

Сведения о выполненных работах в 2021 году
по проекту «**Механизмы метаболического контроля в скелетных мышцах:
новые пути коррекции метаболического синдрома**»,
поддержанному Российским научным фондом
Соглашение № 19-15-00118

Руководитель Капилевич Леонид Владимирович, д-р мед. наук

В том случае, когда дифференцировка клеток C2C12 проходит в среде с избыточным содержанием глюкозы, значительно растет количество p-Akt, но чувствительность клеток к воздействию инсулина снижается. Электростимуляция оказывает значительный эффект на фосфорилирование Akt в интактных клетках. 2-х часовая EPS увеличивает концентрацию p-Akt в интактных клетках втрое, 6-часовая – в 10 раз, у 24-х часовой EPS прирост уже был незначительным.

В клетках, которые дифференцировались в среде с избыточным содержанием глюкозы, фоновая концентрация p-Akt возрастала в 10 раз в сравнении с клетками, которые дифференцировались в обычной среде, но прирост p-Akt под воздействием инсулина был всего в два раза (против 6-кратного в обычной среде).

2-х часовая EPS не влияла на фоновую концентрацию p-Akt в клетках, но в два раза увеличивала ответ на стимуляцию инсулином. Дальнейшее увеличение времени электростимуляции (до 6 и 24 часов) вдвое увеличивала фоновую концентрацию p-Akt но полностью угнетала ответ на воздействие инсулина. После 24-х часовой стимуляции воздействие инсулина, напротив, приводило к значительному снижению количества p-Akt в клетках.

Полученные результаты свидетельствуют, что в реализацию эффектов среды с избыточным содержанием глюкозы и электростимуляции вовлекаются сигнальные пути, сопряженные с pAMPK / AMPK, pACC / ACC. В клетках так же изменялось содержание изоформ Na/K-ATPase. Однако общее содержание GLUT4 оставалось неизменным.

Так же важно отметить увеличение соотношения внутриклеточных концентраций ионов Na⁺ и K⁺. Это свидетельствует в пользу высказанной нами ранее гипотезы о возможной роли моновалентных катионов в регуляции секреторных ответов скелетной мышцы на сокращение.

Полученные результаты убедительно свидетельствуют, что культивирование миобластов в среде с избытком глюкозы приводит к угнетению фосфорилирования Akt при воздействии инсулина в сравнении с контролем, что свидетельствует о формировании инсулинорезистентности. В то же время электростимуляция способствует восстановлению процесса фосфорилирования Akt под влиянием инсулина. Полученный результат свидетельствует что электростимуляция в данном случае, аналогично физическим нагрузкам *in vivo*, приводит к снижению инсулинорезистентности.

Считается, что эндогенные кардиотонические стероиды (CTS), такие как убаин и маринобуфагенин, представляют собой гормоны коры надпочечников, секретируемые во время физических упражнений и стрессовой реакции. Скелетная мышца, которая содержит самый большой пул Na, K-АТФазы (НКА), рецептора CTS, является основной секреторной тканью и способствует адаптации к упражнениям, секретируя интерлейкин-6 (IL-6) и множество других цитокинов. Мы исследовали, модулируют ли убаин и маринобуфагенин секрецию цитокинов в культивируемых клетках скелетных мышц человека. Мы показали, что убаин, но не маринобуфагенин, стимулировал секрецию IL-6, IL-8 и TNF- α клетками здоровых людей и субъектов с диабетом 2 типа. Маринобуфагенин стимулировал секрецию IL-5 обеими группами клеток, тогда как убаин - только диабетическими клетками. Различия в секреции цитокинов сопровождались различными сигнальными ответами ERK1 / 2 и p38 MAPK. Убаин заметно снижал количество α 1-субъединицы НКА, активировал путь mTOR и блокировал индуцируемый гипоксией фактор-1 α . Кроме того, убаин подавлял базальное и стимулированное IL-6 фосфорилирование STAT3, ключевого фактора транскрипции, расположенного ниже рецептора IL-6. Наши результаты показывают, что уменьшение количества STAT3 и ингибирование его фосфорилирования способствуют подавлению передачи сигналов STAT3 с помощью убаина. В совокупности наши результаты указывают на роль CTS и НКА в регуляции секреторной функции и действия IL-6 в скелетных мышцах.

Мы так же показали, что убаин подавляет передачу сигналов IL-6 / STAT3, но способствует секреции IL-6 и других цитокинов в культивируемых клетках скелетных мышц человека. Убаин также модулировал ERK1 / 2, mTOR, а также путь HIF-1 α , которые все участвуют в ответах скелетных мышц на упражнения (Egan and Zierath, 2013). Однако необходимо подчеркнуть, что мы не наблюдали серьезных сигнальных реакций, по крайней мере, до 3 часов лечения убаином. Хотя мы не изучали, как клетки скелетных мышц реагируют в течение первого часа, когда могли наблюдаться быстрые ответы, задержка косвенно предполагает, что изменения в передаче сигналов клеток могут быть в первую очередь из-за измененных $[K^+]_i$ и $[Na^+]_i$, вызванных ингибированием НКА. В самом деле, даже для дефосфорилирования STAT3 требуется несколько часов, возможно, из-за измененных уровней или активности фосфатаз или других белков, участвующих в его регуляции.

Динамика влияния убаина на количество НКА α 1 и STAT3 в сочетании с повышенной секрецией IL-6 и экспрессией мРНК НКА α 1 и IL-6 косвенно указывает на то, что клетки скелетных мышц человека проходят несколько фаз в ответ на убаин. Наша гипотеза состоит в том, что в первой фазе (1–6 ч) НКА α 1 теряется из-за увеличения его эндоцитоза и протеолиза. Ингибирование НКА в сочетании со сниженным содержанием НКА в сарколемме приводит к прогрессивному снижению соотношения $[K^+]_i$: $[Na^+]_i$, что подавляет трансляцию и запускает транскрипционные ответы. Эта фаза также характеризуется инактивацией STAT3 (дефосфорилирование) и активацией Akt (фосфорилирование), которые проявляются через 6 часов лечения убаином. Кроме того, на основании результатов в миообластах убаин начинает подавлять путь HIF-1.

Вторая фаза (6–12 ч) характеризуется продолжающейся и более выраженной потерей $\text{NK}\alpha 1$ и дальнейшим снижением соотношения $[\text{K}^+]_i : [\text{Na}^+]_i$. К концу этой фазы клетки также отвечают активацией путей ERK1 / 2 и mTOR.

На третьей фазе (12–24 ч) потеря STAT3, который имеет относительно короткий период полураспада (~4–8 часов), предполагает подавление трансляции. Убаин заметно подавлял повышающую регуляцию HIF-1 α с помощью CoCl₂, что ингибирует его протеолиз, что также позволяет предположить, что трансляция подавляется после 24-часовой обработки убаином. Однако повышающая регуляция транскрипции генов ATP1A1 и IL-6 в сочетании с активацией пути mTOR и увеличение секреции IL-6 указывает на то, что синтез специфических белков увеличивается, возможно, чтобы противодействовать дисбалансу в отрицательной обратной связи. Важно отметить, что хотя соотношение $[\text{K}^+]_i : [\text{Na}^+]_i$, скорее всего, находится на самом низком уровне к концу третьей фазы, экспрессия IL-6 имела место. Было показано, что регуляция его активности повышается, когда соотношение $[\text{K}^+]_i : [\text{Na}^+]_i$ снижается в разных типах клеток, что согласуется с повышенной экспрессией и секрецией IL-6, которые мы наблюдали в мышечных трубках.