

МИОСТАТИН И НЕКОТОРЫЕ ДРУГИЕ БИОХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ, РЕГУЛИРУЮЩИЕ РОСТ МЫШЕЧНЫХ ТКАНЕЙ У ЧЕЛОВЕКА И РЯДА ВЫСШИХ ПОЗВОНОЧНЫХ

© 2004 г.

С. С. ШИШКИН

Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН

I. Введение. II. Особенности строения и биосинтеза миостатина. III. Молекулярные основы биологических эффектов миостатина и его взаимоотношения с некоторыми другими факторами, регулирующими рост мышечных тканей. IV. Участие миостатина в процессах дифференцировки мышечных клеток и миогенеза, взаимодействие с другими регуляторными факторами. V. Биохимическая изменчивость и генетический полиморфизм миостатина, а также некоторых других факторов, регулирующих рост мышечных тканей. VI. Пути биомедицинского использования некоторых биохимических факторов, регулирующих рост мышечных тканей. VII. Заключение.

I. ВВЕДЕНИЕ

Изучение биохимических основ выраженного полиморфизма по росту-весовым признакам, который характерен для человека и многих видов высших позвоночных, уже более столетия привлекает вни-

Принятые сокращения: МСТН — миостатин; СК — сателлитные клетки; МБ — миобласты, а.о. — аминокислотный остаток, Мм — молекулярная масса; ГР — гормон роста; РГР — рецептор гормона роста; ГРСБ — белок, связывающий гормон роста; ИФР — инсулиноподобные факторы роста; ИФРСБ — белки, связывающие ИФР; МАР — митоген-активируемые протеинкиназы; ФСГ — фолликулостимулирующий гормон; ФСТН — фоллистатин; ФРФ — факторы роста фибробластов; ТФ — транскрипционные факторы; ЦНС — центральная нервная система; РИА — радиоиммунный анализ; TGF- β — семейство трансформирующих ростовых β -факторов; ActR β и ActR β — трансмембранные рецепторы активина; kb — килобазы; IRS — белки-субстраты рецептора инсулина; ELISA — твердофазный иммуноферментный анализ; Smad — семейство белков, обеспечивающих реализацию сигнала от трансформирующих ростовых β -факторов.

Адрес для корреспонденции: shishkin@inbi.ras.ru

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 02-04-48879 и договора «Фундаментальные исследования молекулярных механизмов рабочей гипертрофии мышц» (№ 14-04/03).

мание многих исследователей. В результате были существенно расширены представления о механизмах молекулярного контроля за процессами онтогенеза, открыты многие гормоны и их рецепторы, выявлены специальные ростовые факторы, влияющие на пролиферативную активность различных клеток, и т.д. [4, 93, 118, 123, 124, 184]. Более того, эти достижения фундаментальной науки стали основой для ряда прикладных разработок, активно использующихся современной медициной (например, для диагностики и лечения гипофизарной низкорослости) [4, 25, 70, 124, 132, 168].

Даже на таком фоне обнаружение в 1997 г. нового регуляторного фактора — миостатина (МСТН) [60, 104, 106], вызвало значительный всплеск интереса к проблеме. Уже в первых работах было установлено, что миостатин обладает рядом необычных свойств и ингибирует развитие мышечных тканей у высших позвоночных. При этом особенно важным представляется то, что блокирование пути от гена миостатина к его продукту и далее к мышечным клеткам — мишеням, имеющим соответствующий трансмембранный рецептор, сопровождается выраженными позитивными эффектами на метаболизм этих клеток скелетной мускулатуры. Например, мутации в миостатиновом гене могут приводить к двукратному увеличению массы мышц у особей, относящихся к разным видам [60, 104, 106]. С другой стороны, некоторые исследования выявили вовлеченность МСТН в процессы старения, а также в возникновение кахексии, развивающейся при СПИДе и других патологических состояниях [56, 82, 182].

За прошедшие 5 лет появилось более сотни публикаций, в которых проведено детальное изучение как самого миостатина, его гена и механизмов, обеспечивающих биологическую активность этого фактора, так и возможностей использования обнаруженного феномена в различных биомедицинских целях [42, 92, 95, 116], включая космическую биологию [90, 193] и спортивную медицину [142].

Хорошо известно, что мышечные ткани — одна из основных составляющих тела человека (и других высших позвоночных). По существующим оценкам на эти ткани приходится до 40% веса тела и в них происходит весьма значительный обмен белков — около 25% общего белкового обмена [188]. Мышечные ткани обладают рядом биохимических особенностей, настолько существенных, что их изучение стало предметом специальной дисциплины — биохимии мышц. Разнообразные мышечные ткани человека формируют скелетные мышцы, которые обеспечивают работу опорно-двигательного аппарата, составляют основу ряда органов (сердце, мочевого пузыря, матка), образуют оболочки крупных сосудов, входят в стенки кишечника, бронхов и др. Обладая принципиально важным общим свойством —

сократимостью, которое обеспечивается специальными сократительными белками, мышечные ткани имеют значительные морфологические и биохимические различия, проявляющиеся, например, характерным спектром экспрессирующихся генов, что отражается в виде набора специфических изоформ белков [8, 86, 151, 188]. На основе морфо-биохимических особенностей мышечные ткани подразделяют на две большие группы, в одну из которых включают так называемые гладкие мышцы, содержащие типичные одноядерные клетки, обладающие сократимостью и набором соответствующих мышечных белков. Другая группа представлена мышцами, состоящими из особых многоядерных структур — волокон, гистологически характеризующихся специфичной поперечно-полосатой исчерченностью. Поперечно-полосатыми являются скелетные мышцы человека и высших позвоночных. К данной группе относится также сердечная мышца, которая, в отличие от произвольных скелетных мышц, функционирует непроизвольно, т.е. независимо от воли человека.

Наряду с многоядерными волокнами, в поперечно-полосатых мышцах присутствует небольшое количество одноядерных клеток (рис. 1, см. стр. 249), среди которых имеются клетки, дифференцированные по мышечному типу. Такие клетки обычно называют сателлитными (СК) [5, 10]. СК расценивают как стволовые клетки, поскольку основное время своей жизни они находятся в покое, но активируются и вступают в клеточный цикл после повреждения мышечной ткани [69, 89, 175]. Установлено, что делящиеся потомки СК способны участвовать в формировании новых мышечных волокон и образовывать клеточные культуры при выращивании их *in vitro* [5, 10, 11, 89, 175]. Такие одноядерные мышечные клетки чаще всего обозначают термином миобласты (МБ).

МБ активно используются в различных медико-биологических исследованиях, и, в частности, они оказались удобной моделью для изучения процессов дифференцировки, поскольку при определенных условиях культивирования в МБ меняется спектр экспрессирующихся генов, появляются новые специфичные для мышечных тканей белки и, наконец, эти клетки сливаются в многоядерные образования — миотубы [11, 69, 175].

Недавно полученные результаты свидетельствуют о том, что в мышцах взрослых особей существует, как минимум, две популяции стволовых клеток, одна из которых представлена типичными СК, а другую составляют так называемые мультипотентные стволовые клетки [152].

В поперечно-полосатых мышцах имеется разветвленная сеть капилляров и различные соединительно-тканые образования, кото-

рые играют важную роль в поддержании метаболических процессов и функционировании этих мышц [69, 128]. Как следствие, в таких мышечных тканях наряду с клетками (многоядерными и одноядерными), находящимися на разных стадиях дифференцировки по мышечному типу, присутствует целый ряд одноядерных клеток с другими типами дифференцировки — фибробласты, адипоциты и др. (см. рис. 1). Все это разнообразие клеточных форм является мишенями для регуляторных влияний.

Установлено, что и само возникновение поперечно-полосатых мышц на ранних стадиях онтогенеза, и их дальнейшее развитие являются следствием многих молекулярных процессов, протекающих не только в самих мышечных клетках, но и в других тканях и органах организма [3, 8, 124, 148, 151]. Эти процессы обеспечиваются рядом особых гормонов и ростовых факторов, в число которых входит и недавно открытый миостатин [60, 92, 95, 104].

По имеющимся данным, у человека и высших позвоночных МСТН является тканеспецифичным белком, который синтезируется в скелетных мышцах и именно на этих мышцах проявляются его биологические эффекты [52, 56, 85, 104]. В настоящем обзоре основное внимание будет уделено рассмотрению роли миостатина в регуляции роста скелетных мышц, а также некоторым другим биохимическим факторам, вовлеченным в сложные процессы развития и функционирования скелетной мускулатуры у человека и высших позвоночных.

II. ОСОБЕННОСТИ СТРОЕНИЯ И БИОСИНТЕЗА МИОСТАТИНА

Открытие миостатина стало логическим следствием бурного развития молекулярно-генетических методов и фактически совпало с началом формирования нового фронта исследований — функциональной геномики. Во второй половине 90-х годов А.С.МакФеррон с соавт. из Университета Джона Гопкинса, США, предприняли поиск в геноме мышцы новых генов, которые способны кодировать белки, относящиеся к одному из наиболее важных семейств ростовых факторов, так называемых transforming growth factor β -family (TGF- β) [104, 106]. Для этой цели были использованы полимеразная цепная реакция с праймерами, которыми стали олигонуклеотиды, комплементарные определенным консервативным участкам в последовательностях известных ростовых факторов данного семейства, а также ряд других молекулярно-генетических методов. Далее продукты амплификации (длиной около 280 нуклеотидов) были использованы как зонды для скрининга кДНК библиотеки мышечной ткани мыши,

в результате чего удалось выявить ДНК-клон, содержащий открытую рамку считывания для последовательности в 376 аминокислот. Анализ обнаруженной последовательности показал, что она обладает рядом особенностей, характерных для семейства TGF- β . В частности, было предсказано наличие: а) в N-концевой части молекулы относительно короткой сигнальной последовательности, необходимой для секреции фактора из клетки в кровотоки; б) особого внутримолекулярного сайта для процессинга этого белка с помощью ограниченного протеолиза (RXXR – 263–266 аминокислотные остатки); в) специфичного паттерна из девяти остатков цистеина, которые располагаются в C-концевой части молекулы.

Сравнительное сопоставление предполагаемой аминокислотной последовательности с последовательностями 25 ранее известных факторов из семейства TGF- β показало достаточно высокую степень гомологии в C-концевой области, особенно с белками морфогенеза костей (bone morphogenetic proteins, BMPs), ингибинами и белками, обозначаемыми TGF β s. При этом наибольшая гомология была с фактором Vgr-1 (BMP-6), у которого 45% аминокислотной последовательности C-концевой области оказалось идентичной с новым фактором. Таким образом, авторы вполне обоснованно стали рассматривать обнаруженную ими кДНК-последовательность, как продукт гена, кодирующего новый белок из TGF- β семейства и назвали предсказанный продукт фактором TGF-8 [104, 106].

Годом позднее Гонзалез-Кадавид с соавт. [56] определили длину белкового продукта соответствующего человеческого гена в 375 аминокислотных остатков и установили его полную аминокислотную последовательность. Эта последовательность, имеющаяся в американском компьютерном банке данных об аминокислотных последовательностях белков (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=Protein>, локус NP005250, запись O14793), приведена в табл. 1 с некоторыми предсказанными характеристиками и комментариями.

Кроме того, уже в пионерской работе А. МакФеррон с соавт. [105] с помощью иммуноблоттинга было продемонстрировано, что в культивируемых клетках, полученных из яичников китайского хомячка (Chinese hamster ovary, CHO) и трансфецированных кДНК TGF-8, фактор существует в двух формах – в виде полноразмерной цепи (Мм 52 кДа) и C-концевой части молекулы (Мм 15 кДа); обе эти формы образуют димеры, что является типичным для белков семейства TGF- β . При этом изучение геномной ДНК ряда видов высших позвоночных, включая человека, показало, что ген TGF-8 присутствует в геномах всех исследованных млекопитающих, а также у птиц [104, 106]. Параллельно было обнаружено наличие еще одного гомологич-

Таблица 1
**Аминокислотная последовательность предшественника TGF-8
 (препромиостатина) человека и ее некоторые структурные
 особенности [56 и по www.ncbi.nlm.nih.gov. запись O14793]**

№№	Аминокислотные остатки	№№
1	<i>MQKLQLCVYI YLFMLIVAGP VDLNENSEQK ENVEKEGLCN ACTWRQNTKS</i>	50
51	<i>SRIEAIIQI LSKLRLETAP NISKDVIRQL LPKAPPLREL IDQYDVQRDD</i>	100
101	<i>SSDGSLEDDDD YHATTETIIT MPTESDFLMQ VDGKPKCCFF KFSSKIQYNK</i>	150
151	<i>VVKAQLWIYL RPVETPTTVF VQILRLIKPM KDTRYTGIR SLKLDMPGT</i>	200
201	<i>GIWQSIDVKT VLQNWLKQPE SNLGIEIKAL DENGHDLAFT FPGPGEDGLN</i>	250
251	<i>PFLEVKVTDI PKRSRRDFGL DCDENSTESR ĆCRYPLTVDF EAFGWDWIIA</i>	300
301	<i>PKRYKANYĆS GEĆEFVFLQK YPHTHLVHQA NPRGSAGPĆĆ TPTKMSPINM</i>	350
351	<i>LYFNGKEQII YGKIPAMVVD RĆGĆS</i>	375

Примечания:

— курсивом показана последовательность сигнального пептида (1–23 а.о.), далее следует последовательность пропептида (до 266 а.о.), отделяющегося при протеолитическом процессинге (специальным шрифтом выделены сайт гликозилирования [Asn71] и сайт протеолитического процессинга (RXXR — 263–266 а.о.));

— жирным шрифтом показана последовательность созревшей (процессированной) молекулы;

* — консервативный паттерн из цистеиновых остатков в С-концевом домене молекулы: внутрицепочечные S–S-связи — 281–340; 309–372; 313–374; Cys339 — участвует в образовании межцепочечной S–S-связи.

ного гена, который позднее идентифицировали как ген фактора TGF-11 [105, 131].

Для дальнейшего изучения особенностей гена TGF-8 у разных видов позвоночных были сконструированы кДНК-библиотеки на основе РНК, выделенных из соответствующих мышечных тканей [56, 95]. Полученные ДНК-библиотеки скринировались с помощью ДНК-пробы, содержащей фрагмент гена TGF-8 мыши, соответствующий консервативному С-концевому домену — для ряда белков семейства TGF-β установлено, что именно эта область важна для их функции. По отобранным клонам, содержащим полноразмерные кДНК, были предсказаны аминокислотные последовательности миостатинов разных видов: человека, обезьяны (бабуина), мыши, крысы, коровы, овцы, курицы, индейки и рыбы (zebrafish). Оказалось, что у всех этих видов структура TGF-8 отличается высоким подобием, включая отмеченные выше особенности, характерные для всех белков семейства TGF-β. У человека, крысы, свиньи и некоторых других видов

С-концевая область оказалась практически идентичной, а у обезьяны, быка и овцы в ней было найдено только три аминокислотных замены.

Однако наибольший интерес и внимание вызвали результаты экспериментов, направленных на выяснение функциональной роли TGF-8 [104, 105, 106]. Сначала конструирование мышечных мутантов по гену TGF-8 показало, что такие животные по сравнению с обычными достигают существенно большего веса тела (135%). При этом увеличение веса обеспечивалось практически за счет мышечной массы и вес некоторых мышц у гомозигот -/- более чем в 2 раза превышал вес аналогичных мышц у контрольных животных. Поперечное сечение миофибрилл у мышечных мутантов оказалось значительно большим, чем у мышечных дикого типа (C57Bl), что указывало на развитие мышечной гипертрофии. В итоге авторы пришли к заключению о том, что TGF-8 каким-то образом подавляет рост скелетных мышц, и предложили называть этот фактор миостатином (MSTN или MCTN).

Совсем сенсационными стали результаты исследований структуры миостатинового гена у пород коров, отличающихся особенно выраженным развитием мышечной системы. Особи с таким фенотипом («Double muscling») были описаны еще в XIX веке и к настоящему времени хорошо охарактеризованы как специальные породы, например, Belgian Blue, Piedmontese и Asturiana de los Valles (по [85]). Мышечная масса этих животных уже при рождении несколько выше, чем у телят других пород, а вес жировой ткани и костей в процентном отношении снижен [14]. Для взрослых особей с «Double muscling» фенотипом наблюдается ярко выраженное усиление развития скелетной мускулатуры (в среднем на 20% больше, чем у животных других пород), которое обеспечивается в основном за счет гиперплазии — повышенного количества мышечных волокон [60, 85, 106].

При анализе гена MCTN у Belgian Blue была обнаружена делеция в экзоне 3, охватывающая 11 нуклеотидов (позиции 937–947) и вызывающая сдвиг рамки считывания в функционально важной области, кодирующей зрелый миостатин. Более того, у этих коров делеция оказалась в гомозиготном состоянии, то есть они являлись фактически нуль-мутациями по гену миостатина, не способными к синтезу миостатина.

У Piedmontese в гене MCTN присутствовали две миссенс мутации, одна из которых (C → A) ведет к замене лейцина на фенилаланин в положении 94, то есть в структуре пробелка, и, по-видимому, это не оказывает существенного влияния на функцию зрелого миостатина. В то же время другая мутация (G → A) приводит к замещению принципиально важного цистеина в положении 313 на тирозин. В результате в измененном продукте не может образовываться 313–374 S–S-связь,

что приводит к инактивации данного белка. Piedmontese обладали гомозиготностью по данной мутации, и, соответственно, такие животные были тоже нуль-мутантами по гену MSTN.

Параллельно проведенный анализ ДНК 120 коров разных пород с обычным развитием скелетной мускулатуры не выявил ни одного случая с мутацией 313Cys → Tug, и только у одного животного при нормальной мышечной массе оказалась 11-нуклеотидная делеция в гетерозиготном состоянии.

В течение 3–4-х последующих лет появился целый ряд публикаций о картировании и расшифровке тонкой структуры гена миостатина человека, а также данные о полной нуклеотидной последовательности соответствующей мРНК, новые сведения о строении зрелого внутриклеточного MSTN, о его процессировании, секреции в кровоток и об особенностях циркулирующего в кровотоке этого ростового фактора [56, 67, 72, 92, 97, 116, 157, 193].

Первые усилия по картированию гена, ответственного за «Double muscling» фенотип у коров, были предприняты еще до открытия MSTN и привели к определению участка его предположительной локализации на хромосоме 2 в геноме коров [29]. Затем уже в 1998 г. в геноме человека на специально построенной генетической карте области 2q32.2 Гонзалес-Кадавилья с соавт. [56] с использованием панели радиационных гибридов соматических клеток картировали ген миостатина (символы MSTN и GDF8, OMIM № 601788). В той же работе было показано, что ген MSTN человека занимает участок около 8 kb и имеет структуру весьма сходную со структурами других ростовых факторов семейства TGF- β .

В гене MSTN оказалось 3 экзона, первый из которых содержит нетранслируемый участок и N-концевую последовательность из 124 аминокислот. Далее, между кодирующими нуклеотидами 372 и 373 находится интрон 1 размером в 1789 bp, после которого начинается второй экзон, кодирующий 125 аминокислот. Затем за нуклеотидом 747 располагается интрон 2, занимающий 2,4 kb, и, наконец, следует третий экзон, транслируемая часть которого содержит информацию о 126 аминокислотах и завершается стоп-кодоном (UGA), а нетранслируемая часть простирается до области полиаденилирования.

Наряду с геном MSTN человека детально изучен соответствующий ген коров, структура которого, в целом, оказалась весьма близкой [28, 76].

Образующаяся при транскрипции гена MSTN мРНК первоначально оценивалась размером в 3,1 kb [56], а затем, когда ее полностью секвенировали, в ней было выявлено 2823 нуклеотида (по <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> – запись AF104922).

Детальный анализ мРНК из скелетных мышц человека выявил наличие трех транскриптов, различающихся по длине 5'-нетранслируемой области, что позволило сделать заключение о существовании, как минимум, трех сайтов инициации транскрипции в гене MSTN (-76, -116 и -166) [56].

Результаты изучения структуры мРНК МСТН и строения образующихся белковых продуктов вполне согласуются и подтверждают предсказанные ранее особенности первичной структуры этого фактора [56, 104].

Уже в первых исследованиях для анализа процессинга миостатина были получены два типа антител: первый — к эпитопу в N-концевой части миостатина, для чего сначала синтезировали пептид из 16 аминокислот, соответствующий фрагменту последовательности с 133 по 149 аминокислотный остаток (а.о.), и затем использовали его в качестве антигена. Аналогичным способом создавался второй тип антител против эпитопа в С-концевой части МСТН (349—365 а.о.). С помощью таких и аналогичных антител методом Вестерн-блоттинга удалось показать, что в скелетных мышцах присутствуют белок 52 кДа, соответствующий димеру миостатинового пропептида (26 кДа × 2), и белок 26 кДа, представляющий собой димер зрелого МСТН (12,5 кДа × 2) [56, 104, 161, 179]. Таким образом, в ходе посттрансляционных модификаций (ограниченный протеолиз и гликозилирование) формируется зрелый гликопротеид 26 кДа, который иммунохимически и иммуногистохимически определяется в миофибриллах [56, 104, 147, 179]. Имеются косвенные указания на то, что посттрансляционный процессинг промиостатина обеспечивает пока неидентифицированная металлопротеиназа, действие которой блокируют специфические ингибиторы из группы HIMP (hydroxamate-based inhibitors of metalloproteinases) [72].

Установлено также, что зрелый МСТН секретируется в межклеточную среду и затем оказывается в плазме крови, где тестируется как myostatin-immunoreactive protein [56, 67]. По имеющимся данным, основная часть циркулирующего в крови МСТН входит в состав особого белкового олигомерного комплекса (-ов), где, кроме зрелого МСТН, присутствуют пропептид из 243 аминокислотных остатков (продукт процессинга промиостатина), фоллистатин и/или фоллистатин-родственные белки [56, 67]. При этом реализацию своих биологических эффектов внеклеточный МСТН (подобно другим пептидным гормонам) осуществляет через взаимодействие со специальным трансмембранным рецептором, имеющимся в саркомере мышечных клеток, и благодаря возникающему вслед за этим каскаду

целенаправленных внутриклеточных биохимических процессов [52, 95]. Подробнее эти вопросы будут рассмотрены в разделе III.

Схематически строение гена MSTN и основные особенности его экспрессии представлены на рис. 2 (см. стр. 250).

Одним из важнейших аспектов экспрессии гена миостатина стали исследования ее тканеспецифичности. Так, А.С.МакФеррон с соавт. и другие исследователи с помощью нозерн-блот-анализа показали, что у мышей, человека и некоторых других млекопитающих соответствующая мРНК образуется только в скелетных мышцах и не детектируется ни в сердечной мышце, ни в образцах ряда органов, содержащих гладкомышечные клетки, среди которых матка, мочевой пузырь, желудок, тонкая и толстая кишка [56, 104]. Эти данные о строгой тканеспецифичности биосинтеза MSTN соответствовали и результатам различных иммунохимических исследований.

Позднее возникли некоторые противоречия. В 1999 г. Шарма и соавт. [154] сообщили об обнаружении экспрессии гена MSTN в сердце коровы (и в кардиомиоцитах, и в волокнах Пуркинье), а чуть раньше Джи и соавт. [77] представили данные о том, что у свиней этот ген работает не только в скелетных мышцах, но и в жировой ткани, а также в клетках лактирующих молочных желез. В 2003 г. появилось сообщение о том, что у рыб предшественник миостатина иммунохимическими методами детектируется не только в мышцах, но и в ряде других тканей (мозге, сетчатке, коже и т.д.) [131]. В связи с этим, вероятно, потребуется еще немало усилий, чтобы в деталях охарактеризовать вопрос о тканеспецифичности миостатиновой экспрессии у человека и других видов позвоночных.

III. МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ОСНОВЫ БИОЛОГИЧЕСКИХ ЭФФЕКТОВ МИОСТАТИНА И ЕГО ВЗАИМООТНОШЕНИЯ С НЕКОТОРЫМИ ДРУГИМИ ФАКТОРАМИ, РЕГУЛИРУЮЩИМИ РОСТ МЫШЕЧНЫХ ТКАНЕЙ

Как отмечалось ранее, особый интерес к миостатину возник в связи с тем, что уже в самых первых публикациях, посвященных этому фактору, был сделан вывод о том, что MSTN каким-то способом подавляет развитие скелетной мускулатуры, поскольку в его отсутствие наблюдается увеличение мышечной массы за счет гипертрофии и гиперплазии мышечных волокон [56, 60, 95, 104]. В последующем Цу и соавт. [194] отметили, что при определенных условиях блокирование действия MSTN приводит только к гипертрофии, но не вызывает гиперплазию мышц, тогда как другие авторы сообщили о

миссенс-мутации в гене MSTN, сопровождающейся гиперплазией мышц мыши при отсутствии признаков гипертрофии [116]. По всей вероятности, эти материалы не столько противоречат друг другу, сколько указывают на сложность и многообразие механизмов, обеспечивающих влияние МСТН на скелетную мускулатуру.

Важно отметить, что по имеющимся данным при блокировании действия МСТН наблюдается не только увеличение мышечной массы, но и повышение силовых характеристик скелетных мышц [21, 142, 161].

С другой стороны, при изучении биологических эффектов МСТН была выявлена корреляция между его высокой продукцией и дистрофическими изменениями скелетной мускулатуры (вплоть до кахексии) [56, 191, 193, 195]. Эти результаты вполне соответствовали данным, полученным в опытах на моделях, в частности, на клеточных культурах, где удалось продемонстрировать ингибирование пролиферативной активности миобластов после внесения МСТН в культуральную среду [160]. Более того, было установлено (и для человека, и для многих высших млекопитающих), что миостатин тормозит синтез сократительных и других мышечных белков, в результате чего замедляется формирование скелетных мышц или возникает истощение (кахексия). Вследствие этого появилась гипотеза о том, что по принципу обратной связи МСТН, продуцируемый мышцами, играет роль специфического физиологического регулятора их роста [85].

Иными словами, МСТН был охарактеризован как один из важных факторов в поддержании равновесия сложных биохимических процессов, которые обеспечивают белковый обмен и связанные с ним процессы формирования скелетных мышц (гипертрофия и гиперплазия в онтогенезе) [52, 82, 107, 116, 161, 194].

С учетом особенностей структуры МСТН и его гена, которые предопределили включение данного фактора в семейство TGF- β , появились предположения о том, что некоторые рецепторы, обеспечивающие работу других TGF-факторов, могут передавать внутрь клетки и миостатиновый сигнал [95].

В 90-е годы было показано, что функционирование многих членов семейства TGF- β включает связывание с трансмембранными рецепторами, которые обладают серин/треонин-протеинкиназной активностью и вызывают фосфорилирование определенных, так называемых Smad белков, после чего запускается каскад реакций, специфически изменяющих, в конце концов, характер генной экспрессии (рис. 3, см. стр. 251) [65, 101]. Символом Smad (по аналогии с используемыми названиями для родственных генов у *Drosophila* — *Mad* (*mothers against decapentaplegic*) и у *Caenorhabditis elegans* — *Sma*) в геномах человека и других позвоночных обозначаются функцио-

нально разные участники этого особого пути внутриклеточной передачи сигнала (Smad-сигналинг). Во-первых, сюда относят пять так называемых R-Smad (Smad 1, 2, 3, 5 и 8), которые рассматриваются как рецептор-специфичные субстраты для фосфорилирования, вызываемого цитоплазматическими доменами соответствующих рецепторов семейства TGF- β . Во-вторых, это Smad 4, являющийся общим партнером для подгруппы R-Smad, поскольку он способен образовывать комплексы с отдельными R-Smad и обеспечивает их транспорт в клеточное ядро. В-третьих, в данную группу включают Smad 6 и 7 — ингибиторы фосфорилирования и внутриклеточной передачи сигнала от рецепторов семейства TGF- β [17, 74, 125].

В структуре R-Smad выделяют два домена, связанных линкерной последовательностью, один из которых (MH2) содержит сайт для фосфорилирования, а другой (MH1) участвует в связывании со Smad 4 и другими факторами, способными модулировать его эффекты [125]. MH1 обеспечивает также взаимодействие комплекса с ДНК (регуляторными участками соответствующих генов). К настоящему времени обнаружен еще целый ряд мембранных и цитозольных белков, а также транскрипционных факторов, принимающих как непосредственное участие в Smad-сигналинге, так и связывающих этот каскад реакций с другими подобными процессами, в частности с MAP-сигналингом (см. рис. 3) [17, 52, 74].

Для проверки предположения о существовании подобного механизма для МСТН и с целью выявления рецепторов, способных узнавать данный фактор и обеспечивать передачу его сигнала внутрь клетки, была проведена большая работа с использованием самых различных подходов — от создания трансгенных животных с нарушениями в функционировании определенных молекул-мишеней, до прямого анализа связывания МСТН с предполагаемым рецептором в условиях конкуренции с другими факторами — антагонистами миостатина [95].

Первым этапом в этих поисках стали эксперименты с культивируемыми клетками (COS-7), которые трансфецировали векторами, несущими полноразмерные последовательности, кодирующие различные рецепторы для факторов семейства TGF- β , а именно: TGF- β RII, BMP- β RII (для факторов BMP — Bone Morphogenetic Proteins), ActRIIA и ActRIIB. Оказалось, что только клетки, экспрессирующие ActRIIB, способны эффективно и специфически связывать рекомбинантный меченый ^{125}I МСТН [95]. При этом заметно меньшее сродство данного лиганда наблюдалось к рецептору ActRIIA, а с остальными рецепторами связывания не регистрировалось. Соответственно, дальнейшие исследования сконцентрировались на изучении ActRIIB и ActRIIA.

ActRIIB и ActRIIA ранее были охарактеризованы как рецепторы, работающие с особой группой факторов, относящихся к суперсемейству TGF- β , — активинами и ингибинами, близкими по структуре белками, участвующими в различных видах клеточной дифференцировки и, в частности, при эритропоэзе [58, 99, 159, 167, 183]. По имеющимся данным, ActRIIB и ActRIIA представляют собой типичные одноцепочечные трансмембранные рецепторы, в структуре которых выделяют экстраклеточный домен, один трансмембранный участок и цитоплазматический домен, обладающий серин/треонин-протеинкиназной активностью [58, 187]. В экстраклеточном домене этих рецепторов выявлены участки последовательности, ответственные за связывание активина и ингибина, в которых идентифицированы три критические гидрофобные циклические аминокислоты (Phe42, Trp60, Phe83) — их замены ведут к потере функции [58]. Для связывания с лигандами ActRIIB формируют гомодимеры, после чего взаимодействуют с еще одним мембранным белком — активиновым рецептором тип I, обозначаемым ActRIB или ALK4 (activin receptor-like kinase 4) [24]. Далее, протеинкиназный домен ActRIIB осуществляет фосфорилирование цитоплазматического домена ActRIB, который в свою очередь фосфорилирует Smad 2 и Smad 3. После этого комплексы из этих белков и Smad 4 транспортируются в клеточное ядро и активируют экспрессию ряда различных генов (см. рис. 3) [24, 48, 58].

Активины были открыты в конце 80-х годов по их способности активировать секрецию фолликулостимулирующего гормона, что и стало основанием для нескольких вариантов их названия (табл. 2) [73, 187, 166]. Подобно МСТН и другим членам семейства TGF- β активины синтезируются в виде высокомолекулярных предшественников, в составе которых имеются сигнальная последовательность, гликозилируемый пропептидный домен и С-концевая последовательность, содержащая особый мотив, богатый цистеиновыми остатками и получивший название «цистеиновый узел» (cysteine-knot). Активины приобретают функциональную активность только после соответствующего процессинга и формирования димерной молекулы с молекулярной массой около 28 кДа. Выполненные в последние годы многочисленные исследования структурных и функциональных свойств активина убедительно показали, что эти регуляторные факторы участвуют в обеспечении различных молекулярных процессов у позвоночных, хотя ряд вопросов еще далеко не ясен [17, 184].

Параллельно, наряду с активинами, интенсивно изучаются очень близкие к ним по структуре факторы — ингибины (димеры с молекулярной массой около 32 кДа), которые способны подавлять секрецию фолликулостимулирующего гормона (ФСГ) [17, 159, 166, 184]. Хотя

Таблица 2
Аминокислотная последовательность фоллистатина человека (FST344) и ее некоторые структурные особенности
 (по [176] и www.Ncbi.nlm.nih.gov запись NP_037541)

Домен	Аминокислотная последовательность
Сигнальная последовательность, 29 а.о.	<i>mvrrarhpggg lclllllllcq fmedrsaga</i>
N-концевой, 1–63 а.о.	<i>g ncwlrqakng rcqvlyktel skeeccstgr lstswteedv ndntlfkwimifnggapncip ck</i>
Фоллистатиновый 1, 64–136 а.о.	<i>etCenvdC gpgkkCrmnk knkprCvcap dCsnitwkgp vCgldgktyr neCallkarc keqpelevqy qgrck</i>
Фоллистатиновый 2, 137–211 а.о.	<i>ktCrd vfcpgsstcv vdtqnnaycv tCnricpepa sseqylCgnd gvtysachl rkatCllgrs iglayegkCi</i>
Фоллистатиновый 3, 212–288 а.о.	<i>kakscediqc tggkkclwdf kvgrgrCslc delcpdsksd epvCasdnat yaseCamkea aCsgvlllev khsgscn</i>
C-концевой, 289–315 а.о.	<i>sis edteeeeede dgdysfpiss ilew</i>

Примечания:

— курсивом показана последовательность сигнального пептида из 29 а.о.; специальным шрифтом выделены цистеиновые остатки в фоллистатиновых доменах, образующие характерные паттерны из 10 С;

— жирным шрифтом обозначены активин-связывающие участки в N-концевом домене (3–26 а.о. и 46–59 а.о.), а также гепарин-связывающий мотив в фоллистатиновом домене 1.

первые упоминания о белковом факторе, ингибирующем секрецию ФСГ относятся к 30-м годам XX века, только к настоящему времени у ингибинов и активинов удалось выявить многочисленные функции, связанные с их действием на клетки гонад, гипофиза, гипоталамуса и некоторых других органов и тканей [17, 184]. При этом по результатам связывания рекомбинантных ингибинов и активинов, меченных ¹²⁵I, их главной мишенью в организме позвоночных является печень [99, 159, 167, 183, 186]. Более того, оказалось, что активины и ингибины имеют отношение к самым разным физиологическим и патологическим процессам — от апоптоза до воспаления и канцерогенеза [17, 30, 88, 183, 184]. Хотя соответствующие исследования и ведутся широким фронтом, многое в динамической биохимии активинов и ингибинов остается пока недостаточно ясным.

Важно отметить, что существуют указания о возможности некоторого влияния активинов и ингибинов на рост мышечных тканей. Так, например, показано, что активин А вовлечен в процессы дифференцировки миобластов [192], а у ингибин-дефицитных мышей развивается кахексия [34]. Однако, несмотря на то, что по имеющимся данным активины и МСТН взаимодействуют с одними и теми же

рецепторами, физиологические эффекты этих ростовых факторов явно различны. Следовательно, можно предполагать существование либо особых модуляторов, обеспечивающих специфичность сигналинга от МСТН и активинов (по аналогии с модуляторами андрогенных рецепторов [80, 81, 120]), либо неидентифицированных пока особых специфичных рецепторов МСТН.

Исследования структуры активинов принесли неожиданный результат. Было установлено, что активины представляют собой молекулы, состоящие из двух ингибиновых β -субъединиц (βA и βB), связанных дисульфидными связями. И это несмотря на то, что активины и ингибины по функциям — антагонисты. Так, активин А и активин В оказались гомодимерами с составами $\beta A\beta A$ и $\beta B\beta B$, соответственно, а активин АВ — $\beta A\beta B$ гетеродимером [167, 183]. В отличие от активинов ингибины, наряду с одной из β -субъединиц, содержали α -субъединицу и обладали составом $\alpha\beta A$ (ингибин А) или $\alpha\beta B$ (ингибин В). В геноме человека кодирование каждого вида ингибиновых субъединиц осуществляется специальными генами (см. табл. 2), интенсивное изучение которых продолжается [159]. Важно отметить, что сравнительно недавно у млекопитающих было обнаружено еще два родственных гена, которые кодируют β -субъединицы, названные С и Е, соответственно, а у *Xenopus laevis* выявлен ген βD -субъединицы [17]. Таким образом, по-видимому, можно ожидать увеличения количества регуляторных факторов, родственных активинам и ингибинам.

Наряду с этим, исследования рецепторов активинов и ингибинов, а также механизмов соответствующего сигналинга остаются в настоящее время «горячей областью» с целым рядом нерешенных вопросов [17, 184]. В частности, нет окончательного заключения о главном рецепторе для ингибинов. Установлено, что ингибин А может связываться с ActRIIB. Однако это взаимодействие по сравнению с активинами отличается очень низким сродством.

В 2000 г. появилось сообщение об обнаружении нового трансмембранного белка, способного связывать ингибины [31]. Для этого была использована аффинная хроматография на колонке с иммобилизованным рекомбинантным ингибином А. Дальнейший анализ показал, что выделенный белок с молекулярной массой 142 кДа присутствует в мембранах клеток, являющихся мишенями для действия ингибина, но его цитозольный домен оказался лишенным серин/треонин-протеинкиназной активности, что принципиально отличает данный белок от других известных рецепторов, работающих с факторами семейства TGF- β . Соответственно, он получил название — ингибин-связывающий белок (inhibin binding protein или InhBP), хотя его роль в передаче сигнала внутрь клетки остается сомнительной. Вместе с тем имеются указания, что, наряду с InhBP, связывание инги-

бина с клеточной мембраной может обеспечивать особый протеогликан — β -гликан, называемый также рецептором типа III для семейства TGF- β [17, 127]. β -Гликан состоит из корового белка с молекулярной массой 100–120 кДа, в котором выделяют трансмембранный домен, короткий цитоплазматический участок, богатый серином и два участка для связывания гликозаминогликановых цепей [125]. Взаимодействие ингибина с β -гликаном приводит к заметному повышению аффинности для последующего связывания этого комплекса с ActRIIB. При этом нельзя исключить, что существуют и другие способы передачи или модуляции ингибинового (или активинового) сигнала внутрь клетки-мишени, а, соответственно, возможно, что такие способы будут найдены и для МСТН.

В целом ряде работ было показано, что взаимодействие активина с рецепторами ActRIIB и ActRIIA может ингибироваться одноцепочечным белком, получившим название фоллистатин (ФСТН, который вначале был описан как фактор, способный блокировать действие фолликулостимулирующего гормона) (по [123, 184]). Основная зрелая изоформа ФСТН имеет молекулярную массу около 35 кДа, ее первичная структура характеризуется высоким содержанием цистеиновых остатков ($n = 36$) и в ней выделяют пять доменов (см. табл. 2) [123, 176]. Три из них называются фоллистатиновыми модулями (доменами), они состоят из 73–77 а.о. и обладают высокой гомологией по аминокислотным последовательностям. В фоллистатиновых модулях присутствуют особые функционально важные мотивы, содержащие по 10 цистеиновых остатков. Подобные мотивы встречаются также в ингибиторах сериновых протеиназ и некоторых белках экстраклеточного матрикса, вовлеченных в процессы клеточного роста и дифференцировки [123, 176]. Известно, что экспрессия фоллистатинового гена идет с альтернативным сплайсингом, в результате которого образуется, по крайней мере, два белковых продукта [176], обладающих сходными и весьма широкими функциями, далеко выходящими за пределы роли ингибитора фолликулостимулирующего гормона [123].

В дальнейшем было обнаружено еще несколько белковых факторов, родственных фоллистатину по строению и функциям, которые взаимодействуют с активинами [163, 164, 196]. Таким образом, в настоящее время имеются достаточно веские основания рассматривать активины, ингибины, фоллистатины, родственные им белки и соответствующие рецепторы как одну из важнейших регуляторных систем в организме позвоночных, которая контролирует не только репродуктивную функцию (через фолликулостимулирующий гормон), но и многие другие процессы [30, 88]. Некоторые характеристики белковых факторов, составляющих эту систему у человека, приведены в табл. 3.

Таблица 3
**Основные участники активин-ингибин-фоллистатиновой
 регуляторной системы человека**
 (по [17,123,163,167,184], а также по материалам сайта
www.ncbi.nlm.nih.gov/ из банков данных OMIM и
 Genome → Eukaryotic Genome Projects → Homo sapiens)

№ п/п	Название белка, синонимы и структурные характеристики	Ген, символы и локализация	OMIM	Экзон-интронная структура гена и некоторые другие свойства
1	Активин А (follicle-stimulating hormone-releasing protein, FRP), гомодимер $\beta A\beta A$	Inhibin βA ; INHBA 7p15-p13	147290	Ген занимает более 14 kb и содержит 3 экзона
2	Активин В; гомодимер $\beta B\beta B$	Inhibin βB ; INHBB; 2cen-q13	147390	Ген занимает 6,7 kb и содержит 2 экзона
3	Активин АВ; гетеродимер $\beta A\beta B$	Inhibin βA и βB ; INHBA и INHBB	—	—
4	Ингибин А; гетеродимер $\alpha\beta A$	Inhibin αA ; INHA; 2q33-q36 и Inhibin, βA	147380	Ген INHA занимает 4,3 kb и содержит 3 экзона
5	Ингибин В; гетеродимер $\alpha\beta A$	Inhibin αA и Inhibin βB	—	—
6	Фоллистатин (activin-binding protein), одноцепочечный; Мм 35 кДа	FST; 5q11.2	136470	Ген занимает более 7 kb и содержит 6 экзонов
7	Фоллистатин-подобный фактор 1 (follistatin-like 1, FRP);	FSTL1; Chr.7 (нет точного картирования)	605547	Нет точных данных
8	Фоллистатин-подобный фактор 3 (follistatin-like 3, FLRG)	FSTL3; 19p13	605343	Ген занимает более 7 kb и содержит 5 экзонов
9	Активный рецептор, ActR IA (activin receptor-like kinase 2; ALK2); Мм 65 кДа	ACVR1; 2q23-q24	102576	Ген занимает около 140 kb и содержит 13 экзонов
10	Активный рецептор, ActRIB, (activin receptor-like kinase 4, ALK4)	ActRIB; 12q13	601300	Ген занимает около 46 kb и содержит 9 экзонов
11	Активный рецептор тип IIA (ACTIVIN A RECEPTOR, TYPE II); Мм 85 кДа	ACVR2; 2q22.2-q23.3	102581	Ген занимает около 84 kb и содержит 12 экзонов
12	Активный рецептор тип IIB (ActRIIB)	ACVR2B, 3p22	602730	Ген занимает около 30 kb и содержит 11 экзонов

Манипуляции с фоллистатином и его геном оказались весьма полезными для изучения механизмов, обеспечивающих регуляторные эффекты МСТН на внутриклеточный метаболизм (сигналинг).

Один из важнейших выводов, позволивших приблизиться к расшифровке миостатинового сигналинга, был сделан по результатам изучения специально созданных трансгенных мышей, продуцирующих укороченный ActRIIB, у которого отсутствует домен с протеинкиназной активностью. Такие мышцы характеризуются выраженным повышением массы отдельных мышц, а также и всей мышечной системы [95]. При этом гистохимический анализ показал, что у трансгенных животных имеется как гипертрофия (приблизительно на 20%), так и гиперплазия мышечных волокон (приблизительно на 40%) по сравнению с контролем. Иными словами, полученный эффект был подобен тому, который наблюдается у животных с мутациями в миостатиновом гене.

В параллельно проведенных экспериментах трансгенные животные, которым ввели генетическую конструкцию, продуцирующую фоллистатин, продемонстрировали еще более выраженный эффект на развитие мышечной системы. У таких животных поперечное сечение мышечных волокон в среднем увеличивалось на 28% по сравнению с контролем (гипертрофия), а рост количества миофибрилл (гиперплазия) составил 66% [95]. Таким образом, удалось продемонстрировать, что избыточная продукция фоллистатина, по-видимому, снижает активность МСТН и, в целом, ведет к тем же биологическим эффектам в мышечных тканях, которые достигаются при блокировании рецепторов ActRIIB. Эти данные вполне коррелируют с наблюдениями за мышами, которые имели нокаут-мутации в гене фоллистатина. Эти животные характеризовались заметным снижением мышечной массы при рождении, множественными дефектами развития и быстрой гибелью в перинатальном периоде, что, возможно, отчасти связано с действием МСТН, полностью освобожденного от блокирующего эффекта фоллистатина [103].

В целом, приведенные данные свидетельствуют о существовании определенного сходства по ряду структурных и функциональных свойств между МСТН и отдельными членами активин-ингибин-фоллистатиновой регуляторной системы. В то же время отличительной чертой МСТН является его высокая тканеспецифичность, ограничивающая действие данного фактора, по-видимому, только скелетной мускулатурой.

Из имеющихся литературных материалов следует также, что в функциональном плане по влиянию на мышечную систему антагонистами МСТН могут быть не только ФСТН и родственные ему белки, но и ряд регуляторных факторов, входящих в систему гормона роста.

К настоящему времени имеется обширная информация о свойствах и особенностях функционирования соматотропина или гормона

роста (ГР), которому отводят центральную роль в регуляции формообразования многочисленных структур опорно-двигательного аппарата млекопитающих (скелетных мышц, костей, хрящевых образований, связок и т.д.) [46, 93, 124]. Характер биохимических изменений, возникающих под влиянием ГР, в целом противоположен эффектам, вызываемых МСТН. При этом важно подчеркнуть, что в отличие от миостатина, действующего только на мышечные клетки, мишенями для ГР является и скелетная мускулатура, и большинство других тканей, составляющих опорно-двигательный аппарат, а также клетки печени и многих других органов [70, 93, 124, 134]. Так, повышение продукции ГР сопровождается усилением синтеза белков в мышцах, связках, хрящах, костях, параллельно повышается активность многих ферментов, а также ускоряется трансмембранный транспорт аминокислот в клетки. Более того, отмечается уменьшение интенсивности процессов белкового катаболизма и в итоге регистрируется положительный азотистый баланс. На организмах эффекты ГР проявляются увеличением толщины костей и ростом размеров многих внутренних органов (сердце, легкие, печень, почки, кишечник, поджелудочная железа, надпочечники и др.) [4, 70, 93, 124, 134]. Наряду с этим, различные нарушения в функции ГР или работающих вместе с ним белков приводят к существенным изменениям ростовых показателей и даже к серьезной патологии [70, 93, 124, 132, 168].

Реализация биологических эффектов ГР — сложный многоступенчатый и разветвленный процесс. Во-первых, в нем участвует целый набор специальных белков, обеспечивающих отдельные стадии так называемой «прямой» ветви данного механизма, типичного для многих других белковых гормонов: контроль поступления ГР в кровоток, транспорт к клеткам-мишеням, взаимодействие с клеточным рецептором, передачу сигнала внутрь клетки-мишени и его реализацию [46, 93, 124].

Во-вторых, ГР, действуя на клетки печени, мышц и некоторых других органов, индуцирует в них синтез особых регуляторных факторов (инсулино-подобные факторы роста I [ИФР-1] и II [ИФР-2]), которые секретируются в кровоток, транспортируются к своим мишеням (в частности, к скелетным мышцам), связываются со своими рецепторами и усиливают в соответствующих клетках анаболические процессы [4, 52, 70, 93, 134]. Таким образом, ИФР-1 и ИФР-2 выступают фактически в качестве посредников, формируя «дополнительную» ветвь в реализации сигнала ГР. Схематично эти процессы представлены на рис. 4 (см. стр. 252).

Важно отметить, что, по современным данным, ИФР-1 и ИФР-2 не только выполняют роль посредников для ГР, но имеют и собствен-

ные регуляторные функции [46, 47, 59, 93, 189] (см. рис. 4). Вместе с тем по биологическим эффектам ИФР-1 и ИФР-2 в целом являются антагонистами МСТН. Таким образом, ГР, ИФР-1 и ИФР-2 можно рассматривать как общую систему стимуляции анаболических процессов в скелетной мускулатуре.

У человека ГР продуцируется и сохраняется в специальных соматотрофных клетках передней доли гипофиза, где в результате тканеспецифичной экспрессии гена GH1, состоящего из 5 экзонов и входящего в кластер из 5 родственных генов, синтезируется сначала предшественник ГР из 217 а.о., затем образуется зрелый ГР из 191 а.о. [93, 124]. По существующим оценкам в гипофизе взрослого человека содержание ГР составляет 5–15 мг (по [124]), а регуляция его секреции осуществляется ЦНС с помощью двух гормонов гипоталамуса – соматостатина и соматолиберина, соответственно блокирующего и стимулирующего высвобождение ГР из соматотрофных клеток [4, 93, 112].

Особая значимость в реализации биологических эффектов ГР принадлежит нескольким белковым продуктам одного гена, получившего название – ген рецептора гормона роста (ген GHR). Этот ген, содержащийся в одной копии на гаплоидный геном человека, картирован в области 5p13-p12. В нем выявлено, как минимум, 10 экзонов, причем 9 из них кодируют аминокислотные последовательности, а экзон 1 определяет 5'-нетранслируемую последовательность в мРНК [45, 54, 124].

Установлено, что данный ген, во-первых, направляет синтез трансмембранного белка (РГР) и именно этот полноразмерный продукт (зрелый белок – 620 а.о.; предшественник – 638 а.о.), образуя функционально активный димер, выполняет роль рецептора ГР [96, 124].

Во-вторых, при экспрессии гена GHR за счет альтернативного сплайсинга может удаляться 26 нуклеотидов в экзоне 9, вследствие чего в позиции 280 появляется стоп-кодон. Как результат, образуется укороченный белок РГР (GHRtr), у которого отсутствует 97,5% внутриклеточного домена [45]. При этом известен и другой продукт альтернативного сплайсинга гена GHR, который возникает при вырезании экзона 3 (GHRd3) [158]. Физиологическое значение этих продуктов пока остается предметом дискуссии.

В-третьих, у человека и из GHR, и из GHRtr в результате ограниченного протеолиза отщепляется фрагмент последовательности (экстраклеточный домен), который поступает в кровоток и выполняет роль специального транспортера и стабилизатора ГР. Данный продукт получил название – белок, связывающий ГР (ГРСБ) [93, 124]. Имеются данные, что GHRtr наиболее эффективно процессируется в ГРСБ [140].

Достигнув клетки-мишени, ГР связывается с РГР, что приводит к активации цитоплазматического домена этого рецептора, который вступает в ассоциацию с особой внутриклеточной тирозиновой протеинкиназой (Janus kinase 2, JAK2) [27, 93]. В результате JAK2 запускает фосфорилирование целой группы белков, называемых преобразователями сигнала и активаторами транскрипции (signal transducers and activators of transcription – STAT). Фосфорилированные STAT-белки (в частности, 1, 3, 5a и 5b) формируют димеры, способные проникать в клеточное ядро и взаимодействовать со специфическими последовательностями в ДНК, что приводит к активации транскрипции ряда определенных генов [133, 140]. Следствием начавшейся генной экспрессии и становится усиление различных анаболических процессов в клетке.

Наряду с фосфорилированием STAT, было обнаружено, что сигнал ГР, переданный в клетку через РГР, реализуется за счет фосфорилирования группы других белков, известных как субстратные белки рецептора инсулина (insulin receptor substrate, IRS) [12, 50, 93, 146]. Эти белки (IRS-1 и IRS-2) способны ассоциировать с фосфатидилинозитол-3'-фосфат киназой, что приводит к запуску целой цепи событий («сигналинг»), инициируемых не только ГР, но и рядом других регуляторных факторов, в частности, ИФР-1 [50, 52, 93, 146].

Известно еще несколько важных проявлений действия ГР на клетку-мишень, в частности, усиление поступления в нее ионов Са из межклеточного пространства через специальный трансмембранный канал (voltage-dependent L-type) с последующим каскадом Са-активируемых событий [46, 52, 93]. Отмечалась также активация фосфопротеинкиназы С (РКС) и митоген-активируемых протеинкиназ (МАР-киназ) [46, 93]. Таким образом, совершенно очевидно, что ГР обладает чрезвычайно широким спектром воздействия на различные процессы, протекающие в клетке, и расшифровка механизмов его действия требует дальнейших исследований.

В числе генов, экспрессию которых активирует ГР, особый интерес уже многие годы привлекают гены ИФР-1 и ИФР-2. Еще в 1957 г. были получены данные о том, что биологические эффекты ГР (или соматотропина) реализуются с помощью особых посредников, получивших соответственно название соматомедины. В настоящее время, учитывая их свойства и сходство первичных структур с проинсулином, эти белки обычно называют инсулино-подобными факторам роста – ИФР-1 и ИФР-2 [4, 32, 46, 70, 93].

По имеющимся данным, ген ИФР-1, состоящий из 5 сравнительно коротких экзонов, занимает в области 12q22-q24.1 весьма протяженный участок размером 45 kb (по [143], и <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Экспрессия этого гена идет с многовариантным альтернативным сплайсингом (основные белки – предшественники содержат 195 и 153 а.о.) и с посттрансляционным процессингом, в результате чего образуется и секретируется в кровотоки полипептидная цепь ИФР-1 (соматомедин С) из 70 а.о. [93, 143]. Важно отметить, что относительно недавно в скелетных мышцах был обнаружен еще один продукт гена ИФР-1, который также формируется за счет альтернативного сплайсинга, но не секретируется в кровь и, по-видимому, играет важную роль в развитии рабочей гипертрофии [55, 189]. Этот вариант ИФР-1 назван механическим фактором роста (MGF).

Отмечено существование прямой корреляции между уровнем ИФР-1 в крови и рядом росто-весовых характеристик у человека и некоторых других млекопитающих [19, 46, 57, 124]. Вместе с тем, избыток ИФР-1 в организме снижает секрецию ГР, подавляя высвобождение соматолиберина из клеток гипоталамуса и стимулируя выход соматостатина. Ингибирование также обеспечивается при избытке ИФР-1 и самим ГР, тормозящим освобождение соматолиберина [4, 93, 124].

В кровотоке ИФР-1 (как и ИФР-2) взаимодействует со специальными транспортными белками, которые за счет высокого сродства способны связывать данный фактор(ы), образуя олигомерные комплексы, устойчивые к действию протеиназ, что способствует увеличению продолжительности жизни ИФР в крови и обеспечивает реализацию их биологических эффектов. Уже известны шесть ИФР-связывающих белков (ИФРСБ или IFG-binding proteins), которые кодируются соответствующими генами [46, 49, 93].

Передача сигнала от ИФР-1 в клетку-мишень происходит через специфичный трансмембранный рецептор (ИФР-1Р), состоящий из α и β полипептидных цепей [46, 93]. По своему строению ИФР-1Р во многом сходен с рецептором инсулина – его α -цепь, располагаясь в основном экстраклеточно, отвечает собственно за связывание фактора, а β -цепь, локализованная во внутриклеточном домене, ответственна за тирозинкиназную активность. При связывании с ИФР-1 структура рецептора приобретает форму $\alpha\beta_2$ и активированный тирозинкиназный домен путем фосфорилирования ряда белков, участвующих в передаче сигнала, запускает каскад реакций, результатом которых становится усиление анаболических процессов в клетке-мишени (в частности, в клетках мышечных тканей) [50, 52, 93, 146].

Имеются данные, что основными субстратами для активированного ИФР-1Р являются уже упоминавшиеся IRS белки [46, 52, 93]. Обнаружено, как минимум, четыре представителя этого белкового семейства, которые участвуют в реализации сигнала от ИФР-1. Фосфорилирование IRS, вызванное ИФР-1, как и в случае с ГР, индуци-

рует цепь реакций, ведущих к образованию инозитол—3,4,5-трифосфата, одного из известных вторичных мессенджеров, который в свою очередь активирует особые серин/треонин киназы, обозначаемые в англоязычной литературе аббревиатурой АКТ по названию одного из онкогенов [52].

АКТ фосфорилируют ряд субстратов, включая белки, участвующие в синтезе белков и в транскрипции генов, что в итоге усиливает пролиферацию и жизнеспособность клеток [52, 170]. Наряду с этим, результатом действия АКТ становится повышение транспорта глюкозы в клетки и ингибирование внутриклеточных протеиназ [62, 170]. У млекопитающих АКТ представлены тремя изоформами, которые детерминируются, соответственно, тремя разными генами. Среди них особо следует отметить АКТ1 — серин/треонин киназу, которая в активной форме вызывает гипертрофию скелетных мышц [52, 62, 170].

Наряду с IRS белками, активированный ИФР-1Р фосфорилирует и другую группу белков, известных как трансформирующие белки семейства SHC (молекулярная масса 46, 52 и 66 кДа) структурной особенностью которых является наличие в С-концевом участке SH2-домена и глицин-, пролин-богатой области [93, 108, 122]. В результате запускается еще один каскад реакций, приводящих к активации клеточной пролиферации.

Весьма неожиданным по сравнению с отмеченными выше данными о механизмах сигналинга ИФР-1, реализующихся через фосфорилирование различных белков, явилось обнаружение активации этим фактором кальций-зависимой серин/треонин-протеинфосфатазы 3, называемой также кальцинейрином (calcineurin) [52, 111]. Этот фермент гидролизует фосфоэфирные связи в молекулах нескольких транскрипционных факторов, известных под названием ядерные факторы активации Т клеток (NF-AT, nuclear factor of activated T cells). После этого NF-AT активно диффундируют в ядро клетки, взаимодействуют с определенными сайтами в ДНК, запуская экспрессию ряда генов, вызывающих, в частности, мышечную гипертрофию [52, 71, 111]. Возможно, что активация кальцинейрина является частью аутокринного механизма действия ИФР-1, тогда как фосфорилирование белков — это способ эндокринного (или паракринного) сигналинга.

ИФР-2 (соматомедин А), так же как и ИФР-1, представляет собой одинарную, но чуть более короткую полипептидную цепь (67 а.о.), которая имеет 62% гомологии с первичной структурой ИФР-1 [75, 136]. Ген ИФР-2 человека располагается в 11p15.5, занимая участок длиной 25 kb, содержит 4 экзона [40, 113], экспрессируется с альтернативным сплайсингом и кодирует в качестве основного варианта

образование белка-предшественника из 180 а.о. В этом белке на N-конце имеется фрагмент из 24 а.о., удаляемый при процессинге, затем следует последовательность собственно ИФР-2, а далее — также удаляемая С-концевая последовательность [40, 75, 113].

Хотя структура ИФР-2 человека и его гена хорошо изучены, некоторые вопросы функционирования данного фактора в организме еще далеки от разрешения [46, 75, 93]. Исследования на клеточных культурах *in vitro* продемонстрировали сходство основных биологических эффектов ИФР-2 и ИФР-1 — стимуляция клеточной пролиферации и анаболических процессов [46, 93]. Наряду с этим, было показано, что ИФР-2 способен связываться с рецептором ИФР-1 и даже с близким к нему по структуре рецептором инсулина, однако вопрос о том, приводит ли такое связывание к передаче стимулирующего сигнала в клетку, остается спорным [93, 141]. Обнаружен также специальный рецептор для ИФР-2, который имеет высокое сродство к ИФР-2, хотя по своему строению он резко отличается от инсулинового рецептора, ИФР-1Р и других представителей данного семейства [93, 141]. Однако строгих доказательств роли и этого специального рецептора в запуске каскада реакций сигналинга от ИФР-2 пока не получено (по [93]). Тем не менее интересно отметить, что недавно появилось сообщение об обнаружении корреляций между однонуклеотидными полиморфизмами (SNP's), детектируемыми в области гена ИФР-2, и массой тела у мужчин [51], из чего можно предполагать возможность генерализованных эффектов от ИФР-2, включая воздействие на мышечные ткани.

В настоящее время известно, что ГР не только запускает синтезы ИФР-1 и ИФР-2, но и индуцирует продукцию ряда других ростовых факторов, в частности, фактора роста гепатоцитов (в печени), фактора роста фибробластов 2 (в хондроцитах), белков морфогенеза костей 2 и 4 (в фибробластах) и др. [46, 93]. Часть этих факторов, как и МСТН, относится к семейству TGF- β , а некоторые из них (фактор роста гепатоцитов, фактор роста фибробластов 2 и др.) способны активировать анаболические процессы в миобластах, по крайней мере, при культивировании *in vitro* [93, 109]. Подробнее результаты экспериментов с миобластами будут рассмотрены в следующем разделе.

Таким образом, накоплен значительный материал о целом наборе взаимодействующих друг с другом регуляторных факторов, включая МСТН, которые влияют на состояние мышечных тканей. Естественно, что особый интерес вызывает их роль в процессах миогенеза.

IV. УЧАСТИЕ МИОСТАТИНА В ПРОЦЕССАХ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ МЫШЕЧНЫХ КЛЕТОК И МИОГЕНЕЗА, ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ С ДРУГИМИ РЕГУЛЯТОРНЫМИ ФАКТОРАМИ

Изучение молекулярных основ формирования мышечных волокон — уникальных многоядерных клеток и гистогенеза поперечно-полосатых мышц позвоночных, в целом, вполне обоснованно рассматривается как одна из важных и интригующих областей современной биохимии и молекулярной биологии [46, 147, 148]. За несколько десятилетий интенсивных исследований сложились общие представления о многоступенчатом характере морфогенетических процессов, происходящих в мышечных клетках (рис. 5, см. стр. 253), при этом особое внимание обычно уделялось той стадии, на которой непосредственно происходит образование многоядерных волокон из МБ — одноядерных мышечных клеток [3, 18, 148, 152]. Однако теперь не вызывает сомнений, что данная стадия является лишь весьма важным звеном в цепи других не менее интересных и значимых событий, начинающихся в физиологических условиях в раннем онтогенезе с превращения мезодермальных клеток в МБ, из которых в последующем и образуется скелетная мускулатура. Вместе с тем результаты, полученные А.С.МакФеррон с соавт., свидетельствуют, что именно в этот период в соответствующих компартментах эмбриона начинается экспрессия миостатинового гена, позволяя предполагать вовлеченность МСТН в дифференцировку мышечных клеток [95, 104].

Важно отметить, что еще в 80-е годы было обнаружено несколько регуляторных факторов, способных направлять дифференцировку различных клеток (в частности, эмбриональных фибробластов) по миогенному пути [37, 117]. Эти факторы получили название миогенных. В настоящее время и они сами, и соответствующие гены, а также некоторые их партнеры, участвующие в реализации молекулярных эффектов, детально охарактеризованы (см. табл. 3).

Анализ строения миогенных факторов показал значительную гомологию между ними, включая наличие в них особых структурных доменов — «спираль-петля-спираль» (helix-loop-helix domain), что позволило рассматривать миогенные факторы как особое семейство белков-регуляторов (обычно обозначаемое как семейство myoD — часть суперсемейства helix-loop-helix белков или HLH-белков).

По данным Хастей с соавт. [64], важнейшая роль в раннем эмбриогенезе принадлежит миогенину, поскольку мыши, гомозиготные по мутациям в его гене и пережившие ранний эмбриогенез, погибали сразу же после рождения, при этом у них отмечалось недоразвитие всей скелетной мускулатуры. К аналогичному выводу пришла также

группа японских исследователей, работавших с нокаут-моделями [114]. Параллельно было показано, что в отличие от мутантов по гену миогенина мышцы с мутациями в генах MYF3 или MYF5 могли формировать практически нормальную скелетную мускулатуру, и только компаунды по мутациям в обоих этих генах (и в гене MYF3, и в гене MYF5) фактически лишаются скелетных мышц, что ведет к утрате жизнеспособности [144].

Миогенез у 18-дневного человеческого эмбриона (так называемый пресомитный эмбрион) фактически начинается в последующие 3-6 дней — после того, как из промежуточной мезодермы сформируются хорда и тяжи параксиальной мезодермы с подразделением последних на особые сегменты — сомиты (по <http://mglinets.narod.ru/slova/MyoGeSom.htm>). В этот период в сомитах появляется целый набор белков-индукторов, часть из которых продуцируется непосредственно клетками сомитов, а часть имеет экзогенное происхождение. Многие из этих белков-индукторов уже идентифицированы (табл. 4) и получили названия, указывающие на их происхождение (например, хордин) или по аналогии с соответствующими ранее описанными мутациями у дрозофилы (например, Shh — аббревиатура от Sonic hedgehog, в дословном переводе — «звучащий еж» или Wnt — от дрозофильного белка wingless, в дословном переводе — «бескрылый»). Некоторые из отмеченных индукторов (в частности, хордин и ноггин) подобно миостатину реализуют свои эффекты через Smad-белки [125].

По всей вероятности, стадия инициации миогенеза — чрезвычайно сложна, о чем свидетельствует участие в ней большого числа обнаруженных белков-регуляторов. Среди них, в частности, имеется целый ряд секретируемых гликопротеинов — продуктов генного семейства Wnt (у человека найдено уже более 14 генов, относящихся к этому семейству), которые взаимодействуют со специальными рецепторами на клеточных мембранах и вызывают каскад биохимических реакций в клетках-мишенях [150].

Одним из наиболее важных результатов действия белков-индукторов становится активация генов миогенных факторов. В дифференцирующихся мезодермальных клетках наиболее рано, по-видимому, появляется мРНК MYF5 [119], а экспрессия MYF3 и MYF4 начинается позднее. Более того, проведенный анализ дал основание считать, что ген MYF3 со временем становится основным регулятором дифференцировки по мышечному типу, участвует в репарации повреждений мышц и сохраняет активность только в мышечных клетках, а в неммышечных клетках этот ген репрессирован [180].

Таблица 4
**Общие характеристики миогенных факторов человека,
а также некоторых партнеров, взаимодействующих с ними
в процессах миогенеза**
(по [18,110, 117,180], а также по материалам сайта
www.ncbi.nlm.nih.gov/ из банков данных OMIM и
Genome→ Eukaryotic Genome Projects→ Homo sapiens)

Название и символ	OMIM	Локализация гена	Структурная характеристика		
			ген, размер	мРНК, размер	белковый продукт
Миогенин, миогенный фактор 4, MYF4	159980	1q31-q41	3969 bp, 3 экзона	1420 bp	224 а.о.
Миогенный фактор 3, МиоД1, MYF3, MYOD1)	159970	11p15.4	3 экзона	1757 bp	320 а.о.
Миогенный фактор 5, MYF5	159990	12q21	2646 bp, 3 экзона	1427 bp	255 а.о.
Миогенный фактор 6, Herculin, MYF6, MRF4	159991	12q21	1805bp, 3 экзона	1294 bp	242 а.о.
Транскрипционный фактор 3, белок E2A, TCF3, E2A, ITF1, E2A/HLF	147141	19p13.3	40993 bp, минимум 18 экзонов	4396 bp*	654 а.о.(изоформа E47)
Транскрипционный фактор 12, белок HEB, TCF12, HTF4	600480	15q21	369870 bp, минимум 26 экзонов	4202 bp	682 а.о.
Мускулин, миогенный репрессор, MSC, ABF1, MYOR	603628	8q21	2902 bp, 3 экзона	1294 bp	218 а.о.
Миоцит-специфичный энхансерный фактор 2A, MEF2A	600660	15q26	150430 bp, 14 экзонов	2975 bp	507 а.о.
Миоцит-специфичный энхансерный фактор 2B, MEF2B	60066	19p12	47385 bp, 14 экзонов	1671 bp	365 а.о.
Миоцит-специфичный энхансерный фактор 2C, MEF2C	600662	5q14	186611 bp, 15 экзонов	2161 bp	473 а.о.**
Миоцит-специфичный энхансерный фактор 2D, MEF2D	600663	1q12-q23	35414 bp, 13 экзонов	1919 bp	521 а.о.
Хордин, CHRД	603475	3q27	11,5 kb, 23 экзона	3517 bp	954 а.о.
Ноггин, NOG	602991	17q22	2073 bp, 1 экзон	699 bp	232 а.о.
SHH фактор (SONIC HEDGEHOG)	600725	7q36	10210 bp, 3 экзона	1576 bp	462 а.о.
Фактор WNT1, онкоген INT1, MMTV 1	164820	12q12-q13	5044 bp, 4 экзона	2368 bp	370 а.о.

* – альтернативный сплайсинг в мышцах – 465 а.о.

** – альтернативный сплайсинг, 1074 bp

Исследования механизмов действия миогенных факторов показали, что эти регуляторные белки взаимодействуют с ядерной ДНК, находящейся в составе хроматина, и специфически активируют многие гены, экспрессия которых необходима для обеспечения миогенеза. Имеются данные о том, что миогенные факторы предварительно образуют димеры с другими членами HLH семейства (в частности, MyoD-E12 гетеродимеры) и такая форма обеспечивает эффективное связывание с ДНК [18]. Однако в одной из недавних работ был описан особый механизм активации MYOD (мышинного аналога MYF3 у человека), заключающийся в энзиматическом ацетилировании трех консервативных остатков лизина (31, 164, 184), что повышает сродство этого фактора к ДНК-мишени [150].

В результате происходят целенаправленные изменения транскрипции, и дифференцирующиеся клетки сомитов приобретают характерную вытянутую форму, перемещаются к медиальной стенке, формируют специальные компартменты — митомы, из которых в последующем развиваются скелетные мышцы. Эти клетки рассматривают как эмбриональные миобласты, хотя в них еще не выявляются основные сократительные белки, но уже синтезируется десмин — цитоскелетный белок промежуточных филаментов, характерный для ряда мышечных тканей.

Наряду с миогенными факторами семейства myoD, обнаружены еще важные участники процесса эмбрионального миогенеза — семейство myocyte-specific enhancer factor-2 (MEF2), которое представляют также тканеспецифические ДНК-связывающие белки. У позвоночных выявлено четыре гена, относящиеся к семейству mef2, которые локализованы на разных хромосомах и обозначаются как mef2a, -b, -c, и -d [18]. Имеются данные, что белки семейства MEF2 содержат специальный ДНК-связывающий домен и кооперативно взаимодействуют с миогенными факторами. В целом, они оказывают определенное регуляторное воздействие на транскрипцию, что, как считается, поддерживает мышечный фенотип во время дифференцировки и далее при развитии мышечных тканей [18, 110]. Уже показано, что таким способом, в конечном счете, активируется экспрессия более 30 генов мышечных белков, среди которых тяжелые и легкие цепи миозина, α -актин, тропонины, десмин и др. [18].

Во время эмбриогенеза до появления миогенных факторов экспрессия генов, относящихся к семейству MEF2, не наблюдается, то есть они, по-видимому, не участвуют в первых стадиях инициации миогенеза [18].

Таким образом, можно выстроить следующую последовательность биохимических событий в процессе образования миобластов

из мезодермальных клеток: появление белков-индукторов → индукция миогенных факторов → активация генов семейства MEF2 с последующим началом синтеза комплекса сократительных и других тканеспецифичных мышечных белков. По-видимому, именно на этой стадии в эмбриональных миобластах начинается и синтез миостатина, который продолжается далее на протяжении всей жизни [95, 104].

Проведенные в 2000–20001 гг. модельные эксперименты на клеточных культурах позволили до некоторой степени конкретизировать роль МСТН в пролиферирующих миобластах [74, 160]. Во-первых, было показано, что хотя в пролиферирующих МБ происходит синтез миостатина, добавки этого фактора в культуральную среду замедляют рост клеток. Во-вторых, методом сортировки флуоресцентно-меченных клеток удалось установить, что при повышении уровня миостатина МБ задерживаются в G1 фазе клеточного цикла и не переходят в S фазу. В-третьих, по данным Вестерн-блоттинга, параллельно с повышением уровня МСТН наблюдалось увеличение количества одного (обозначаемого как p21^{Waf1, Cip1}) известного ингибитора циклин D-зависимых киназ (Cdk). Наконец, оказалось, что при этом падает активность белка Cdk2, который участвует в обеспечении продвижения клеток по циклу, а именно — в переходе из фазы G1 в фазу S. Таким образом, возникли представления о том, что находящийся в культуральной среде миостатин запускает в МБ каскад процессов, одним из результатов которых становится блокирование так называемого циклинового механизма контроля за клеточным циклом [52, 74, 160].

Более того, совсем недавно появилось сообщение о том, что МСТН ингибирует и процессы дифференцировки миобластов, снижая экспрессию фактора MyoD [92]. В других работах было показано также, что ингибирующее влияние МСТН на анаболические процессы сохраняется и после образования многоядерных миотуб [160]. Ингибирующее влияние на рост и дифференцировку МБ отмечалось и у некоторых других членов семейства TGF- β [46, 161].

Напротив, стимулирующие эффекты на рост и дифференцировку МБ были обнаружены у ИФР-1, а также у ИФР-2 [46, 47, 93, 109]. Более того, оказалось, что ИФР-1 способен существенно активировать процессы регенерации в поврежденных мышцах [46, 52]. Вместе с тем имеются противоречивые данные относительно прямого действия ГР на культивируемые МБ — в некоторых работах удавалось обнаруживать усиление пролиферации клеток после добавки ГР, а в других — явные эффекты не регистрировались [по 46].

Несмотря на это, ряд авторов уделяли значительное внимание выяснению роли гормона роста и связанных с ним регуляторных белков (ИФР-1 и др.) в эмбриональном развитии мышечной системы

[46, 93, 124]. У растущего эмбриона в клетках гипофиза синтез ГР начинает регистрироваться уже на 7–9 неделях развития; в конце первого триместра этот гормон появляется в плазме крови плода и далее его концентрация быстро повышается, достигая максимума в 100–150 нг/мл приблизительно в середине беременности [53, 124]. В последующем уровень ГР в плазме крови плода постепенно снижается до 30 нг/мл перед родами. Снижение продолжается и в начале антенатального периода, а затем в детском возрасте этот показатель стабилизируется на так называемом базальном уровне, который поддерживается у взрослых; в старости секреция ГР постепенно еще снижается [по 124]. В целом, существует ряд материалов, указывающих на то, что ГР вряд ли оказывает решающее влияние на рост мышц эмбриона. Так, при некоторых тяжелых врожденных пороках — при анэнцефалии, а также при аплазии гипофиза, которые фактически исключают продукцию ГР у эмбриона, размеры плода при родах обычно существенно не снижаются. Более того, нередко генетические дефекты, блокирующие действие гормона роста (делеции в гене *GH1* или в гене *GHR*, кодирующем рецептор ГР), не проявляются у новорожденных, а замедление роста обнаруживается лишь в последующем антенатальном развитии [53, 124, 134, 149, 155].

В отдельных исследованиях показано, что активировать пролиферацию миобластов способен фактор роста гепатоцитов (HGF) и некоторые представители семейства цитокинов (интерлейкин 6 (IL6) и ингибирующий лейкемию фактор (LIF)) [109, 121, 147]. Вместе с тем HGF ингибирует мышечную дифференцировку в условиях *in vitro* и *in vivo* (109), а LIF и интерлейкин 15 (IL15), по-видимому, вовлечены в развитие мышечной гипертрофии, хотя последний не вызывает пролиферацию МБ, но, возможно, влияет на их дифференцировку [46, 129, 130, 147]. Интересно отметить, что продукция IL15 и IL6 может осуществляться самими мышечными тканями с последующим выведением фактора в кровотоки и гормоно-подобными эффектами на различные органы и ткани [23, 121].

По имеющимся данным, на рост и дифференцировку мышечных клеток существенное влияние оказывают представители еще одного большого семейства регуляторных белков — факторов роста фибробластов (ФРФ). К настоящему времени идентифицировано уже более 20 членов этого семейства, среди которых, по крайней мере, ФРФ2 стимулирует пролиферацию МБ (хотя потенциально он может ингибировать терминальные стадии дифференцировки) и, по-видимому, участвует в обеспечении роста мышечных тканей [46, 118, 161]. Кроме того, по имеющимся данным, в регенерации мышечных тканей участвует и ФРФ6 [118, 147].

К настоящему времени накоплен большой материал об анаболическом действии на скелетную мускулатуру тестостерона и ряда других стероидных гормонов, а также их синтетических аналогов, тогда как некоторые глюкокортикоиды способны приводить к мышечной атрофии [79, 98, 100]. По результатам проведенных исследований эффекты отдельных белковых ростовых факторов, в том числе и МСТН, могут быть прямо или косвенно сопряжены с функционированием системы стероидных гормонов [22, 97, 100]. В частности, недавно появились сообщения о том, что при мышечной атрофии, вызванной действием глюкокортикоидов, происходит индукция экспрессии гена МСТН [98]. Хотя многие из стероидов используются в качестве лекарственных средств при разных заболеваниях, в спортивной медицине данные соединения, как правило, отнесены к допинг-препаратам и их подробное рассмотрение не входит в рамки данного обзора.

Очевидно, что многообразие уже выявленных регуляторных факторов, которые обеспечивают миогенез *in vitro* и *in vivo*, далеко не полностью отражает всю сложность процессов формирования и развития скелетной мускулатуры в онтогенезе. Существенный вклад в конечный результат могут вносить изменчивость биохимических показателей и генетический полиморфизм участников этих процессов, которые в отдельных случаях приводят к состояниям, нуждающимся в медицинской коррекции, но иногда создают предпосылки и для возникновения повышенной мышечной работоспособности. Некоторые вопросы биохимической изменчивости и генетического полиморфизма МСТН, а также других ростовых факторов будут рассмотрены в следующем разделе.

V. БИОХИМИЧЕСКАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ И ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПОЛИМОРФИЗМ МИОСТАТИНА, А ТАКЖЕ НЕКОТОРЫХ ДРУГИХ ФАКТОРОВ, РЕГУЛИРУЮЩИХ РОСТ МЫШЕЧНЫХ ТКАНЕЙ

Известно, что суммарная масса мышечных тканей в теле человека существенно варьирует — у детей и лиц пожилого возраста данный показатель может составлять 25–30%, а у тренированных спортсменов он достигает 55–70% [1, 91, 190]. Из результатов различных исследований следует, что основные биохимические и физиологические показатели поперечно-полосатых мышечных тканей не только значительно изменяются с возрастом, но и обладают межиндивидуальной вариабельностью при выраженном половом диморфизме [1, 42, 95, 115]. Среди причин такой изменчивости важное место отводят генетическим предпосылкам и особенностям индивидуального

развития, что находит отражение в биохимической изменчивости ростовых факторов и ряда других белков, вовлеченных в реализацию соответствующих физиологических эффектов на молекулярном уровне [19, 49, 57, 93, 124]. В свою очередь, биохимическая изменчивость каждого из указанных белков может характеризоваться как количественной вариабельностью, так и качественными особенностями. Ранее уже отмечалось, что экспрессия отдельных генов, кодирующих белки рассматриваемой группы, может приводить к образованию нескольких белковых продуктов с разными функциями (например, ген GHR обеспечивает формирование мембранного рецептора ГР, а также циркулирующего в кровотоке белка, связывающего и транспортирующего ГР). Однако нередко, благодаря альтернативному сплайсингу и/или постсинтетическим модификациям, образуется ряд изоформ одного и того же фактора, что обеспечивает значительный вклад в качественную составляющую биохимической изменчивости по данному параметру. В частности, хорошо известно существование различных изоформ ГР у здоровых людей (табл. 5). Наряду с этим, в качественной биохимической изменчивости важную роль может играть образование аллельных вариантов соответствующего фактора, что является следствием генетического полиморфизма (однонуклеотидного или иного). Иногда такой генетический полиморфизм практически не влияет на функцию фактора (так называемые «нейтральные» мутации), однако в своих крайних проявлениях

Таблица 5
Изоформы гормона роста (по [124])

№	Мм	Особенности структуры и способ образования
1*	22 кДа	Содержит 191 а.о. — продукт постсинтетической модификации белка-предшественника, состоящего из 217 а.о.
2	45 кДа	Агрегат (димер) основной изоформы ГР (22 кДа), разрушается при обработке 2-меркаптоэтанолом
3	24 кДа (1)	Образуется из основной изоформы ГР (22 кДа) за счет протеолитического разрыва связи 139—140 с образованием двух цепей, удерживаемых S—S-связями; увеличение кажущейся молекулярной массы из-за конформационных изменений
4	24 кДа (2)	Продукт, содержащий N-концевой сигнальный пептид из 26 а.о., который не удален в процессе созревания
5	20 кДа	Продукт альтернативного сплайсинга с потерей участка цепи — 32—46 а.о.
6	17,5 кДа	Продукт альтернативного сплайсинга с потерей экзона 3

* — основной продукт гена GH1

он становится причиной существенного изменения фенотипа особи (как, например, отмеченные ранее нуль-мутации по гену *MSTN* у коров породы *Belgian Blue* и других животных с «*Double muscling*» фенотипами). К настоящему времени описано существование многих мутаций в человеческих генах ГР, РГР и других белков, участвующих в контроле за ростом мышечных тканей, что вызывает у их носителей или определенные наследственные болезни (ряд форм дефицита гормона роста, синдром Ларона и др.) или значительные отклонения роста-весовых показателей от средних значений [6, 25, 46, 93, 124, 168].

В целом, накопленные материалы свидетельствуют, что функционирование большинства ростовых факторов, регулирующих рост мышечных тканей, происходит по сходной схеме (рис. 6, см. стр. 254), включающей стадию циркуляции факторов в кровотоке, что привлекает к ней особое внимание. Очень условно можно представить себе, что на разных стадиях онтогенеза в плазме крови и других биологических жидкостях формируются определенные соотношения между факторами, стимулирующими рост и пролиферацию миобластов (или сателлитных клеток), их дифференцировку, гипертрофию мышечных волокон и др., а также факторами, ингибирующими перечисленные процессы. Получить некоторое представление об этом позволяют биохимические исследования содержания в крови ростовых факторов и взаимодействующих с ними белков.

Установлено, что у здоровых людей межиндивидуальные различия в содержании ГР, ИФР-1 и ряда белков, способных их связывать, могут достигать 3–10 кратных величин [49, 57, 93, 124, 162]. Кроме того, важной особенностью эндокринной функции ГР считается то, что у мужчин поступление гормона в кровоток происходит импульсами (обычно от 2 до 9 за сутки), в промежутках между которыми концентрация гормона в крови находится на сравнительно низком уровне (5–10 нг/мл). В отличие от этого у женщин импульсы секреции ГР мало выражены, а базовый уровень ГР в крови заметно выше, чем у мужчин [93, 126, 124]. Обнаружены также существенные возраст-зависимые изменения в содержании ГР в крови [124, 162].

Если методы тестирования ГР, ИФР-1 и ряда белков, способных их связывать, уже более десяти лет назад прочно вошли в арсенал клинической биохимии и активно используются как в исследовательских, так и в диагностических целях [93, 124, 162, 168], то для количественного определения *MSTN* в крови (и биопсийных материалах) лишь сравнительно недавно появились соответствующие технологии [56, 82, 193]. Так, в 1998 г. был предложен метод радиоиммунного анализа, в котором применялся сравнительно короткий, меченный ^{125}I пептид В, представляющий собой фрагмент *MSTN* последовательности (349–365 а.о.), кроличьи поликлональные анти-

тела против него и вторые антитела против кроличьего IgG [56]. Этот тест был назван — «определение миостатин-иммунореактивного белка» и оказался весьма специфичным, поскольку перекрестные реакции с активином А, ингибином В и TGF- β 1 не превышали 1% при чувствительности около 10 нг/мл пептидного эквивалента. В результате проведенного анализа содержание МСТН в сыворотке крови здоровых людей ($n=42$) было оценено средней величиной в $290,5 \pm 12,9$ нг/мл при изменчивости от 140 до 490 нг/мл. В своей выборке авторы отметили существование обратной корреляции между уровнем миостатин-иммунореактивного белка и индексом свободной от жира массы тела (fat-free mass index, который рассчитывался в $\text{кг}/\text{м}^2$ — как отношение свободной от жира массы к возведенной в квадрат величине роста). Более того, сравнение уровней МСТН в крови здоровых индивидуумов с лицами, страдающими от СПИДа ($n=23$) и имевшими сниженную массу тела (не менее чем на 10% от нормы), показало достоверное увеличение этого фактора в крови больных [56].

В начале нового столетия появилась информация о разработке иммуноферментного теста на МСТН, и соответствующий набор был предложен фирмой BioVendor Laboratory Medicine Inc. (по www.immundiagnostik.com/produkte_ansicht.php?produktid=222). Однако в доступной литературе пока не удалось найти исследований, выполненных с его использованием.

Наряду с количественным анализом МСТН в крови, применяются методы количественной оценки этого фактора в мышечных биоптатах на основе Вестерн-блоттинга [82, 107]. Кроме того, для изучения изменений экспрессии гена МСТН активно используются методы определения соответствующей мРНК (Нозерн-блоттинг, RT-PCR и их различные комбинации) [90, 107].

В 1999 г. Зачвиеджа с соавт. [193] представили интересные результаты определения миостатин-иммунореактивного белка в сыворотке крови у лиц, которые 25 дней находились на строгом постельном режиме в условиях, моделирующих развитие функциональной мышечной гипотрофии. По окончании эксперимента испытуемые потеряли в среднем около 2,2 кг мышечной массы и при этом в их крови содержание миостатин-иммунореактивного белка увеличилось на 12% по сравнению с базовым уровнем, что дало основание для предположения о вовлеченности МСТН в процессы физиологической регуляции состояния скелетной мускулатуры и, в частности, в условиях космических полетов. С данными Зачвиеджа с соавт. [193] вполне коррелировали материалы, полученные и на других моделях [26]. Однако Кавада с соавт. [82], проанализировав содержание миостатина в мышцах мышц разного возраста и у животных, которые подверга-

лись 14 дней экспериментальной разгрузке мышц задних конечностей, пришли к заключению, что хотя МСНТ играет определенную роль в процессах роста мышц и формировании рабочей гипертрофии, но этот фактор не вовлечен в развитие возраст-зависимой атрофии или атрофии, индуцированной разгрузкой.

Прямым подтверждением вовлеченности МСНТ в развитие мышечной гипотрофии в условиях невесомости стали результаты исследований крыс, участвовавших в космическом полете на Шаттле [90]. У перенесших полет животных по сравнению с остававшимися на Земле особями было обнаружено повышение содержания в мышцах МСНТ и миостатиновой мРНК при снижении уровня мРНК ИФР-2.

Проведенные Ярашески с соавт. [191] анализы миостатин-иммунореактивного белка в крови пожилых людей показали, что с возрастом происходит повышение данного показателя, и это дало основание надеяться на возможность получения объективной оценки вклада МСНТ в развивающуюся с возрастом саркопению. Наряду с этим, по данным других авторов, уровень мРНК миостатина в мышцах пожилых людей существенно не изменен по сравнению с молодыми [182].

В 2003 г. было опубликовано сообщение о том, что в ответ на силовую тренировку (в течение 9 недель) в мышечных биоптатах 15 молодых и пожилых людей снижается уровень миостатиновой мРНК [142]. Однако эти авторы не обнаружили (возможно, из-за малого размера выборки) прямой корреляции между мышечной силой и уровнем экспрессии гена МСНТ.

По-видимому, количественные исследования МСНТ в крови и мышцах в ближайшем будущем позволят составить более полные представления о роли биохимической изменчивости данного фактора при различных физиологических и патологических процессах.

В периодической литературе пока не удалось найти публикаций о выявлении изоформ миостатина у высших позвоночных или аллельных вариантов этого фактора, однако в геномах рыб выявлено два неаллельных гена МСНТ, которые детерминируют образование изоформ этого фактора, различающихся по своим свойствам [135, 137]. Вместе с тем уже известно о существовании однонуклеотидного полиморфизма в гене МСНТ у человека. В частности, в исследованиях, охватывающих от нескольких десятков до нескольких сотен индивидуумов, был обнаружен ряд миссенс замен в экзонах 1 и 2 гена миостатина (A55T, K153R, E164K, P198A и I225T) [35, 42, 153]. Хотя эти замены и не затрагивали участка, кодирующего зрелый миостатин (т.е. экзон 3), имеются косвенные основания для предположения о том, что и такой полиморфизм в гене МСНТ может отражаться на состоянии мышечной системы, в частности аллель R153 оказался ассоциированным со снижением мышечной силы у женщин [153].

При исследованиях гена MSTN у коров, кроме описанных выше случаев нуль-мутаций и гетерозиготности по 11-нуклеотидной делеции, была обнаружена вариабельность длины экзона 3 (1701 или 1812 или 1887 нуклеотидов), а также наличие, как минимум, трех сайтов полиаденилирования в нетранслируемой 3'-области и другие виды полиморфизма [28, 76, 156]. Наряду с этим, имеется сообщение о выявлении трех однонуклеотидных полиморфизмов (SNP's) в гене MSTN свиней [78].

Таким образом, можно думать, что несомненно существующий полиморфизм гена MSTN должен вносить весомый вклад в биохимическую изменчивость данного фактора и, соответственно, отражаться на состоянии мышечной системы позвоночных.

Очевидно, что при рассмотрении проблем, связанных с регуляцией роста мышечных тканей, наряду с миостатином особое внимание следует уделить фоллистатину, поскольку этот белок, как отмечалось ранее, способен блокировать ингибирующие эффекты MSTN. Для количественного измерения фоллистатина разработано несколько вариантов РИА и ELISA [84, 173, 177], с их помощью удалось получить усредненные значения содержания этого фактора в сыворотке крови человека — $13,3 \pm 4,7$ мкг/л, при этом Вакатзуки с соавт. [173] не обнаружили статистически достоверных различий между мужчинами и женщинами. Однако при некоторых карциномах яичников наблюдалась гиперпродукция ФСТН, что дало основание для предложений об использовании теста на ФСТН в диагностике таких опухолей [177].

Ген ФСТН экспрессируется с альтернативным сплайсингом, в результате которого образуются две изоформы данного фактора, обозначаемые как FST317 и FST344 [176]. За счет трансляции альтернативного участка в экзоне 6 последовательность изоформы FST344 содержит в С-концевой области на 27 аминокислотных остатков больше, чем имеется в FST317. У человека уже известно не менее 10 аллельных вариантов ФСТН гена с однонуклеотидными заменами (SNP's) в структуре (табл. 6). Одна из причин значительного интереса к полиморфизму гена ФСТН связана с существующими указаниями на его важную роль в возникновении синдрома поликистоза яичников [165]. В целом, биохимическая изменчивость ФСТН не может не сказываться на состоянии системы активин-ингибиновых факторов и также должна влиять на равновесие между ФСТН и MSTN с соответствующими эффектами на скелетную мускулатуру [67].

В заключение этого раздела следует отметить, что за последние два-три года появилось несколько весьма интересных работ по изучению генетического полиморфизма ГР, ИФР-1 и ИФР-2. Так, Хасагава с соавт. [63] описали новые полиморфные варианты в гене ГР, ассоциированные с изменением продукции этого фактора и рос-

Таблица 6
Аллельные варианты фоллистанинового гена человека
 (по материалам сайта www.ncbi.nlm.nih.gov/,
 банк данных запись – NM 006350 – Homo sapiens follistatin (FST),
 transcript variant FST317, mRNA)

Позиция	Аллельные варианты	Позиция	Аллельные варианты
707	аллель «Т»	742	аллель «Т»
	аллель «А»		аллель «А»
714	аллель «G»	744	аллель «Т»
	аллель «А»		аллель «А»
715	аллель «Т»	746	аллель «Т»
	аллель «G»		аллель «А»
716	аллель «G»	1306	аллель «G»
	аллель «С»		аллель «А»
	аллель «А»		
735	аллель «G»		
	аллель «А»		

том. Делеллис с соавт. [39] сообщили о выраженном полиморфизме СА-динуклеотидных повторов в некодирующей области гена ИФР-1. По данным Гаунт с соавт. [51], некоторые однонуклеотидные замены в гене ИФР-2 коррелировали с показателями массы тела у мужчин.

Прямыми следствиями достижений в исследованиях биохимической изменчивости ростовых факторов (включая дефицитные состояния и проявления недостаточности при различных заболеваниях) стали многочисленные примеры применения этих биологически активных соединений в медицине (заместительная терапия и другие виды лечения) [25, 59, 132, 145, 168]. Наместились также попытки использования воздействий на миостатиновую регуляторную систему в интересах медицины и животноводства, но это требует специального обсуждения.

VI. ПУТИ БИОМЕДИЦИНСКОГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ НЕКОТОРЫХ БИОХИМИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ, РЕГУЛИРУЮЩИХ РОСТ МЫШЕЧНЫХ ТКАНЕЙ

Развитие биотехнологии, позволившее решить проблему получения значительных количеств различных ростовых факторов, пригодных для введения в организм человека, открыло фактически особую важную область в медикаментозном лечении и профилактике различных заболеваний. Основные потенциально возможные направления

(а также осложнения) по применению различных ростовых факторов в биомедицинских целях и, в частности, для воздействия на скелетную мускулатуру можно контурно охарактеризовать, исходя из уже имеющихся материалов об использовании ГР и функционально связанного с ним ИФР-1 [25, 70, 124, 168].

Уже несколько десятилетий человеческий ГР (сначала препараты, выделяемые из ткани гипофиза, а с середины 80-х – рекомбинантные продукты) применяется в заместительной терапии при определенных формах дефицита гормона роста, как у детей, так и у взрослых [25, 124, 168]. К настоящему времени в разных странах по данной проблеме накоплен обширный материал, охватывающий сотни, и даже более десятка тысяч пациентов с дефицитом ГР. Полученные данные убедительно свидетельствуют о высокой результативности долговременной заместительной терапии при сравнительно небольшом риске побочных эффектов [6, 25, 124, 132, 168,]. Наряду с этим, активно продолжаются разработки новых схем применения препаратов ГР (а также его различных комбинаций с ИФР-1 и/или с другими лекарственными средствами), призванные повысить эффективность лечения и снизить возможность осложнений [6, 70, 132].

Способности ГР и ИФР-1 снижать концентрацию глюкозы в крови (инсулино-подобный эффект), а также стимулировать различные анаболические процессы, находят применение при лечении весьма распространенных заболеваний, таких как диабет и некоторые формы сердечно-сосудистой патологии [70, 83]. Особо следует подчеркнуть, что инсулино-подобные эффекты ИФР-1 весьма успешно используются при терапии диабета 1 и 2 типов, с этими целями пациентам вводят рекомбинантные препараты ИФР-1 [32, 36, 93]. Наряду с этим, большое значение придается терапии ГР для коррекции нарушений углеводного и липидного обмена при так называемом «метаболическом» синдроме, который особенно часто развивается у жителей благополучных стран, ведущих малоподвижный образ жизни [70, 169]. Это способствует профилактике некоторых смертельно опасных и ведущих к инвалидности заболеваний, в частности, инсультов, инфарктов миокарда и сахарного диабета 2 типа, в патогенезе которых важную роль играет «метаболический» синдром.

Имеется ряд публикаций об относительно успешных попытках использования анаболических свойств ГР и ИФР-1 для лечения различных миопатий [33, 102, 171, 181], синдрома Турнера [66, 168], а также некоторых других наследственных и врожденных заболеваний [6, 168]. Вместе с тем у больных СПИДом существенных результатов не получено [94, 178].

Целое направление в использовании ГР и ИФР-1 связано с разработками поддерживающей терапии для лиц пожилого возраста [15,

91, 139]. На основе многочисленных данных о том, что с наступлением старости постепенно снижается уровень ГР, ИФР-1 и некоторых других белков, обеспечивающих их функционирование, сложилось представление о важной роли этих факторов в процессах старения [91, 139]. Соответственно, показатели уровней ГР, ИФР-1, ИФРСБ-3 и др. используются для контроля эффективности реабилитационных мероприятий, а курсовые назначения рекомбинантных ГР и ИФР-1 применяют при различных видах восстановительного лечения в пожилом возрасте [15, 91], в частности, для улучшения функционирования дыхательной мускулатуры в послеоперационном периоде [41].

Особая ситуация с применением ГР и ИФР-1 сложилась в спортивной медицине. С одной стороны, установлено, что существует определенная зависимость между содержанием в крови ГР, ИФР-1 и других белков, которые обеспечивают их функционирование, и различными показателями, характеризующими физическую работоспособность спортсменов [38, 87, 115]. Более того, в некоторых публикациях сообщалось о получении у лиц, проходивших программы силовых тренировок, позитивного эффекта на скелетную мускулатуру и иные системы организма при воздействии терапевтических или даже меньших доз ГР (и ИФР-1) лицам, проходившим программы силовых тренировок [44, 190]. С другой стороны, известно, что некоторые спортсмены из-за стремления к рекордам используют высокие дозы ГР (а также ИФР-1) без объективных показаний [13, 20, 138]. Подобное применение ГР рассматривается как допинг, однако выявление данного препарата сопряжено с рядом трудностей из-за идентичности структур рекомбинантного и природного ГР, достаточно быстрого выведения гормона из кровотока и др. Соответствующие обследования спортсменов проводились на Олимпиаде в Сиднее и других соревнованиях [13, 20]. Для решения этой проблемы был предложен специальный сравнительный анализ изоформ ГР [174]; в настоящее время продолжаются разработки эффективного допинг-контроля за ГР [38].

Как отмечалось ранее, фундаментальные исследования свойств МСТН показали, что этот ростовой фактор по своему физиологическому действию на скелетную мускулатуру является антагонистом ГР и ИФР-1 [52, 85, 95, 104]. Исходя из этих данных, возникли идеи о создании и биомедицинском использовании технологий, основанных на подавлении эффектов МСТН, что должно оказывать стимулирующее влияние на рост, развитие, регенерацию и/или функционирование мышечных тканей. Наиболее активно обсуждаются следующие перспективные направления применения биотехнологических способов блокирования действия миостатина:

- повышение мышечной работоспособности у лиц, работающих в условиях повышенных нагрузок, в частности в спортивной медицине [82, 142];

- реабилитация лиц, подвергавшихся экстремальным воздействиям на опорно-двигательный аппарат (в частности, в условиях длительного космического полета) [90, 193];

- повышение мышечной работоспособности у лиц пожилого возраста [142, 191];

- для лечения пациентов с мышечными гипотрофиями и атрофиями, включая больных наследственными миопатиями [21, 56, 172, 185];

- для выведения новых пород животных с повышенной мышечной массой в интересах животноводства [14, 61, 85].

Более того, в некоторых экспериментальных работах удалось реализовать соответствующие замыслы.

В частности, весьма многообещающими представляются данные об улучшении состояния скелетной мускулатуры у экспериментальных моделей миодистрофии Дюшенна при блокировании МСТН, которые были представлены в статье Богданович с соавт. [21]. Четырехнедельным мышам-самцам известной линии mdx авторы вводили внутривенно моноклональные антитела против миостатина, причем предварительно было установлено, что эти антитела способны ингибировать взаимодействие миостатина с рецептором ActRIIB. Инъекции осуществлялись еженедельно на протяжении 3 месяцев, в качестве основного контроля использовались mdx мыши, которым вводился свободный от антител растворитель. Кроме того, некоторые показатели сопоставляли с данными для мышей линии C57/BL10, ставшей основой для выведения модельной линии mdx.

Фактически еще перед началом основных исследований было показано, что в культурах миобластов через 3 ч после обработки блокирующими антителами происходит снижение по сравнению с контролем содержания Smad2 и Smad3 — белков, обеспечивающих сигналинг от рецепторов ActRIIB, с которыми по существующим материалам взаимодействует МСТН.

За трехмесячный период наблюдений у опытной группы мышей отмечалось достоверное повышение веса тела и улучшение ряда других морфометрических показателей. Более того, при детальном изучении отдельных мышечных групп (extensor digitorum longus и некоторых других) было обнаружено, что введение блокирующих антител привело к статистически доказанному увеличению мышечной силы, а также площади единичных волокон и уменьшению ряда гистологически регистрируемых признаков мышечного распада. Особенно важным, по-видимому, следует признать практически трехкратное падение уровня креатинфосфокиназы в крови пролеченных животных, поскольку выход этого мышечного фермента обычно

рассматривают как признак, отражающий интенсивность процесса миодистрофии [2, 7, 9]. Таким образом, авторы пришли к выводу, что связывание антител против МСТН с этим фактором может блокировать биологическую активность последнего и стать основой для разработок новых подходов к лечению миодистрофий. Сходные материалы о действии антител против МСТН были недавно представлены в двух других публикациях [172, 185].

В нескольких работах показано, что достаточно специфически блокировать МСТН могут имеющиеся в плазме крови фоллистатин и некоторые фоллистатин-родственные белки [67, 95, 123, 163, 164]. Это позволяет думать о создании методики их применения или рекомбинантных препаратов, содержащих соответствующие сайты связывания, вместо анти-МСТН антител или в комбинации с ними. Более того, уже в 2003 г. появилось сообщение о новом белке, найден-

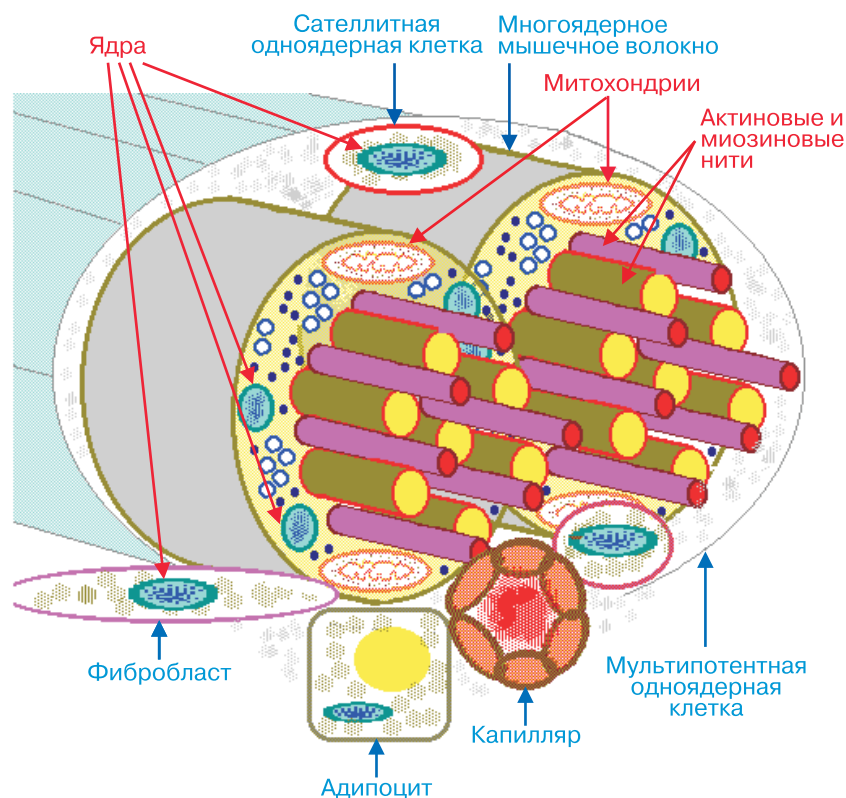


Рис. 1. Схематическое строение скелетной мышцы: многоядерные мышечные волокна с сопутствующими одноядерными клетками (по [5, 10, 69, 128]).

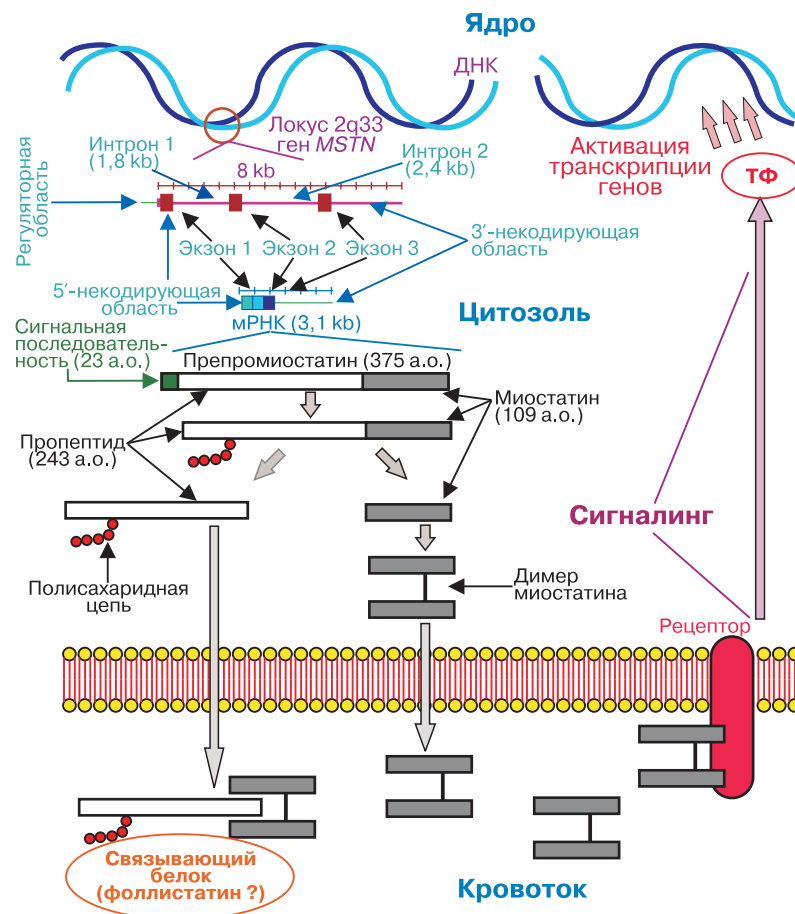


Рис. 2. Основные особенности строения и экспрессии гена MSTN.

ТФ – транскрипционные факторы (по [56, 67, 72, 92, 97, 104, 106, 116, 157, 193]).

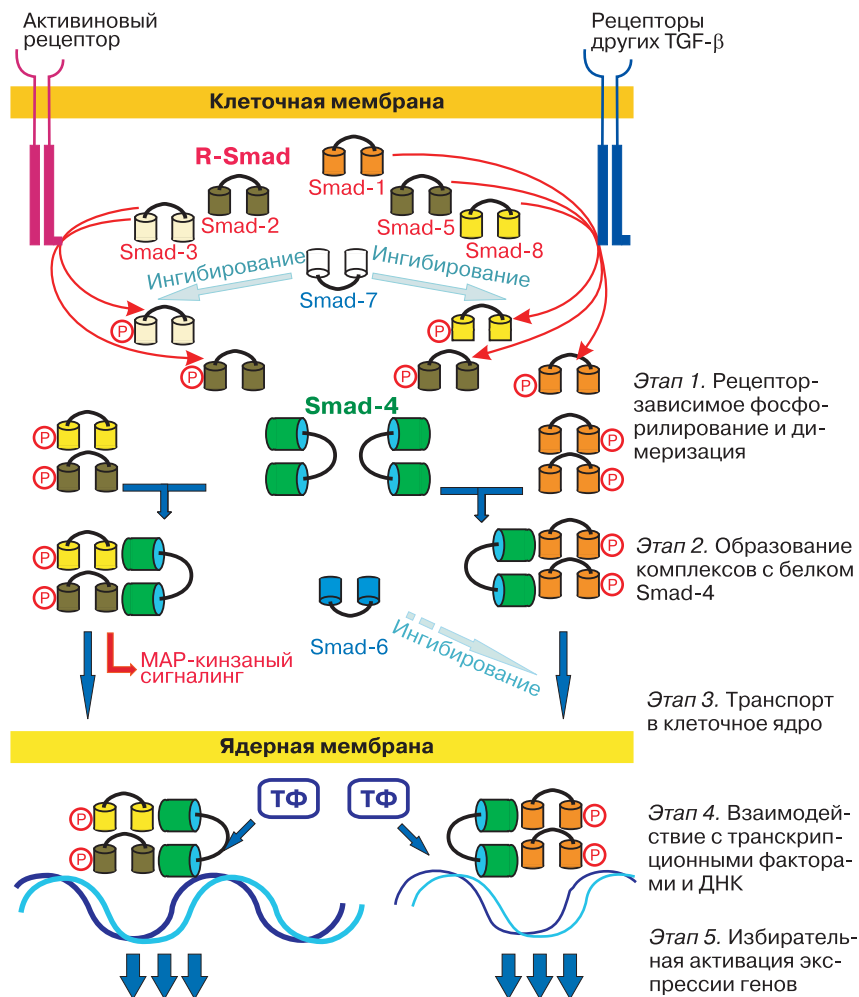


Рис. 3. Схема Smad-сигналинга (описание в тексте) (по [17, 74, 125]).

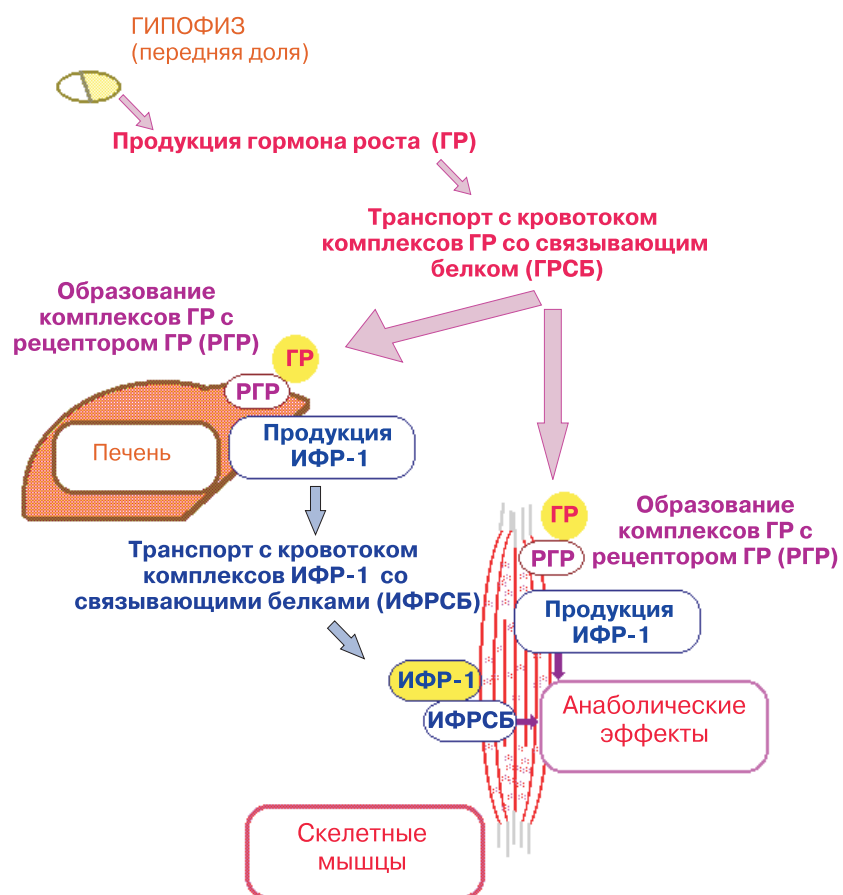


Рис. 4. Схема контроля за ростом мышечных тканей регуляторной системы «Гормон роста – ИФР-1» (по [46, 93, 124]).

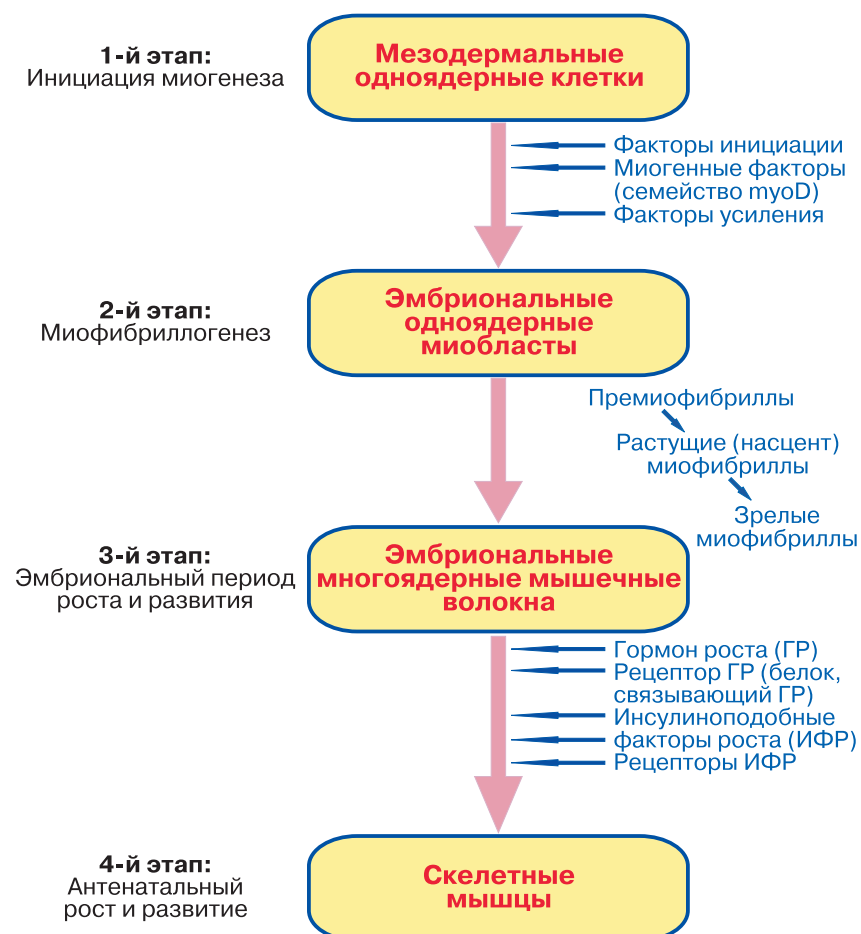


Рис. 5. Общие представления о многоступенчатом характере морфогенетических процессов, происходящих с мышечными клетками в процессе развития (по [18, 46, 147, 148, 152]).

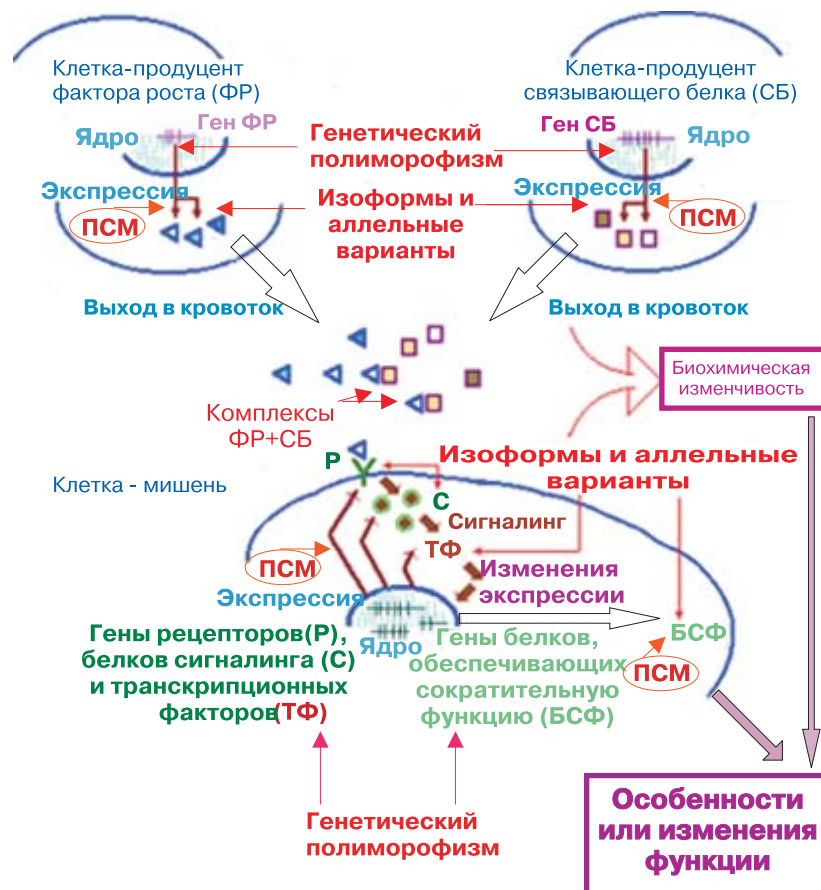


Рис. 6. Общая схема функционирования ряда белковых ростовых факторов, регулирующих рост мышечных тканей.

БСФ – белки, обеспечивающие сократительную функцию; ПСМ – постсинтетические модификации белков; Р – белки-рецепторы; С – белки, обеспечивающие сигналинг; СБ – белки, связывающие факторы роста; ФР – факторы роста; ТФ – транскрипционные факторы (по [60, 92, 95, 104]).

ном в плазме крови, который содержит несколько фолистатин-родственных доменов и потенциально способен связывать МСТН [68].

Возможно, что практическое применение подхода, ориентированного на связывание МСТН, циркулирующего в кровотоке, уже началось. Так, недавно на ряде сайтов в сети «Интернет» (<http://www.enutrition.com/chammyos120c.html>; http://www.undergroundsports.com/myostat_study.html; http://www.n101.com/Static/Products/myo-blast_csp3_010142home.html) была представлена информация о создании нескольких новых препаратов, резко стимулирующих развитие мышечных тканей человека (Myostim, Myostat, Myo-Blast CSP3 и др.).

По утверждениям фирм-разработчиков, механизм действия этих препаратов связан с «нейтрализацией» присутствующего в крови МСТН, результатом чего становится рост мышечной массы при выраженном уменьшении жировой клетчатки в организме. В их рекламных сообщениях отмечается, что указанные препараты содержат в качестве основного действующего начала сульфатированный полисахарид (Fraction C), который был получен из морских водорослей *Cystoseira canariensis*, первоначально найденных у Канарских островов. Сообщается также, со ссылкой на эксперименты *in vitro*, проведенные биохимиками Университета в Las Palmas (Испания), что фракция C способна специфически связывать миостатин. Однако в научной периодике соответствующие публикации пока отсутствуют.

По всей видимости, нейтрализация биологических эффектов миостатина может быть достигнута воздействиями на разные участки сложного пути от гена МСТН к физиологическому результату. Соответственно, для решения многих задач, связанных с повышением потенциала скелетной мускулатуры, потребуется создание эффективных методик, которые способны снимать миостатиновое ингибирование роста мышечных тканей.

VII. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Открытие миостатина и результаты фундаментальных исследований его свойств, а также целого комплекса белков, взаимодействующих с этим фактором, наглядно демонстрируют сложный и многоуровневый характер контроля за ростом мышечных тканей у позвоночных. Более того, вполне вероятно, что новые успехи в расшифровке геномной информации человека и других организмов расширят наши представления о биохимических механизмах, обеспечивающих существующее внутривидовое разнообразие роста-весовых характеристик, включая функциональный потенциал мышечной системы.

За последние 3–4 года можно отметить явную тенденцию к интенсификации и углублению работ по изучению МСТН, его гена и различных белков, участвующих в реализации биологических эффектов МСТН. При этом все большее число авторов сосредотачивают свое внимание на решении биомедицинских вопросов, связанных с функционированием МСТН и его партнеров по управлению за состоянием мышечных тканей. Особо следует подчеркнуть, что определенные шаги к использованию результатов исследования миостатиновой системы уже сделаны в космической биологии [90, 193], в спортивной медицине [142] и для создания новых методов лечения заболеваний, сопровождающихся мышечными атрофиями, включая наследственные миодистрофии [21, 172, 185].

Имеющийся обширный опыт использования рекомбинантных препаратов гормона роста, ИФР-1 и других ростовых факторов свидетельствует о том, что современная медицина не только допускает (по определенным показаниям) применение подобных биологически активных веществ, но и добивается с их помощью успехов в лечении многих болезней [6, 25, 124, 132, 168]. Таким образом, разработки биохимических методов целенаправленного воздействия на регуляторную миостатиновую систему можно рассматривать как весьма перспективное направление в современных биомедицинских исследованиях.

ЛИТЕРАТУРА

1. Волков Н.И., Несен Э.Н., Осипенко А.А., Корсун С.Н. (2000) Биохимия мышечной деятельности. Изд-во «Олимпийская литература». Киев. 286–485.
2. Горбунова В.Н., Е.А. Савельева-Васильева, Красильников В.В. (2000) Молекулярная неврология. Часть 1. Заболевания нервно-мышечной системы. Изд-во «Интермедика». Санкт-Петербург. 19–190.
3. Зенгбуш П. (1982) Молекулярная и клеточная биология. Изд-во «Мир». М. т. 3. 235–244.
4. Марри Р., Греннер Д., Мейес П., Родуэлл В. (1993) Биохимия человека. Изд-во «Мир» М. 384 с.
5. Терехов С.М., Крохина Т.Б., Шишкин С.С., Крахмалева И.Н., Захаров С.Ф., Ершова Е.С. (2001) Известия АН. Серия биологическая. №6. 745–752.
6. Царегородцев А.Д., Казанцева Л.З., Новиков П.В., Семякина А.Н., Белова Н.А. (2000) Росс. Вестн. Перинатол. и педиатрии. № 3. 43–46.
7. Шаховская Н.И., Шишкин С.С., Скозобцева Л.Ф., Шаховский В.А., Родионова Н.И., Лунга И.Н., Тарки М.А., Герасимова Н.Л., Крахмалева И.Н. (1999) Журнал неврологии и психиатрии, **99**, № 6, 23–26.
8. Шишкин С.С., Ковалев Л.И., Громов П.С. (2000) Функциональная геномика человека и протеомика, как раздел функциональной геномики. В кн: «Многоликость современной генетики человека» под ред. С.С.Шишкина. Москва–Уфа. Изд-во «Гилем». 17–50.
9. Шишкин С.С., Шаховская Н.И., Лунга И.Н. и др. (2000) Наследственные нервно-мышечные заболевания, некоторые проблемы оказания помощи больным иотягощенным семьям. В кн: «Многоликость современной генетики человека» под ред. С.С.Шишкина. Москва–Уфа. Изд-во «Гилем». 197–276.

10. Allbrook D. (1981) *Muscle Nerve*. **4**. 234–245.
11. Anderson J.E. (2000) *Mol. Biol. Cell.* **11**. 1859–1874.
12. Argetsinger L.S., Norstedt G., Billestrup N., White M.F., Carter-Su C. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**. 29415–29421.
13. Armanini D., Faggian D., Scaroni C., Plebani M. (2002) *Br. J. Sports Med.* **36**. 148–149.
14. Arthur P.F. (1995) *Aust. J. Agric. Res.* **46**. 1493–1515.
15. Arvat E., Ceda G., Ramunni J., Lanfranco F., Aimaretti G., Gianotti L., Broglio F., Ghigo E. (1998) *Clin. Endocrinol.* **49**. 757–763.
16. Bergstrom D.A., Penn B.H., Strand A., Perry R.L.S., Rudnicki M.A., Tapscott S.J. (2002) *Molec. Cell*. **9**. 587–600.
17. Bernard D.J., Chapman S.C., Woodruff T.K. (2001) *Recent Prog. Horm. Res.* **56**. 417–450.
18. Black B.L., Olson E.L. (1998) *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **14**. 167–196.
19. Blair H.T., McCutcheon S.N., Mackenzie D.D., Ormsby J.E., Siddiqui R.A., Breier B.H., Gluckman P.D. (1988) *Endocrinology*. **123**. 1690–1692.
20. Bidlingmaier M., Wu Z., Strasburger C.J. (2001) *J. Pediatr. Endocrinol. Metab.* **14**. 1077–1083.
21. Bogdanovich S., Krag T.O., Barton E.R., Morris L.D., Whittemore L.A., Ahima R.S., Khurana T.S. (2002) *Nature*. **420**. 418–421.
22. Brill K.T., Weltman A.L., Gentili A., Patrie J.T., Fryburg D.A., Hanks J.B., Urban R.J., Veldhuis J.D. (2002) *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **87**. 5649–5657.
23. Carbo N., Lopez-Soriano J., Costelli P., Alvarez B., Busquets S., Baccino F.M., Quinn L.S., Lopez-Soriano F.J., Argiles J.M. (2001) *Biochim. Biophys. Acta*. **1526**. 17–24.
24. Carcamo J., Weis F.M., Ventura F., Wieser R., Wrana J.L., Attisano L. Massague J. (1994) *Mol. Cell. Biol.* **14**. 3810–3821.
25. Carel J.C., Ecosse E., Nicolino M., Tauber M., Leger J., Cabrol S., Bastie-Sigeac I., Chaussain J.L., Coste J. (2002) *BMJ*. **325**. 70–76.
26. Carlson C.J., Booth F.W., Gordon S.E. (1999) *Am. J. Physiol.* **277** (Regulatory Integrative Comp. Physiol. 46) R601–R606.
27. Carter-Su C., Smit L.S. (1998) *Recent Prog. Horm. Res.* **53**. 61–82.
28. Casas E., Shackelford S.D., Keele J.W., Stone R.T., Kappes S.M., Koohmaraie M. (2000) *J. Anim. Sci.* **78**. 560–569.
29. Charlier C., Coppieters W., Farnir, F., Grobet L., Leroy P.L., Michaux C., Mni M., Schweser A., Vanmanshoven P., Hanset R., Georges M. (1995) *Mamm. Genome*. **6**. 788–792.
30. Chen W., Woodruff T.K., Mayo K.E. (2000) *Endocrinology*. **141**. 1263–1272.
31. Chong H., Pangas S.A., Bernard D.J., Wang E., Gitich J., Chen W., Draper L.B., Cox E.T., Woodruff T.K. (2000) *Endocrinology*. **141**. 2600–2607.
32. Christ E.R., Carroll P.V., Albany E., Umpleby A.M., Lumb P.J., Wierzbicki A.S., Sonksen P.H., Russell-Jones D.L. (2002) *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **282**. E1154–E1162.
33. Cittadini A., Comi I.L., Longobardi S., Rocco P.V., Casaburi C., Passamano L., Merola B., Durante-Mangoni E., Sacca L., Politano L. (2003) *Eur. Heart J.* **24**. 664–672.
34. Coerver K.A., Woodruff T.K., Finegold M.J., Mather J., Bradley A., Matzuk M.M. (1996) *Mol. Endocrinology*. **10**. 534–543.
35. Corsi A.M., Ferrucci L., Gozzini A., Tanini A., Brandi M.L. (2002) *J. Am. Geriatr Soc.* **50**. 1463.
36. Crowne E.C., Samra J.S., Cheetham T., Acerini C.L., Watts A., Holly J.M., Dunger D.B. (2001) *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **86**. 3686–3691.
37. Davis R.L., Weintraub H., Lassar A.B. (1987) *Cell*. **51**. 987–1000.
38. De Palo E.F., Gatti R., Lancerin F., Cappellin E., Spinella P. (2001) *Clin. Chim. Acta*. **305**. 1–17.
39. DeLellis K., Ingles S., Kolonel L., McKean-Cowdin R., Henderson B., Sranzyk F., Probst-Hensch N.M. (2003) *Br. J. Cancer*. **88**. 277–282.
40. Dull T.J., Gray A., Hayflick J.S., Ulbrich A. (1984) *Nature*. **310**. 777–781.
41. Felbinger T.W., Suchner U., Goetz A.E., Briegel J., Peter K. (1999) *Crit. Care Med.* **27**. 1634–1638.

42. Ferrell R.E., Conte V., Lawrence E.C., Roth S.M., Hagberg J.M., Hurley B.F. (1999) *Genomics*. **62**. 203–207.
43. Firth S.M., Baxter R.C. (2002) *Endocr. Rev.* **23**. 824–854.
44. Frisch H. (1999) *J. Endocrinol. Invest.* **22** (5 Suppl) 106–109.
45. Fisker S., Kristensen K., Rosenfalck A.M., Pedersen S.B., Ebdrup L., Richelsen B., Hilsted J., Christiansen J.S., Jorgensen J.O. (2001) *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **86**. 792–796.
46. Florini J.R., Ewton D.Z., Coolican S.A. (1996) *Endocr. Rev.* **17**. 481–517.
47. Florini J.R., Ewton D.Z., Roof S.L. (1991) *Mol. Endocrinol.* **5** 718–724.
48. Foley H.A., Ofori-Aquah S.F., Yoshimura A., Critz S., Baliga B.S., Pace B.S. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**. 16211–16219.
49. Frisch H. (1999) *J. Endocrinol. Invest.* **22** (5 Suppl). 106–109.
50. Furuhashi Y., Yonezawa T., Takahashi M., Nishihara M. (2002) *J. Endocrinol.* **172**. 127–136.
51. Gaunt T.R., Cooper J.A., Miller G.J., Day I.N., O'Dell S.D. (2001) *Hum. Mol. Genet.* **10**. 1491–1501.
52. Glass D.J. (2003) *Nature Cell Biology*. **5**. 87–90.
53. Gluckman P.D., Grumbach M.M., Kaplan S.L. (1981) *Endocr. Rev.* **2**. 363–395.
54. Godowski P.J., Leung D.W., Meacham L.R., Galgani J.P., Hellmiss R., Keret R., Rotwein P.S., Parks J.S., Laron Z., Wood W.I. (1989) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. **86**. 8083–8087.
55. Goldspink G. (2000) *Br. J. Sports Med.* **34**. 159–161.
56. Gonzalez-Cadavid N.F., Taylor W.E., Yarasheski K., Sinha-Hikim I. Ma K., Ezzat S., Shen R., Lalani R., Asa S., Mamita M., Nair, G., Arver S., Bhasin S. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **95**. 14938–14943.
57. Gourmelen M., Le Bouc Y., Girard F., Binoux M. (1984) *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **59**. 1197–1203.
58. Gray P.C., Greenwald J., Blount A.L., Kunitake K.S., Donaldson C.J., Choe S., Vale W. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**. 3206–3212.
59. Grinspoon S., Miller K., Herzog D., Clemmons D., Klibanski A. (2003) *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **88**. 1142–1149.
60. Grobet L., Martin L.J.R., Poncelet D., Pirottin D., Brouwers B., Riquet J., Schoeberlein A., Dunner S., Menissier F., Massabanda J., Fries R., Hanset R., Georges M. (1997) *Nature Genet.* **17**. 71–74.
61. Grobet L., Poncelet D., Royo L.J., Brouwers B., Pirottin D., Michaux C., Menissier F., Zanotti M., Dunner S., Georges M. (1998) *Mamm. Genome*. **9** 210–213.
62. Hajdich E., Litherland G.J., Hundal H.S. (2001) *FEBS Lett.* **492**. 199–203.
63. Hasegawa Y., Fujii K., Yamada M., Igarashi Y., Tachibana K., Tanaka T., Onigata K., Nishi Y., Kato S., Hasegawa T. (2000) *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **85**. 1290–1295.
64. Hasty P., Bradley A., Morris J.H., Edmondson D.G., Venuti J.M., Olson E.N., Klein W.H. (1993) *Nature*. **364**. 501–506.
65. Heldin C.-H., Miyazono K, ten Dijke P. (1997) *Nature*. **390**. 465–471.
66. Henwood M.J., Grimberg A., Moshang T. (2002) *Curr. Opin. Pediatr.* **14**. 437–4342.
67. Hill J.J., Davies M.V., Pearson A.A., Wang J.H., Hewick R.M., Wolfman N.M., Qiu Y. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**. 40735–40741.
68. Hill J.J., Qiu Y., Hewick R.M., Wolfman N.M. (2003) *Mol. Endocrinol.* **17**. 1144–1154.
69. Hohlfeld R., Engl A.G. (1994) *Immunology Today*. **15**. 269–274.
70. Holt R.I., Simpson H.L., Sonksen P.H. (2003) *Diabet Med.* **20**. 3–15.
71. Horsley V., Pavlath, G. K. (2002) *J. Cell Biol.* **156**. 771–774.
72. Huet C., Li Z.F., Liu H.Z., Black R.A., Galliano M.F., Engvall E. (2001) *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* **281**. C1624–C1634.
73. Huylebroeck D., Van Nimmen K., Waheed A., von Figura K., Marmenout A., Fransen L., De Waele P., Jaspard J.-M., Franchimont P., Stunnenberg H., Van Heuverswijn, H. (1990) *Mol. Endocrinol.* **4**. 1153–1165.

74. Inman J., Hill C. S. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**. 51008–51016.
75. Jansen M., van Schaik F.M.A., van Tol H., Van den Brande J.L., Sussenbach J.S. (1985) *FEBS Lett.* **179**. 243–246.
76. Jeanplong F., Sharma M., Somers W.G., Bass J.J., Kambadur R. (2001) *Mol. Cell. Biochemistry*. **220**. 31–37.
77. Ji S., Losinski R.L., Corneliuss S.G., Frank G.R., Willis G.M., Gerrand D.E., Depreux F.F.X., Spurlock M.E. (1998) *Am. J. Physiol.* **275**. 1265–1273.
78. Jiang Y.L., Li N., Plastow G., Liu Z.L., Hu X.X., Wu C.X. (2002) *Anim. Biotechnol.* **13**. 173–178.
79. Kanda F., Takatani K., Okuda S., Matsushita T., Chihara K. (1999) *Muscle Nerve*. **22**. 213–217.
80. Kang H.Y., Huang K.E., Chang S.Y., Ma W.L., Lin W.J., Chang C. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**. 43749–43756.
81. Kang H.Y., Yeh S., Fujimoto N., Chang C. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**. 8570–8576.
82. Kawada S., Tachi C., Ishii N. (2001) *J. Muscle Res. Cell Motil.* **22**. 627–633.
83. Khan A.S., Sane D.C., Wannenburg T., Sonntag W.E. (2002) *Cardiovasc. Res.* **54**. 25–35.
84. Khoury R.H., Wang Q.F., Crowley W.F., Hall J.E., Schneyer A.L., Toth T., Midgley A.R., Sluss P.M. (1995) *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **80**. 1361–1368.
85. Kocamis H., Killefer J. (2002) *Domestic Animal Endocrinology*. **23**. 447–454.
86. Kovalyov L.I., Shishkin S.S., Efimochkin A.S., Kovalyova M.A., Ershova E.S., Egorov T.A., Musalyamov A.K. (1995) *Electrophoresis*. **16**. 1160–1169.
87. Kraemer W.J., Hakkinen K., Newton R.U., Nindl B.C., Volek J.S., McCormick M., Gotshalk L.A., Gordon S.E., Fleck S.J., Campbell W.W., Putukian M., Evans W.J. (1999) *J. Appl. Physiol.* **87**. 982–992.
88. Kretser de D.M., Hedger M.P., Phillips D.J. (1999) *J. Endocrinology*. **161**. 195–198.
89. Law P.K. (1994) *Myoblast transfer: Gene Therapy for Muscular Dystrophy*. CRC Press, 164 p.
90. Lalani R., Bhasin S., Byhower F., Tar-nuzzer R., Grant M., Shen R., Asa S., Ezzat S., Gonzalez-Cadavid N.F. (2000) *J. Endocrinology*. **167**. 417–428.
91. Lange K.H., Isaksson F., Juul A., Rasmussen M.H., Bulow J., Kjaer M. (2000) *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **279**. E989–E996.
92. Langley B., Thomas M., Bishop A., Sharma M., Gilmour S., Kambadur R. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**. 49831–49840.
93. Le Roith D., Bondy K., Yakar S., Liu J.-L., Butler A. (2001) *Endocrine Reviews*. **22**. 53–74.
94. Lee P.D., Pivarnik J.M., Bukar J.G., Muurahainen N., Berry P.S., Skolnik P.R., Nerad J.L., Kudsk K.A., Jackson L., Ellis K.J., Gesundheit N. (1996) *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **81**. 2968–2975.
95. Lee S.J., McPherron A.C. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **98**. 9306–9311.
96. Leung D.W., Spencer S.A., Cachianes G., Hammonds R.G., Collins C., Henzel W.J., Barnard R., Waters M.J., Wood W.I. (1987) *Nature*. **330**. 537–543.
97. Ma K., Mallidis C., Artaza J., Taylor W., Gonzalez-Cadavid N., Bhasin S. (2001) *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **281**. E1128–E1136.
98. Ma K., Mallidis C., Bhasin S., Mahabadi V., Artaza J., Gonzalez-Cadavid N., Arias J., Salehian B. (2003) *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **285**. E363–E371.
99. Maguer-Satta V.V., Bartholin L., Jeanpierre S., Ffrench M., Martel S., Magaud J.P., Rimokh R. (2003) *Exp. Cell. Res.* **282**. 110–120.
100. Marcell T.J., Harman S.M., Urban R.J., Metz D.D., Rodgers B.D., Blackman M.R. (2001) *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **281**. E1159–E1164.
101. Massaguer J., Blain S.W., Lo R.S. (2000) *Cell*. **103**. 295–309.
102. Matsuzaki M., Izumi T., Shishikura K., Suzuki H., Hirayama Y. (2002) *Neuropediatrics*. **33**. 271–273.
103. Matzuk M.M., Lu N., Vogel H., Sellheyer K., Roop D.R., Bradley A. (1995) *Nature*. **374**. 360–363.
104. McPherron A.C., Lawler A.M., Lee S.-J. (1997) *Nature*. **387**. 83–90.

105. McPherron A.C., Lawler A.M., Lee S.J. (1999) *Nat. Genet.* **22**. 260–264.
106. McPherron, A.C., Lee S.-J. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **94**. 12457–12461.
107. Mendler L., Zador E., Ver Heyen M., Dux L., Wuytack F. (2000) *J. Muscle Res. Cell Motil.* **21**. 551–563.
108. Migliaccio E., Giorgio M., Mele S., Pelicci G., Reboldi P., Pandolfi P.P., Lanfrancone L., Pelicci P.G. (1999) *Nature.* **402**. 309–313.
109. Miller K.J., Thaloor D., Matteson S., PavlaTH G.K. (2000) *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **278**. C174–C181.
110. Molkenstin J.D., Black B.L., Martin J.F., Olson E.N. (1995) *Cell.* **83**. 1125–1136.
111. Molkenstin J.D., Lu J.R., Antos C.L., Markham B., Richardson J., Robbins J., Grant S.R., Olson E.N. (1998) *Cell.* **93**. 215–228.
112. Montero M., Yon L., Kikuyama S., Dufour S., Vaudry H. (2000) *J. Mol. Endocrinology.* **25**. 157–168.
113. Morton C.C., Byers M.G., Nakai H., Bell G.I., Shows T.B. (1986) *Cytogenet. Cell Genet.* **41**. 245–249.
114. Nabeshima Y., Hanaoka K., Haya-saka M., Esumi E., Li S., Nonaka I., Nabeshima Y.-I. (1993) *Nature.* **364**. 532–535.
115. Naughton G., Farpour-Lambert N.J., Carlson J., Bradney M., Van Praagh E. (2000) *Sports Med.* **30**. 309–325.
116. Nishi M., Yasue A., Nishimatu S., Nohno T., Yamaoka T., Itakura M., Moriyama K., Ohuchi H., Noji S. (2002) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **293**. 247–251.
117. Olson E.N. (1990) *Genes Dev.* **4**. 1454–1461.
118. Ornitz D.M., Itoh N. (2001) *Genome Biology.* **2**. (reviews3005) 1–12.
119. Ott M.-O., Bober E., Lyons G., Arnold H.-H., Buckingham M. (1991) *Development.* **111**. 1097–1107.
120. Palma M.M., Fernandez M., Vivanco X., Pino A.M. (2002) *Int. J. Androl.* **25**. 288–294.
121. Pedersen B.K., Steensberg A., Schj-erling P. (2001) *J. Physiology.* **536**. 329–337.
122. Pelicci G., Lanfrancone L., Grignani F., McGlade J., Cavallo F., Forni G., Nicoletti I., Grignani F., Pawson T., Pelicci P.G. (1992) *Cell.* **70**. 93–104.
123. Phillips D.J., Kretser de D.M. (1998) *Front Neuroendocrinol.* **19**. 287–322.
124. Phillips J.A. III (1995) Inherited defects in growth hormone synthesis and action. In: *The metabolic and molecular basis of inherited disease*. Ed. by C.R. Scriver, A.L. Beaudet, W.S. Sly, D. Valle. 7-th Edition. McGraw-Hill Health Professions Division.. Vol. II. 3023–3044.
125. Piek E., Heldin C.H., Ten Dijke P. (1999) *FASEB J.* **13**. 2105–2124.
126. Pincus S.M., Gevers E.F., Robinson I.C., van den Berg G., Roelfsema F., Hartman M.L., Veldhuis J.D. (1996) *Am. J. Physiol.* **270**. E107–E115.
127. Ponce-Castaneda M.V., Esparza-Lopez J., Vilchis-Landeros M.M., Mendoza V., Lopez-Casillas F. (1998) *Biochim. Biophys. Acta.* **1384**. 189–196.
128. Purslow P.P. (2002) *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* **133**. 947–966.
129. Quinn L.S., Anderson B.G., Drivdahl R.H., Alvarez B., Argiles J.M. (2002) *Exp. Cell. Res.* **280**. 55–63.
130. Quinn L.S., Haugk K.L., Damon S.E. (1997) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **239**. 6–10.
131. Radaelli G., Rowleron A., Mascarello F., Patrino M., Funkenstein B. (2003) *Cell Tissue Res.* **311**. 239–250.
132. Radetti G., Buzi F., Paganini C., Pilot-ta A., Felappi B. (2003) *Eur. J. Endocrinol.* **148**. 515–518.
133. Ramana C.V., Chatterjee-Kishore M., Nguyen H., Stark G.R. (2000) *Oncogene.* **19**. 2619–2627.
134. Rechler M.M., Nissley S.P., Roth J. (1987) *N. Engl. J. Med.* **316**. 941–943.
135. Rescan P.Y., Jutel I., Ralliere C. (2001) *J. Exp. Biol.* **204**. (Pt 20) 3523–3529.
136. Rinderknecht E., Humbel R. (1978) *FEBS Lett.* **89**. 283–286.
137. Roberts S.B., Goetz F.W. (2001) *FEBS Lett.* **491**. 212–216.
138. Rogol A.D. (2000) *Curr. Opin. Pediatr.* **12**. 382–387.
139. Rosen C.J. (2000) *Endocrine.* **12**. 197–201.

140. Ross R.J., Esposito N., Shen X.Y., Von Laue S.L., Chew P.R., Dobson M., Postel-Vinay M.-C., Finidori J. (1997) *Mol. Endocrinol.* **11**. 265–273.
141. Roth R.A. (1988) *Science*. **239**. 1269–1271.
142. Roth S.M., Martel G.F., Ferrell R.E., Metter E.J., Hurley B.F., Rogers M.A. (2003) *Exp. Biol. Med.* (Maywood). **228**. 706–709.
143. Rotwein P., Pollock K.M., Didier D.K., Krivis G.G. (1986) *J. Biol. Chem.* **261**. 4828–4832.
144. Rudnicki M.A., Schnegelsberg P.N.J., Stead R.H., Braun T., Arnold H.-H., Jaenisch R. (1993) *Cell*. **75**. 1351–1359.
145. Ruel M., Laham R.J., Parker J.A., Post M.J., Ware J.A., Simons M., Sellke F.W. (2002) *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **124**. 28–34.
146. Sadowski C.L., Wheeler T.T., Wang L.H., Sadowski H.B. (2001) *Endocrinol.* **142**. 3890–3900.
147. Sakuma K., Watanabe K., Sano M., Uramoto I., Totsuka T. (2000) *Biochim. Biophys. Acta*. **1497**. 77–88.
148. Sanger J.W., Chowrashi P., Shaner N.C., Spalithoff S., Wang J., Freeman N.L., Sanger J.M. (2002) *Clin. Orthop.* **403**. Suppl. S153–S162.
149. Sara V.R., Hall K., Rodeck C.H., Wetterberg L. (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **78**. 3175–3179.
150. Sartorelli V., Puri P.L., Hamamori Y., Ogryzko V., Chung G., Nakatani Y., Wang J.Y.J., Kedes L. (1999) *Molec. Cell*. **4**. 725–734.
151. Schiaffino S., Reggiani C. (1996) *Physiol. Reviews*. **76**. 371–423.
152. Seale P., Asakura A., Rudnicki M.A. (2001) *Dev. Cell*. **1**. 333–342.
153. Seibert M.J., Xue Q.L., Fried L.P., Walston J.D. (2001) *J. Am. Geriatr. Soc.* **49**. 1093–1096.
154. Sharma M., Kambadur R., Matthews K.G., Somers W.G., Devin G.P., Conagen J.V., Fowke P., Bass J.J. (1999) *J. Cell Physiol.* **180**. 1–9.
155. Siler-Khodr T.M., Morgenstern L.L., Greenwood F.C. (1974) *J. Clin. Endocrinol. Metab.* Vol. **39**. 891–905.
156. Smith J.A., Lewis A.M., Wiener P., Williams J.L. (2000) *Anim. Genet.* **31**. 306–309.
157. Spiller M.P., Kambadur R., Jeanplong F., Thomas M., Martyn J.K., Bass J.J., Sharma M. (2002) *Mol. Cell. Biol.* **22**. 7066–7082.
158. Stallings-Mann M.L., Ludwiczak R.L., Klinger K.W., Rottman F. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **93**. 12394–12399.
159. Tanimoto K., Yoshida E., Mita S., Nibu Y., Murakami K., Fukamizu A. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**. 32760–32769.
160. Taylor W.E., Bhasin S., Artaza J., Byhower F., Azam M., Willard D.H., Kull F.C., Gonzalez-Cadavid N.F. (2001) *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **280**. E221–E228.
161. Thomas M., Langley B., Berry C., Sharma M., Kirk S., Bass J., Kambadur R. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**. 40235–40243.
162. Tillmann V., Buckler J.M.H., Kibirige M.S., Price D.A., Shalet S.M., Wales J.K.H., Addison M.G., Gill M.S., Whatmore A.J., Clayton P.E. (1997) *J. Clin. Endocr. Metab.* **82**. 531–535.
163. Tortoriello D.V., Sidis Y., Holtzman D.A., Holmes W.E., Schneyer A.L. (2001) *Endocrinology*. **142**. 3426–3434.
164. Tsuchida K., Arai K.Y., Kuramoto Y., Yamakawa N., Hasegawa Y., Sugino H. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**. 40788–40796.
165. Urbanek M., Legro R.S., Driscoll D.A., Azziz R., Ehrmann D.A., Norman R.J., Strauss J.F. III, Spielman R.S., Dunaif A. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **96**. 8573–8578.
166. Vale W., Hsueh A., River C., Yu J. (1990) In: *Handbook of Experimental Pharmacology*. Ed. by Sporn M.A., Roberts A.B. Springer Verlag, Heidelberg, Germany. **95/II** 211–248.
167. Vale W., Rivier C., Hsueh A., Campen C., Meunier H., Biesak T., Vaughan J., Corrigan A., Bardin W., Sachenko P., Spiess J., Rivier J. (1988) *Rec. Prog. Horm. Res.* **44**. 1–34.
168. Vance M.L., Mauras N. (1999) *New Engl. J. Med.* **341**. 1206–1216.
169. Vickers M.H., Ikenasio B.A., Breier B.H. (2002) *J. Endocrinol.* **175**. 615–623.
170. Vivanco I., Sawyers C. L. (2002) *Nature Rev. Cancer*. **2**. 489–501.

171. Vlachopapadopoulou E., Zachwieja J.J., Gertner J.M., Manzione D., Bier D.M., Matthews D.E., Slonim A.E. (1995) *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **80**. 3715–3723.
172. Wagner K.R., McPherron A.C., Winik N., Lee S.J. (2002) *Ann Neurol.* **52**. 832–836.
173. Wakatsuki M., Shintani Y., Abe M., Zhong-Hui Liu, Shitsukawa K., Saito S. (1996) *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **81**. 630–634.
174. Wallace J.D., Cuneo R.C., Bidlingmaier M., Lundberg P.A., Carlsson L., Boguszewski C.L., Hay J., Boroujerdi M., Cittadini A., Dall R., Rosen T., Strasburger C.J. (2001) *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **86**. 1731–1737.
175. Walsh F.S., Ritter M.A. (1984) *Nature.* **289**. 60–64.
176. Wang Q., Keutmann H.T., Schneyer A.L., Sluss A.L. (2000) *Endocrinol.* **141**. 3183–3193.
177. Wang Q.F., Khoury R.H., Smith P.C., McConnell D.S., Padmanabhan V., Midgley A.R., Schneyer A.L., Crowley W.F., Sluss P.M. (1996) *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **81**. 1434–1441.
178. Waters D., Danska J., Hardy K., Koster F., Qualls C., Nickell D., Nightingale S., Gesundheit N., Watson D., Schade D. (1996) *Ann. Intern. Med.* **125**. 865–872.
179. Wehling M., Cai B., Tidball J.G. (2000) *FASEB J.* **14**. 103–110.
180. Weintraub H., Davis R., Tapscott S., Thayer M., Krause M., Benezra R., Blackwell T.K., Turner D., Rupp R., Hollenberg S., Zhuang Y., Lassar A. (1991) *Science.* **251**. 761–766.
181. Welle S. (1998) *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care.* **1**. 257–262.
182. Welle S., Bhatt K., Shah B., Thornton C. (2002) *Exp. Gerontol.* **37**. 833–839.
183. Welt C.K., Lambert-Messerlian G., Zheng W., Crowley W.F., Schneyer A.L. (1997) *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **82**. 3720–3727.
184. Welt C., Sidis Y., Keutmann H., Schneyer A. (2002) *Exp. Biol. Med.* (Maywood). **227**. 724–752.
185. Whittemore L.A., Song K., Li X., Ag-hajanian J., Davies M., Girgenrath S., Hill J.J., Jalenak M., Kelley P., Knight A., Maylor R., O'Hara D., Pearson A., Quazi A., Ryerson S., Tan XY, Tomkinson KN, Veldman GM, Widom A., Wright J.F., Wudyka S., Zhao L., Wolfman N.M. (2003) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **300**. 965–971.
186. Woodruff T.K., Krummen L., Chen S.A., Lyon R., Hansen S.E., DeGuzman G., Covello R., Matther J., Cossum P. (1993) *Endocrinology.* **132**. 725–734.
187. Wuytens G., Verschueren K., de Winter J.P., Gajendran N., Beek L., Devosi K., Bosmani F., de Waele P., Andries M., van den Eijnden-van Raaij A.J.M., Smith J.C., Huylebroeck D. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**. 9821–9827.
188. Yan J.X., Harry R.A., Wait R., Welson S.Y., Emery P.W., Preedy V.R., Dunn M.J. (2001) *Proteomics.* **1**. 424–434.
189. Yang S.Y., Goldspink G. (2002) *FEBS Lett.* **522**. 156–160.
190. Yarasheski K.E. (1994) *Exerc. Sport Sci. Rev.* **22**. 285–312.
191. Yarasheski K.E., Bhasin S., Sinha-Hikim I., Pak-Loduca J., Gonzalez-Cadavid N.F. (2002) *J. Nutr. Health Aging.* **6**. 343–348.
192. You L., Kruse F.E. (2002) *Invest. Ophthalm. Vis. Sci.* **43**. 72–81.
193. Zachwieja J.J., Smith S.R., Sinha-Hikim I., Gonzalez-Cadavid N., Bhasin S. (1999) *J. Gravit. Physiol.* **6**. 11–15.
194. Zhu X., Hadhazy M., Wehling M., Tidball J.G., McNally E.M. (2000) *FEBS Lett.* **474**. 71–75.
195. Zimmers T.A., Davies M.V., Koniaris L.G., Haynes P., Esquela A.F., Tomkinson K.N., McPherron A.C., Wolfman N.M., Lee S.-J. (2002) *Science.* **296**. 1486–1488.
196. Zwijsen A., Blockx H., van Arnhem W., Willems J., Fransen L., Devos K., Raymackers J., van de Voorde A., Slegers H. (1994) *Europ. J. Biochem.* **225**. 937–946.