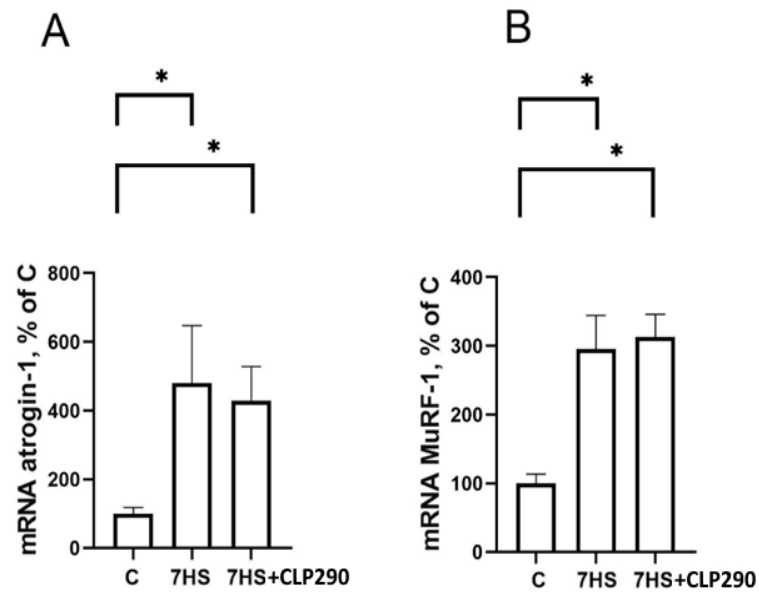


Рисунок 29. Экспрессия мРНК atrogin-1 (A) и MuRF-1(B) в камбаловидной мышце экспериментальных животных. Данные представлены в процентах от среднего значения группы C. C—виварный контроль, 7HS—7-суточное антиортостатическое вывешивание с введением CLP-290. *— статистически значимое отличие от группы C

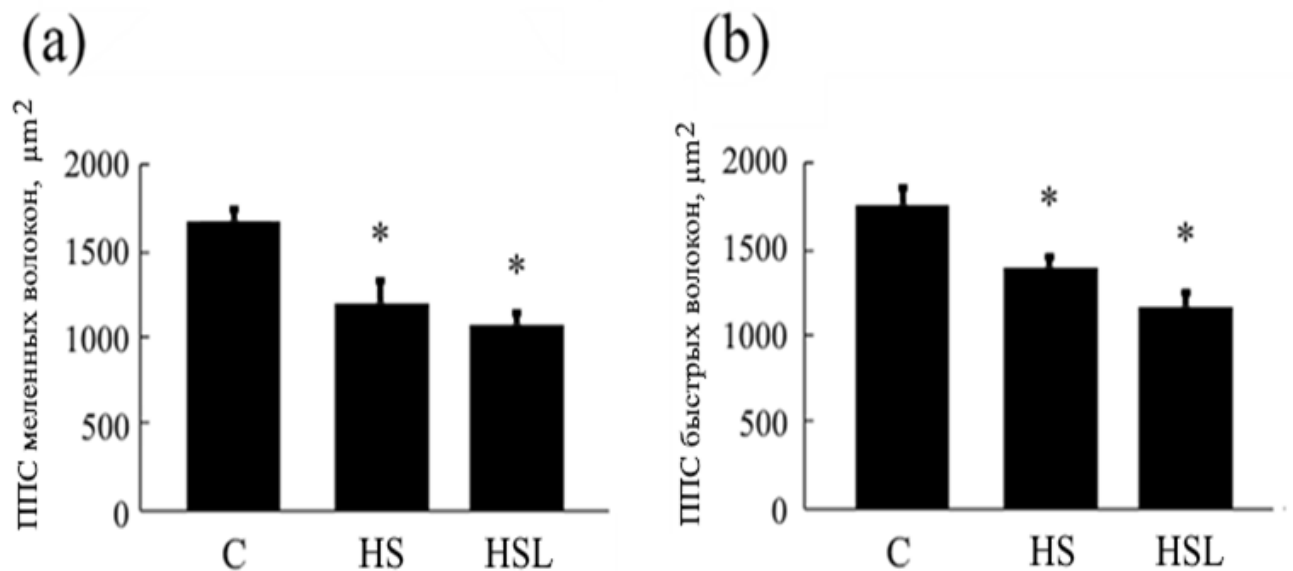


Рисунок 30. Площадь поперечного сечения медленных (a) и быстрых (b) мышечных волокон в *m. soleus* крысы. C – контроль; HS –вывешивание 7 дней; HSL – вывешивание + введение CLP 7 дней. * – $p < 0.05$.

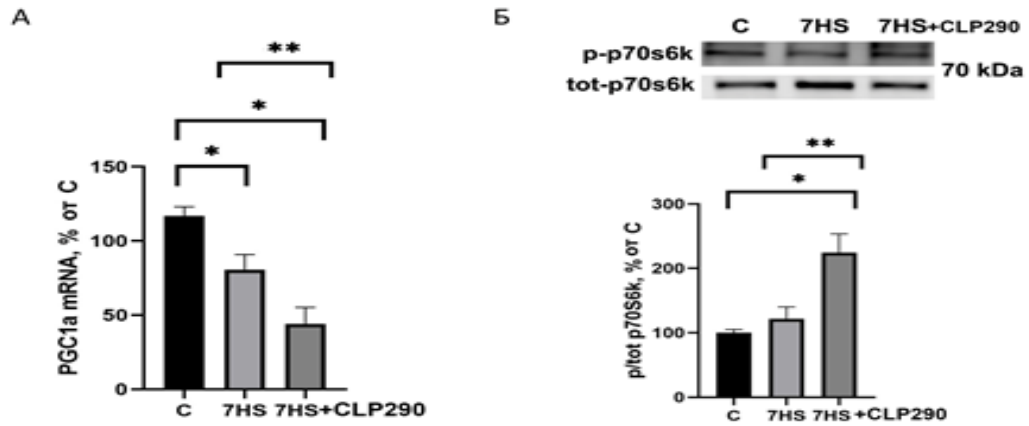


Рисунок 31. Экспрессия мРНК *PGC1α* (А) и уровень фосфорилирования *p70S6K* (Thr389) (Б) в *m. soleus* крысы при введении *CLP290* на фоне 7-суточного антиортостатического вывешивания. С – виварный контроль, 7HS – 7-суточное антиортостатическое вывешивание, 7HS+*CLP290* – 7-суточное вывешивание с ежедневным введением *CLP290*, * – достоверное отличие от контроля ($p < 0,05$), ** – достоверное отличие от группы «7HS» ($p < 0,05$)

4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

4.1. Исследование содержания мембранных ионных котранспортёров KCC2 и NKCC1 в мотонейронах поясничного отдела спинного мозга крыс при функциональной разгрузке и модуляция их содержания в мотонейронах с помощью фармакологических средств

Больше десяти лет назад Baldwin и соавт. (2013) отметили схожесть нервно-мышечных изменений, возникающих в условиях реальной или моделируемой микрогравитации, с изменениями, наблюдаемыми после изоляции спинного мозга (хирургической процедуры, устраняющей нейронную активацию мотонейронов и иннервируемых ими двигательных единиц) [12]. Это наблюдение позволило нам провести аналогию между описанным в литературе механизмом развития мышечной спастичности на фоне спинальной травматизации и остававшимся до сих пор неисследованным феноменом возникновения спонтанной активности в камбаловидной мышце крысы в условиях моделируемой микрогравитации, и предположить, что в основе этих двух явлений лежат схожие молекулярные механизмы.

Известно, что одной из основных причин постепенного развития спастичности в мышцах ног у пациентов с повреждением спинного мозга выше поясничной области является значительное снижение экспрессии KCC2 в спинномозговых мотонейронах [19, 41, 82]. Аналогичным образом происходит значительное снижение экспрессии KCC2 в мотонейронах ниже места повреждения позвоночника в экспериментах со спинальной травматизацией животных [19, 82].

Показано, что снижение содержания KCC2 приводит к повышению концентрации хлорид-ионов в мотонейронах, что, в свою очередь, вызывает инверсию гиперполяризирующего действия ГАМК-глициновых рецепторов, с заменой его на деполяризирующее [30, 71, 98], что приводит, в ряде случаев, к развитию мышечной спастичности.

Вместе с тем, вопрос о связи между спастичностью при спинальных травмах и развитием спонтанной активности у крыс на фоне антиортостатического вывешивания оставался открытым.

В настоящем исследовании мы показали значительное снижение общего содержания калий-хлоридного котранспортёра КСС2 в мотонейронах поясничного отдела спинного мозга после как 7-суточного, так и 14-суточного антиортостатического вывешивания. Применение активаторов КСС2 (прохлорперазина и CLP-290) в экспериментах с антиортостатическим вывешиванием различной продолжительности позволило предотвратить снижение содержания КСС2 в мотонейронах спинного мозга. Аналогичный эффект прохлорперазина на КСС2 был ранее продемонстрирован у крыс после травмы спинного мозга [78].

Полученные нами данные также показывают, что функциональная разгрузка задних конечностей крысы приводит к увеличению содержания в мотонейронах спинного мозга натрий-калий-хлоридного котранспортёра НКСС1, известного антагониста КСС2. Внутривентрикулярное введение активаторов КСС2 (прохлорперазина и CLP-290) на фоне антиортостатического вывешивания различной продолжительности также предотвращало и вызванное вывешиванием увеличение содержания НКСС1 в мотонейронах поясничного отдела спинного мозга крысы.

Таким образом, нам удалось впервые показать сдвиг баланса ионных котранспортёров на мембранах мотонейронов поясничного отдела спинного мозга крысы на фоне антиортостатического вывешивания различной продолжительности и связь между развитием спонтанной ЭМГ-активности камбаловидной мышцы в условиях искусственной микрогравитации и снижением содержания КСС2 в мотонейронах. В последующих экспериментах нам предстояло установить характер этой связи, и ответить на вопрос, действительно ли изменение содержания ионных котранспортёров на мембранах мотонейронов является непосредственной причиной развития спонтанной активности в камбаловидной мышце.

4.2. Регистрация и фармакологическая модуляция биоэлектрической активности камбаловидной мышцы крысы на разных сроках функциональной разгрузки различной продолжительности

Известно, что длительная (более 3 суток) опорная разгрузка приводит к развитию в камбаловидной мышце спонтанной активности [9, 34, 69]. В то же время в условиях как реальной, так и моделируемой микрогравитации, и у человека, и у модельных животных развивается гиперрефлексия, что свидетельствует о повышении возбудимости мотонейронов [73, 74].

Ранее в этом исследовании нами было показано, что как 7-суточное, так и 14-суточное антиортостатическое вывешивание сопровождается изменением содержания мембранных ионных котранспортёров KCC2 и NKCC1 в мотонейронах поясничного отдела спинного мозга крысы. В соответствие с механизмом, описанным для случаев спинальной травматизации, снижение содержания KCC2 должно приводить к сдвигу мембранного потенциала мотонейронов, повышать возбудимость двигательных единиц, и, по-видимому, являться причиной появления спонтанной электрической активности в камбаловидной мышце.

Для проверки этого предположения в следующих экспериментах мы проводили регистрацию электрической активности камбаловидной мышцы на фоне 7- и 14-суточного вывешивания в группах «чистого» вывешивания и вывешивания с внутрибрюшинным введением фармакологических активаторов KCC2.

В ходе эксперимента с 7-суточным антиортостатическим вывешиванием зарегистрирован спонтанный рост электрической активности камбаловидной мышцы начиная с третьих суток «чистого» вывешивания, что согласуется с наблюдениями, ранее опубликованными в работах других авторов [9, 34, 69]. Вместе с тем, мы обнаружили, что введение активатора KCC-2 прохлорперазина на фоне 7-суточного вывешивания предотвращает как снижение содержания KCC-2 в спинном мозге, так и нарастание интегральной ЭМГ камбаловидной мышцы, что позволило нам сделать выводы о ключевой роли KCC2 в механизме генерации

спонтанной активности и до некоторой степени подтвердить предположение о прямой причинно-следственной связи между сдвигом баланса мембранных ионных котранспортёров мотонейронов спинного мозга и развитием спонтанной активности в мышце.

Несмотря на полученные результаты, фармакологическая модуляция содержания КСС2 в мотонейронах спинного мозга внутрибрюшинным введением прохлорперазина оставляла открытым вопрос о возможном неспецифическом системном воздействии этого препарата непосредственно на камбаловидную мышцу, в обход КСС2-зависимого механизма. Для выяснения того, в какой мере эффекты прохлорперазина обусловлены его влиянием на содержание КСС2 в мотонейронах спинного мозга, а не непосредственным воздействием на камбаловидную мышцу, было решено поставить дополнительный эксперимент с внутрибрюшинным введением другого активатора КСС2, CLP-290 на фоне 14-суточного антиортостатического вывешивания. CLP-290 известен как высокоселективный активатор КСС2 [50], а сравнение действия CLP-290 и прохлорперазина позволяет выявить эффекты, связанные непосредственно с активацией КСС2 поскольку эти эффекты будут общими в группах с введением обоих фармакологических активаторов КСС2.

Применение альтернативного активатора КСС2 – CLP-290 позволило подтвердить связь спонтанной электрической активности камбаловидной мышцы при длительной функциональной разгрузке со снижением экспрессии КСС2 в спинном мозге и исключить возможные артефакты неспецифического действия прохлорперазина. Мы обнаружили, что внутрибрюшинное введение CLP-290 на фоне антиортостатического вывешивания, так же, как и введение прохлорперазина, предотвращает снижение содержания КСС2 в поясничном отделе спинного мозга. «Чистое» 14-суточное антиортостатическое вывешивание сопровождалось ростом интегральной ЭМГ камбаловидной мышцы в течение 14 суток вывешивания до 90% от контрольных значений электромиограммы животных, не подвергавшихся вывешиванию; при этом в группе с введением CLP-290 интегральная ЭМГ за весь период вывешивания не превышала 30% от контроля, статистически значимо

отличаясь от «чистого» вывешивания, начиная с третьих суток. Наблюдаемые эффекты, таким образом, соответствуют данным, полученным в эксперименте с прохлорперазином, и свидетельствуют о том, что подавление спонтанной электрической активности мышцы, ранее обнаруженное нами при действии прохлорперазина, обусловлено именно повышением содержания КСС2 в мотонейронах спинного мозга. Это позволяет исключить прямое неспецифическое действие прохлорперазина на рецепторы камбаловидной мышцы как гипотетическую причину развития спонтанной активности и сделать вывод о ключевой роли баланса мембранных ионных котранспортёров в мотонейронах поясничного отдела спинного мозга на развитие спонтанной активности в камбаловидной мышце.

4.3. Исследование эффекта применения электромиостимуляции в периоды пониженной электрической активности *m.soleus* крысы в условиях гравитационной разгрузки

Впервые обнаруженный нами сдвиг содержания мембранных ионных котранспортёров в мотонейронах поясничного отдела спинного мозга на фоне длительной функциональной разгрузки задних конечностей, который, как мы показали, является непосредственной причиной развития спонтанной активности в камбаловидной мышце крысы при антиортостатическом вывешивании, закономерно поднимает вопрос о сигнальных предпосылках сдвига баланса ионных котранспортёров при функциональной разгрузке конечности, поскольку характер зависимости содержания КСС-2 от нервно-мышечной активности оставался не вполне ясным.

В этом контексте интересным обстоятельством представляется значительное снижение экспрессии КСС2 в мотонейронах после аксотомии как следствие повреждения периферических нервов [8], т.е. из-за нарушения двигательной иннервации спинного мозга. Это позволило нам выдвинуть гипотезу, согласно которой активация мышечных сокращений (прямая электростимуляция) на фоне

функциональной разгрузки, запущенная с самого начала экспозиции, должна предотвращать снижение содержания КСС-2.

Для проверки этой гипотезы был проведён эксперимент с 7-суточной экспозицией животных в условиях функциональной разгрузки с разделением животных на три группы: виварный контроль, вывешивание животных с наложенными, но не подключенными электростимуляционными электродами, вывешивание животных с низкочастотной электростимуляцией. По завершении эксперимента проводилась оценка содержания в поясничном отделе спинного мозга белков КСС-2 и НКСС1. Результаты эксперимента показали, что электростимуляция предотвращает снижение содержания КСС2 и рост содержания НКСС1 в спинном мозге вывешенных животных, причем наиболее ярко эффект проявляется со стороны, подвергавшейся стимуляции. Описанные изменения полностью подтверждают вывод Akhter et al. (2019) о том, что экспрессия КСС2 определяется состоянием нервно-мышечного контроля [8] и нашу гипотезу о мышечной активности как о регуляторе содержания КСС2 в спинном мозге. Более того, поскольку наши данные были получены в модели разгрузки, характеризующейся на начальном этапе глубоким снижением или полным устранением нервно-мышечной активности камбаловидной мышцы крысы [9, 33, 68, 69], можно предположить, что экспрессия КСС2 поддерживается на определенном уровне до тех пор, пока мотонейроны получают сигналы о нормальной активности из иннервируемой мышцы.

4.4. Исследование роли TRKb-рецепторов в регуляции содержания КСС2 в мотонейронах поясничного отдела спинного мозга крысы

Полученные нами данные указывают на то, что снижение содержания КСС2 в спинном мозге в условиях гравитационной разгрузки является следствием снижения или прекращения нервно-мышечной активности. Вопрос о том, каким образом информация об уровне мышечной активности достигает мотонейронов спинного мозга, заставляет обратить внимание на работу исследователей из Nanjing

Medical University Li et al, [77] которые показали, что наблюдаемого при гемисекции спинного мозга снижения содержания KCC2 в спинном мозге не происходит у животных, выполнявших упражнения на тредмиле (с облегчением веса тела). В то же время этот профилактический эффект не воспроизводился при использовании специфической блокады TrkB-рецепторов, избирательно связывающих нейротрофический фактор BDNF.

Это позволяет предположить, что гуморальная или нейротрофическая BDNF-зависимая сигнализация может быть важным каналом передачи сигнала от активной/неактивной мышцы к системе регуляции хлоридного гомеостаза мотонейронов. Для проверки гипотезы о роли BDNF как метаболического сигнала, позволяющего поддерживать нормальное содержание KCC2 в спинном мозге, и, соответственно, предотвращать развитие спонтанной нервно-мышечной активности в условиях функциональной разгрузки, мы провели исследование влияния 14-суточной низкочастотной электростимуляции на фоне антиортостатического вывешивания на содержание в мотонейронах мембранных ионных котранспортёров и сигнальных факторов гамкэргического пути, в группах с введением и без введения блокатора TrkB рецепторов ANA-12.

Полученные результаты показали значимое увеличение на фоне 14-суточного антиортостатического вывешивания содержания в поясничном отделе спинного мозга β -субъединицы рецептора ГАМК (GABA A β 1), относительно группы ложнооперированного контроля, что свидетельствует о модуляции активности ГАМК-эргической системы. Этот эффект предотвращался в группах с электростимуляцией на фоне антиортостатического вывешивания. Содержание рецепторов ГАМК GABA A α 1 и GABA BR1 в поясничном отделе спинного мозга не претерпевало изменений в группах «чистого» антиортостатического вывешивания и вывешивания с электростимуляцией, однако введение ANA-12 на фоне вывешивания с электростимуляцией привело к снижению содержания GABA A α 1 и GABA BR1 относительно групп CSO и HSO.

Содержание в поясничном отделе спинного мозга глутаматдекарбоксилазы GAD 65/67 и везикулярного котранспортера глутамата VGAT относительно уровня ложнооперированного контроля в 14-суточном эксперименте не претерпевало статистически значимых изменений ни в одной из экспериментальных групп животных, однако имела тенденцию к уменьшению экспрессии мРНК Gad65 и Gad67 в группе HStimBDNF- относительно группы CSO.

Таким образом, мы показали, что при 14-суточном антиортостатическом вывешивании наблюдается сдвиг содержания мембранных ионных котранспортёров (снижение содержания KCC2 и повышение содержания NKCC1), предотвращаемый электростимуляцией. При этом обнаружено снижение содержания KCC2 у крыс, получавших ANA-12 (блокатор TRKb-рецепторов), что соответствует результатам Li et al [77] и позволяет говорить о подтверждении гипотезы.

4.5. Анализ ответов сигнальных путей камбаловидной мышцы крысы при фармакологической блокировке спонтанной электрической активности

Исследование роли спонтанной активности в процессах молекулярной перестройки постуральной мышцы в условиях гравитационной разгрузки требует оценки изменений, происходящих в атрофирующейся мышце на фоне значительного снижения или устранения спонтанной электрической активности. Стоит обратить внимание на то, что спонтанная активность у животных группы «чистого» вывешивания наблюдается постоянно, без периодов расслабления и отдыха. Такой режим не характерен для нормальной активности постуральной мышцы.

Мы проанализировали ответы сигнальных путей камбаловидной мышцы крысы при фармакологической блокировке спонтанной активности на фоне антиортостатического вывешивания. При хроническом введении прохлорперазина на фоне полного отсутствия сократительной активности были обнаружены изменения маркеров сигнальных путей: предотвращение как снижения экспрессии

рибосомальных РНК, так и повышения мышечных убиквитин-лигаз (MuRF-1 и Mafbx/atrogen-1). Интересно, что при этом у животных со сниженной спонтанной активностью наблюдалось снижение степени атрофии медленных и быстрых волокон камбаловидной мышцы.

При использовании CLP290 для предотвращения снижения экспрессии KCC2 в поясничном отделе спинного мозга перечисленных эффектов не наблюдается, как не наблюдается и изменений размеров медленных и быстрых мышечных волокон и их соотношения.

Указанные различия в действии этих препаратов могут быть объяснены побочным действием прохлорперазина на кальциевый гомеостаз [86, 112].

В то же время, как при введении прохлорперазина, так и при использовании CLP290, глубокое снижение спонтанной активности сопровождалось еще более глубоким по сравнению с «чистым» вывешиванием снижением экспрессии мРНК некоторых ферментов окислительного фосфорилирования и ключевого регулятора митохондриального биогенеза PGC1 α (Рисунок 31А). Это обстоятельство подтверждает укоренившееся в литературе представление о том, что состояние митохондрий находится в прямой зависимости от уровня сократительной активности мышцы [119].

Можно предположить, что спонтанная активность на фоне разгрузки предотвращает более глубокое снижение показателей биогенеза митохондрий.

При анализе роли спонтанной активности в работе мышечных сигнальных путей обращает на себя внимание значительное повышение уровня фосфорилирования рибосомальной киназы p70S6K у животных из группы с фармакологическим подавлением спонтанной активности камбаловидной мышцы при помощи CLP290 (Рисунок 31Б). При этом уровень фосфорилирования этого фермента у животных при «чистом» вывешивании, для которого характерна постоянная спонтанная активность камбаловидной мышцы, не демонстрирует достоверных отличий от животных группы виварного контроля (Рисунок 31 Б). Ранее аналогичный феномен наблюдался в экспериментах с денервацией [86] на ранних стадиях разгрузки в иммобилизованной мышце [112] и при 6- и 24-часовом антиортостатическом

вывешивании [89, 119]. Это явление можно объяснить переходом от постоянной активности камбаловидной мышцы (предполагающей подавление синтетических процессов) к практически полному ее отключению, при котором в условиях нормальной мышечной деятельности в мышечных волокнах активируются анаболические сигнальные пути [26]. При снижении спонтанной активности до минимума, таким образом, следует ожидать подавления механизмов, препятствующих активации сигнальных путей анаболической направленности; ключевым маркером активности которых является фосфорилирование p70S6K.

5. ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ

5.1. Заключение

В настоящей работе исследован ранее малоизученный феномен: спонтанная активность камбаловидной мышцы в условиях антиортостатического вывешивания. Это явление, впервые обнаруженное в 1987 году (Alford et. al), заключается в парадоксальном нарастании электрической активности в мышце на фоне длительной функциональной разгрузки конечности, вопреки ожидаемому (но наблюдаемому лишь в первые двое-трое суток разгрузки) полному отсутствию электрической активности. В дальнейшем этот эффект в том или ином виде воспроизводился в работах различных авторов [9, 34, 69]. Ранние эксперименты показали, что эта активность не влияет на степень мышечной атрофии, а потому не может в этом смысле рассматриваться как компенсаторная. Однако нейронные механизмы и сигнальная роль этой активности долгое время оставались неизученными.

В настоящем исследовании мы наблюдали аналогичный рост ЭМГ-активности камбаловидной мышцы на протяжении 14 суток антиортостатического вывешивания. К пятым суткам вывешивания электрическая активность мышцы возросла до 50% от контрольных значений; к двенадцатым суткам достигнув 90%.

Мы показали, что в условиях разгрузки, как и в случае травмы спинного мозга, спонтанная активность камбаловидной мышцы сопровождается снижением содержания калий-хлоридного котранспортёра KCC2 и ростом содержания его антагониста натрий-калий-хлоридного котранспортёра NKCC1, что в свою очередь вызывает повышение возбудимости мотонейронов, и, по-видимому, является непосредственной причиной развития спонтанной активности в камбаловидной мышце крысы при антиортостатическом вывешивании. В то же время фармакологическая профилактика сдвига содержания мембранных ионных котранспортёров приводит к радикальному снижению спонтанной электрической активности. Отсутствие снижения содержания KCC2 и повышения содержания

NKCC1 в мотонейронах поясничного отдела спинного мозга при антиортостатическом вывешивании у животных с низкочастотной электростимуляцией двигательных единиц свидетельствует о важной роли метаболических сигналов нормальной мышечной активности в поддержании баланса ионных котранспортёров на мембранах мотонейронов. При этом, из результатов эксперимента с фармакологической инактивацией TRKb-рецепторов следует, что в основе механизма регуляции баланса мембранных ионных котранспортёров лежит BDNF-зависимый сигнальный путь. Кроме того, мы продемонстрировали, что снижение спонтанной активности вызывает значительные изменения в ряде сигнальных путей камбаловидной мышцы крысы.

Основываясь на полученных нами в этой работе данных, мы можем реконструировать следующую цепочку событий, приводящих к возникновению и поддержанию нервно-мышечного напряжения.

Устранение афферентной сигнализации при механической разгрузке приводит к первоначальному прекращению электрической активности камбаловидной мышцы [9, 34, 69]. Вызванные прекращением электрической активности изменения в метаболитном BDNF-зависимом сигналинге приводят к снижению экспрессии KCC2 и последующему сдвигу в равновесном потенциале ионов Cl^- на мембранах мотонейронов поясничного отдела спинного мозга в положительную сторону. Тормозящие эффекты ГАМК и глицина сменяются возбуждающими, что приводит к генерации электрических импульсов и возникновению и поддержанию ЭМГ-активности камбаловидной мышцы в период гравитационной разгрузки.

Результаты настоящего исследования, таким образом, подтверждают наши представления о ключевой роли баланса мембранных ионных котранспортёров в генезисе спонтанной активности *m. soleus* при гравитационной разгрузке и представляют собой значимый шаг к пониманию физиологической природы спонтанной активности и лежащих в её основе молекулярных сигнальных механизмов.

В то же время некоторые важные вопросы, связанные с механизмами спонтанной активности и ее ролью в развитии атрофических процессов в условиях разгрузки, остаются без ответа. Прежде всего, открытым остаётся вопрос о спонтанной активности камбаловидной мышцы у человека при различных видах функциональной разгрузки. Одним из возможных проявлений сходного механизма у человека может являться известное снижение порога Н-рефлекса в экспериментальных условиях сухой иммерсии. Поскольку гиперрефлексия при различных патологических состояниях может быть связана со снижением содержания КСС2 в спинном мозге, вполне естественно предположить, что снижение содержания КСС2 в спинальных мотонейронах и развитие спонтанной мышечной активности также должны происходить у человека после воздействия искусственной микрогравитации, однако это предположение требует дальнейшей проверки.

5.2. Выводы

1. Гравитационная разгрузка задних конечностей крысы, как и спинальная травма, сопровождается сдвигом баланса мембранных ионных котранспортёров в мотонейронах спинного мозга: снижением содержания калий-хлоридного котранспортёра KCC2 и повышением содержания натрий-калий хлоридного котранспортёра NKCC1.
2. В условиях гравитационной разгрузки в камбаловидной мышце крыс развивается спонтанная активность, амплитуда которой прогрессивно нарастает, достигая к 5-7 суткам 50%, а к 12 суткам — 90% от уровня животных контрольной группы. Фармакологическая коррекция снижения содержания калий-хлоридного котранспортера KCC2 в мотонейронах спинного мозга (при помощи CLP290 или прохлорперазина) сопровождается уменьшением амплитуды спонтанной активности камбаловидной мышцы.
3. Снижение спонтанной ЭМГ-активности камбаловидной мышцы в результате активации KCC2 углубляет изменения регуляторов биогенеза митохондрий, что что свидетельствуют об отсутствии компенсаторной роли спонтанной ЭМГ-активности камбаловидной мышцы при гравитационной разгрузке.
4. Применение хронической низкочастотной электромиостимуляции в условиях функциональной разгрузки задней конечности предотвращает снижение содержания KCC2 в мотонейронах спинного мозга.
5. BDNF-зависимый сигналинг опосредует влияние электромиостимуляции на содержание KCC2; фармакологическое ингибирование BDNF-зависимого сигнального пути приводит к устранению эффектов низкочастотной электростимуляции. Длительная гравитационная разгрузка (14 суток) не вызывает значимых изменений в содержании рецептора GABAA и ключевых ферментов метаболизма ГАМК.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Агаджанян Н. А., Баевский Р. М., Берсенева А. П. Проблемы адаптации и учения о здоровье. – М. : Изд-во РУДН, 2006. – 284 с.
2. Бородина К. М., Затолокина М. А., Созыкин А. А., Цымбалюк В. В., Шматько И. А., Затолокина Е. С., Банченко Д. А. К вопросу об особенностях топографии и морфометрии седалищного нерва крысы // Вестник Волгоградского государственного медицинского университета. – 2021. – № 3 (79). – С. 159–163.
3. Гидиков А. А. Теоретические основы электромиографии : Биофизика и физиология двигательных единиц / А. А. Гидиков ; пер. с болг. Ю. Т. Шапкова ; под ред. Н. А. Рокотовой ; АН СССР, Науч. совет по комплексным проблемам физиологии человека и животных. – Л. : Наука. Ленингр. отд-ние, 1975. – 181 с., 1 л. ил.
4. Рангайян Р. М. Анализ биомедицинских сигналов. Практический подход. – М. : Физматлит, 2007. – 440 с.
5. 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.
6. Шульженко Е. Б., Виль-Вильямс И. Ф. Возможность проведения длительной водной иммерсии методом «сухого» погружения // Космическая биология и авиакосмическая медицина. – 1976. – Т. 10. – № 2. – С. 82–84.
7. Adams G. R. et al. Skeletal muscle unweighting: spaceflight and ground-based models // Journal of Applied Physiology. 2003.
8. Akhter E. T., Griffith R. W., English A. W., Alvarez F. J. Removal of the Potassium Chloride Co-Transporter from the Somatodendritic Membrane of Axotomized Motoneurons Is Independent of BDNF/TrkB Signaling but Is Controlled by Neuromuscular Innervation // eNeuro. 2019. V.6. P.PENEURO.0172-19.2019.
9. Alford E. K., Roy R. R., Hodgson J. A., Edgerton V. R. Electromyography of rat soleus, medial gastrocnemius, and tibialis anterior during hind limb suspension // Experimental Neurology. 1987. V.96. P.635–649.
10. Anderson J., Almeida-Silveira M. I., Pe'rot C. Reflex and muscular adaptations in rat soleus muscle after hindlimb suspension // Journal of Experimental Biology. 1999. V.202 (Pt. 19). P.2701–2707.
11. Baker L. L., et al. Neuromuscular electrical stimulation: a practical guide. 2000.
12. Baldwin K. M., Haddad F., Pandorf C. E. et al. Alterations in muscle mass and contractile phenotype in response to unloading models: role of

- transcriptional/pretranslational mechanisms // *Frontiers in Physiology*. 2013. V.4. №284.
13. Balestra G., Frassinelli S., Knaflitz M., Molinari F. Time-frequency analysis of surface myoelectric signals during athletic movement // *IEEE Engineering in Medicine and Biology Magazine*. 2001. V.20. P.106–115.
 14. Bassel-Duby R., Olson E. N. Signaling pathways in skeletal muscle remodeling // *Annual Review of Biochemistry*. 2006. V.75. P.19–37.
 15. Ben-Ari Y. NKCC1 chloride importer antagonists attenuate many neurological and psychiatric disorders // *Trends in Neurosciences*. 2017. V.40. №9. P.536–554.
 16. Bilchak J. N., Yeakle K., Caron G., Malloy D., Côté M. P. Enhancing KCC2 activity decreases hyperreflexia and spasticity after chronic spinal cord injury // *Experimental Neurology*. 2021. V.338. 113605.
 17. Blewett C., Elder G. C. Quantitative EMG analysis in soleus and plantaris during hindlimb suspension and recovery // *Journal of Applied Physiology*. 1993. V.74. P.2057–2066.
 18. Borisov A. B., Dedkov E. I., Carlson B. M. Interrelations of myogenic response, progressive atrophy of muscle fibers, and cell death in denervated skeletal muscle // *Anatomical Record*. 2001. V.264. №2. P.203–218.
 19. Boulenguez P. et al. Down-regulation of the potassium-chloride cotransporter KCC2 contributes to spasticity after spinal cord injury // *Nature Medicine*. 2010. V.16. №3. P.302–7.
 20. Boulenguez P., Vinay L. Strategies to restore motor functions after spinal cord injury // *Current Opinion in Neurobiology*. 2009. V.19. P.587–600.
 21. Burke R. E., Levine D. N., Tsairis P., Zajac F. E. Physiological types and histochemical profiles in motor units of the cat gastrocnemius // *Journal of Physiology*. 1973. V.234. №3. P.723–748.
 22. Canon F., Goubel F., Guezennec C. Effects of chronic low frequency stimulation on contractile and elastic properties of hindlimb suspended rat soleus muscle // *European Journal of Applied Physiology*. – 1997. – Vol. 77. – P. 118–124.
 23. Cazorla M., et al. Cyclothiazin-B, the first highly potent and selective TrkB inhibitor, has anxiolytic properties in mice // *PLoS One*. 2010. V.5. №3. e9777.
 24. Cazorla M., Prémont J., Mann A., Girard N., Kellendonk C., Rognan D. Identification of a low-molecular weight TrkB antagonist with anxiolytic and antidepressant activity in mice // *Journal of Clinical Investigation*. 2011. V.121. №5. P.1846–1857.

25. Chen B., Li Y., Yu B., Zhang Y., Gu X., He Z. Reactivation of Dormant Relay Pathways in Injured Spinal Cord by KCC2 Manipulations // *Cell*. 2018. V.174. №3. P.521-535.e13.
26. Chibalin A. V., Benziene B., Zakyrganova G. F. et al. Early endplate remodeling and skeletal muscle signaling events following rat hindlimb suspension // *Journal of Cellular Physiology*. 2018. V.233. P.6329-6336.
27. Cohen I., Navarro V., Clemenceau S., Baulac M., Miles R. On the origin of interictal activity in human temporal lobe epilepsy in vitro // *Science*. 2002. V.298. P.1418–1421.
28. Collins D. F. Central contributions to contractions evoked by tetanic neuromuscular electrical stimulation // *Exercise and Sport Sciences Reviews*. 2007.
29. Côté M. P., et al. Plasticity in ascending long propriospinal and descending supraspinal pathways in chronic cervical spinal cord injured rats // *Frontiers in Physiology*. 2014.
30. Coull J. A. et al. BDNF from microglia causes the shift in neuronal anion gradient underlying neuropathic pain // *Nature*. 2005. V.438. №7070. P.1017-21.
31. Coull J. A. et al. Trans-synaptic shift in anion gradient in spinal lamina I neurons as a mechanism of neuropathic pain // *Nature*. 2003. V.424. P.938–942.
32. De Luca C. J. Physiology and mathematics of myoelectric signals // *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*. 1979. V.26. P.313-325.
33. De Luca G. Fundamental concepts in EMG signal acquisition // *Delsys Inc*. 2003.
34. De-Doncker L., Kasri M., Picquet F., Falempin M. Physiologically adaptive changes of the L5 afferent neurogram and of the rat soleus EMG activity during 14 days of hindlimb unloading and recovery // *Journal of Experimental Biology*. 2005. V.208. P.4585–4592.
35. Delp M. D., Changping D. Composition and size of type I, IIA, IID/X, and IIB fibers and citrate synthase activity of rat muscle // *Journal of Applied Physiology*. 1996. V.80. №1. P.261–270.
36. Delpire E., Weaver C. D. Challenges of Finding Novel Drugs Targeting the K–Cl Cotransporter // *ACS Chemical Neuroscience*. 2016. V.7. №12.
37. Deschenes M. R., Giles J. A., McCoy R. W., Volek J. S., Gomez A. L., Kraemer W. J. Neural factors account for strength decrements observed after short-term muscle unloading // *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 2002. V.282. P.R578–R583.

38. Doucet B. M., Lam A., Griffin L. Neuromuscular electrical stimulation for skeletal muscle function // *The Yale Journal of Biology and Medicine*. 2012. V.85. №2. P.201-15.
39. Duchateau J., Hainaut K. Electrical and mechanical changes in immobilized human muscle // *Journal of Applied Physiology*. 1987.
40. Edgerton V. R., Roy R. R. Regulation of skeletal muscle fiber size, shape and function // *Journal of Biomechanics*. 1991.
41. Edgerton V. R., Roy R. R. Spasticity: A switch from inhibition to excitation // *Nature Medicine*. 2010. V.16. P.270–271.
42. Eken T., Gundersen K. Electrical stimulation resembling normal motor-unit activity: effects on denervated fast and slow rat muscles // *The Journal of Physiology*. 1988.
43. Falempin M. et al. Effect of hindlimb unloading on EMG activity in rat postural muscles // *Journal of Gravitational Physiology*. 1998.
44. Falls D. L. Neuregulins: functions, forms, and signaling strategies // *Experimental Cell Research*. 2003. V.284. №1. P.14–30.
45. Farina D., Merletti R., Enoka R. M. The extraction of neural strategies from the surface EMG // *Journal of Applied Physiology*. 2004. V.96. P.1486–1495.
46. Fischbach G. D., Robbins N. Changes in contractile properties of disused soleus muscles // *The Journal of Physiology*. 1969. V.201. P.305–320.
47. Fitts R. H. et al. Physiologic and adaptive responses to low gravity // *Comprehensive Physiology*. 2015.
48. Fitts R. H., Riley D. R., Widrick J. J. Physiology of a microgravity environment invited review: microgravity and skeletal muscle // *Journal of Applied Physiology*. 2000. V.89. №2. P.823–839.
49. Fitts R. H., Trappe S. W., Costill D. L., Gallagher P. M., Creer A. C., Colloton P. A., Peters J. R., Romatowski J. G., Bain J. L., Riley D. A. Prolonged space flight-induced alterations in the structure and function of human skeletal muscle fibres // *Journal of Physiology*. 2010. V.588. P.3567-3592.
50. Gagnon M., Bergeron M. J., Lavertu G., Castonguay A., Tripathy S., Bonin R. P., Perez-Sanchez J., Boudreau D., Wang B., Dumas L., Valade I., Bachand K., Jacob-Wagner M., Tardif C., Kianicka I., Isenring P., Attardo G., Coull J. A. M., De Koninck Y. Chloride extrusion enhancers as novel therapeutics for neurological diseases // *Nature Medicine*. 2013. V.19. P.1524–1528.
51. Gazzoni M., Farina D., Merletti R. A new method for the extraction and classification of single motor unit action potentials from surface EMG signals // *Journal of Neuroscience Methods*. 2004. V.136. №2. P.165–177.

52. Gomez-Pinilla F., Ying Z., Roy R. R., Molteni R., Edgerton V. R. Voluntary exercise induces a BDNF-mediated mechanism that promotes neuroplasticity // *Journal of Neurophysiology*. 2002. V.88. P.2187–2195.
53. Gorassini M. A., Knash M. E., Harvey P. J., Bennett D. J., Yang J. F. Role of motoneurons in the generation of muscle tone at rest: an investigation of spinal cord injury // *Journal of Neurophysiology*. 2004. V.92. №3. P.1328–1337.
54. Gordon T., Mao J. Muscle atrophy and procedures for training after spinal cord injury // *Physical Therapy*. 1994.
55. Gregory C. M., Bickel C. S. Recruitment patterns in human skeletal muscle during electrical stimulation // *Physical Therapy*. 2005.
56. Grigor'ev A. I., Kozlovskaya I. B., Shenkman B. S. The role of support afferents in organization of the tonic muscle system // *Russ Fiziol Zh Im I M Sechenova*. 2004. V.90. №5. P.508–521.
57. Gupta V. et al. TrkB Receptor Signalling: Implications in Neurodegenerative, Psychiatric and Proliferative Disorders // *International Journal of Molecular Sciences*. 2013. V.14. №5. P.10122–10142.
58. Gurfinkel V. S., Levik Y. S. The mechanisms of postural regulation in man // *Soviet Scientific Reviews Section F Physiology and General Biology*. 1991. V.7. P.59–89.
59. Han L., Zhang Z., Qin W., Sun W. Neurotrophic receptor TrkB: Is it a predictor of poor prognosis for carcinoma patients? // *Medical Hypotheses*. 2007. V.68. P.407–409.
60. Henneman E., Olson C. B. Relations between structure and function in the design of skeletal muscles // *Journal of Neurophysiology*. 1965. V.28. P.581–598.
61. Henneman E., Somjen G., Carpenter D. O. Functional significance of cell size in spinal motoneurons // *Journal of Neurophysiology*. 1965. V.28. P.560–580.
62. Hennig R., Lomo T. Firing patterns of motor units in normal rats // *Nature*. 1985.
63. Hodgson J. A., Roy R. R., Higuchi N. et al. Does daily activity level determine muscle phenotype? // *Journal of Experimental Biology*. 2005. V.208. P.3761–3770.
64. Huang E. J., Reichardt L. F. Trk receptors: roles in neuronal signal transduction // *Annual Review of Biochemistry*. 2003. V.72. P.609–42.
65. Hübner C. A. et al. Disruption of KCC2 reveals an essential role of K-Cl cotransport already in early synaptic inhibition // *Neuron*. 2001. V.30. P.515–524.
66. Jang S. W., et al. A selective TrkB agonist with potent neurotrophic activities by 7,8-dihydroxyflavone // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010. V.107. №6. P.2687–2692.

67. Jiang B., et al. Effects of chronic electrical stimulation on contractile properties of long-term denervated rat skeletal muscle // *Journal of Physiology*. 1992.
68. Johnson M. A., Polgar J., Weightman D., Appleton D. Data on the Distribution of Fibre Types in Thirty-six Human Muscles an Autopsy Study // *Journal of the Neurological Sciences*. 1973. V.18. №1. P.111-129.
69. Kawano F., Ishihara A., Stevens J. L., Wang X. D., Ohshima S., Horisaka M., Maeda Y., Nonaka I., Ohira Y. Tension- and afferent input-associated responses of neuromuscular system of rats to hindlimb unloading and/or tenotomy // *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 2004. V.287. P.R76–R86.
70. Kawano F., Nomura T., Ishihara A., Nonaka I., Ohira Y. Afferent input-associated reduction of muscle activity in microgravity environment // *Neuroscience*. 2002. V.114. P.1133–1138.
71. Koumangoye R., Bastarache L., Delpire E. NKCC1: Newly Found as a Human Disease-Causing Ion Transporter // *Function*. 2021. V.2. №1. zqaa028.
72. Kozlovskaya I. B., Grigoriev A. I. Russian system of countermeasures on board of the International Space Station (ISS): The first results // *Acta Astronautica*. 2004. V.55. №3-9. P.233–237.
73. Kozlovskaya I. B., Kreidich Yu. V., Oganov V. S., Koserenko O. P. Pathophysiology of motor functions in prolonged manned space flights // *Acta Astronautica*. 1981. V.8. P.1059–1072.
74. Kozlovskaya I., Dmitrieva I., Grigorieva L. et al. Gravitational mechanisms in the motor system. Studies in real and simulated weightlessness // *Stance and Motion* / Eds. V.S. Gurfinkel, M.Y. Ioffe, J. Massion. New York, 1988. P.37–48.
75. Kupa E. J., et al. Effects of muscle fiber type and size on EMG median frequency and conduction velocity // *Journal of Applied Physiology*. 1995.
76. Leterme D., Falempin M. EMG activity of three rat hindlimb muscles during microgravity and hypergravity phase of parabolic flight // *Aviation, Space, and Environmental Medicine*. 1998. V.69. P.1065-1070.
77. Li X., Song X., Fang L. et al. Body weight-supported treadmill training ameliorates motoneuronal hyperexcitability by increasing GAD-65/67 and KCC2 expression via Trkb signaling in rats with incomplete spinal cord injury // *Neurochemical Research*. 2022. V.47. №6. P.1679-1691.
78. Liabeuf S., Stuhl-Gourmand L., Gackière F., Mancuso R., Sanchez Brualla I., Marino P., Brocard F., Vinay L. Prochlorperazine Increases KCC2 Function and Reduces Spasticity after Spinal Cord Injury // *Journal of Neurotrauma*. 2017. V.34. №24.

79. Loeb G. E., Gans C. Electromyography for Experimentalists. University of Chicago Press, 1986.
80. Lohof A. M., Ip N. Y., Poo M. M. Potentiation of developing neuromuscular synapses by the neurotrophins NT-3 and BDNF // *Nature*. 1993. V.363. P.350–353.
81. Lomo T. Nerve-muscle interactions // *Clinical Neurophysiology of Disorders of Muscle and the Neuromuscular Junction in Adults and Children*. IFSCN Handbook of Clinical Neurophysiology / Ed. E. Stalberg. Amsterdam: Elsevier, 2003. P.47–65.
82. Lu Y., Zheng J., Xiong L., Zimmermann M., Yang J. Spinal cord injury-induced attenuation of GABAergic inhibition in spinal dorsal horn circuits is associated with down-regulation of the chloride transporter KCC2 in rat // *The Journal of Physiology*. 2008. V.586. P.5701–5715.
83. Lykke K., Töllner K., Feit P. W., Erker T., MacAulay N., Löscher W. The search for NKCC1-selective drugs for the treatment of epilepsy: Structure–function relationship of bumetanide and various bumetanide derivatives in inhibiting the human cation-chloride cotransporter NKCC1A // *Epilepsy & Behavior*. 2016. V.59. P.42-49.
84. Massa S. M., et al. Small molecule BDNF mimetics activate TrkB signaling and prevent neuronal degeneration in rodents // *Journal of Clinical Investigation*. 2010. V.120. №5. P.1774–1785.
85. Massion J. Postural control system // *Current Opinion in Neurobiology*. 1994. V.4. №6. P.877–887.
86. Memme J. M., Erlich A. T., Phukan G., Hood D. A. Exercise and mitochondrial health // *The Journal of Physiology*. 2021. V.599. №3. P.803-817.
87. Mendell L. M., Johnson R. D., Munson J. B. Neurotrophin modulation of the monosynaptic reflex after peripheral nerve transection // *The Journal of Neuroscience*. 1999. V.19. P.3162–3170.
88. Minichiello L. TrkB signalling pathways in LTP and learning // *Nature Reviews Neuroscience*. 2009. V.10. №12. P.850-60.
89. Mirzoev T., Tyganov S., Vilchinskaya N. et al. Key markers of mTORc1-dependent and mTORc1-independent signaling pathways regulating protein synthesis in rat soleus muscle during early stages of hindlimb unloading // *Cellular Physiology and Biochemistry*. 2016. V.39. P.1011-1020.
90. Morey-Holton E. R., Globus R. K. Hindlimb unloading rodent model: technical aspects // *Journal of Applied Physiology*. 2002. V.92. P.1367-1377.
91. Nabekura J., Ueno T., Okabe A., Furuta A., Iwaki T., Shimizu-Okabe C., Fukuda A., Akaike N. Switching of neurotransmitter-phenotype in GABAergic neurons

- of adult rat dorsal root ganglia following peripheral nerve injury // *The Journal of Neuroscience*. 2002. V.22. №11. P.4412–4417.
92. Nair A. B., Jacob S. A simple practice guide for dose conversion between animals and human // *Journal of Basic and Clinical Pharmacy*. 2016. V.7. P.27–31.
 93. Nakazato K., Oshikawa M., Tamura Y., Fujino H. An electrical stimulation intervention protocol to prevent disuse atrophy in rats // *Journal of NeuroEngineering and Rehabilitation*. 2023. V.20. 89.
 94. Netter F. H. *Atlas of Human Anatomy*. 7th ed. Elsevier, 2019.
 95. Novikov V. E., Ilyin E. A. Age-related reactions of rat bones to their unloading // *Aviation, Space, and Environmental Medicine*. 1981. V.52. №9. P.551–553.
 96. Ohira Y., Kawano F., Wang X. D., Nakai N., Ohira T., Okabe H., Naito H., Goto K. Role(s) of Mechanical Load and Satellite Cells in The Regulation of The Size of Soleus Muscle Fiber in Rats // *Biological Sciences in Space*. 2010. V.24. №3–4. P.135–144.
 97. Ohira Y., Yoshinaga T., Ohara M., Kawano F., Wang X. D., Higo Y., Terada M., Matsuoka Y., Roy R. R., Edgerton V. R. Gravitational mechanisms in the motor system influences in maintaining normal fast and slow muscle properties // *Cells Tissues Organs*. 2006. V.182. P.129–142.
 98. Payne J. A., Rivera C., Voipio J., Kaila K. Cation-chloride co-transporters in neuronal communication, development and trauma // *Trends in Neurosciences*. 2003. V.26. P.199–206.
 99. Pette D., Vrbová G. Adaptation of mammalian skeletal muscle fibers to chronic electrical stimulation // *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology*. 1992.
 100. Rennie M. J. Why muscle stops building when it's working // *The Journal of Physiology*. 2005. V.569. P.3.
 101. Reschke M. F., Bloomberg J. J., Paloski W. H., Mulavara A. P., Feiveson A. H., Harm D. L. Postural reflexes, balance control, and functional mobility with long-duration head-down bed rest // *Aviation, Space, and Environmental Medicine*. 2009. V.80. №5 Suppl. A45–A54.
 102. Rivera C. et al. The K⁺/Cl⁻ co-transporter KCC2 renders GABA hyperpolarizing during neuronal maturation // *Nature*. 1999. V.397. №6716. P.251–5.
 103. Roy R. R., et al. Differential response of fast and slow hindlimb muscles to electrical stimulation training in rats // *Journal of Applied Physiology*. 1999.
 104. Russomano T., Gustavo D., Falcuo F. The Effects of Hypergravity and Microgravity on Biomedical Experiments // *Biomedical Engineering*. 2008. P.77.

105. Saveko A., Bekreneva M., Ponomarev I., Zelenskaya I., Riabova A., Shigueva T., Kitov V., Abu Sheli N., Nosikova I., Rukavishnikov I., Sayenko D., Tomilovskaya E. Impact of different ground-based microgravity models on human sensorimotor system // *Frontiers in Physiology*. 2023. V.14. 1085545.
106. Schiaffino S., Reggiani C. Fiber types in mammalian skeletal muscles // *Physiological Reviews*. 2011. V.91. №4. P.1447–1531.
107. Shenkman B. S. From Slow to fast: hypogravity-induced remodeling of muscle fiber myosin phenotype // *Acta Naturae*. 2016. V.8. №4. P.47–59.
108. Shenkman B. S. How postural muscle senses disuse? Early signs and signals // *International Journal of Molecular Sciences*. 2020.
109. Takashi Ohira, Fuminori Kawano, Katsumasa Goto, Hiroshi Kaji, Yoshinobu Ohira. Responses of neuromuscular properties to unloading and potential countermeasures during space exploration missions // *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. 2022. V.136. 104617.
110. Tamura Y., Oshikawa M., Nakazato K., Fujino H. Mixed twitch and tetanus electrical stimulation via belt-electrode effectively attenuates denervation-induced muscle atrophy // *PLOS ONE*. 2024. V.19. №7. e0334691.
111. Tang B. L. The Expanding Therapeutic Potential of Neuronal KCC2 // *Cells*. 2020. V.9. №1. 240.
112. Tang H., Inoki K., Lee M. et al. mTORC1 Promotes Denervation-Induced Muscle Atrophy Through a Mechanism Involving the Activation of FoxO and E3 Ubiquitin Ligases // *Science Signaling*. 2014. V.7. №314. ra18.
113. Templeton G. H., et al. Influence of suspension hypokinesia on rat soleus muscle // *Journal of Applied Physiology*. 1984.
114. Treffort N., et al. Differential effect of hindlimb unloading on homospecific and heterospecific synaptic inputs to lumbar motoneurons: a reverse microdialysis study in the rat // *Neuroscience Letters*. 2006. V.403. P.147-150.
115. Trimble M. H., Enoka R. M. Mechanisms underlying the training effects associated with neuromuscular electrical stimulation // *Physical Therapy*. 1991.
116. Vanden Heuvel G. B., Payne J. A., Igarashi P., Forbush B. Expression of the basolateral Na-K-Cl cotransporter during mouse nephrogenesis and embryonic development // *Gene Expression Patterns*. 2006. V.6. №8. P.1000-1006.
117. Vinay L., Jean-Xavier C. Plasticity of spinal cord locomotor networks and contribution of cation-chloride cotransporters // *Brain Research Reviews*. 2008. V.57. №1. P.103-110.
118. Yang W., Zhang H. Effects of hindlimb unloading on neurotrophins in the rat spinal cord and soleus muscle // *Brain Research*. 2016. V.1630. P.1–9.
119. You J. S., Anderson G. B., Dooley M. S., Hornberger T. A. The role of mTOR signaling in the regulation of protein synthesis and muscle mass during

- immobilization in mice // *Disease Models & Mechanisms*. 2015. V.8. №9. P.1059-1069.
120. Zagrebelsky M., Korte M. Form follows function: BDNF and its involvement in sculpting neurotransmitter systems // *Frontiers in Synaptic Neuroscience*. 2014.
 121. Zhao J., Yang H., Wang Z., Zhu H., Xie M. ANA-12 inhibits spinal inflammation and alleviates acute and chronic pain in rats by targeted blocking of BDNF/TrkB signaling // *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao = Journal of Southern Medical University*. 2022. V.42. №2. P.232-237.
 122. Ziskind-Conhaim L. Physiological functions of GABA-induced depolarizations in the developing rat spinal cord // *Perspectives on Developmental Neurobiology*. 1998. V.5. P.279–287.