

Сведения о выполненных работах в 2017 году
по проекту «Скелетные мышцы как эндокринный орган: роль натрий-калий
опосредованного механизма регуляции транскрипции»,
поддержанному Российским научным фондом

Соглашение № 16-15-10026

Руководитель д-р биол. наук Орлов Сергей Николаевич

Были проведены эксперименты на клетках линии C2C12 (мышинные миобласты), которые позволили продемонстрировать зависящее от времени влияние электростимуляции на внутриклеточную концентрацию моновалентных катионов (натрий, калий) и подобрать концентрацию убаина (30 мкМ), вызывающую их изменения сходные с таковыми при электростимуляции. Предварительно было показано, что двухчасовая электростимуляция не влияет на жизнеспособность миобластов (при этом четырехчасовая электростимуляция вызывает снижение их жизнеспособности на 20 %), а шестичасовая инкубация в присутствии убаина в диапазоне от 1 до 3000 мкМ не имеет цитотоксического эффекта.

Как было отмечено ранее, в наших исследованиях продемонстрировано, что электростимуляция клеток линии C2C12 приводит к зависящей от времени диссипации моновалентных катионных трансмембранных градиентов (результаты исследования опубликованы в *Biochemical and Biophysical Research Communications* (2017)). Полученные результаты согласуются с данными экспериментов на скелетных мышцах *in vivo* и на их изолированных полосках. Также было исследовано дозозависимое действие убаина (время инкубации два часа) на внутриклеточное содержание натрия и калия, как в контрольных образцах, так и в миобластах, подвергнутых электростимуляции (результаты исследования опубликованы в материалах конференции «Рецепторы и внутриклеточная сигнализация» (Пушино, 2017)). Было доказано, что электростимуляция повышает чувствительность миобластов к низким дозам убаина (до 3 мкМ), сопровождающееся снижением внутриклеточной концентрации калия (с 830 до 675 нмоль/мг белка). При этом низкие дозы убаина увеличивают соотношение натрия и калия на 35 % в контрольных образцах и на 85% в клетках, подвергнутых электростимуляции. Таким образом, повышенная продукция убаина и/или других эндогенных кардиотонических стероидов может способствовать повышению отношения внутриклеточного натрия и калия в работающей скелетной мышце посредством подавления работы натрий-калиевой аденозинтрифосфатазы.

Полученные результаты позволили провести следующую серию экспериментов по исследованию роли изменения градиентов натрия и калия в регуляции транскрипции и трансляции миокинов. Для анализа изменений протеома были подготовлены пробы с применением рутинных методов. Стоит отметить, что в работе были использованы полнотранскриптомные чипы GeneChip™ Mouse Gene 2.0 ST Array (Affymetrix), включающие более 28 000 кодирующих и более 7 000 некодирующих транскриптов.

К настоящему времени нами завершены эксперименты по изучению изменений транскриптома клеток. Получен большой массив крайне интересных данных, который анализируется с помощью набора современных биоинформационных программ и подготавливается к публикации.

Одновременно с этими исследованиями приступили к изучению роли диссипации моновалентных катионных трансмембранных градиентов в изменениях транскриптома клеток при действии кардиотонических стероидов (уабаин, маринобуфагенин) (результаты исследования опубликованы в *Molecules* (2017)). Для достижения этой цели мы рассмотрели относительное влияние [Na]/[K]-опосредованной и [Na]/[K]-независимой сигнализации в транскриптомных изменениях, вызванных эндогенными кардиотоническими стероидами в эндотелиальных клетках пупочной вены человека (HUVES). Было обнаружено, что длительная инкубация (6-96 часов) эндотелиальных клеток увеличивала сродство к уабаину, которое характеризовалось снижением внутриклеточной концентрации калия и увеличением натрия. Таким образом, было доказано, что обязательным фактором, сопровождающим транскриптомные изменения, которые вызываются влиянием эндогенных кардиотонических стероидов в эндотелиальных клетках пупочной вены человека, является повышение соотношения внутриклеточного содержания натрия и калия (результаты исследования опубликованы в *Nature Scientific Reports* (2017)).

Дополнительно было проведено исследование относительного участия кальций-опосредованных и кальций-независимых сигнальных путей в экспрессии миокинов, индуцированной увеличением соотношения натрия и калия. Так, для выяснения роли изменения концентрации внутриклеточного кальция в регуляции экспрессии миокинов часть проб содержала никардипин (блокатор потенциал-зависимых кальциевых каналов L-типа).

Было показано, что трехчасовая инкубация клеток гладкой мускулатуры сосудов крысы (rVSMC) с уабаином приводит к увеличению содержания мРНК факторов транскрипции Nr4a1 (белок группы 1 подсемейства ядерных рецепторов), Egr1 (белок раннего ответа), Ptgs2 (простагландин-эндопероксид-синтаза-2) и Atf3 (активирующий транскрипционный фактор 3) в 4, 6, 10 и 12 раз, соответственно. Инкубация клеток в бескальциевой среде с целью ингибирования натрий-калиевой аденозинтрифосфатазы продемонстрировала сходные результаты, которые были получены при инкубации клеток с уабаином, в увеличении концентрации внутриклеточного натрия и снижении – калия. При этом наблюдались статистически значимые ($p < 0,05$) сильные положительные корреляционные связи ($R^2 > 0,6838$) между уровнями транскриптов, идентифицированных при этих условиях. Полученные результаты доказывают, что изменение экспрессии генов, вызванные этими стимулами, опосредованы повышением уровня внутриклеточного соотношения натрия и калия.

Не было обнаружено какого-либо значительного эффекта обедненной кальциевой среды на исходное содержание мРНК таких факторов транскрипции, как Egr1, Atf3, Nr4a1 и Ptgs2. При этом дополнительное ингибирование натрий-калиевой аденозинтрифосфатазы приводило к снижению уровня мРНК NR4a1 и Ptgs2 в 2 и 5 раз, соответственно. В свою очередь, добавление убаина приводило к двукратному повышению скорости притока $^{45}\text{Ca}^{2+}$ в клетках rVSMC (этот прирост отсутствовал при блокировке калициевых каналов L-типа, но сохранялся в присутствии ингибитора натрий-кальциевого обменника (KB-R7943)). Было показано, что никардипин уменьшает убаин-зависимый прирост мРНК Nr4a1 и Ptgs2 на 50 и 70 %, соответственно. Ингибирование активности CaMKII и кальцинейрина при использовании таких соединений, как KN-93 и циклоспорин А, не вызвало изменений экспрессии Egr1 и Atf3 в клетках rVSMC обработанных убаином. При этом KN-93 (10 мкМ) подавлял прирост содержания Ptgs2 на 75 % ($p < 0,001$), а его неактивный аналог KN-92 не оказывал влияния. Наряду с этим, экспрессия Nr4a1 была нечувствительна к KN-92, но уменьшалась в 2 раза в присутствии циклоспорина А (результаты исследования опубликованы в Cell Calcium (2017)).