

Сведения о выполненных работах в 2019 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 мед. наук Капилевич Леонид Владимирович

Клетки скелетной мускулатуры мышцы C2C12 были получены из Российской коллекции клеточных культур Института цитологии РАН (Санкт-Петербург, Россия). Дифференцированные миотубулы C2C12 промывали фосфатно-солевым буфером (PBS) и помещали их в 3 мл среды дифференцировки, содержащей дополнительные компоненты. В некоторых экспериментах миотубулы подвергались электростимуляции (EPS) с использованием пульсового генератора C-Pace (C-Pace EP, IonOptix, USA) при 37°C в режиме 40 V, 10 ms, 1Hz. Жизнеспособность клеток оценивали с помощью Alamar Blue. Для оценки действия EPS на трансмембранные потоки одновалентных катионов мы использовали Rb⁺ и Li⁺ в качестве аналогов K⁺ и Na⁺ соответственно. Внутриклеточное содержание Na⁺, K⁺, Rb⁺ и Li⁺ определяли с помощью метода атомно-абсорбционной спектрометрии.

Для изучения роли генов раннего ответа (immediate response genes, IRGs) и циклооксигеназы второго типа (COX2) в секреции миокинов при электростимуляции клеток скелетной мускулатуры были выполнены эксперименты с использованием малых интерферирующих РНК (siRNA). Для исследования влияния динамических и статических нагрузок на содержание внутриклеточного Na⁺ и K⁺ в клетках скелетной мускулатуры контрольных и предварительно тренированных мышей были выполнены эксперименты *in vivo*.

EPS в течение 4 часов приводит к 2-кратному увеличению содержания Na⁺_i и уменьшению K⁺_i. Инкубация с 10 мкМ убаина не влияет на базовый уровень содержания одновалентных катионов, но почти на треть увеличивает соотношение [Na⁺]_i/[K⁺]_i, вызванное EPS. Эти результаты позволяют предположить, что EPS увеличивает относительный вклад α2-Na,K-АТФазы в поддержание трансмембранного градиента Na⁺ и K⁺. Действительно, активность α2-Na,K-АТФазы в миотубулах C2C12, определенная по входу в клетки Rb⁺ в присутствии 10 мкМ убаина, возрастает в результате EPS с 19±21 до 73±24 нмоль/мг белка/10 мин. Напротив, полное ингибирование обеих изоформ Na,K-АТФазы по действием 3 мкМ убаина приводит почти к 3-кратному снижению входа Rb⁺ как в контроле, так и в миотубулах, подверженных EPS.

EPS увеличивает активность NKCC, которую мы определяли как убаин-резистентную и буметанид-чувствительную компоненту внутриклеточного входа Rb⁺. На фоне буметанида 2000 мкМ фуросемида не оказывало влияния на вход Rb⁺, что говорит о несущественной активности K,Cl-котранспорта, направленного внутрь клетки. Ни буметанид, ни фуросемид не оказывают влияния на внутриклеточное

содержание Na^+ и K^+ в контроле, а также на изменение $[\text{Na}^+]_i/[\text{K}^+]_i$ -соотношения в C2C12, опосредованного действием EPS.

1 мкМ амилорида не влиял на увеличение $[\text{Na}^+]_i$ и уменьшение $[\text{K}^+]_i$, вызванное действием EPS, однако эффект электростимуляции на диссипацию градиента одновалентных катионов устранялся в присутствии 1000 мкМ амилорида. Эти данные позволяют предположить существование в C2C12 каналов с низким сродством к амилориду.

Данные, полученные нами в ходе исследования, позволяют сделать три важных вывода. Во-первых, диссипация трансмембранных градиентов Na^+ и K^+ в C2C12, подвергнутых действию EPS, происходит в основном за счет активации тетродотоксин-чувствительных потенциал-зависимых Na -каналов (NaV) и харибдотоксин-чувствительных K -каналов большой проводимости (BKCa). Во-вторых, EPS приводит к активации $\alpha 2$ - Na, K -АТФазы, работа которой подавляет диссипацию градиента одновалентных катионов, опосредованную активацией потенциал-чувствительных Na - и Ca -активируемых K -каналов. Это заключение поддерживается тем фактом, что в присутствии 10 мкМ убаина увеличение соотношения $[\text{Na}^+]_i/[\text{K}^+]_i$, опосредованное действием EPS, происходит в большей степени, т.е. ингибирующий эффект 10 мкМ убаина усиливается в случае миотубул, подвергнутых EPS. В третьих, данные, полученные с использованием буметанида и фуросемида свидетельствуют о том, что в C2C12 присутствуют каналы, активируемые высокими концентрациями амилорида. Нельзя также исключить, что высокие концентрации амилорида, влияющие на активность протеинкиназ, могут через эти протеинкиназы подействовать на проводимость существующих амилорид-чувствительных каналов или переносчиков.

Ранее было показано, что ингибирование $\alpha 1$ -изоформы Na, K -АТФазы убаином изменяет экспрессию генов посредством увеличения внутриклеточного соотношения $[\text{Na}^+]_i/[\text{K}^+]_i$. Мы сравнили изменения транскриптома при действии разных концентраций убаина в нейронах, которые обогащены $\alpha 3$ -изоформой Na, K -АТФазы, имеющей более высокое сродство к убаину (на 4 порядка выше, чем у $\alpha 1$ -изоформы). Ингибирование $\alpha 1$ - и $\alpha 3$ - Na, K -АТФазы в присутствии 1 мМ убаина приводило к диссипации трансмембранного градиента Na^+ и K^+ и экспрессии 994 транскриптов, в то же время селективное ингибирование $\alpha 3$ - Na, K -АТФазы под действием 100 нМ убаина изменяло экспрессию 114 транскриптов, не влияя при этом на соотношение $[\text{Na}^+]_i/[\text{K}^+]_i$. Среди генов, экспрессия которых изменялась при действии 1 мМ убаина более чем в 2 раза, обнаружены участники сигнальных каскадов, регуляторы транскрипции, включая *Npas4*, *Fos*, *Junb*, *Atf3* и *Klf4*, увеличение экспрессии которых показано при электрической и глутаматной стимуляции нейронов.

Показано, что как динамическая (1 час плавания), так и статическая (40 мин виса на сетке) приводили к 2-х кратному увеличению содержания Na^+_i , уменьшению содержания K^+_i на 25-35 % и 3-4-х кратному увеличению соотношения $\text{Na}^+_i/\text{K}^+_i$.

Действие динамической и статической нагрузок на эти параметры сохранялась у мышечной ткани, подвергнутой регулярной тренировке в виде плавания или виса на сетке в течение 4 недель по 1 часу в день. Полученные результаты позволяют рассматривать диссипацию трансмембранных градиентов натрия и калия при физической нагрузке как фактор регуляции функциональной активности скелетной мускулатуры, включая обнаруженные ранее изменения транскрипции и трансляции миокинов.