

Сведения о выполненных работах в 2016 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

Мы сравнили концентрационную и временную зависимость действия убаина на соотношение $[Na^+]_i/[K^+]_i$, активность Na^+ , K^+ -АТФазы и пролиферацию клеток эндотелия из пупочной вены человека (HUVES). Воздействие 1-3 нМ убаина в течение 24-72 ч приводит к снижению соотношения $[Na^+]_i/[K^+]_i$ и увеличению пролиферации клеток на 20-50%. Мы обнаружили, что в этом диапазоне концентраций убаин увеличивает на 25-30% активность Na^+ , K^+ -АТФазы, измеренную как скорость входа ^{86}Rb . Добавление убаина в более высоких концентрациях ингибирует Na^+ , K^+ -АТФазу, увеличивает соотношение $[Na^+]_i/[K^+]_i$, подавляет рост и вызывает гибель клеток. Мы обнаружили отрицательную корреляцию между соотношением $[Na^+]_i/[K^+]_i$ и активацией роста клеток, обработанных низкими дозами убаина в течение 48 или 72 ч, и положительную корреляцию этого соотношения с ингибированием пролиферации клеток, обработанных в течение 24 ч высокими дозами убаина. Полученные данные показывают, что ингибирование пролиферации HUVES при действии высоких доз кардитонических стероидов коррелирует с диссипацией градиентов Na^+ и K^+ , в то время как активация роста клеток, отмеченная при действии низких доз кардитонических стероидов, вызвана активацией Na^+ , K^+ -АТФазы и уменьшением $[Na^+]_i/[K^+]_i$.

Ранее нами было установлено, что нарушение целостности плазматической мембраны вносит основной вклад в высвобождение АТФ из эритроцитов при изменении объема клеток. Для данного проекта необходимо отметить, что активация пуриnergической системы сосудов за счет высвобождения АТФ из эритроцитов рассматривается как один из центральных механизмов ауторегуляции локального кровотока и поддержания работы скелетной мускулатуры в условиях гипоксии, связанной с экстремальными физическими нагрузками. В этой связи мы сравнили влияние гипоксии на гемолиз, высвобождение АТФ и белковый состав мембраны эритроцитов человека. Было установлено, что 20-мин гипоксия приводит к 50 % увеличению содержания внеклеточного гемоглобина. Одновременное измерение содержания внеклеточного гемоглобина и АТФ показало положительную и высоко достоверную корреляцию высвобождения АТФ и гемолиза эритроцитов. Кроме того нами было установлено, что гипоксия сопровождается изменениями белкового состава плазматической мембраны, выражающегося в увеличении содержания белка с молекулярной массой ~60 kDa. Механизмы вовлечения этого белка в нарушение целостности мембраны эритроцитов как механизм высвобождения АТФ, активации

пуриnergической системы и увеличения кровоснабжения скелетной мускулатуры в условиях гипоксии, связанной с экстремальными физическими нагрузками, в настоящее время изучается.

С помощью методов иммунопреципитации и двумерного электрофореза мы обнаружили ряд белков, связывание которых с Na⁺, K⁺-АТФазой активируется после выдерживания клеток с убаином. Их анализ методом масс-спектрометрии позволил идентифицировать 7 сигнальных белков из суперсемейств глюкокортикоидных рецепторов, серин/треониновых киназ и фосфатаз 2С, Src-киназ и Rho GTPаз. Используя базы данных по белкам NCBI и HPRD, мы установили, что последовательности некоторых из идентифицированных нами белков содержат консервативные домены, которые могут быть вовлечены во взаимодействие с Na⁺, K⁺-АТФазой. Так, связывающий кальмодулин активатор транскрипции 1 (SAMTA1) содержит анкириновые повторы. Это позволяет предложить, что SAMTA1 может быть потенциальным партнером Na, K-АТФазы. Помимо анкириновых повторов, SAMTA1 имеет два типа ДНК-связывающих домена, называемых CG-1 домен и иммуноглобулиновый домен транскрипционного фактора (TIG), а также четыре кальмодулин-связывающих мотива IQ. TIG домены представлены в большом количестве белков, включая транскрипционные факторы. Было показано, что SAMTA1 действует как активатор транскрипции в экспрессированной системе гена-репортера. Другие белки также содержат консервативные домены, включая каталитический домен Ser/Thr фосфатаз семейства 2С, каталитический домен Ser/Thr протеинкиназы. Кроме того, мы обнаружили, что под действием убаина с Na⁺, K⁺-АТФазой взаимодействует глюкокортикоидный рецептор, который является членом суперсемейства ядерных рецепторов, относящихся к лиганд-зависимым факторам регуляции транскрипции. В последнее время растет количество публикаций, свидетельствующих о негеномных механизмах действия глюкокортикоидного рецептора. Негеномные эффекты, обусловленные связыванием глюкокортикоидов с рецептором, могут осуществляться через различные механизмы с участием некоторых киназ, таких как PI3K, АКТ и MAPK. Среди других белков, взаимодействующих с Na⁺, K⁺-АТФазой мы обратили внимание на альфа-изоформорму протеинфосфатазы 1А (PP2Cα) и белок 1, активирующий Rac GTPазу (RACGAP1). Этот белок вовлечен в регуляцию взаимодействия между Rho- и Rac-GTPазами, участвуя в реорганизации цитоскелета, трансформации клеток и метастазировании. В дальнейших исследованиях мы планируем установить роль этих белков в [Na⁺]_i/[K⁺]_i-опосредованном механизме регуляции транскрипции миокинов.

На основании проведенного обзора литературы нами были отобраны четыре наиболее охарактеризованных миокина (интерлейкины IL-1β, IL-6, IL-8, IL-15, и лейкомиа-ингибирующий фактор LIF) для выявления роли предварительной тренировки на их секрецию в экспериментах *in vivo*. Эти эксперименты представлялись нами

существенными для разработки режима оптимальной электростимуляции клеток скелетной мускулатуры C2C12 в условиях *in vitro*.

Как динамические, так и статические упражнения по-разному влияют на содержание цитокинов в плазме крови спортсменов и нетренированных лиц. Так, у спортсменов после циклической нагрузки наблюдалось двукратное увеличение концентрации IL-8 в плазме, тогда как у нетренированных лиц подобная реакция отсутствовала. Увеличение IL-15, вызванное статической нагрузкой в плазме спортсменов-тяжелоатлетов, не наблюдалось в контрольной группе. Эти факты можно объяснить адаптационными изменениями в организме спортсменов, вызванными регулярными физическими нагрузками.

Возбуждение миоцитов сопровождается изменением трансмембранного градиента одновалентных катионов вследствие притока Na^+ и оттока K^+ через потенциал-зависимые и Ca^{2+} - чувствительные ионные каналы. В мышечных клетках человека и экспериментальных животных длительные упражнения приводят к увеличению $[\text{Na}^+]_i$ в 3-4 раза и снижению $[\text{K}^+]_i$ на 50%, что сопровождается повышением $[\text{K}^+]_i$ в плазме и межклеточной жидкости. Это позволяет предположить, что увеличение соотношения $[\text{Na}^+]_i/[\text{K}^+]_i$ является фактором, стимулирующим продукцию миокинов. В некоторых типах клеток повышение соотношения $[\text{Na}^+]_i/[\text{K}^+]_i$ приводило к экспрессии mRNA ряда цитокинов, в том числе IL-6.

Сравнительный анализ полученных результатов свидетельствует, что есть сходные закономерности в продукции миокинов при динамических нагрузках у экспериментальных животных и у людей. В частности, после тренировок более выражено возрастание концентрации IL-6 непосредственно после физической нагрузки. Так же после тренировок как у спортсменов, так и у мышей ниже фоновая концентрация IL-15 в покое снижается, одновременно гораздо в меньшей степени выражено падение содержания IL-15 в отдаленные сроки после нагрузки.

Полученные результаты свидетельствуют о корректности сравнительных исследований миокинов у спортсменов и у экспериментальных животных.