

Сведения о выполненных работах в 2018 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

Было выполнено исследование роли изменения градиентов натрия и калия в регуляции транскрипции и трансляции миокинов. 2-часовая электростимуляция миотубул C2C12 с напряжением 40 В, продолжительностью стимулов 10 мс и частотой 1 Гц увеличила содержание  $\text{Na}^+$  на ~70% ( $p < 0.01$ ) и уменьшила  $\text{K}^+$  на 70% ( $p < 0.05$ ). Мы обнаружили, что 30 микроМ убаин увеличил  $\text{Na}^+$  в ~2-раза и уменьшил  $\text{K}^+$  на ~35%, таким образом имитируя действие электростимуляции по этим параметрам.

Было обнаружено, что 3-часовая инкубация миотубул C2C12 с + хелаторами внеклеточного и внутриклеточного  $\text{Ca}^{2+}$  (EGTA и ВАРТА-АМ, соответственно) привели к повышению в ~4-раза  $[\text{Na}^+]_i/[\text{K}^+]_i$  соотношения. Мы использовали никардипин в качестве ингибитора потенциал-зависимых  $\text{Ca}^{2+}$  + каналов L-типа, которые играют ключевую роль в сокращении скелетной мышцы. 2-часовая электростимуляция миотубул C2C12 сопровождается ритмическими увеличениями  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , измеренными по соотношению F340/F380 флуоресценции Fura-2. При концентрации 10 микроМ никардипин полностью блокировал колебания  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , вызванные электростимуляцией, без какого-либо влияния на максимальное приращение отношения F340/F380, вызванное ионофором  $\text{Ca}^{2+}$ A23187. Важно отметить, что мы не обнаружили значительного действия никардипина на внутриклеточное содержание одновалентных катионов в контрольных миотубулах C2C12, а также прирост  $\text{Na}^+$ , вызванный их электростимуляцией.

Для изучения влияния электростимуляции на транскрипцию генов мы использовали технологию Affymetrix. Мы обнаружили, что при 2-часовой инкубации миотубул C2C12 с электростимуляцией экспрессия 1392 транскриптов увеличилась до 8.35-крат и 1823 транскриптов уменьшилась в 3.78 раз. В отсутствие электростимуляции ингибирование с помощью никардипина потенциал-зависимых  $\text{Ca}^{2+}$  каналов L-типа приводило к незначительным транскриптомным изменениям. Следует отметить, что в присутствии никардипина электростимуляция увеличивала до 5.47 раз и уменьшала до 3.23 раз содержание 931 и 2177 транскриптов, соответственно. Умеренное ингибирование  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ - АТФазы 30 микроМ убаином приводило к появлению дифференциально экспрессирующихся 1943 транскриптов, с максимальной кратностью повышения и понижения экспрессии в 1.86 и 2.86, соответственно.

Поскольку никардипин устранял вызванные электростимуляцией колебания  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , мы предлагаем подразделить транскриптомные изменения в миотубулах,

подвергнутых электростимуляцией, на три главных категории: Ca<sup>2+</sup>-опосредованные транскриптомные изменения, т.е. транскриптомные изменения, устраняемые никардипином; Ca<sup>2+</sup>-независимые транскриптомные изменения, т.е. изменения транскрипта, обнаруженные как при наличии, так и в отсутствии никардипина, и Ca<sup>2+</sup>-ингибированные транскриптомные изменения, т.е. изменения, обнаруженные исключительно в присутствии никардипина.

На экспрессию 2073 и 1142 транскриптов электростимуляция влияет через Ca<sup>2+</sup>-опосредованные и Ca<sup>2+</sup>-независимые механизмы сопряжения возбуждения и транскрипция, соответственно. Дифференциальная экспрессия 1966 транскриптов, обнаруженная исключительно в миотубулах в присутствии никардипина, ингибируется сигнальными путями, которые активируются колебаниями [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>, вызванными электростимуляцией. Мы наблюдали очень достоверную ( $p < 10^{-5}$ ) положительную ( $R^2 = 0.9732$ ) корреляцию между экспрессией транскриптов, затронутых EPS в присутствии и отсутствие никардипина, таким образом предлагая общие механизмы, лежащие в основе Ca<sup>2+</sup>-независимого механизма сопряжения возбуждения и -транскрипции.

Сравнительный анализ выявил 456 транскриптов, экспрессия которых была изменена в миотубулах, подвергнутых электростимуляцией, а также в миотубулах, подвергнутых приблизительно тому же самому повышению [Na<sup>+</sup>]<sub>i</sub>/[K<sup>+</sup>]<sub>i</sub> соотношения в присутствии 30 микроМ убаина. Набор общих транскриптов, обнаруженных в обработанных убаином и EPS миотубулах, может быть далее разделен на убаин-чувствительные гены, дифференцированная экспрессия которых в подвергнутых электростимуляцией клетках происходит через Ca<sup>2+</sup>-независимые пути (у 37 транскриптов повышается и у 76 транскриптов понижается экспрессия) и Ca<sup>2+</sup>, +-опосредованную сигнализацию (у 83 транскриптов повышается и у 260 понижается экспрессия).

Функциональная характеристика генов, чувствительных к электростимуляции, демонстрирующие самые высокие изменения транскрипции в ответ на электростимуляцию миотубул C2C12, привела нас к следующим выводам.

Во-первых, электростимуляция приводила к изменению экспрессии регуляторов транскрипции, включая 10 генов быстрого ответа (immediate response genes, IRGs), таких как Fos, Egr1, Myc, Egr2, Atf3, Fosl1 и Fosb, 12 гистонных групп и 29 microRNAs. Эти гены могут рассматриваться в качестве промежуточных продуктов дифференциальной экспрессии генов позднего ответа, включая миокины, экспрессия которых была слегка увеличена через 2-часа электростимуляции и далее потнциирована после продления электростимуляции до 48 ч. Эта гипотеза согласовывается с накоплением IRGs в биоптатах скелетной мышцы, полученных от людей после интенсивных упражнений.

Во-вторых, электростимуляция привела почти к 3-кратному повышению Ptgс2, кодирующего синтазу простагландинов (включая простагландин E2, PGE2), известную также как циклооксигеназа 2-ого типа (COX-2). Ранее повышенное

содержание мРНК и белка COX-2 наблюдалось при сокращении скелетных мышц человека. Многочисленные исследования продемонстрировали физиологически зависимое продуцирование PGE2 и нескольких других простагландинов, которые были подавлены ингибиторами циклооксигеназы. Важно отметить, что добавление PGE2 увеличивает содержание IL-6 в биоптатах мышц человека. В совокупности эти данные свидетельствуют о том, что повышенная экспрессия COX-2 способствует секреции цитокинов из работающей мышцы.

В-третьих, белки теплового шока (heat shock proteins, HSP) контролируют правильную структурную организацию белков в исходных и стрессовых условиях. Электростимуляция в 5 раз увеличила содержание мРНК Hspa1a и Hspa1b, кодирующих HSP с молекулярной массой 70 кДа (HSP70). Мы также обнаружили 3.5-кратное повышение Hsph1, кодирующий HSP 110 кДа, и Dnajb, кодирующий HSP40, стимулирующий активность АТФ-азы HSP70, принимающей участие в сворачивании и предотвращении агрегации белка.

В-четвертых, электрическая стимуляция увеличила в 6 раз содержание мРНК Hmox1, кодирующей гемоксигеназу-1. Широко известно, что транскрипция этого гена может быть вызвана активатором белка-1 (AP1), сигнальным преобразователем и активатором транскрипции 3 (STAT3), а также гемом, окислительным стрессом и гипоксией. Важно отметить, что помимо железа и биливердина, деградация гема, катализируемая Hmox1, приводит к массовому высвобождению окиси углерода, т.е. газотрансмиттера, активирующего растворимую гуанилилциклазу, что в свою очередь приводит к вазорелаксации. Мы также обнаружили в миотубулах, подвергнутых электростимуляции, 2-кратное повышение адреномедуллина (Adm) расслабляющий кровеносные сосуды через активацию аденилциклазы. Роль этих генов в усилении тока крови в тренирующейся мышце, остается неизвестной.

На экспрессию генов влияют разнообразные протеинкиназы и фосфатазы, контролирующие фосфорилирование факторов транскрипции и их транслокацию в ядро. Мы заметили, что электростимуляция приводит к фосфорилированию серин-треониновых специфических митоген-активированных протеинкиназ ERK1/2 и JNK1/2 MAPK, серин/треонин-киназы Akt1, также известной как протеинкиназа B (PKB), сАМР-связывающего белка CREB и циклического АМР-зависимого транскрипционного фактора ATF-1. Увеличенное фосфорилирование JNK MAPK согласуется с предыдущим сообщением, в котором показано 2,5-кратное повышение содержания фосфо-JNK1/2 в миотубулах C2C12, подвергнутых воздействию электростимуляции в течение 4 часов. Приращения фосфорилирования ERK1/2, JNK1/2 и CREB сохранялись в присутствии никардипина, что свидетельствует о наличии Ca<sup>2+</sup>-независимых промежуточных звеньев передачи сигнала. В отличие от ERK1/2, JNK1/2 и CREB, никардипин полностью устранял прирост фосфорилирования Akt-1 и уменьшал содержание фосфо-ATF-1 в клетках, подвергнутых электростимуляцией, что указывает на влияние Ca<sup>2+</sup>-опосредованных сигнальных путей. Ни электростимуляция, ни убаин не влияли на фосфорилирование серина-529 в регуляторе транскрипции NFκB, треонина 286/287 в Ca<sup>2+</sup>/ кальмодулин-

зависимой протеинкиназе II (CaMKII), а также фосфорилирование серина-79 в ацетил-СоА карбоксилазе (АСС) и серина-317 в Unc-51, используемых в качестве маркера активации АМРК.

Исследования *in vivo* было выполнено на половозрелых мышах-самцах линии c57bl/6 (от 8-ми до 12 недель), из которые подвергались динамическим (принудительное плавали статическим (вис на сетке) нагрузкам как острого, так и хронического характера. Забивка животных (методом декапитации) производилась сразу после нагрузки и в различные сроки после ее завершения – 1, 5 и 24 часа. Определение концентрации белков в плазме производилось при помощи иммуноферментного анализа (ИФА).

По результатам влияния динамической нагрузки на продукцию миокинов можно сделать следующие выводы: утяжеление 10% от массы тела оказало влияние на содержание ИЛ-6 в плазме крови мышей через 5 часов после нагрузки. На продукцию ИЛ-15 в большей степени оказало время плавания, чем интенсивность нагрузки. Содержание ИЛ-8 не зависело ни от интенсивности нагрузки, ни от времени плавания.

Тренировочный процесс в течение 4х недель оказал влияние на продукцию ИЛ-6. Уровень ИЛ-6 у тренированных животных выше во все временные промежутки по сравнению с нетренированными животными. Влияние длительной тренировки проявлялось и на продукцию ИЛ-15: через 24 часа уровень ИЛ-15 в плазме выше у тренированных животных с 5% и 7,5% утяжелениями по сравнению с нетренированными. Максимальная концентрация ИЛ-8 в плазме крови у тренированных мышей после нагрузки с 10% утяжелением наблюдалась через 5 часов.

Статическая нагрузка различной интенсивности оказала влияние на изменение концентрации ИЛ-6 в первые часы после нагрузки у нетренированных мышей. На продукцию ИЛ-15 в большей степени оказало длительность нагрузки, чем интенсивность. На изменение концентрации ИЛ-8 оказало длительность статической нагрузки. Уровень ИЛ-6 у тренированных животных ниже во все временные промежутки по сравнению с нетренированными животными. Также 4х-недельная тренировка оказала влияние и на продукцию ИЛ-15: сразу после нагрузки наблюдается увеличение концентрации ИЛ-15 в плазме по сравнению с нетренированными. После статической нагрузки различной интенсивности наблюдается увеличение концентрации ИЛ-8 примерно в 2 раза, и сохранение этого уровня во все временные промежутки после нагрузки.