

Сведения о выполненных работах в 2020 году  
по проекту «Скелетные мышцы как эндокринный орган: роль натрий-калий  
опосредованного механизма регуляции транскрипции»,  
поддержанному Российским научным фондом  
Соглашение № 16-15-10026

Руководитель Капилевич Леонид Владимирович, д-р мед. наук

Изучен характер изменения внутриклеточной концентрации  $Ca^{2+}$  при электростимуляции клеток C2C12. Показано, что добавление хелатора ВАРТА существенно снижает уровень  $Ca^{2+}$  внутри клеток. Однако электростимуляция даже в отсутствие хелатора снижает уровень  $Ca^{2+}$  в клетках C2C12 в большей степени, сравнимой с уровнем, который наблюдается в присутствии блокатора Na-насоса убаина.

Изучена роль интермедиатов сигнального каскада, запускаемого увеличением концентрации внутриклеточного  $Ca^{2+}$  при изменении внутриклеточного соотношения  $[Na^+]_i/[K^+]_i$ . В контроле ингибитор кальмодулин-зависимой протеинкиназы II KN-62 практически не оказывает влияния на содержание ионов натрия и калия в клетках C2C12, в то время как другой блокатор той же протеинкиназы KN-93 достоверно снижает уровень натрия в клетке (примерно на 30 %), не влияя на уровень калия. Так же действует в контроле и циклоспорин А (ингибитор кальцинейрина). По-видимому, это свидетельствует о том, что при подавлении кальмодулин-зависимой протеинкиназы II или кальцинейрина активируется либо Na, K-АТРаза, либо другие натриевые переносчики, увеличивающие выход натрия из клетки. Предположение об активации Na, K-АТРаза подтверждается данными о том, что эффекты KN-93 и циклоспорина слабо выражены в среде с убаином. Ингибитор митоген-активируемой протеинкиназы ERK (PD98059) не оказывал влияния на содержание в клетке  $Na^+$  во всех трех случаях (контроль, EPS и убаин). Однако на фоне убаина обнаружено достоверное увеличение содержания  $K^+$  в клетках C2C12 под действием никардипина. Это позволяет предполагать, что  $Ca^{2+}$ , входящий в клетку, подавляет выход из нее  $K^+$ .

Изучена роль генов раннего ответа (immediate response genes, IRGs) и циклооксигеназы второго типа (COX2) в секреции мискинов при электростимуляции клеток скелетной мускулатуры. В проведенных экспериментах нам удалось несколько снизить экспрессию трех генов: Fos, PTGS2 и Erg2. Однако эти результаты статистически недостоверны. Итак, несмотря на длительный и тщательный подбор условий эксперимента (изменение концентрации siRNA в растворе, с которым инкубировали клетки, изменение содержания липофектамина, необходимого для проведения трансфекции и их соотношение в комплексе siRNA - липид, а также времени проведения трансфекции), мы не смогли вызвать нокдаун этих генов.

Есть несколько возможных объяснений того, почему нам не удалось добиться успешной трансфекции. Одна из причин заключается в том, что siRNA не проникали в клетку. Возможно, для этого требовалось проведение электропорации либо использование аденовирусных конструкций. Кроме того, возможно, была

использована не совсем удачная система оценки успешности нокдауна. Для этого можно было использовать и другие методы, которые могли бы дать более наглядный результат при использовании siRNA, меченой флуоресцентной меткой (например, проточная цитометрия).

Выполнено исследование по оценке повреждения сарколеммы после многократного применения электрических стимулов. Полученные значения AMP соответствовали положительному контролю с искусственно проницаемыми мембранами, а контрольное значение соответствовало отрицательному контролю без искусственной проницаемости или эффектов, вызванных EPS. Следовательно, если показатели предложенной модели проницаемости мембраны для тестовой группы не находятся в пределах между показателями групп положительного и отрицательного контроля, значение AMP ниже 0 или выше 1 может быть получено в первом случае, наблюдаемом в электростимулируемых миотубулах, полученных из клеток C57BL/10ScSn1. Эффекты ЭПС на мышечные трубки, полученные из клеток C57BL/10ScSn1, включают уменьшение включения ядерных пятен по сравнению с таковым у нестимулированного контроля. Наблюдаемые эффекты могут быть объяснены измененным транспортом красителя, который может зависеть от мембранного потенциала, внутриклеточных концентраций  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  и мембранного градиента. Кроме того, было показано, что изменения мембранного потенциала, то есть деполяризация, исследуемая по изменениям внеклеточной концентрации  $\text{K}^+$  и  $\text{Cl}^-$ , влияют на жесткость эндотелиальной мембраны, измеренную с помощью атомно-силовой микроскопии в течение нескольких минут после воздействия, что можно объяснить кортикальной сеткой актина и влиянием мембранного потенциала на полимеризованное состояние кортикально расположенных актиновых филаментов.

Исследована взаимосвязь динамики содержания одновалентных катионов в скелетных мышцах экспериментальных животных и содержания миокинов при статических и динамических нагрузках. Для этого у экспериментальных животных (мышей) выполнялось определение содержания миокинов в гомогенате скелетных мышцах методом ИФА и концентрации натрия и калия в мышечных клетках методом атомной спектрофотометрии после статических и динамических физических нагрузок различной интенсивности.

Во всех группах тренированных и нетренированных животных при статической и динамической нагрузках наблюдается увеличение уровня IL-6 спустя 24 часа. Это может свидетельствовать о запуске продукции белков внутри скелетной мышцы. При однократной динамической нагрузке происходит постепенное увеличение IL-15, при хронической нагрузке прирост IL-15 происходит значительно быстрее: спустя один час, а затем спустя 24 часа. При статической нагрузке происходит значительное увеличение уровня IL-15 как при однократной нагрузке, так и при хронической. Уровень LIF постоянен у тренированных мышей, как при статической так и при динамической нагрузках, причём при статической нагрузке концентрация его выше. Это может свидетельствовать о том, что статическая нагрузка в большей степени приводит к пролиферации клеток миобластов и гипертрофии скелетных мышц. Уровень CXCL1 выше в группах как тренированных, так и нетренированных

животных при статической физической нагрузке. CXCL1, относящийся к классу CXС принимает участие в процессах ангиогенеза, пролиферации, следовательно, статическая нагрузка в большей степени влияет на продукцию данного хемокина. Показано, что как динамическая (1 час плавания) так и статическая (40 мин виса на сетке) нагрузки приводили к 2-х кратному увеличению содержания  $\text{Na}^+$ , уменьшению содержания  $\text{K}^+$  на 25-35 % и 3-4-х кратному увеличению соотношения  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ . Действие динамической и статической нагрузок на эти параметры сохранялась у мышей, подвергнутых 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.

Заключительная серия исследований была посвящена оценке физиологических эффектов миокинов у людей с различной степенью физической подготовленности. Для этого изучалось влияние однократной физической нагрузки на концентрацию эндотелиальной NO-синтазы и фактора активации тромбоцитов в плазме крови у спортсменов, тренирующихся в циклических и силовых видах спорта и у нетренированных волонтеров, а так же на характер эндотелий-зависимой вазодилатации у мужчин с различным уровнем физической активности.

В группе со средним уровнем двигательной активности наблюдается выраженная вазодилатация плечевой артерии после окклюзионной пробы: до физической нагрузки на 13,6 %, после физической нагрузки на 17 %. В группе отмечается нормальная реакция на пробу с реактивной гиперемией. Физическая нагрузка способствовала усилению функции эндотелия, что можно рассматривать как положительный эффект динамической физической нагрузки на сосудистую систему.

Группа с высоким уровнем двигательной активности и группа спортсменов характеризуется неадекватной реакцией на пробу с реактивной гиперемией. В группе тяжелоатлетов до физической нагрузки не произошло изменения диаметра плечевой артерии, а после физической нагрузки диаметр артерии уменьшился на 5,3 %, вследствие сужения кровеносных сосудов и, таким образом, уменьшения скорости кровотока. В группе легкоатлетов до физической нагрузки диаметр плечевой артерии увеличился на 2,9 %, а после физической нагрузки произошло незначительное расширение сосуда на 4,7 %. Расширение сосудов, посредством усиленного образования сосудорасширяющих веществ клетками тканей, происходит вследствие парциального давления кислорода, кровотока ускоряется с увеличением потребности кислорода.

У контрольной группы была зарегистрирована концентрация eNOS  $4,96 \pm 0,72$  ng/ml, что достоверно выше данного показателя в обеих группах спортсменов. Одновременно в данной группе фиксируется максимальный прирост данного показателя сразу после физической нагрузки и сохранение его на неизменном уровне в течение часа. У спортсменов обеих групп концентрация eNOS в покое была

достоверно ниже - в два раза ниже у легкоатлетов и в 4 раза ниже у тяжелоатлетов. У спортсменов группы ЛА после физической нагрузки регистрировался прирост концентрации eNOS в 2,5 раза, через час она снижалась примерно на 30 %. У тяжелоатлетов, напротив, отмечали тенденцию к снижению концентрации eNOS в плазме после нагрузки, которая через час возвращалась к исходным значениям.