

УДК 612.743

НИЗКИЕ ДОЗЫ УБАИНА И АМФ-АКТИВИРУЕМАЯ ПРОТЕИНКИНАЗА КАК ФАКТОРЫ ПОДДЕРЖАНИЯ ЭЛЕКТРОГЕНЕЗА СКЕЛЕТНОЙ МЫШЦЫ

© 2019 В.В. Кравцова¹, Н.А. Вильчинская², В.Л. Розломий¹,
Б.С. Шенкман², И.И. Кривой^{1*}

¹ Санкт-Петербургский государственный университет,
199034 Санкт-Петербург, Россия; электронная почта: iikrivoi@gmail.com

² Государственный научный центр Российской Федерации –
Институт медико-биологических проблем РАН, 123007 Москва, Россия

Поступила в редакцию 11.02.2019

После доработки 24.05.2019

Принята к публикации 07.06.2019

Различные виды двигательной дисфункции сопровождаются устойчивой деполяризацией мембраны скелетных мышечных волокон за счет нарушения функционирования Na,K-АТФазы. Нами впервые исследована возможность участия в поддержании мышечного электрогенеза эндогенных факторов, уровень которых непосредственно связан с двигательной активностью: убаина (специфического лиганда Na,K-АТФазы) и АМФ-активируемой протеинкиназы (ключевого регулятора мышечного метаболизма). В изолированных диафрагмальных мышцах крыс после введения убаина (1 мкг/кг/день в течение 4-х суток) зарегистрирована гиперполяризация сарколеммы за счет увеличения электрогенной активности Na,K-АТФазы. Гиперполяризация, развивающаяся уже через 15 мин, показана и в острых опытах с добавлением наномолярных концентраций убаина в раствор. При увеличении концентрации наружного калия менялся знак действия убаина и наблюдалась только деполяризация мембраны. Специфическая субклеточная локализация, наличие определенных молекулярных партнеров, а также изменение ионного баланса рассматриваются в качестве возможных факторов реализации активирующего Na,K-АТФазу действия убаина. В экспериментах с превентивным введением АICAR (активатор АМФ-активируемой протеинкиназы, 400 мг/кг/день в течение 7 сут) показана стабилизация структуры концевых пластинок и отсутствие деполяризации мембраны камбаловидной мышцы крысы, вызываемой прекращением двигательной активности. Полученные новые факты могут быть полезными с точки зрения поиска путей коррекции мышечной дисфункции, в том числе на ее ранних этапах, предшествующих развитию выраженной атрофии.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: скелетная мышца, двигательная активность, убаин, Na,K-АТФаза, АМФ-активируемая протеинкиназа.

DOI: 10.1134/S0320972519090112

Поддержание определенного уровня мембранного потенциала покоя (МПП) является важнейшим условием нормального функционирования скелетной мышцы. Даже небольшая, но длительная деполяризация (гиперполяризация) мембраны может быть критически важна с точки зрения кинетики потенциал-зависимых Na⁺-каналов и возбудимости сарколеммы [1–3]. В связи с этим необходимо отметить, что различные формы нарушения двигательной актив-

ности сопровождаются устойчивым снижением МПП скелетных мышечных волокон [4–6], причем эта деполяризация обусловлена в основном нарушением функционирования Na,K-АТФазы [4, 5, 7, 8]. В скелетной мышце грызунов ко-экспрессируются $\alpha 1$ - и $\alpha 2$ -изоформы каталитической и транспортной α -субъединицы Na,K-АТФазы, различающиеся локализацией и функциональной специализацией [9]. При двигательной дисфункции преимущественно нарушается функционирование $\alpha 2$ -изоформы Na,K-АТФазы [7, 8, 10].

Среди многочисленных факторов, связанных с двигательной активностью и способных влиять на активность Na,K-АТФазы, особое место занимает эндогенный аналог убаина, который синтезируется в коре надпочечников и в

Принятые сокращения: МПП – мембранный потенциал покоя, АМПК – АМФ-активируемая протеинкиназа, АICAR – 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1- β -D-ribofuranoside, HS – вывешивание задних конечностей, нХР – никотиновые холинорецепторы, α -БТХ – α -бунгаротоксин.

* Адресат для корреспонденции.

гипоталамусе. Убаин является ингибитором Na,K-АТФазы, специфическим рецептором для него служат внеклеточные участки α -субъединицы Na,K-АТФазы [11]. Эндогенный убаин циркулирует в наномолярном диапазоне концентраций [12] и рассматривается в качестве нового гормона [11]. Важно, что уровень эндогенного убаина существенно повышается при мышечной активности [13] и, предположительно действуя через α 2-изоформу Na,K-АТФазы, этот лиганд является регулятором работоспособности скелетной мышцы [14]. Хотя убаин является специфическим ингибитором Na,K-АТФазы, для ряда клеток показана способность убаина активировать Na,K-АТФазу при субнаномолярных концентрациях, сопоставимых с уровнем его эндогенного аналога [15–19]. Что касается скелетной мышцы, такая способность убаина влиять на Na,K-АТФазу исследована не была.

Другим фактором, непосредственно связанным с мышечной активностью, является АМФ-активируемая протеинкиназа (АМР-activated protein kinase, АМРК). В камбаловидной мышце крысы снижение уровня фосфорилирования АМРК [20–22], сопровождающееся снижением электрогенной активности α 2-изоформы Na,K-АТФазы [8], наблюдается уже в первые сутки двигательной разгрузки, и оба эти феномена относятся к наиболее ранним событиям, предшествующим развитию атрофии. Важно отметить, что в скелетной мышце АМРК, ключевой регулятор мышечного метаболизма [23], влияет также и на активность Na,K-АТФазы [24, 25].

Хотя способность эндогенного убаина и АМРК влиять на активность Na,K-АТФазы известна, возможная роль этих факторов в поддержании МПП скелетных мышечных волокон ранее не была исследована. Изучению этого вопроса посвящена данная работа. В опытах с хроническим введением крысам экзогенного убаина моделировали условия повышения уровня циркулирующего эндогенного убаина. Были проведены также хронические эксперименты на крысах с применением фармакологического агента АICAR, что, по ряду данных, активирует АМРК и препятствует структурным нарушениям нервно-мышечного соединения и развитию симптомов мышечной атрофии [20,26].

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Работа была проведена на изолированных нервно-мышечных препаратах камбаловидной и диафрагмальной (левая полу-диафрагма) мышц самцов крыс Wistar весом 190–210 г («Пи-

томник лабораторных животных», Рапполово, Ленинградская обл., Россия). В экспериментах использовали химические реактивы и убаин («Sigma», США) и АICAR («Toronto Research Chemicals», Канада).

В опытах применяли стандартный метод внутрибрюшинного ежедневного введения убаина в дозе 1 мкг/кг/день в течение 4-х суток, что повышает уровень циркулирующего убаина в сыворотке крови крыс с 0,9 до 1,7 нМ [17]. Контрольным крысам вводили 0,9% NaCl. В части опытов убаин в концентрациях 5–100 нМ добавляли в омывающий изолированную мышцу раствор.

В хронических экспериментах с применением АICAR (5-aminoimidazole-4-carboxamide-1- β -D-ribofuranoside) крысы были разделены на четыре группы: контрольная и две группы крыс, которых подвергали вывешиванию задних конечностей (hindlimb suspension, HS) в течение 12 ч традиционным способом [27]. Одну группу перед вывешиванием подвергали обработке АICAR (400 мг/кг/день) – группа (HS+АICAR), другая группа получала такой же объем физиологического раствора (0,9% NaCl) – группа HS. Контрольные животные получали только инъекции физиологического раствора. АICAR или физиологический раствор вводили внутрибрюшинно раз в день в течение 7 суток, как описано ранее [20]. Четвертая группа – полностью интактные животные. Поскольку само по себе введение физиологического раствора никак не влияло на изучаемые характеристики, данные по интактным крысам не приводятся.

Сразу после выделения исследуемую мышцу с отрезком нерва помещали в экспериментальную камеру с физиологическим раствором следующего состава (в мМ): NaCl – 137; KCl – 5; CaCl₂ – 2; MgCl₂ – 2; NaHCO₃ – 24; NaH₂PO₄ – 1; глюкоза – 11; pH – 7,4. Раствор постоянно аэрировали карбогеном (95% O₂ + 5% CO₂). В опытах с регистрацией МПП использовали проточный раствор (температура 28 °С). Перед началом эксперимента мышцы выдерживали в этих условиях в течение 60 мин. Величину МПП регистрировали внутриклеточно с помощью стеклянных микроэлектродов с внутренними капиллярами BF150-110-10 («Sutter Instrument, Co.», USA), изготовленных на микрокузнице Sutter P-97 («Sutter Instrument, Co.», USA). В каждой мышце регистрировали МПП в 25–30 волокнах в постсинаптическом и внесинаптическом районах сарколеммы, как описано ранее [2]. Каждое значение представляет собой результат измерений МПП не менее чем в 100 волокнах 4–6 диафрагмальных мышц и в 150 волокнах 6–8 камбаловидных мышц. Общ

электрогенный вклад $\alpha 1$ - и $\alpha 2$ -изозимов Na,K-АТФазы определяли как разницу между исходным значением МПП и через 30 мин действия 500 мкМ убаина [5].

В части опытов на камбаловидной мышце оценивали локализацию никотиновых холинорецепторов (нХР). Эти опыты проводили при температуре 22 °С с использованием меченого α -бунгаротоксина (α -БТХ, tetramethylrhodamine- α -bungarotoxin) («Biotium», USA), как описано ранее [28]. Для получения изображений применяли конфокальную систему Leica TCS SP5 с объективом 63 \times и числовой апертурой 1,30 («Leica», Germany); обработку изображений проводили с помощью программы Image Pro software («Media Cybernetics Inc.», USA).

Статистическую обработку проводили с помощью программы Origin (ORIGIN Pro 8 software). В тексте и на рисунках приведены средние значения \pm стандартная ошибка (mean \pm SE).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Хроническое введение убаина. В изолированных диафрагмальных мышцах крыс, получавших инъекции убаина в течение 4-х суток,

была зафиксирована гиперполяризация внесинаптической мембраны величиной $3,3 \pm 0,5$ мВ ($p < 0,01$) по сравнению с контрольными мышцами (рис. 1, а). В постсинаптическом районе сарколеммы, напротив, наблюдали деполяризацию мембраны величиной $3,0 \pm 0,6$ мВ ($p < 0,01$) (рис. 1, б). Чтобы выяснить причину таких изменений МПП, электрогенную активность Na,K-АТФазы в этих же мышцах оценивали по изменению величины МПП через 30 мин после добавления в омывающий раствор убаина в концентрации 500 мкМ, полностью блокирующей активность обеих изоформ Na,K-АТФазы. Такая оценка показала, что у крыс, хронически получавших убаин, электрогенная активность Na,K-АТФазы во внесинаптическом районе мембраны возрастала ($p < 0,01$) до $-19,5 \pm 0,5$ мВ по сравнению с контролем: $-16,1 \pm 0,5$ мВ. В постсинаптическом районе, наоборот, наблюдалось снижение ($p < 0,05$) электрогенной активности Na,K-АТФазы с $-19,0 \pm 0,5$ мВ в контроле до $-17,4 \pm 0,5$ мВ (рис. 1, в и г). Важно, что полное ингибирование Na,K-АТФазы убаином в концентрации 500 мкМ во всех случаях вызвало деполяризацию мембраны до одного и того же уровня около -62 мВ (рис. 1, а и б). Поскольку в отсутствие электрогенного транспорта этот уровень МПП в основном определяется прони-

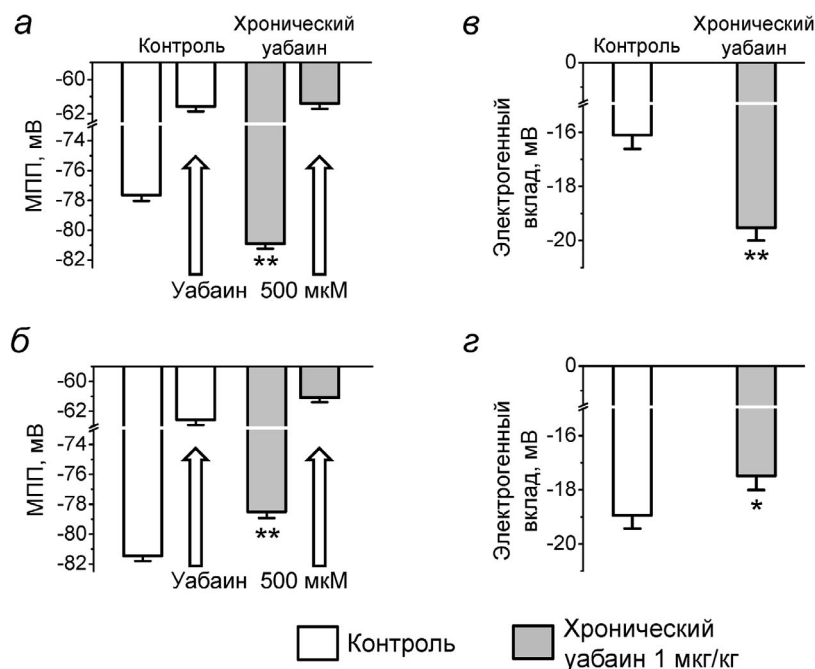


Рис. 1. Влияние хронического введения убаина в дозе 1 мкг/кг в течение 4-х суток на электрогенез мышечных волокон изолированной диафрагмы крысы во внесинаптическом (а, в) и постсинаптическом (б, г) районах мембраны. а и б – Величины МПП в контрольных и опытных мышцах, вертикальными стрелками отмечены величины МПП через 30 мин после добавления в раствор 500 мкМ убаина; в и г – электрогенные вклады Na,K-АТФазы в МПП. * $p < 0,05$ и ** $p < 0,01$ по сравнению с соответствующим контролем

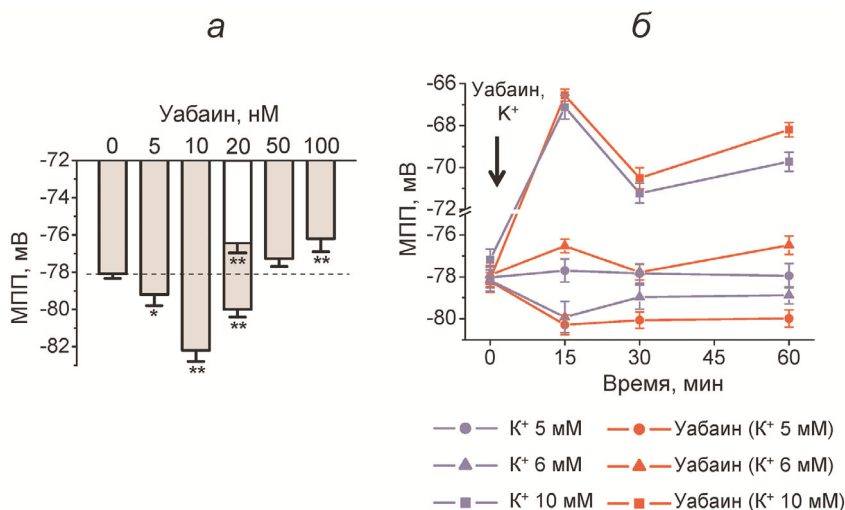


Рис. 2. Регистрация МПП во внесинаптическом районе мембраны мышечных волокон диафрагмы крысы в опытах с добавлением разных концентраций убаина и/или K^+ в омывающий раствор. *а* – Влияние убаина на МПП при 5 мМ K^+ в растворе. Белый столбец – величина МПП через 60 мин действия убаина (20 нМ) на фоне 6 мМ K^+ . *б* – Динамика изменения МПП при действии убаина (20 нМ) на фоне разных концентраций наружного K^+ (момент замены раствора отмечен вертикальной стрелкой). * $p < 0,05$ и ** $p < 0,01$ по сравнению с контролем (без убаина)

цаемостью мембраны и ионными градиентами (уравнение Goldman–Hodgkin–Katz), можно полагать, что хронические инъекции убаина не влияли на эти параметры.

Таким образом, изменения МПП, наблюдаемые у крыс, хронически получавших убаин, объясняются скорее соответствующими изменениями электрогенной активности Na,К-АТФазы, нежели другими факторами.

В острых опытах с добавлением убаина в концентрации 5–20 нМ в омывающий изолированную мышцу раствор (60 мин инкубации) наблюдали аналогичную по величине гиперполяризацию внесинаптической мембраны, концентрации 50–100 нМ вызывали деполяризацию (рис. 2, *а*). Гиперполяризация при действии убаина в концентрации 20 нМ полностью развивалась уже через 15 мин и оставалась стабильной в течение 60 мин (рис. 2, *б*). Отметим, что в этих опытах гиперполяризацию наблюдали при концентрациях значительно превышающих уровень эндогенного убаина [12]. Однако надо иметь в виду, что эффективность наномолярных концентраций убаина может существенно усиливаться при увеличении времени их действия [19]. Поэтому эффекты кратковременного добавления убаина в раствор можно, в определенных пределах, расценивать как моделирование условий хронического повышения уровня циркулирующего убаина.

Важно отметить, что при увеличении концентрации K^+ в растворе с 5 мМ до 6 мМ убаин (20 нМ) вызывал уже деполяризацию мембра-

ны, соответствующую эффекту 100 нМ убаина (рис. 2, *а*). При увеличении концентрации K^+ до 10 мМ убаин также вызывал только деполяризацию (рис. 2, *б*). Этот результат соответствует хорошо известной высокой степени зависимости связывания убаина с Na,К-АТФазой от концентрации наружного K^+ [29]. Отметим, что сходную ситуацию наблюдали при исследовании одного из эндогенных модуляторов Na,К-АТФазы, который активировал Na,К-АТФазу при концентрации K^+ 0,3 мМ, но ингибировал при концентрации K^+ 2,5 мМ [30]. Механизм такой реверсии знака действия убаина неизвестен. Вполне вероятно, что имеют значение какие-то особенности конформации E2-P, где и происходит конкуренция между убаином и K^+ . Мы считаем этот факт весьма важным, поскольку он дополнительно подтверждает вовлечение Na,К-АТФазы в реализацию гиперполяризующего действия убаина.

Учитывая накопление K^+ в синаптических щелях [31] и в Т-системе [9] скелетных мышечных волокон при активности, данный фактор можно расценивать как потенциальный модулятор эффектов низких концентраций убаина. Различная концентрация K^+ в различных ультраструктурах межклеточных пространствах может быть причиной противоположных эффектов хронически действующего убаина в постсинаптической и внесинаптической областях мембраны, наблюдаемых в наших опытах.

Убаин является специфическим ингибитором Na,К-АТФазы, однако ряд данных свиде-

тельствует о способности убаина в сверхнизких концентрациях активировать Na,K-АТФазу [15–19, 32]. Поэтому наблюдаемая нами в хронических и острых опытах гиперполяризация внесинаптической мембраны может быть следствием активирующего Na,K-АТФазу действия убаина в наномолярных концентрациях. Механизм этого эффекта остается неясным. Одна из возможностей заключается в функциональном взаимодействии Na,K-АТФазы с такими молекулярными партнерами, как NHE-1 (sodium/hydrogen exchanger-1) [17] и АТ1R (angiotensin receptor type I) [18]. В частности, предполагается, что связывание убаина может усиливать транслокацию Na,K-АТФазы из внутриклеточного пула в плазматическую мембрану [18]. Подобный механизм может действовать в условиях хронических инъекций убаина. Однако в острых опытах гиперполяризация мембраны полностью развивалась уже через 15 мин действия убаина (рис. 2, б). Это время представляется слишком коротким, чтобы реализовались такие более длительные процессы, как интернализация и транслокация Na,K-АТФазы [33, 34].

Эффекты наномолярных концентраций убаина могут быть обусловлены изменением соотношения внутриклеточных концентраций Na^+ и K^+ [35]. В связи с этим отметим, что активирующие эффекты убаина были показаны преимущественно в интактных клетках, причем наблюдали активацию как $\alpha 1$ [16–19], так и $\alpha 2$ [15] изоформ Na,K-АТФазы. Данные, полученные на бесклеточных препаратах Na,K-АТФазы, противоречивы: наблюдается как активация Na,K-АТФазы [32], так и ее отсутствие [36, 37]. Если прямое активирующее Na,K-АТФазу действие убаина маловероятно, можно предположить, что для реализации этого эффекта необходимы определенные условия, существующие только в интактных клетках. Например, специфическая субклеточная локализация и наличие определенных молекулярных партнеров, как это показано для гладкой и сердечной мышц, где эффекты убаина реализуются в местах тесного прилегания плазматической мембраны к саркоплазматическому ретикулуму, характеризующиеся специфической кластеризацией $\alpha 2$ -изоформы Na,K-АТФазы с Na^+ , Ca^{2+} -обменником, SERCA, риадиноновыми и IP_3 рецепторами [11]. В скелетной мышце аналогом такого микродомена может быть триадное соединение между Т-тубулами и концевыми цистернами саркоплазматического ретикулума, где локализованы перечисленные выше белки, включая Na^+ , Ca^{2+} -обменник [38] и $\alpha 2$ -изоформу Na,K-АТФазы [9]. Не исключено, что именно по причине такой субклеточной локализации

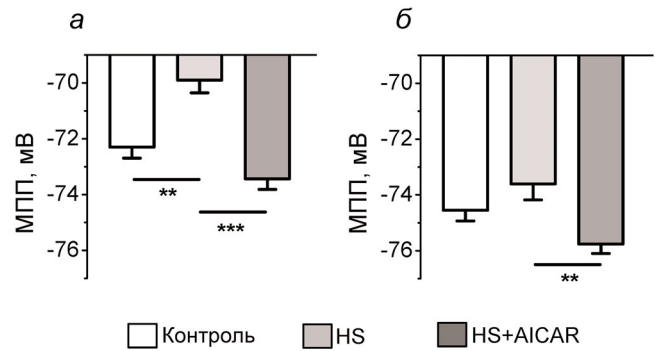


Рис. 3. Влияние хронического введения AICAR на МПП мышечных волокон камбаловидной мышцы крысы во внесинаптическом (а) и постсинаптическом (б) районах мембраны. Контроль – крысы, получавшие инъекции NaCl; HS – крысы после 12 ч вывешивания с инъекциями NaCl; HS+AICAR – крысы после 12 ч вывешивания с инъекциями NaCl и AICAR. ** $p < 0,01$ и *** $p < 0,001$ по сравнению с соответствующей группой животных

гиперполяризующие эффекты убаина наблюдаются нами только во внесинаптической области мембраны.

Хроническое введение AICAR. В этих опытах было установлено, что введение AICAR препятствует развитию деполяризации внесинаптической области мышечной мембраны камбаловидной мышцы крысы, наблюдаемой через 12 ч разгрузки. После применения AICAR мембрана была гиперполяризована на $3,5 \pm 0,6$ мВ ($p < 0,001$) по сравнению с условиями разгрузки (рис. 3, а). Гиперполяризацию наблюдали и в постсинаптической области мембраны (рис. 3, б).

Число отдельных фрагментов концевых пластинок в контроле не изменялось после вывешивания, однако площадь фрагментов уменьшалась (рис. 4, а–д). Соответственно, общая площадь концевых пластинок, оцениваемая как сумма площадей отдельных фрагментов, после вывешивания также снижалась (рис. 4, е). Эти наблюдения соответствуют данным о дезинтеграции структуры концевых пластинок, наблюдаемой в первые 12 ч вывешивания [22, 28]. В условиях введения AICAR число и площадь фрагментов, а также общая площадь концевых пластинок не отличались от контрольных значений (рис. 4, з–е). После введения AICAR наблюдалось также увеличение уровня относительной флуоресценции α -БТХ, что может отражать увеличение плотности распределения nXP в мембране. Соответственно возрастала и общая флуоресценция α -БТХ по всей площади концевых пластинок (рис. 4, ж и з).

АМПК является метаболическим сенсором, который активируется в условиях сократительной деятельности, когда возрастает потребление

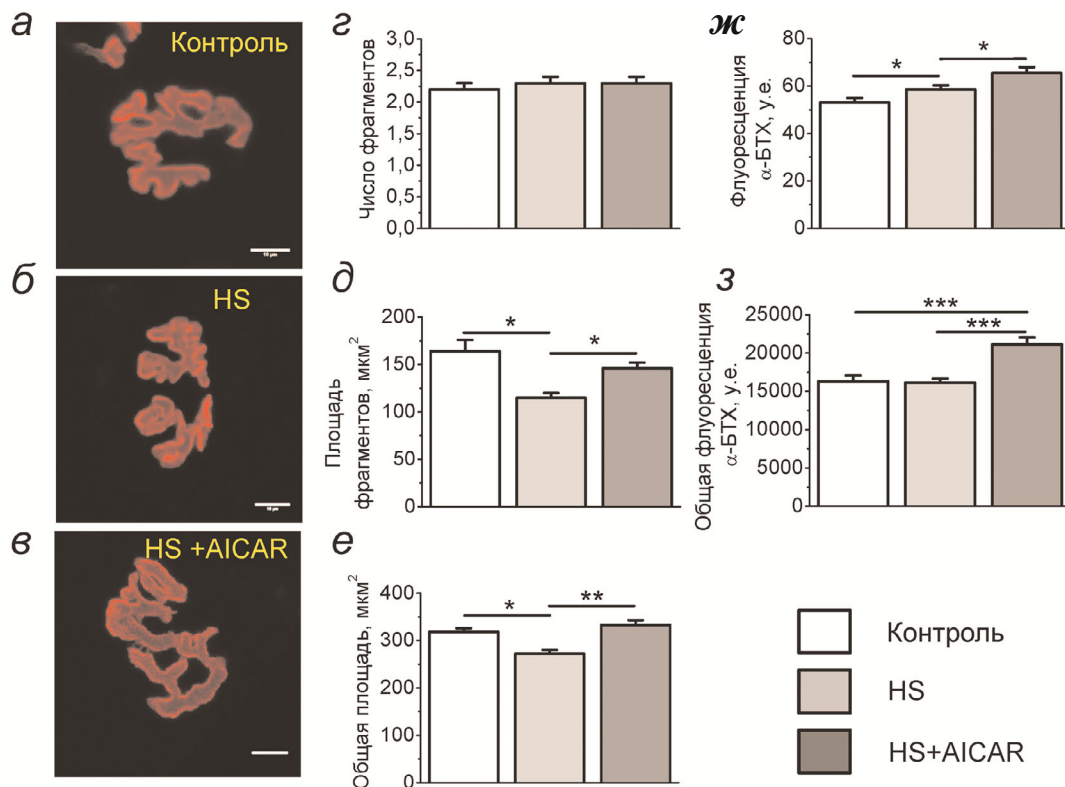


Рис. 4. Влияние хронического введения AICAR на характеристики концевых пластинок камбаловидной мышцы крысы. *a–в* – Примеры изображений распределения нХР, меченых α-БТХ. Масштаб 10 мкм. *д–е* – Соответственно, число и площадь отдельных фрагментов, а также общая площадь концевых пластинок; *ж* – уровень относительной и *з* – общей флуоресценции α-БТХ по всей площади концевых пластинок. Контроль – крысы, получавшие инъекции NaCl; HS+AICAR – крысы после 12 ч вывешивания с инъекциями NaCl и AICAR. В каждой серии опытов обработано 64–144 изображений концевых пластинок 6–8 мышц у 3–4 крыс. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ и *** $p < 0,001$ по сравнению с соответствующей группой животных

ние энергии клеткой и увеличивается внутриклеточное соотношение АМФ/АТФ. Напротив, уже в первые сутки вывешивания наблюдается снижение уровня фосфорилирования АМПК в камбаловидной мышце крысы [20, 22]. Снижение уровня фосфорилирования АМПК наблюдается и в скелетной мышце человека в условиях сухой иммерсии [39]. В настоящее время АМПК рассматривается в качестве важнейшего фактора регулирования метаболизма скелетных мышц, процессов транскрипции, аутофагии и многих других, включая механизмы поддержания структурно-функциональной организации нервно-мышечного соединения [26]. В частности, хорошо известна роль липидов (прежде всего холестерина) в кластеризации нХР и поддержании целостности структуры концевой пластинки, которая нарушается в условиях двигательной разгрузки [3, 28]. В связи с этим интересны данные о превентивном эффекте введения AICAR в течение 7 суток в условиях нарушения липидного обмена при сниженной двигательной активности крыс [40].

В нашей работе впервые получены данные, свидетельствующие о том, что превентивное введение AICAR способно не только стабилизировать структуру концевых пластинок, но и предотвращать деполяризацию мембраны, вызываемую прекращением двигательной активности.

Необходимо отметить, что AICAR традиционно применяется в качестве активатора АМПК, и к настоящему времени накоплено большое количество данных о специфичности этого влияния. В частности, показано увеличение уровня фосфорилирования АМПК в мышцах при применении AICAR у крыс [20] и мышей [41]. Единичные работы, описывающие не зависящие от АМПК эффекты AICAR, как правило, не затрагивают сигнальную регуляцию энергетических процессов или регуляцию процессов белкового синтеза [42].

Хорошо известно, что различные виды нарушения двигательной активности сопровождаются снижением величины МПП скелетных мышечных волокон. Даже относительно не-

большая, но длительная деполяризация ведет к инактивации Na^+ -каналов и уменьшению возбудимости мембраны, нарушению генерации и проведения потенциалов действия, а также к нарушению функционирования системы электромеханического сопряжения; гиперполяризация мембраны оказывает противоположное действие. Нами впервые показано, что низкие дозы убаина способны гиперполяризовать мембрану скелетных мышечных волокон за счет увеличения электрогенной активности Na, K-ATPase . Изоформ-специфичность участия Na, K-ATPase в этих эффектах требует отдельного анализа. Установлено также, что превентивное введение AICAR стабилизирует структуру концевых пластинок и оказывает протектирующее действие в отношении МПП в условиях двигательной разгрузки. Необходимо дальнейшее исследование механизма этого эффекта AICAR и его специфичности. Полученные новые факты могут быть полезными с точ-

ки зрения поиска путей коррекции мышечной дисфункции, в том числе на ее ранних этапах, предшествующих развитию выраженной атрофии.

Финансирование. Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 18-15-00043).

Благодарности. Авторы выражают благодарность Ресурсному центру «Развитие молекулярных и клеточных технологий» Санкт-Петербургского государственного университета и лично Н.А. Костину за помощь в проведении работ с конфокальной микроскопией.

Конфликт интересов. Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Filatov, G.N., Pinter, M.J., and Rich, M.M. (2005) Resting potential-dependent regulation of the voltage sensitivity of sodium channel gating in rat skeletal muscle *in vivo*, *J. Gen. Physiol.*, **126**, 161–172, doi: 10.1085/jgp.200509337.
- Heiny, J.A., Kravtsova, V.V., Mandel, F., Radzyukevich, T.L., Benziane, B., Prokofiev, A.V., Pedersen, S.E., Chibalin, A.V., and Krivoi, I.I. (2010) The nicotinic acetylcholine receptor and the $\text{Na, K-ATPase } \alpha 2$ isoform interact to regulate membrane electrogenesis in skeletal muscle, *J. Biol. Chem.*, **285**, 28614–28626, doi: 10.1074/jbc.M110.150961.
- Krivoi, I.I., and Petrov, A.M. (2019) Cholesterol and the safety factor for neuromuscular transmission, *Int. J. Mol. Sci.*, **20**, 1046, doi: 10.3390/ijms20051046.
- Тяпкина, О., Вольков, Е., Нуруллин, Л., Шенкман, В., Козловская, И., Никольский, Е., and Vyskocil, F. (2009) Resting membrane potential and Na^+, K^+ -ATPase of rat fast and slow muscles during modeling of hypogravity, *Physiol. Res.*, **58**, 599–603.
- Miles, M.T., Cottey, E., Cottey, A., Stefanski, C., and Carlson, C.G. (2011) Reduced resting potentials in dystrophic (mdx) muscle fibers are secondary to NF- κ B-dependent negative modulation of ouabain sensitive Na-K pump activity, *J. Neurol. Sci.*, **303**, 53–60, doi: 10.1016/j.jns.2011.01.015.
- Kravtsova, V.V., Timonina, N.A., Zakir'yanova, G.F., Sokolova, A.V., Mikhailov, V.M., Zefirov, A.L., and Krivoi, I.I. (2018) The structural and functional characteristics of the motor end plates of dysferlin-deficient mice, *Neurochem. J.*, **12**, 305–310, doi: 10.1134/S1819712418040049.
- Kravtsova, V.V., Matchkov, V.V., Bouzinova, E.V., Vasiliev, A.N., Razgovorova, I.A., Heiny, J.A., and Krivoi, I.I. (2015) Isoform-specific Na, K-ATPase alterations precede disuse-induced atrophy of rat soleus muscle, *Biomed Res. Int.*, **2015**, 720172, doi: 10.1155/2015/720172.
- Kravtsova, V.V., Petrov, A.M., Matchkov, V.V., Bouzinova, E.V., Vasiliev, A.N., Benziane, B., Zefirov, A.L., Chibalin, A.V., Heiny, J.A., and Krivoi, I.I. (2016) Distinct $\alpha 2$ Na, K-ATPase membrane pools are differently involved in early skeletal muscle remodeling during disuse, *J. Gen. Physiol.*, **147**, 175–188, doi: 10.1085/jgp.201511494.
- DiFranco, M., Hakimjavadi, H., Lingrel, J.B., and Heiny, J.A. (2015) $\text{Na, K-ATPase } \alpha 2$ activity in mammalian skeletal muscle T-tubules is acutely stimulated by extracellular K^+ , *J. Gen. Physiol.*, **146**, 281–294, doi: 10.1085/jgp.201511407.
- Kravtsova, V.V., Bouzinova, E.V., Machkov, V.V., Timonina, N.A., Zakyranova, G.F., Zefirov, A.L., and Krivoi, I.I. (2019) Abnormal membrane localization of $\alpha 2$ isoform of Na, K-ATPase in *m. soleus* of dysferlin-deficient mice, *Bull. Exp. Biol. Med.*, **166**, 593–597, doi: 10.1007/s10517-019-04398-z.
- Blaustein, M.P., Chen, L., Hamlyn, J.M., Leenen, F.H., Lingrel, J.B., Wier, W.G., and Zhang, J. (2016) Pivotal role of $\alpha 2$ Na^+ pumps and their high affinity ouabain binding site in cardiovascular health and disease, *J. Physiol.*, **594**, 6079–6103, doi: 10.1113/JP272419.
- Khalaf, F.K., Dube, P., Mohamed, A., Tian, J., Malhotra, D., Haller, S.T., and Kennedy, D.J. (2018) Cardiotonic steroids and the sodium trade balance: new insights into trade-off mechanisms mediated by the Na^+/K^+ -ATPase, *Int. J. Mol. Sci.*, **19**, 2576, doi: 10.3390/ijms19092576.
- Bauer, N., Muller-Ehmsen, J., Kramer, U., Hambarchian, N., Zobel, C., Schwinger, R.H., Neu, H., Kirch, U., Grünbaum, E.G., and Schoner, W. (2005) Ouabain-like compound changes rapidly on physical exercise in humans and dogs: effects of β -blockade and angiotensin-converting enzyme inhibition, *Hypertension*, **45**, 1024–1028, doi: 10.1161/01.HYP.0000165024.47728.f7.
- Radzyukevich, T.L., Lingrel, J.B., and Heiny, J.A. (2009) The cardiac glycoside binding site on the $\text{Na, K-ATPase } \alpha 2$ isoform plays a role in the dynamic regulation of active transport in skeletal muscle, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 2565–2570, doi: 10.1073/pnas.0804150106.
- Gao, J., Wymore, R.S., Wang, Y., Gaudette, G.R., Krukenkamp, I.B., Cohen, I.S., and Mathias, R.T. (2002) Isoform-specific stimulation of cardiac Na/K pumps by nanomolar concentrations of glycosides, *J. Gen. Physiol.*, **119**, 297–312.
- Saunders, R., and Scheiner-Bobis, G. (2004) Ouabain stimulates endothelin release and expression in human

- endothelial cells without inhibiting the sodium pump, *Eur. J. Biochem.*, **271**, 1054–1062, doi: 10.1111/j.1432-1033.2004.04012.x.
17. Holthouser, K.A., Mandal, A., Merchant, M.L., Schelling, J.R., Delamere, N.A., Valdes, R.R. Jr., Tyagi, S.C., Lederer, E.D., and Khundmiri, S.J. (2010) Ouabain stimulates Na-K-ATPase through a sodium/hydrogen exchanger-1 (NHE-1)-dependent mechanism in human kidney proximal tubule cells, *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, **299**, F77–F90, doi: 10.1152/ajprenal.00581.2009.
 18. Ketchum, C.J., Conner, C.D., Murray, R.D., DuPlessis, M., Lederer, E.D., Wilkey, D., Merchant, M., and Khundmiri, S.J. (2016) Low dose ouabain stimulates Na-K ATPase $\alpha 1$ subunit association with angiotensin II type 1 receptor in renal proximal tubule cells, *Biochim. Biophys. Acta*, **1863**, 2624–2636, doi: 10.1016/j.bbamcr.2016.07.008.
 19. Klimanova, E.A., Tverskoi, A.M., Koltsova, S.V., Sidorenko, S.V., Lopina, O.D., Tremblay, J., Hamet, P., Kapilevich, L.V., and Orlov, S.N. (2017) Time- and dose-dependent actions of cardiotonic steroids on transcriptome and intracellular content of Na^+ and K^+ : a comparative analysis, *Sci. Rep.*, **7**, 45403, doi: 10.1038/srep45403.
 20. Vilchinskaya, N.A., Mochalova, E.P., Nemirovskaya, T.L., Mirzoev, T.M., Turtikova, O.V., and Shenkman, B.S. (2017) Rapid decline in MyHC I(β) mRNA expression in rat soleus during hindlimb unloading is associated with AMPK dephosphorylation, *J. Physiol.*, **595**, 7123–7134, doi: 10.1113/JP275184.
 21. Vilchinskaya, N.A., Krivoi, I.I., and Shenkman, B.S. (2018) AMP-activated protein kinase as a key trigger for the disuse-induced skeletal muscle remodeling, *Int. J. Mol. Sci.*, **19**, 3558, doi: 10.3390/ijms19113558.
 22. Chibalin, A.V., Benziiane, B., Zakyrganova, G.F., Kravtsova, V.V., and Krivoi, I.I. (2018) Early endplate remodeling and skeletal muscle signaling events following rat hindlimb suspension, *J. Cell. Physiol.*, **233**, 6329–6336, doi: 10.1002/jcp.26594.
 23. Hardie, D.G., Schaffer, B.E., and Brunet, A. (2016) AMPK: an energy-sensing pathway with multiple inputs and outputs, *Trends Cell Biol.*, **26**, 190–201, doi: 10.1016/j.tcb.2015.10.013.
 24. Ingwersen, M.S., Kristensen, M., Pilegaard, H., Wojtaszewski, J.F., Richter, E.A., and Juel, C. (2011) Na,K-ATPase activity in mouse muscle is regulated by AMPK and PGC-1 α , *J. Membr. Biol.*, **242**, 1–10, doi: 10.1007/s00232-011-9365-7.
 25. Benziiane, B., Bjornholm, M., Pirkmajer, S., Austin, R.L., Kotova, O., Viollet, B., Zierath, J.R., and Chibalin, A.V. (2012) Activation of AMP-activated protein kinase stimulates Na^+ , K^+ -ATPase activity in skeletal muscle cells, *J. Biol. Chem.*, **287**, 23451–23463, doi: 10.1074/jbc.M111.331926.
 26. Cervero, C., Montull, N., Tarabal, O., Piedrafita, L., Esquerda, J.E., and Caldero, J. (2016) Chronic treatment with the AMPK agonist AICAR prevents skeletal muscle pathology but fails to improve clinical outcome in a mouse model of severe spinal muscular atrophy, *Neurotherapeutics*, **13**, 198–216, doi: 10.1007/s13311-015-0399-x.
 27. Morey-Holton, E., Globus, R.K., Kaplansky, A., and Durnova, G. (2005) The hindlimb unloading rat model: literature overview, technique update and comparison with space flight data, *Adv. Space Biol. Med.*, **10**, 7–40.
 28. Petrov, A.M., Kravtsova, V.V., Matchkov, V.V., Vasiliev, A.N., Zefirov, A.L., Chibalin, A.V., Heiny, J.A., and Krivoi, I.I. (2017) Membrane lipid rafts are disturbed in the response of rat skeletal muscle to short-term disuse, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **312**, C627–C637, doi: 10.1152/ajpcell.00365.2016.
 29. Kuntzweiler, T.A., Arguello, J.M., and Lingrel, J.B. (1996) Asp⁸⁰⁴ and Asp⁸⁰⁸ in the transmembrane domain of the Na,K-ATPase α subunit are cation coordinating residues, *J. Biol. Chem.*, **271**, 29682–29687, doi: 10.1074/jbc.271.47.29682.
 30. Reines, A., Peaa, C., and Rodriguez de Lores Arnaiz, G. (2000) Kinetics of Na^+ , K^+ -ATPase inhibition by an endogenous modulator (II-A), *Neurochem. Res.*, **25**, 121–127.
 31. Matyushkin, D.P., Krivoi, I.I., and Drabkina, T.M. (1995) Synaptic feed-backs mediated by potassium ions, *Gen. Physiol. Biophys.*, **14**, 369–381.
 32. Tverskoi, A.M., Sidorenko, S.V., Klimanova, E.A., Akimova, O.A., Smolyaninova, L.V., Lopina, O.D., and Orlov, S.N. (2016) Effects of ouabain on proliferation of human endothelial cells correlate with Na^+ , K^+ -ATPase activity and intracellular ratio of Na^+ and K^+ , *Biochemistry (Moscow)*, **81**, 876–883, doi: 10.1134/S0006297916080083.
 33. Kotova, O., Al-Khalili, L., Talia, S., Hooke, C., Fedorova, O.V., Bagrov, A.Y., and Chibalin, A.V. (2006) Cardiotonic steroids stimulate glycogen synthesis in human skeletal muscle cells via a Src- and ERK1/2-dependent mechanism, *J. Biol. Chem.*, **281**, 20085–20094, doi: 10.1074/jbc.M601577200.
 34. Cherniavsky-Lev, M., Golani, O., Karlsh, S.J., and Garty, H. (2014) Ouabain-induced internalization and lysosomal degradation of the Na^+ / K^+ -ATPase, *J. Biol. Chem.*, **289**, 1049–1059, doi: 10.1074/jbc.M113.517003.
 35. Orlov, S.N., Klimanova, E.A., Tverskoi, A.M., Vladychenskaya, E.A., Smolyaninova, L.V., and Lopina, O.D. (2017) Na^+ , K^+ -dependent and -independent signaling triggered by cardiotonic steroids: facts and artifacts, *Molecules*, **22**, 635, doi: 10.3390/molecules22040635.
 36. Cornelius, F., and Mahmoud, Y.A. (2009) Interaction between cardiotonic steroids and Na,K-ATPase. Effects of pH and ouabain-induced changes in enzyme conformation, *Biochemistry*, **48**, 10056–10065, doi: 10.1021/bi901212r.
 37. Lopachev, A.V., Lopacheva, O.M., Nikiforova, K.A., Filimonov, I.S., Fedorova, T.N., and Akkuratov, E.E. (2018) Comparative action of cardiotonic steroids on intracellular processes in rat cortical neurons, *Biochemistry (Moscow)*, **83**, 140–151, doi: 10.1134/S0006297918020062.
 38. Altamirano, F., Eltit, J.M., Robin, G., Linares, N., Ding, X., Pessah, I.N., Allen, P.D., and López, J.R. (2014) Ca^{2+} influx via the Na^+ / Ca^{2+} exchanger is enhanced in malignant hyperthermia skeletal muscle, *J. Biol. Chem.*, **289**, 19180–19190, doi: 10.1074/jbc.M114.550764.
 39. Vilchinskaya, N.A., Mirzoev, T.M., Lomonosova, Y.N., Kozlovskaya, I.B., and Shenkman, B.S. (2015) Human muscle signaling responses to 3-day head-out dry immersion, *J. Musculoskelet. Neuronal Interact.*, **15**, 286–293.
 40. Rueggsegger, G.N., Savage, J.A., Childs, T.E., Grigsby, K.B., and Booth, F.W. (2017) 5-Aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide prevents fat gain following the cessation of voluntary physical activity, *Exp. Physiol.*, **102**, 1474–1485, doi: 10.1113/EP086335.
 41. Kjobsted, R., Trebak, J.T., Fentz, J., Lantier, L., Viollet, B., Birk, J.B., Schjerling, P., Björnholm, M., Zierath, J.R., and Wojtaszewski, J.F. (2015) Prior AICAR stimulation increases insulin sensitivity in mouse skeletal muscle in an AMPK-dependent manner, *Diabetes*, **64**, 2042–2055, doi: 10.2337/db14-1402.
 42. Meley, D., Bauvy, C., Houben-Weerts, J.H., Dubbelhuis, P.F., Helmond, M.T., Codogno, P., and Meijer, A.J. (2006) AMP-activated protein kinase and the regulation of autophagic proteolysis, *J. Biol. Chem.*, **281**, 34870–34879.

LOW OUABAIN DOSES AND AMP-ACTIVATED PROTEIN KINASE AS SUPPORTING FACTORS FOR SKELETAL MUSCLE ELECTROGENESIS**V. V. Kravtsova¹, N. A. Vilchinskaya², V. L. Rozlomii¹, B. S. Shenkman², and I. I. Krivoi^{1*}**¹ *Department of General Physiology, St. Petersburg State University, 199034 St. Petersburg, Russia; E-mail: iikrivoi@gmail.com*² *Myology Laboratory, Institute of Biomedical Problems, Russian Academy of Sciences, 123007 Moscow, Russia*

Received February 11, 2019

Revised May 24, 2019

Accepted June 7, 2019

Various types of disorders of motor activity are accompanied by steady depolarization of the membrane of skeletal muscle fibers due to the disruption of the functioning of Na,K-ATPase. We first studied the possibility of participating in the maintenance of muscle electrogenesis of endogenous factors directly related to motor activity, i.e., ouabain (a specific ligand of Na,K-ATPase) and AMP-activated protein kinase (a key regulator of muscle metabolism). After 4-day intraperitoneal administration of ouabain (1 µg/kg daily), a hyperpolarization of sarcolemma was registered in isolated rat diaphragm muscles due to an increase in the electrogenic activity of Na,K-ATPase. Hyperpolarization, which develops already after 15 min, is also shown in experiments with the addition of nanomolar concentrations of ouabain into the solution with immersed isolated muscle. An increase in the concentration of external potassium reversed the vector of ouabain action, and only membrane depolarization was observed. Specific subcellular localization, the presence of certain molecular partners, as well as a change in the ionic balance are considered as possible factors for the realization of the activation of Na,K-ATPase by ouabain. In experiments with 7-day preventive AICAR (an activator of AMP-activated protein kinase, 400 mg/kg daily) administration, the stabilization of the endplate structure and the absence of depolarization of rat *m. soleus* membrane caused by cessation of motor activity have been shown. The obtained facts can be useful for searching for new ways to correct muscle dysfunction, including early stages, prior to the development of severe atrophy.

Keywords: skeletal muscle, motor activity, ouabain, Na,K-ATPase, AMP-activated protein kinase