

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ТОМСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
ИМ. М.В. ЛОМОНОСОВА

**С.Н. Орлов, Л.В. Капилевич, Е.Ю. Дьякова,
А.Н. Захарова, А.В. Кабачкова,
Ю.Г. Калининкова, Е.А. Климанова,
Т.А. Кироненко, К.В. Милованова,
С.В. Сидоренко**

СКЕЛЕТНЫЕ МЫШЦЫ КАК ЭНДОКРИННЫЙ ОРГАН

Томск
Издательский Дом Томского государственного университета
2018

УДК 376-056.26(470+571)

ББК 74.044.6(2Рос)

О66

**Орлов С.Н., Капилевич Л.В., Дьякова Е.Ю., Захарова А.Н.,
Кабачкова А.В., Калининкова Ю.Г., Климанова Е.А.,
Кироненко Т.А., Милованова К.В., Сидоренко С.В.**

О66

Скелетные мышцы как эндокринный орган. – Томск :
Издательский Дом Томского государственного университета,
2018. – 190 с.

ISBN 978-5-94621-765-1

В монографии рассматривается способность мышечных клеток высвобождать белки и пептиды, оказывающие влияние на функциональную активность клеток других тканей – миокины. Ключевым фактором экспрессии и продукции миокинов является физическая нагрузка. Уровень экспрессии миокинов в значительной степени зависит от количества мышечной массы, вовлеченной в работу. Миокины вовлекаются в межклеточную коммуникацию и являются важным элементом поддержания гомеостаза и адаптации организма к физической нагрузке. Физическая нагрузка увеличивает транскрипцию миокинов через сигнальные системы, активирующиеся в ответ на снижение парциального давления кислорода, увеличение концентрации $[Ca^{2+}]_i$ и АМР, а также соотношение одновалентных катионов.

Для научных работников и аспирантов, выполняющих исследования в области физиологии и патологии скелетных мышц и эндокринной системы.

УДК 376-056.26(470+571)

ББК 74.044.6(2Рос)

*Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда «Скелетные мышцы как эндокринный орган: роль натрий-калий опосредованного механизма регуляции транскрипции»
(проект № 16-15-10026)*

Рецензенты:

доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой нормальной физиологии Красноярского государственного медицинского университета

А.А. Савченко;

доктор медицинских наук, профессор кафедры биофизики и функциональной диагностики Сибирского государственного медицинского университета *И.В. Ковалев*

ISBN 978-5-94621-765-1

© Орлов С.Н., Капилевич Л.В., Дьякова Е.Ю., Захарова А.Н., Кабачкова А.В., Калининкова Ю.Г., Климанова Е.А., Кироненко Т.А., Милованова К.В., Сидоренко С.В., 2018

ВВЕДЕНИЕ

Скелетные мышцы, составляющие до 40% от общей массы тела, являются частью опорно-двигательного аппарата человека и выполняют функции, связанные с поддержанием позы и локомоциями¹. Морфологически скелетные мышцы состоят из поперечнополосатых мышечных волокон; функционально – это высокоспециализированная ткань, которая имеет свойства электрической возбудимости и механической сократимости. Исследования последних лет позволили сделать вывод, что многофункциональный характер скелетной мышечной ткани позволяет ей оказывать влияние на многие системы организма.

Исследования последних лет позволили пересмотреть классические представления о функциях многих органов и тканей. Так, с начала двухтысячных годов в исследованиях *in vivo* было показано, что мышечные клетки способны высвобождать белки и пептиды, оказывающие влияние на функциональную активность клеток других тканей². Среди таких пептидов в наиболее полной мере изучены IL-6, IL-8, IL-15, миостатин, PGE₂, LIF, COX, CXCL, eNOS. Эти молекулы представляют собой ранее известные цитокины (IL-6, IL-8, IL-15, CXCL1 и LIF), а также другие белки (миостатин, COX и eNOS) и липиды (PGE₂)³.

Первые статьи, посвященные изучению эндокринной функции скелетных мышц, начали появляться с начала тысячелетия⁴.

¹ Покровский В.М. Физиология человека. М.: Медицина, 2003. 664 с.

² Steensberg A., van Hall G., Osada T. et al. Production of interleukin-6 in contracting human skeletal muscles can account for the exercise-induced increase in plasma interleukin-6 // J. Physiol. 2000. V. 529, № 1. P. 237–242.

³ Petersen A.M.W., Pedersen B.K. The anti-inflammatory effect of exercise // J. Appl. Physiol. 2005. V. 98, № 4. P. 1154–1162.

⁴ Ibid.; Steensberg A., van Hall G., Osada T. et al. Production of interleukin-6 in contracting human skeletal muscles can account for the exercise-induced increase in plasma inter-

Группой исследователей под руководством J.M. Argiles (2005 г.) было установлено, что метаболический контроль способна осуществлять не только жировая, но и скелетная мышечная ткань. Исследования *in vivo* показали, что мышечные клетки способны высвобождать белки и пептиды, оказывающие модулирующее воздействие на функциональную активность клеток других тканей¹. Включаясь в механизмы межклеточной коммуникации, эти молекулы играют различную роль в регуляции селекции и дифференцировки клеток. Многие виды тканей в организме человека способны продуцировать специфические белки, имеющие как аутокринные, так и паракринные эффекты. По аналогии с адипокинами (белками, секретируемыми адипоцитами)², гепатокинами (белками, секретируемыми в печени)³, лимфокинами (белками, секретируемыми лимфоцитами)⁴ эти новые молекулы были определены как миокины (*myokines*)¹.

leukin-6 // *J. Physiol.* 2000. V. 529, № 1. P. 237–242; Akerstrom T., Steensberg A., Keller P. et al. Exercise induces interleukin-8 expression in human skeletal muscle // *J. Physiol.* 2005. V. 563. P. 507–516; Hiscock N., Chan M.H., Bisucci T. et al. Skeletal myocytes are a source of interleukin-6 mRNA expression and protein release during contraction: evidence of fiber type specificity // *FASEB J.* 2004. V. 18, № 9. P. 992–994.

¹ Argiles J.M., López-Soriano J., Almendro V. et al. Cross-talk between skeletal muscle and adipose tissue: a link with obesity? // *Med. Res. Rev.* 2005. V. 25. P. 49–65.

² Maeda K., Okubo K., Shimomura I. et al. cDNA cloning and expression of a novel adipose specific collagen-like factor, apM1 (adipose most abundant gene transcript 1). 1996 // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2012. V. 425, № 3. P. 556–559; Trayhurn P., Drevon C. A., Eckel J. Secreted proteins from adipose tissue and skeletal muscle – adipokines, myokines and adipose/muscle cross-talk // *Arch. Physiol. Biochem.* 2011. V. 117. P. 47–56; Trayhurn P., Beattie J.H. Physiological role of adipose tissue: white adipose tissue as an endocrine and secretory organ // *Proc. Nutr. Soc.* 2001. V. 60. P. 329–339; Rajala M.W., Scherer P.E. Minireview: The adipocyte--at the crossroads of energy homeostasis, inflammation, and atherosclerosis // *Endocrinology.* 2003. V. 144, № 9. P. 3765–3773.

³ Misu H., Takamura T., Matsuzawa N. et al. Genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately upregulated with fasting hyperglycaemia in livers of patients with type 2 diabetes // *Diabetologia.* 2007. V. 50, № 2. P. 268–277; Takamura T., Sakurai M., Ota T. et al. Genes for systemic vascular complications are differentially expressed in the livers of type 2 diabetic patients // *Diabetologia.* 2004. V. 47, № 4. P. 638–647; Takeshita Y., Takamura T., Hamaguchi E. et al. Tumor necrosis factor-alpha-induced production of plasminogen activator inhibitor 1 and its regulation by pioglitazone and cerivastatin in a nonmalignant human hepatocyte cell line // *Metabolism.* 2006. V. 55, № 11. P. 1464–1472.

⁴ Dumonde D.C., Wolstencroft R.A., Panayi G.S. et al. «Lymphokines»: non-antibody mediators of cellular immunity generated by lymphocyte activation // *Nature.* 1969.

Показано, что ключевым фактором экспрессии и продукции миокинов является физическая нагрузка и уровень экспрессии миокинов в значительной степени зависит от количества мышечной массы, вовлеченной в работу². В то же время физическая нагрузка характеризуется различными качественными и количественными показателями, включая интенсивность и объем, степень и характер мышечного напряжения, мощность мышечной работы. Анализ научной литературы показал отсутствие систематических исследований, посвященных модификации параметров физической нагрузки на продукцию миокинов.

Убедительно доказано, что миокины вовлекаются в межклеточную коммуникацию и являются важным элементом поддержания гомеостаза и адаптации организма к физической нагрузке³. Такая роль миокинов обеспечивается разнообразием их эффектов: миокины способны модулировать функцию клеток иммунной системы, локальный кровоток, энергетический метаболизм, процессы пролиферации и дифференцировки миоцитов⁴.

Несмотря на наличие большого числа исследований эндокринной функции мышц, молекулярные механизмы продукции миокинов при различных видах физической нагрузки остаются малоизученными. Предполагается, что физическая нагрузка

V. 224. № 5214. P. 38–42; Halpern M.T. Human nonspecific suppressive lymphokines // *J. Clin. Immunol.* 1991. V. 11, № 1. P. 1–12.

¹ Pedersen B.K., Akerström T.C.A., Nielsen A.R. et al. Role of myokines in exercise and metabolism // *J. Appl. Physiol.* 2007. V. 103, № 3. P. 1093–1098.

² Pedersen B.K. Muscle as a secretory organ // *Compr. Physiol.* 2013. V. 3. P. 1337–1362.

³ Pedersen B.K., Akerström T.C.A., Nielsen A.R. et al. Role of myokines in exercise and metabolism // *J. Appl. Physiol.* 2007. V. 103, № 3. P. 1093–1098.

⁴ Broholm C., Laye M.J., Brandt C. et al. LIF is a contraction-induced myokine stimulating human myocyte proliferation // *J. Appl. Physiol.* 2011. V. 111, № 1. P. 251–259; Otis J.S., Burkholder T.J., Pavlath G.K. Stretch-induced myoblast proliferation is dependent on the COX2 pathway // *Exp. Cell Res.* 2005. V. 310. P. 417–425; Pedersen B.K., Steensberg A., Fischer C. et al. Searching for the exercise factor: is IL-6 a candidate? // *J. Muscle Res. Cell. Motil.* 2003. V. 24, № 2–3. P. 113–119; Pedersen L., Olsen C.H., Pedersen B.K. et al. Muscle-derived expression of the chemokine CXCL1 attenuates diet-induced obesity and improves fatty acid oxidation in the muscle // *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2012. V. 302, № 7. P. 831–840.

увеличивает транскрипцию миокинов через сигнальные системы, активирующиеся в ответ на снижение парциального давления кислорода, увеличение концентрации $[Ca^{2+}]_i$ и АМР. Известно, что физическая нагрузка сопровождается увеличением в скелетной мускулатуре соотношения $[Na^+]_i/[K^+]_i$. В наших исследованиях было показано, что увеличение соотношения $[Na^+]_i/[K^+]_i$ является достаточным условием изменения транскрипции генов.

Значительные перспективы имеет исследование роли миокинов в коррекции различных расстройств. Показано изменение продукции миокинов при сахарном диабете¹, ожирении², остеопорозе³, а также при метаболических нарушениях⁴. Это позволяет рассматривать миокины как возможный механизм, через который реализуются терапевтические эффекты физической активности при различных заболеваниях. Выяснение этих механизмов раскрывает возможности эффективной комбинации режимов двигательной активности с различными методами фармакотерапии.

¹ Yang M., Chen P., Jin H. et al. Circulating levels of irisin in middle-aged first-degree relatives of type 2 diabetes mellitus – correlation with pancreatic β -cell function // *Diabetol. Metab. Syndr.* 2014. V. 6, № 1. P. 133–139; Huh J.Y., Siopi A., Mougios V. et al. Irisin in response to exercise in humans with and without metabolic syndrome // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2015. V. 100. P. 453–457; Li Y., Li F., Lin B. et al. Myokine IL-15 regulates the crosstalk of co-cultured porcine skeletal muscle satellite cells and preadipocytes // *Mol. Biol. Rep.* 2014. V. 41, № 11. P. 7543–7553.

² Pedersen B.K., Febbraio M.A. Muscles, exercise and obesity: skeletal muscle as a secretory organ // *Nat. Rev. Endocrinol.* 2012. V. 8. P. 457–465; Pierce J.R., Maples J.M., Hickner R.C. IL-15 concentrations in skeletal muscle and subcutaneous adipose tissue in lean and obese humans: local effects of IL-15 on adipose tissue lipolysis // *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2015. V. 308, № 12. P. 1131–1139; Blüher S., Panagiotou G., Petroff D. et al. Effects of a 1-year exercise and lifestyle intervention on irisin, adipokines, and inflammatory markers in obese children // *Obesity.* 2014. V. 22, № 7. P. 1701–1708.

³ Datta N.S. Muscle-bone and fat-bone interactions in regulating bone mass: do PTH and PTHrP play any role? // *Endocrine.* 2014. V. 47. P. 389–400; Lai X., Price C., Lu X.L. et al. Imaging and quantifying solute transport across periosteum: implications for muscle-bone crosstalk // *Bone.* 2014. V. 66. P. 82–89.

⁴ Henriksen T., Green C., Pedersen B.K. Myokines in myogenesis and health // *Recent Pat. Biotechnol.* 2012. V. 6, № 3. P. 167–171.

Таким образом, в настоящее время накоплено достаточно данных для рассмотрения миокинов как единой функциональной системы, играющей важную роль в механизмах адаптации организма к регулярным физическим нагрузкам.

С.Н. Орлов, Л.В. Каплевич

Глава 1. СЕКРЕТОРНАЯ ФУНКЦИЯ СКЕЛЕТНЫХ МЫШЦ: МЕХАНИЗМЫ ПРОДУКЦИИ И ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ МИОКИНОВ

1.1. Классификация миокинов

Миокины – это молекулы, экспрессируемые, продуцируемые и высвобождаемые мышечными клетками, обладающие аутокринными, паракринными или эндокринными эффектами. Большинство исследователей относит миокины к обширной категории мелких белков (~5–20 кДа) и протеогликанов, что имеет большое значение в плане их возможной роли в межклеточной сигнализации.

Первым идентифицированным миокином, полученным из мышцы, был *миостатин*. Его открытие произошло в лаборатории Си-Чжин Ли в Университете им. Джона Хопкинса в 1997 году¹. В 2000 году *IL-6* был определен как миокин, высвобождающийся в кровоток при мышечном сокращении². В эксперименте было зафиксировано экспоненциальное увеличение концентрации этого интерлейкина пропорционально продолжительности сокращения и количеству мышечной массы, вовле-

¹ Allen D.L., Cleary A.S., Speaker K.J et al. Myostatin, activin receptor IIb, and follistatin-like-3 gene expression are altered in adipose tissue and skeletal muscle of obese mice // *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2008. V. 294. P. 918–927; Pedersen B.K., Febbraio M.A. Muscle as an endocrine organ: focus on muscle-derived interleukin-6 // *Physiol. Rev.* 2008. V. 88. P. 1379–1406.

² Steensberg A., van Hall G., Osada T. et al. Production of interleukin-6 in contracting human skeletal muscles can account for the exercise-induced increase in plasma interleukin-6 // *J. Physiol.* 2000. V. 529, № 1. P. 237–242.

ченной в него¹. В настоящее время известно более 82 миокинов², относящихся к различным структурно-функциональным группам³. Показано, что ключевым фактором экспрессии и продукции миокинов является физическая нагрузка. Например, уровень экспрессии IL-6 зависит от количества мышечной массы, вовлеченной в работу⁴.

Среди миокинов в наиболее полной мере изучены IL-6⁵, IL-8⁶, IL-15⁷, миостатин⁸, PGE2⁹, LIF¹⁰, COX¹¹, CXCL¹², eNOS¹³.

¹ Austin L., Burgess A.W. Stimulation of myoblast proliferation in culture by leukaemia inhibitory factor and other cytokines // *J. Neurol. Sci.* 1991. V. 101, № 2. P. 193–197.

² Raschke S., Eckardt K., Bjørklund Holven K. Identification and validation of novel contraction-regulated myokines released from primary human skeletal muscle cells // *PLoS One*. 2013. V. 8, № 4. e62008; Catoire M., Mensink M., Kalkhoven E. et al. Identification of human exercise-induced myokines using secretome analysis // *Physiol. Genomics*. 2014. V. 46, № 7. P. 256–267; Щербаков В.И., Скосырева Г.А., Рябичев Т.И. Роль миокинов в регуляции энергетического обмена // *Бюлл. сиб. мед.* 2012. № 3. С. 173–178.

³ Симбирцев А.С. Цитокины: классификация и биологические функции // *Цитокины и воспаление*. 2004. № 3. С. 16–22.

⁴ Pedersen B.K. Muscle as a secretory organ // *Compr. Physiol.* 2013. V. 3. P. 1337–1362.

⁵ Pedersen B.K., Steensberg A., Fischer C. et al. Searching for the exercise factor: is IL-6 a candidate? // *J. Muscle Res. Cell. Motil.* 2003. V. 24, № 2–3. P. 113–119.

⁶ Pedersen B.K., Akerström T.C.A., Nielsen A.R. et al. Role of myokines in exercise and metabolism // *J. Appl. Physiol.* 2007. V. 103, № 3. P. 1093–1098.

⁷ Tamura Y., Watanabe K., Kantani T. et al. Upregulation of circulating IL-15 by treadmill running in healthy individuals: is IL-15 an endocrine mediator of the beneficial effects of endurance exercise? // *Endocr. J.* 2011. V. 58, № 3. P. 211–215.

⁸ Kainulainen H., Papaioannou K.G., Silvennoinen M. et al. Myostatin/activin blocking combined with exercise reconditions skeletal muscle expression profile of mdx mice // *Mol. Cell. Endocrinol.* 2014. V. 399. P. 131–142.

⁹ Karamouzis M., Langberg H., Skovgaard D. et al. In situ microdialysis of intramuscular prostaglandin and thromboxane in contracting skeletal muscle in humans // *Acta Physiol. Scand.* 2001. V. 171, № 1. P. 71–76.

¹⁰ Broholm C., Mortensen O.H., Nielsen S. et al. Exercise induces expression of leukaemia inhibitory factor in human skeletal muscle // *J. Physiol.* 2008. V. 586, № 8. P. 2195–2201.

¹¹ Carroll C.C., O'Connor D.T., Steinmeyer R. et al. The influence of acute resistance exercise on cyclooxygenase-1 and -2 activity and protein levels in human skeletal muscle // *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2013. V. 305, № 1. P. 24–30.

¹² Pedersen L., Olsen C.H., Pedersen B.K. et al. Muscle-derived expression of the chemokine CXCL1 attenuates diet-induced obesity and improves fatty acid oxidation in the muscle // *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2012. V. 302, № 7. P. 831–840.

¹³ Cocks M., Shaw C.S., Shepherd S.O. et al. Sprint interval and endurance training are equally effective in increasing muscle microvascular density and eNOS content in sedentary males // *J. Physiol.* 2013. V. 591, № 3. P. 641–656.

Эти миокины представляют собой молекулы ранее известных цитокинов (IL-6, IL-8, IL-15, CXCL1 и LIF), а также других белков (миостатин, COX и eNOS) и липидов (PGE2). Для названных молекул, во-первых, имеются наиболее убедительные доказательства их продукции именно мышечными клетками, индуктором которой является сократительная активность, а во-вторых, доказан достаточно широкий спектр физиологических эффектов.

В связи со значительно возросшим числом молекул, которые были идентифицированы как миокины, многие авторы обратились к проблеме их классификации¹. Однако единой, общепринятой классификации миокинов до сегодняшнего дня нет. И для этого есть вполне объективные причины. Большинство миокинов являются представителями весьма многочисленной и разнообразной группы цитокинов. Поэтому в основном исследователи пытаются построить классификацию миокинов по той же схеме, по которой традиционно классифицируют цитокины². Однако такие попытки чаще всего оказываются неудачными. В основе классификации цитокинов традиционно лежат два признака – химическая природа и физиологический эффект. Поскольку цитокины прежде всего рассматриваются как регуляторы иммунитета, то эффект их традиционно оценивают как про- или противовоспалительный. В этой связи следует отметить, что в отличие от регуляции иммунного ответа физиологические эффекты миокинов в большинстве случаев не выяснены. В лучшем случае они зафиксированы на феноменологическом уровне. Поэтому такой подход, по сути, дублирует общепринятые классификации цитокинов, и не основан на физиологическом подходе.

¹ Raschke S., Eckel J. Adipo-myokines: two sides of the same coin--mediators of inflammation and mediators of exercise // *Mediators Inflamm.* 2013. (2013): 320724; Iizuka K., Machida T., Hirafuji M. Skeletal muscle is an endocrine organ // *J. Pharmacol. Sci.* 2014. V. 125, № 2. P. 125–131; Pedersen B.K., Edward F. Adolph distinguished lecture: muscle as an endocrine organ: IL-6 and other myokines // *J. Appl. Physiol.* 2009. V. 107. P. 1006–1014.

² Симбирцев А.С. Цитокины: классификация и биологические функции // *Цитокины и воспаление.* 2004. № 3. С. 16–22; Borish L.C., Steinke J.W. Cytokines and chemokines // *J. Allergy Clin. Immunol.* 2003. V. 111, № 2. P. 460–475; Lata S., Raghava G.P.S. CytoPred: a server for prediction and classification of cytokines // *Protein Eng. Des. Sel.* 2008. V. 21, № 4. P. 279–282.

В максимально обобщенном виде классификация, основанная на таком подходе, выглядит так:

– цитокины подсемейства IL-6 (цитокины, связывающиеся с рецептором gp130 или CD130) – IL-6 (другое обозначение у человека IL6 (ген IL6)) и LIF (ген LIF)³⁸;

– подсемейство цитокинов, связывающихся с рецепторами CD122 и CD132 – интерлейкин 15 (другие обозначения у человека IL-15, IL15 (ген IL15))¹;

– хемокины подсемейства CXС (цитокины размером от 8 до 10 кДа) – CXCL1 (другие обозначения у человека GRO-alpha, MGSA, NAP-3 (ген CXCL1), у мыши – Gm1960 (ген Cxc13)), CXCL8 (другие обозначения у человека IL-8, NAP-1 (ген IL8))²;

– суперсемейство TGF-beta/BMP (трансформирующий фактор роста костного морфогенетического белка) – миостатин или фактор роста и дифференцировки 8 (myostatin, growth differentiation factor 8, GDF8 (ген MSTN)), который связывается с рецепторами ACVR2B (activin type II receptor, активиновый рецептор II типа)³;

– семейство простагландинов – PGE2 – группа гормонов, образующихся из арахидоновой кислоты под действием циклооксигеназы (COX) и PGE-синтазы⁴;

– COX, или простагландин-эндопероксид синтаза (prostaglandin-endoperoxide synthase, PTGS) – фермент, катализирующий первые две стадии синтеза Pg и необходимый для формирования PGG2 (обеспечение стереоспецифичности), представляет собой гомодимер из идентичных гликопротеинов (576 и 581 а.к.)⁵;

¹ Steel J.C., Waldmann T.A., Morris J.C. Interleukin-15 biology and its therapeutic implications in cancer // Trends Pharmacol. Sci. 2013. V. 33, № 1. P. 35–41.

² Zlotnik A., Yoshie O. The chemokine superfamily revisited // Immunity. 2012. V. 36. P. 705–716.

³ Шишкин С.С. Миостатин и другие биохимические факторы, регулирующие рост мышечной ткани у человека и ряда высших позвоночных // Успехи биол. химии. 2004. Т. 44. С. 209–262; Allen D.L., Hittel D.S., McPherron A.C. Expression and function of myostatin in obesity, diabetes, and exercise adaptation // Med Sci Sport. Exerc. 2011. V. 43, № 10. P. 1828–1835.

⁴ Curtis-Prior P. The Eicosanoids. Wiley, 2004. 654 p.

⁵ Северин Е.С. Биохимия. М.: ГЭОТАР-МЕД, 2004. 779 с.

– эндотелиальная синтаза оксида азота (eNOS) – это одна из NO-синтаз человека, кодируемая геном NOS3, состоящая из оксигеназного и редуктазного доменов¹.

Пожалуй, наиболее успешной попыткой построить классификацию миокинов по функциональному признаку можно признать объединение их с другой группой молекул – регуляторов энергетического обмена – адипокинами. Поскольку миокины, в плане влияния на энергетический обмен, являются либо антагонистами, либо агонистами адипокинов, то Silja Raschke and Jurgen Eckel (2013)² предложили сформировать три группы – миокины, адипомиокины и адипокины (рис. 1). Такой подход можно признать перспективным, если рассматривать роль миокинов только с позиций регуляции энергетического баланса. Однако уже сейчас совершенно ясно, что функции миокинов этим не ограничиваются.

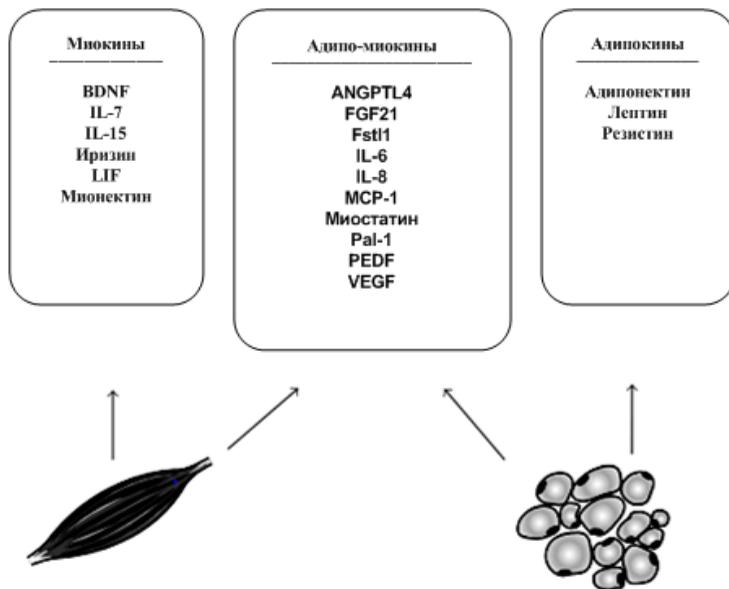


Рис. 1. Адипокины, миокины и адипо-миокины

¹ Alderton W.K., Cooper C.E., Knowles R.G. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition // *Biochem. J.* 2001. V. 615. P. 593–615.

² Raschke S., Eckel J. Adipo-myokines: two sides of the same coin--mediators of inflammation and mediators of exercise // *Mediators Inflamm.* 2013. (2013): 320724.

Поиск оригинальных статей в PubMed был выполнен для всех миокинов, представленных в табл. 1, чтобы выявить среди них те, которые также секретируются адипоцитами. Были использованы следующие термины для поиска: «жировая ткань», «адипоциты» и указан цитокин / белок. Список представленных статей также был использован для поиска дальнейших работ. В указанных статьях опубликованы данные о том, что цитокины / белки секретируются или не секретируются адипоцитами или жировой тканью. Не выявлено опубликованных данных о секреции LIF и иризина адипоцитами или жировой тканью¹.

1.2. Физиологическое значение миокинов

Физические нагрузки разной интенсивности приводят к запуску большого количества биохимических, молекулярных и генетических механизмов, лежащих в основе адапционных реакций организма на физиологический стресс². Процессы адаптации организма к физическим нагрузкам различного характера связаны с изменениями нервной и гуморальной регуляции, адекватной перестройкой центральной и периферической гемодинамики и пр. Таким образом, физическая нагрузка оказывает системное воздействие на организм, что во многом опосредовано продукцией миокинов. Эти молекулы вовлечены в межклеточную коммуникацию и выполняют разнообразные роли, например:

– влияют на жировой обмен, вызывая липолиз, интерлейкин 6 (IL-6)³, интерлейкин 15 (IL-15)⁴, онкоген альфа, связанный с ростом (CXCL1, GRO-alpha, MGSA, NAP-3)¹;

¹ Raschke S., Eckel J. Adipo-myokines: two sides of the same coin--mediators of inflammation and mediators of exercise // *Mediators Inflamm.* 2013. (2013): 320724.

² Coffey V.G., Hawley J.A. The Molecular Bases of Training Adaptation // *Sport. Med.* 2007. V. 37. P. 737–763.

³ Pedersen B.K., Steensberg A., Fischer C. et al. Searching for the exercise factor : is IL-6 a candidate ? // *J. Muscle Res. Cell. Motil.* 2003. V. 24. № 2–3. P. 113–119; Pedersen B.K., Febbraio M.A. Muscle as an endocrine organ: focus on muscle-derived interleukin-6 // *Physiol. Rev.* 2008. V. 88. P. 1379–1406.

⁴ Tamura Y., Watanabe K., Kantani T. et al. Upregulation of circulating IL-15 by treadmill running in healthy individuals: is IL-15 an endocrine mediator of the beneficial effects of endurance exercise? // *Endocr. J.* 2011. V. 58, № 3. P. 211–215.

– способствуют ангиогенезу ИЛ-6 (показано увеличение уровня экспрессии мРНК фактора роста эндотелия сосудов (VEGF, vascular endothelial growth factor) в эксперименте с использованием культуры человеческих клеток A431)², CXCL1³, eNOS (эндотелиальной синтазы оксида азота)⁴;

– оказывают влияние на миобласты, способствуют их пролиферации и дифференцировке (CXCL1/КС, CXCL5/LIX, CXCL1/КС, CXCL5/LIX⁵, ингибирующий фактор лейкемии (LIF)⁶, простагландины PGE2 и PGF2α)⁷;

– способствуют регенерации и гипертрофии мышечных клеток (LIF⁸, простагландины⁹).

¹ Pedersen L., Olsen C.H., Pedersen B.K. et al. Muscle-derived expression of the chemokine CXCL1 attenuates diet-induced obesity and improves fatty acid oxidation in the muscle // *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2012. V. 302, № 7. P. 831–840.

² Cohen T., Nahari, D., Cerem L.W. et al. Interleukin 6 induces the expression of vascular endothelial growth factor // *J. Biol. Chem.* 1996. V. 271. P. 736–741.

³ Pedersen L., Olsen C.H., Pedersen B.K. et al. Muscle-derived expression of the chemokine CXCL1 attenuates diet-induced obesity and improves fatty acid oxidation in the muscle // *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2012. V. 302, № 7. P. 831–840.

⁴ Rudnick J., Püttmann B., Tesch P.A. et al. Differential expression of nitric oxide synthases (NOS 1-3) in human skeletal muscle following exercise countermeasure during 12 weeks of bed rest // *FASEB J.* 2004. V. 18, № 11. P. 1228–1230.

⁵ Nedachi T., Hatakeyama H., Kono T., Sato M. et al. Characterization of contraction-inducible CXC chemokines and their roles in C2C12 myocytes // *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2009. V. 297. P. 866–878.

⁶ Austin L., Burgess A.W. Stimulation of myoblast proliferation in culture by leukaemia inhibitory factor and other cytokines // *J. Neurol. Sci.* 1991. V. 101, № 2. P. 193–197; Rosenblatt J.D., Yong D., Parry D.J. Satellite cell activity is required for hypertrophy of overloaded adult rat muscle // *Muscle Nerve.* 1994. V. 17, № 6. P. 608–613; Hawke T.J., Garry D.J. Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology // *J. Appl. Physiol.* 2001. V. 91. P. 534–551; Mitchell P.O., Pavlath G.K. A muscle precursor cell-dependent pathway contributes to muscle growth after atrophy // *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2001. V. 281. P. 1706–1715; Spangenburg E.E., Booth F.W. Multiple signaling pathways mediate LIF-induced skeletal muscle satellite cell proliferation // *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2002. V. 283, № 1. P. 204–211.

⁷ Otis J.S., Burkholder T.J., Pavlath G.K. Stretch-induced myoblast proliferation is dependent on the COX2 pathway // *Exp. Cell Res.* 2005. V. 310. P. 417–425.

⁸ Reardon K.A., Kapsa R.M., Davis J. et al. Increased levels of leukemia inhibitory factor mRNA in muscular dystrophy and human muscle trauma // *Muscle Nerve.* 2000. V. 23, № 6. P. 962–966.

⁹ Sorokin A., Kozlowski P., Graves L. et al. Protein-tyrosine kinase Pyk2 mediates endothelin-induced p38 MAPK activation in glomerular mesangial cells // *J. Biol. Chem.* 2001. V. 276, № 24. P. 21521–21528.

Как следствие, миокины считаются важными факторами поддержания гомеостаза и адаптации мышц к физической нагрузке¹.

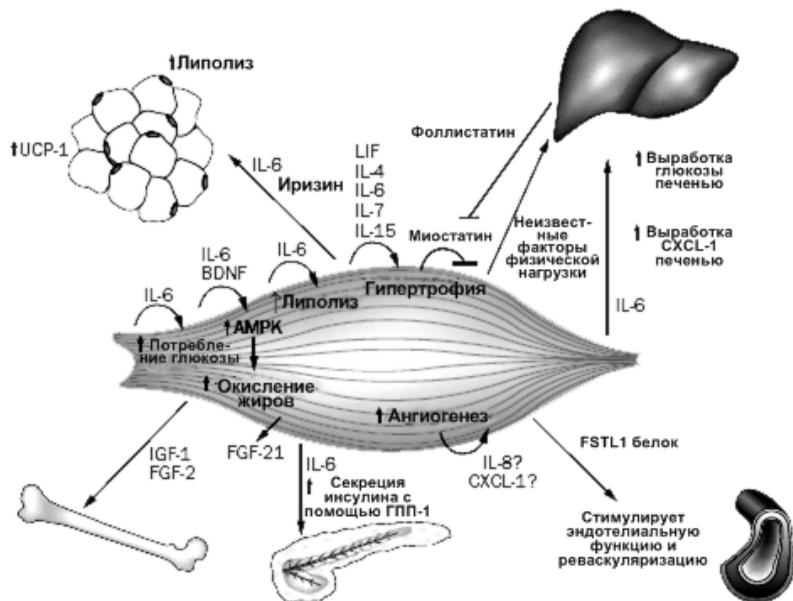


Рис. 2. Скелетная мышца – эндокринный орган. LIF, IL-4, IL-6, IL-7 и IL-15 способствуют мышечной гипертрофии. Миостатин ингибирует гипертрофию мышц, упражнения стимулируют высвобождение ингибитора миостатина – фоллистатина из печени. BDNF и IL-6 участвуют в AMPK-опосредованном окислении жиров, IL-6 стимулирует выработку инсулина и поглощение глюкозы. IL-6 оказывает системные эффекты на печень и жировую ткань: увеличивает секрецию инсулина с помощью GLP-1. IGF-1 и FGF-2 участвуют в формировании костной ткани, а FSTL1 белок улучшает функцию эндотелия и стимулирует ревазуляризацию ишемизированных сосудов. Ирисин играет важную роль в «побурении» белой жировой ткани²

¹ Broholm C., Pedersen B.K. Leukaemia inhibitory factor – An exercise-induced myokine // Exercise Immunology Review. 2010. V. 16. P. 77–85.

² Pedersen B.K., Febbraio M.A. Muscles, exercise and obesity: skeletal muscle as a secretory organ // Nat. Rev. Endocrinol. 2012. V. 8. P. 457–465.

Изучению эндокринных, паракринных и аутокринных эффектов миокинов посвящены работы таких авторов, как L. Pedersen (2012), G. Lutosławska (2012), H. Duzova (2012), L.C. Hunt (2013), M. Scheler (2013), K. Tsuchida (2014). В первую очередь рассматривается влияние миокинов на жировую ткань и печень, а также на костную ткань, поджелудочную железу и эндотелий сосудов¹. Доказано, что LIF, IL-4, IL-6, IL-7 и IL-15 способствуют мышечной гипертрофии и миогенезу. Миостатин тормозит мышечную гипертрофию, но физическая нагрузка приводит к высвобождению печенью ингибитора миостатина – фоллистатина. Установлено, что BDNF и IL-6 способствуют увеличению окислению жиров, опосредованному активацией АМР-чувствительной протеинкиназы (АМПК), а IL-8 может участвовать в ангиогенезе, опосредованным физическими нагрузками. В целом IL-6 обладает системными эффектами и оказывает влияние на печень, жировую ткань и увеличение инсулиновой секреции через регуляцию GLP-1 (рис. 2).

Интерлейкины. Тот факт, что сократительная активность является фактором, способствующим продукции **IL6** мышечными клетками, впервые был установлен методом биохимического анализа биоптатов после марафонского бега². В дальнейшем способность физических нагрузок и мышечного сокращения стимулировать экспрессию IL-6 была доказана в многочисленных исследованиях³. IL-6 продуцируется в работающих

¹ Pedersen B.K., Febbraio M.A. Muscles, exercise and obesity: skeletal muscle as a secretory organ // *Nat. Rev. Endocrinol.* 2012. V. 8. P. 457–465.

² Northoff H., Berg A. Immunologic mediators as parameters of the reaction to strenuous exercise // *Int. J. Sports Med.* 1991. V. 12, № 1. P. 9–15.

³ Bruunsgaard H., Galbo H., Halkjaer-Kristensen J. et al. Exercise-induced increase in serum interleukin-6 in humans is related to muscle damage // *J. Physiol.* 1997. V. 499 № 3. P. 833–841; Drenth J.P., Van Uum S.H., Van Deuren M. et al. Endurance run increases circulating IL-6 and IL-1ra but downregulates ex vivo TNF-alpha and IL-1 beta production // *J. Appl. Physiol.* 1995. V. 79, № 5. P. 1497–1503; Hellsten Y., Frandsen U., Orthenblad N. et al. Xanthine oxidase in human skeletal muscle following eccentric exercise: a role in inflammation // *J. Physiol.* 1997. V. 498, № 1. P. 239–248; Nehlsen-Cannarella S.L., Fagoaga O.R., Nieman D.C. et al. Carbohydrate and the cytokine response to 2.5 h of running // *J. Appl. Physiol.* 1997. V. 82, № 5. P. 1662–1667; Ostrowski K., Hermann C., Bangash A. et al. A trauma-like elevation of plasma cytokines in humans in response to treadmill running // *J. Physiol.* 1998. V. 513, № 3. P. 889–894;

мышцах в больших количествах и оказывает значительное влияние на организм человека, в том числе воздействует на жировую ткань, вызывая липолиз, регулирует жировой обмен, ингибирует TNF¹. Уровень экспрессии IL6 зависит от количества мышечной массы, вовлеченной в процесс физической работы². Есть данные, что непосредственно после выполнения динамической нагрузки (велозаезда) в мышечных клетках значительно возрастает уровень IL-6 и IL-8 mRNA, в то время как уровень белка в плазме остается неизменным. Эти данные свидетельствуют о том, что источником продукции IL-6, IL-8 являются именно мышечные клетки³.

Показано, что после бега в течение 30 минут на уровне 70% МПК у мужчин наблюдалось увеличение концентрации IL-15 в плазме крови. По мнению Y. Tamura, K. Watanabe и др., IL-15 оказывает эндокринное действие⁴.

Однако в настоящее время нет однозначных доказательств того, что при динамических нагрузках происходит увеличение концентрации IL-15 в мышечных клетках. После бега на беговой дорожке в течение 30 минут на уровне 75% МПК изменений экспрессии IL-15 mRNA в клетках мышц человека не зафиксировано⁵.

Ullum H., Haahr P.M., Diamant M. et al. Bicycle exercise enhances plasma IL-6 but does not change IL-1 alpha, IL-1 beta, IL-6, or TNF-alpha pre-mRNA in BMNC // *J Appl Physiol*. 1994. V. 77, № 1. P. 93–97.

¹ Pedersen B.K., Steensberg A., Fischer C. et al. Searching for the exercise factor: is IL-6 a candidate? // *J. Muscle Res. Cell. Motil*. 2003. V. 24, № 2–3. P. 113–119.

² Pedersen B.K. Muscle as a secretory organ // *Compr. Physiol*. 2013. V. 3. P. 1337–1362.

³ Chan M.H.S., Carey A.L., Watt M.J. et al. Cytokine gene expression in human skeletal muscle during concentric contraction: evidence that IL-8, like IL-6, is influenced by glycogen availability // *Am J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol*. 2004. V. 287, № 2. P. 322–327.

⁴ Tamura Y., Watanabe K., Kantani T. et al. Upregulation of circulating IL-15 by treadmill running in healthy individuals: is IL-15 an endocrine mediator of the beneficial effects of endurance exercise? // *Endocr. J*. 2011. V. 58, № 3. P. 211–215.

⁵ Louis E., Raue U., Yang Y. et al. Time course of proteolytic, cytokine, and myostatin gene expression after acute exercise in human skeletal muscle // *J. Appl. Physiol*. 2007. V. 103. P. 1744–1751.

Миостатин является белком, который подавляет рост и дифференцировку мышечной ткани. Исследования на животных показывают, что блокирование действия миостатина приводит к значительному увеличению сухой мышечной массы с практически полным отсутствием жировой ткани. По данным Kainulainen et al. (2014), концентрация миостатина в мышечных клетках мышей уменьшается после беговой нагрузки, тем самым стимулируя процесс роста и дифференцировки сателлитных клеток¹.

Эксперименты по определению концентрации **PGE₂** в мышечных клетках модулировались с использованием разнообразных динамических и статических нагрузок. По данным M. Karamouzis, H. Langberg, A. Burian (2001), динамические нагрузки (бег в течение 60 мин) стимулируют экспрессию PGE₂ у человека, в то время как при статических нагрузках изменений концентрации этого липида не выявлено. Вероятно, это связано с тем, что длительные упражнения в режиме умеренной мощности способствуют более значительным изменениям внутриклеточной среды мышечной ткани².

COX (циклооксигеназа) – фермент, участвующий в синтезе простаноидов, таких как простагландины, простациклины и тромбоксаны, включая PGE₂. При детальном исследовании COX было установлено наличие изоформ этого фермента в различных тканях. После выполнения упражнений с преодолением сопротивления в период восстановления у мужчин выявлено увеличение уровня COX-1 и COX-2 в пять раз, по сравнению с уровнем до начала упражнения³.

eNOS (NOS 3) вырабатывается в мышцах, является кальций-зависимым ферментом, локализован в сарколемме и Т-трубочках

¹ Kainulainen H., Papaioannou K.G., Silvennoinen M. et al. Myostatin/activin blocking combined with exercise reconditions skeletal muscle expression profile of mdx mice // *Mol. Cell. Endocrinol.* 2014. V. 399. P. 131–142.

² Karamouzis M., Langberg H., Skovgaard D. et al. In situ microdialysis of intramuscular prostaglandin and thromboxane in contracting skeletal muscle in humans // *Acta Physiol. Scand.* 2001. V. 171, № 1. P. 71–76.

³ Carroll C.C., O'Connor D.T., Steinmeyer R. et al. The influence of acute resistance exercise on cyclooxygenase-1 and -2 activity and protein levels in human skeletal muscle // *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2013. V. 305, № 1. P. 24–30.

скелетных мышечных волокон¹. Изоформы NOS3 были обнаружены связанными с митохондриями в мышечных волокнах и в эндотелиальных клетках капилляров². Хроническое ингибирование NOS у крыс приводит к снижению мышечной массы и к значительным локомоторным расстройствам, в частности – к снижению скорости передвижений³. Эндотелиальная NOS3 является мощным вазодилататором, и мутантные мыши, лишённые гена этой изоформы, страдают гипертонией⁴. eNOS также влияет на капилляризацию мышц⁵. Показано, что тренировки на выносливость способствуют увеличению экспрессии eNOS в мышцах⁶. При этом концентрация белка не изменяется при физических нагрузках субмаксимальной мощности⁷. Вероятно, повышение pNOS и eNOS в ответ на динамическую физическую нагрузку (бег 1 час в день, в течение 5 дней) является адаптивным ответом мышечных волокон, позволяющим удовлетворить повышенные требования к поглощению глюкозы⁸.

Существует предположение, что изменение метаболизма NO в скелетных мышцах при физических нагрузках может способ-

¹ Wang M.X., Murrell D.F., Szabo C. et al. Nitric oxide in skeletal muscle: inhibition of nitric oxide synthase inhibits walking speed in rats // *Nitric Oxide*. 2001. V. 5, № 3. P. 219–232.

² Kobzik L., Reid M.B., Brecht D.S. et al. Nitric oxide in skeletal muscle // *Nature*. 1994. V. 372. P. 546–548.

³ Wang M.X., Murrell D.F., Szabo C. et al. Nitric oxide in skeletal muscle: inhibition of nitric oxide synthase inhibits walking speed in rats // *Nitric Oxide*. 2001. V. 5, № 3. P. 219–232.

⁴ Pedersen B.K., Febbraio M.A. Muscles, exercise and obesity: skeletal muscle as a secretory organ // *Nat. Rev. Endocrinol.* 2012. V. 8. P. 457–465.

⁵ Rudnick J., Püttmann B., Tesch P.A. et al. Differential expression of nitric oxide synthases (NOS 1-3) in human skeletal muscle following exercise countermeasure during 12 weeks of bed rest // *FASEB J.* 2004. V. 18. № 11. P. 1228–1230.

⁶ Frandsen U., Höffner L., Betak A. et al. Endurance training does not alter the level of neuronal nitric oxide synthase in human skeletal muscle // *J. Appl. Physiol.* 2000. V. 89, № 3. P. 1033–1038.

⁷ Frandsen U., Höffner L., Betak A. et al. Endurance training does not alter the level of neuronal nitric oxide synthase in human skeletal muscle // *J. Appl. Physiol.* 2000. V. 89, № 3. P. 1033–1038.

⁸ Vassilakopoulos T., Deckman G., Kebbewar M. et al. Regulation of nitric oxide production in limb and ventilatory muscles during chronic exercise training // *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2003. V. 284, № 3. P. 452–457.

ствовать увеличению чувствительности к инсулину и митохондриальной емкости¹. Увеличение экспрессии eNOS во время физических упражнений, также рассматривается как компонент сосудистой адаптации к сдвигам ламинарного напряжения, тангенциальным воздействиям, оказываемым потоком крови на поверхность эндотелия².

Наблюдается значительно большее увеличение содержания eNOS: после интервальной тренировки (sprint interval training – SIT) – на 36%, в сравнении с тренировкой на выносливость (endurance training – ET) – на 14%. Структурные преобразования, которые происходят в мышечных микрососудах, могут способствовать увеличению чувствительности к инсулину при обоих режимах тренировки³.

Была описана возможность взаимодействия между NO и миокинами из группы интерлейкинов⁴. Блокатор NOS L-NAME вызывал выраженное угнетение экспрессии мРНК IL-6 и IL-8 при физической нагрузке. Нитроглицерин, напротив, потенцировал мРНК и подавлял эффекты L-NAME. Эти данные подтверждают предположение, что NO участвует в регуляции экс-

¹ Eghbalzadeh K., Brixius K., Bloch W. et al. Skeletal muscle nitric oxide (NO) synthases and NO-signaling in «diabesity» – what about the relevance of exercise training interventions? // Nitric Oxide. 2014. V. 37. P. 28–40.

² Soskic S.S., Dobutović B.D., Sudar E.M. et al. Regulation of inducible nitric oxide synthase (iNOS) and its potential role in insulin resistance, diabetes and heart failure // Open Cardiovasc. Med. J. 2011. V. 5. P. 153–163.

³ Cocks M., Shaw C.S., Shepherd S.O. et al. Sprint interval and endurance training are equally effective in increasing muscle microvascular density and eNOS content in sedentary males // J. Physiol. 2013. V. 591, № 3. P. 641–656.

⁴ Steensberg A., Keller C., Hillig T. et al. Nitric oxide production is a proximal signaling event controlling exercise-induced mRNA expression in human skeletal muscle // FASEB J. 2007. V. 21, № 11. P. 2683–2694; Murata I., Nozaki R., Ooi K. et al. Nitrite reduces ischemia/reperfusion-induced muscle damage and improves survival rates in rat crush injury model // J. Trauma Acute Care Surg. 2012. V. 72, № 6. P. 1548–1554; Takahashi Y., Katayose D., Shindoh C. Interleukin 13 Prevents Diaphragm Muscle Deterioration in a Septic Animal Model // Tohoku J. Exp. Med. 1999. V. 189, № 3. P. 191–202; Chong H.C., Chan J.S., Goh C.Q. et al. Angiopoietin-like 4 stimulates STAT3-mediated iNOS expression and enhances angiogenesis to accelerate wound healing in diabetic mice // Mol. Ther. 2014. V. 22, № 9. P. 1593–1604.

прессии генов миокинов в мышцах во время физической нагрузки¹.

Б.С. Шенкман с соавторами (2014) считают, что при физических нагрузках различной интенсивности и направленности оксид азота является незаменимым триггером сигнальных процессов, приводящих к изменению структурно-метаболического профиля волокна и повышению его функциональных возможностей². В то же время NO при повышенной сократительной активности мышцы может выполнять и защитную, стабилизирующую функцию, не допуская интенсификации протеолитических реакций. Результаты экспериментов с модуляцией активности pNO-синтазы на фоне функциональной (гравитационной) разгрузки свидетельствуют о том, что активация этого фермента и в этом случае позволяет стабилизировать деструктивные процессы и предотвратить развитие инактивационной атрофии мышц³.

СХС (подсемейство хемокинов, содержащих четыре цистеина, из которых первый отделен от остальных одной аминокислотой) в основном являются провосполительными, потенцирующими таксис нейтрофилов. Тем не менее функции хемокинов СХС выходят далеко за пределы хемотаксиса. Предполагается, что хемокины принимают участие в различных гомеостатических процессах, их функциональное значение включает процессы ангиогенеза, пролиферации, клеточной адгезии и секреции

¹ Steensberg A., Keller C., Hillig T. et al. Nitric oxide production is a proximal signaling event controlling exercise-induced mRNA expression in human skeletal muscle // *FASEB J.* 2007. V. 21, № 11. P. 2683–2694.

² Шенкман Б.С., Ломоносова Ю.Н., Немировская Т.Л. Нейрональная NO-синтаза – молекулярный гарант стабильности мышечного волокна: NO-зависимые сигнальные пути в активной и разгруженной мышце // *Успехи физиол. наук.* 2014. Т. 45, № 2. С. 37–48.

³ Dyakova E.Y., Kapilevich L.V., Shylko V.G. et al. Physical exercise associated with NO production: signaling pathways and significance in health and disease // *Front. cell Dev. Biol.* 2015. V. 3, № 19. P. 1–9; Nosarev A.V., Smagliy L.V., Anfinogenova Y. et al. Exercise and NO production: relevance and implications in the cardiopulmonary system // *Front. Cell. Dev. Biol.* 2014. V. 2. Art. 73. P. 1–9.

цитокинов¹. Кроме того, в настоящее время существует предположение, что некоторые из хемокинов продуцируются мышечными клетками в процессе сокращения². Выработка CXCL1 мышцами и его содержание в сыворотке крови значительно увеличивается в ответ на однократную физическую нагрузку³. В экспериментах на мышцах было выявлено увеличение в 2,4 раза концентрации CXCL-1mRNA после 1 часа плавания. Также 30-минутный бег мышей на тредмиле стимулирует увеличение CXCL1/КС в плазме крови с 60.26 ± 4.89 до 92.45 ± 11.98 pg/ml. По мнению авторов, источником увеличения CXCL1/КС в плазме являются мышечные клетки⁴.

Ингибирующий лейкемию фактор (LIF) принадлежит к семейству интерлейкин 6-подобных цитокинов, продуцируемых скелетной мышцей. Основной эффект LIF заключается в активации пролиферации клеток миобластов⁵. Также он оказывает значительное влияние на сателлитные клетки⁶. Кроме того, бы-

¹ Bacon K.B., Harrison J.K. Chemokines and their receptors in neurobiology: Perspectives in physiology and homeostasis // *J. Neuroimmunol.* 2000. V. 104, № 1. P. 92–97.

² Pedersen L., Pilegaard H., Hansen J. et al. Exercise-induced liver chemokine CXCL-1 expression is linked to muscle-derived interleukin-6 expression // *J. Physiol.* 2011. V. 589, № 6. P. 1409–1420.

³ Pedersen L., Olsen C.H., Pedersen B.K. et al. Muscle-derived expression of the chemokine CXCL1 attenuates diet-induced obesity and improves fatty acid oxidation in the muscle // *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2012. V. 302, № 7. P. 831–840.

⁴ Nedachi T., Fujita H., Kanzaki M. Contractile C2C12 myotube model for studying exercise-inducible responses in skeletal muscle // *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2008. V. 295, № 5. P. 1191–1204.

⁵ Austin L., Burgess A.W. Stimulation of myoblast proliferation in culture by leukaemia inhibitory factor and other cytokines // *J. Neurol. Sci.* 1991. V. 101, № 2. P. 193–197; Spangenburg E.E., Booth F.W. Multiple signaling pathways mediate LIF-induced skeletal muscle satellite cell proliferation // *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2002. V. 283, № 1. P. 204–211.

⁶ Rosenblatt J.D., Yong D., Parry D.J. Satellite cell activity is required for hypertrophy of overloaded adult rat muscle // *Muscle Nerve.* 1994. V. 17, № 6. P. 608–613; Hawke T.J., Garry D.J. Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology // *J. Appl. Physiol.* 2001. V. 91. P. 534–551; Mitchell P.O., Pavlath G.K. A muscle precursor cell-dependent pathway contributes to muscle growth after atrophy // *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2001. V. 281. P. 1706–1715.

ло обнаружено, что LIF принимает участие в процессах регенерации и гипертрофии скелетных мышц¹.

Таким образом, на сегодняшний день твердо установлено, что мышечные клетки способны экспрессировать и продуцировать целый ряд регуляторных молекул. При этом продукция индуцируется именно в процессе сократительной активности и зависит от режима стимуляции. Физиологические эффекты миокинов весьма разнообразны – наряду с воздействием на клетки иммунной системы, миокины способны регулировать локальный кровоток, энергетическим метаболизм, в частности – липолиз, а также модулировать процессы пролиферации и дифференцировки миобластов.

1.3. Мышечное сокращение – главный регулятор продукции миокинов

Большинство авторов для исследования закономерностей продукции миокинов используют в эксперименте длительные динамические нагрузки – беговые тренировки, велотренировки, плавание. Изменение концентрации некоторых миокинов при предъявлении физических нагрузок различного характера представлено в табл. 1. Показано, что длительные циклические нагрузки стимулируют экспрессию IL-6², IL-8³, IL-15¹, PGE₂².

¹ Kami K., Senba E. Localization of leukemia inhibitory factor and interleukin-6 messenger ribonucleic acids in regenerating rat skeletal muscle // *Muscle. Nerve*. 1998. V. 21. P. 819–822; Reardon K.A., Kapsa R.M., Davis J. et al. Increased levels of leukemia inhibitory factor mRNA in muscular dystrophy and human muscle trauma // *Muscle Nerve*. 2000. V. 23, № 6. P. 962–966; Sakuma K., Watanabe K., Sano M. et al. Differential adaptation of growth and differentiation factor 8/myostatin, fibroblast growth factor 6 and leukemia inhibitory factor in overloaded, regenerating and denervated rat muscles // *Biochim. Biophys. Acta-Mol. Cell Res.* 2000. V. 1497. P. 77–88.

² Pedersen B.K., Steensberg A., Fischer C. et al. Searching for the exercise factor: is IL-6 a candidate? // *J. Muscle Res. Cell. Motil.* 2003. V. 24, № 2–3. P. 113–119.

³ Chan M.H.S., Carey A.L., Watt M.J. et al. Cytokine gene expression in human skeletal muscle during concentric contraction: evidence that IL-8, like IL-6, is influenced by glycogen availability // *Am J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2004. V. 287, № 2. P. 322–327.

Концентрация миостатина в мышечных клетках мышей уменьшается после беговой нагрузки, тем самым стимулируя процесс роста и дифференцировки сателлитных клеток³.

Т а б л и ц а 1

**Изменение концентрации миокинов при мышечном сокращении
в различных режимах**

Мио- кины / белки	Динами- ческая нагруз- ка	Упражнения с преодоле- нием сопро- тивления	Электрическая стимуляция	Механи- ческое растяжение	Статическая нагрузка
<i>LIF</i>	↑ в мышце h ⁴	↑ в мышце h ⁵	↑ в мышце h ⁶	–	–
<i>CXCL1</i>	↑ в плазме m ⁷	–	↑ в мышце m ⁸ ↑ в мышце h ¹⁰	↑ в мышце m ⁹	–
<i>eNOS</i>	↑ в мышце r ¹¹	–	–	–	–

¹ Tamura Y., Watanabe K., Kantani T. et al. Upregulation of circulating IL-15 by treadmill running in healthy individuals: is IL-15 an endocrine mediator of the beneficial effects of endurance exercise? // *Endocr. J.* 2011. V. 58, № 3. P. 211–215.

² Karamouzis M., Langberg H., Skovgaard D. et al. In situ microdialysis of intramuscular prostaglandin and thromboxane in contracting skeletal muscle in humans // *Acta Physiol. Scand.* 2001. V. 171, № 1. P. 71–76.

³ Kainulainen H., Papaioannou K.G., Silvennoinen M. et al. Myostatin/activin blocking combined with exercise reconditions skeletal muscle expression profile of mdx mice // *Mol. Cell. Endocrinol.* 2014. V. 399. P. 131–142.

⁴ Broholm C., Mortensen O.H., Nielsen S. et al. Exercise induces expression of leukaemia inhibitory factor in human skeletal muscle // *J. Physiol.* 2008. V. 586, № 8. P. 2195–2201.

⁵ Broholm C., Laye M.J., Brandt C. et al. LIF is a contraction-induced myokine stimulating human myocyte proliferation // *J. Appl. Physiol.* 2011. V. 111, № 1. P. 251–259.

⁶ Ibid.

⁷ Nedachi T., Fujita H., Kanzaki M. Contractile C2C12 myotube model for studying exercise-inducible responses in skeletal muscle // *Am J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2008. V. 295, № 5. P. 1191–1204.

⁸ Nedachi T., Hatakeyama H., Kono T., Sato M. et al. Characterization of contraction-inducible CXC chemokines and their roles in C2C12 myocytes // *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2009. V. 297. P. 866–878.

⁹ Nedachi T., Hatakeyama H., Kono T., Sato M. et al. Characterization of contraction-inducible CXC chemokines and their roles in C2C12 myocytes // *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2009. V. 297. P. 866–878.

¹⁰ Scheler M., Irmiler M., Lehr S. et al. Cytokine response of primary human myotubes in an in vitro exercise model // *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2013. V. 305, № 8. P. 877–886.

¹¹ Vassilakopoulos T., Deckman G., Kebbewar M. et al. Regulation of nitric oxide production in limb and ventilatory muscles during chronic exercise training // *Am J. Physiol. Lung Cell Mol Physiol.* 2003. V. 284, № 3. P. 452–457.

Мио- кины / белки	Динами- ческая нагруз- ка	Упражнения с преодоле- нием сопро- тивления	Электрическая стимуляция	Механи- ческое растяжение	Статическая нагрузка
<i>PGE2</i>	↑ в мышце h	↑ в мышце h	–	–	Без измене- ний в мыш- це h ¹
<i>Миоста- тин (GDF-8)</i>	↓ в мышце m ²	↓ в мышце h ³	Без изменений в мышце r ⁴	Без измене- ний в мышце r ⁵	–
<i>COX2</i>	↑ в мышце r ⁶	↑ в мышце h ⁷	↑ в мышце r ⁸	–	–
<i>IL6</i>	↑ в мышце h ⁹	↑ в мышце h ¹⁰	↑ в мышце m ¹¹	–	–
	↑ в мышце h ¹	–	–	–	–

¹ Karamouzis M., Langberg H., Skovgaard D. et al. In situ microdialysis of intramuscular prostaglandin and thromboxane in contracting skeletal muscle in humans // Acta Physiol. Scand. 2001. V. 171, № 1. P. 71–76.

² Kainulainen H., Papaioannou K.G., Silvennoinen M. et al. Myostatin/activin blocking combined with exercise reconditions skeletal muscle expression profile of mdx mice // Mol. Cell. Endocrinol. 2014. V. 399. P. 131–142.

³ Willoughby D.S. Effects of heavy resistance training on myostatin mRNA and protein expression // Med.Sci.Sports Exerc. 2004. V. 36. P. 574–582.

⁴ Russo T.L., Peviani S.M., Durigan J.L. et al. Stretching and electrical stimulation reduce the accumulation of MyoD, myostatin and atrogen-1 in denervated rat skeletal muscle // J. Muscle Res. Cell Motil. 2010. V. 31, № 1. P. 45–57.

⁵ Ibid.

⁶ Kim J.S., Lee Y.H., Kim J.C. et al. Effect of exercise training of different intensities on anti-inflammatory reaction in streptozotocin-induced diabetic rats // Biol. Sport. 2014. V. 31, № 1. P. 73–79.

⁷ Carroll C.C., O'Connor D.T., Steinmeyer R. et al. The influence of acute resistance exercise on cyclooxygenase-1 and -2 activity and protein levels in human skeletal muscle // Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 2013. V. 305, № 1. P. 24–30.

⁸ Murase S., Terazawa E., Hirate K. et al. Upregulated glial cell line-derived neurotrophic factor through cyclooxygenase-2 activation in the muscle is required for mechanical hyperalgesia after exercise in rats // J. Physiol. 2013. V. 591, № 12. P. 3035–3048.

⁹ Chan M.H.S., Carey A.L., Watt M.J. et al. Cytokine gene expression in human skeletal muscle during concentric contraction: evidence that IL-8, like IL-6, is influenced by glycogen availability // Am J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 2004. V. 287, № 2. P. 322–327.

¹⁰ Della Gatta P.A., Cameron-Smith D., Peake J.M. Acute resistance exercise increases the expression of chemotactic factors within skeletal muscle // Eur. J. Appl. Physiol. 2014. V. 114. P. 2157–2167.

¹¹ Pan H., Xu X., Hao X. et al. Changes of myogenic reactive oxygen species and interleukin-6 in contracting skeletal muscle cells // Oxid. Med. Cell. Longev. 2012. P. 145–148.

Мио- кины / белки	Динами- ческая нагруз- ка	Упражнения с преодоле- нием сопро- тивления	Электрическая стимуляция	Механи- ческое растяжение	Статическая нагрузка
<i>IL8</i>	↑ в мышце h ²	↑ в мышце h	↑ в мышце h ³	–	–
<i>IL15</i>	Без изменений IL-15mRNA в мышце h ⁴	↑ IL-15 mRNA в мышце h, Без измене- ний IL-15 в мышце h ⁵	–	–	–
	↑ в плазме h ⁶	–	–	–	–

Примечание: h – человек; r – крыса; m – мышшь; ↑ – повышение; ↓ – снижение;
– не найдено данных.

Использование статических нагрузок при исследовании продукции миокинов встречается в единичных работах. Так, E. Ochi с соавторами⁷ сообщают, что повторные серии силовых упражнений на 20 день приводят к увеличению концентрации IL-6, фоллистатина, фосфо-STAT-3 и снижению миостатина. Предполагается, что IL-6, миостатин, фосфо-STAT-3 и фоллистатин вовлекаются именно в механизмы, связанные с повторными тренировками и обеспечивают мышечную гипертрофию.

¹ Ostrowski K., Rohde T., Zacho M. et al. Evidence that interleukin-6 is produced in human skeletal muscle during prolonged running // J. Physiol. 1998. V. 508, № 3. P. 949–953.

² Chan M.H.S., Carey A.L., Watt M.J. et al. Cytokine gene expression in human skeletal muscle during concentric contraction: evidence that IL-8, like IL-6, is influenced by glycogen availability // Am J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 2004. V. 287, № 2. P. 322–327.

³ Scheler M., Irmiler M., Lehr S. et al. Cytokine response of primary human myotubes in an in vitro exercise model // Am. J. Physiol. Cell Physiol. 2013. V. 305, № 8. P. 877–886.

⁴ Louis E., Raue U., Yang Y. et al. Time course of proteolytic, cytokine, and myostatin gene expression after acute exercise in human skeletal muscle // J. Appl. Physiol. 2007. V. 103. P. 1744–1751.

⁵ Nielsen A.R., Mounier R., Plomgaard P. et al. Expression of interleukin-15 in human skeletal muscle effect of exercise and muscle fibre type composition // J. Physiol. 2007. V. 584, № 1. P. 305–312.

⁶ Tamura Y., Watanabe K., Kantani T. et al. Upregulation of circulating IL-15 by treadmill running in healthy individuals: is IL-15 an endocrine mediator of the beneficial effects of endurance exercise? // Endocr. J. 2011. V. 58, № 3. P. 211–215.

⁷ Ochi E., Nakazato K., Ishii N. Muscular hypertrophy and changes in cytokine production after eccentric training in the rat skeletal muscle // J. Strength Cond. Res. 2011. V. 25. P. 2283–2292.

Т.А. Траппе с соавторами¹ показали, что прием ингибиторов СОХ ацетаминофена и ибупрофена потенцирует рост мышечной массы при тренировках с отягощениями у пожилых людей. Кроме того, авторы впервые показали возможность адаптации ферментов простагландин / СОХ сигнального пути к физическим нагрузкам. Особенно это важно в отношении $\text{PGF}_{2\alpha}$ и PGE_2 двух простагландинов, которые стимулируют продукцию мышечных белков. Эти данные подчеркивают участие простагландинов и миокинов в адаптивном ответе на упражнения с преодолением сопротивления.

Зарегистрированное отсутствие изменений концентрации PGE_2 при длительных упражнениях в режиме умеренной мощности позволило выдвинуть предположение, что такой характер нагрузки способствуют более значительным изменениям внутриклеточной среды мышечной ткани². В то же время физические нагрузки субмаксимальной мощности не приводят к изменению концентрации eNOS, а тренировки на выносливость способствуют его увеличению³. Позднее было показано, что интервальные тренировки увеличивают концентрацию eNOS в большей степени⁴.

Увеличение концентрации некоторых миокинов происходит в период восстановления – так, к примеру, повышение СОХ-1 и СОХ-2 зарегистрировано после выполнения силовых упражне-

¹ Trappe T.A, Standley R.A, Jemiolo B. Prostaglandin and myokine involvement in the cyclooxygenase-inhibiting drug enhancement of skeletal muscle adaptations to resistance exercise in older adults // *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2013. V. 304. P. 198–205.

² Karamouzis M., Langberg H., Skovgaard D. et al. In situ microdialysis of intramuscular prostaglandin and thromboxane in contracting skeletal muscle in humans // *Acta Physiol. Scand.* 2001. V. 171, № 1. P. 71–76.

³ Frandsen U., Höffner L., Betak A. et al. Endurance training does not alter the level of neuronal nitric oxide synthase in human skeletal muscle // *J. Appl. Physiol.* 2000. V. 89, № 3. P. 1033–1038.

⁴ Cocks M., Shaw C.S., Shepherd S.O. et al. Sprint interval and endurance training are equally effective in increasing muscle microvascular density and eNOS content in sedentary males // *J. Physiol.* 2013. V. 591, № 3. P. 641–656.

ний¹. Для выработки CXCL1 достаточным является предъявление однократной физической нагрузки циклического характера², в то время как для увеличения концентрации белка LIF в мышцах необходимо его накопление вследствие повторяющихся нагрузок³.

Уровень LIF mRNA увеличивается в скелетных мышцах в ответ на циклические упражнения (динамическая нагрузка на велоэргометре в течение 3 часов на уровне 60% МПК (максимальное потребление кислорода)). Однако увеличение LIF в мышцах не было обнаружено в первый день после нагрузки⁴. Вероятно, для увеличения концентрации LIF в мышцах необходимо его накопление под действием повторяющихся нагрузок. По-видимому, циклическая работа может регулировать LIF на уровне транскрипции, но не на уровне синтеза белка⁵. Однако увеличения уровня LIF в плазме после физической нагрузки не выявлено, что позволяет утверждать, что LIF оказывает свое действие на местном уровне⁶. Следует также отметить, что концентрация LIF mRNA увеличилась в 9 раз в течение 6 часов после выполнения силовых упражнений на мышцы ног, однако при этом уровень белка LIF оставался неизменным⁷.

¹ Carroll C.C., O'Connor D.T., Steinmeyer R. et al. The influence of acute resistance exercise on cyclooxygenase-1 and -2 activity and protein levels in human skeletal muscle // *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2013. V. 305, № 1. P. 24–30.

² Pedersen L., Olsen C.H., Pedersen B.K. et al. Muscle-derived expression of the chemokine CXCL1 attenuates diet-induced obesity and improves fatty acid oxidation in the muscle // *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2012. V. 302, № 7. P. 831–840.

³ Broholm C., Mortensen O.H., Nielsen S. et al. Exercise induces expression of leukaemia inhibitory factor in human skeletal muscle // *J. Physiol.* 2008. V. 586, № 8. P. 2195–2201.

⁴ Sakuma K., Watanabe K., Sano M. et al. Differential adaptation of growth and differentiation factor 8/myostatin, fibroblast growth factor 6 and leukemia inhibitory factor in overloaded, regenerating and denervated rat muscles // *Biochim. Biophys. Acta-Mol. Cell Res.* 2000. V. 1497. P. 77–88.

⁵ Broholm C., Mortensen O.H., Nielsen S. et al. Exercise induces expression of leukaemia inhibitory factor in human skeletal muscle // *J. Physiol.* 2008. V. 586, № 8. P. 2195–2201.

⁶ Broholm C., Pedersen B.K. Leukaemia inhibitory factor – An exercise-induced myokine // *Exercise Immunology Review.* 2010. V. 16. P. 77–85.

⁷ Broholm C., Laye M.J., Brandt C. et al. LIF is a contraction-induced myokine stimulating human myocyte proliferation // *J. Appl. Physiol.* 2011. V. 111, № 1. P. 251–259.

Для моделирования физической нагрузки в экспериментальных исследованиях на культурах мышечных клеток используют электрическую импульсную стимуляцию и механическое растяжение. В экспериментах с использованием электростимуляции различной мощности и частоты стимуляции зарегистрировано увеличение миокинов LIF и CXCL1 (культура мышечных клеток человека)¹, CXCL1 и IL6 (культура мышечных клеток линии C2C12 мышей)², COX 2 (культура мышечных клеток линии L6 крыс)³.

Таким образом, в современных исследованиях, посвященных миокиновой экспрессии и продукции, в основном используются типовые циклические физические нагрузки. В настоящее время имеются лишь фрагментарные данные о продукции миокинов при циклических нагрузках различной мощности и интенсивности (особенно тренировочных режимов умеренной мощности) статических упражнений, интервальной и непрерывной тренировки и др. Практически нет данных о продукции миокинов при динамической уступающей работе мышц (плиометрический режим, при котором нагрузка на мышцы превосходит максимально возможное усилие и мышцы постепенно расслабляется, задача спортсмена – максимально замедлить расслабление), в зонах максимальной, субмаксимальной и большой мощности. Также не обнаружено данных о различиях в экспрессии миокинов при разных режимах физических нагрузок.

Ввиду сказанного важно отметить, что морфологические и химические изменения в мышечных волокнах зависят от часто-

¹ Ibid; Scheler M., Irmeler M., Lehr S. et al. Cytokine response of primary human myotubes in an in vitro exercise model // *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2013. V. 305, № 8. P. 877–886.

² Nedachi T., Hatakeyama H., Kono T., Sato M. et al. Characterization of contraction-inducible CXC chemokines and their roles in C2C12 myocytes // *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2009. V. 297. P. 866–878; Pan H., Xu X., Hao X. et al. Changes of myogenic reactive oxygen species and interleukin-6 in contracting skeletal muscle cells // *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2012. (2012): 145418.

³ Murase S., Terazawa E., Hirate K. et al. Upregulated glial cell line-derived neurotrophic factor through cyclooxygenase-2 activation in the muscle is required for mechanical hyperalgesia after exercise in rats // *J. Physiol.* 2013. V. 591, № 12. P. 3035–3048.

ты стимуляции мышцы¹. Кроме того, существуют свидетельства, что на выделение некоторых белков влияет сдвиг ламинарного напряжения, тангенциальные усилия, оказываемые потоками по поверхности эндотелия². Так как при различных физических нагрузках происходит изменение не только системного, но и регионарного кровотока, этот механизм так же может быть задействован в регуляции эндокринной функции скелетных мышц. Поэтому изучение продукции миокинов в зависимости от характера нагрузки, ее длительности, наличия или отсутствия интервалов отдыха, уровня тренированности (степень адаптации к нагрузкам различного характера) представляется актуальным и перспективным направлением.

1.4. Внутриклеточные механизмы регуляции транскрипции и продукции миокинов

1.4.1. Ca^{2+} -зависимые процессы

При мышечном сокращении происходит увеличение концентрации ионов Ca^{2+} за счет его выхода из саркоплазматического ретикулума. Учитывая роль кальция как регулятора многих метаболических процессов, логично было предположить и его участие в запуске продукции миокинов. Это предположение согласуется с работами, демонстрирующими способность ионов кальция стимулировать процессы транскрипции целого ряда миоки-

¹ Martin T.P., Stein R.B., Hoepfner P.H. et al. Influence of electrical stimulation on the morphological and metabolic properties of paralyzed muscle // J. Appl. Physiol. 1992. V. 72. P. 1401–1406; Greve J.M., Muszkat R., Schmidt B. et al. Functional electrical stimulation (FES): muscle histochemical analysis // Paraplegia. 1993. V. 31, № 12. P. 764–770; Rochester L., Barron M.J., Chandler C.S. et al. Influence of electrical stimulation of the tibialis anterior muscle in paraplegic subjects. 2. Morphological and histochemical properties // Paraplegia. 1995. V. 33, № 9. P. 514–522; Mohr T., Andersen J.L., Biering-Sørensen F. et al. Long term adaptation to electrically induced cycle training in severe spinal cord injured individuals // Spinal Cord. 1997. V. 35, № 1. P. 1–16.

² Soskic S.S., Dobutović B.D., Sudar E.M. et al. Regulation of inducible nitric oxide synthase (iNOS) and its potential role in insulin resistance, diabetes and heart failure // Open Cardiovasc. Med. J. 2011. V. 5. P. 153–163.

нов – LIF¹, CXCL1², IL6³, eNOS⁴ посредством активации Ca²⁺-кальмодулин-зависимого сигнального каскада. Наряду с кальмодулин-зависимым путем, следует отметить каскады, Ca²⁺ может быть вовлечен в регуляции транскрипции посредством активации протеинкиназы C и ряда других тирозиновых и серин-треониновых протеинкиназ.

Febbraio и Pedersen (2002) показали, что увеличения концентрации IL-6 в мышечных клетках во время нагрузки может быть опосредовано несколькими механизмами. Во-первых, это усиление продукции IL6 в клетках скелетных мышц через Ca²⁺/NFAT-зависимый сигнальный путь. Ядерный фактор активации T-клеток NFAT (Nuclear factor of activated T-cells) обнаружен во многих клетках, включая скелетные миоциты. Его активация опосредуется Ca²⁺-чувствительной фосфопротеин-фосфатазой (кальцинейрином). В покоящихся клетках NFAT-белки фосфорилированы и находятся в цитоплазме. Их активация требует мобилизации внутриклеточного Ca²⁺ и индуцируется при стимуляции целого ряда мембранных белков. Кальцинейрин (протеинфосфатаза 2B) является серин-треониновой фосфатазой цитозольного белка. При активации кальцинейрин дефосфорилирует NFAT, что позволяет последнему перемещаться в ядро, где он связывается с другими факторами транскрипции. Хотя NFAT сам по себе может стимулировать транскрипцию генов цитокинов, он так же способен связываться с фактором транскрипции AP-1, усиливая вышеописанный эффект.

¹ Broholm C., Mortensen O.H., Nielsen S. et al. Exercise induces expression of leukaemia inhibitory factor in human skeletal muscle // *J. Physiol.* 2008. V. 586, № 8. P. 2195–2201.

² Nedachi T., Hatakeyama H., Kono T., Sato M. et al. Characterization of contraction-inducible CXC chemokines and their roles in C2C12 myocytes // *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2009. V. 297. P. 866–878.

³ Febbraio M.A., Pedersen B.K. Muscle-derived interleukin-6: mechanisms for activation and possible biological roles // *FASEB J.* 2002. V. 16. P. 1335–1347.

⁴ Han J.A., Seo E.Y., Kim H.J. et al. Hypoxia-augmented constriction of deep femoral artery mediated by inhibition of eNOS in smooth muscle // *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2013. V. 304, № 1. P. 78–88.

Во вторых, это увеличение ИЛ-6 в клетках скелетных мышц через митоген-активируемую протеинкиназу (МАР-киназы) JNK. Повышение концентрации внутриклеточного Ca^{2+} при сокращении потенцирует экспрессию JNK. Вероятно, JNK регулирует экспрессию генов ИЛ-6 через активацию NF κ B¹. В то же время те же авторы отмечают и наличие Ca^{2+} – независимого пути экспрессии ИЛ-6 в скелетных мышцах. Предполагается, что снижение содержания гликогена в цитоплазме миоцитов может активировать продукцию ИЛ-6 через посредство МАР-киназы p38. Есть сведения, что p38 МАР-киназа индуцирует продукцию ИЛ-6 в неонатальных кардиомиоцитах крысы за счет активации NF κ B. Также известно, что активность p38 МАР-киназы заметно возрастает при сокращении скелетных мышц². p38 МАР-киназа – это стресс-активируемая протеинкиназа, а низкий уровень гликогена рассматривается как стресс-фактор³.

Предполагается, что регуляция продукции LIF является кальций-зависимым процессом⁴. Показано, что экспрессия LIF мРНК модулируется кальцием в первичных скелетных миоцитах человека, эти клетки так же обладают способностью продуцировать LIF в ответ на стимуляцию иономицином. Также есть сведения о том, что экспрессия LIF при стимуляции клетки иономицином опосредована Ca^{2+} /NFAT-зависимым механизмом. Иономицин, являясь в том числе и кальциевым ионофором, способствует увеличению внутриклеточной концентрации ионов Ca^{2+} . Последний через посредство протеинкиназы С (PKC) активирует NFAT, являющийся фактором транскрипции цитокинов.

¹ Febbraio M.A., Pedersen B.K. Muscle-derived interleukin-6: mechanisms for activation and possible biological roles // FASEB J. 2002. V. 16. P. 1335–1347.

² Boppart M.D., Asp S., Wojtaszewski Jorgen F. P. et al. Marathon running transiently increases c-Jun NH2-terminal kinase and p38 activities in human skeletal muscle // J. Physiol. 2000. V. 526, № 3. P. 663–669.

³ Febbraio M.A., Pedersen B.K. Muscle-derived interleukin-6: mechanisms for activation and possible biological roles // FASEB J. 2002. V. 16. P. 1335–1347.

⁴ Broholm C., Mortensen O.H., Nielsen S. et al. Exercise induces expression of leukaemia inhibitory factor in human skeletal muscle // J. Physiol. 2008. V. 586, № 8. P. 2195–2201.

В экспериментах Nedachi, Hatakeyama, Kono, Sato, Kanzaki было показано, что экспрессия хемокина CXCL1 мышечными клетками мышей опосредована внутриклеточными Ca^{2+} -зависимыми сигнальными каскадами. Среди этих каскадов ведущая роль принадлежит Ca^{2+} -зависимой стимуляции JNK. JNK-киназа непосредственно связывается со специфическими белковыми доменами c-Jun и ATF2, которые образуют один из димерных факторов транскрипции семейства AP1. В результате c-Jun и ATF2 фосфорилируются по N-концевым доменам. Эти домены являются активаторными, их фосфорилирование приводит к увеличению транскрипционной активности димера AP1¹. JNK-киназа также способна стимулировать транскрипционный фактор NF- κ B, в результате чего экспрессируются CXCL1/KC и CXCL5/LIX. Последние оказывают аутокринное действие и стимулируют миграцию миобластов, вовлеченных в процесс клеточной дифференцировки².

1.4.2. Снижение парциального давления кислорода (гипоксия)

Первоначально гипоксия, создающаяся в процессе длительного выполнения физических упражнений, считалась фактором, стимулирующим синтез IL6. Экспрессия IL6 после длительного бега оказывает воздействие на VEGF (vascular endothelial growth factor), что стимулирует ангиогенез³. Кроме того, IL-6 совместно с другими транскрипционными факторами, вырабатываемыми вследствие гипоксии (IL-1 alpha, IL-1 beta, TGF-beta, TNF-alpha), способствует стимуляции эритропоэтина⁴. Ostrowski

¹ Wilkinson M.G., Millar J.B. SAPKs and transcription factors do the nucleocytoplasmic tango // Genes Dev. 1998. V. 12, № 10. P. 1391–1397.

² Nedachi T., Hatakeyama H., Kono T., Sato M. et al. Characterization of contraction-inducible CXC chemokines and their roles in C2C12 myocytes // Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 2009. V. 297. P. 866–878.

³ Dumonde D.C., Wolstencroft R.A., Panayi G.S. et al. «Lymphokines»: non-antibody mediators of cellular immunity generated by lymphocyte activation // Nature. 1969. V. 224, № 5214. P. 38–42.

⁴ Faquin W.C., Schneider T.J., Goldberg M.A. Effect of inflammatory cytokines on hypoxia-induced erythropoietin production // Blood. 1992. V. 79. P. 1987–1994.

и соавторы¹ показали, что эти же транскрипционные факторы (IL-1, IL-1 β and TNF- α , IL-6) способствуют увеличению концентрации PGE2 в мышечных клетках человека после марафонского бега. Однако в дальнейшем не нашлось прямых доказательств данной гипотезы – прямое воздействие гипоксии на транскрипцию миокинов не было подтверждено экспериментально. Таким образом, механизмы взаимосвязи гипоксии с продукцией миокинов до сих пор остаются предметом дискуссии. В этой связи заслуживает интереса гипотеза о вовлечении ион-транспорт-ирующих систем одновалентных катионов (натрия и особенно калия) в реализацию стимулирующего влияния на процессы транскрипции в условиях гипоксии и недостатка глюкозы, установленная в нашей лаборатории на примере гладкомышечных клеток сосудов² и подробно рассмотренная ниже.

Другой возможный механизм связан с активацией в процессе сокращения мышц окислительного пути, что сопровождается наработкой активных форм кислорода (АФК, ROS). АФК являются фактором, запускающим ряд сигнальных каскадов и усиливающим обмен веществ. С. Scheele и соавторы подчеркивают важную роль митохондриальной активации АФК и антиоксидантных защитных механизмов в ответ на физические упражнения. Предлагаемая ими схема сигнального каскада, запускаемого ROS, представлена на рис. 3. Авторы этой работы предполагают, что мышечное сокращение потенцирует выработку про-

¹ Ostrowski K., Rohde T., Zacho M. et al. Evidence that interleukin-6 is produced in human skeletal muscle during prolonged running // *J. Physiol.* 1998. V. 508, № 3. P. 949–953.

² Koltsova S.V., Shilov B., Birulina J.G. et al. Transcriptomic changes triggered by hypoxia: evidence for HIF-1 α -independent, [Na⁺]_i/[K⁺]_i-mediated, excitation-transcription coupling // *PLoS One.* 2014. V. 9, № 11. e110597; Orlov S.N., Koltsova S.V., Kapilevich L.V. et al. NKCC1 and NKCC2: The pathogenetic role of cation-chloride cotransporters in hypertension // *Genes Dis.* 2015. V. 2. P. 186–196; Orlov S.N., Hamet P. Salt and gene expression: evidence for [Na⁺]_i/[K⁺]_i-mediated signaling pathways // *Pflugers Arch.* 2015. V. 467. P. 489–498; Орлов С.Н. Котранспортеры катионов и хлора: регуляция, физиологическое значение и роль в патогенезе артериальной гипертензии // *Успехи биол. химии.* 2014. Т. 54. С. 267–298.

воспалительных цитокинов через TNF- α и NFkB-независимые механизмы¹.

Еще одна гипотеза связывает транскрипцию IL-15 с активацией процессов перекисного окисления. Скелетные мышцы генерируют большое количество супероксидов, во время сокращения эти процессы усиливаются. Потенциальные источники продукции супероксидов в скелетных мышцах обобщены на рис. 4². В качестве ключевых звеньев образования АФК авторы рассматривают митохондрии, процессы, катализируемые фосфолипазой A₂, а также NO-зависимые процессы – последние связаны как с eNOS эндотелия прилегающих сосудов, так и с pNOS плазмолеммы миоцитов.

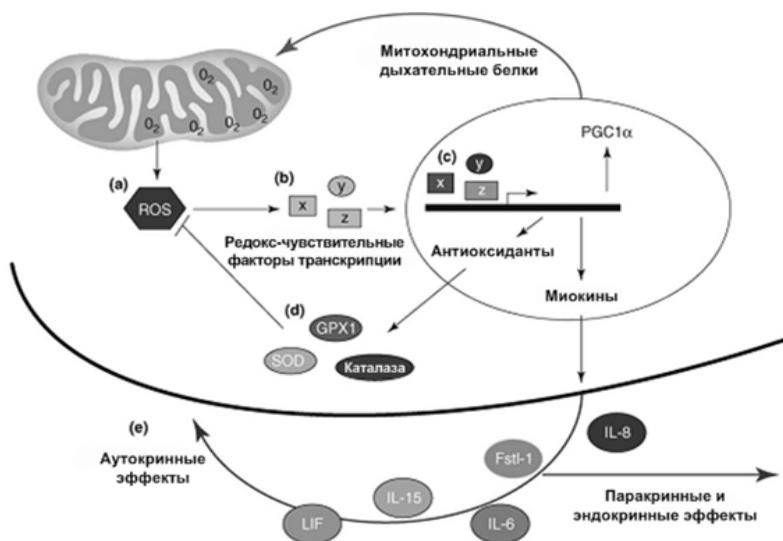


Рис. 3. Предлагаемая модель сигнализации с помощью активных форм кислорода (ROS) в скелетных мышцах в ответ на упражнения: (а) – активные формы кислорода (ROS) образуются в результате митохондриального дыхания при

¹ Scheele C., Nielsen S., Pedersen B.K. ROS and myokines promote muscle adaptation to exercise // Trends Endocrinol. Metab. 2009. V. 20. P. 95–99.

² Powers S.K., Jackson M.J. Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production // Physiol. Rev. 2008. V. 88, № 4. P. 1243–1276.

переходе электронов из электрон-транспортной цепи к кислороду. Этот процесс стимулируется во время тренировки как следствие повышенной митохондриальной активности; (b) – ROS обладает способностью регулировать передачу сигналов внутри клеток через редокс-чувствительные факторы транскрипции (обозначены x, y и z), вызывая продукцию PGC1 α , антиоксидантов и миокинов; (c) – PGC1 α активирует гены, участвующие в митохондриальном дыхании, что позволяет расширить активность митохондрий, тогда как (d) – эндогенные антиоксиданты, такие как супероксиддисмутаза (SOD), глутатионпероксидаза-1 (GPX1) и каталаза являются буферной системой, обеспечивающей повышенное количество ROS; (e) – Миокины обладают аутокринным, паракринным или эндокринным эффектом, стимулируют гипертрофию (IL-6, LIF и IL-15) или ангиогенез (IL-8 и Fstl-1)¹

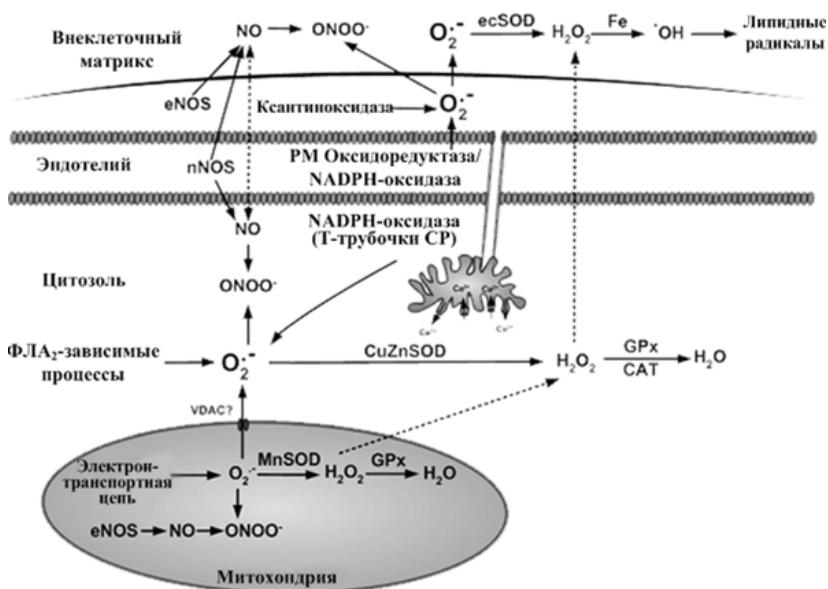


Рис. 4. Субклеточные структуры, продуцирующие супероксид и оксид азота в скелетной мышце²

¹ Scheele C., Nielsen S., Pedersen B.K. ROS and myokines promote muscle adaptation to exercise // Trends Endocrinol. Metab. 2009. V. 20. P. 95–99.

² Powers S.K., Jackson M.J. Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production // Physiol. Rev. 2008. V. 88, № 4. P. 1243–1276.

ERK- и Akt-зависимые сигнальные пути активируются при участии перекиси (H_2O_2). IL-15, вероятно, является эндогенным антиоксидантным регулятором¹. Фосфорилирование Akt белка снижается после предварительного воздействия IL-15. Также указано, что Akt-зависимый сигнальный путь участвует в антиоксидантных процессах.

В заключение можно отметить, что снижение продукции АФК в сочетании с нормализацией функционирования митохондрий посредством активации Akt-зависимого сигнального пути может быть основным механизмом защитных эффектов IL-15 в C2C12 миобластах. Li et al. (2014) предполагают, что миокин IL-15 может быть эндогенным антиоксидантным регулятором в скелетных мышечных клетках.

1.4.3. Фосфорилирование и соотношение АТФ/АДФ

АМПК – (аденозин монофосфат-чувствительная киназа) – гетеротримерный комплекс, переключатель метаболического контроля в условиях уменьшения энергии и экономии АТФ². Активация АМПК возможна двумя путями. Первый путь запускается при увеличении концентрации АМФ и, как правило, реализуется в условиях недостаточного производства АТФ или большого расхода энергии. Второй путь не связан с концентрацией АМФ и индуцируется при повышении концентрации Ca^{2+} . Данный путь опосредуется Ca / кальмодулин-зависимой протеинкиназой киназы- β , которая фосфорилирует остаток Thr172, локализованный в α -субъединице. Также есть данные о возможности активации АМПК в условиях избыточного образования активных

¹ Li F., Li Y., Tang Y. et al. Protective effect of myokine IL-15 against H_2O_2 -mediated oxidative stress in skeletal muscle cells // Mol. Biol. Rep. 2014. V. 41, № 11. P. 7715–7722.

² Hardie D.G. AMP-activated/SNF1 protein kinases: conserved guardians of cellular energy // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2007. V. 8. P. 774–785; Hue L., Rider M.H. The AMP-activated protein kinase: more than an energy sensor // Essays Biochem. 2007. V. 43. P. 121–137.

форм кислорода¹. Как упоминалось выше, все эти факторы активируются при мышечном сокращении, что свидетельствует в пользу предположения о вовлечении данного механизма в индукцию синтеза миокинов.

Основной эффект активации АМПК направлен на восстановление клеточного энергетического потенциала путем угнетения анаболических механизмов и переключения на катаболизм. Угнетаются такие биосинтетические процессы, как глюконеогенез, синтез гликогена, липогенез, синтез холестерина и синтез белка, в то время как утилизация глюкозы, окисление жирных кислот и митохондриальный биогенез – стимулируются². Данный путь реализуется через фосфорилирование основных ферментов и транскрипционных факторов³. Активация транскрипции может быть опосредована через фосфорилирование гистона H₂B⁴. АМПК не влияет на митохондриальный окислительный потенциал в краткосрочной перспективе. Однако он стимулирует биогенез митохондрий посредством активации PGC₁-Альфа⁵.

Последние данные свидетельствуют о том, что АМПК может предотвращать эндоплазматический стресс (хотя механизм пока

¹ Choi S.L., Kim S.J., Lee K.T. et al. The regulation of AMP-activated protein kinase by H(2)O(2) // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2001. V. 287, № 1. P. 92–97; Emerling B.M., Weinberg F., Snyder C. et al. Hypoxic activation of AMPK is dependent on mitochondrial ROS but independent of an increase in AMP/ATP ratio // *Free Radic. Biol. Med.* 2009. V. 46, № 10. P. 1386–1391.

² Hardie D.G. AMP-activated/SNF1 protein kinases: conserved guardians of cellular energy // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2007. V. 8. P. 774–785; Hue L., Rider M.H. The AMP-activated protein kinase: more than an energy sensor // *Essays Biochem.* 2007. V. 43. P. 121–137; Hardie D.G. AMP-activated protein kinase as a drug target // *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2007. V. 47. P. 185–210.

³ Hardie D.G. AMP-activated/SNF1 protein kinases: conserved guardians of cellular energy // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2007. V. 8. P. 774–785.

⁴ Bungard D., Fuerth B.J., Zeng P. et al. Signaling kinase AMPK activates stress-promoted transcription via histone H2B phosphorylation // *Science.* 2010. V. 329, № 5996. P. 1201–1205.

⁵ Jäger S., Handschin C., St-Pierre J. et al. AMP-activated protein kinase (AMPK) action in skeletal muscle via direct phosphorylation of PGC-1alpha // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2007. V. 104, № 29. P. 12017–12022.

еще однозначно не определен)¹; препятствовать активации c-JUN-киназы и угнетать окислительный стресс в некоторых клеточных моделях, в том числе кардиомиоцитах². Последнее может иметь место в результате фосфорилирования и активации фактора транскрипции forkhead 3, в результате чего снижается уровень АФК путем индуцирования антиоксидантной системы, включая тиоредоксин (thioredoxin)³. Наконец, АМПК ингибирует глюкозо-индуцированный окислительный стресс и активацию НАДФН-оксидазы в эндотелиальных клетках⁴.

У млекопитающих АМПК ингибирует рапамициновый путь (mTOR), который контролирует синтез белка и рост клеток. Опосредованное фосфорилирование АМПК регуляторных каскадов, таких как комплекс туберозного склероза 2 (tuberous sclerosis complex 2 (TSC2)) и / или Раптор⁵, находящихся под контролем данного комплекса mTOR, p70 рибосомальной S6 протеинкиназы (p70S6K), и 4E-связывающий белок-1 (4EBP1) участвуют в транслокации белка и росте клеток⁶. Кроме того, АМПК

¹ Dong Y., Zhang M., Liang B. et al. Reduction of AMP-activated protein kinase alpha2 increases endoplasmic reticulum stress and atherosclerosis in vivo // *Circulation*. 2010. V. 121, № 6. P. 792–803.

² Qi D., Hu X., Wu X. et al. Cardiac macrophage migration inhibitory factor inhibits JNK pathway activation and injury during ischemia/reperfusion // *J. Clin. Invest.* 2009. V. 119, № 12. P. 3807–3816.

³ Li X.N., Song J., Zhang L. et al. Activation of the AMPK-FOXO3 pathway reduces fatty acid-induced increase in intracellular reactive oxygen species by upregulating thioredoxin // *Diabetes*. 2009. V. 58, № 10. P. 2246–2257; Hou X., Song J., Li X.N. et al. Metformin reduces intracellular reactive oxygen species levels by upregulating expression of the antioxidant thioredoxin via the AMPK-FOXO3 pathway // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2010. V. 396, № 2. P. 199–205.

⁴ Ceolotto G., Gallo A., Papparella I. et al. Rosiglitazone reduces glucose-induced oxidative stress mediated by NAD(P)H oxidase via AMPK-dependent mechanism // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2007. V. 27, № 12. P. 2627–2633.

⁵ Inoki K., Li Y., Xu T. et al. Rheb GTPase is a direct target of TSC2 GAP activity and regulates mTOR signaling // *Genes Dev.* 2003. V. 17, № 15. P. 1829–1834; Gwinn D.M., Shackelford D.B., Egan D.F. et al. AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint // *Mol Cell.* 2009. V. 30, № 2. P. 214–226.

⁶ Proud C.G. Signalling to translation: how signal transduction pathways control the protein synthetic machinery // *Biochem. J.* 2007. V. 403, № 2. P. 217–234; Bertrand L., Horman S., Beauloye C. et al. Insulin signalling in the heart // *Cardiovascular Research*. 2008. V. 79, № 2. P. 238–248.

непосредственно фосфорилирует эукариотический фактор элонгации-2 киназы (eEF2K), тем самым блокируя удлинение белка через фосфорилирование eEF2¹.

В эндотелиальных клетках АМПК активируется с помощью VEGF и контролируется активацией eNOS². eNOS также известна как непосредственная мишень для АМПК в кардиомиоцитах³, хотя роль этого фосфорилирования до сих пор не установлена. В гладкомышечных клетках сосудов прямое фосфорилирование киназы легких цепей миозина АМПК позволяет этой протеинкиназе участвовать в контроле сосудистого тонуса⁴. Интересно, что в скелетных мышцах и кардиомиоцитах, активация АМПК индуцирует VEGF экспрессию и секрецию. Последний эффект (секреция VEGF) играет важную роль в мышечной адаптации к физической нагрузке и координирует ангиогенез в сторону гипертрофии⁵.

В скелетных мышцах метаболические изменения, вызванные активацией АМПК, могут развиваться либо остро, через непосредственное фосфорилирование метаболических ферментов, либо хронически, посредством контроля экспрессии генов⁶. Активация АМПК увеличивает быстрое потребление глюкозы, так

¹ Horman S., Browne G., Krause U., et al. Activation of AMP-activated protein kinase leads to the phosphorylation of elongation factor 2 and an inhibition of protein synthesis // *Curr. Biol.* 2002. V. 12, № 16. P. 1419–1423.

² Reihill J.A., Ewart M.A., Hardie D.G. et al. AMP-activated protein kinase mediates VEGF-stimulated endothelial NO production // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2007. V. 354, № 4. P. 1084–1088; Chen Z.P., Mitchelhill K.I., Michell B.J. et al. AMP-activated protein kinase phosphorylation of endothelial NO synthase // *FEBS Lett.* 1999. V. 443, № 3. P. 285–289.

³ Li J., Hu X., Selvakumar P. et al. Role of the nitric oxide pathway in AMPK-mediated glucose uptake and GLUT4 translocation in heart muscle // *Am J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2004. V. 287, № 5. P. 834–841.

⁴ Horman S., Morel N., Vertommen D. et al. AMP-activated protein kinase phosphorylates and desensitizes smooth muscle myosin light chain kinase // *J. Biol. Chem.* 2008. V. 283, № 27. P. 18505–18512.

⁵ Shimano M., Ouchi N., Shibata R. et al. Adiponectin deficiency exacerbates cardiac dysfunction following pressure overload through disruption of an AMPK-dependent angiogenic response // *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2010. V. 49, № 2. P. 210–220.

⁶ Hardie D.G., Sakamoto K. AMPK: a key sensor of fuel and energy status in skeletal muscle // *Physiology (Bethesda)*. 2006. V. 21. P. 48–60.

как увеличивается транслокация транспортера глюкозы 4 (GLUT4) в плазматической мембране¹. Кроме того, окисление жирных кислот резко увеличивается за счет фосфорилирования ацетил-СоА-карбоксилазы-2 (АСС-2), приводящего к снижению малонил-СоА – ингибитор карнитин-о-пальмитоилтрансфераза-1. Все это усиливает транспорт жирных кислот в митохондриях².

1.5. Вовлечение миокинов в патогенетические механизмы и их роль в терапевтических и профилактических эффектах физических упражнений

Продукция миокинов при заболеваниях исследована на примере сахарного диабета 2 типа³, ожирения⁴, остеопороза⁵, а так-

¹ Kurth-kraczek E.J., Hirshman M.F., Goodyear L.J. et al. 5' AMP-activated protein kinase activation causes GLUT4 translocation in skeletal muscle // *Diabetes*. 1999. V. 48, № 8. P. 1667–1671.

² Merrill G.F., Kurth E.J., Hardie D.G. et al. AICA riboside increases AMP-activated protein kinase, fatty acid oxidation, and glucose uptake in rat muscle // *Am J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 1997. V. 273, № 6. P. 1107–1112; Vavvas D., Apazidis A., Saha A.K. et al. Contraction-induced changes in acetyl-CoA carboxylase and 5'-AMP-activated kinase in skeletal muscle // *J. Biol. Chem.* 1997. V. 272, № 20. P. 13255–13261.

³ Yang M., Chen P., Jin H. et al. Circulating levels of irisin in middle-aged first-degree relatives of type 2 diabetes mellitus – correlation with pancreatic β -cell function // *Diabetol. Metab. Syndr.* 2014. V. 6, № 1. P. 133–139; Huh J.Y., Siopi A., Mougios V. et al. Irisin in response to exercise in humans with and without metabolic syndrome // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2015. V. 100. P. 453–457; Li Y., Li F., Lin B. et al. Myokine IL-15 regulates the crosstalk of co-cultured porcine skeletal muscle satellite cells and preadipocytes // *Mol. Biol. Rep.* 2014. V. 41, № 11. P. 7543–7553.

⁴ Pedersen B.K., Febbraio M.A. Muscles, exercise and obesity: skeletal muscle as a secretory organ // *Nat. Rev. Endocrinol.* 2012. V. 8. P. 457–465; Pierce J.R., Maples J.M., Hickner R.C. IL-15 concentrations in skeletal muscle and subcutaneous adipose tissue in lean and obese humans: local effects of IL-15 on adipose tissue lipolysis // *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2015. V. 308, № 12. P. 1131–1139; Blüher S., Panagiotou G., Petroff D. et al. Effects of a 1-year exercise and lifestyle intervention on irisin, adipokines, and inflammatory markers in obese children // *Obesity*. 2014. V. 22, № 7. P. 1701–1708.

⁵ Datta N.S. Muscle-bone and fat-bone interactions in regulating bone mass: do PTH and PTHrP play any role? // *Endocrine*. 2014. V. 47. P. 389–400; Lai X., Price C., Lu X.L. et al. Imaging and quantifying solute transport across periosteum: implications for muscle-bone crosstalk // *Bone*. 2014. V. 66. P. 82–89.

же при метаболических нарушениях¹, развитии мышечной атрофии². Некоторые миокины (IL-6, IL-7, IL-8, MCP-1, PEDF), являющиеся одновременно адипокинами, ассоциированы с ожирением и инсулинорезистентностью. Установлено, что концентрация IL-6 в плазме напрямую зависит от количества жира в организме и повышена при сахарном диабете 2 типа. При этом заболевании отмечено также увеличение экспрессии IL-8 в висцеральной жировой ткани. Малоподвижный образ жизни провоцирует нарушения продукции миокинов, а также устойчивость к их воздействиям, что в свою очередь приводит к увеличению риска развития метаболических нарушений и заболеваний сердечно-сосудистой системы. Ряд авторов рассматривают терапевтические перспективы использования IL-15 при снижении мышечной массы и ожирении³.

В настоящее время физическая активность рассматривается как важный терапевтический фактор при различных заболеваниях. Однако для того, чтобы успешно комбинировать уровень двигательной активности с различными методами фармакотерапии, необходимо иметь четкие представления о механизмах влияния физических упражнений на организм пациента. Одним из характерных примеров такого подхода является терапия сахарного диабета.

С одной стороны, толерантность скелетных мышц к глюкозе ставит под сомнение эффективность физических упражнений в коррекции проявлений данного заболевания. Однако как экспериментальные, так и клинические данные свидетельствуют о наличии позитивных эффектов физической активности, которые

¹ Henriksen T., Green C., Pedersen B.K. Myokines in myogenesis and health // *Recent Pat. Biotechnol.* 2012. V. 6. № 3. P. 167–171.

² Argiles J.M., Busquets S., López-Soriano F.J. Anti-inflammatory therapies in cancer cachexia // *Eur. J. Pharmacol.* 2011. V. 668. P. 81–86; Argiles J.M., Busquets S., Stemmler B.J. et al. Cancer cachexia: understanding the molecular basis // *Nat. Rev. Cancer.* 2014. V. 14. P. 754–762; Argiles J.M., Lopez-Soriano F.J., Busquets S. Counteracting Inflammation: A Promising Therapy in Cachexia // *Critical Reviews in Oncogenesis.* 2012. V. 17. P. 253–262.

³ Argiles J.M., López-Soriano F.J., Busquets S. Therapeutic potential of interleukin-15: a myokine involved in muscle wasting and adiposity // *Drug Discov. Today.* 2009. V. 14. P. 208–213.

непосредственно связаны с продукцией NO. Так, у пациентов с нарушением толерантности к глюкозе после 12 недель регулярных занятий физической культурой в плазме было отмечено снижение NO и эндотелина-1¹. У крыс с сахарным диабетом 1 типа была увеличена концентрация eNOS в мозговой ткани и она еще более повышается после физических нагрузок. Содержание nNOS в мозговой ткани при этом состоянии не изменялось, но повышалось в ответ на упражнения, что может облегчать нарушенную NOS-зависимую дилатацию мозговых артериол при сахарном диабете 1 типа². Также у диабетических крыс после физических нагрузок снижался объем ишемии после окклюзии-реперфузии мозговой артерии³. При сравнении силовых тренировок с тренировками на выносливость было выяснено, что у крыс с диабетом 1 типа тренировки на выносливость были более эффективными и улучшали ацетилхолин-зависимую релаксацию аорты, подвздошных и бедренных артерий⁴.

В исследовании Rodrigues A.M. et al. показано, что физические упражнения способствовали улучшению контроля гликемии с увеличением биодоступности NO и контроля окислительного стресса, связанного с улучшением функции почек. Объектом изучения служили крысы Вистар с моделированной диабетической нефропатией. Упражнения проводились на беговой дорожке при скорости работы 16 м/мин, 60 мин/сут, 5 раз в неделю в течение восьми недель. После физической нагрузки у диабетических крыс снижалось количество креатинина и мочевины, концентрация глюкозы в крови, альбуминурия и тиобар-

¹ Kasmay O., Ergen N., Bilsel S. et al. Diet-supported aerobic exercise reduces blood endothelin-1 and nitric oxide levels in individuals with impaired glucose tolerance // J. Clin. Lipidol. 2010. V. 4, № 5. P. 427–434.

² Mayhan W.G., Arrick D.M., Patel K.P. et al. Exercise training normalizes impaired NOS-dependent responses of cerebral arterioles in type 1 diabetic rats // Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. 2011. V. 300. P. 1013–1020.

³ Arrick D.M., Sun H., Mayhan W.G. Influence of exercise training on ischemic brain injury in type 1 diabetic rats // J. Appl. Physiol. 2012. V. 113, № 7. P. 1121–1127.

⁴ Murias J.M., Dey A., Campos O.A. et al. High-intensity endurance training results in faster vessel-specific rate of vasorelaxation in type 1 diabetic rats // PLoS One. 2013. V. 8, № 3. e59678.

битуровой кислоты¹. Кроме того, физические упражнения через 3–4 недели снижают эректильную дисфункцию, вызванную введением экзогенного NO донора нитропрусида натрия, у крыс с сахарным диабетом 1 типа².

У больных сахарным диабетом 2 типа отмечен повышенный уровень свободных радикалов, которые существенно ограничивают биодоступность NO для эндотелия и тем самым способствуют развитию эндотелиальной дисфункции. Физические упражнения повышают синтез NO в сосудах благодаря увеличению доступности и активности eNOS³. Так же физические упражнения у таких пациентов (тренировки проводилось 4 раза в неделю в течение 90 мин, 6 недель) частично восстановили NOS- активность в эритроцитах⁴.

Функциональная оценка кольцевых сегментов аорты показала, что физические нагрузки восстанавливают ацетилхолин-индуцированную эндотелиальную вазодилатацию аорты мышей с сахарным диабетом 2 типа, хотя синтез белка eNOS при этом не увеличивался. Механизм такого улучшения был связан как с адипонектин-зависимыми, так и адипонектин-независимыми путями проведения сигнала⁵. Таким образом, можно предполагать, что, не оказывая непосредственного влияния на уровень утилизации глюкозы мышцами, NO, продукция которого усиливается при физических упражнениях, различными путями обеспечивает коррекцию функциональных расстройств.

¹ Rodrigues A.M., Bergamaschi C.T., Araújo R.C. et al. Effects of training and nitric oxide on diabetic nephropathy progression in type I diabetic rats // *Exp. Biol. Med.* (Maywood). 2011. V. 236, № 10. P. 1180–1187.

² Zheng H., Mayhan W.G., Patel K.P. Exercise training improves the defective centrally mediated erectile responses in rats with type I diabetes // *J. Sex. Med.* 2011. V. 8. P. 3086–3097.

³ Brinkmann C., Schwinger R.H., Brixius K. Physical activity and endothelial dysfunction in type 2 diabetic patients: the role of nitric oxide and oxidative stress // *Wien. Med. Wochenschr.* 2011. V. 161, № 11–12. P. 305–314.

⁴ Ladage D., Braunroth C., Lenzen E. et al. Influence of intermittent hypoxia interval training on exercise-dependent erythrocyte NOS activation and blood pressure in diabetic patients // *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 2012. V. 90, № 12. P. 1591–1598.

⁵ Lee S., Park Y., Dellsperger K.C. et al. Exercise training improves endothelial function via adiponectin-dependent and independent pathways in type 2 diabetic mice // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2011. V. 301. P. 306–314.

В терапии заболеваний системы кровообращения сегодня также большое внимание уделяется физическим упражнениям. Лечебный эффект умеренных физических нагрузок у таких пациентов во многом оказывается связан с продукцией NO. Так, у пациентов с гипертонической болезнью уровень NO в плазме крови повышался после 12 недель занятий физической культурой. Этого эффекта не наблюдалось у контрольной группы здоровых людей¹.

У пациентов с хронической сердечной недостаточностью регулярные физические нагрузки (как аэробные, так и с преодолением сопротивления) способствуют увеличению максимального потребления кислорода и толерантности к физической нагрузке. Причем описанные эффекты в большей степени обусловлены влиянием тренировок на периферическое кровообращение и скелетные мышцы, а не на само сердце. Физическая тренировка способствует улучшению обмена веществ в скелетных мышцах, увеличению притока крови в активные скелетные мышцы, повышает плотность капилляров, способствует синтезу и высвобождению NO и уменьшает окислительный стресс².

¹ Pan X., Zhang Y., Tao S. Effects of Tai Chi exercise on blood pressure and plasma levels of nitric oxide, carbon monoxide and hydrogen sulfide in real-world patients with essential hypertension // *Clin. Exp. Hypertens.* 2014. V. 37, № 1. P. 8–14.

² Gąsiorowski A., Dutkiewicz J. Comprehensive rehabilitation in chronic heart failure // *Ann. Agric. Environ. Med.* 2013. V. 20. P. 606–612.

Глава 2. СОДЕРЖАНИЕ МИОКИНОВ В ПЛАЗМЕ КРОВИ ПОСЛЕ ФИЗИЧЕСКИХ НАГРУЗОК РАЗЛИЧНОГО ХАРАКТЕРА У СПОРТСМЕНОВ И НЕТРЕНИРОВАННЫХ ЛИЦ

2.1. Дизайн и методы исследования

Большая часть данных о продукции миокинов получена в исследованиях, использующих циклические упражнения, в то время как данные о выработке миокинов при изометрических упражнениях ограничиваются несколькими работами¹. В этой связи следует отметить, что при циклических (аэробных) упражнениях, таких как ходьба, бег и плавание, задействованы большие группы мышц, составляющие более двух третей от общей мышечной массы. В отличие от циклических упражнений, силовые и изометрические упражнения, как правило, включают локальные группы мышц, представляющие менее одной трети от общей мышечной массы.

Во время изометрических сокращений длина мышц не изменяется, что также отличает их от нагрузок динамического характера. Статическая мышечная нагрузка быстрее вызывает развитие утомления, так как не включает фазу расслабления, в течение которой возможно пополнение энергетических ресурсов,

¹ Ochi E., Nakazato K., Ishii N. Muscular hypertrophy and changes in cytokine production after eccentric training in the rat skeletal muscle // *J. Strength Cond Res.* 2011. № 25. P. 2283–2292; Karamouzis M., Landberg H., Skovgaard D. et. al. In situ microdialysis of intramuscular prostaglandin and thromboxane in contracting skeletal muscle in humans // *Acta Physiol Scand.* 2001. № 171. P. 71–76; Louis E., Raue U., Yang Y. et. al. Time course of proteolytic, cytokine, and myostatin gene expression after acute exercise in human skeletal muscle // *J. Appl Physiol.* 2007. № 103. P. 1744–1751; Coffey V.G., Zhong Z., Shield A. et. al. Early signaling responses to divergent exercise stimuli in skeletal muscle from well-trained humans // *FASEB J.* 2006. № 20. P. 190–192.

расходуемых для сокращения мышц¹. Мы не обнаружили исследований, в которых изучалось влияние предварительных тренировок на продукцию миокинов при статических и динамических нагрузках. Кроме того, важно учитывать и индивидуальные особенности изменения уровня миокинов в плазме после физических нагрузок. Так, например, у двухсот участников марафона Western States 160-km Endurance Run содержание белка IL-6 в плазме изменялась в пределах от 5 до 800 пг/мл².

В нашем исследовании принимали участие здоровые юноши в возрасте от 18 до 23 лет. Основная группа 1 включала в себя 10 спортсменов, профессионально занимающихся тяжелой атлетикой (ТА). В основную группу 2 вошли 10 спортсменов легкоатлетов (ЛА), специализирующихся в беге на средние дистанции. Спортсмены основной группы 1 и 2 занимались избранным видом спорта более 6 лет. Антропометрические данные испытуемых представлены в табл. 2. Необходимым требованием для включения спортсменов в группы исследования являлось наличие спортивного разряда не ниже кандидат в мастера спорта. Контрольная группа состояла из 20 человек, здоровых нетренированных волонтеров, не занимающихся спортом. Группа контроля была разделена на две подгруппы по 10 человек. Волонтеры первой подгруппы (КГ1) выполняли статическую нагрузку, волонтеры второй подгруппы (КГ2) – динамическую. Все испытуемые на момент исследования не имели острых и хронических заболеваний в анамнезе. Цель исследования была разъяснена участникам. Всеми участниками было подписано информированное согласие на участие в исследовании и согласие на забор крови. На проведение исследования было получено разрешение этической комиссии Томского государственного университета (регистрационный номер 11 от 24 сентября 2015 г.).

¹ Egan B., Zierath J.R. Exercise metabolism and the molecular regulation of skeletal muscle adaptation // *Cell Metab.* 2013. № 17. P. 162–184.

² Peake J.M., Gatta P.D., Suzuki K., Nieman D.C. Cytokine expression and secretion by skeletal muscle cells: regulatory mechanisms and exercise effects // *Exercise Immunol Rev.* 2015. № 21. P. 8–25.

Антропометрические данные участников исследования ($\bar{X} \pm m$)

Группа	Возраст, лет	Рост, см	Масса тела, кг
ТА (тяжелая атлетика)	19,9±1,4	177,0±4,5	82,7±10,2
ЛА (легкая атлетика)	20,8±1,4	180,2±6,2	73,2±6,9
КГ ₁ (контроль)	19,5±0,7	183,2±5,7	74,5±4,75
КГ ₂ (контроль)	20,2±1,1	179,4±3,1	69,8±3,1

Спортсмены тяжелоатлеты (ТА) и волонтеры (КГ₁) в качестве статической нагрузки выполняли однократное удержание штанги на уровне ниже колен. Вес отягощения составлял 50% от максимального результата, показанного в упражнении «становая тяга». Максимальный вес определялся заранее, не позднее, чем за неделю до исследования. Процедуре определения максимального веса предшествовала разминка и инструктаж по работе с отягощениями. Руководство процессом осуществлял профессиональный тренер-инструктор. Перед выполнением статического удержания штанги все испытуемые хорошо разминались. Выполнение упражнения также осуществлялось под руководством инструктора. Удержание штанги производилось до состояния полной усталости и невозможности дальше продолжать упражнение. Время удержания засекалось при помощи секундомера. За состоянием испытуемых наблюдал врач.

В качестве динамической нагрузки для спортсменов-легкоатлетов (ЛА) и волонтеров (КГ₂) была использована методика стандартного теста PWC170¹. Тест выполнялся без предварительной разминки и состоял из двухступенчатой нагрузки с различной мощностью. Первый этап – педалирование на велоэргометре в течение 5 минут с мощностью, которая подбиралась по таблицам в соответствии с массой тела испытуемого. За 15 с до окончания нагрузки производилось измерение частоты сердечных сокращений (ЧСС). Второй этап – отдых в течение 3 минут. Третий этап – педалирование на велоэргометре в течение

¹ Svannshvili R.A., Sopromadze Z.G., Kakhabrishvili Z.G. et al. Athletes' physical working capacity // Georgian Medical News. 2009. № 166. P. 68–73.

5 минут с мощностью, которая подбиралась по таблицам в зависимости от ЧСС в конце первой нагрузки. За 15 с до окончания нагрузки производилось измерение ЧСС.

Забор крови осуществлялся при помощи вакуумной системы BD Vacutainer® (Greiner Bio-One, Австрия) трехкратно по 5 мл (до нагрузки – проба А, непосредственно после нагрузки – проба В и через 30 мин после нагрузки – проба С). Указанные временные промежутки для забора крови были определены в связи с тем, что по данным литературных источников выработка миокинов может увеличиваться как непосредственно во время физической нагрузки¹, так и через определенные промежутки времени после окончания физического упражнения².

Все волонтеры проходили обследование утром натощак. За 1 день до исследования спортсменам было рекомендовано прекратить тренировочный процесс. Использовались пробирки Vacuette® Premium (Greiner Bio-One, Австрия) с лития гепарином и разделительным гелем объемом 5 мл. Концентрация гепарина в пробирках составила 20 ед./мл. Центрифугирование образцов крови проводилось при помощи лабораторной центрифуги LMC 3000 (Biosan, Латвия) через 30 мин после забора крови. Центрифугирование осуществлялось в течение 11 мин при 2000 об./мин. Плазма замораживалась и хранилась в морозильной камере при $t = -20^{\circ}\text{C}$, срок хранения – не более 30 суток.

Определение концентрации белков в плазме производилось методом иммуноферментного анализа (ИФА). Были использованы наборы для ИФА с антителами к соответствующим белкам Platinum: Human LIF Platinum ELISA Kit, Human IL-6 Platinum ELISA Kit, Human IL-8 Platinum ELISA Kit (eBioscience, Австрия), а также RayBio® Human IL-15 ELISA Kit (RayBio®, США) с приложенными к наборам инструкциями. Все образцы разливались в двух экземплярах. Для анализа использовались планшеты с общим числом плоскодонных лунок 96 (размер

¹ Broholm C., Laye M.J., Brandt C. et al. LIF is a contraction-induced myokine stimulating human myocyte proliferation // *J. Appl. Physiol.* 2011. V. 111, № 1. P. 251–259.

² Scheler M., Irmiler M., Lehr S. et al. Cytokine response of primary human myotubes in an in vitro exercise model // *Am J. Physiol Cell Physiol.* 2013. № 305. P. C877–C886.

планшета 12×8 лунок). Инкубация производилась на термощейкере для планшетов PST-60HL (Biosan, Латвия). Процедура промывки осуществлялась при помощи промывочного устройства Anthos Fluido 2 (Biochrom, Великобритания). Измерение оптической плотности образцов проводилось при помощи микропланшетного спектрофотометра Anthos 2010 с фильтрами (400–750 нм) и программой ADAP+ (Biochrom, Великобритания). Для подготовки стандартов применялось серийное разведение высококонцентрированных растворов белков, прилагаемых в наборах. Расчет оптической плотности образцов производился при длине волны 450 нм, референсная длина волны 620 нм. Измерение концентрации лактата в капиллярной крови производилось при помощи портативного прибора Accutrend Plus (Roche Diagnostics, Германия).

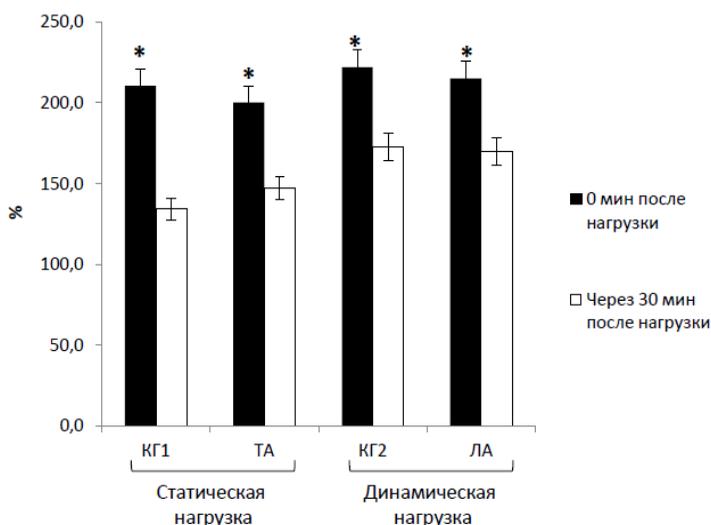


Рис. 5. Изменение уровня лактата после физической нагрузки; * статистически значимые изменения относительно показателя до нагрузки при $p < 0,05$

Во всех группах после статической и динамической нагрузки произошло увеличение уровня лактата в крови. В группе легко-

атлетов произошло повышение в 2,2 раза. У тяжелоатлетов лактат в крови после статической нагрузки увеличился в 2 раза. В группах контроля после статической и динамической нагрузки также произошло увеличение в 2,1 и в 2,3 раза соответственно. Через 30 минут во всех группах наблюдалось восстановление молочной кислоты к первоначальному уровню. Результаты изменения уровня лактата в венозной крови представлены на рис. 5. Эти результаты позволяют считать, что уровень нагрузки у всех испытуемых лиц был одинаковым и выявляемые различия в продукции миокинов обусловлены именно характером предъявляемой нагрузки и характером предварительных тренировок.

2.2. Влияние статической нагрузки на продукцию миокинов у спортсменов и нетренированных волонтеров

В группе тяжелоатлетов после статической нагрузки произошло увеличение концентрации в плазме IL-6 примерно на 25%. При этом в контрольной группе КГ1 после статической нагрузки произошло двукратное увеличение содержания IL-6 (рис. 6). Через тридцать минут после выполнения упражнения содержание в плазме IL-6 оставалось повышенным у спортсменов.

После статического упражнения было выявлено небольшое повышение концентрации IL-8 в плазме спортсменов (от $109,93 \pm 1,63$ до $123,29 \pm 2,92$ пг/мл), в то время как в контрольной группе после статического усилия произошло снижение уровня IL-8 на 25% (рис. 7).

Концентрация IL-15 у тяжелоатлетов после статического усилия значительно увеличилась – на 47,4% (рис. 8). При этом в группе контроля после статического упражнения не обнаружено значительного увеличения содержания данного белка ($38,96 \pm 2,52$ и $42,31 \pm 1,75$ пг/мл). Повышенный уровень IL-15 в плазме сохранился через 30 мин после статической нагрузки у спортсменов-тяжелоатлетов.

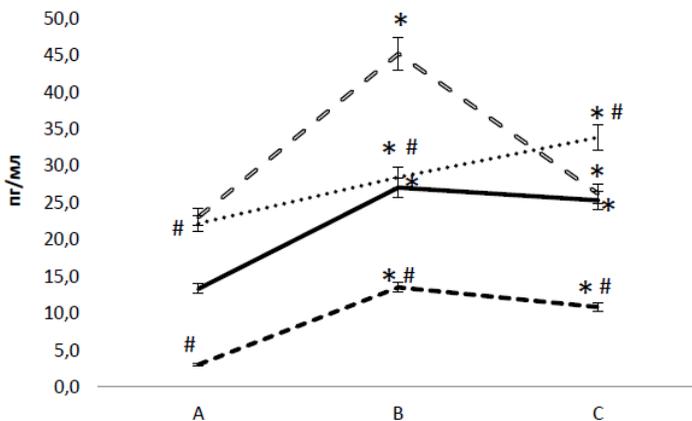


Рис. 6. Концентрация IL-6 в плазме крови в покое и на фоне физической нагрузки; сплошная линия – контрольная группа 1, линия круглыми точками – группа тяжелоатлетов, двойная штриховка – контрольная группа 2, штриховка – группа легкоатлетов; А – до нагрузки; В – 0 мин после нагрузки; С – через 30 мин после нагрузки; * – $p < 0,05$, при сравнении с пробой крови А; # – $p < 0,001$ при сравнении с контролем

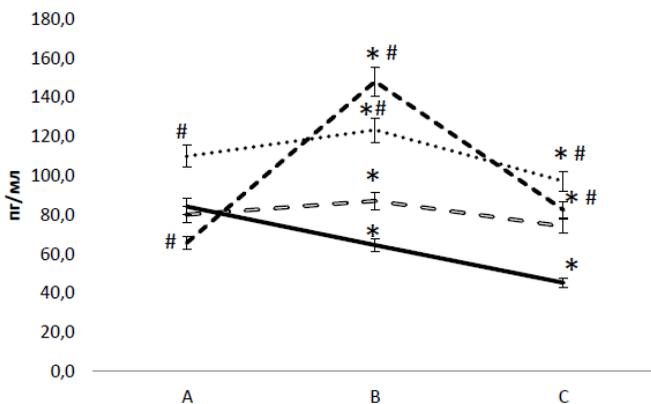


Рис. 7. Концентрация IL-8 в плазме крови в покое и на фоне физической нагрузки; сплошная линия – контрольная группа 1, линия круглыми точками – группа тяжелоатлетов, двойная штриховка – контрольная группа 2, штриховка – группа легкоатлетов; А – до нагрузки; В – 0 мин после нагрузки; С – через 30 мин после нагрузки; * – $p < 0,05$, при сравнении с пробой крови А; # – $p < 0,001$ при сравнении с контролем

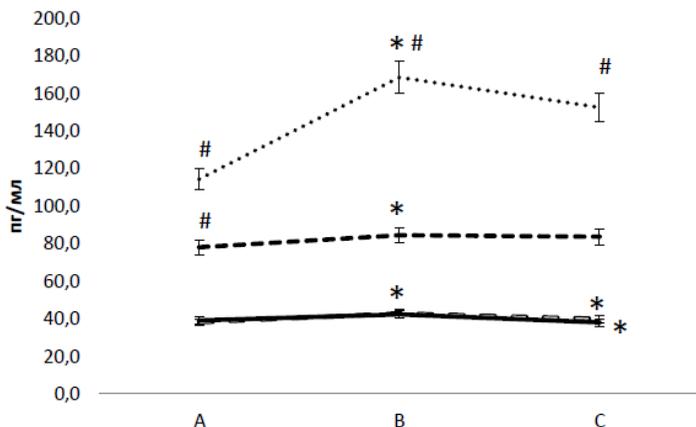


Рис. 8. Концентрация IL-15 в плазме крови в покое и на фоне физической нагрузки; сплошная линия – контрольная группа 1, линия круглыми точками – группа тяжелоатлетов, двойная штриховка – контрольная группа 2, штриховка – группа легкоатлетов; А – до нагрузки; В – 0 мин после нагрузки; С – через 30 мин после нагрузки; * – $p < 0,05$, при сравнении с пробой крови А; # – $p < 0,001$ при сравнении с контролем

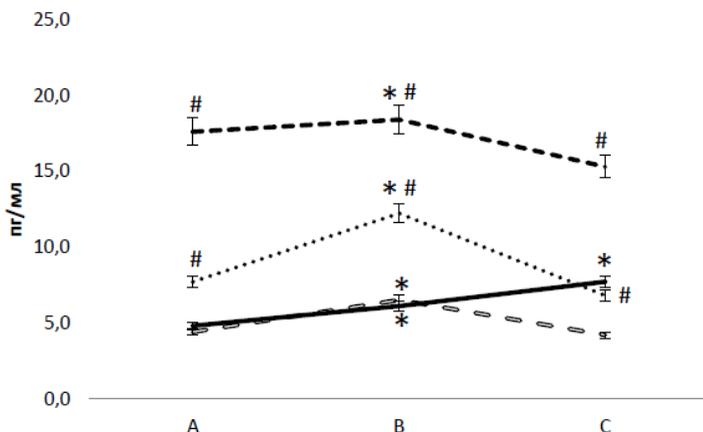


Рис. 9. Концентрация LIF в плазме крови в покое и на фоне физической нагрузки; сплошная линия – контрольная группа 1, линия круглыми точками – группа тяжелоатлетов, двойная штриховка – контрольная группа 2, штриховка – группа легкоатлетов; А – до нагрузки; В – 0 мин после нагрузки; С – через 30 мин после нагрузки; * – $p < 0,05$, при сравнении с пробой крови А; # – $p < 0,001$ при сравнении с контролем

У спортсменов-тяжелоатлетов и нетренированных лиц статические упражнения привели к увеличению в плазме концентрации LIF на ~ 60 и 30% соответственно (рис. 9). Следует отметить, что через 30 минут после упражнения концентрация LIF в плазме в группе контроля увеличилась с $6,12 \pm 1,99$ до $7,69 \pm 1,13$ пг/мл, в то время как у спортсменов этот показатель снизился с $12,24 \pm 1,66$ до $6,82 \pm 1,68$ пг/мл ($p < 0,05$), т.е. практически до исходного значения ($7,73 \pm 1,77$ пг/мл).

2.3. Влияние динамической нагрузки на продукцию миокинов у спортсменов и нетренированных волонтеров

После завершения динамического упражнения содержание IL-6 в плазме крови увеличилось более чем в четыре раза у спортсменов-легкоатлетов (рис. 6), но его концентрация ($13,50 \pm 1,63$ пг/мл) была значительно ниже, чем в контрольной группе КГ2, т.е. у волонтеров, выполнивших аналогичную динамическую нагрузку ($45,25 \pm 1,26$ пг/мл). Через тридцать минут после выполнения упражнения содержание в плазме IL-6 практически полностью нормализовалось у добровольцев, выполнивших динамическую нагрузку.

У легкоатлетов после динамической нагрузки также выявлено увеличение в плазме концентрации IL-8 примерно в два раза, при этом динамическая нагрузка не оказала значительного влияния на концентрацию белка в контрольной группе (рис. 7). Через тридцать минут после упражнения концентрация IL-8 снижалась приблизительно в два раза в группе спортсменов-легкоатлетов, в то время как в других группах его содержание снизилось менее чем на 25% (рис. 7).

В отличие от статической нагрузки, упражнения циклического характера не оказали значительного влияния на изменение уровня IL-15 в группе легкоатлетов и в контрольной группе (рис. 8). Динамические упражнения также не оказали значительного влияния на изменение концентрации LIF в плазме у легкоатлетов. В то время как в группе контроля после динамической нагрузки произошло увеличение примерно на 35% (рис. 9).

Полученные нами результаты позволяют сделать два основных вывода. Во-первых, влияние статических и динамических упражнений на содержание в плазме цитокинов значительно различается. Длительные динамические упражнения вызывают увеличение содержания ИЛ-6 и ИЛ-8 в плазме спортсменов, что согласуется с рядом публикаций¹. В отличие от динамических, статические нагрузки оказывают незначительное влияние на содержание этих цитокинов у спортсменов силовых видов спорта (рис. 5, 6). Упражнения на выносливость не оказали существенного влияния на концентрацию ИЛ-15 и LIF, в то время как статическая нагрузка приводит к увеличению уровня этих цитокинов в плазме на 50% (рис. 7, 8).

Во-вторых, 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 ИЛ-8 в плазме, тогда как у нетренированных лиц подобная реакция отсутствовала (рис. 6). Увеличение ИЛ-15, вызванное статической нагрузкой в плазме спортсменов-тяжелоатлетов, не наблюдалось в контрольной группе (рис. 7). Эти факты можно объяснить адаптационными изменениями в организме спортсменов, вызванными регулярными физическими нагрузками².

Особенности влияния динамической и статической нагрузки на продукцию миокинов у спортсменов и нетренированных юношей могут быть связаны с различиями в клеточном составе мышц. Скелетная мышца весьма гетерогенна и кроме

¹ Ostrowski K., Ronde T., Asp S. et al. Pro- and anti-inflammatory cytokine balance in strenuous exercise in humans // *J Physiol*. 1999. № 515. P. 287–291; Steensberg A., van Hall G., Osada T. et al. Production of interleukin-6 in contracting human skeletal muscles can account for the exercise-induced increase in plasma interleukin-6 // *J Physiol*. 2000. № 529. P. 237–242; Fisher C.P. Interleukin-6 in acute exercise and training: what is the biological relevance?. *Exercise Immunol Rev*. 2006. № 12. P. 6–33.

² Pedersen B.K., Febbraio M.A. Muscle as an endocrine organ: focus on muscle-derived interleukin-6 // *Physiol Rev*. 2008. № 88. P. 1379–1406; Peake J.M., Gatta P.D., Suzuki K., Nieman D.C. Cytokine expression and secretion by skeletal muscle cells: regulatory mechanisms and exercise effects // *Exercise Immunol Rev*. 2015. № 21. P. 8–25.

миоцитов она содержит целый ряд клеток – фибробласты, перициты, адипоциты, чей вклад в общий объем производства цитокинов определен недостаточно. Относительное содержание этих клеток, а также их воздействие на вызванную физической нагрузкой продукцию цитокинов может отличаться у спортсменов и нетренированных лиц. В дополнение к гетерогенности ткани, было показано, что скелетные миоциты могут быть подразделены на 3 различных фенотипа, каждый из которых имеет свои особенности биоэнергетических механизмов¹.

Еще один механизм, обеспечивающий описанные различия, может быть связан с особенностями транскрипционных механизмов, вовлеченных в регуляцию продукции миокинов. В самом деле, показано, что транскрипционные изменения при сокращении мышц наиболее выражены в быстро сокращающихся мышечных волокнах типа IIa², что так же, несомненно, отражается на интенсивности продукции миокинов.

Фактор, индуцируемый гипоксией 1 альфа (HIF-1 α), сAMP- и Ca²⁺_i зависимые протеинкиназы, а также соотношение концентраций одновалентных катионов ($[Na^+]_i/[K^+]_i$) обеспечивают передачу сигналов и участвуют в образовании транскрипционных связей в клетках скелетных мышц³. HIF-1 α транслоцируется в ядро, где образует HIF-1 α /HIF-1 β комплекс и триггеры транскрипции десятков генов, в том числе фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) и эндотелиальной синтазы окиси азота (eNOS)⁴. Важно отметить, что, в отличие от динамической нагрузки, си-

¹ Fitts R.H., Widrick J.J. Muscle mechanics: adaptations with exercise-training // Exercise and sport sciences reviews, edited by Holloszy JO. Williams & Wilkins, 1996. P. 427–473.

² Raue U., Trappe T.A., Estrem S.T. et al. Transcriptomic signature of resistance exercise adaptations: mixed muscle and fiber type specific profiles in young and old adults // J. Appl Physiol. 2012. № 112. P. 1625–1636.

³ Gundersen K. Excitation-transcription coupling in skeletal muscle: the molecular pathways of exercise. Biol Rev. 2011. № 86. P. 564–600; Kapilevich L.V., Kironenko T.A., Zaharova A.N. et al. Skeletal muscle as an endocrine organ: role of $[Na^+]_i/[K^+]_i$ -mediated excitation-transcription coupling. Genes & Diseases. 2015. № 2. P. 328–336.

⁴ Ke Q., Costa M. Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) // Mol Pharmacol. 2006. № 70. P. 1469–1480.

ловые упражнения приводят к окклюзии кровеносных сосудов и локальной гипоксии, сопровождающиеся накоплением VEGF и eNOS mRNA в скелетной мышце крысы¹. Однако роль этого пути в регулировании продукции цитокинов еще не изучена.

Роль АМПК в продукции миокинов, вызванной физической нагрузкой, подтверждается данными, свидетельствующими о том, что выработка IL-15 была снижена у мышей, скелетные мышцы которых лишены $\beta 1$ и $\beta 2$ субъединиц этого фермента². Фосфорилирование АМПК увеличивается в мышцах после езды на велосипеде у спортсменов силовых видов спорта, но подобной реакции не выявлено у спортсменов, тренирующихся на выносливость³. Следует отметить, однако, что экспрессия IL-6 при мышечном сокращении была нормальной у нокаутных мышей, лишенных АМПК $\alpha 2$ гена⁴, свидетельствуя об АМПК-независимом механизме этого явления

Повышение концентрации внутриклеточного кальция от ~ 0,1 до 1 μM при сокращении влияет на экспрессию многих генов, т.е. является важным фактором запуска транскрипционных механизмов⁵. Введение крысам в камбаловидную мышцу Ca^{2+} -ионофора иономицина в течение одного часа приводит к

¹ Rodriguez-Miguelez P., Lima-Cabello E., Martinez-Florez S. et al. Hypoxia-inducible factor-1 modulates the expression of vascular endothelial growth factor and endothelial nitric oxide synthase induced by eccentric exercise // *J. Appl Physiol.* 2015. № 118. P. 1075–1083.

² Crane J.D., MacNeil L.G., Lally J.S. et al. Exercise-stimulated interleukin-15 is controlled by AMPK and regulates skin metabolism and aging // *Aging Cell* in press. 2015. V. 14, № 4. P. 625–634.

³ Coffey V.G., Zhong Z., Shield A. et al. Early signaling responses to divergent exercise stimuli in skeletal muscle from well-trained humans // *FASEB J.* 2006. № 20. P. 190–192.

⁴ Lauritzen H.P., Brandauer J., Schjerling P. et al. Contraction and AICAR stimulate IL-6 vesicle depletion from skeletal muscle fibers in vivo // *Diabetes.* 2013. № 62. P. 3081–3092.

⁵ Gundersen K. Excitation-transcription coupling in skeletal muscle: the molecular pathways of exercise // *Biol Rev.* 2011. № 86. P. 564–600; Ma H., Groth R.D., Wheeler D.G. et al. Excitation-transcription coupling in sympathetic neurons and the molecular mechanism of its initiation // *Neurosci Res.* 2011. № 70. P. 2–8; Santana L.F. NFAT-dependent excitation-transcription coupling in heart // *Circ Res.* 2008. № 103. P. 681–683.

пятикратному увеличению IL-6 mRNA¹. Воздействие на C2C12 миообласты Ca²⁺ ионофором A23187 резко увеличивало транскрипцию IL-6 mRNA². Используя ту же модель упражнений *in vitro*, было показано, что внеклеточный Ca²⁺ хелатор EGTA снижает в два раза накопление CXCL при электрической стимуляции³.

Возбуждение миоцитов сопровождается изменением трансмембранного градиента одновалентных катионов вследствие притока Na⁺ и оттока K⁺ через потенциал-зависимые и Ca²⁺-чувствительные ионные каналы⁴. В мышечных клетках человека и экспериментальных животных длительные упражнения приводят к увеличению [Na⁺]_i в 3–4 раза и снижению [K⁺]_i на 50%, что сопровождается повышением [K⁺]_i в плазме и межклеточной жидкости. Это позволяет предположить, что увеличение соотношения [Na⁺]_i/[K⁺]_i является фактором, стимулирующим продукцию миокинов. В некоторых типах клеток повышение соотношения [Na⁺]_i/[K⁺]_i приводило к экспрессии mRNA ряда цитокинов, в том числе IL-6⁵.

Для оценки относительного вклада Ca²⁺_i опосредованного и Ca²⁺_i-независимого сигнальных путей мы сравнили транскриптомные изменения при увеличении соотношения [Na⁺]_i/[K⁺]_i в клетках гладкой мускулатуры, обедненных кальцием, и обнаружили увеличение количества специфических [Na⁺]_i/[K⁺]_i-чувствительных генов. Среди [Na⁺]_i/[K⁺]_i-чувствительных генов,

¹ Holmes A.G., Watt M.J., Carey A.L., Febbraio M.A. Ionomycin, but not physiological doses of epinephrine, stimulates skeletal muscle interleukin-6 mRNA expression and protein release // *Metabolism*. 2004. № 53. P. 1492–1495.

² Whitham M., Chan M.H.S., Pal M. et al. Contraction-induced interleukin-6 gene transcription in skeletal muscle is regulated by c-Jun terminal kinase/activator protein-1 // *J. Biol Chem*. 2012. № 287. P. 10771–10779.

³ Nedachi T., Hatakeyama H., Kono T. et al. Characterization of contraction-inducibile CXC chemokines and their roles in C2C12 myocytes // *Am J. Physiol Endocrinol Metab*. 2009. № 297. P. E866–E878.

⁴ Murphy K.T., Nielsen O.B., Clausen T. Analysis of exercise-induced Na⁺-K⁺ exchange in rat skeletal muscle // *Exp Physiol*. 2008. № 93. P. 1249–1262.

⁵ Koltsova S.V., Trushina Y., Haloui M. et al. Ubiquitous [Na⁺]_i/[K⁺]_i-sensitive transcriptome in mammalian cells: evidence for [Ca²⁺]_i-independent excitation-transcription coupling // *PLoS One*. 2012. № 7. e38032.

активируемых независимо от наличия хелатов Ca^{2+} , был обнаружен ген миокина IL-6. Недавно также было выявлено, что внеклеточные хелаты Ca^{2+} значительно увеличивают проницаемость мембраны для одновалентных ионов, что приводит к повышению $[\text{Na}^+]_i/[\text{K}^+]_i$ соотношения¹. Мы также показали, что в клетках гладких мышц сосудов гипоксия-индуцированные транскриптомные изменения по меньшей мере частично вызваны HIF-1 α -независимыми, $[\text{Na}^+]_i/[\text{K}^+]_i$ -опосредованными, транскрипционными связями².

Подводя итог сказанному, следует отметить, что спектр вырабатываемых миокинов зависит от характера нагрузок и уровня тренированности. Динамические и статические упражнения по-разному влияют на содержание миокинов в плазме крови спортсменов и нетренированных лиц. Физическая нагрузка циклического характера приводит к увеличению содержания IL-6 и IL-8 в плазме у спортсменов, нагрузка статического характера – к увеличению концентрации IL-15 и LIF. В то же время в контрольной группе не регистрировалось увеличение содержания IL-8 после циклической нагрузки и IL-15 – после статической нагрузки.

Обнаруженные различия могут иметь в своей основе целый ряд механизмов. Клеточный состав скелетных мышц и фенотипические особенности мышечных волокон, изменяясь в результате регулярных тренировок, могут модифицировать процессы продукции миокинов.

Однако гораздо большее значение играют особенности транскрипционных механизмов в мышечных волокнах, среди которых наиболее значимыми являются HIF-1 α , $[\text{Ca}^{2+}]_i$, $[\text{Na}^+]_i/[\text{K}^+]_i$ -зависимые пути внутриклеточной сигнализации. Модификация этих механизмов под влиянием физических нагрузок различного характера и интенсивности представляет

¹ Koltsova S.V., Tremblay J., Hamet P., Orlov S.N. Transcriptomic changes in Ca^{2+} -depleted cells: role of elevated intracellular $[\text{Na}^+]/[\text{K}^+]$ ratio // Cell Calcium. 2015. № 58. P. 317–324.

² Koltsova S.V., Shilov B., Burulina J.G. et. al. Transcriptomic changes triggered by hypoxia: evidence for HIF-1 α -independent, $[\text{Na}^+]_i/[\text{K}^+]_i$ -mediated excitation-transcription coupling // PLoS One. 2014. № 9. e110597.

значительный интерес, так как является перспективным путем воздействия на процессы метаболизма как на клеточном, так и на системном уровне.

Последнее обстоятельство представляется весьма актуальным как для повышения спортивных результатов, так и для коррекции метаболических расстройств при целом ряде социально-значимых заболеваний, рассмотренных выше.

Глава 3. СОДЕРЖАНИЕ МИОКИНОВ В ПЛАЗМЕ КРОВИ ПОСЛЕ ФИЗИЧЕСКИХ НАГРУЗОК РАЗЛИЧНОГО ХАРАКТЕРА У ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ

3.1. Дизайн и методы исследования

В качестве экспериментальных животных использовались половозрелые (8–12-недельные) мыши-самцы линии C57Bl/6 весом 25–30 г. Для проведения исследования были сформированы группы для острого и хронического эксперимента (рис. 10).

В остром эксперименте мыши контрольной группы ($n = 5$) не подвергались физической нагрузке, мыши экспериментальной группы ($n = 60$) подвергались воздействию физической нагрузки – плавание с отягощениями 5; 7,5 и 10% от массы тела (рис. 11). Время плавания с 5-процентным грузом от массы тела составляло 60 мин, с 7,5-процентным грузом – 20 мин, и с 10-процентным – 10 мин. В хроническом эксперименте все мыши подвергались регулярной физической нагрузке (тренировке) в виде плавания в течение 4 недель по 1 часу в день без отягощения. После этого мыши делились на две группы – контрольную ($n = 5$) и экспериментальную ($n = 60$). Исследование выполнялось по той же схеме (рис. 11), что и в первом (остром) эксперименте.

Умерщвление животных (методом декапитации) производилась сразу после нагрузки и в различные сроки после ее завершения – 1, 5 и 24 часа. Кровь собиралась непосредственно после декапитации в пробирки с гепарином (20 ед./мл). Центрифугирование образцов проводилось сразу после забора крови в течение 11 мин при 2 000 об./мин. Плазма хранилась в замороженном виде при температуре -80° .

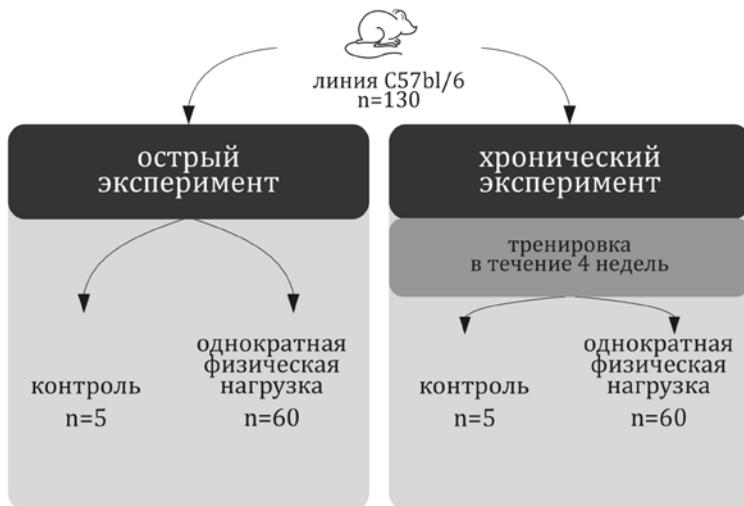
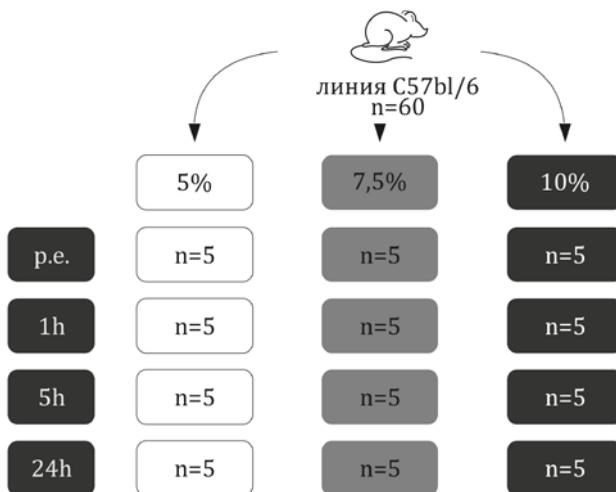


Рис. 10. Дизайн острого и хронического эксперимента



p.e. - сразу после физической нагрузки
 1 h (5h, 24h) - через 1 час (5 часов, 24 часа) после физической нагрузки

Рис. 11. Распределение животных внутри экспериментальных групп

Определение концентрации интерлейкинов в плазме крови мышей проводилось при помощи иммуноферментного метода (набор Platinum ELISA eBioscience, Австрия) и Cloud-Clone Corp. (USA)). Измерение оптической плотности выполнялось на микропланшетном фотометре при длине волны 450 нм.

3.2. Влияние динамической нагрузки на содержание миокинов в плазме крови у мышей

Нами было показано, что концентрация IL-6 увеличивается в плазме крови у мышей после нагрузки с утяжелением в 5% от массы тела через 5 часов ($47,03 \pm 4,51$ пг/мл, $p < 0,05$) и сохраняется выше исходных значений через 24 часа ($40,25 \pm 6,45$ пг/мл, $p < 0,05$). Из полученных результатов видно, что максимальная концентрация IL-6 в плазме крови у мышей достигается через 5 часов после однократной нагрузки (рис. 12). Наибольших значений концентрация данного миокина достигает после плавания с утяжелением в 10% от массы тела ($56,15 \pm 6,37$ пг/мл, $p < 0,05$).

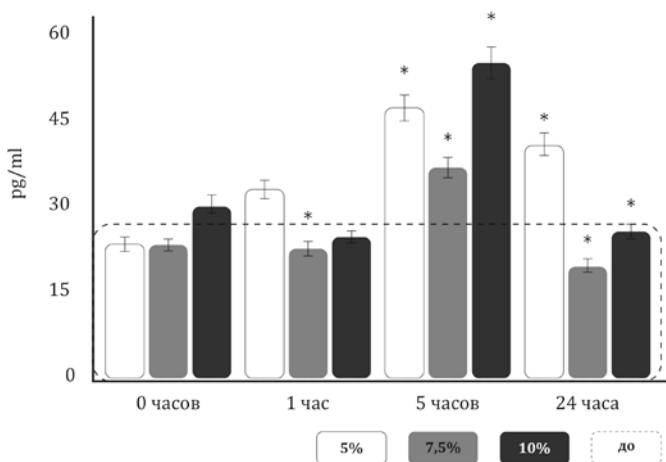


Рис. 12. Динамика концентрации IL-6 в плазме у нетренированных мышей после однократной динамической нагрузки с учетом утяжеления; * – достоверность различий с контролем, $p < 0,05$; пунктирная линия – концентрация цитокина у животных до выполнения нагрузки

Результаты изменения концентрации ИЛ-15 в плазме крови представлены на рис. 13. Значительные изменения наблюдались сразу после 60 минут плавания с 5-процентным грузом относительно исходных значений ($29,11 \pm 8,17$ пг/мл; $p < 0,05$). Увеличение процента утяжеления приводило к снижению концентрации данного цитокина. Интересно отметить, что через 24 часа после нагрузки концентрация ИЛ-15 снижалась по сравнению с исходным уровнем ($5,40 \pm 2,01$ пг/мл; $p < 0,05$).

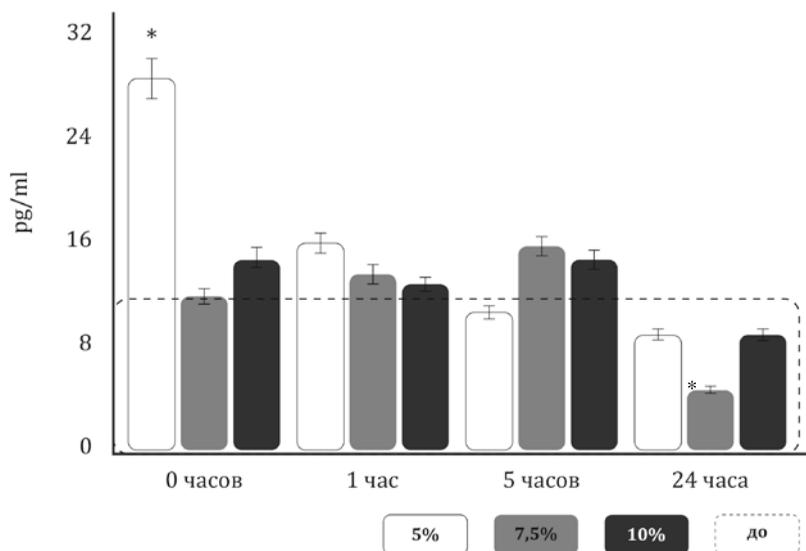


Рис. 13. Динамика концентрации ИЛ-15 в плазме у нетренированных мышей после однократной динамической нагрузки с учетом утяжеления; * – достоверность различий с контролем, $p < 0,05$; пунктирная линия – концентрация цитокина у животных до выполнения нагрузки

Однократная нагрузка различной интенсивности не влияла на концентрацию ИЛ-8 (рис. 14). Возможно, изменения данного цитокина носят только локальный характер и не фиксируются в системном кровотоке.

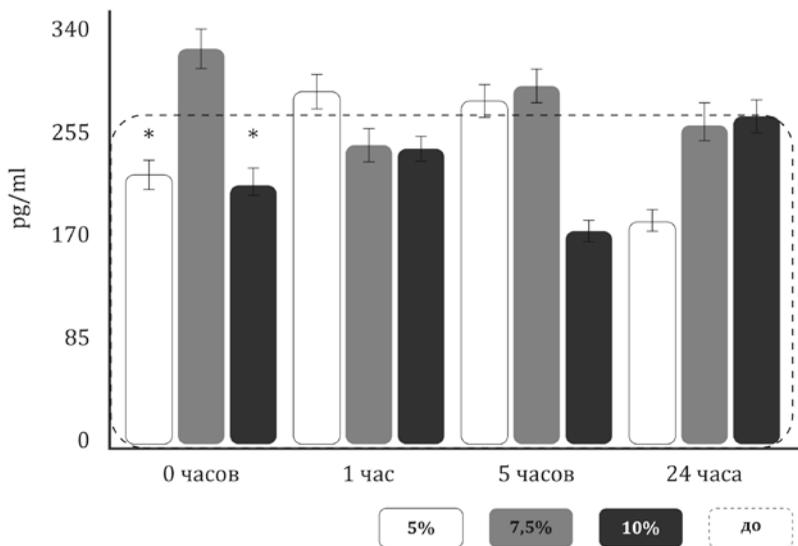


Рис. 14. Динамика концентрации IL-8 в плазме у нетренированных мышей после однократной динамической нагрузки с учетом утяжеления; пунктирная линия – концентрация цитокина у животных до выполнения нагрузки

Ежедневные тренировки в течение 4 недель (в виде плавания по 1 часу в день) повлияли на уровень IL-6 в плазме крови у мышей (табл. 3).

Фоновая концентрация указанного цитокина (до нагрузки) снизилась почти вдвое. В то же время сразу после нагрузки отмечалось увеличение концентрации в сравнении с острым экспериментом (рис. 6).

Максимальный прирост наблюдался через 5 часов после нагрузки с 10-процентным утяжелением ($95,23 \pm 6,07$ пг/мл; $p < 0,05$). Очевидно, что тренировка существенно потенцирует способность мышц к продукции IL-6 при физических нагрузках.

Концентрация IL-15 в сыворотке у тренированных мышей была снижена на 30% по сравнению с контролем (табл. 3). Динамика содержания IL-15 в плазме крови у тренированных мышей после нагрузки представлена на рис. 7.

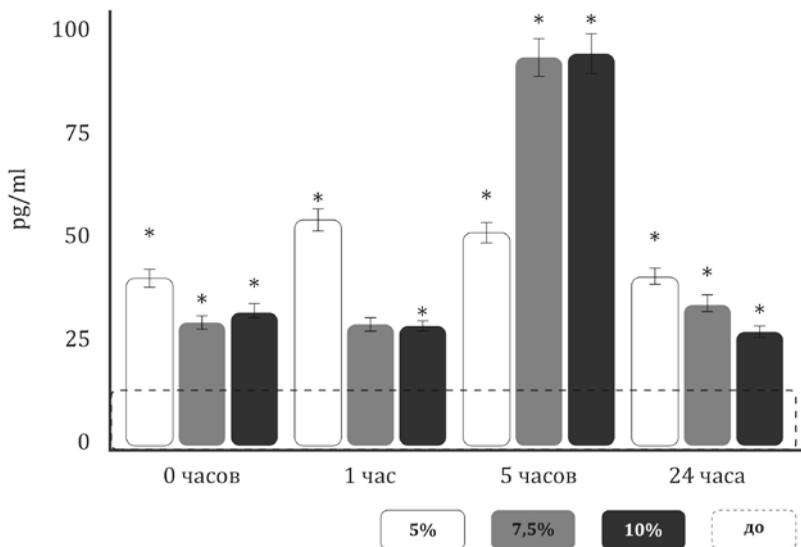


Рис. 15. Динамика концентрации IL-6 в плазме у тренированных мышей после однократной динамической нагрузки с учетом утяжеления; * – достоверность различий с контролем, $p < 0,05$; пунктирная линия – концентрация цитокина у животных до выполнения нагрузки

Уровень IL-15 увеличился примерно в 3 раза сразу после нагрузки для всех утяжелений ($24,29 \pm 4,68$, $25,91 \pm 5,35$, $24,43 \pm 5,27$ пг/мл; $p < 0,05$). При утяжелении 5 и 7,5% концентрация IL-15 остается повышенной до 24 после нагрузки, в отличие от острого эксперимента, где через сутки концентрация данного цитокина снижалась в сравнении с контролем. При утяжелении в 10% концентрация IL-15 уже к 5 ч снижается до исходных значений. Очевидно, что тренировка потенцирует и пролонгирует продукцию IL-15 при физической нагрузке динамического характера (рис. 15а).

Результаты изменения уровня IL-8 в плазме крови у тренированных мышей представлены в табл. 3. После 4-недельных тренировок концентрация указанного цитокина выросла в полтора раза.

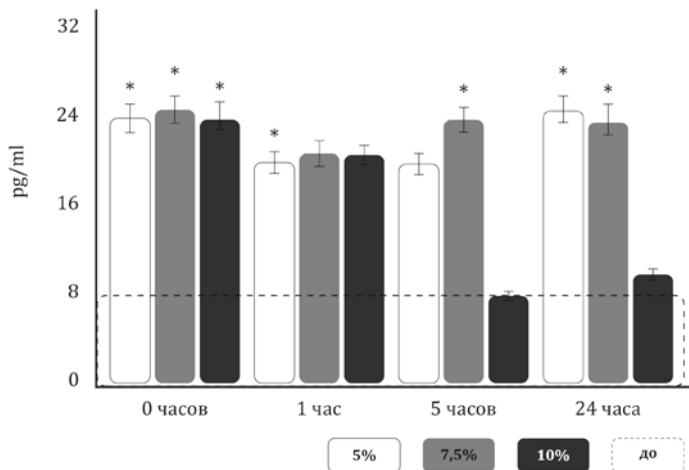


Рис. 15а. Динамика концентрации IL-15 в плазме у тренированных мышей после однократной динамической нагрузки с учетом утяжеления; * – достоверность различий с контролем, $p < 0,05$; пунктирная линия – концентрация цитокина у животных до выполнения нагрузки

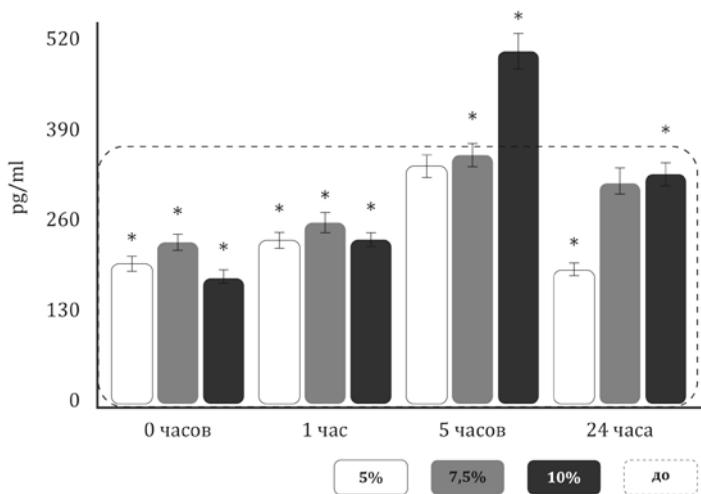


Рис. 16. Динамика концентрации IL-8 в плазме у тренированных мышей после однократной динамической нагрузки с учетом утяжеления; * – достоверность различий с контролем, $p < 0,05$; пунктирная линия – концентрация цитокина у животных до выполнения нагрузки

Как видно из данных, представленных на рис. 16, сразу после нагрузки наблюдается снижение концентрации IL-8 в плазме у тренированных мышей, которое сохраняется в течение 24 часов и не зависит от интенсивности физических нагрузок.

В то же время в подгруппе с максимальным (10% от массы тела) утяжелением отмечается существенное возрастание концентрации IL-8 через 5 часов после нагрузки ($519,33 \pm 52,75$; $p < 0,05$). Можно предполагать, что именно данная реакция является отражением продукции IL-8 скелетными мышцами.

3.3. Влияние статической нагрузки на содержание миокинов в плазме крови у мышей

В качестве статической нагрузки для мышей мы применяли вис на перекладине (сетке). Время нахождения на перекладине с утяжелениями 5; 7,5 и 10% от массы тела животного определялось выносливостью мыши, но после третьего падения мышь умерщвлялась (примерное время вися на перекладине с 5-процентным грузом составляло до 40 мин, с 7,5-процентным – 15–20 мин, с 10-процентным – до 10 мин). Формирование групп проводилось аналогично тому, как это делалось в экспериментах с динамической нагрузкой (рис. 10–11).

Концентрация IL-6 увеличивалась после нагрузки сразу, причем уровень возрастания концентрации цитокина был пропорционален степени утяжеления. Тот же эффект сохранялся в течение часа после выполнения статической нагрузки. Через сутки концентрация IL-6 возвращалась к исходному уровню (рис. 17) и даже несколько снижалась по сравнению с ним в подгруппе с утяжелением 7,5% от массы тела. Таким образом, продукция указанного цитокина при статической нагрузке стимулируется в большей степени и в более ранние сроки. Степень увеличения концентрации пропорциональна интенсивности нагрузок. Все эти факты свидетельствуют, что именно сократительная активность мышц является пусковым фактором продукции IL-6.

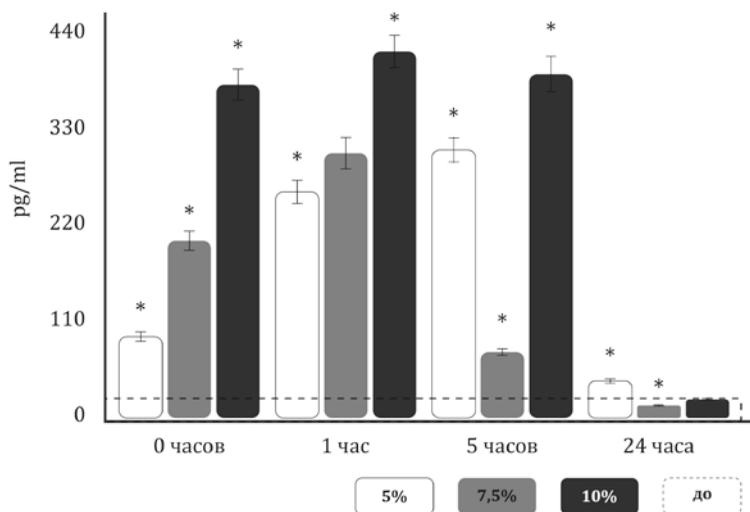


Рис. 17. Динамика концентрации IL-6 в плазме у нетренированных мышей после однократной статической нагрузки с учетом утяжеления; * – достоверность различий с контролем, $p < 0,05$; пунктирная линия – концентрация цитокина у животных до выполнения нагрузки

По полученным результатам статическая нагрузка не оказала сильного влияния на уровень IL-15 (рис. 18). Двукратный прирост концентрации указанного цитокина регистрировался через 1 час после нагрузки и был обратно пропорционален степени утяжеления. Затем концентрация IL-15 возвращалась к исходному уровню во всех трех подгруппах, и даже несколько снижалась. Можно предполагать, что интенсивность продукции данного цитокина связана в большей степени не с интенсивностью, а с длительностью сократительной активности скелетных мышц (максимальную длительность мы отмечаем именно при минимальном утяжелении).

Снижение концентрации IL-8 (рис. 19) наблюдалось в подгруппе с утяжелением 7,5% через 5 часов после нагрузки, а в подгруппе с утяжелением 10% – уже через 1 час после нагрузки. Сниженный уровень концентрации IL-8 сохранялся в обеих указанных подгруппах в течение 24 часов.

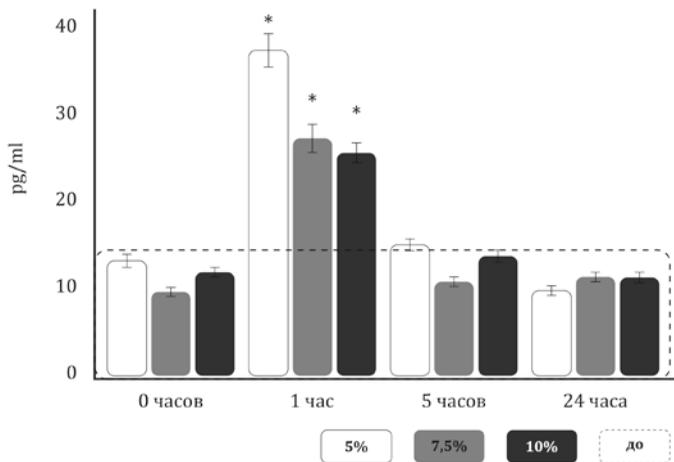


Рис. 18. Динамика концентрации IL-15 в плазме у нетренированных мышей после однократной статической нагрузки с учетом утяжеления; * – достоверность различий с контролем, $p < 0,05$; пунктирная линия – концентрация цитокина у животных до выполнения нагрузки

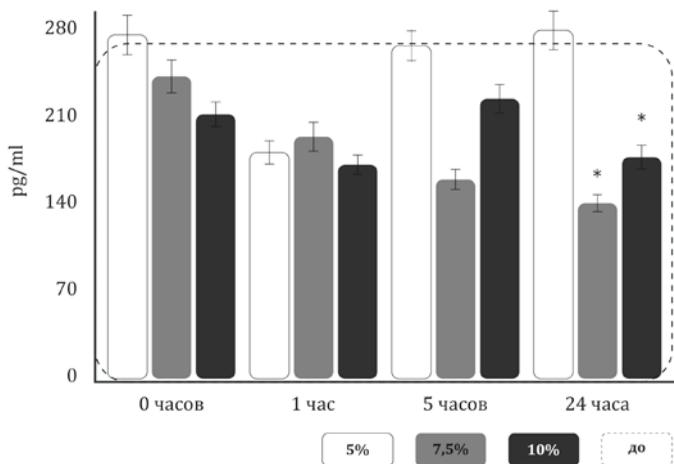


Рис. 19. Динамика концентрации IL-8 в плазме у нетренированных мышей после однократной статической нагрузки с учетом утяжеления; * – достоверность различий с контролем, $p < 0,05$; пунктирная линия – концентрация цитокина у животных до выполнения нагрузки

В подгруппе с утяжелением 5% от массы тела концентрация ИЛ-8 после физической нагрузки не изменялась. Очевидно, что в отличие от нагрузок динамического характера статическая нагрузка оказывает выраженное влияние на продукцию ИЛ-8.

Ежедневные тренировки статического характера в течение 4 недель (вис на перекладине по 40 мин в день) привели к снижению фоновой (до нагрузки) концентрации ИЛ-6 в плазме крови мышей в два раза (табл. 3). В то же время несколько изменился характер динамики концентрации указанного цитокина после физической нагрузки (рис. 20).

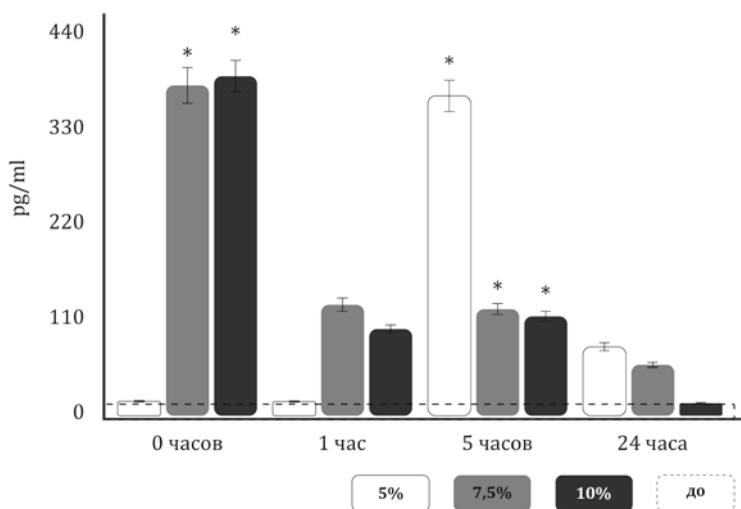


Рис. 20. Динамика концентрации ИЛ-6 в плазме у тренированных мышей после однократной статической нагрузки с учетом утяжеления; * – достоверность различий с контролем, $p < 0,05$; пунктирная линия – концентрация цитокина у животных до выполнения нагрузки

Сразу после нагрузки концентрация ИЛ-6 значительно (двадцатикратно) увеличивалась в группе с 7,5- и 10-процентным утяжелением ($385,01 \pm 17,52$, $395,42 \pm 21,43$ пг/мл; $p < 0,05$), в группе с 5-процентным утяжелением максимальный прирост концентрации отмечался через 5 часов после нагрузки ($374,57 \pm 28,35$; $p < 0,05$). Таким образом, реакция со стороны ИЛ-6

на нагрузку статического характера у тренированных мышей выражена в большей степени, чем у не тренированных. Через 24 часа после нагрузки наблюдалось значительное снижение концентрации указанного цитокина, в подгруппе с 10-процентным утяжелением она снижалась до исходных значений.

Четырехнедельные тренировки статического характера не повлияли на фоновую (до нагрузки) концентрацию ИЛ-15 в плазме крови у мышей (табл. 4). Во всех подгруппах отмечен прирост концентрации ИЛ-15 сразу после нагрузки, который достигал максимума через 24 часа. В подгруппе с утяжелением 10% от массы тела прирост был максимальным. Очевидно, что у тренированных мышей влияние физической нагрузки на продукцию ИЛ-15 выражено в большей степени в сравнении с не тренированными животными.

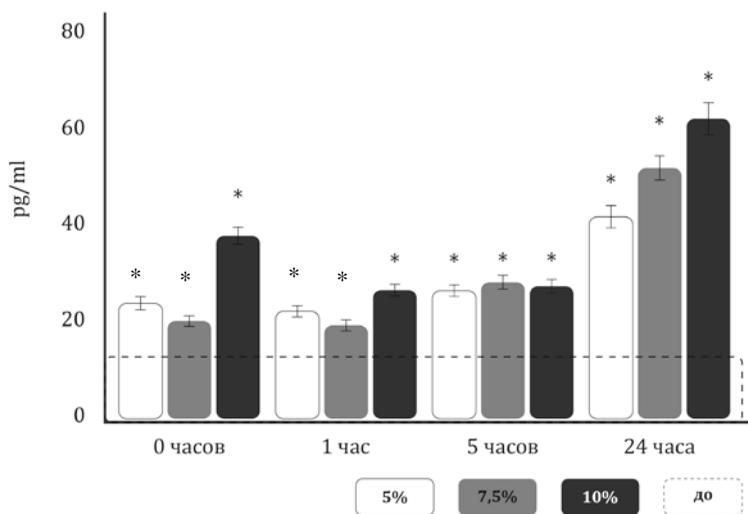


Рис. 21. Динамика концентрации ИЛ-15 в плазме у тренированных мышей после однократной статической нагрузки с учетом утяжеления; * – достоверность различий с контролем, $p < 0,05$; пунктирная линия – концентрация цитокина у животных до выполнения нагрузки

После 4-недельных тренировок статического характера фоновая концентрация ИЛ-8 (до нагрузки) в плазме крови у мышей снизилась на 35% по сравнению с нетренированными животными. В отличие от подгруппы нетренированных животных в данном случае мы наблюдали выраженный прирост уровня ИЛ-8 в плазме крови (рис. 22) через 5 часов после нагрузки, а в подгруппе с 10% утяжелением – уже через 1 час после нагрузки ($429,25 \pm 29,25$).

В целом можно отметить, что, во-первых, нагрузки статического характера в большей степени стимулируют продукцию миокинов скелетными мышцами, чем динамические. Во-вторых, ежедневные тренировки в течение четырех недель, как динамического, так и статического характера, существенно изменяют характер продукции миокинов в ответ на однократную физическую нагрузку.

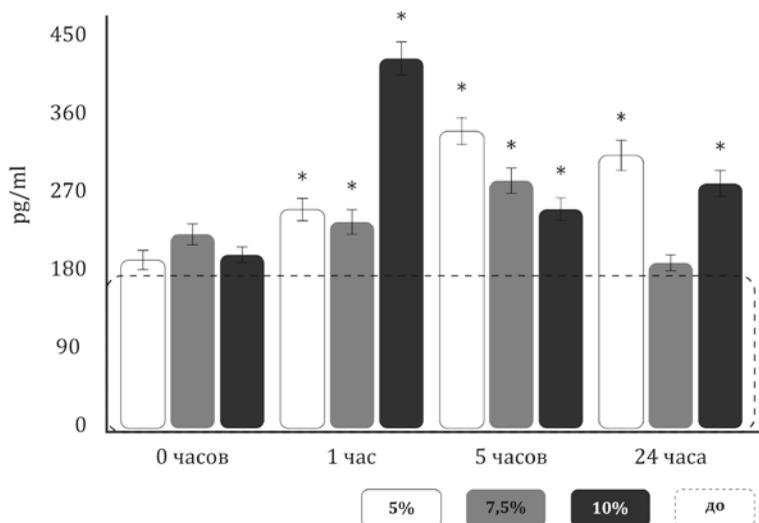


Рис. 22. Динамика концентрации ИЛ-8 в плазме у тренированных мышей после однократной статической нагрузки с учетом утяжеления; * – достоверность различий с контролем, $p < 0,05$; пунктирная линия – концентрация цитокина у животных до выполнения нагрузки

Таблица 3

**Концентрация интерлейкинов в плазме крови мышей
после динамической нагрузки**

		IL-6 (X±m, пг/мл)					
		Острый			Хронический		
		5%	7,5%	10%	5%	7,5%	10%
Контроль			28,32±4,85			15,72±4,04	
0 мин					40,25±4,28		
после	24,36±2,61	24,07±3,61	31,16±4,22	p ₁ <0,05	30,35±3,76	34,46±5,31	p ₁ <0,05
нагрузки				p ₂ <0,05	p ₁ <0,05		
1 час					55,24±3,54	29,8±3,81	29,63±5,20
после	33,02±3,36	23,02±3,24	25,38±2,81	p ₁ <0,05	29,8±3,81	29,63±5,20	p ₁ <0,05
нагрузки		p ₁ <0,05		p ₂ <0,05	p ₂ <0,05		p ₂ <0,05
5 часов					93,47±7,73	95,23±6,07	
после	47,03±4,51	37,38±5,65	56,15±6,37	p ₁ <0,05	93,47±7,73	95,23±6,07	p ₁ <0,05
нагрузки	p ₁ <0,05	p ₁ <0,05	p ₁ <0,05	p ₁ <0,05	p ₂ <0,05	p ₂ <0,05	p ₂ <0,05
24 часа					35,27±5,15	28,06±3,72	
после	40,25±6,45	20,07±2,51	25,41±4,32	40,35±4,72	35,27±5,15	28,06±3,72	p ₁ <0,05
нагрузки	p ₁ <0,05	p ₁ <0,05	p ₁ <0,05	p ₁ <0,05	p ₂ <0,05	p ₂ <0,05	p ₁ <0,05
		IL-15 (X±m, пг/мл)					
Контроль			12,39±4,36			8,52±2,31	
0 мин					24,29±4,68	25,91±5,35	24,43±5,27
после	29,11±8,17	12,84±3,75	15,82±1,95	p ₁ <0,05	24,29±4,68	25,91±5,35	24,43±5,27
нагрузки	p ₁ <0,05			p ₂ <0,05	p ₁ <0,05	p ₂ <0,05	p ₂ <0,05
1 час					20,94±1,94	22,18±2,06	22,06±2,08
после	16,56±3,04	14,84±3,11	13,15±3,32	p ₁ <0,05	20,94±1,94	22,18±2,06	22,06±2,08
нагрузки				p ₂ <0,05	p ₂ <0,05	p ₂ <0,05	p ₂ <0,05
5 часов					24,19±2,14	8,46±2,72	
после	11,39±4,40	16,02±3,40	15,19±4,10	20,13±2,22	24,19±2,14	8,46±2,72	p ₂ <0,05
нагрузки					p ₁ <0,05		
24 часа					25,39±4,11	24,02±4,26	
после	9,30±2,41	5,40±2,01	9,15±3,31	25,39±4,11	25,39±4,11	24,02±4,26	10,60±3,01
нагрузки		p ₁ <0,05		p ₁ <0,05	p ₁ <0,05	p ₂ <0,05	p ₂ <0,05
		IL-8 (X±m, пг/мл)					
Контроль			274,62±84,12			382,5±44,58	
0 мин					218,52±	231,80±	186,96±
после	221,82±	331,18±	217,02±	218,52±	231,80±	186,96±	
нагрузки	17,22	39,3	25,68	21,9	37,46	11,58	
	p ₁ <0,05		p ₁ <0,05				
1 час					246,48±	266,82±	241,92±
после	291,60±	254,28±	253,2±	246,48±	266,82±	241,92±	
нагрузки	35,58	31,02	19,68	33,92	43,18	21,63	
				p ₁ <0,05	p ₁ <0,05		p ₁ <0,05
5 часов					373,9±59,62	519,33±	52,75
после	280,16±	298,44±	180,96±	344,64±	373,9±59,62	519,33±	52,75
нагрузки	19,5	14,7	29,28	41,60	p ₂ <0,05		p ₁ <0,05
							p ₂ <0,05

24 часа	187,20±	265,56±	273,36±	196,5±	324,72±35,5	331,02±
после	45,98	44,40	30,6	41,36	8	28,92
нагрузки				p ₁ <0,05		p ₁ <0,05

Примечание. p₁ – достоверность различий соответствующего показателя с контролем; p₂ – достоверность различий между тренированными и нетренированными животными.

Т а б л и ц а 4

**Концентрация интерлейкинов в плазме крови мышей
после статической нагрузки**

IL-6 (X±m, пг/мл)						
	Острый			Хронический		
	5%	7,5%	10%	5%	7,5%	10%
Контроль	25,82±6,86			12,58±4,33		
0 мин после нагрузки	102,87± 20,56 p ₁ <0,05	215,76± 37,58 p ₁ <0,05	385,76± 44,63 p ₁ <0,05	16,78±5,18 p ₂ <0,05	385,01±17,52 p ₁ <0,05 p ₂ <0,05	395,42± 21,43 p ₁ <0,05 p ₂ <0,05
1 час после нагрузки	286,73± 32,85 p ₁ <0,05	302,78± 25,16 p ₁ <0,05	425,73± 28,34 p ₁ <0,05	13,72±2,3 p ₂ <0,05	131,11±25,74	104,58± 16,53
5 часов после нагрузки	302,78± 63,5 p ₁ <0,05	75,18± 25,04 p ₁ <0,05	405,15± 36,27 p ₁ <0,05	374,57± 28,35 p ₁ <0,05	128,86±38,95 p ₁ <0,05	118,2± 17,28 p ₁ <0,05 p ₂ <0,05
24 часа после нагрузки	45,18± 15,03 p ₁ <0,05	10,86±5,18 p ₁ <0,05	24,31±2,84	85,05± 33,76	65,75±28,34 p ₂ <0,05	13,31±7,5 p ₂ <0,05
IL-15 (X±m, пг/мл)						
Контроль	15,77±3,28			14,27±3,62		
0 мин после нагрузки	14,46±3,65	10,04±4,88	12,59±2,17	24,4±6,55 p ₁ <0,05 p ₂ <0,05	21,36±9,10 p ₁ <0,05 p ₂ <0,05	39,22± 22,73 p ₁ <0,05 p ₂ <0,05
1 час после нагрузки	38,82±4,56 p ₁ <0,05	28,76±3,89 p ₁ <0,05	26,19±3,44 p ₁ <0,05	23,53±4,05 p ₁ <0,05 p ₂ <0,05	20,09±3,15 p ₁ <0,05	27,94±5,66 p ₁ <0,05
5 часов после нагрузки	15,34±2,03	11,78±2,08	14,18±3,18	27,23±6,59 p ₁ <0,05 p ₂ <0,05	29,76±4,23 p ₁ <0,05 p ₂ <0,05	28,02±4,39 p ₁ <0,05 p ₂ <0,05
24 часа после нагрузки	10,85±4,17	12,54±4,01	12,16±2,25	43,82±3,75 p ₁ <0,05 p ₂ <0,05	53,61±3,96 p ₁ <0,05 p ₂ <0,05	63,58±5,69 p ₁ <0,05 p ₂ <0,05

Ц-8 ($X \pm m$, пг/мл)						
Контроль	276,1 \pm 25,56			181,62 \pm 23,64		
0 мин после нагрузки	280,25 \pm 28,21	243,25 \pm 24,5	217,75 \pm 17,15	194,91 \pm 32,65	234,75 \pm 28,16	198,37 \pm 18,25
1 час после нагрузки	186,25 \pm 31,81	193,5 \pm 25,85	176,25 \pm 34,28 $p_1 < 0,05$	263,5 \pm 25,25 $p_1 < 0,05$ $p_2 < 0,05$	237,75 \pm 25,08 $p_1 < 0,05$ $p_2 < 0,05$	429,25 \pm 29,25 $p_1 < 0,05$ $p_2 < 0,05$
5 часов после нагрузки	273,25 \pm 17,59	163,54 \pm 20,33 $p_1 < 0,05$	226,0 \pm 30,19 $p_1 < 0,05$	350,41 \pm 30,15 $p_1 < 0,05$	287,25 \pm 15,29 $p_1 < 0,05$ $p_2 < 0,05$	263,91 \pm 23,45 $p_1 < 0,05$
24 часа после нагрузки	281,5 \pm 20,47	147,75 \pm 18,29 $p_1 < 0,05$	188,75 \pm 15,73 $p_1 < 0,05$	317,5 \pm 25,03 $p_1 < 0,05$	205,5 \pm 26,99 $p_2 < 0,05$	287,25 \pm 19,88 $p_1 < 0,05$ $p_2 < 0,05$

Примечание. p_1 – достоверность различий соответствующего показателя с контролем; p_2 – достоверность различий между тренированными и нетренированными животными.

Глава 4. ДИССИПАЦИЯ ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКИХ ГРАДИЕНТОВ ОДНОВАЛЕНТНЫХ КАТИОНОВ КАК ФАКТОР РЕГУЛЯЦИИ ПРОДУКЦИИ МИОКИНОВ В КУЛЬТУРЕ МИОБЛАСТОВ C2C12

4.1. Физическая нагрузка как фактор диссипации ионных градиентов

Длительное возбуждение скелетных мышц приводит к диссипации трансмембранного градиента одновалентных катионов за счет притока Na^+ через потенциал-зависимые натриевые каналы (Nav), что в свою очередь приводит к деполяризации и выходу K^+ через потенциал зависимые K^+ -каналы (Kv) и Ca^{2+} -активируемые K^+ -каналы (K_{Ca}) (рис. 23)¹.

В экспериментах было показано, что как у человека, так и у экспериментальных животных интенсивные физические упражнения способствуют увеличению $[\text{Na}^+]_i$ в 3–4 раза и уменьшению $[\text{K}^+]_i$ до 50% в скелетных мышцах за счет активации ионных каналов, а также путем частичной инактивации Na^+ , K^+ -АТФазы. Было также продемонстрировано, что выход K^+ из мышечных клеток во время упражнений приводит к повышению $[\text{K}^+]$ в интерстициальной жидкости скелетных мышц от 4 до 5 до 11–15 мМ. У людей интенсивные динамические и статические упражнения приводят к 2-кратному повышению уровня $[\text{K}^+]$ в венозной крови из-за его выхода из скелетных мышц, т.е. основного источника внутриклеточного K^{+2} .

¹ Jurkat-Rott K., Fauler M., Lehmann-Horn F. Ion channels and ion transporters of the transverse tubular system of skeletal muscle // *J Muscle Res Cell Motil.* 2006. V. 27. P. 275–290.

² Sejersted O.M., Sjogaard G. Dynamics and consequences of potassium shifts in skeletal muscle and heart during exercise // *Physiol Rev.* 2000. V. 80. P. 1411–1481; McDonough A.A., Thompson C.B., Youn J.H. Skeletal muscle regulates extracellular potassium // *Am J Physiol Ren Physiol.* 2002. V. 282. P. F967–F974; McKenna M.J., Bangsbo J., Renaud J.M. Muscle K^+ , Na^+ , and Cl^- disturbances and Na^+ - K^+ - ATPase pump inactivation: implications for fatigue // *J. Appl Phys.* 2008. V. 104. P. 288–295; Murphy K.T.,

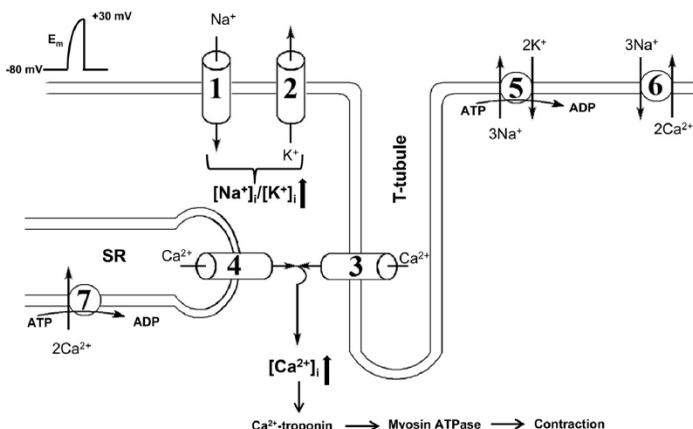


Рис. 23. Основные транспортеры ионов, участвующие в сопряжении возбуждения и сокращения в скелетных мышцах: 1 – потенциал-зависимые Na^+ -каналы; 2 – K^+ -каналы; 3 – потенциал-зависимые Ca^{2+} -канала L-типа; 4 – канала выхода Ca^{2+} из саркоплазматического ретикулума (SR); 5 – Na^+/K^+ -АТФаза, 6 – $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обменник; 7 – Ca^{2+} -АТФаза; E_m – электрический мембранный потенциал¹

Рассмотренные выше результаты позволяют нам предположить, что повышение $[\text{Na}^+]_i/[\text{K}^+]_i$ само по себе достаточно для запуска продукции миокинов. В этой связи можно сформулировать три взаимосвязанных вопроса.

Влияют ли моновалентные ионы на транскрипцию миокинов?

Используя технологию Affymetrix, мы обнаружили 60-кратное изменение уровня экспрессии 684, 737 и 1 839 транскриптов в эндотелиальных клетках HeLa пуповины человека

Nielsen O.B., Clausen T. Analysis of exerciseinduced Na^+/K^+ exchange in rat skeletal muscle // *Exp Physiol.* 2008. V. 93. P. 1249–1262; Cairns S.P., Lindinger M.I. Do multiple ionic interactions contribute to skeletal muscle fatigue? // *J. Physiol.* 2008. V. 586. P. 4039–4054.

¹ Orlov S.N., Koltsova S.V., Kapilevich L.V., Gusakova S.V., Dulin N.O. KCC1 and NKCC2: The pathogenetic role of cation-chloride cotransporters in hypertension // *Genes & Diseases.* 2015. № 2. P. 186–196.

(HUVES) и мышечных клетках гладкой аорты крысы (RASMC). Эти изменения высоко коррелируют с ингибированием Na^+ , K^+ -АТФазы убаином или в безкальциевой среде. Среди этих Na^+/K^+ -чувствительных генов 80 транскриптов были изменены у всех трех типов клеток¹. Важно отметить, что почти половина Na^+ , K^+ -чувствительных транскриптов были представлены по генам быстрого ответа (immediate response genes, IRG) и другим генам, участвующим в регуляции транскрипции / трансляции, что было в 7 раз выше, чем в общем геноме человека.

Во-вторых, мы продемонстрировали, что несколько миокинов, в том числе IL-6, а также простагландин, продуцирующий COX-2, входят в число генов, чья экспрессия значительно возрастает при увеличении $[\text{Na}^+]_i/[\text{K}^+]_i$.

В-третьих, С. Broholm с соавторами на основе анализа биопсии скелетных мышц человека сообщили, что совместно с каноническими миокинами упражнения вызывают глубокое накопление нескольких IRG, в том числе 4-кратное повышение JUNB². Мы отметили, что эти гены также регулируются повышением отношения $[\text{Na}^+]_i/[\text{K}^+]_i$ во всех типах клеток³.

В-четвертых, несколько исследовательских групп выявили, что секреция миокинов сопровождается активацией ERK1/2-, JNK- и NF- κ B-зависимых путей⁴. Эти сигнальные пути также могут быть активированы путем увеличения $[\text{Na}^+]_i/[\text{K}^+]_i$, вызванного ингибированием Na^+ , K^+ -АТФазы⁵.

¹ Koltsova S.V., Trushina Y., Haloui M. et al. Ubiquitous $[\text{Na}^+]_i/[\text{K}^+]_i$ -sensitive transcriptome in mammalian cells: evidence for Ca^{2+} -independent excitation-transcription coupling // PLoS One. 2012. V. 7. e38032.

² Broholm C., Laye M.J., Brandt C. et al. LIF is a contraction-induced myokine stimulating human myocyte proliferation // J. Appl Physiol. 2011. V. 111. P. 251–259.

³ Koltsova S.V., Trushina Y., Haloui M. et al. Ubiquitous $[\text{Na}^+]_i/[\text{K}^+]_i$ -sensitive transcriptome in mammalian cells: evidence for Ca^{2+} -independent excitation-transcription coupling // PLoS One. 2012. V. 7. e38032.

⁴ Scheler M., Irmeler M., Lehr S. et al. Cytokine response of primary human myotubes in an in vitro exercise model // Am J. Physiol Cell Physiol. 2013. V. 305. P. C877–C886; Whitham M., Chan M.H.S., Pal M. et al. Contraction-induced interleukin-6 gene transcription in skeletal muscle is regulated by c-Jun terminal kinase/activator protein-1 // J. Biol Chem. 2012. V. 287. P. 10771–10779.

⁵ Schoner W., Scheiner-Bobis G. Endogenous and exogenous cardiac glycosides: their role in hypertension, salt metabolism, and cell growth // Am J. Physiol Cell Physiol.

В клеточных линиях RASMC и HeLa ингибирование Na^+ , K^+ -АТФазы убаином приводило к экспрессии нескольких IRG, включая 10- и 4-кратное увеличение иммунореактивного c-Fos и c-Jun¹. 4-кратное увеличение мРНК белка c-Fos было обнаружено через 30 мин после добавления убаина. В течение этого времени $[\text{Na}^+]_i$ был увеличен в 5 раз, тогда как $[\text{K}^+]_i$ снизился только на 10–15%. Эти результаты показывают, что увеличение $[\text{Na}^+]_i$ и снижение $[\text{K}^+]_i$ генерирует сигнал, который приводит к экспрессии c-Fos. M. Uddin с соавторами продемонстрировали, что в цитотрофобластах человека секреция IL-6 может быть вызвана убаином и маринобуфагенином², т.е. ингибиторами Na^+ , K^+ -АТФазы, вызывающими различные структурные изменения в его $\alpha 1$ -субъединице.

Эти данные убедительно свидетельствуют о том, что эти кардиотонические стероиды вызывают экспрессию IL-6 путем повышения $[\text{Na}^+]_i/[\text{K}^+]_i$, а не Na^+/K^+ -независимые сигнальные пути.

Влияют ли моновалентные ионы на трансляцию миокинов?

Почти 50 лет назад было продемонстрировано, что синтез белка у прокариот резко ингибируется при отсутствии K^{+3} . Позже необходимость K^+ для синтеза белка была обнаружена в клетках животных различного происхождения⁴. В человеческих фибробластах ингибирование Na^+ , K^+ -АТФазы подавляет транс-

2007. V. 293. P. C509–C536; Akimova O.A., Tverskoi A.M., Smolyaninova L.V. et al. Critical role of the $\alpha 1$ - Na^+ , K^+ -ATPase subunit in insensitivity of rodent cells to cytotoxic action of ouabain // Apoptosis. 2015. V. 20. P. 1200–1210.

¹ Taurin S., Dulin N.O., Pchejetski D. et al. c-Fos expression in ouabain-treated vascular smooth muscle cells from rat aorta: evidence for an intracellular-sodium-mediated, calcium-independent mechanism // J. Physiol. 2002. V. 543. P. 835–847; Haloui M., Taurin S., Akimova O.A. et al. Na_oi-induced c-Fos expression is not mediated by activation of the 50-promoter containing known transcriptional elements // FEBS J. 2007. V. 274. P. 3257–3267.

² Uddin M., Horvat D., Glaser S.S., Mitchell B.M., Puschett J.B. Examination of the cellular mechanisms by which marinobufagenin inhibits cytotblast function // J. Biol Chem. 2008. V. 283. P. 17946–17953.

³ Lubin M., Ennis H.L. On the role of intracellular potassium in protein synthesis // Biochim Biophys Acta. 1964. V. 80. P. 614–631.

⁴ Orlov S.N., Hamet P. Intracellular monovalent ions as second messengers // J. Membr Biol. 2006. V. 210. P. 161–172.

ляцию без какого-либо воздействия на транскрипцию, содержание АТФ и аминокислотный транспорт¹, что указывает на прямое влияние $[K^+]_i$ на синтез белка.

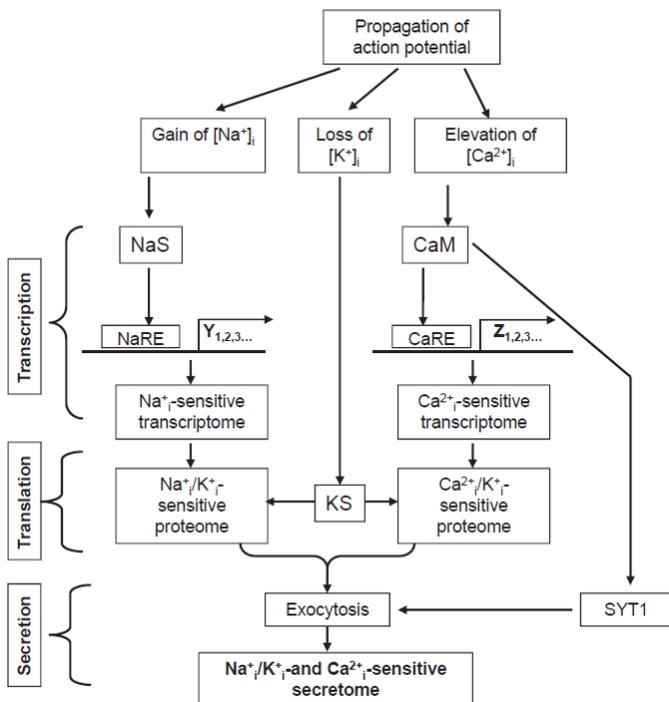


Рис. 24. Ионные механизмы возбуждения-сокращения, возбуждения-транскрипции, возбуждения-трансляции и возбуждения-секреции, участвующие в продукции миокинов скелетными мышцами при сокращении. CaM – кальмодулин и другие внутриклеточные Ca^{2+} -сенсоры; CaRE и Ca^{2+} -чувствительные элементы ответа в промоторах генов; KS и NaS – внутриклеточные сенсоры K^+ и Na^+ соответственно; NaRE и Na^+ -чувствительные элементы ответа в промоторах генов; SYT1 – синаптотагмин ^{1 2}

¹ Ledbetter M.L.S., Lubin M. Control of protein synthesis in human fibroblasts by intracellular potassium // Exp Cell Res. 1977. V. 105. P. 223–236.

² Orlov S.N., Koltsova S.V., Kapilevich L.V., Guskova S.V., Dulin N.O. KCC1 and NKCC2: The pathogenetic role of cation-chloride cotransporters in hypertension // Genes & Diseases. 2015. № 2. P. 186–196.

В ретикулоцитах глобин способствует синтезу более 90% общего белка. В этих клетках было обнаружено, что истощение K^+ подавляет шаг удлинения без какого-либо влияния на сборку субъединиц рибосомы. Активация синтеза глобина ретикулоцитов в среде, содержащей 60, 90 и 125 мМ Na^+ , наблюдается при $[K^+]$ 15, 25 и 40 мМ соответственно. Эти данные свидетельствуют о том, что повышение $[Na^+]_i$ снижает эффективность регуляции синтеза белка через уменьшение взаимодействия K^+ с его гипотетическим сенсором (рис. 24). Как альтернативная гипотеза может быть предложено, что увеличение из $[Na^+]_i$ уменьшает транскрипцию факторов элонгации¹. Эта гипотеза в настоящее время изучается в нашей лаборатории.

Влияют ли моновалентные ионы на секрецию миокинов?

Считается, что секреция миокинов опосредована экзоцитозом². Экзоцитоз состоит из нескольких этапов. Заключительный этап запускается ионами кальция и включает в себя несколько секреторных везикулярных белков, включая чувствительный к Ca^{2+} белок синаптоагмин 1 (SYT1)³. Эти данные свидетельствуют о том, что увеличение $[Ca^{2+}]_i$ при сокращении мышц может повлиять на секрецию миокинов независимо от регуляции их транскрипции и трансляции (рис. 24).

Действительно, используя конфокальный микроскоп и флуоресцентный белок для визуализации внутриклеточных мишеней, Н.Р. Lauritzen с соавторами обнаружили, что сокращение стиму-

¹ Jennings M.D., Pavitt G.D. eIF5 is a dual function GAP and GDI for eukaryotic translational control // Small GTPases. 2010. V. 1. P. 118–123; Cao J., He L., Lin G. et al. Cap-dependent translation initiation factor, eIF4E, is the target for ouabain-mediated inhibition of HIF-1a // Biochem Pharmacol. 2014. V. 89. P. 20–30; Klann E., Dever T.E. Biochemical mechanisms for translation regulation in synaptic plasticity // Nat Rev Neurosci. 2004. V. 5. P. 931–942.

² Gundersen K. Excitation-transcription coupling in skeletal muscle: the molecular pathways of exercise // Biol Rev. 2011. V. 86. P. 564–600.

³ Messenger SW, Falokowski MA, Groblewski GE. Ca^{2+} -regulated secretory granule exocytosis in pancreatic and parotid acinar cells // Cell Calcium. 2014. V. 55. P. 369–375.

лирует высвобождение IL-6 из везикул в мышечных волокнах мышцы *in vivo*¹.

В дополнение к Ca^{2+} , экзоцитоз может регулироваться промежуточными соединениями внутриклеточной передачи сигналов, такими как cAMP, белок ERAC, гуанин-обменные факторы (Rap1-CEF)². Важно, что в гладких мышцах сосудов и эндотелиальных клетках устойчивое ингибирование Na^+ , K^+ -АТФазы влияет на экспрессию многих белков, участвующих в этих сигнальных каскадах.

4.2. Изменение внутриклеточной концентрации натрия и калия как фактор регуляции транскрипции и трансляции: доказательства Ca^{2+} -независимого механизма

4.2.1. Трансмембранный перенос одновалентных катионов и соотношение $[\text{Na}^+]_i/[\text{K}^+]_i$ в безкальциевом растворе

Предыдущие исследования³ показали, что диссипация электрохимических градиентов одновалентных катионов, вызванная ингибированием Na^+ , K^+ -АТФазы, приводит к активации c-FOS и других IRG, а также фактора роста опухоли β , легких цепи миозина, актинскелетных мышц, атриального натрийуретического фактора и морталина. Используя технологию Affymetrix, мы сравнили эффекты ингибиторов Na^+ , K^+ -АТФазы на транскриптомы сосудистых гладкомышечных клеток крысы (RVSMC), эндотелиальных клеток пупочной вены человека (HUVEC) и клеточную линию аденокарциномы человека (клеточная линия HeLa). Мы обнаружили, что устойчивое повыше-

¹ Lauritzen H.P., Brandauer J., Schjerling P. et al. Contraction and AICAR stimulate IL-6 vesicle depletion from skeletal muscle fibers *in vivo* // *Diabetes*. 2013. V. 62. P. 3081–3092.

² Tomes C.N. The proteins of exocytosis: lessons from the sperm model // *Biochem J*. 2015. V. 465. P. 359–370.

³ Taurin S., Hamet P., Orlov S.N., Na/K pump and intracellular monovalent cations: novel mechanism of excitation-transcription coupling involved in inhibition of apoptosis // *Mol. Biol.* 2003. V. 37. P. 315–324; Orlov S.N., Hamet P. Intracellular monovalent ions as second messengers // *J. Membr. Biol.* 2006. V. 210. P. 161–172.

ние внутриклеточного соотношения натрий / калий ($[Na^+]_i/[K^+]_i$) приводит к изменению экспрессии набора генов, специфичных для каждого типа клеток¹. Можно предположить, что это явление вызвано увеличением $[Ca^{2+}]_i$ и активацией Ca^{2+} -чувствительных путей. Чтобы установить, зависят ли изменения экспрессии генов от увеличения $[Ca^{2+}]_i$, мы провели эксперименты в безкальциевых средах, дополненных внеклеточными (EGTA) и внутриклеточными (ВАРТА) хелаторами Ca^{2+} . Однако в этих условиях мы зафиксировали увеличение, а не уменьшение количества как общих, так и специфичных для разных типов клеток Na^+_i/K^+_i -зависимых генов. Эти результаты позволяют предположить, что транскриптомные изменения, вызванные подъемом соотношения $[Na^+]_i/[K^+]_i$, по крайней мере частично опосредованы Ca^{2+} -независимым механизмами.

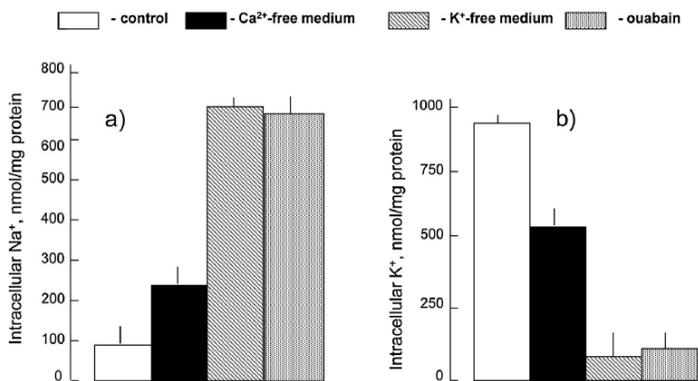


Рис. 25. Внутриклеточное содержание Na^+ и K^+ в VSMC, подвергнутых 3-часовой инкубации в среде, свободной от Ca^{2+} , среде, свободной от K^+ , и при наличии 3 мМ убаина. Среда без Ca^{2+} содержала 50 мкМ EGTA и 10 мкМ ВАРТА-АМ. Представлено как среднее значение \pm стандартное отклонение из 3 независимых экспериментов, проведенных с 4-кратной повторностью²

¹ Koltsova S.V., Trushina Y., Haloui M. et al. Ubiquitous $[Na^+]_i/[K^+]_i$ -sensitive transcriptome in mammalian cells: evidence for Ca^{2+} -independent excitation-transcription coupling // PLoS One. 2012. V. 7. e38032.

² Koltsova S.V., Tremblay J., Hamet P., Orlov S.N. Transcriptomic changes in Ca^{2+} -depleted cells: Role of elevated intracellular $[Na^+]_i/[K^+]_i$ ratio // Cell Calcium. 2015. № 58. P. 317–324.

Полномасштабное ингибирование Na^+ , K^+ -АТФазы путем 3-часовой инкубация RVSMC в безкальциевой среде, привела к повышению $[\text{Na}^+]_i$ и уменьшению $[\text{K}^+]_i$ соответственно в ~ 7 и 10 раз (рис. 25). Такое же повышение соотношения $[\text{Na}^+]_i/[\text{K}^+]_i$ наблюдалось после 3-часового ингибирования Na^+ , K^+ -АТФазы, вызванного добавлением 3 мМ убаина. Мы также обнаружили, что Ca^{2+} -истощение, вызванное добавлением 50 мМ ЭГТА и 10 мМ ВАРТА-АМ к безкальциевой среде, приводило к повышению $[\text{Na}^+]_i$ и уменьшению $[\text{K}^+]_i$; ~ 3 и 2 раза соответственно (рис. 25).

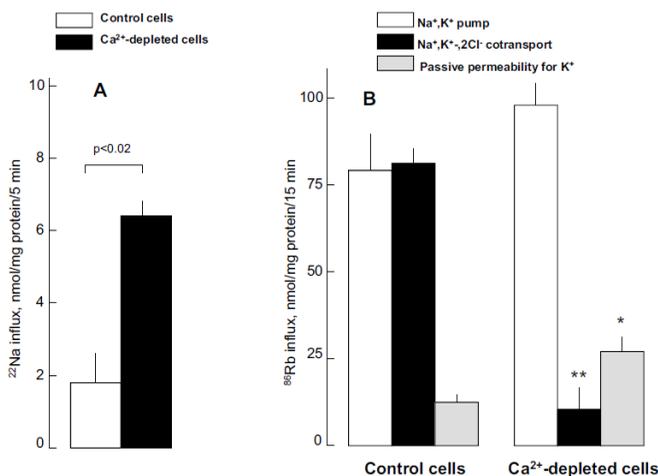


Рис. 26. Скорость притока ^{22}Na (A) и ^{86}Rb (B) в контрольную и Ca^{2+} -обедненную VSMC. Клетки, освобожденные от Ca^{2+} , инкубировали в среде, свободной от Ca^{2+} , содержащей 50 мкМ ЭГТА и 10 мкМ ВАРТА-АМ. Na^+ , K^+ измеряли при ингибировании притока ^{86}Rb 3 мМ убаина; Na^+ , K^+ , 2Cl^- котранспортеры измеряли как устойчивый к убаину приток ^{86}Rb , ингибируемый 10 мМ буметанид; Пассивная проницаемость для K^+ была оценена как (убаин + буметанид)-независимый компонент притока ^{86}Rb . Представлено как среднее значение \pm стандартное отклонение из 3 независимых экспериментов, выполненных с 4 -кратным повторением. *, ** $p < 0,05$ и $0,001$ по сравнению с контрольными клетками¹

¹ Koltsova S.V., Tremblay J., Hamet P., Orlov S.N. Transcriptomic changes in Ca^{2+} -depleted cells: Role of elevated intracellular $[\text{Na}^+]/[\text{K}^+]$ ratio // Cell Calcium. 2015. № 58. P. 317–324.

Как следует из рис. 26, повышение соотношения $[Na^+]_i/[K^+]_i$, зарегистрированное в Ca^{2+} -обедненных клетках, было вызвано повышением проницаемости плазматической мембраны для Na^+ и K^+ .

Действительно, мы отметили ~ 3 -кратный прирост скорости входа ^{22}Na (рис. 26, А) и ~ 2 -кратное повышение проницаемости RVSMC для K^+ , измеренное как скорость притока ^{86}Rb в присутствии ингибиторов Na^+ , K^+ -насоса (уабаин) и Na^+ , K^+ $2Cl^-$ -котранспорта (буметанид) (рис. 26, В).

Небольшой прирост уабаин-чувствительного притока ^{86}Rb , вероятно, опосредован подъемом $[Na^+]_i$ и активацией Na^+ , K^+ -АТФазы. Мы также отметили, что истощение Ca^{2+} привело к почти полному ингибированию Na^+ , K^+ , $2Cl^-$ -котранспорта, измеренного как устойчивая к уабаину, чувствительная к буметаниду компонента скорости притока ^{86}Rb (рис. 26, В). Эти результаты согласуются с предыдущими сообщениями, в которых была показана активация этого обменника внутриклеточным¹ Ca^{2+} и его ингибирование в присутствии ЭГТА².

Для уточнения механизма действия Ca^{2+} -истощения на внутриклеточный обмен моновалентных катионов мы сравнивали действия безкальциевой среды, ЭГТА и ВАРТА на внутриклеточное содержание Na^+ и K^+ и скорость входа Na^+ . В табл. 5 показано, что ни соотношение $[Na^+]_i/[K^+]_i$, ни скорость входа ^{22}Na не изменились после 3-часовой инкубации в среде без Ca^{2+} , не имеющей ЭГТА и ВАРТА-АМ. Оба параметра резко увеличивались после добавления внеклеточного Ca^{2+} -хелатора ЭГТА. В отличие от ЭГТА, внутриклеточный Ca^{2+} -хелатор ВАРТА-АМ не оказывал никакого влияния на базовый вход ^{22}Na и соотношение $[Na^+]_i/[K^+]_i$, а также на их прирост, вызванный ЭГТА. Полученные результаты позволяют заключить, что увеличение проницаемости для одновалентных катионов опосредовано удалением кальция, связанного с внешней поверхностью плазматической мембраны.

¹ Russell J.M. Sodium-potassium-chloride cotransport // *Physiol. Rev.* 2000. V. 80. P. 212-276.

² Orlov S.N., Resink T.J., Bernhardt J., Buhler F.R. Na^+ - K^+ -pump and Na^+ - K^+ -cotransport in cultured vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats: baseline activity and regulation // *J. Hypertens.* 1992. V. 10. P. 733-740.

Таблица 5

Влияние среды, свободной от Ca^{2+} , EGTA и ВАРТА, на скорость поглощения Na^+ и внутриклеточное содержание Na^+ и K^+ в VSMC¹

Инкубационная среда	Внутриклеточное содержание Na^+ , (nmol/mg protein)	Внутриклеточное содержание K^+ , (nmol/mg protein)	Поглощение Na^+ (nmol/mg protein/5 min)
1. Контрольная среда	78 ±12	891 ±64	2,06 ±0,70
2. Ca^{2+} -обедненная среда	69 ±9	857 ±74	1,90 ±0,55
3. Ca^{2+} обедненная среда +50 μM EGTA	206 ± 21	511 ±60	5,99 ±0,43
4. Ca^{2+} -обедненная среда +10 μM ВАРТА-АМ	83 ±15	905 ± 99	2,12 ±0,49
5. Ca^{2+} -обедненная среда + EGTA + ВАРТА-АМ	225 ± 41	543 ±40	6,14 ±0,52
p1,3	<0,002	<0,01	<0,005
p4,5	<0,05	<0,02	<0,002

VSMC инкубировали в течение 3 ч в контрольной среде, не содержащей K^+ , Ca^{2+} -содержащей или Ca^{2+} -свободной среде, содержащей EGTA или / и ВАРТА-АМ. Представлено как среднее значение ± стандартное отклонение из 4 независимых экспериментов.

4.2.2. Влияние ингибиторов Na^+ , K^+ -АТФазы на профиль экспрессии генов в безкальциевой среде и при наличии хелаторов кальция

Данные, полученные в 4 независимых экспериментах, были нормализованы, а затем проанализированы методом главных компонент (РСА)¹.

¹ Koltsova S.V., Tremblay J., Hamet P., Orlov S.N. Transcriptomic changes in Ca^{2+} -depleted cells: Role of elevated intracellular $[\text{Na}^+]/[\text{K}^+]$ ratio // Cell Calcium. 2015. V. 58. P. 317–324.

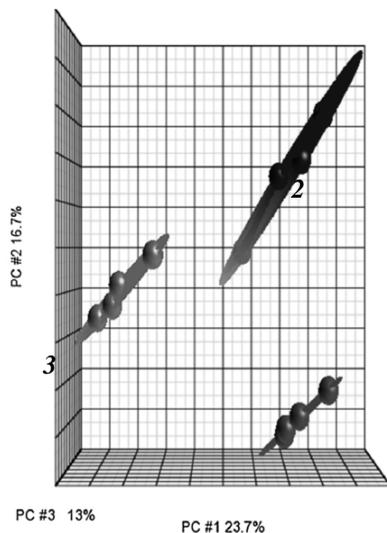


Рис. 27. Анализ основных компонентов транскрипционных изменений в VSMC, вызванных истощением Ca^{2+} и повышением $[\text{Na}^+]_i/[\text{K}^+]_i$. Клетки инкубировали в контрольной среде 3 часа (контроль), в среде, свободной от K^+ , содержащей Ca^{2+} (без K) или в среде без Ca^{2+} , содержащей 50 мкМ EGTA и 10 мкМ ВАРТА-АМ (без Ca). Все эксперименты повторяются 4 раза. Эллипсоиды выделяют порционирование образцов на основе типа обработки. Основные компоненты в трехмерных графиках (PC#1, PC#2 и PC#3) представляют изменчивость уровня экспрессии генов в наборах данных. Общий процент вариальности картирования PCA показан сверху: 1 – безкальциевая среда, 2 – контроль, 3 – безкалиевая среда²

Каждая точка PCA представляет профиль экспрессии генов отдельного образца. Образцы, которые находятся рядом друг с другом в результирующем трехмерном графике, имеют аналогичный транскриптом, в то время как те, которые находятся дальше друг от друга, имеют разные транскрипционные профили (рис. 27).

¹ Pearson K. On lines and planes of closest fit to systems of points in space // Philos. Mag. 1901. V. 2. P. 559–572.

² Koltsova S.V., Tremblay J., Hamet P., Orlov S.N. Transcriptomic changes in Ca^{2+} -depleted cells: Role of elevated intracellular $[\text{Na}^+]/[\text{K}^+]$ ratio // Cell Calcium. 2015. V. 58. P. 317–324.

Т а б л и ц а 6

**Влияние EGTA на внутриклеточное содержание Na⁺ и K⁺
в контрольной среде и среде с высоким содержанием K⁺ и низким Na⁺**

Инкубационная среда	Дополнительно	Na ⁺ i, nmol/mg белка	K ⁺ i, nmol/mg белка
1. Низкий-K ⁺ , высокий Na ⁺ Ca ²⁺ -обедненная DMEM	Нет	71 ±17	922 ±88
2. Низкий-K ⁺ , высокий Na ⁺ Ca ²⁺ -обедненная DMEM	EGTA	233 ±11	571 ± 44
3. Высокий-K ⁺ , низкий Na ⁺ Ca ²⁺ -обедненная DMEM	Нет	91 ± 23	861 ± 48
4. Высокий-K ⁺ , низкий Na ⁺ Ca ²⁺ -обедненная DMEM	EGTA	112± 19	803 ± 61
p1,2		<0,001	<0,02
p3,4		NS	NS

Результаты, представленные в табл. 6, свидетельствуют, что общее число транскриптов с выраженными изменениями в RVSMC, инкубируемых в течение 3 ч в безкальевой среде или при наличии Ca²⁺-хелаторов, составило 3 677 и 4 610 соответственно. Оба воздействия увеличили до ~25 раз и уменьшили до 8 раз содержание 1 281 и 711 транскриптов соответственно. Дальнейший анализ показал высокую достоверность ($P < 10^{-12}$) и положительную ($R^2 > 0,51$) корреляцию между уровнями измененных транскриптов, идентифицированных в клетках, подвергнутых ингибированию Na⁺, K⁺-АТФазы в среде без K⁺ или в среде без Ca²⁺, содержащей внеклеточные и внутриклеточные хелаторы Ca²⁺ (рис. 28).

¹ Koltsova S.V., Tremblay J., Hamet P., Orlov S.N. Transcriptomic changes in Ca²⁺-depleted cells: Role of elevated intracellular [Na⁺]/[K⁺] ratio // Cell Calcium. 2015. V. 58. P. 317–324.

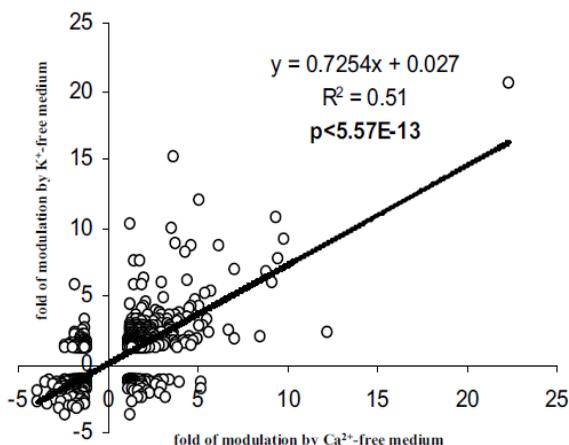


Рис. 28. Корреляционный анализ транскриптов, экспрессия которых изменяется более чем в 1,2 раза ($p < 0,05$) в течение 3 ч инкубации VSMC в среде без K⁺ или среде без Ca²⁺, содержащей 50 мкМ EGTA и 10 мкМ ВАРТА-АМ. Экспрессия транскриптов в VSMC после 3 ч инкубации в контрольной среде была принята за 1,00¹

Гены, экспрессия которых была изменена в обедненных Ca²⁺ RVSMC более чем в 4 раза, перечислены в табл. 7. Таблица показывает, что 75% из 41 гена, экспрессия которых повышается в присутствии Ca²⁺ хелаторов, также подвергались повышенной экспрессии в среде без K⁺. Список генов, экспрессия которых резко активизируется обоими факторами, дополнился генами, участвующими в регуляции транскрипции, такими как цАМФ-зависимый фактор транскрипции Atf3, белки раннего ответа Egr1, Egr2 и Egr3, белки группы A Nr4a1, Nr4a2 и Nr4a3, белок немедленного раннего ответа Ier2, Hey2, Mafk, Jun-B и Hes1, репрессор Snail, коррегулятор транскрипции Btg2 и транскрипт, индуцируемый повреждением ДНК, Ddit. Мы также отметили повышение уровня мРНК, кодирующей натрийуретический пептид В-типа Nppb, сигнальные белки (протеинкиназа Trib3, серин / треонин-протеинкиназа Plk2; регулятор передачи сигналов G-

¹ Koltsova S.V., Tremblay J., Hamet P., Orlov S.N. Transcriptomic changes in Ca²⁺-depleted cells: Role of elevated intracellular [Na⁺]/[K⁺] ratio // Cell Calcium. 2015. V. 58. P. 317–324.

protein Rgs2, инозит-трифосфат-3-киназа C Itpkc) и белки, участвующие в регуляции клеточных циклов роста и дифференцировки (фактор ингибирования лейкемии Lif, ингибитор циклинзависимой киназы Cdkn1a, белок, индуцируемый повреждением ДНК Gadd45a, белок суперсемейства лигандов фактора некроза опухолей Tnfsf18).

Чтобы изучить роль повышения соотношения $[Na^+]_i/[K^+]_i$ в регуляции экспрессии генов, вызванной истощением Ca^{2+} , мы инкубировали RVSMC в контрольной среде с высоким Na^+ , низким K^+ и искусственной среде с высоким K^+ , низким Na^+ . В табл. 8 показано, что диссипация трансмембранных градиентов моновалентных катионов в среде с высоким K^+ , низким Na^+ полностью нивелировала действие ЭГТА на внутриклеточное содержание Na^+ и K^+ . Учитывая это, мы выбрали Atf3, Nr4a1 и Erg3, экспрессия которых была активирована более чем в 7 раз как в клетках, обедненных Ca^{2+} , так и после ингибирования Na^+ , K^+ -АТФазы в безкальциевой среде (табл. 7), и использовали цепную реакцию полимеризации в реальном времени (Real-Time PCR) для сравнительного анализа действия ЭГТА на их экспрессию в контроле и среде с высоким содержанием K^+ , низким Na^+ .

Таблица 7

Гены, экспрессия которых была изменена более чем в 4,0 раза в VSMC, подвергнутом 3-часовой инкубации в безкальциевой среде¹

Гены	Безкальциевая среда			Безкальциевая среда		
	Изменение в п раз	p уровень		Изменение в п раз	p уровень	
Atf3	22,38	2,08E-	06	20,63	1,69E-	09
Trib3	12,28	1,60E	05	2,35	2,41E-	05
Serpib2	11,23	6,58E	05	-	-	
Egr2	9,81	6,74E	06	9,08	2,01E-	08
Rgs2	9,53	8,93E	06	7,67	3,13E-	06
Nr4a1	9,39	5,79E	05	10,73	4,79E-	07

¹ Koltsova S.V., Tremblay J., Hamet P., Orlov S.N. Transcriptomic changes in Ca^{2+} -depleted cells: Role of elevated intracellular $[Na^+]_i/[K^+]_i$ ratio // Cell Calcium. 2015. V. 58. P. 317–324.

Гены	Безкальциевая среда			Безкальциевая среда		
	Изменение в п раз	p уровень		Изменение в п раз	p уровень	
Egr3	9,22	3,35E	05	6,00	4,48E-	08
Plk2	8,82	2,08E	06	6,77	3,10E-	09
Hey2	8,50	2,08E	06	2,00	1,38E-	04
Tmem88	7,25	2,68E	05	-	-	
Jag1	7,13	7,86E	06	1,80	3,67E-	04
Egr1	7,09	1,12E	04	6,97	1,76E-	06
Ccrn4l	6,79	2,96E	05	2,53	2,75E-	06
Lif	6,16	5,47E	05	8,68	1,47E-	07
Ier2	5,74	3,42E	05	5,26	2,80E-	07
Snai1	5,62	2,98E	06	2,29	4,76E-	05
Mafk	5,53	6,20E	06	3,19	6,09E-	06
Garnl4	5,48	3,06E	05	-	-	
Psg19	5,40	3,35E	05	-	-	
Cdkn1a	5,34	2,95E	05	2,85	5,19E-	06
Nppb	5,19	2,37E-	05	-1,38	5,56E-	03
Btg2	5,14	2,58E	04	12,02	6,67E-	07
Gadd45a	5,10	6,20E	06	2,80	4,45E-	08
Ddit3	5,07	2,98E	06	4,26	1,52E-	09
Nfxl1	5,02	1,78E	05	-	-	
Nr4a3	4,91	7,82E	05	4,68	9,44E-	06
Nr4a2	4,72	3,27E	05	8,65	1,47E-	07
Junb	4,66	1,60E	05	4,24	8,44E-	08
Herpud1	4,64	8,21E	06	1,43	6,92E-	05
Arid5a	4,60	2,15E	04	1,69	9,37E-	03
Dlc1	4,60	6,39E	06	1,94	1,94E-	05
Il18r1	4,57	5,63E	05	-	-	
Nfxl1	4,55	2,95E	05	-	-	
Itpkc	4,55	1,28E	05	1,65	2,09E-	05
Hbegf	4,53	1,19E	04	4,10	1,63E-	05
Hes1	4,48	1,94E	05	6,15	5,28E-	08

Гены	Безкальциевая среда			Безкалиевая среда		
	Изменение в п раз	р уровень		Изменение в п раз	р уровень	
Tnfsf18	4,46	6,26E	05	3,42	1,11E-	06
Csrnp1	4,38	5,67E	06	–	–	
Inhbe	4,33	7,25E	05	–	–	
Kdm6b	4,06	6,47E	06	–	–	
Scara3	–4,26	2,22E	05	–	–	
Adm	–4,50	3,79E	05	–	–	

Примечание. Гены, на экспрессию которых также влияла среда, не содержащая K^+ , выделены **жирным шрифтом**.

На рис. 29 показано, что прирост содержания мРНК в этих генах, наблюдаемый в RVSMC, обработанном ЭГТА, в контрольной среде с низким K^+ и высоким Na^+ , отсутствовал в клетках, обработанных ЭГТА в среде с высоким K^+ и низким Na^+ .

Т а б л и ц а 8

Влияние EGTA на внутриклеточное содержание Na^+ и K^+ в контроле и среде с высоким K^+ , низким Na^+

Среда инкубации	Дополнительно	Na^+ , nmol/mg белка	K^+ , nmol/mg белка
1. Низкий- K^+ , высокий Na^+ Ca^{2+} -обедненная DMEM	нет	71 ± 17	922 ± 88
2. Низкий- K^+ , высокий Na^+ Ca^{2+} -обедненная DMEM	EGTA	233 ± 11	571 ± 44
3. Высокий- K^+ , низкий Na^+ Ca^{2+} -обедненная DMEM	нет	91 ± 23	861 ± 48
4. Высокий- K^+ , низкий Na^+ Ca^{2+} -обедненная DMEM	EGTA	112 ± 19	803 ± 61
p1,2		<0,001	<0,02
p3,4		NS	NS

¹ Koltsova S.V., Tremblay J., Hamet P., Orlov S.N. Transcriptomic changes in Ca^{2+} -depleted cells: Role of elevated intracellular $[Na^+]/[K^+]$ ratio // Cell Calcium. 2015. V. 58. P. 317–324.

Полученные данные показывают, что транскриптомные изменения в Ca^{2+} -обедненных RVSMC по крайней мере частично вызваны повышением $[\text{Na}^+]_i/[\text{K}^+]_i$ соотношения и активацией Ca^{2+} -независимого $[\text{Na}^+]_i/[\text{K}^+]_i$ -опосредованного механизма связи возбуждения-транскрипции, описанного в наших предыдущих исследованиях¹. Этот вывод подтверждается рядом других результатов.

Во-первых, истощение Ca^{2+} привело к увеличению в 3 раза $[\text{Na}^+]_i$ и 2-кратному ослаблению $[\text{K}^+]_i$ (рис. 25). Это наблюдение согласуется с резким повышением $[\text{Na}^+]_i$, вызванным добавлением 3,5 мМ ЭГТА в сперму человека, нагруженную флуоресцентным Na^+ -индикатором, который был полностью устранен при добавлении внеклеточного Ca^{2+} и Mg^{2+} в микромолярном и миллимолярном диапазоне соответственно².

Во-вторых, список генов, у которых содержание мРНК было увеличено в Ca^{2+} -обедненных клетках более чем в 4 раза, во многом совпадал со списком генов, экспрессия которых изменялась ингибированием Na^+ , K^+ -АТФазы в среде без K^+ (табл. 7).

В-третьих, мы обнаружили высокодостоверную положительную корреляцию в содержании мРНК генов (всего 2 071), экспрессия которых была изменена более чем в 1,2 раза как в Ca^{2+} -обедненных клетках, так и ингибированием Na^+ , K^+ -АТФазы в среде без K^+ (рис. 28).

В-четвертых, выравнивание трансмембранных градиентов Na^+ и K^+ в среде с высоким K^+ и низким Na^+ устраняет увеличение отношения $[\text{Na}^+]_i/[\text{K}^+]_i$, а также резкое повышение содержа-

¹ Koltsova S.V., Trushina Y., Haloui M. et al., Ubiquitous $[\text{Na}^+]_i/[\text{K}^+]_i$ -sensitive transcriptome in mammalian cells: evidence for Ca^{2+} -independent excitation–transcription coupling // PLOS ONE. 2012. V. 7. e38032; Taurin S., Dulin N.O., Pchejetski D. et al. c-Fos expression in ouabain-treated vascular smooth muscle cells from rat aorta: evidence for an intracellular-sodium-mediated, calcium-independent mechanism // J. Physiol. 2002. V. 543. P. 835–847; Haloui M., Taurin S., Akimova O.A. et al. Na^+ -induced c-Fos expression is not mediated by activation of the 5'-promoter containing known transcription elements // FEBS J. 2007. V. 274. P. 3257–3267.

² Torres-Flores V., Garcia-Sanchez N.L., Gonzalez-Martinez M.T. Intracellular sodium increase induced by external calcium removal in human sperm // J. Androl. 2008. V. 29. P. 63–69.

ния мРНК Atf3, Nr4a1 и Egr3, вызванное 3-часовой инкубацией VSMC в среде без Ca^{2+} , содержащей ЭГТА (рис. 29).

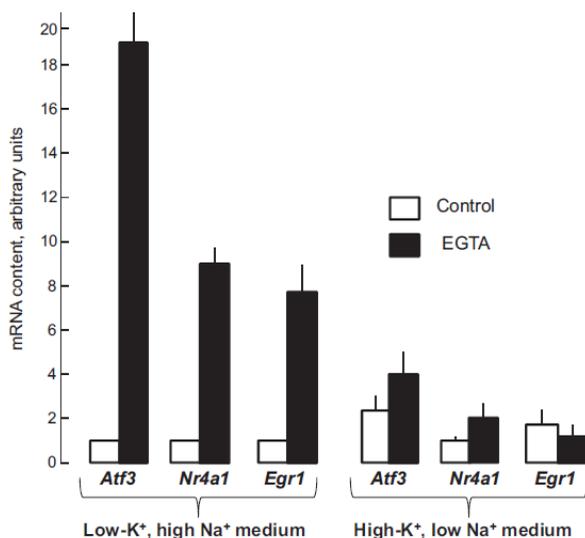


Рис. 29. Влияние EGTA на содержание мРНК Atf3, Nr4a1 и Egr1. VSMC инкубировали в течение 3 ч в контрольной DMEM-подобной среде с низким содержанием K^+ и высоким содержанием Na^+ без Ca^{2+} , содержащей (мМ), NaCl – 109,4; KCl – 5,4; MgSO_4 – 0,8; NaHCO_3 – 29,8; NaH_2PO_4 – 0,9; HEPES – 8,4; глюкоза – 5, а также витамины и аминокислоты в концентрациях, указанных для рецептов DMEM. В среде с высоким K^+ NaCl была заменена KCl с низким содержанием Na^+ и без Ca^{2+} . EGTA добавляли в конечной концентрации 50 мМ. Представлено как среднее значение \pm стандартное отклонение из 3 независимых экспериментов. Содержание мРНК в среде с низким K^+ , высоким Na^+ при отсутствии EGTA было принято как 1,00¹

Наши результаты убедительно свидетельствуют о том, что увеличение соотношения $[\text{Na}^+]_i/[\text{K}^+]_i$, наблюдаемое в Ca^{2+} -обедненных клетках, вызвано повышением проницаемости плазматических мембран для моновалентных катионов. Действительно, мы наблюдали, что истощение Ca^{2+} привело к почти

¹ Koltsova S.V., Tremblay J., Hamet P., Orlov S.N. Transcriptomic changes in Ca^{2+} -depleted cells: Role of elevated intracellular $[\text{Na}^+]/[\text{K}^+]$ ratio // Cell Calcium. 2015. V. 58. P. 317–324.

3-кратному повышению скорости притока ^{22}Na и ^{86}Rb , измеренного в присутствии ингибиторов Na^+ , K^+ -АТФазы и Na^+ , K^+ , 2Cl^- -котранспорта (рис. 26). Мы также отметили, что повышенная проницаемость моновалентных катионов, наблюдаемая в Ca^{2+} -обедненных клетках, вероятно, вызвана ослаблением внеклеточного, а не внутриклеточного Ca^{2+} . Действительно, в отличие от внеклеточного Ca^{2+} -хелатора ЭГТА, ни $[\text{Na}^+]_i/[\text{K}^+]_i$ соотношение, ни VSMC проницаемость для Na^+ не влияли на Ca^{2+} -свободную среду без хелаторов Ca^{2+} , а также при добавлении внутриклеточного Ca^{2+} - хелатора ВАРТА-Am в покое (табл. 5).

Было показано, что в отсутствие внеклеточного Ca^{2+} потенциал-зависимые каналы Т-типа проницаемы для Na^+ ¹. Такое же явление было обнаружено и при изучении проницаемости рН-чувствительных Ca^{2+} -каналов², Ca^{2+} -зависимых Ca^{2+} -каналов (CRAC)³, а также каналов транзиторного рецепторного потенциала (TRPM4, TRPM6, TRPM7). С использованием клеток базофильного лейкоза крыс показано, что в среде без Ca^{2+} каналы CRAC проницаемы для Li^+ и Rb^+ ⁴. В астроцитах и фибробластах ЗТЗ ослабление $[\text{Ca}^{2+}]_o$ и $[\text{Mg}^{2+}]_o$ активируют гемиканалы коннексина, проницаемые для низкомолекулярных красителей, АТФ и NAD^+ ⁵. Относительный вклад этих ионных транспортеров в повышение проницаемости плазматических мембран для

¹ Suarez-Kurtz G., Katz G.M. Currents carried by sodium ions through transient calcium channels in clonal GH3 pituitary cells // *Pflugers Arch.* 1987. V. 410. P. 345–347.

² Cain K., Langlais C., Sun X.M., Brown D.G., Cohen G.M. Physiological concentrations of K^+ inhibit cytochrome c-dependent formation of the apoptosisosome // *J. Biol. Chem.* 2001. V. 276. P. 41985–41990.

³ Minke B., Cook B. TRP channel proteins signal transduction // *Physiol. Rev.* 2002. V. 82. P. 429–472; DeHaven W.I., Smyth J.T., Boyles R.R., Putney J.W. Calcium inhibition and calcium potentiation of Orai1, Orai2, and Orai3 calcium release-activated calcium channels // *J. Biol. Chem.* 2007. V. 282. P. 17548–17556.

⁴ Bakowski D., Parekh A.B. Monovalent cation permeability and Ca^{2+} -block of the store-operated Ca^{2+} -current ICRAC in rat basophilic leukemia cells // *Pflugers Arch. – Eur. J. Physiol.* 2002. V. 443. P. 892–902.

⁵ Stout C., Charles A. Modulation of intercellular calcium signaling in astrocytes by extracellular calcium and magnesium // *Glia.* 2003. V. 43. P. 265–273; Bruzzone S., Guida L., Zocchi E., Franco L., De Flora A., Connexin 43 hemichannels mediate Ca^{2+} -regulated transmembrane NAD^+ fluxes in intact cells // *FASEB J.* 2001. V. 15. P. 10–12.

Na^+ и K^+ , зарегистрированной в Ca^{2+} -обедненном RVSMC, остается неизвестным.

Таким образом, наши результаты демонстрируют, что устойчивые транскриптомные изменения, вызванные истощением Ca^{2+} в присутствии внеклеточного Ca^{2+} -хелатора ЭГТА, по меньшей мере частично опосредованы повышением соотношения $[\text{Na}^+]_i/[\text{K}^+]_i$ и активацией Ca^{2+}_i -независимого $[\text{Na}^+]_i/[\text{K}^+]_i$ – опосредованного механизма связи возбуждения-транскрипции.

4.2.3. Влияние ингибиторов Na^+ , K^+ -АТФазы на процессы транскрипции и трансляции в безкальциевой среде и при наличии хелаторов кальция

Мы обнаружили, что устойчивое ингибирование Na^+ , K^+ -АТФазы приводит к резкому увеличению мРНК, кодирующих фактор роста эндотелия 1 (Egr1), фактор, активирующий транскрипцию 3 (Atf3), подсемейство ядерных рецепторов группы 1 (Nr4a1) и простагландин-эндопероксидсинтазу 2 (Ptgs2) (рис. 30).

Используя два независимых подхода для ингибирования Na^+ , K^+ -АТФазы (уабаин и безкальциевая среда), мы наблюдали очень значительную положительную корреляцию с ростом содержания мРНК. Это свидетельствует, что выявленные изменения вызваны повышением соотношения $[\text{Na}^+]_i/[\text{K}^+]_i$, а не изменением содержания Na_i^+ или K_i^+ по отдельности. Наши результаты убедительно свидетельствуют о том, что усиленная транскрипция Nr4a1 и Ptgs2 обусловлена усиленным притоком Ca^{2+} через управляемые напряжением каналы Ca^{2+} L-типа и активацией Ca^{2+} /CaM-зависимых протеинкиназ (Ptgs2) и протеинфосфатаз (Nr4a1) (рис. 31). Этот вывод подтверждается приведенными ниже наблюдениями.

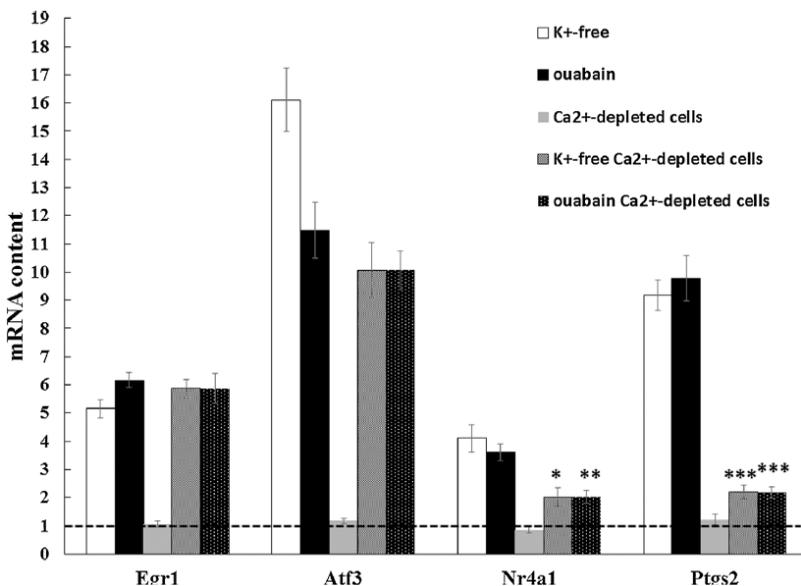


Рис. 30. Влияние ингибирования Na^+ , K^+ -АТФазы на содержание мРНК Egr1, Atf3, Nr4a1 и Ptgs2 в контрольный и Ca^{2+} -обедненной RVSMC. Контрольные клетки инкубировали в течение 3 ч в контрольной среде (Sp-DMEM + Ca, K) или свободной от K^+ (Sp-DMEM + Ca) среде при отсутствии или наличии 3 000 мкМ убаина. Для удаления внутриклеточного Ca^{2+} внеклеточный Ca^{2+} был удален и добавлено 10 мкМ ВАРТА-АМ. Содержание мРНК в контрольных клетках, инкубируемых в Sp-DMEM + Ca, K при отсутствии убаина, было взято как 1,00 и показано как штрихованная линия. Представлено как среднее значение \pm стандартное отклонение из 3 независимых экспериментов. *, **, *** – $p < 0,05$, $0,02$ и $0,001 <$ соответственно¹

¹ Smolyaninova L.V., Koltsova S.V., Sidorenko S.V., Orlov S.N. Augmented gene expression triggered by Na^+ , K^+ -ATPase inhibition: Role of Ca^{2+} -mediated and -independent excitation-transcription coupling // Cell Calcium. 2017. № 68. P. 5–13.

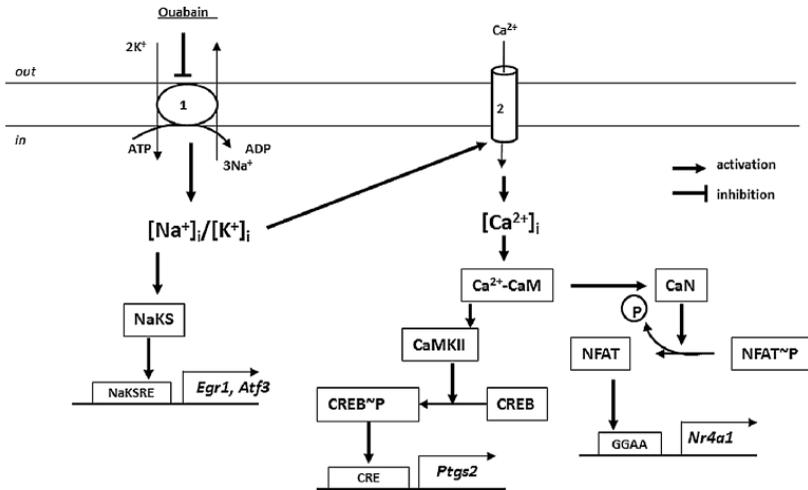


Рис. 31. Взаимодействие Ca^{2+} -опосредованной и независимой передачи сигналов при возбуждении-транскрипции, вызванной повышением отношения $[\text{Na}^+]_i/[\text{K}^+]_i$. Диссипация трансмембранной градиенты одновалентных катионов, вызванная ингибированием Na^+ , K^+ -АТФазы (1) или другими стимулами, приводит к деполаризации плазматической мембраны, активации потенциал-зависимых Ca^{2+} -каналов (2), повышению $[\text{Ca}^{2+}]_i$ и его взаимодействию с кальмодулином (CaM). Ca^{2+} -CaM приводит к фосфорилированию белка CREB и дефосфорилированию белка NFAT через активацию Ca^{2+} /кальмодулин-зависимой протеинкиназы CaMKII и протеинфосфатазы кальциейрина (CaN) соответственно. Белок CREB-P увеличивает транскрипцию Ptgs2 через взаимодействие с CREB-элементом ответа (CRE) в пределах 5'UTR, тогда как NFAT увеличивает экспрессию Nr4a1 через взаимодействие с GGAA. В качестве рабочей гипотезы мы предлагаем, что Ca^{2+} -зависимое приращение транскрипции Egr1 и Atf3 вызвано активацией неизвестного сенсора $[\text{Na}^+]_i/[\text{K}^+]_i$ (NaKS) и его ответных элементов (NaKSRE). Остальные пояснения в тексте¹

Во-первых, повышенное содержание мРНК Nr4a1 и Ptgs2, индуцированное ингибированием Na^+ , K^+ -АТФазы под действием убаина или безкальциевой среды, угнеталось в RVSMC в присутствии внутриклеточного Ca^{2+} -хелатора ВАРТА и в без-

¹ Smolyaninova L.V., Koltsova S.V., Sidorenko S.V., Orlov S.N. Augmented gene expression triggered by Na^+ , K^+ -ATPase inhibition: Role of Ca^{2+}_i -mediated and -independent excitation-transcription coupling // Cell Calcium. 2017. № 68. P. 5–13.

кальциевой инкубационной среде (рис. 30). Во-вторых, мы наблюдали, что убаин увеличивал скорость входа $^{45}\text{Ca}^{2+}$, чувствительного к никардипину, но не к соединению KB-R7943, демонстрируя тем самым активацию потенциал-зависимых Ca^{2+} -каналов L-типа, а не $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обменника (рис. 32).

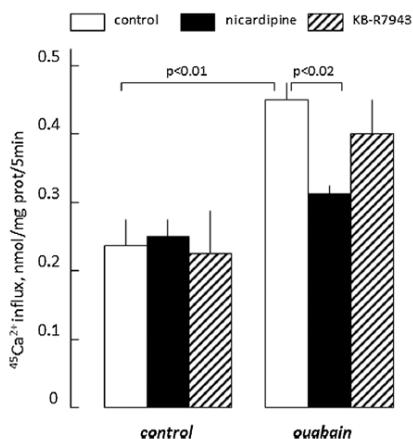


Рис. 32. Влияние убаина (3 мМ), никардипина (1 мкМ) и KB-R7943 (3 мкМ) на скорость входа $^{45}\text{Ca}^{2+}$ в RVSMC. Представлено как среднее значение \pm стандартное отклонение из 4 независимых экспериментов¹

Важно отметить, что добавление никардипина приводило к ослаблению прироста содержания мРНК Nr4a1 и Ptgс2, индуцируемого убаином (рис. 33).

В-третьих, при изучении Ca^{2+} -индуцированного конформационного перехода очищенного СаМ и активации Ca^{2+} -активируемых K^+ каналов мы выбрали А7 и W-7 в качестве наиболее сильных антагонистов СаМ (рис. 34).

Эти соединения резко ослабили прирост содержания мРНК Nr4a1 и Ptgс2 в RVSMC, обработанных убаином (рис. 35).

В-четвертых, KN-93, ингибитор Ca^{2+} /кальмодулин-зависимой протеинкиназы СаМКII, и циклоспорин А, ингибитор

¹ Smolyaninova L.V., Koltsova S.V., Sidorenko S.V., Orlov S.N. Augmented gene expression triggered by Na^+ , K^+ -ATPase inhibition: Role of Ca^{2+} -mediated and -independent excitation-transcription coupling // Cell Calcium. 2017. № 68. P. 5–13.

Ca²⁺/кальмодулин-зависимой протеинфосфатазы кальциейрина, резко снижали убаин-зависимые приросты транскрипции Ptgс2 и Nr4a1 соответственно (рис. 36).

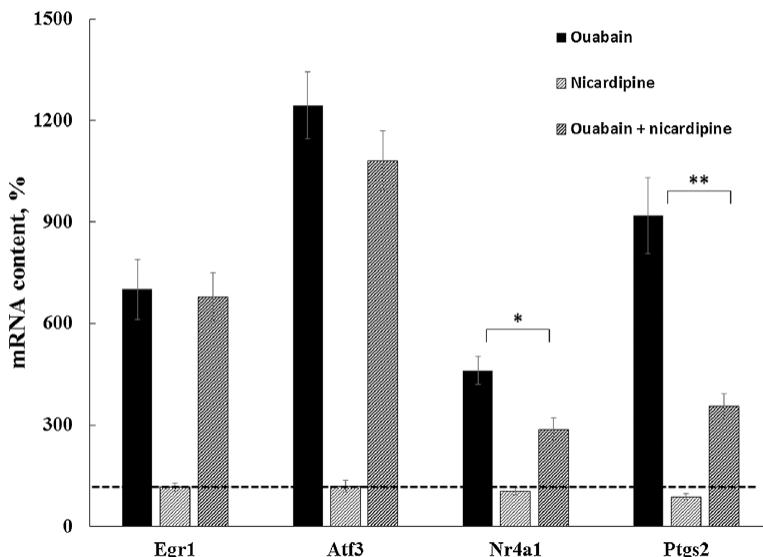


Рис. 33. Влияние убаина и никардипина на содержание Egr1, ATf3, Nr4a1 и Ptgс2 в RVSМC. RVSМC инкубировали в течение 3 ч в контрольной (Sp-DMEM+ Ca, K) среде при отсутствии или наличии 3 000 мкМ убаина и 1 мкМ никардипина. Содержание мРНК в клетках, инкубированных при отсутствии какого-либо добавления, было принято за 100% и отображается как пунктирная линия. Представлено как среднее значение ± стандартное отклонение из 4 независимых экспериментов. *, ** – p < 0,01 и 0,002 соответственно¹

¹ Smolyaninova L.V., Koltsova S.V., Sidorenko S.V., Orlov S.N. Augmented gene expression triggered by Na⁺,K⁺-ATPase inhibition: Role of Ca²⁺-mediated and -independent excitation-transcription coupling // Cell Calcium. 2017. № 68. P. 5–13.

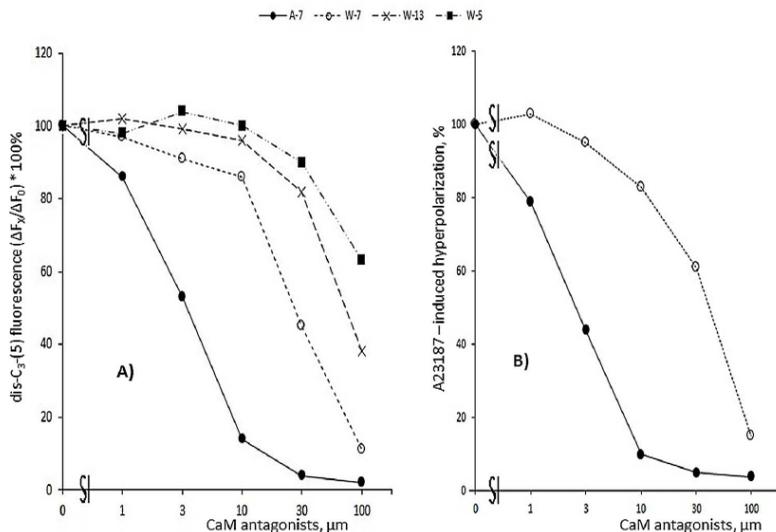


Рис. 34. Влияние антагонистов кальмодулина на Ca²⁺-индуцированное взаимодействие diS-C3- (5) с CaM (A) и Ca²⁺-активированная K⁺-проводимость в эритроцитах крысы (B). A. Ca²⁺-индуцированное снижение флуоресценции 1 мкМ diS-C3- (5) при наличии 1 мкМ CaM (ΔF₀, рис. 1) принято за 100%. ΔF_x является Ca²⁺-индуцированным уменьшением флуоресценции при наличии антагонистов CaM, указано в абсциссе. B. CaM-антагонисты были добавлены за 5 минут до A23187. Значения A23187-индуцированной гиперполяризации мембраны при отсутствии CaM-антагонистов принимались за 100%. Концентрации CaM-антагонистов показаны пунктирными линиями¹

В совокупности наши данные убедительно свидетельствуют о том, что диссипация трансмембранного градиента одновалентных катионов, вызванная ингибированием Na⁺, K⁺-АТФазы, увеличивает транскрипцию Ptg2 и Nr4a1 посредством CaMKII-опосредованного фосфорилирования CREB и кальциейрин-опосредованного дефосфорилирования NFAT соответственно (рис. 31).

¹ Smolyaninova L.V., Koltsova S.V., Sidorenko S.V., Orlov S.N. Augmented gene expression triggered by Na⁺, K⁺-ATPase inhibition: Role of Ca²⁺i-mediated and -independent excitation-transcription coupling // Cell Calcium. 2017. № 68. P. 5–13.

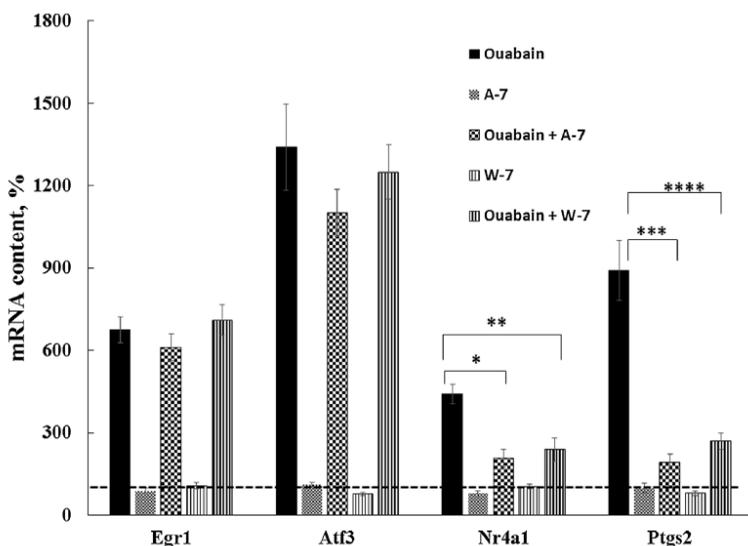


Рис. 35. Влияние антагонистов CaM на содержание мРНК, кодирующие Na⁺, K⁺-чувствительные гены. RVSMC были инкубированы в течение 3 ч в контрольной (Sp-DMEM + Ca, K) среде при отсутствии или наличии 3 000 мкМ убаина/A-7 (10 мкМ) и W-7 (100 мкМ). Содержание мРНК в клетках, инкубированных при отсутствии этих добавок, принималось за 100% и показано пунктирной линией. Представлено как среднее значение ± стандартное отклонение из 4 независимых экспериментов. *, **, ***, **** – p < 0,01, 0,002, 0,05 и 0,005 соответственно¹

Роль входа Ca²⁺ через потенциал-управляемые каналы Ca²⁺ L-типа в активации этих сигнальных путей в гладких мышцах различного происхождения подробно описана².

¹ Smolyaninova L.V., Koltsova S.V., Sidorenko S.V., Orlov S.N. Augmented gene expression triggered by Na⁺,K⁺-ATPase inhibition: Role of Ca²⁺-mediated and -independent excitation-transcription coupling // Cell Calcium. 2017. № 68. P. 5–13.

² Barlow C.A., Rose P., Pulver-Kaste R.A., Lounsbury K.M. Excitation-transcription coupling in smooth muscle // J. Physiol. 2006. V. 570. P. 59–64; Dominguez-Rodriguez A., Ruiz-Hurtado G., Benitah J.-P., Goetz A.M. The other side of cardiac signaling: transcriptional control // Front. Physiol. 2012. V. 3. P. 452; Misarkova E., Behuliak M., Bencze M., Zicha J. Excitation-contraction coupling and excitation-transcription coupling

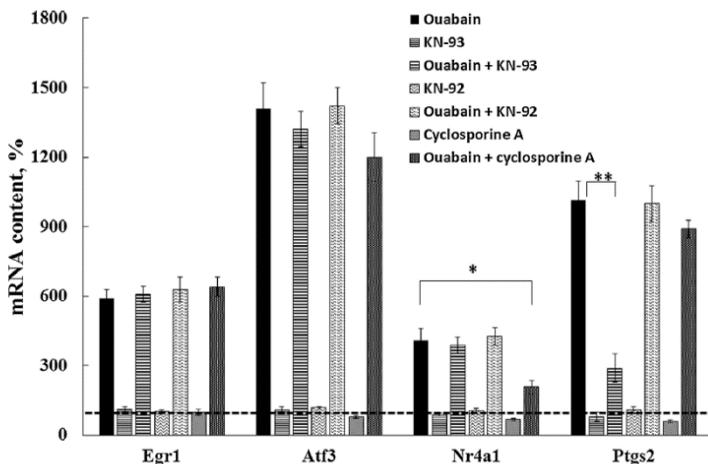


Рис. 36. Эффекты ингибиторов Ca^{2+} /кальмодулин-зависимой протеинкиназы (CaMKII) и Ca^{2+} /кальмодулин-зависимой протеинфосфатазы (кальцинейрина) на содержание мРНК, кодирующих Na^+ -, K^+ -чувствительные гены. RVSMC инкубировали в течение 3 ч в контрольной среде (Sp-DMEM + Ca, K) при отсутствии или наличии 3 000 мкМ убаина, 10 мкМ KN-93, 10 мкМ KN-92 и 1 мМ циклоспорина А. Содержание мРНК в инкубированных клетках при отсутствии каких-либо добавок было принято за 100% и показано пунктирной линией. Представлено как среднее значение \pm стандартное отклонение из 4 независимых экспериментов. *, ** – $p < 0,02$ и $0,001$ соответственно¹

Следует отметить, однако, что одновременно с ингибированием путей, опосредованных Ca^{2+} , исследуемые соединения влияют на различные Ca^{2+} -независимые клеточные ответы. Действительно, наряду с ингибированием трех изоформ $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обменника (NCX1-NCX3)², KB-R7943 воздействует на АТФ-

in blood vessels: their possible interaction in hypertensive vascular remodeling // *Physiol. Res.* 2016. V. 65. P. 173–191.

¹ Smolyaninova L.V., Koltsova S.V., Sidorenko S.V., Orlov S.N. Augmented gene expression triggered by Na^+ , K^+ -ATPase inhibition: Role of Ca^{2+} -mediated and -independent excitation-transcription coupling // *Cell Calcium*. 2017. № 68. P. 5–13.

² Billman G.E. KB-R7943. Kanebo // *Curr. Opin. Investig. Drugs*. 2001. V. 2. P. 1740–1745.

зависимый ток K^{+1} , неселективные катионные каналы² и пору митохондриальной проницаемости³, тогда как KN-92 блокирует потенциал-зависимые K^{+} -каналы⁴.

В отличие от Ptgs2 и Nr4a1, мы не отмечаем каких-либо эффектов безкальциевой среды, а также никардипина, антагонистов кальмодулина, KN-93 и циклоспорина А на усиленную транскрипцию Egr1 и Atf3, наблюдаемую в RVSMC, обработанных убаином. Чтобы объяснить этот факт, можно предложить две альтернативные гипотезы.

Во-первых, ингибирование Na^{+} , K^{+} -АТФазы влияет на транскрипцию этих генов через Na^{+} , K^{+} -независимые сигнальные пути. Это предположение согласуется с многочисленными данными, показывающими активацию разнообразных сигнальных систем низкими дозами убаина и других кардиотонических стероидов⁵. Следует однако отметить, что в наших экспериментах мы подвергли RVSMC воздействию 3 мМ убаина, что приводило к полному ингибированию Na^{+} , K^{+} -АТФазы⁶. Ключе-

¹ Abramochkin D.V., Vornanen M. Inhibition of the cardiac ATP-dependent potassium current by KB-R7943 // *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 2014. V. 175. P. 38–45.

² Pezier A., Bobkov Y.V., he B.W. The Na^{+}/Ca^{2+} exchanger inhibitor, KB-R7943, 12 blocks a nonselective cation channel implicated in chemosensory transduction // *J. Neurophysiol.* 2009. V. 101. P. 1151–1159.

³ Wiczler B.M., Marcu R., Hawkins B.J. KB-R7943, a plasma membrane Na^{+}/Ca^{2+} exchanger inhibitor, blocks opening of the mitochondrial permeability transition pore, *Biochem // Biophys. Res. Commun.* 2014. V. 444. P. 44–49.

⁴ Rezazadeh S., Claydon T.W., Fedida D. KN-93 (2-[N-9hydroxyethyl]-N-(4-methoxybenzenesulfonyl)-amino-N-(4-chlorocinnamyl)-n-methylbenzylamine), a calcium/calmodulin-dependent protein kinase II inhibitor, is a direct extracellular blocker of voltage-gated potassium channels // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2006. V. 317. P. 292–299.

⁵ Schoner W., Scheiner-Bobis G. Endogenous and exogenous cardiac glycosides: their role in hypertension, salt metabolism, and cell growth // *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2007. V. 293. P. C509–C536; Liu J., Xie Z. The sodium pump and cardiotonic steroids-induced signal transduction protein kinases and calcium-signaling microdomain in regulation of transporter trafficking // *Biochim. Biophys. Acta.* 2010. V. 1802. P. 1237–1245; Orlov S.N., Klimanova E.A., Tverskoi A.M., Vladychenskaya E.A., Smolyaninova L.V., Lopina O.D. Na^{+} , K^{+} , K^{+} -dependent and $-$ independent signaling triggered by cardiotonic steroids: facts and artifacts // *Molecules.* 2017. V. 22. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules22040635>

⁶ Orlov S.N., Thorin-Trescases N., Kotelevtsev S.V., Tremblay J., Hamet P., Inversion of the intracellular Na^{+}/K^{+} ratio blocks apoptosis in vascular smooth muscle at a site upstream of caspase-3 // *J. Biol. Chem.* 1999. V. 274. P. 16545–16552; Taurin S., Du-

вая роль повышения соотношения $[Na^+]_i/[K^+]_i$ в транскриптомных изменениях, вызванных кардиотоническими стероидами, также согласуется со сравнительным анализом кинетики и дозозависимого действия убаина и маринобуфагенина на соотношение $[Na^+]_i/[K^+]_i$ и экспрессию генов в эндотелиальных клетках человека¹.

Во-вторых, ингибирование Na^+ , K^+ -АТФазы влияет на транскрипцию *Egr1* и *Atf3*, а также других $[Na^+]_i/[K^+]_i$ -чувствительных, Ca^{2+} -независимых генов через новые сигнальные пути, запускаемые активацией сенсоров мембранного потенциала и внутриклеточной концентрации моновалентных ионов, отличных от их традиционных мембранных сенсоров, таких, как потенциал-зависимые каналы Ca^{2+} L-типа, Na^+/Ca_o^+ обменник и т.д. (рис. 31).

4.2.4. Поиск внутриклеточных сенсоров одновалентных ионов

Предлагаемая нами модель строится на предположении, что повышение отношения $[Na^+]_i/[K^+]_i$, влияет на транскрипцию и трансляцию миокинов через взаимодействия $[Na^+]_i$ и $[K^+]_i$ с их гипотетическими сенсорами: NaS и KS соответственно (рис. 24). Молекулярная природа сенсоров одновалентных катионов, отличных от ионных транспортеров, остается неизвестной. Эта неопределенность до сих пор сохраняется, в отличие от быстрого обнаружения рецепторов Ca^{2+} . Следует отметить, однако, что локусы с высоким сродством связывания для Ca^{2+} , первоначально обнаруженные в парвальбуминах и кальмодулине, образова-

lin N.O., Pchejetski D. et al. c-Fos expression in ouabain-treated vascular smooth muscle cells from rat aorta: evidence for an intracellular-sodiummediated, calcium-independent mechanism // J. Physiol. 2002. V. 543. P. 835–847.

¹ Klimanova E.A., Tverskoi A.M., Koltsova S.V. et al. Time- and dose-dependent actions of cardiotonic steroids on transcriptome and intracellular content of Na^+ and K^+ : a comparative analysis // Sci. Rep. 2017. V. 7. P. 45403. <http://dx.doi.org/101038/rep45403>

ны высококонсервативной линейной аминокислотной последовательностью, состоящий из 14 аминокислотных остатков (так называемый «EF-hand» домен). Эти факты привели к быстрой идентификации в библиотеке генов более 30 других Ca^{2+} сенсоров¹. Напротив, сенсоры одновалентных ионов, вероятно, образованы трехмерными белковыми структурами². Кроме того, высокоаффинные Ca^{2+} сенсоры почти полностью насыщены при $[\text{Ca}^{2+}]_i=1$ мкМ. Эта особенность привела к идентификации аминокислотных остатков с помощью анализа связывания радиоактивного ^{45}Ca . В отличие от Ca^{2+} , одновалентные катионы влияют на клеточные функции в миллимолярном диапазоне, что усложняет их идентификацию путем скрининга радиоизотопов.

Согласно общепринятому мнению, транскрипция находится под контролем белков, взаимодействующих с конкретными «элементами ответа», расположенными в некодируемом участке гена. Учитывая это, мы попытались найти такой элемент для Na^+ (NaRE) в 5'-промоторе c-Fos. Мы не смогли обнаружить в клетках HeLa в ответ на ингибирование Na^+ , K^+ -АТФазы повышения экспрессии гена-репортера люциферазы, находящейся под контролем промотора c-Fos. Эти контрастировали с накоплением в этих клетках мРНК эндогенного c-Fos и иммунореактивного белка c-Fos³.

Можно предложить несколько гипотез для объяснения отрицательных результатов, полученных в этом исследовании. (1) NaRE находится в интронах c-Fos и/или c-Fos 3'-UTR. (2) Повышение соотношения $[\text{Na}^+]_i/[\text{K}^+]_i$ влияет на экспрессию генов посредством эпигенетической модификации ДНК, гистонов или ремоделирования нуклеосом – механизм регулирования экспрессии генов, оказывающий значительное влияние на раз-

¹ Heizmann C.W., Hunziker W. Intracellular calcium-binding proteins: more sites than insights // *TiBS*. 1991. V. 16. P. 98–103.

² Orlov S.N., Hamet P. Intracellular monovalent ions as second messengers // *J. Membr Biol*. 2006. V. 210. P. 161–172.

³ Haloui M., Taurin S., Akimova O.A. et al. Naoi-induced c-Fos expression is not mediated by activation of the 50-promoter containing known transcriptional elements // *FEBS J*. 2007. V. 274. P. 3257–3267.

нообразные клеточные функции¹. Важно, что в наших экспериментах эпигенетические механизмы экспрессии генов не могут быть обнаружены при изучении регуляция транскрипции люциферазы, находящейся во внегеномной плазмиде². (3) Экспрессия c-Fos находится под комплексным контролем трехмерного позиционирования генетического материала и хроматина в ядерном пространстве³. Можно предположить, что $[Na^+]_i/[K^+]_i$ соотношение влияет на транскрипцию гена путем изменения трехмерной организации генома. (4) У. Оно с соавторами обнаружили, что, при уровне $[Ca^{2+}]_i$ (100 нМ), Na^+ взаимодействует с Ca^{2+} -связывающими сайтами кальпаина и этот фермент функционирует как Na^+ -зависимая протеаза с $K_{0,5}$ 15 мМ для Na^+ ⁴. Для изучения роли Ca^{2+} -связывающих белков как потенциальных сенсоров моновалентных катионов, участвующих в транскриптомных и протеомных изменениях, вызванных увеличением отношения $[Na^+]_i/[K^+]_i$, необходимы дополнительные исследования.

Следует подчеркнуть, что наряду с транскрипцией этапы трансляции и секреции миокинов могут влиять на их продукцию через аутокринные механизмы⁵. Например, IL-15 увеличивает экспрессию PPAR δ и SIRT1 через взаимодействие с его рецептором IL-15Ra⁶, PGE2 запускает накопление IL-6¹, тогда как экспрессия CXL-1 регулируется IL-6².

¹ Graff J., Kim D., Dobbin M.M., Tsai L.-H. Epigenetic regulation of gene expression in physiological and pathological brain processes // *Physiol Rev.* 2011. V. 91. P. 603–649.

² Haloui M., Taurin S., Akimova O.A. et al. Notoi-induced c-Fos expression is not mediated by activation of the 50-promoter containing known transcriptional elements // *FEBS J.* 2007. V. 274. P. 3257–3267.

³ Lancot C., Cheutin T., Cremer M., Cavalli G., Cremer T. Dynamic genome architecture in the nuclear space: regulation of gene expression in three dimensions // *Nat Rev Genet.* 2007. V. 8. P. 104–115.

⁴ Оно Y., Ojima K., Torii F. et al. Skeletal muscle-specific calpain is an intracellular Na^+ -dependent protease // *J. Biol Chem.* 2010. V. 285. P. 22986–22998.

⁵ Peake J.M., Gatta P.D., Suzuki K., Nieman D.C. Cytokine expression and secretion by skeletal muscle cells: regulatory mechanisms and exercise effects // *Exerc Immunol Rev.* 2015. V. 21. P. 8–25.

⁶ Quinn L.S., Anderson B.G., Conner J.D., Wolden-Hanson T., Marcell T.J. IL-15 required for postexercise induction of the pro-oxidative mediators PPAR δ and SIRT1 in male mice // *Endocrinology.* 2014. V. 155. P. 143–155.

4.3. Изменение внутриклеточной концентрации натрия и калия как фактор регуляции экспрессии генов в условиях гипоксии

Гипоксия характерна для многочисленных патологий, включая воспаление³, рак⁴, ожирение⁵, системную и легочную гипертензию⁶, атеросклероз⁷ и заболевания почек⁸. В 1986 году С.Е. Murry и его коллеги сообщили, что размер инфарктов миокарда, возникающих при 40-минутной окклюзии обгибающей артерии, может быть уменьшен на 75%, если миокард подвергнуть так называемому ишемическому прекондиционированию, т.е. нескольким коротким окклюзиям, перемежающимся периодами реперфузии⁹. В дальнейшем защитное действие кратковременной ишемии было показано и в других тканях, включая

¹ Standley R.A., Liu S.Z., Jemiolo B., Trappe S.W., Trappe T.A. Prostaglandin E2 induces transcription of skeletal muscle mass regulators interleukin-6 and muscle RING finger-1 in humans // *Prostagl Leukot Essent Fat Acids*. 2013. V. 88. P. 361–364.

² Pedersen L., Pilegaard H., Hansen J. et al. Exercise-induced liver chemokine expression is linked to muscle-derived interleukin-6 expression // *J. Physiol*. 2011. V. 589. P. 1409–1420.

³ Taylor C.T. Interdependent roles for hypoxia inducible factor and nuclear factor-κB in hypoxic inflammation // *J. Physiol.*, 2008. V. 586. P. 4055–4059.

⁴ Harris A.L. Hypoxia – a key regulatory factor in tumour growth // *Nature Rev. Cancer*, 2002. № 2. P. 38–47.

⁵ Wood I.S., Perez de Heredia F., Wang B. et al. Cellular hypoxia and adipose tissue dysfunction in obesity // *Proc. Nutr. Soc.* 2009. № 68. P. 370–377.

⁶ Greenstein A.S., Khavandi K., Withers S.B. et al. Local inflammation and hypoxia abolish the protective anticontractile properties of perivascular fat in obese patients // *Circulation*. 2009. № 119. P. 1661–1670; Vender R.L. Chronic hypoxic pulmonary hypertension: Cell biology to pathophysiology // *Chest*. 1994. № 106. P. 236–243.

⁷ Castellano J., Aledo R., Sendra J. et al. Hypoxia stimulates low-density lipoprotein receptor-regulated protein-1 expression through hypoxia-inducible factor-1α in human vascular smooth muscle cells // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol*. 2011. № 31. P. 1411–1420.

⁸ Nangaku M., Eckardt K.U. Hypoxia and the HIF system in kidney disease // *J. Mol. Med*. 2007. № 85. P. 1325–1330.

⁹ Murry C.E., Jennings R.B., Reimer K.A. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium // *Circulation*. 1986. № 74. P. 1124–1136.

кровеносные сосуды¹. Показательно, что профилактическое влияние ишемического preconditionирования частично блокировалось ингибиторами синтеза РНК², что свидетельствует о ключевой роли глубоких транскриптомных изменений, зафиксированных в исследованиях профиля экспрессии генов ишемических тканей³.

Фактор альфа 1, индуцируемый гипоксией (HIF-1a), считающийся основным кислородным сенсором, регулирует экспрессию генов в ишемизированных тканях путем взаимодействия гетеродимера HIF-1a/HIF-1b с гипоксия-чувствительными элементами (HREs) в промоторных / энхансерных областях ДНК целевого гена. При нормоксии HIF-1a гидроксилируется кислород-зависимой пролилгидролазой, которая вызывает ее протеосомную деградацию. Напротив, в гипоксических условиях HIF-1a транслицируется в ядро, где образует комплекс HIF-1a/HIF-1b. Список HIF-1-чувствительных генов включает Hif-1a как таковой и другие, связанные с вазомоторным контролем (синтаза-2 оксида

¹ Zhao H., Ren C., Chen X. et al. From rapid to delayed and remote postconditioning: the evolving concept of ischemic postconditioning in brain ischemia // *Curr Drug Targets*. 2012. № 13. P. 173–187.

² Sharp F.R., Ran R., Lu A. et al. Hypoxic preconditioning protects against ischemic brain injury // *NeuroEx*. 2004. № 1. P. 26–35; Hausenloy D.J., Yellon D.M. Preconditioning and postconditioning: Underlying mechanisms and clinical applications // *Atherosclerosis*. 2009. № 204. P. 334–341.

³ Mazzatti D., Lim F-L., O'Hara A. et al. A microarray analysis of the hypoxia-induced modulation of gene expression in human adipocytes // *Arch. Physiol. Biochem*. 2012. № 118. P. 112–120; Lu A., Tang Y., Ran R. et al. Genomics of the periinfarction cortex after focal cerebral ischemia // *J. Cereb. Blood Flow Met*. 2003. № 23. P. 786–810; Kamphuis W., Dijk F., van Soest S. Vender R.L. et al. Global gene expression profiling of ischemic preconditioning in the rat retina // *Mol. Vision*. 2007. № 13. P. 1020–1030; Tang Y., Pacary E., Freret T. et al. Effect of hypoxic preconditioning on brain genomic response before and following ischemia in the adult mouse: identification of potential neuroprotective candidate for stroke // *Neurobiol. Dis*. 2006. № 21. P. 18–28; Ong L.L., Oldigs J.K., Kaminski A. et al. Hypoxic/normoxic preconditioning increases endothelial differentiation potential of human bone marrow CD133+ cells // *Tissue Eng Part C Methods*. 2010. № 16. P. 1069–1081; Manalo D.J., Rowan S., Lavoie T. et al. Transcription regulation of vascular endothelial cell responses to hypoxia by HIF-1 // *Blood*. 2005. № 105. P. 659–669; Leonard M.O., Cottell D.C., Godson C. et al. The role of HIF-1a in transcriptional regulation of the proximal tubular epithelial cell response to hypoxia // *J. Biol. Chem*. 2003. № 278. P. 40296–40304.

азота, адrenomедулин, эндотелин-1), ангиогенезом (фактор роста эндотелия сосудов (Vegf) и его рецептор Flt1), эритропозом и метаболизмом железа (эритропоэтин, трансферрин, рецептор трансферрина, церулоплазмин), пролиферацией клеток (Igf1, Igfbp1, Tgfb), энергетическим метаболизмом (переносчики глюкозы Glut1-Glut3, фосфоенолпируваткарбоксилаза, лактатдегидрогеназа-фосфатаза А, альфа-альдегезо-альфа-альдегоза А, альфа-альдегезо-альфа-альдегоза А, альфа-фосфоэз -С, эндолаза, тирозин-гидроксилаза и ингибитор активатора плазминогена-1)¹.

Сразу после понижения парциального давления кислорода, вызванного прекращением кровотока, концентрация АТФ и других высокоэнергетических фосфатных соединений падает, что в свою очередь приводит к снижению активности ионного насоса, рассеянию электрохимических градиентов K^+ , Na^+ , Cl^- и Ca^{2+} и деполяризации плазматической мембраны². Многочисленные исследовательские группы сообщили, что повышение $[Ca^{2+}]_i$ вызывает повреждение клеток посредством активации Ca^{2+} -чувствительных изоформ протеаз, протеинкиназы С, митоген-активированной протеинкиназы, JNK и p38, а также транскриптомных изменений, вызванных $[Ca^{2+}]_i$ -чувствительной транскрипцией элементов, таких как Ca^{2+} -реагирующие элементы (CRE), ответный элемент сыворотки (SRE) и активирующий белок-1 (AP-1)³. Постишемическая реперфузия, по-видимому, вызывает дальнейшее повреждение через митохондриальную пере-

¹ Sharp F.R., Ran R., Lu A. et al. Hypoxic preconditioning protects against ischemic brain injury // *NeuroEx*. 2004. № 1. P. 26–35; Maxwell P.H., Wiesener M.S., Chang G.W. et al. The tumor suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factor for oxygen-dependent proteolysis // *Nature*. 1999. № 399. P. 271–275; Kallio P.J., Pongratz I., Gradin K. et al. Activation of hypoxia-inducible factor 1a: posttranslational regulation and conformational change by recruitment of the Arnt transcription factor // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1997. № 94. P. 5667–5672; Semenza G.L., Jiang B.H., leung S.W. et al. Hypoxia response elements in the aldolase A, enolase 1, and lactate dehydrogenase A gene promoters contain essential binding sites for hypoxia-inducible factor 1 // *J. Biol. Chem.* 1996. № 271. P. 32529–32537; Ke Q., Costa M. Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) // *Mol. Pharmacol.* 2006. № 70. P. 1469–1480.

² Williams R.S., Benjamin I.J. Protective responses in the ischemic myocardium // *J. Clin. Invest.* 2000. № 106. P. 813–818.

³ Coulon V., Blanchard J-M. Flux calciques et expression gé'nique. *Medicine // Sciences*. 2001. № 17. P. 969–978.

грузку Ca^{2+} и выработку активных форм кислорода, включая супероксидные, гидроксильные и оксидные радикалы¹.

Недавно нами было установлено, что в некоторых типах клеток млекопитающих Ca^{2+} -истощение увеличивало, а не уменьшало количество транскриптов, дифференциальная экспрессия которых была вызвана ингибированием Na^+ , K^+ -АТФазы². Эти данные позволяют нам предположить, что наряду с перечисленными выше сигнальными путями, транскриптомные изменения в ишемических тканях вызываются возбуждением – транскрипционным соединением посредством нового $\text{Na}^+_i/\text{K}^+_i$ -опосредованного Ca^{2+}_i -независимого механизма.

4.3.1. Влияние убаина, безкалиевой среды и гипоксии на внутриклеточное содержание одновалентных ионов и АТФ

Шестичасовое ингибирование Na^+ , K^+ -АТФазы в сосудистых гладкомышечных клетках крысы (RVSMC) убаином увеличивало $[\text{Na}^+]_i$ с 15–20 до 130 мМ и уменьшало $[\text{K}^+]_i$ со 150 до 25 мМ (рис. 37). Несколько похожее повышение отношения $[\text{Na}^+]_i/[\text{K}^+]_i$ было обнаружено при 6-часовом ингибировании Na^+ , K^+ -АТФазы в среде без K^+ . Диссипация трансмембранных градиентов одновалентных катионов, запускаемых убаином и безкалиевой средой, сопровождалось повышением $[\text{Cl}^-]_i$ с 40 до 80 и 60 мМ соответственно (рис. 37).

На рис. 38 показано, что 24-часовая инкубация сосудистых гладкомышечных клеток крысы (RVSMC) при гипоксии и глюкозном голодании снижала содержание внутриклеточного АТФ в 3 раза, тогда как убаин ослаблял этот параметр менее чем на 20%.

¹ Lee J-M., Grabb M.C., Zipfel G.J. et al. Brain tissue responses to ischemia // J. Clin. Invest. 2000. № 106. P. 723–731.

² Koltsova S.V., Trushina Y., Haloui M. et al. Ubiquitous $[\text{Na}^+]_i/[\text{K}^+]_i$ -sensitive transcriptome in mammalian cells: evidence for Ca^{2+}_i -independent excitation-transcription coupling // PLoS One. 2012. № 7. P. 38032.

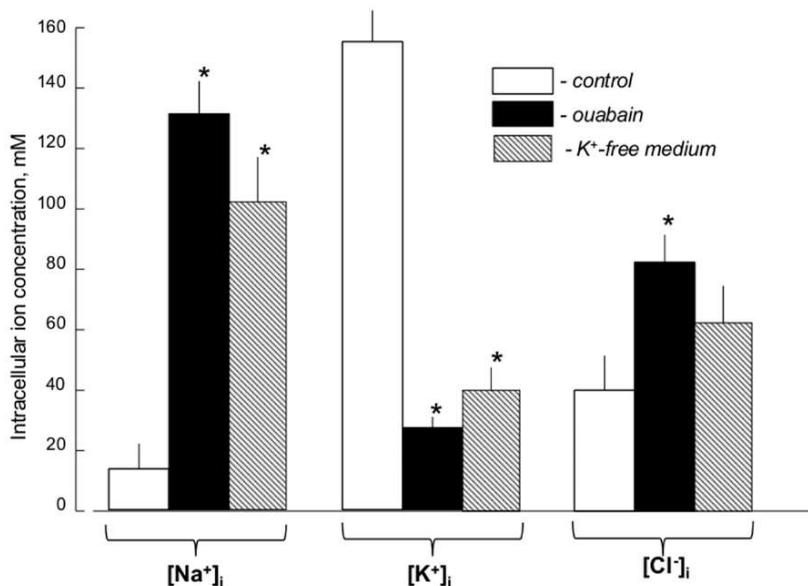


Рис. 37. Влияние ингибирования Na^+ , K^+ -АТФазы на внутриклеточное содержание одновалентных ионов. Гладкомышечные клетки аорты крысы инкубировали в контрольной безкальциевой среде или при наличии 3 мМ убаина в течение 6 часов. Представлено как среднее значение \pm стандартное отклонение из 3 независимых экспериментов, выполненных в четырех экземплярах. * $p < 0,05$ по сравнению с контролем¹

Необходимо отметить, что действие гипоксии и убаина на содержание АТФ сохранялось в среде с низким Na^+ , высоким K^+ . Обработка убаином привела к почти 10-кратному увеличению $[Na^+]_i$ и практически аналогичному снижению $[K^+]_i$. В условиях гипоксии $[Na^+]_i$ увеличивалась в 3 раза, $[K^+]_i$ уменьшалась в 2 раза.

¹ Koltsova S.V., Shilov B., Burulina J.G., Akimova O.A., Haloui M., Kapilevich L.V., Gusakova S.V., Tremblay J., Hamet P., Orlov S.N. Transcriptomic changes triggered by hypoxia: evidence for HIF-1 α -independent, $[Na^+]_i/[K^+]_i$ -mediated excitation-transcription coupling // PLoS ONE. 2014. № 9 (11): e110597. doi: 10.1371/journal.pone.0110597.

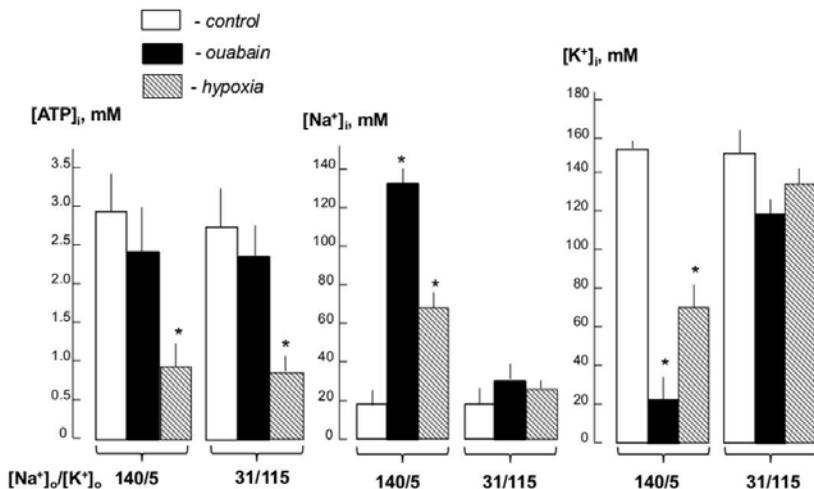


Рис. 38. Влияние убаина и гипоксии на внутриклеточные концентрации Na^+ , K^+ и АТФ. Гладкомышечные клетки аорты крысы инкубировали в течение 24 часов при нормальном парциальном давлении кислорода (5% CO_2 / контроль воздуха) \pm 3 мМ убаин или в гипоксических условиях (5% CO_2 / 95% N_2) / депривации глюкозы в норме с высоким Na^+ , низким K^+ ($[\text{Na}^+]_o/[\text{K}^+]_o = 140/5$) или в среде с низким содержанием Na^+ и высоким K^+ DMEM ($[\text{Na}^+]_o/[\text{K}^+]_o = 31/115$). Представлено как среднее значение \pm стандартное отклонение из 3 независимых экспериментов, выполненных в четырех экземплярах. * $p < 0.05$ по сравнению с контролем¹

Как и предполагалось, диссипация трансмембранных градиентов одновалентных катионов в низконатриевой, высококалиевой средах почти полностью устраняет действия убаина и гипоксии на соотношение $[\text{Na}^+]_i/[\text{K}^+]_i$ (рис. 38). В совокупности эти результаты позволили нам предположить, что транскриптомные изменения, вызванные гипоксией, по крайней мере частично опосредованы $\text{Na}^+_i/\text{K}^+_i$ -зависимым механизмом регуляции тран-

¹ Koltsova S.V., Shilov B., Burulina J.G., Akimova O.A., Haloui M., Kapilevich L.V., Gusakova S.V., Tremblay J., Hamet P., Orlov S.N. Transcriptomic changes triggered by hypoxia: evidence for HIF-1 α -independent, $[\text{Na}^+]_i/[\text{K}^+]_i$ -mediated excitation-transcription coupling // PLoS ONE. 2014. № 9 (11): e110597. doi: 10.1371/journal.pone.0110597.

скрипции, обнаруженным в наших недавних исследованиях¹ и описаном в предыдущих главах. Данные, рассмотренные ниже, подтверждают эту гипотезу.

4.3.2. Идентификация и функциональная характеристика [Na⁺]_i/[K⁺]_i-чувствительного транскриптома сосудистых гладкомышечных клеток крысы

Данные Affymetrix из 3 независимых экспериментов были нормализованы и проанализированы с помощью PCA (Principal Component Analysis)². Каждая точка на PCA представляет профиль экспрессии гена отдельного образца. Образцы, которые находятся рядом друг с другом в результирующем трехмерном графике, имеют сходный транскриптом, в то время как образцы, которые находятся дальше друг от друга, имеют разные профили транскрипции. Этот подход идентифицировал убаин и безкалиевую среду в качестве основных источников изменчивости в наборах данных (рис. 39, A).

На рис. 39, B показано, что количество дифференциально-экспрессированных транскриптов в RVSMC, обработанных в течение 6 ч убаином или средой, свободной от K⁺, составило 8 266 и 8 264 соответственно. Дальнейший анализ показал, что на экспрессию 6 412 транскриптов влияли оба стимула (рис. 39, B). Важно отметить, что мы наблюдали очень высокодостоверную ($p < 4 \times 10^{-9}$) и положительную ($R^2 > 0,80$) корреляцию между уровнями дифференциально-экспрессированных транскриптов, выявленных при наличии убаина и среды, свободной от K⁺ (рис. 40). Поскольку увеличение [Na⁺]_i и потеря [K⁺]_i в клетках, обработанных убаином или безкалиевой средой, сходны (рис. 37), результаты убедительно свидетельствуют о том, что

¹ Koltsova S.V., Trushina Y., Haloui M. et al. Ubiquitous [Na⁺]_i/[K⁺]_i-sensitive transcriptome in mammalian cells: evidence for Ca²⁺-independent excitation-transcription coupling // PLoS One. 2012. № 7. P. 38032.

² Pearson K. On lines and planes of closest fit to systems of points in space // Philos. Mag. 1901. № 2. P. 559–572.

изменения в экспрессии генов, вызванные обоими стимулами, происходят в ответ на повышение соотношения $[Na^+]_i/[K^+]_i$.

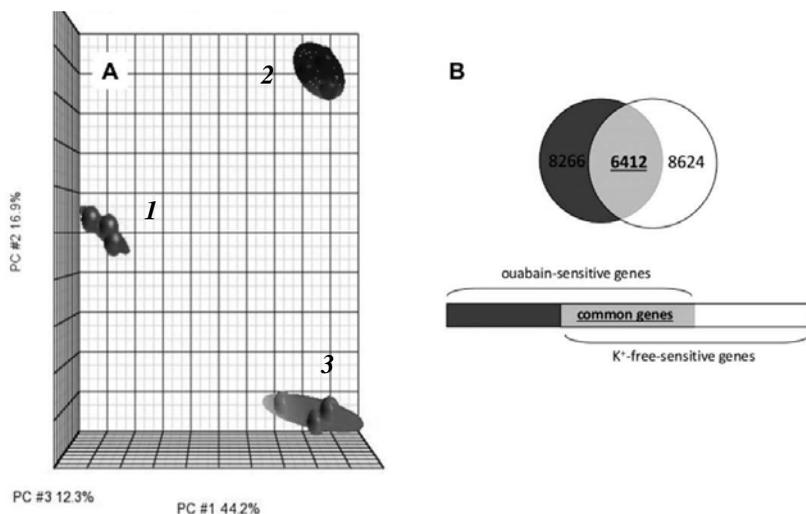


Рис. 39. Влияние ингибирования Na^+,K^+ -АТФазы на транскриптом гладкомышечных клеток аорты крысы. Клетки инкубировали в течение 6 часов в контрольной среде DMEM, безкалиевой среде DMEM или среде DMEM, содержащей 3 мМ убаина. Все эксперименты повторяли 3 раза. А. PCA транскриптомных изменений. Эллипсоиды выделяют порционирование образцов в зависимости от типа обработки. Главные компоненты в трехмерных графиках (PC № 1, PC № 2 и PC № 3) представляют изменчивость уровня экспрессии генов в наборах данных. В. Сравнительный анализ влияния ингибирования Na^+ , K^+ -АТФазы убаином и безкалиевой среды на транскриптом гладкомышечных клеток аорты крысы. Указано общее количество генов, экспрессия которых изменена убаиновой и безкалиевой средой более чем в 1,2 раза с $p < 0,05$; количество генов, затронутых обоими стимулами, выделено жирным шрифтом¹: 1 – контроль; 2 – безкалиевая среда; 3 – убаин

¹ Koltsova S.V., Shilov B., Burulina J.G., Akimova O.A., Haloui M., Kapilevich L.V., Gusakova SV, Tremblay J, Hamet P, Orlov SN. Transcriptomic changes triggered by hypoxia: evidence for HIF-1 α -independent, $[Na^+]_i/[K^+]_i$ -mediated excitation-transcription coupling // PLoS ONE. 2014. 9 (11): e110597. doi: 10.1371/journal.pone.0110597.

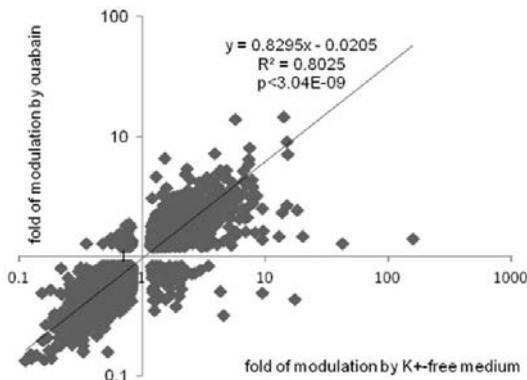


Рис. 40. Корреляционный анализ транскриптов, экспрессия которых изменена убаином и безкальциевой средой в гладкомышечных клетках аорты крысы более чем в 1,2 раза с $p < 0,05$. Экспрессия транскрипта в контрольных клетках была принята за 1,00. Изменение кратности определяли как логарифмически трансформированное отношение обработки / контроля экспрессии¹

Следует отметить, что вместе с увеличением отношения $[Na^+]_i/[K^+]_i$ как убаин, так и среда, свободная от K^+ , могут воздействовать на клетки независимо от подавления потока ионов, опосредованного Na^+ , K^+ -АТФазой. Так, например, недавние исследования показали, что убаин запускает взаимодействие α -субъединицы Na^+ , K^+ -АТФазы с мембраносвязанной нерецепторной тирозинкиназой Src, активацию Ras Raf/ERK1, 2, фосфатидилинозитол-3-киназы (PI(3)K), PI(3)K-зависимой протеинкиназы B, фосфолипазы C, $[Ca^{2+}]_i$ -колебания и усиление продукции ROS². С другой стороны, перенос клеток с высокой K^+ -проницаемостью в среду без K^+ приводит к временной гиперполяризации мембран, которая оказывает тканеспецифическое влияние на активность

¹ Koltsova S.V., Shilov B., Burulina J.G., Akimova O.A., Haloui M., Kapilevich L.V., Gusakova S.V., Tremblay J., Hamet P., Orlov S.N. Transcriptomic changes triggered by hypoxia: evidence for HIF-1 α -independent, $[Na^+]_i/[K^+]_i$ -mediated excitation-transcription coupling // PLoS ONE. 2014. 9 (11): e110597. doi: 10.1371/journal.pone.0110597.

² Schoner W., Scheiner-Bobis G. Endogenous and exogenous cardiac glycosides: their role in hypertension, salt metabolism, and cell growth // Am. J. Physiol. Cell Physiol. 2007. № 293. P. C509–C536; Liu J., Xie Z. The sodium pump and cardiotoxic steroids-induced signal transduction protein kinases and calcium-signaling microdomain in regulation of transporter trafficking // Biochim. Biophys. Acta. 2010. № 1802. P. 1237–1245.

различных мембраносвязанных белков¹ и влияет на распределение других проницаемых ионов, в том числе Ca^{2+} .

Действительно, мы отметили, что экспрессия нескольких генов, таких как *Cxcl2*, *Cxcl5*, *Tnfs5*, *Lif* и *Vcam1*, резко повышена в среде без K^+ по сравнению с клетками, обработанными уабаином (табл. 9).

Т а б л и ц а 9

Гены, экспрессия которых была повышена в гладкомышечных клетках аорты крысы, подвергнутых ингибированию Na^+ , K^+ -АТФазы²

Символ гена // название гена (ref #) – функциональные категории	Безкальциевая среда		Уабаин	
	Кратное изменение	p- уровень значимости	Кратное изменение	p- уровень значимости
<i>Gdf15</i> //growth differentiation factor 15 (D) – D	15,17	1,88E-06	7,44	6,03E-06
<i>Ereg</i> //epiregulin (1) – D	15,14	1,59E-06	9,63	4,10E-06
<i>Cyp1a1</i> //cytochrome P450, family 1, subfamily a (15) – O	14,22	1,59E-06	15,58	2,95E-06
<i>Fos</i> //FBJ osteosarcoma oncogene (427) – T	7,91	2,23E-05	3,95	1,23E-04
<i>Atf3</i> //activating transcription factor (27) – T	7,83	2,85E-05	4,53	1,07E-04
<i>Slc9a3</i> //solute carrier family 9 (sodium/hydrogen exchange – O	7,52	2,13E-06	3,25	1,22E-05
<i>Nppc</i> //natriuretic peptide C – O	7,42	6,35E-06	6,80	9,53E-06
<i>Bhlhe41</i> //basic helix-loop-helix family, member e41 – T	7,42	6,59E-06	6,23	1,13E-05
<i>Klf10</i> //Kruppel-like factor 10 (2) – T	7,16	4,32E-06	4,09	1,38E-05
<i>Trib1</i> //Tribbles homolog 1 (<i>Drosophila</i>) (2) – D	7,09	1,50E-06	4,47	4,54E-06
<i>Il6r</i> //interleukin 6 receptor (1) – I	6,71	9,08E-07	4,37	3,17E-06
<i>Ets2</i> //v-ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 2 – T	6,68	4,93E-06	5,35	9,09E-06
<i>Fam43a</i> //family with sequence similarity 43, member A – U	6,56	6,89E-06	3,45	3,34E-05
<i>Arrdc4</i> //arrestin domain containing 4- U	5,89	1,70E-06	3,06	7,44E-06
<i>Tppp</i> //tubulin polymerization promoting protein – D	5,89	1,11E-05	3,58	4,18E-05

¹ Bezanilla F. How membrane proteins sense voltage // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2008. № 9. P. 323–332; Okamura Y., Dizon J.E. Voltage-sensing phosphatase: its molecular relationship with PTEN // Physiology. 2011. № 26. P. 6–13.

² Koltsova S.V., Shilov B., Burulina J.G., Akimova O.A., Haloui M., Kapilevich L.V., Gusakova S.V., Tremblay J., Hamet P., Orlov S.N. Transcriptomic changes triggered by hypoxia: evidence for HIF-1 α -independent, $[Na^+]_i/[K^+]_i$ -mediated excitation-transcription coupling // PLoS ONE. 2014. № 9 (11): e110597. doi: 10.1371/journal.pone.0110597.

Символ гена // название гена (ref #) – функциональные категории	Безкальциевая среда		Уабаин	
	Кратное изменение	p- уровень значимости	Кратное изменение	p- уровень значимости
Ptgs2//prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (588) – I	5,68	1,44E-06	3,71	4,45E-06
<i>F3//coagulation factor III (thromboplastin, tissue factor 1</i>	5,64	1,62E-06	3,39	5,50E-06
<i>Enc1//ectodermal-neural cortex – D</i>	5,61	9,08E-07	3,85	2,57E-06
<i>Mmp28//matrix metalloproteinase 28 – I</i>	5,47	3,64E-06	4,24	7,44E-06
Epha2//Eph receptor A2 (3) – D	5,46	2,73E-06	3,32	8,72E-06
<i>RGD1307396//similar to RIKEN cDNA 6330406115 – U</i>	5,39	2,12E-06	3,94	5,19E-06
<i>Slc25a25//solute carrier family 25 (mitochondrial Pi carrier) – O</i>	5,04	2,66E-06	2,85	1,12E-05
Nr4a1//nuclear receptor subfamily 4, group A (14) – T	4,99	9,44E-06	4,67	1,33E-05
Per2//period homolog 2 (Drosophila)(6) – O	4,88	7,48E-06	5,47	8,33E-06
<i>Zbtb2//zinc finger and BTB domain containing 2 – T</i>	4,68	2,63E-06	3,09	8,01E-06
<i>Rab32//RAB32, member RAS oncogene family – T</i>	4,68	1,49E-06	2,51	7,26E-06
<i>Isg20//interferon stimulated exonuclease gene 20- I</i>	4,67	2,44E-06	4,71	4,06E-06
Hbegf//heparin-binding EGF-like growth factor (4) – D	4,65	2,60E-06	2,69	1,10E-05
<i>Pde4b//phosphodiesterase 4B, cAMP-specific – O</i>	4,52	3,64E-06	2,43	2,15E-05
<i>Csrmp1//cysteine-serine-rich nuclear protein 1-D</i>	4,52	3,63E-06	3,52	7,73E-06
<i>PVR//poliovirus receptor – D</i>	4,50	3,47E-06	3,58	7,26E-06
Hes1//hairy and enhancer of split 1 (Drosophila) (34) – T	4,47	5,68E-06	2,94	1,93E-05
Bcl6//B-cell CLL/lymphoma 6 (1) – D	4,45	2,12E-06	2,90	7,26E-06
<i>Ier5//immediate early response 5-T</i>	4,45	5,59E-06	2,76	2,26E-05
Sgk1//serum/glucocorticoid regulated kinase 1 (14) – O	4,42	3,96E-06	3,64	7,69E-06
Plk3//polo-like kinase 3 (20) – D	4,41	1,03E-05	3,13	3,05E-05
<i>Klf5//Kruppel-like factor 5-T</i>	4,39	1,17E-05	3,43	2,64E-05
<i>Mthfd21//methylenetetrahydrofolate dehydrogenase – O</i>	4,38	9,85E-06	2,49	6,04E-05
Areg//amphiregulin (3) – D	4,37	1,00E-05	3,26	2,51E-05
<i>RGD1563891//similar to core 2 beta-1,6-N-acetylglucosam – U</i>	4,36	5,54E-05	3,52	1,17E-04
Fst//follistatin (9) – D	4,35	6,59E-06	5,50	6,34E-06
<i>Fos1//fos-like antigen 1-T</i>	4,27	1,20E-05	3,41	2,59E-05

Символ гена // название гена (ref #) – функциональные категории	Безкальциевая среда		Убаин	
	Кратное изменение	p- уровень значимости	Кратное изменение	p- уровень значимости
Ier2//immediate early response 2 (1) – T	4,24	2,62E-05	1,99	6,15E-04
Baiap2//Bai1-associated protein 2-D	4,14	9,08E-07	3,98	2,57E-06
Rassf9//Ras association (RalGDS/AF-6) domain family – D	4,12	2,41E-06	2,86	7,26E-06
Chka//choline kinase alpha – O	4,10	1,82E-06	4,71	2,95E-06
<i>Irf2bp1//interferon regulatory factor 2-binding protein-like – I</i>	4,10	3,37E-05	3,27	7,69E-05
Mum111//melanoma-associated antigen (mutated) 1 -like 1-I	4,00	4,60E-06	2,69	1,53E-05
Nr4a3//nuclear receptor subfamily 4, group A, mem 3 (5) – T	3,99	1,00E-05	4,13	1,19E-05
Tas2r135//taste receptor, type 2, member 135-O	3,94	3,86E-05	3,56	6,11E-05
Erf1//ERBB receptor feedback inhibitor 1-D	3,93	4,30E-06	2,82	1,19E-05
Skil//SKI-like oncogene – T	3,92	9,08E-07	2,13	6,03E-06
Zswim4//zinc finger, SWIM-type containing 4-T	3,92	2,09E-06	2,31	1,02E-05
Dusp10//dual specificity phosphatase 10 (3)-D	3,92	8,95E-06	2,09	8,82E-05
Has2//hyaluronan synthase 2 (3) – I	3,91	9,85E-06	7,60	4,67E-06
Txnip//thioredoxin interacting protein (9) – I	3,88	1,82E-06	2,31	8,58E-06
Mdm2//Mdm2 p53 binding protein homolog (mouse) (22) – T	3,85	9,08E-07	2,98	2,95E-06
Fam171b//family with sequence similarity 171, member B – U	3,84	3,05E-06	4,82	3,26E-06
Stk17b//serine/threonine kinase 17b -O	3,76	3,65E-06	4,00	4,67E-06
<i>Zfp36//zinc finger protein 36-T</i>	3,70	6,56E-05	2,15	7,25E-04
Rab20//RAB20, member RAS oncogene family – I	3,66	4,53E-06	3,90	5,52E-06
Pnrc1//proline-rich nuclear receptor coactivator 1-T	3,66	2,19E-07	3,10	7,72E-07
Abc11b//ATP-binding cassette, subfamily B, mem 1B (3) – O	3,65	9,08E-07	2,72	3,17E-06
Smad3//SMAD family member 3 (20) – T	3,64	4,27E-06	2,78	1,04E-05
RGD1306119//similar to transcriptional regulating prot 132 – T	3,59	1,13E-05	1,80	2,42E-04
Htr2a//5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 2A (1) – O	3,58	9,08E-07	3,10	2,78E-06
Jun//jun proto-oncogene (799) – T	3,57	1,77E-06	2,76	4,54E-06
Zfat//zinc finger and AT hook domain containing – T	3,57	4,59E-06	3,01	8,69E-06
Dusp6//dual specificity phosphatase 6 (2) – O	3,56	4,79E-06	2,42	1,73E-05

Символ гена // название гена (ref #) – функциональные категории	Безкальциевая среда		Уабаин	
	Кратное изменение	p- уровень значимости	Кратное изменение	p- уровень значимости
Ier5l//immediate early response 5-like T	3,55	4,98E-06	2,71	1,29E-05
Bmp2//bone morphogenetic protein 2 (13) – D	3,52	3,96E-05	3,69	4,14E-05
Gnat1//guanine nucleotide-binding protein, alpha t – O	3,50	2,44E-06	3,86	3,26E-06
RGD1305254//similar to transmembrane protein 2-U	3,48	3,31E-05	2,14	2,69E-04
Alkbh//alkB, alkylation repair homolog (E. coli) – D	3,45	2,26E-06	2,44	7,40E-06
Klf4//Kruppel-like factor 4 (gut) (5) – T	3,44	1,54E-05	2,49	5,57E-05
Hapln3//hyaluronan and proteoglycan link protein 3 – O	3,44	2,58E-05	1,95	3,45E-04
<i>Mafk//v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma onco hom K-T</i>	3,42	8,48E-06	2,75	1,91E-05
<i>Maff//v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma onco hom F-T</i>	3,42	2,09E-05	2,55	6,83E-05
Dusp16//dual specificity phosphatase 16 (2) – O	3,39	1,94E-05	2,23	1,10E-04
Gprc5a//G protein-coupled receptor, family C, gr 5, mem A-O	3,38	3,26E-05	4,73	1,74E-05
Lgr5//leucine-rich repeat contain G protein coupled recept -O	3,32	1,11E-05	4,12	8,86E-06
Per1//period homolog 1 (Drosophila) (4) – O	3,32	5,54E-06	4,09	5,06E-06
Cd80//Cd80 molecule (28) -I	3,30	6,40E-06	2,10	3,72E-05
Mybl1//myeloblastosis oncogene-like 1 (1) – T	3,29	1,86E-05	2,03	1,55E-04
Pim1//pim-1 oncogene (5) – D	3,27	6,86E-06	1,84	8,03E-05
Osmr//oncostatin M receptor – I	3,25	2,76E-05	2,00	2,57E-04
Smad7//SMAD family member 7 (6) – D	3,23	4,22E-06	2,05	2,23E-05
Cpeb4//cytoplasmic polyadenyl element bind prot 4 (1) – T	3,20	4,79E-06	3,01	7,42E-06
Aen//apoptosis-enhancing nuclease (5) D	3,17	5,96E-06	3,10	8,39E-06
Nr4a2//nuclear receptor subfamily 4, group A, mem 2 (4) – T	3,16	1,56E-05	3,99	1,15E-05
Tnfrsf1b//tumor necrosis factor receptor superfamily – D	3,15	2,67E-05	1,99	2,31E-04
Lhfp12//lipoma HMGIC fusion partner-like 2-O	3,10	4,60E-06	1,76	5,10E-05
Rap2b//RAP2B, member of RAS oncogene family – O	3,07	1,00E-05	2,34	3,03E-05
Lmbrd2//LMBR1 domain containing 2-U	3,07	9,85E-06	2,70	1,77E-05
Cdc42ep1//CDC42 effector protein (Rho GTPase binding) 1 – D	3,06	2,92E-05	2,80	4,71E-05

Символ гена // название гена (ref #) – функциональные категории	Безкальциевая среда		Уабаин	
	Кратное изменение	p- уровень значимости	Кратное изменение	p- уровень значимости
Kdm6b/lysine (K)-specific demethylase 6B – T	3,04	7,50E-06	2,04	3,94E-05
RGD1310794//similar to RIKEN cDNA C030048B08 – D	3,04	2,47E-04	4,01	1,07E-04
Sertad2//SERTA domain containing 2-T	3,03	1,40E-05	2,55	3,05E-05

Примечание. Гладкомышечные клетки аорты крысы обрабатывали 3 мМ уабаином или безкальциевой средой в течение 6 часов. В списке указаны гены, экспрессия которых была увеличена в среде без K⁺ более чем в 3 раза и которые отличались менее чем в 2 раза в присутствии уабаина по сравнению со средой, не содержащей K⁺. Анализ экспрессии GeneChip проводили с помощью Affymetrix GeneChip system. Содержание мРНК в контрольных клетках принималось равным 1,00. Гены, экспрессия которых изменяется при ишемии/гипоксии, выделены жирным шрифтом. В скобках указаны номера ссылок в PubMed. Выделены курсивом гены, дифференциальная экспрессия которых была обнаружена в ишемической ткани на основе анализа микроматрицы всего генома¹. Данные о функции гена из базы данных GeneCards (www.genecards.org) были использованы для идентификации функции гена. Функциональные категории: T – регуляторы транскрипции/трансляции, процессинга и деградации РНК; D – регуляторы клеточной адгезии, миграции, пролиферации, дифференцировки и гибели; I – воспаление и иммунные реакции; O – другие; U – неизвестная функция.

Учитывая это, мы сфокусировали наш анализ на $[Na^+]_i/[K^+]_i$ -чувствительных генах, экспрессия которых различалась как в среде без K⁺, так и в присутствии уабаина. $[Na^+]_i/[K^+]_i$ -чувствительные гены, экспрессия которых была увеличена или

¹ Mazzatti D., Lim F-Lt., O'Hara A. et al. A microarray analysis of the hypoxia-induced modulation of gene expression in human adipocytes // Arch. Physiol. Biochem., 2012. № 118. P. 112–120; Lu A., Tang Y., Ran R. et al. Genomics of the perinfarction cortex after focal cerebral ischemia // J. Cereb. Blood Flow Met. 2003. № 23. P. 786–810; Kamphuis W., Dijk F., van Soest S. et al. Global gene expression profiling of ischemic preconditioning in the rat retina // Mol. Vision. 2007. № 13. P. 1020–1030; Tang Y., Pacary E., Freret T. et al. Effect of hypoxic preconditioning on brain genomic response before and following ischemia in the adult mouse: identification of potential neuroprotective candidate for stroke // Neurobiol. Dis. 2006. № 21. P. 18–28; Ong L.L., Oldigs J.K., Kaminski A. et al. Hypoxic/normoxic preconditioning increases endothelial differentiation potential of human bone marrow CD133+ cells // Tissue Eng Part C Methods. 2010. № 16. P. 1069–1081; Manalo D.J., Rowan S., Lavoie T. et al. Transcriptional regulation of vascular endothelial cell responses to hypoxia by HIF-1 // Blood. 2005. № 105. P. 659–669; Leonard M.O., Cottell D.C., Godson C. et al. The role of HIF-1 α in transcriptional regulation of the proximal tubular epithelial cell response to hypoxia // J. Biol. Chem. 2003. № 278. P. 40296–40304.

уменьшена при действии этих стимулов более чем в 3 раза, перечислены в табл. 10, 11 соответственно.

Хотя функциональная характеристика является несколько искусственной – поскольку гены обычно многофункциональны и подразделяются на несколько категорий – мы обнаружили, что как активируемая, так и ингибируемая части $[Na^+]_i/[K^+]_i$ -чувствительного транскриптома обогащены генами, участвующими в регуляции транскрипции / трансляции, клеточной адгезии, миграции, пролиферации, дифференцировке и смерти клеток (табл. 9, 10, рис. 41).

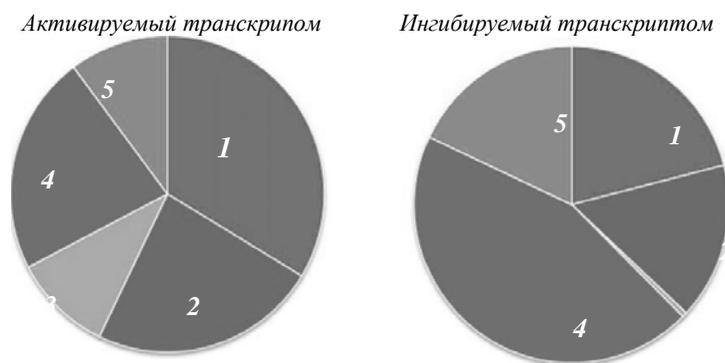


Рис. 41. Распределение $[Na^+]_i/[K^+]_i$ -чувствительных генов среди основных функциональных категорий¹: 1 – транскрипция / трансляция; 2 – дифференцировка / пролиферация / смерть / адгезия; 3 – иммунный / воспалительный ответ; 4 – другие категории; 5 – неизвестные функции

¹ Koltsova S.V., Shilov B., Burulina J.G., Akimova O.A., Haloui M., Kapilevich L.V., Gusakova S.V., Tremblay J., Hamet P., Orlov S.N. Transcriptomic changes triggered by hypoxia: evidence for HIF-1 α -independent, $[Na^+]_i/[K^+]_i$ -mediated excitation-transcription coupling // PLoS ONE. 2014. № 9 (11): e110597. doi: 10.1371/journal.pone.0110597.

Таблица 10

Гены, экспрессия которых была снижена в гладкомышечных клетках аорты крысы, подвергнутых ингибированию Na⁺, K⁺-АТФазы¹

Символ гена // название гена (ref #) – функциональные категории	Безкальцевая среда		Убаин	
	Кратное изменение	р-уровень значимости	Кратное изменение	р-уровень значимости
Syt17//synaptotagmin XVII – O	-3,01	1,19E-05	-1,81	1,35E-04
Phyh//phytanoyl-CoA 2-hydroxylase – O	-3,02	4,62E-05	-2,84	6,80E-05
Ttc21b//tetraatricopeptide repeat domain 21B – O	-3,03	4,28E-05	-4,06	2,24E-05
Parp2//poly (ADP-ribose) polymerase 2-T	-3,03	2,91E-05	-3,94	1,77E-05
RGD1309534//similar to RIKEN cDNA 4931406C07 – U	-3,03	2,51E-05	-2,12	1,31E-04
Mus81//MUS81 endonuclease homolog (S. cerevisiae) – T	-3,03	8,76E-06	-2,52	1,88E-05
Lactb2//lactamase, beta 2-O	-3,04	2,89E-05	-3,41	2,48E-05
Fbxw17//F-box and WD-40 domain protein 17-U	-3,05	3,50E-05	-3,61	2,57E-05
Gnb5//guanine nucleotide binding prot beta 5 (1) – O	-3,05	1,03E-05	-2,63	2,03E-05
Mrpl32//mitochondrial ribosomal protein L32 – O	-3,06	5,76E-05	-1,83	8,71E-04
MGC94199//similar to RIKEN cDNA 2610301B20; -U	-3,06	2,15E-04	-3,68	1,26E-04
Zscan12//zinc finger and SCAN domain containing 12-T	-3,07	2,82E-05	-3,37	2,57E-05
Top3b//topoisomerase (DNA) III beta -T	-3,07	9,85E-06	-3,90	7,40E-06
Zfp259//zinc finger protein 25 – T	-3,08	3,32E-06	-1,61	5,70E-05
Myo19//myosin XIX – O	-3,09	1,64E-05	-2,24	6,71E-05
Prkg1//protein kinase, AMP-activat, gamma 1 (1) – O	-3,09	4,04E-06	-1,67	6,07E-05
Gtpbp5//GTP-binding protein 5-T	-3,10	2,84E-05	-2,83	4,59E-05
Dcaf4//DDB1 and CUL4 associated factor 4-O	-3,10	1,20E-05	-2,59	2,64E-05
LOC687284//similar to excision repair cross-compl – U	-3,10	7,20E-06	-3,34	8,30E-06

¹ Koltsova S.V., Shilov B., Burulina J.G., Akimova O.A., Haloui M., Kapilevich L.V., Gusakova S.V., Tremblay J., Hamet P., Orlov S.N. Transcriptomic changes triggered by hypoxia: evidence for HIF-1a -independent, [Na⁺]_i/[K⁺]_i-mediated excitation-transcription coupling // PLoS ONE. 2014. № 9 (11): e110597. doi: 10.1371/journal.pone.0110597.

Символ гена // название гена (ref #) – функциональные категории	Безкальцевая среда		Уабаин	
	Кратное изменение	P-уровень значимости	Кратное изменение	P-уровень значимости
<i>Gdf10</i> // <i>growth differentiation factor 10-D</i>	-3,11	9,18E-05	-2,69	1,83E-04
<i>Tmem184c</i> //transmembrane protein 184C – D	-3,11	3,45E-06	-2,02	1,69E-05
<i>Deac1</i> //deaminase domain containing 1-O	-3.11	4.60E-05	-3.13	5.42E-05
<i>RGD1311422</i> //similar to CG8841-PA – U	-3.12	9.85E-06	-2.60	2.07E-05
<i>Parp1</i>//poly (ADP-ribose) polymerase 1 (46) – D	-3.13	1.87E-06	-2.75	4.29E-06
<i>Rtel1</i> //regulator of telomere elongation helicase 1 – D	-3.13	8.33E-06	-2.29	2.80E-05
<i>Dhcr7</i> //7-dehydrocholesterol reductase – O	-3.14	3.83E-05	-4.86	1.54E-05
<i>Gatsl2</i> //GATS protein-like 2-T	-3.14	3.51E-05	-1.97	3.31E-04
<i>Gbl1l2</i> //galactosidase, beta 1 -like 2-O	-3.14	2.49E-05	-3.60	2.09E-05
<i>RGD1563798</i> //similar to BC040823 protein – U	-3,14	2,24E-05	-2,88	3,62E-05
<i>Gbas</i> //glioblastoma amplified sequence – O	-3,15	2,23E-06	-2,92	4,31E-06
<i>Cybas3</i> //cytochrome b, ascorbate dependent 3-O	-3,15	4,82E-06	-3,72	4,97E-06
<i>Fn3krp</i> //fructosamine-3-kinase-related protein – O	-3,16	2,94E-06	-3,92	3,24E-06
<i>Mrpl34</i> //mitochondrial ribosomal protein L34 – T	-3,17	3,78E-04	-2,27	1,88E-03
<i>Nsun6</i> //NOP2/Sun domain family, member 6-U	-3,17	1,49E-05	-1,99	1,19E-04
<i>Zdhhc12</i> //zinc finger, DHHC-type containing 12-T	-3,17	5,52E-05	-4,22	2,93E-05
<i>Rab15</i> //RAB, member RAS oncogene family-like 5-U	-3,18	5,97E-05	-2,89	9,60E-05
<i>Aacs</i> //acetoacetyl-CoA synthetase – O	-3,18	5,96E-06	-2,42	1,68E-05
<i>Xylb</i> //xylulokinase homolog (H, influenzae) – U	-3,19	1,70E-06	-2,51	4,54E-06
<i>Lhfp</i> //lipoma HMGIC fusion partner – U	-3,19	4,12E-06	-2,65	8,66E-06
<i>Prkg2</i>//protein kinase, AMP-activated gamma 2 (4) – O	-3,20	3,79E-06	-2,61	8,39E-06
<i>Six2</i> //SIX homeobox 2 (1) – T	-3,20	3,23E-06	-2,19	1,19E-05
<i>Uri1</i> //URI1, prefoldin-like chaperone -T	-3,21	4,03E-06	-3,34	5,07E-06
<i>Aarsd1</i> //alanyl-tRNA synthetase domain containing 1-T	-3,21	1,80E-05	-3,10	2,46E-05
<i>Pik3r2</i> //phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit 2 – O	-3,22	1,03E-05	-2,96	1,62E-05
<i>Mknr2</i> //makorin, ring finger protein, 2-O	-3,22	6,43E-05	-2,84	1,16E-04
<i>Map9</i> //microtubule-associated protein 9-D	-3,25	1,70E-05	-2,97	2,74E-05

Символ гена // название гена (ref #) – функциональные категории	Безкальцевая среда		Уабаин	
	Кратное изменение	Р-уровень значимости	Кратное изменение	Р-уровень значимости
Dnajc2//DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, memb 2-T	-3,25	1,73E-05	-2,29	7,41E-05
Asb13//ankyrin repeat and SOCS box-containing 13-O	-3,26	3,47E-06	-2,65	7,73E-06
RGD1561270//similar to zinc finger protein 248-T	-3,26	2,32E-05	-3,71	2,04E-05
Hebp2//heme-binding protein 2-O	-3,26	6,69E-05	-2,54	2,00E-04
Cers4//ceramide synthase 4-O	-3,28	5,44E-05	-2,94	9,07E-05
MGC108823//similar to interferon-inducible GTPase – U	-3,28	1,20E-04	-3,17	1,52E-04
<i>Bmyc</i> //brain expressed myelocytomatosis oncogene – T	-3,28	2,90E-05	-3,01	4,61E-05
Pitpna//phosphatidylinositol transfer protein, alpha – O	-3,28	9,08E-07	-2,84	2,91E-06
Npepl1//aminopeptidase-like 1 – O	-3,29	7,69E-06	-3,32	9,65E-06
Mtrr//5-methyltetrahydrofolate-homocystein (2) – O	-3,29	1,07E-05	-3,02	1,73E-05
Akap6//A kinase (PRKA) anchor protein 6-O	-3,30	3,74E-05	-3,60	3,49E-05
Ttc8//tetratricopeptide repeat domain 8-D	-3,30	5,05E-06	-3,72	5,61E-06
Dgcr8//DiGeorge syndrome critical region gene 8-T	-3,30	2,90E-06	-1,70	3,90E-05
Mgat4b//mannosyl (alpha-1,3-)glycoprotein beta -O	-3,30	3,01E-05	-3,84	2,40E-05
LOC687284//similar to excision repair cross-complem – U	-3,32	2,05E-05	-3,60	2,05E-05
Rpusd1//RNA pseudouridylate synthase domain-cont – T	-3,32	1,85E-05	-2,74	4,20E-05
LOC500420//similar to CG12279-PA – U	-3,33	2,38E-04	-5,21	7,30E-05
Stxbp2//syntaxin-binding protein 2-O	-3,33	9,86E-06	-4,00	8,49E-06
Mis18bp1//MIS18-binding protein 1-U	-3,34	6,29E-06	-1,76	1,02E-04
Nol3//nucleolar protein 3, apoptosis repressor (16) – D	-3,34	4,84E-05	-2,16	3,44E-04
Lst8//MTOR-associated protein, LST8 homolog – T	-3,34	1,25E-05	-2,80	2,66E-05
Bbs9//Bardet-Biedl syndrome 9-O	-3,35	6,12E-06	-2,70	1,38E-05
Apip//APAF1-interacting protein (1) – D	-3,35	9,85E-06	-3,22	1,35E-05
Rabif//RAB-interacting factor (1) – O	-3,35	9,08E-07	-1,71	7,26E-06
<i>Vsnl1</i> //visinin-like 1-O	-3,36	1,00E-04	-3,19	1,37E-04
Fig4//FIG4 homolog, SAC1 lipid phosphatase domain – O	-3,37	9,33E-06	-3,14	1,37E-05

Символ гена // название гена (ref #) – функциональные категории	Безкальцевая среда		Уабаин	
	Кратное изменение	Р-уровень значимости	Кратное изменение	Р-уровень значимости
Tmem209//transmembrane protein 209-U	-3,37	1,96E-05	-4,16	1,46E-05
LOC685574//zinc finger protein 334-T	-3,38	3,36E-05	-3,18	4,91E-05
Arhgef25//Rho guanine nucleotide exchange factor 25-D	-3,40	5,05E-06	-3,13	8,33E-06
Vamp4//vesicle-associated membrane protein 4-O	-3,40	1,52E-04	-2,58	5,08E-04
Pold2//polymerase (DNA directed), delta 2, regulat sub – D	-3,40	2,88E-05	-2,06	2,70E-04
Ssbp1//single-stranded DNA-binding protein 1-O	-3,40	6,62E-06	-3,45	8,57E-06
Slc35d2//solute carrier family 35, member D2-O	-3,40	6,67E-06	-3,32	9,24E-06
LOC683626//similar to limb-bud and heart – U	-3,41	1,30E-05	-1,84	2,13E-04
Lrrk1//leucine-rich repeat kinase 1-O	-3,41	4,33E-05	-3,31	5,60E-05
RGD1309362//similar to interferon-inducible GTPase – O	-3,41	1,21E-04	-3,64	1,10E-04
Acat3//acetyl-coenzyme A acetyltransferase 3-O	-3,41	4,09E-06	-2,35	1,42E-05
Pter//phosphotriesterase related – O	-3,42	8,74E-06	-2,31	3,69E-05
RragB//Ras-related GTP-binding B-D	-3,43	1,93E-04	-2,56	7,02E-04
Pdcd4//programmed cell death 4 (5) – D	-3,43	1,28E-05	-1,74	3,18E-04
Aaas//achalasia, adrenocortical insufficiency, alacrimia – O	-3,44	3,64E-06	-2,53	1,03E-05
Bph1//biphenyl hydrolase-like (serine hydrolase) O	-3,45	1,38E-05	-3,96	1,28E-05
Zfp68//zinc finger protein 68-T	-3,45	1,17E-03	-3,40	1,31E-03
Stampb//Stam-binding protein – I	-3,45	2,04E-05	-4,59	1,33E-05
Ptcd2//pentatricopeptide repeat domain 2-U	-3,46	2,03E-04	-4,01	1,41E-04
Aurkb//aurora kinase B-D	-3,47	8,48E-06	-1,84	1,24E-04
Mvd//mevalonate (diphospho) decarboxylase – O	-3,49	5,26E-05	-2,07	5,61E-04
Ssh3//slingshot homolog 3 (Drosophila) – O	-3,50	1,82E-06	-3,39	3,26E-06
Zfp110//zinc finger protein 110-T	-3,50	1,03E-05	-3,33	1,46E-05
Hscb//HscB iron-sulfur cluster co-chaperone homolog – O	-3,50	2,66E-05	-3,00	5,16E-05
Tfip11//tuftelin-interacting protein 11-D	-3,51	5,98E-06	-4,67	5,00E-06
Thtpa//thiamine triphosphatase/-O	-3,52	1,26E-05	-3,27	1,96E-05
LOC100362431//tetratricopeptide repeat domain 30B – U	-3,52	2,88E-05	-3,00	5,70E-05

Символ гена // название гена (ref #) – функциональные категории	Безкальцевая среда		Уабаин	
	Кратное изменение	Р-уровень значимости	Кратное изменение	Р-уровень значимости
RGD1564300//similar to phosphoserine kinase – U	-3,53	2,95E-05	-3,91	2,74E-05
Lrrc8e//leucine-rich repeat containing 8 family, memb E – D	-3,53	3,20E-04	-4,51	1,63E-04
Zfp39//zinc finger protein 39-T	-3,54	1,22E-04	-3,72	1,18E-04
Fbx14//F-box and leucine-rich repeat protein 4-D	-3,55	1,87E-06	-3,72	3,17E-06
Mpped2//metallophosphoesterase domain containing 2 – O	-3,55	2,65E-05	-3,28	4,02E-05
Trak2//trafficking protein, kinesin binding 2-O	-3,55	8,54E-06	-2,34	3,83E-05
Ecsit//ECSIT homolog (Drosophila) -O	-3,55	1,18E-05	-3,75	1,34E-05
Tfip11//tuftelin-interacting protein 11-D	-3,51	5,98E-06	-4,67	5,00E-06
Thtpa//thiamine triphosphatase/-O	-3,52	1,26E-05	-3,27	1,96E-05
LOC100362431//tetratricopeptide repeat domain 30B – U	-3,52	2,88E-05	-3,00	5,70E-05
RGD1564300//similar to phosphoserine kinase – U	-3,53	2,95E-05	-3,91	2,74E-05
Tdp1//tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1-D	-3,55	9,58E-06	-4,83	7,04E-06
Pik3c2b//phosphoinositide-3-kinase, class 2, beta-O	-3,56	1,12E-05	-3,20	1,86E-05
Nexn/nexilin (F actin binding protein) – D	-3,59	8,85E-05	-2,98	1,92E-04
Impa2//inositol (myo)-1(or 4)-monophosphat 2 (1) – O	-3,60	7,30E-05	-2,24	5,86E-04
Oas12//2'-5' oligoadenylate synthetase-like 2-T	-3,60	4,54E-05	-4,51	3,03E-05
Stk25//serine/threonine kinase 25 (1) – O	-3,60	3,32E-06	-2,97	6,95E-06
Cnpy2//canopy 2 homolog (zebrafish) – D	-3,61	1,13E-05	-3,23	1,91E-05
Mrv1//murine retrovirus integration site 1 homolog – U	-3,62	3,34E-06	-4,17	4,06E-06
Mrp140//mitochondrial ribosomal protein L40 -T	-3,62	2,39E-05	-3,43	3,39E-05
Plin3//perilipin 3//9q11//316130 -O	-3,63	8,44E-06	-2,34	4,00E-05
Tdp1//tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1-D	-3,55	9,58E-06	-4,83	7,04E-06
Pik3c2b//phosphoinositide-3-kinase, class 2, beta-O	-3,56	1,12E-05	-3,20	1,86E-05
Nexn/nexilin (F actin binding protein) – D	-3,59	8,85E-05	-2,98	1,92E-04
Impa2//inositol (myo)-1(or 4)-monophosphat 2 (1) – O	-3,60	7,30E-05	-2,24	5,86E-04
Fam118a//family with sequence similarity 118, mem A – U	-3,64	5,05E-06	-4,01	6,02E-06

Символ гена // название гена (ref #) – функциональные категории	Безкальцевая среда		Убаин	
	Кратное изменение	Р-уровень значимости	Кратное изменение	Р-уровень значимости
<i>Mmd</i> // <i>monocyte to macrophage differentiation-ass</i> – U	-3,65	1,43E-05	-2,83	3,77E-05
<i>Hdcd2</i> //HD domain-containing 2 – U	-3,66	1,49E-05	-3,68	1,88E-05
<i>Zfp386</i> //zinc finger protein 386 (Kruppel-like) – T	-3,67	1,00E-04	-3,02	2,20E-04
<i>Ficd</i> //FIC domain-containing – O	-3,67	7,72E-06	-3,04	1,56E-05
<i>Wdr11</i> //WD repeat domain 11-T	-3,68	2,74E-05	-5,73	1,32E-05
<i>Xrcc6</i> //X-ray repair complement defective repair – D	-3,68	1,18E-05	-2,37	6,06E-05
<i>Stx17</i> //syntaxin 17-D	-3,68	1,03E-05	-5,02	7,40E-06
<i>LOC100362548</i> //rCG52086-like – U	-3,70	4,60E-06	-2,04	3,71E-05
<i>Nipsnap3b</i> //nipsnap homolog 3B (C, elegans) – O	-3,71	1,64E-05	-1,95	2,63E-04
<i>Fam118a</i> //family with sequence similarity 118, mem A -U	-3,64	5,05E-06	-4,01	6,02E-06
<i>Mmd</i> // <i>monocyte to macrophage differentiation-ass</i> – U	-3,65	1,43E-05	-2,83	3,77E-05
<i>Hdcd2</i> //HD domain-containing 2 – U	-3,66	1,49E-05	-3,68	1,88E-05
<i>Zfp386</i> //zinc finger protein 386 (Kruppel-like) – T	-3,67	1,00E-04	-3,02	2,20E-04
<i>Cad</i> //carbamoyl-phosphate synthetase 2 – O	-3,72	1,09E-05	-2,72	3,33E-05
<i>Gemin4</i> //gem (nuclear organelle) associated protein 4 – T	-3,73	3,95E-05	-4,65	2,74E-05
<i>Nagk</i> //N-acetylglucosamine kinase -O	-3,73	4,98E-06	-4,28	5,47E-06
<i>Tamm41</i> //TAM41, mitochondrial translocator assembly – O	-3,73	7,27E-06	-2,99	1,61E-05
<i>Msto1</i> //misato homolog 1 (Drosophila) – O	-3,74	1,23E-05	-3,57	1,77E-05
<i>Mutyh</i>//mutY homolog (E, coli) (3) – D	-3,76	9,85E-06	-3,14	1,91E-05
<i>Stat2</i>//signal transducer, activator of transcrip 2 (3) – T	-3,76	1,50E-06	-4,33	2,78E-06
<i>Gcs1</i> //glucosidase 1-O	-3,81	3,65E-05	-2,03	5,66E-04
<i>Ccdc36</i> //coiled-coil domain containing 36-U	-3,84	2,43E-06	-2,85	6,65E-06
<i>Odf31l</i> //outer dense fiber of sperm tails 3-like 1-U	-3,88	1,54E-05	-4,58	1,37E-05
<i>Cad</i> //carbamoyl-phosphate synthetase 2 – O	-3,72	1,09E-05	-2,72	3,33E-05
<i>Gemin4</i> //gem (nuclear organelle) associated protein 4 – T	-3,73	3,95E-05	-4,65	2,74E-05
<i>Nagk</i> //N-acetylglucosamine kinase – O	-3,73	4,98E-06	-4,28	5,47E-06
<i>Tamm41</i> //TAM41, mitochondrial translocator assembly – O	-3,73	7,27E-06	-2,99	1,61E-05

Символ гена // название гена (ref #) – функциональные категории	Безкальцевая среда		Уабаин	
	Кратное изменение	Р-уровень значимости	Кратное изменение	Р-уровень значимости
LOC100360582//5',3'-nucleotidase, cytosolic – O	-3,89	3,03E-05	-2,48	1,69E-04
Dguok//deoxyguanosine kinase – O	-3,90	2,09E-05	-3,00	5,56E-05
Ick//intestinal cell kinase – D	-3,90	7,69E-06	-3,30	1,43E-05
Aspscr1//alveolar soft part sarcoma chrom region 1 – O	-3,92	4,86E-06	-2,01	5,15E-05
Arntl2//aryl hydrocarbon receptor nuclear transl-like 2 - T	-3,93	3,45E-06	-2,92	8,57E-06
Acy3//aspartoacylase (aminocyclase) 3-O	-3,93	3,79E-06	-3,47	6,91E-06
Zfp9//zinc finger protein 9-T	-3,99	6,67E-06	-3,71	1,02E-05
LOC688548//hypothetical protein LOC688548-U	-3,99	3,08E-05	-3,06	8,11E-05
LOC100360582//5',3'-nucleotidase, cytosolic – O	-3,89	3,03E-05	-2,48	1,69E-04
Dguok//deoxyguanosine kinase – O	-3,90	2,09E-05	-3,00	5,56E-05
Ick//intestinal cell kinase – D	-3,90	7,69E-06	-3,30	1,43E-05
Aspscr1//alveolar soft part sarcoma chrom region 1 – O	-3,92	4,86E-06	-2,01	5,15E-05
Fblim1//filamin-binding LIM protein 1-D	-4,01	5,05E-06	-3,87	7,42E-06
Kif3c//kinesin family member 3C – O	-4,01	1,69E-05	-3,32	3,48E-05
Gsdmd//gasdermin D – D	-4,02	3,08E-06	-3,36	6,02E-06
LOC498145//similar to RIKEN cDNA 2810453106 – U	-4,02	2,45E-04	-2,89	8,91E-04
Zfp42612//zinc finger protein 426-like 2-T	-4,02	5,00E-05	-4,59	4,24E-05
Chst12//carbohydrate (chondroitin 4) sulfotransfer 12 – O	-4,03	1,13E-05	-2,89	3,48E-05
RGD1565316//similar to sphingomyelin phosphodies – U	-4,04	7,16E-06	-4,18	8,72E-06
Mir143//microRNA mir-143 – T	-4,04	4,55E-05	-2,67	2,14E-04
Sh3glb2//SH3-domain GRB2-like endophilin B2 – U	-4,04	4,68E-05	-2,05	8,75E-04
Ccdc8//coiled-coil domain-containing 8 – D	-4,06	1,20E-05	-2,98	3,48E-05
Pot1//protection of telomeres 1 homolog (1) – D	-4,07	5,28E-06	-5,21	5,01E-06
Rbl2//retinoblastoma-like 2 - T	-4,07	5,76E-06	-2,05	6,46E-05
Ankra2//ankyrin repeat, family A (RFXANK-like) 2 – O	-4,09	1,26E-05	-4,30	1,44E-05
Slc45a4//solute carrier family 45, member 4 – O	-4,10	5,05E-06	-2,92	1,45E-05
Polm//polymerase (DNA directed) – D	-4,13	4,22E-06	-4,06	6,03E-06

Символ гена // название гена (ref #) – функциональные категории	Безкальцевая среда		Уабаин	
	Кратное изменение	Р-уровень значимости	Кратное изменение	Р-уровень значимости
Hmbs//hydroxymethylbilane synthase (1) – O	-4,16	3,51E-06	-2,76	1,15E-05
Mrpl40//mitochondrial ribosomal protein L40 – T	-4,17	1,45E-04	-4,20	1,59E-04
Fastk//Fas-activated serine/threonine kinase – T	-4,20	9,96E-06	-2,84	3,50E-05
LOC688548//hypothetical protein LOC688548 – U	-4,29	1,31E-05	-3,27	3,31E-05
LOC691254//hypothetical protein LOC691254 – U	-4,39	1,05E-05	-4,31	1,37E-05
Plcb3//phospholipase C, beta 3, PIP-specific (1) – O	-4,41	2,75E-06	-3,20	7,06E-06
Setd6//SET domain-containing 6 – T	-4,41	5,99E-06	-3,55	1,22E-05
RGD1565222//similar to RIKEN cDNA 4931414P19 – U	-4,43	1,17E-05	-3,74	2,18E-05
Crot//carnitine O-octanoyltransferase – O	-4,44	1,26E-05	-3,59	2,66E-05
Haus1//HAUS augmin-like complex, subunit 1 – D	-4,46	3,39E-05	-4,58	3,85E-05
Paqr7//progesterone and adiponectin receptor family memb VII – O	-4,52	3,81E-06	-5,24	4,54E-06
Slc27a4//solute carrier family 27 (fatty acid transp) – O	-4,56	1,11E-05	-3,03	3,94E-05
Pde6d//phosphodiesterase 6D, cGMP-specific, rod – O	-4,57	5,23E-06	-5,82	5,06E-06
Stard3nl//STARD3 N-terminal like – O	-4,61	2,60E-06	-3,88	5,04E-06
Ssx2ip//synovial sarcoma, X breakpoint 2 interact prot – D	-4,64	1,05E-05	-3,20	3,31E-05
<i>Galk1//galactokinase 1 – O</i>	-4,68	1,03E-05	-4,08	1,73E-05
Nipsnap1//nipsnap homolog 1 (C, elegans) – O	-4,72	9,38E-06	-4,94	1,08E-05
Golph3l//golgi phosphoprotein 3-like – O	-4,75	2,90E-06	-3,34	7,44E-06
Kprp//keratinocyte proline-rich protein – U	-4,79	5,45E-05	-5,63	4,47E-05
Nr1h2//nuclear receptor subfamily 1, group H, mem 2-T	-4,94	3,81E-05	-4,03	7,47E-05
Ogg1//8-oxoguanine DNA glycosylase (11) – D	-5,11	4,60E-06	-3,10	1,68E-05
Nsdhl//NAD(P)-dependent steroid dehydrogenase-like – O	-5,13	9,08E-07	-3,59	2,89E-06
Mir145//microRNA mir-145 – T	-5,14	1,50E-06	-3,36	4,54E-06
Zfp40//zinc finger protein 40 – T	-5,20	7,56E-06	-4,07	1,54E-05
RGD1311946//similar to RIKEN cDNA 1810055G02 – U	-5,28	1,87E-06	-6,39	2,95E-06

Символ гена // название гена (ref #) – функциональные категории	Безкальциевая среда		Уабаин	
	Кратное изменение	Р-уровень значимости	Кратное изменение	Р-уровень значимости
Tmem177//transmembrane protein 177 – O	-5,41	3,53E-05	-7,49	2,30E-05
Rab27a//RAB27A, member RAS oncogene family – T	-5,65	3,45E-06	-6,40	4,47E-06
Stx2//syntaxin 2 – D	-5,82	2,27E-06	-4,98	4,54E-06
Stk16//serine/threonine kinase 16 – O	-6,35	1,70E-06	-5,32	3,58E-06
Ttc30b//tetratricopeptide repeat domain 30B – O	-7,12	8,89E-06	-7,00	1,13E-05
Tradd//TNFRSF1A-associated via death domain (5) – T	-7,81	9,08E-07	-7,44	1,84E-06
Zink1//Arg3.1/Arc mRNA-binding zinc finger protein – T	-8,80	3,51E-06	-7,78	5,65E-06

Примечание. Гладкомышечные клетки аорты крысы обрабатывали 3 мМ уабаином или безкальциевой средой в течение 6 часов. В списке указаны гены, экспрессия которых была увеличена в среде без К + более чем в 3 раза и отличались менее чем в 2 раза при наличии уабаина по сравнению со средой, не содержащей К⁺. Анализ экспрессии GeneChip проводили с помощью Affymetrix GeneChip system. Содержание мРНК в контрольных клетках принималось равным 1,00. Гены, экспрессия которых изменяется при ишемии/гипоксии, выделены жирным шрифтом. В скобках указаны номера ссылок в PubMed. Выделены курсивом гены, дифференциальная экспрессия которых была обнаружена в ишемической ткани на основе анализа микроматрицы всего генома¹. Данные о функции гена из базы данных GeneCards (www.genecards.org) были использованы для идентификации функции гена. Функциональные категории: Т – регуляторы транскрипции/трансляции, процессинга и деградации РНК; D – регуляторы клеточной адгезии, миграции, пролиферации, дифференцировки и гибели; I – воспаление и иммунные реакции; O – другие; U – неизвестная функция.

¹ Mazzatti D., Lim F-Lt., O'Hara A. et al. A microarray analysis of the hypoxia-induced modulation of gene expression in human adipocytes // Arch. Physiol. Biochem. 2012. № 118. P. 112–120; Lu A., Tang Y., Ran R. et al. Genomics of the periinfarction cortex after focal cerebral ischemia // J. Cereb. Blood Flow Met. 2003. № 23. P. 786–810; Kamphuis W., Dijk F., van Soest S. et al. Global gene expression profiling of ischemic preconditioning in the rat retina // Mol. Vision. 2007. № 13. P. 1020–1030; Tang Y., Pacary E., Freret T. et al. Effect of hypoxic preconditioning on brain genomic response before and following ischemia in the adult mouse: identification of potential neuroprotective candidate for stroke // Neurobiol. Dis. 2006. № 21. P. 18–28; Ong L.L., Oldigs J.K., Kaminski A. et al. Hypoxic/normoxic preconditioning increases endothelial differentiation potential of human bone marrow CD133+ cells // Tissue Eng Part C Methods. 2010. № 16. P. 1069–1081; Manalo D.J., Rowan S., Lavoie T. et al. Transcription regulation of vascular endothelial cell responses to hypoxia by HIF-1 // Blood, 2005. № 105. P. 659–669; Leonard M.O., Cottell D.C., Godson C. et al. The role of HIF-1 α in transcriptional regulation of the proximal tubular epithelial cell response to hypoxia // J. Biol. Chem. 2003. № 278. P. 40296–40304.

Таблица 11

Гипоксия-чувствительные транскрипционные факторы, экспрессия которых была увеличена в гладкомышечных клетках аорты крысы, подвергнутых ингибированию Na^+ , K^+ -АТФазы¹

Символьное обозначение гена	Название гена	Кратное изменение	
		Безкальциевая среда	Уабаин
HIF			
Hif-1b/Arnt	Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator	1,28	1,24
Ahr	Aryl hydrocarbon receptor	1,94	1,34
NFkB			
Ikbkg	nhibitor of kappa light polypeptide kinase b	-1,93	-3,06
Ikbke	nhibitor of kappa light polypeptide kinase e	-2,16	-2,18
Sike 1	Suppressor of Ikbke	-5,51	-6,40
AP-1			
Fos	BJ osteosarcoma oncogene	7,91	3,95
Jun	Jun proto-oncogene	3,57	2,76
Junb	Jun B proto-oncogene	3,23	1,29
Jund	Jun D proto-oncogene	1,59	1,53
Atf3	Activating transcription factor 3	7,83	4,53
Atf6	Activating transcription factor 6	1,42	1,36
Atf1	Activating transcription factor 1	1,35	1,24
Maff	v-maf musculoaponeurotic oncogene homolog F	3,42	2,55
Mafk	v-maf musculoaponeurotic oncogene homolog K	3,42	2,75
Fos	BJ osteosarcoma oncogene	7,91	3,95
Jun	Jun proto-oncogene	3,57	2,76
CREB			
Creb5	cAMP-responsive element-binding protein 5	1,69	1,36
Creb1	cAMP-responsive element-binding protein 1	1,45	1,46
p53			
Mdm2	Mdm2 p53-binding protein homolog (mouse)	3.85	2.98

¹ Koltsova S.V., Shilov B., Burulina J.G., Akimova O.A., Haloui M., Kapilevich L.V., Gusakova S.V., Tremblay J., Hamet P., Orlov S.N. Transcriptional changes triggered by hypoxia: evidence for HIF-1 α -independent, [Na⁺]_i/[K⁺]_i-mediated excitation-transcription coupling // PLoS ONE. 2014. № 9 (11): e110597. doi: 10.1371/journal.pone.0110597.

Символьное обозначение гена	Название гена	Кратное изменение	
		Безкальцевая среда	Уабаин
EGR			
Egr1	Early growth response 1	5.15	1.49
OTHERS			
Sp1	Sp1 transcription factor	2.00	1.50

Примечание. Na⁺, K⁺-АТФаза ингибировалась в течение 6 часов с помощью 3 мМ уабаина или среды без K⁺. Экспрессия других генов, кодирующих факторы HIF-1 (Hif-1a, Hif-2a, Hif-3a), NFκB (p65, cRel, RelB, p50, p52, IκB), а также другие индуцируемые гипоксией факторы транскрипции (p53, Sp3, Gata2, Stat5, Gadd153) существенно не изменились.

Мы также отметили, что среди чувствительных к [Na⁺]_i/[K⁺]_i генов относительное содержание регуляторов транскрипции / трансляции было в 3–4 раза выше, чем в общих геномах млекопитающих¹. Имея это в виду, мы предприняли дополнительный поиск генов, кодирующих HIF-1, AP-1, белок, связывающий элемент циклического ответа AMP (CREB), ядерный фактор каппа-B (NFκB), факторы ответа раннего роста (EGR), т.е. основные факторы транскрипции, участвующие в транскриптомных изменениях, вызванных гипоксией².

Данные, представленные в табл. 11, свидетельствуют, что ингибирование Na⁺, K⁺-АТФазы приводило к усиленной экспрессии генов, кодирующих AP-1 и Egr1, и понижало транскрипцию генов, кодирующих регуляторы NFκB- и p53-опосредованных сигнальных путей. Мы обнаружили менее чем двукратное повышение Sp1, Creb1 и Creb5 и отсутствие какого-либо влияния увеличения соотношения [Na⁺]_i/[K⁺]_i на транскрипцию других индуцируемых гипоксией транскрипционных факторов: Hif-1a, Hif-1b, Hif-2a, Hif-3a, p65, cRel, RelB, p50, p52, IκB, p53, Sp3, Gata2, Stat5, Gadd153.

¹ Tupler R., Perini G., Green M.R. Expressing the human genome // Nature. 2001. № 409. P. 832–833.

² Cummins E.P., Taylor C.T. Hypoxia-responsive transcription factors // Pflugers Arch. – Eur. J. Physiol. 2005. № 450. P. 363–371.

4.3.3. Поиск подмножества генов *In silico*, на экспрессию которых влияют как повышение отношения $[Na^+]_i/[K^+]_i$, так и гипоксия

Чтобы отобрать гены-кандидаты для исследования относительного влияния передачи сигналов, опосредованных HIF-1 α - и увеличением $[Na^+]_i/[K^+]_i$, вызванных гипоксией, мы провели сравнительный анализ результатов по выявлению $[Na^+]_i/[K^+]_i$ -чувствительных RVSMC в базе данных PubMed для генов, экспрессия которых изменяется в ответ на воздействие гипоксии / ишемии. В табл. 9 и 10 транскрипты, чувствительные к $[Na^+]_i/[K^+]_i$, обнаруженные в базе данных PubMed как гены, затронутые гипоксией и / или ишемией, показаны жирным шрифтом, а количество публикаций, обнаруживших это явление, приведено в скобках. Затем мы провели дополнительный поиск $[Na^+]_i/[K^+]_i$ - и гипоксия-чувствительных генов в рукописях и исследовали транскриптомные изменения, вызванные гипоксией / ишемией с использованием глобальной технологии профилирования экспрессии генов¹. $[Na^+]_i/[K^+]_i$ -чувствительные гены, обнаруженные в этих статьях, выделены курсивом в табл. 9, 10. Эти два подхода привели нас к заключению, что относительный процент чувствительных к гипоксии генов среди генов, экспрессия которых увеличивалась или уменьшалась в ответ на увеличение $[Na^+]_i/[K^+]_i$, составлял 40 и 12% соответственно, т.е. был значительно выше, чем следовало ожидать исходя из их случайного распределению в геноме крысы: 280 $[Na^+]_i/[K^+]_i$ -чувствительных генов и 60 гипоксия-чувствительных генов (табл. 9, 10).

¹ Mazzatti D., Lim F-L., O'Hara A. et al. A microarray analysis of the hypoxia-induced modulation of gene expression in human adipocytes // Arch. Physiol. Biochem, 2012. № 118. P. 112–120; Lu A., Tang Y., Ran R. et al. Genomics of the perinfarction cortex after focal cerebral ischemia // J. Cereb. Blood Flow Met. 2003. № 23. P. 786–810; Kamphuis W., Dijk F., van Soest S. et al. Global gene expression profiling of ischemic preconditioning in the rat retina // Mol. Vision. 2007. № 13. P. 1020–1030; Ong L.L., Oldigs J.K., Kaminski A. et al. Hypoxic/normoxic preconditioning increases endothelial differentiation potential of human bone marrow CD133+ cells // Tissue End Part C Methods. 2010. № 16. P. 1069–1081; Manalo D.J., Rowan S., Lavoie T. et al. Transcription regulation of vascular endothelial cell responses to hypoxia by HIF-1 // Blood. 2005. № 105. P. 659–669.

4.3.4. Роль HIF-1a и $[Na^+]_i/[K^+]_i$ -опосредованной сигнализации

Для дальнейших исследований мы выбрали *Cyp1a1*, *Fos*, *Atf3*, *Klf10*, *Ptgs2*, *Nr4a1*, *Per2* и *Hes1*, т.е. гены, обладающие наибольшими приращениями экспрессии при устойчивом ингибировании Na^+ , K^+ -АТФазы и чье участие в патогенезе гипоксии было доказано предыдущими исследованиями. Так, например, FOS и ATF3 вместе с JUN образуют транскрипционный фактор AP-1, усиленная экспрессия которого была задокументирована во всех типах клеток, подвергшихся гипоксии¹. *Ptgs2* кодирует индуцибельную изоформу циклооксигеназы-2 (COX-2), роль которой в патофизиологии гипоксии хорошо документирована². *Klf10* – член семейства транскрипционных факторов Круппела, активирующийся в ответ на гипоксию и участвующий в ангиогенезе посредством активации COX-1³. Фактор роста нервов IB, также известный как *Nur77* или *Nr4a1*, является ядерным рецептором факторов транскрипции, стабилизирующих HIF-1a, что повышает его транскрипционную активность⁴. *Hes1* является основным фактором транскрипции, экспрессия которого резко увеличивается после ишемической почечной недостаточности⁵. Центральным циркадным осциллятором обеспечивает обратную связь транскрипции-трансляции, в которой *Clock* и *Bmal1* являются положительными регуляторами, а *Per1*, *Per2*, *Cry1* и *Cry2* действуют как отрицательные регуляторы⁶. Было показано, что *Per2* способствует цир-

¹ Cummins E.P., Taylor C.T. Hypoxia-responsive transcription factors // *Pflugers Arch. – Eur. J. Physiol.* 2005. № 450. P. 363–371.

² Phillis J.W., Horrocks L.A., Farooqui A.A. Cyclooxygenases, lipoxygenases, and epoxygenases in CNS: their role and involvement in neurological disorders // *Brain Res.* 2006. № 52. P. 201–243.

³ Yang D.H., Hsu C.F., Lin C.Y. et al. Kruppel-like factor 10 upregulates the expression of cyclooxygenase 1 and further modulates angiogenesis in endothelial cell and platelet aggregation in gene-deficient mice // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2013. № 45. P. 419–428.

⁴ Kim B.-J., Kim H., Cho E.-J. et al. Nur77 upregulates HIF- α by inhibiting pVHL-mediated degradation // *Exp. Mol. Med.* 2008. № 40. P. 71–83.

⁵ Kobayashi T., Terada Y., Kuwana H. et al. Expression and function of the Delta-1/NOct-2/Hes-1 pathway during experimental acute kidney injury // *Kidney Int.* 2008. № 73. P. 1240–1250.

⁶ Hamet P., Tremblay J. Genetics of the sleep-wake cycle and its disorders // *Metabolism Clin. Exp.* 2006. № 55. P. S7–S12.

кадной стабилизации активности HIF-1a, которая имеет решающее значение для адаптации миокарда к ишемии¹. Cyp1a1 кодирует член семейства цитохрома P450, и его экспрессия опосредуется HIF-1b². Фактор роста эндотелия сосудов (Vegfa) и эндотелин (Edn1) были выбраны в качестве положительных контролей для канонических HIF-1a-чувствительных генов.

Чтобы изучить относительное влияние HIF-1a-опосредованной и $[Na^+]_i/[K^+]_i$ -зависимой передачи сигналов, мы сравнили эффекты гипоксии и убаина на экспрессию перечисленных выше отобранных генов в контрольной среде с высоким Na^+ , низким K^+ , после диссипации трансмембранных градиентов одновалентных катионов в среде с высоким K^+ , низким Na^+ и в клетках, трансфицированных siRNA, блокирующим экспрессию Hif-1a. Как продемонстрировано ранее на других типах клеток³, гипоксия незначительно увеличивала РНК Hif-1a (табл. 12) и увеличивала содержание иммунореактивного белка HIF-1a в 5 раз (рис. 42).

Контрольные нетрансфицированные гладкомышечные клетки аорты крысы или трансфицированные скремблированием siRNA или siRNA Hif-1a подвергались воздействию гипоксии, сочетанному с депривации глюкозой, или 3 мМ убаина в контроле или среде с низким Na^+ , высоким K^+ в течение 24 часов и с добавлением указанных siRNA. Количественные измерения проводили с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени. Результаты представлены как среднее значение \pm стандартное

¹ Koyanagi S., Kuramoto Y., Nakagawa H. et al. A molecular mechanism regulating circadian expression of vascular endothelial growth factor in tumor cells // *Cancer Res.* 2003. № 63. P. 7277–7283; Eckle T., Hartmann K., Bonney S. et al. Adora2b-elicited Per2 stabilization promotes a HIF-dependent metabolic switch critical for myocardial adaptation to ischemia // *Nature Med.* 2012. № 18. P. 774–782.

² Zhang N., Walker M.K. Crosstalk between the aryl hydrocarbon receptor and hypoxia on the constitutive expression of cytochrome P4501A1 mRNA // *Cardiovasc. Toxicol.* 2007. № 7. P. 282–290.

³ Ke Q., Costa M. Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) // *Mol. Pharmacol.* 2006. № 70. P. 1469–1480; Zhang H., Qian D.Z., Tan Y.S. et al. Digoxin and other cardiac glycosides inhibit HIF-1a synthesis and block tumor growth // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2008. № 105. P. 19579–19586.

отклонение, получены в трех независимых экспериментах и выполнены в трех экземплярах. Средние значения для клеток, инкубированных в контрольной среде в нормоксических условиях, были приняты равными 1,00.

Таблица 12

Влияние среды с высоким K⁺, низким Na⁺ и Hif-1a миРНК на экспрессию генов, вызванную гипоксией и уабаинном¹

Обозначение гена	Обработка клеток											
	Контроль (высокий Na ⁺ , низкий K ⁺)			Низкий Na ⁺ , высокий K ⁺			Скремблированная siRNA			HIF-1a siRNA		
	Нормоксия	гипоксия	уабаин	Нормоксия	гипоксия	уабаин	нормоксия	гипоксия	уабаин	нормоксия	гипоксия	уабаин
Hif-1a	1,00	1,88+11	1,56+18	0,8 + 8 1,25 + 5	1,06 + 21	0,89+14	1,47+13	1,11+9	0,31 ±4	0,26 + 4	0,22 + 5	Hif-1a
Vegfa												
Ednl	1,00	4,11+39	2,45 ± 11	1,07 + 8	2,85 + 26	0,87+16	1,14 + 22	4,89 + 54	2,66+17	1,14 + 9	1,89 + 44	2,46 + 2
Cypal	1,00	0,43+4	8,94+111	1,33 + 22	0,39 + 7	1,76 + 25	0,95 ± 15	0,38 + 6	10,25 + 211	0,77 + 21	0,40 + 4	13,17 + 311
Fos	1,00	4,12+41	5,21+16	1,99 + 29	2,02 ± 17	1,65 + 28	0,87+17	5,11+48	5,07+12	1,12 + 18	4,01 ±38	4,77 + 29
Atf3	1,00	7,16 + 53	5,02 + 65	2,19 + 3	3,13+4	2,02 ± 17	1,07 + 28	6,92 + 58	5,00 + 82	0,98 + 9	3,12 + 3	5,14 + 37
KlflO	1,00	5,02 + 66	4,06 + 44	1,19+1	2,18 + 4	1,33 + 31	1,07 + 9	3,87 + 36	4,56 + 42	1,26+18	3,03 + 51	3,82 + 34
Ptgs2	1,00	5,14 + 77	9,87+138	2,12+42	1,88+19	1,98 + 31	1,23 + 7	6,11+1	9,67+132	0,92 ± 13	4,91 ±57	9,16 + 49
Nr4a1	1,00	6,11+79	6,15 + 71	1,36+12	2,60 + 39	1,71 ±44	0,91 ±6	3,15 + 21	7,11+155	0,92 ± 19	2,91 ±46	7,06 + 79
Per2	1,00	3,02 + 36	6,18+14	0,98+18	1,48 + 2	1,38+17	1,27+19	3,37 + 28	5,82 ± 7	1,06+19	3,00 + 32	7,59+131
Hesl	1,00	1,72+46	3,48 + 33	1,56+18	2,09 + 28	1,89 + 22	0,87 + 9	1,30 + 27	3,22+43	1,16 + 23	1,03 ± 15	4,09 + 58

¹ Koltsova S.V., Shilov B., Burulina J.G., Akimova O.A., Haloui M., Kapilevich L.V., Gusakova S.V., Tremblay J., Hamet P., Orlov S.N. Transcriptomic changes triggered by hypoxia: evidence for HIF-1a -independent, [Na⁺]/[K⁺]-mediated excitation-transcription coupling // PLoS ONE. 2014. № 9 (11): e110597. doi: 10.1371/journal.pone.0110597.

Трансфекция RVSMC siRNA Hif-1a, но не скремблированной siRNA в 3 раза снизила экспрессию Hif-1a и резко ослабила накопление белка HIF-1a, вызванного гипоксией (рис. 42). Убаин увеличивал базальное содержание РНК Hif-1a на 50% (табл. 12) и немного снижал содержание белка HIF-1a (рис. 42). Подтверждая предыдущие наблюдения¹, гипоксия увеличивала содержание siРНК Vegfa и Edn1 в 12 и 4 раза соответственно (табл. 13).

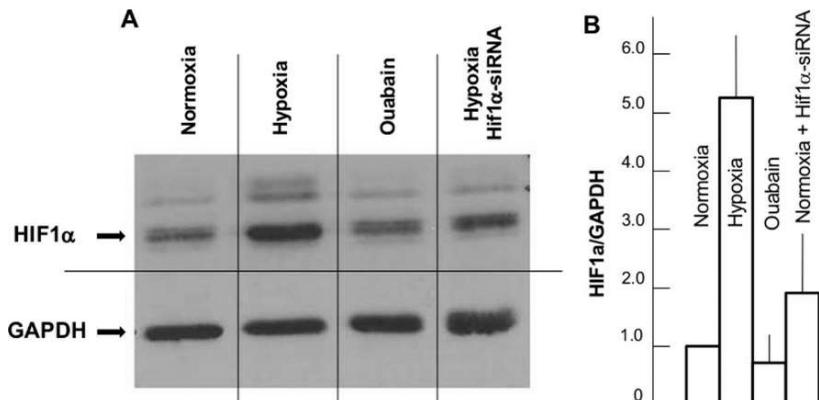


Рис. 42. *A.* Репрезентативные вестерн-блоты HIF-1a и GAPDH в гладкомышечных клетках аорты крысы, подвергнутые 24-часовой инкубации в контрольных условиях (нормоксия), при гипоксии / депривации глюкозы, добавление 3 мМ убаина или при гипоксии / депривации глюкозы в клетках, трансфицированных siRNA Hif-1a. *B.* Влияние гипоксии / депривации глюкозы и убаина на относительное содержание белка HIF-1a в гладкомышечных клетках аорты крысы. Отношение HIF-1a/GAPDH в контрольных условиях было принято равным 1,00. Данные, полученные в 3 независимых экспериментах, представлены как среднее значение ± стандартное отклонение²

Трансфекция миРНК Hif-1a снижала зависимые от гипоксии приращения РНК Vegfa и Edn1 в 4 и 2 раза соответственно

¹ Sharp F.R., Ran R., Lu A. et al. Hypoxic preconditioning protects against ischemic brain injury // *NeuroEx.* 2004. № 1. P. 26–35.

² Koltsova S.V., Shilov B., Burulina J.G., Akimova O.A., Haloui M., Kapilevich L.V., Gusakova S.V., Tremblay J., Hamet P., Orlov S.N. Transcriptional changes triggered by hypoxia: evidence for HIF-1a -independent, [Na⁺]_i/[K⁺]_i-mediated excitation-transcription coupling // *PLoS ONE.* 2014. № 9 (11): e110597. doi: 10.1371/journal.pone.0110597.

(рис. 42). Убаин не оказал значительного влияния на Vegfa и увеличил РНК Edn1 в 2,5 раза. Диссипация трансмембранных градиентов одновалентных катионов в среде с низким Na⁺, высоким K⁺ не изменяла экспрессию Vegfa, вызванную гипоксией, и снижала РНК Edn1 в 2 раза.

Диссипация трансмембранных градиентов одновалентных катионов полностью подавляла приращения РНК Fos, Atf3, Ptgs2 и Per2 и резко уменьшала подъемы экспрессии Klf10, Edn1, Nr4a1 и Hes1, наблюдаемые в гипоксических условиях (рис. 43). В соответствии с данными, полученными для клеток других типов, включая глакомышечные клетки сосудов человека¹, гипоксия увеличивала экспрессию Fos, Atf3, Klf10, Ptgs2, Nr4a2, Per2 и Hes1 в 2–6 раз (рис. 43).

Таблица 13

Последовательности праймеров для ПЦР в реальном времени²

Обозначение генов	Прямой праймер	Обратный праймер
Atf3	TGTCAGTCACCAAGTCTGAGGT	CAGTTTCTCTGACTCCTTCTGC
Cyp11a1	ATTTGAGAAGGGCCACATCC	AAACCCAGCTCCAAAGAGGT
Edn1	AAAGAACTCGAGCCAAAAG	CTGATGGCCTCCAACCTTC
Fos	GAGCAGTATCTCCTGAAGAGG	TGATCTGTCTCCGCTTGGA
Hes1	CAAACCAAAGACAGCCTCTGA	ATGCCGGGAGCTATCTTTCT
Hif1a	AAAGTCACTGAGCCTAACA	TGTCCTGAGCTGAAAATGGA
Klf10	TCTGTAGCCACCCAGGATGT	GGACAGTTCATCGGAACGAG
Nr4a1	GATGCCTCCCCTACCAATCT	GTCACCGGCATCTTCCTTT
Per2	GCAGGTGAAGGCTAATGAGG	CACAGCAAACATGTCCGAGT
Ptgs2	GGCCATGGAGTGGACTTAAA	TGTCTTTGACTGTGGGAGGA
Vegfa2	CATGCGGATCAAACCTCAC	TGGCTTTGTCTATCTTTCTTTGG

¹ Zuloaga K.L., Gonzales R.J. Dihydrotestosterone attenuates hypoxia inducible factor-1a and cyclooxygenase-2 in cerebral arteries during hypoxia with glucose deprivation // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2011. № 301. P. H1882–H1890; Camacho M., Rodriguez C., Guadall A. et al. Hypoxia upregulates PGI-synthase and increases PGI2 release in human vascular cells exposed to inflammatory stimuli // *J. Lipid Res.* 2011. № 52. P. 720–731.

² Koltsova S.V., Shilov B., Burulina J.G., Akimova O.A., Haloui M., Kapilevich L.V., Gusakova S.V., Tremblay J., Hamet P., Orlov S.N. Transcriptomic changes triggered by hypoxia: evidence for HIF-1a -independent, [Na⁺]_i/[K⁺]_i-mediated excitation-transcription coupling // *PLoS ONE.* 2014. № 9 (11): e110597. doi: 10.1371/journal.pone.0110597.

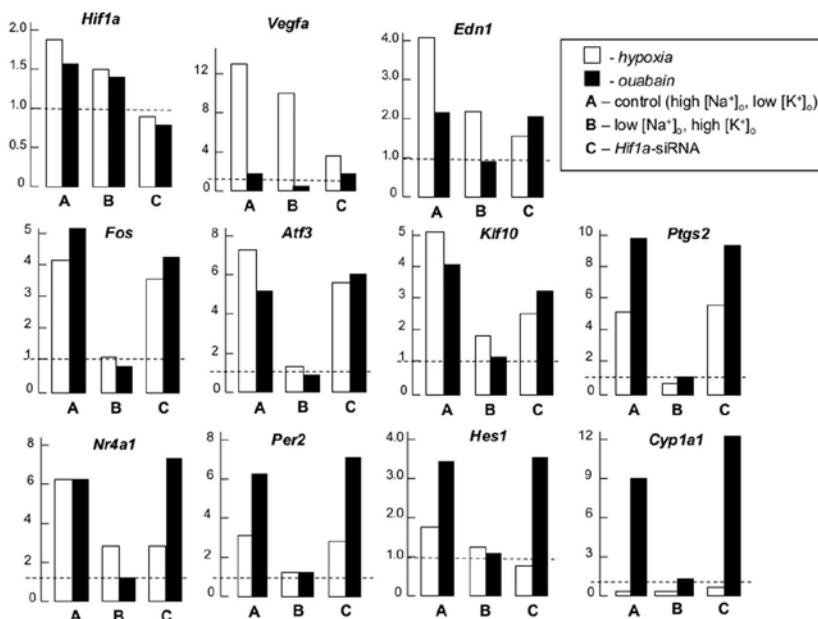


Рис. 43. Влияние гипоксии и уабаина на экспрессию генов в гладкомышечных клетках аорты крысы. Клетки подвергали воздействию нормоксии, гипоксии / депривации глюкозы или 3 мМ уабаина в течение 24 часов в контрольной среде с высоким Na^+ , низким K^+ (A, C) или средой с высоким K^+ , низким Na^+ (B). В некоторых экспериментах RASMC трансфицировали миРНК Hif-1a (C). Содержание мРНК в нормоксии было принято равным 1,00 и показано пунктирными линиями¹

Трансфекция siRNA Hif-1a снижала приросты мРНК Klf10 и Nr4a, вызванные гипоксией, в 2 раза, но не влияла на вызванную гипоксией экспрессию Fos, Atf3, Ptgs2 и Per2. В отличие от других генов, перечисленных в табл. 12, гипоксия снизила мРНК Cyp11a в 2 раза в соответствии с ослабленной экспрессией Cyp11a в микроциркуляторном русле человека,

¹ Koltsova S.V., Shilov B., Burulina J.G., Akimova O.A., Haloui M., Kapilevich L.V., Gusakova S.V., Tremblay J., Hamet P., Orlov S.N. Transcriptional changes triggered by hypoxia: evidence for HIF-1a -independent, $[\text{Na}^+]/[\text{K}^+]_i$ -mediated excitation-transcription coupling // PLoS ONE. 2014. № 9 (11): e110597. doi: 10.1371/journal.pone.0110597.

подвергнутом гипоксии¹. Экспрессия всех 8 тестируемых генов была повышена в 3–10 раз при наличии убаина. Эти приращения полностью устранялись при диссипации трансмембранных градиентов одновалентных катионов в среде с низким Na⁺, высоким K⁺. В отличие от среды с низким Na⁺, высоким K⁺, трансфекция siRNA Hif-1a не влияла на экспрессию этих генов в RVSMC, полученном ранее (табл. 12). Рассеяние трансмембранного градиента одновалентных катионов полностью ингибировало увеличение мРНК Fos, Atf3, Ptgs2 и Per2 и резко уменьшало повышение экспрессии Klf10, Edn1, Nr4a1 и Hes1, наблюдаемое в условиях гипоксии (рис. 43).

4.3.5. Локализация (A/G) CGTG элементов гипоксии в пределах 59-UTR

Несколько исследовательских групп сообщили, что HIF-1a регулирует экспрессию генов в ишемических тканях посредством взаимодействия гетеродимера HIF-1a/HIF-1b с hypoxia-responsive elements (HRE), содержащими (A/G) CGTG-консенсус в областях промотора / энхансера ДНК целевого гена, таких как VEGFA² и EDN1³. Учитывая это, мы использовали сервис SCOPE (Suite для компьютерной идентификации элементов промоутера)⁴ для поиска (A/G) CGTG-консенсуса в 5'-нетранслируемых регионах (5'-untranslated region, UTR) чувствительных к [Na⁺]_i/[K⁺]_i генов, перечисленных в табл. 12. Используя этот подход, мы обнаружили многочисленные (A/G)

¹ Zhang N., Walker M.K. Crosstalk between the aryl hydrocarbon receptor and hypoxia on the constitutive expression of cytochrome P4501A1 mRNA // *Cardiovasc. Toxicol.* 2007. № 7. P. 282–290.

² Liu Y., Cox R.S., Morita T. et al. Hypoxia regulates vascular endothelial growth factor gene expression in endothelial cells: identification of a 5 prime enhancer // *Circ. Res.* 1995. № 77. P. 638–643.

³ Hu J., Disher D.J., Bishopric N.H. et al. Hypoxia regulates expression of the endothelin-1 gene through a proximal hypoxia-inducible factor-1 binding site on the antisense strand. *Biochem // Biophys. Res. Commun.* 1998. № 245. P. 894–899.

⁴ Chakravarty A., Carlson J.M., Khetani R.S. et al. A novel ensemble learning method for de novo computational identification of DNA binding sites // *BMC Bioinformatics.* 2007. № 8. P. 249.

последовательности CGTG в нетранслируемых областях 5'-UTR генах, кодирующих канонические гены HIF-1-чувствительных (Edn1 и Vegfa), а также все $[Na^+]_i/[K^+]_i$ -чувствительные гены, перечисленные в табл. 11. Необходимо отметить, что нам не удалось найти какое-либо фиксированное положение для этого консенсуса в пределах 10 000 bp 5'-UTR-чувствительных к HIF1a по сравнению с HIF1a-устойчивыми генами (рис. 44). Кроме того, мы наблюдали, что в некоторых $[Na^+]_i/[K^+]_i$ -чувствительных генах проксимальные сегменты длиной 1 500 bp 5'-UTRs более распространены с последовательностью (A/G) CGTG по сравнению с каноническими HIF-чувствительными транскриптами (рис. 45). Таким образом, 5'-UTR 1 500 bp Atf3 и Edn1 содержат 8 и 3 (A/G) CGTG-последовательности. Это наблюдение также подтверждается параметром Sig Value, имеющим значение 28,4 для 1 500- bp 5'-UTR генов, перечисленных в табл. 11. Если поиск не ограничен позициями в 1 500 bp, значение Sig является отрицательным, что указывает на отсутствие возможностей прогнозирования для указанной выше консенсусной последовательности.

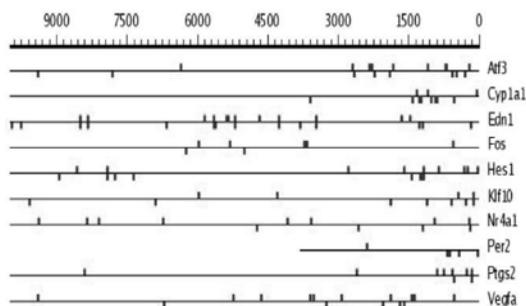


Рис. 44. Положение (A/G) CGTG консенсуса в пределах 10 000 bp 5-UTR генов, перечисленных в табл. 5¹

¹ Koltsova S.V., Shilov B., Burulina J.G., Akimova O.A., Haloui M., Kapilevich L.V., Gusakova S.V., Tremblay J., Hamet P., Orlov S.N. Transcriptional changes triggered by hypoxia: evidence for HIF-1a -independent, $[Na^+]_i/[K^+]_i$ -mediated excitation-transcription coupling // PLoS ONE. 2014. № 9 (11): e110597. doi: 10.1371/journal.pone.0110597

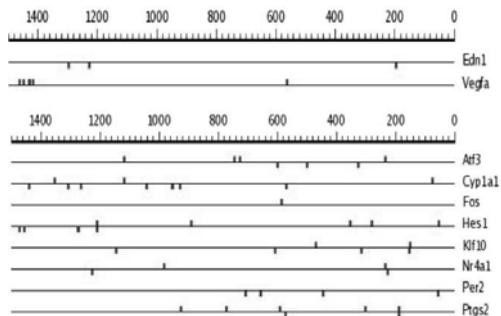


Рис. 45. Положение (A/G) CGTG консенсуса в пределах 1 500 bp 5'-UTR генов, перечисленных в табл. 5¹

HIF-1a, единственный известный датчик кислорода, регулирует экспрессию генов в ишемических тканях посредством взаимодействия гетеродимера HIF-1a/HIF-1b с HRE в областях промотора / энхансера ДНК целевого гена². Наше исследование впервые демонстрирует, что $[\text{Na}^+]_i/[\text{K}^+]_i$ -чувствительная возбуждимо-транскрипционная связь способствует транскриптомным изменениям, вызванным гипоксией, независимо от HIF-1a-опосредованной передачи сигналов. Доказательства, подтверждающие этот вывод, перечислены ниже.

Во-первых, повышение отношения $[\text{Na}^+]_i/[\text{K}^+]_i$, вызванное 6-часовым ингибированием Na^+ , K^+ -АТФазы под воздействием убаина или безкальевой среды, привело к дифференциальной

¹ Koltsova S.V., Shilov B., Burulina J.G., Akimova O.A., Haloui M., Kapilevich L.V., Gusakova S.V., Tremblay J., Hamet P., Orlov S.N. Transcriptomic changes triggered by hypoxia: evidence for HIF-1a -independent, $[\text{Na}^+]_i/[\text{K}^+]_i$ -mediated excitation-transcription coupling // PLoS ONE. 2014. № 9 (11): e110597. doi: 10.1371/journal.pone.0110597.

² Maxwell P.H., Wiesener M.S., Chang G.W. et al. The tumor suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factor for oxygen-dependent proteolysis // Nature. 1999. № 399. P. 271–275; Kallio P.J., Pongratz I., Gradin K. et al. Activation of hypoxia-inducible factor 1a: posttranslational regulation and conformational change by recruitment of the Arnt transcription factor // Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1997. № 94. P. 5667–5672; Semenza G.L., Jiang B.H., Leung S.W. et al. Hypoxia response elements in the aldolase A, enolase 1, and lactate dehydrogenase A gene promoters contain essential binding sites for hypoxia-inducible factor 1 // J. Biol. Chem. 1996. № 271. P. 32529–32537; Ke Q., Costa M. Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) // Mol. Pharmacol. 2006. № 70. P. 1469–1480.

экспрессии более 6 000 транскриптов (рис. 39). Список чувствительных к $[Na^+]_i/[K^+]_i$ генов, экспрессия которых изменилась более чем в 3 раза (табл. 9, 10), избыточен генами, на дифференциальную экспрессию которых влияет гипоксия или ишемия / реперфузия.

Во-вторых, 24-часовое поддержание RVSMC в условиях гипоксии привело к 3-кратному увеличению $[Na^+]_i$ и 2-кратному снижению $[K^+]_i$ (рис. 38). Ранее было показано, что транзиторная ишемия миоцитов сердца увеличила $[Na^+]_i$ с 5–8 до 25–40 мМ и уменьшила $[K^+]_i$ на 30%¹. Увеличение соотношения $[Na^+]_i/[K^+]_i$, наблюдаемое в гипоксических RVSMC, вероятно, вызвано ослаблением внутриклеточного содержания АТФ (рис. 38), что в свою очередь приводит к частичному ингибированию Na^+ , K^+ -АТФазы.

В-третьих, трансфекция RVSMC мiРНК Hif-1a сдерживала прирост белка HIF-1 α , а также Vegfa, Edn1, Klf10 и мРНК Nr4a1, вызванных ишемией, но не оказала значительного влияния на 7-, 5-, 4- и 3-кратное повышение экспрессии Atf3, Ptgs2, Fos и Per2, задокументированных в гипоксических клетках (рис. 42, 43; табл. 12).

В-четвертых, в отличие от siRNA Hif-1 α , диссипация трансмембранных градиентов одновалентных катионов в среде с низким Na^+ , высоким K^+ устраняет увеличение мРНК Fos, Atf3, Ptgs2 и Per2 и резко снижает экспрессию Klf10, Edn1, Nr4a1 и Hes1 при гипоксии. Примечательно, что среда с низким Na^+ и высоким K^+ полностью отменяет повышение отношения $[Na^+]_i/[K^+]_i$ (рис. 38), а также увеличение экспрессии всех исследованных генов, наблюдаемых в обработанных убаином RVSMC (табл. 12, рис. 43).

В совокупности наши результаты демонстрируют доминирующую роль $[Na^+]_i/[K^+]_i$ -опосредованного возбудимо-транскрипционной связи в общих транскриптомных изменениях, вызванных ишемическими состояниями. Было показано, что в ишемических тканях HIF-1 α повышает

¹ Murphy E., Eisner D.A. Regulation of intracellular and mitochondrial sodium in health and disease // *Circ. Res.* 2009. № 104. P. 292–303.

экспрессию *Vegfa* и *Edn1* посредством взаимодействия гетеродимера HIF-1a/HIF-1b с элементами ответа на гипоксию (HRE), кодируемыми консенсусом CGTG 59-UTR (A/G)¹. Мы отметили, что наряду с чувствительными к Hif-1a siRNA *Vegfa* и *Edn1*, 5'-UTR -резистентных к Hif-1a siRNA *Atf3*, *Ptgs2*, *Fos* и *Per2* также содержит последовательности (A/G) CGTG (рис. 44, 45). Следовательно, присутствие (A/G) CGTG-консенсуса в пределах 5'-UTR недостаточно для прогнозирования HIF-1-опосредованного механизма регуляции экспрессии генов в условиях гипоксии.

Параллельно с накоплением белка HIF-1a гипоксия запускает экспрессию других транскрипционных факторов, перечисленных в табл. 11 и рассмотренных Е.Р. Cummins и С.Т. Taylor². Способствуют ли эти факторы транскрипции $[Na^+]_i/[K^+]_i$ -зависимым транскрипционным изменениям, вызванным гипоксией? Мы обнаружили незначительное влияние ингибирования Na^+ , K^+ -АТФазы на экспрессию Hif-1b и 2-кратное повышение мРНК, кодирующей арильные углеводородные рецепторы для диоксинов, бензопиренов и других загрязнений окружающей среды (AhR) (табл. 11). Было показано, что, помимо HIF-1a, HIF-1b образует димер с AhR³, что приводит к сходным уровням экспрессии изоформ P450 CYP1A1 и CYP1B1 посредством связывания комплекса AhR/HIF-1b с консенсусной последовательностью TNGCGTG в

¹ Liu Y., Cox R.S., Morita T. et al. Hypoxia regulates vascular endothelial growth factor gene expression in endothelial cells: identification of a 5 prime enhancer // *Circ. Res.* 1995. № 77. P. 638–643; Hu J., Disher D.J., Bishopric N.H. et al. Hypoxia regulates expression of the endothelin-1 gene through a proximal hypoxia-inducible factor-1 binding site on the antisense strand. *Biochem // Biophys. Res. Commun.* 1998. № 245. P. 894–899; Wenger R.H., Stiehl D.P., Camenisch G. Integration of oxygen signaling at the consensus HRE // *Sci. STKE.* 2005. V. 306. P. 12.

² Cummins E.P., Taylor C.T. Hypoxia-responsive transcription factors // *Pfluger Arch. - Eur. J. Physiol.* 2005. № 450. P. 363–371.

³ Reyes H., Reisz-Porszasz S., Hankinson O. Identification of the Ah receptor nuclear translocation protein Arnt as a component of the DNA binding form of the Ah receptor // *Science.* 1992. № 256. P. 1193–1195.

ксенобиотических реагирующих элементах¹. Однако участие этого регуляторного пути в экспрессии $[Na^+]_i/[K^+]_i$ -чувствительных генов кажется маловероятным. Действительно, мы наблюдали очень незначительное повышение экспрессии *Cyp1b1*, вызванное убаином и безкальциевой средой (в 1,41 и 1,54 раза соответственно), в отличие от 15-кратного увеличения экспрессии *Cyp1a1* (табл. 9). Мы не обнаружили каких-либо изменений в мРНК, кодирующих регуляторные (p65, cRel, RelB, p50, p52) и ингибирующие (IκB) субъединицы NFκB. Iκbkg и Iκbke кодируют киназы, которые фосфорилируют IκB, вызывая его диссоциацию, и активируют NFκB-опосредованную транскрипцию, тогда как SIK1 взаимодействует с Iκbke и ингибирует его². Экспрессия как Iκbkg/Iκbke, так и Sike1 была снижена до 5 раз в среде, свободной от убаина и K^+ (табл. 11). Таким образом, окончательный результат повышения отношения $[Na^+]_i/[K^+]_i$ к активности этого регуляторного пути остается неизвестным. MDM2 является основным негативным регулятором p53. Повышение соотношения $[Na^+]_i/[K^+]_i$ увеличивало экспрессию *Mdm2* в 3 раза (табл. 11), что предполагает ингибирование транскрипции p53, а не активацию, обнаруженную при гипоксии³. Мы наблюдали, что 6-часовое ингибирование Na^+ , K^+ -АТФазы приводило к 2–3-кратному ослаблению мРНК, кодирующих АМР-активированные протеинкиназы (АМРК) регуляторные субъединицы *Prkag1* и *Prag2* (табл. 10). Эти данные свидетельствуют о том, что повышение отношения $[Na^+]_i/[K^+]_i$ скорее ослабляет, чем

¹ Zhang N., Walker M.K. Crosstalk between the aryl hydrocarbon receptor and hypoxia on the constitutive expression of cytochrome P4501A1 mRNA // *Cardiovasc. Toxicol.* 2007. № 7. P. 282–290; Schultz M.A., Timmermans L., Godschalk R.W. et al. Diminished carcinogen detoxification is a novel mechanism for hypoxia-inducible factor 1-mediated genetic instability // *J. Biol. Chem.* 2010. № 285. P. 14558–14564.

² Chen R., Castranova V., Shi X. et al. New insights into the role of nuclear factor-κB, a ubiquitous transcription factor in the initiation of diseases // *Clin. Chem.* 1999. № 45. P. 7–17.

³ Alarcon R., Koumenis C., Geyer R.K. et al. Hypoxia induces p53 accumulation through MDM2 down-regulation and inhibition of E6-mediated degradation // *Cancer Res.* 1999. № 59. P. 6046–6051.

активирует АМПК, повышенная активность которой была обнаружена в гипоксических клетках¹.

Ранее мы продемонстрировали, что 3-часовое ингибирование Na^+ , K^+ -АТФазы в RVSMC под действием убаина и свободной от K^+ среде увеличивает Egr1 в 5 и 7 раз соответственно². Продление времени инкубации до 6 часов уменьшало прирост РНК Egr1 (табл. 11), что свидетельствует о временной активации этого фактора транскрипции. Мы также задокументировали активацию фактора транскрипции AP-1, о чем свидетельствует до 8-кратное увеличение РНК, кодирующих его основные субъединицы, включая Fos, Jun, Atf3, Maff и Mafk (табл. 11). Эти данные показывают, что AP-1 и Egr1 являются основными индуцируемыми гипоксией факторами транскрипции, которые также активируются повышением соотношения $[\text{Na}^+]_i/[\text{K}^+]_i$.

S-F. Yan и его коллеги сообщили, что гипоксия вызывает Egr1 в культивируемых клетках, полученных из гепатомы, с дефицитом HIF-1b³. Мы обнаружили, что накопление мРНК Fos, запускаемое убаином, происходит в RVSMC с дефицитом HIF-1a (табл. 12), а это указывает на то, что пути Egr1 и AP-1 иницируются в ответ на удаление кислорода независимо от HIF-1. В качестве альтернативной гипотезы мы предлагаем, что активация Egr1, AP-1 и других генов, устойчивых к siRNA Hif-1a, перечисленных в табл. 13, в гипоксических клетках опосредована истощением АТФ, ингибированием Na^+ , K^+ -АТФазы и диссипацией трансмембранных градиентов одновалентных катионов (рис. 46).

¹ Ahn Y-L., Kim H., Lim H. et al. AMP-activated protein kinase: implications on ischemic diseases // *BMB reports*. 2012. № 45. P. 489–495.

² Koltsova S.V., Trushina Y., Haloui M. et al. Ubiquitous $[\text{Na}^+]_i/[\text{K}^+]_i$ -sensitive transcriptome in mammalian cells: evidence for Ca^{2+} -independent excitation-transcription coupling // *PLoS One*. 2012. № 7. P. 38032.

³ Yan S-F., Lu J., Zou Y.S. et al. Hypoxia-associated induction of early growth response-1 gene expression // *J. Biol. Chem.* 1999. № 274. P. 15030–15040.

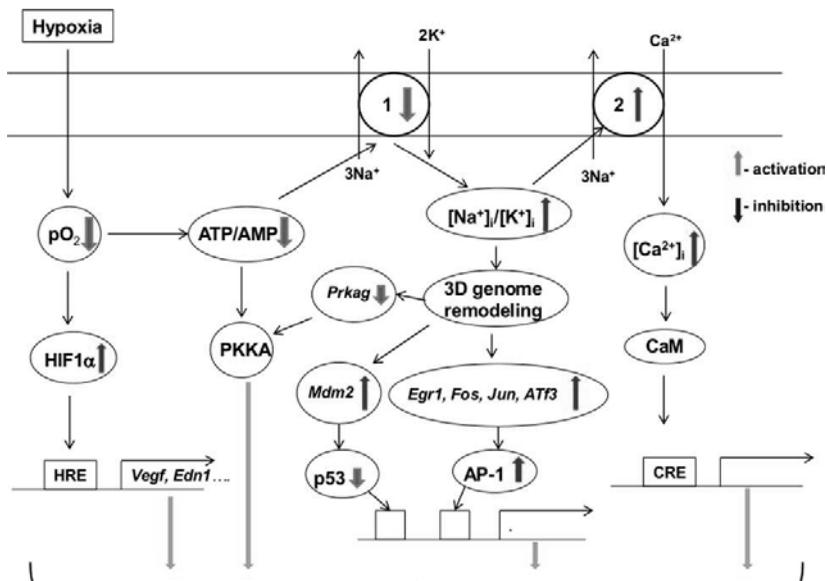


Рис. 46. Возможные механизмы участия повышенного отношения $[Na^+]_i/[K^+]_i$ в транскриптомных изменениях, вызванных гипоксией: рабочая гипотеза: 1 – Na^+ , K^+ -АТФаза; 2 – Na^+ / Ca^{2+} -обменник; CaM – кальмодулин; CRE – Ca^{2+} -чувствительные элементы¹

Было показано, что увеличение Na^+_i , а не потеря K^+_i увеличивает экспрессию Fos в RVSMC 2. Многочисленные исследования обнаружили, что повышение $[Na^+]_i$ повышает $[Ca^{2+}]_i$ посредством активации Na^+_i/Ca^{2+} -обменника, а также посредством деполяризации и активации управляемых напряжением

¹ Koltsova S.V., Shilov B., Burulina J.G., Akimova O.A., Haloui M., Kapilevich L.V., Gusakova S.V., Tremblay J., Hamet P., Orlov S.N. Transcriptomic changes triggered by hypoxia: evidence for HIF-1α -independent, $[Na^+]_i/[K^+]_i$ -mediated excitation-transcription coupling // PLoS ONE. 2014. № 9 (11): e110597. doi: 10.1371/journal.pone.0110597.

² Taurin S., Dulin N.O., Pchejetski D. et al. c-Fos expression in ouabain-treated vascular smooth muscle cells from rat aorta: evidence for an intracellular-sodium-mediated, calcium-independent mechanism // J. Physiol. 2002. № 543. P. 835–847.

каналов Ca^{2+} .¹ Хорошо документировано, что повышение $[\text{Ca}^{2+}]_i$ влияет на экспрессию генов путем активации элементов цАМФ-ответа посредством фосфорилирования CREB с помощью (Ca^{2+} -кальмодулин)-зависимой протеинкиназы и дефосфорилирования ядерного фактора АТ (NFAT) кальциневрином². В предыдущем исследовании мы обнаружили, что добавление внеклеточных (EGTA) и внутриклеточных (BAPTA) Ca^{2+} -хелаторов увеличивало, а не уменьшало количество $[\text{Na}^+]_i/[\text{K}^+]_i$ -чувствительных генов³. Следует отметить, однако, что эти соединения могут влиять на клеточные функции независимо от истощения Ca^{2+} . Так, например, мы наблюдали, что добавление EGTA увеличивает проницаемость клеток гладких мышц сосудов для Na^+ ⁴. Таким образом, необходимо провести дополнительные эксперименты для выяснения относительного влияния Ca^{2+} -опосредованной и Ca^{2+} -независимой передачи сигналов, показанной на рис. 46, на изменения транскриптомики, вызванные гипоксией.

Мы установили, что повышение отношения $[\text{Na}^+]_i/[\text{K}^+]_i$ способствует транскриптомным изменениям, вызванным гипоксией и депривацией глюкозы, независимо от передачи сигналов, опосредованной HIF-1. Молекулярное происхождение вышестоящего сенсора и относительный вклад повышения $[\text{Na}^+]_i$ и потери $[\text{K}^+]_i$ в запуск этого нового сигнального пути, включая усиленную экспрессию индуцируемых гипоксией транскрипционных факторов Egr1 и AP-1, остаются неизвестными. Недавние исследования показали, что модуляция метилирования гистонов

¹ McDonald T.F., Pelzer S., Trautwein W. et al. Regulation and modulation of calcium channels in cardiac, skeletal, and smooth muscle cells // *Physiol. Rev.* 1994. № 74. P. 365–512; Blaustein M.P., Lederer W.J. Sodium/calcium exchange: its physiological implications // *Physiol. Rev.* 1999. № 79. P. 763–854.

² Alberini C.A. Transcription factors in long-term memory and synaptic plasticity // *Physiol. Rev.* 2009. № 89. P. 121–145.

³ Koltsova S.V., Trushina Y., Haloui M. et al. Ubiquitous $[\text{Na}^+]_i/[\text{K}^+]_i$ -sensitive transcriptome in mammalian cells: evidence for Ca^{2+} -independent excitation-transcription coupling // *PLoS One.* 2012. № 7. P. 38032.

⁴ Orlov S.N., Aksentsev S.L., Kotelevtsev S.V. Extracellular calcium is required for the maintenance of plasma membrane integrity in nucleated cells // *Cell Calcium.* 2005. № 38. P. 53–57.

с помощью эпигенетического механизма является ключевым фактором, который клетки используют для адаптации к гипоксии¹. Появляется все больше свидетельств того, что наряду с регуляцией 5'-UTR транскрипционными факторами, активацией генов или глушением находится под сложным контролем трехмерное позиционирование генетических материалов и хроматина в ядерных пространствах². Роль соотношения $[Na^+]_i/[K^+]_i$ в эпигенетической регуляции трехмерной организации генома и его связь с молчанием и активацией генов в настоящее время изучаются в нашей лаборатории.

4.4. Роль одновалентных катионов в регуляции экспрессии генов при электростимуляции миобластов

В предыдущих разделах монографии мы суммировали результаты исследований влияния физической нагрузки на содержание миокинов. Увеличение $[Ca^{2+}]_i$, снижение парциального давления кислорода и активация АМПК, отмеченные в работающих мышцах, рассматриваются как основные пусковые механизмы этого явления. Наряду с перечисленными выше факторами мышечная нагрузка сопровождается диссипацией трансмембранного градиента моновалентных катионов и увеличения соотношения $[Na^+]_i/[K^+]_i$. Нами было установлено, что в клетках всех исследованных на этот предмет тканей увеличение $[Na^+]_i/[K^+]_i$ является достаточным условием изменения транскрипции десятков универсальных и сотен тканеспецифических генов. В последующих главах мы показали, что в ряде случаев эти изменения транскрипции не связаны с возможным приростом $[Ca^{2+}]_i$. Мы также показали, что в условиях гипоксии наблюдается увеличение $[Na^+]_i/[K^+]_i$ и это может быть доста-

¹ Johnson A.B., Denko N., Barton M.C. Hypoxia induces a novel signature of chromatin modifications and global repression of transcription // *Mutat. Res.* 2008. № 640. P. 174–179.

² Lanctot C., Cheutin T., Gremer M. et al. Dynamic genome architecture in the nuclear space: regulation of gene expression in three dimensions // *Nature Rev. Genet.* 2007. № 8. P. 104–115; Gibcus J.H., Dekker J. The hierarchy of the 3D genome // *Mol. Cell.* 2013. № 49. P. 773–782.

точным условием изменения транскриптома этих клеток. В заключительной главе мы приводим данные, полученные при изучении роли одновалентных катионов в изменении транскриптома культивируемых клеток скелетной мускулатуры в ответ на их электрическую стимуляцию.

Культивируемые клетки скелетной мышцы, подвергнутые электростимуляции (electrical pulse stimulation, EPS), широко используются как *in vitro* модель тренировки скелетной мышцы. Этот подход основан на нескольких наблюдениях. Во-первых, в дифференцированных миотубулах, полученных из мышиных (линия C2C12)¹, крысиных L6² и человеческих клеток³ скелетной мышцы, EPS приводит к метаболическим и адаптационным изменениям, обнаруженным в изолированных мышцах после физической нагрузки⁴. Во-вторых, в ответ на электростимуляцию миотубулы C2C12 показывают сократительные реакции⁵ и повторяющиеся увеличения концентрации внутриклеточного

¹ Nedachi T., Fujita H., Kanzaki M. Contractile C2C12 myotube model for studying exercise-inducible responses in skeletal muscle // *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2008. № 295. E1191–E1204; Burch N., Arnold A.S., Item F., Summermatter S., Brochmann S.S.G., Christe M., Boutellier U., Toigo M., Handschin C. Electric pulse stimulation of cultured murine muscle cells reproduces gene expression changes of trained mouse muscle // *PLoS One.* 2010. № 5. e10970.

² Yano S., Morino-Koga S., Kondo T., Suico M.A., Koga T., Shimauchi Y., Matsuyama S., Shuto T., Sato T., Araki E. et al. Glucose uptake in rat skeletal muscle L6 cells is increased by low-intensity electrical current through the activation of the phosphatidylinositol-3-OH kinase (PI-3K)/Akt pathways // *J. Pharmacol. Sci.* 2010. № 115. P. 94–98.

³ Nikolic N., Bakke S.S., Kase E.T., Rudberg I., Halle I.F., Rustan A.C., Thoresen G.H., Aas V. Electrical pulse stimulation of cultured human skeletal muscle cells as an *in vitro* model of exercise // *PLoS One.* 2012. № 7. e33203.

⁴ Egan B., Zierath J.R. Exercise metabolism and the molecular regulation of skeletal muscle adaptation // *Cell Metab.* 2013. № 17. P. 162–184.

⁵ Nedachi T., Fujita H., Kanzaki M. Contractile C2C12 myotube model for studying exercise-inducible responses in skeletal muscle // *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2008. № 295. E1191–E1204; Fujita H., Nedachi T., Kanzaki M. Accelerated *de novo* sarcomere assembly by electric pulse stimulation in C2C12 myotubes // *Exp. Cell Res.* 2007. № 313. P. 1853–1865; Park H., Bhalla R., Saigal R., Radisic M., Watson N., Langer R., Vunjak-Novakovic G. Effects of electrical stimulation in C2C12 muscle constructs // *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 2008. № 2. P. 279–287.

кальция ($[Ca^{2+}]_i$). В-третьих, в миотубулах C2C12¹ и первичных культивируемых миотубулах человека² электростимуляция запускает секрецию интерлейкина 6 и нескольких других миокинов, уровень содержания которых резко возрастает у человека и животных в ответ на физическую нагрузку³.

В первой серии экспериментов⁴ мы обнаружили, что 7-дневное нахождение в питательной среде, обедненной сывороточными факторами роста и при наличии инсулина, привело к миогенному дифференцированию клеток C2C12, наблюдаемому как слияние клеток и формирование протяженных многоядерных мышечных трубочек (рис. 47, А). Это заключение также подтверждается появлением тропонина Т, т.е. хорошо известно-го биохимического маркера скелетной мышцы (рис. 47, В).

Далее мы сопоставили действие электростимуляции и ингибитора убаина на жизнеспособность C2C12 клеток. На рис. 48, А показано, что электростимуляция в течение 2 часов не влияет на жизнеспособность миотубул C2C12 (оценка проводилась набором AlamarBlue), тогда как после 4 часов инкубации этот параметр уменьшился на 20%. Мы не выявили цитотоксическо-

¹ Nedachi T., Fujita H., and Kanzaki M. Contractile C2C12 myotube model for studying exercise-inducible responses in skeletal muscle // *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2008. № 295. E1191–E1204; Nedachi T., Hatakeyama H., Kono T., Sato M., Kanzaki M. Characterization of contraction-inducible CXC chemokines and their roles in C2C12 myocytes // *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2009. № 297. E866–E878; Whitham M., Chan M.H.S., Pal M., Matthews V.B., Prelovsek J., Wunderlich F.T., Lancaster G.I., Febbraio M.A. Contraction-induced interleukin-6 gene transcription in skeletal muscle is regulated by c-Jun terminal kinase/activator protein-1 // *J. Biol. Chem.* 2012. № 287. P. 10771–10779.

² Scheler M., Irmeler M., Lehr S., Hartwig S., Staiger H., Al-Hasani H., Beckers J., de Angelis M.H., Haring H.-U., Weigert C. Cytokine response of primary human myotubes in an in vitro exercise model // *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2013. № 305. C877–C886.

³ Pedersen B.K., Febbraio M.A. Muscle as an endocrine organ: focus on muscle-derived interleukin-6 // *Physiol. Rev.* 2008. № 88. P. 1379–1406; Iizuka K., Machida T., Hirafuji M. Skeletal muscle is an endocrine organ // *J. Pharmacol. Sci.* 2014. № 125. P. 125–131; Kapilevich L.V., Kironenko T.A., Zaharova A.N., Kotelevtsev Yu.V., Dudlin N.O., Orlov S.N. Skeletal muscle as an endocrine organ: role of $[Na^+]_i/[K^+]_i$ -mediated excitation-transcription coupling // *Genes & Diseases.* 2015. № 2. P. 328–336.

⁴ Danilov K., Sidorenko S.V., Milovanova K., Klimanova E.A., Kapilevich L.V., Orlov S.N. Electrical pulse stimulation decreases electrochemical Na^+ and K^+ gradients in C2C12 myotubes // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2017. № 493. P. 875–878.

го действия инкубации в течение 6 часов в присутствии убаина в диапазоне от 1 до 3 000 мкМ. Основываясь на этих данных, мы изучили кинетику действия электростимуляции на внутриклеточную концентрацию одновалентных катионов. На рис. 48, *B* показано, что электростимуляция приводила к диссипации трансмембранного градиента одновалентных катионов.

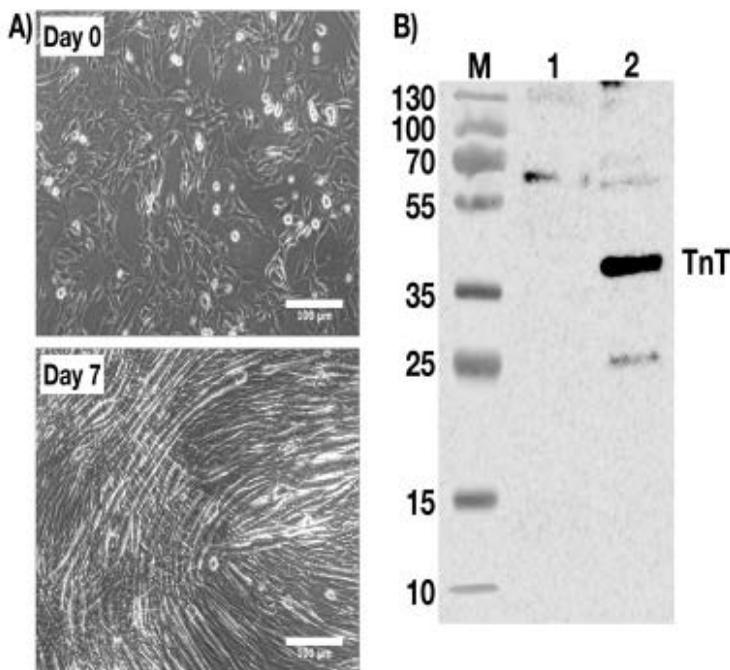


Рис. 47. Морфологические и биохимические изменения клеток C2C12 во время дифференцировки в среде DMEM с добавлением 2% телячьей сыворотки и 1 нМ инсулина. (A) Фазово-контрастная микроскопия клеток C2C12 до дифференцировки (день 0) и через неделю воздействия на них среды дифференцировки (день 7). (B) Вестерн-блот-анализ маркера дифференцировки миоцитов тропонина-Т (TnT) скелетных мышц в клетках C2C12 до (1) и после недели дифференцировки (2), показаны маркеры молекулярной массы (M)

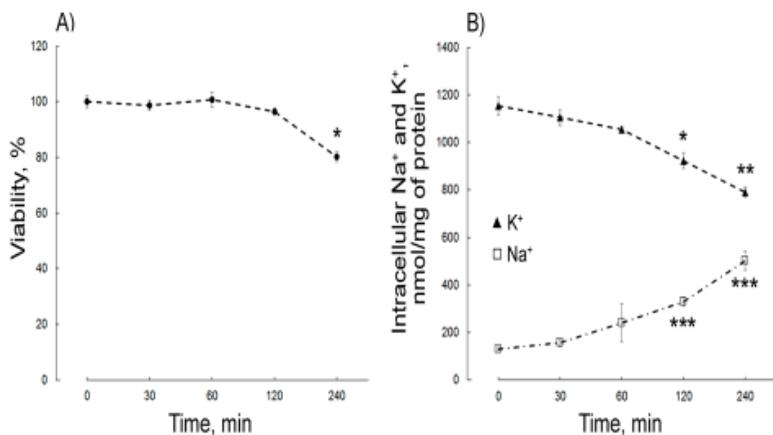


Рис. 48. Воздействие EPS на миотубулы C2C12. Влияние EPS (40 В, 1 Гц, 10 мс) на жизнеспособность (A) и внутриклеточное содержание Na^+ и K^+ (B) в миотубулах C2C12. Среднее значение \pm стандартное отклонение, получены в трех экспериментах; жизнеспособность контрольных образцов была принята за 100%. **, *** – $p < 0,01$ и $0,005$ по сравнению с необработанными EPS клетками

Через 2 и 4 часа электростимуляции содержание $[\text{Na}^+]_i$ увеличилось со 130 до 330 и 500, тогда как $[\text{K}^+]_i$ снизилось с 1150 до 922 и 790 нмоль на $(\text{мг белка})^{-1}$ соответственно. Эти результаты согласуются с потерей $[\text{K}^+]_i$ и увеличением $[\text{Na}^+]_i$, продемонстрированных при тренировке скелетных мышц *in vivo*, а также в свежeweделенных изолированных волокнах скелетных мышц во время индукции деполяризованного тока. Известно, что сарколемма и Т-трубочка скелетной мышцы обогащены потенциал-зависимыми Na^+ -каналами Nav1.4, Nav1.5, Nav1.6, потенциал-зависимыми K^+ -каналами (Kv1.4, Kv3.4, Kv7.5) и Ca^{2+} -активируемыми K^+ -каналами, большой (KCa1.1) и низкой (KCa2.2 и KCa2.3) проводимости¹. Относительное участие этих ионных каналов, а также переносчиков одновалентных катионов

¹ Jurkat-Rott K., Fauler M., Lehmann-Horn F. Ion channels and ion transporters of the transverse tubular system of skeletal muscle // J. Muscle Res. Cell. Motil. 2006. № 27. P. 275–290.

в увеличение соотношения $[Na^+]_i/[K^+]_i$ в ответ на электрическую стимуляцию миотубул будет изучено нами в последующих экспериментах.

Имея в виду участие альфа-1- и альфа-2- Na^+ , K^+ -АТФазы в регулировании соотношения $[Na^+]_i/[K^+]_i$ в покое и при электростимуляции изолированных волокон скелетной мышцы соответственно¹, мы сопоставили дозозависимое действие убаина на внутриклеточное содержание $[Na^+]_i$ и $[K^+]_i$ в миотубулах C2C12 в контроле и после электростимуляции. Рассматривая предыдущие результаты (рис. 48, А), мы ограничили время инкубации до 2 часов. В контрольных клетках полное ингибирование альфа-2- Na^+ , K^+ -АТФазы путем добавления 3 мкМ убаина² не оказало существенного влияния на $[K^+]_i$, но увеличило $[Na^+]_i$ со 128 до 160 нмолей (на мг белка)⁻¹. В отличие от низких доз убаина, ингибирование альфа-1- Na^+ , K^+ - АТФазы 1 000 мкМ убаина увеличило $[Na^+]_i$ и уменьшило $[K^+]_i$ в ~7- и 5-раз соответственно (рис. 49, А, В).

Эти результаты согласуются с изменениями содержания моновалентных катионов, наблюдаемыми в изолированных волокнах скелетной мышцы крысы после двухчасового нахождения в убаине с концентрацией 1 000 микроМ³. В отличие от начальных условий, электростимуляция резко увеличила чувствительность миотубул C2C12 к низким дозам убаина. В самом деле, воздействие на EPS-обработанные клетки 3 микроМ убаина привело к потере $[K^+]_i$ от 830 до 675 нмолей (на 1 мг белка)⁻¹.

¹ Murphy K.T., Macdonald W.A., McKenna M.J., Clausen T. Ionic mechanisms of excitation-induced regulation of Na^+ , K^+ -ATPase mRNA expression in isolated rat EDL muscle // *Am. J. Physiol. Integr. Comp. Physiol.* 2006. № 290. R1397–R1406; Minke B., Cook B. TRP channel proteins and signal transduction // *Physiol. Rev.* 2002. № 82. P. 429–472.

² Radzyukevich T.L., Lingrel J.B., Heiny J.A. The cardiac glycoside binding site of the Na, K -ATPase $\alpha 2$ isoform plays a role in the dynamic regulation of active transport in skeletal muscle // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2009. № 106. P. 2565–2570.

³ Kapilevich L.V., Kironenko T.A., Zaharova A.N., Kotelevtsev Yu.V., Dulin N.O., Orlov S.N. Skeletal muscle as an endocrine organ: role of $[Na^+]_i/[K^+]_i$ -mediated excitation-transcription coupling // *Genes & Diseases.* 2015. № 2. P. 328–336.

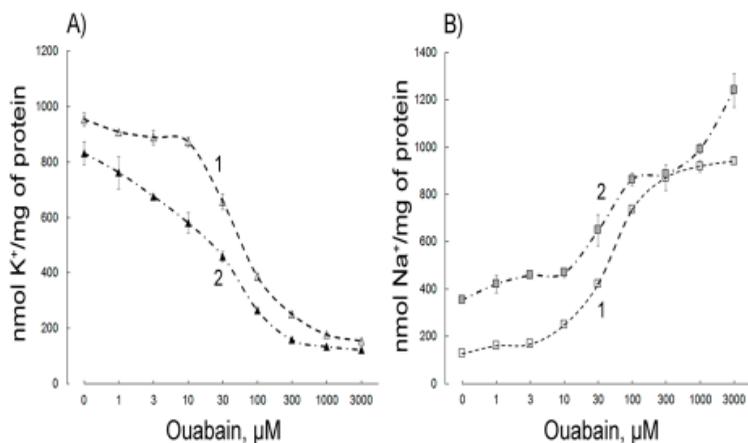


Рис. 49. Дозозависимое действие применения уабаина в контрольных и обработанных EPS миотубулах C2C12. Дозозависимое действие 2-часового применения уабаина на внутриклеточное содержание K⁺ (A) и Na⁺ (B) в контрольных миотубулах C2C12 (1) и миотубулах, подвергнутых воздействию EPS (40 В, 1 Гц, 10 мс; 2). Среднее значение ± стандартное отклонение получены в трех независимых экспериментах. *, **, *** – p < 0,05, 0,01 и 0,005 соответственно

При этой концентрации уабаин увеличивал соотношение $[Na^+]_i/[K^+]_i$ в контроле и EPS-обработанных клетках на 35 и 85% соответственно. Используя иммуносорбентный анализ и ингибирование поглощения ⁸⁶Rb эритроцитами, Бауэр с сотрудниками продемонстрировали, что 15-минутный бег приводит к увеличению содержания уабаин-подобных соединений в венозной плазме человека от 5 до 100 нМ¹. Наши результаты свидетельствуют о том, что усиление продукции уабаина и / или других эндогенных кардиотонических стероидов, обнаруженных в этом исследовании, может способствовать повышению $[Na^+]_i/[K^+]_i$ соотношения при нагрузке скелетной мышцы через

¹ Bauer N., Muller-Ehmsen J., Kramer U., Hambarchian N., Zobel C., Schwinger R.H., Neu H., Kirch U., Grunbaum E.G., Schoner W. Ouabain-like compound changes rapidly on physical exercise in humans and dogs: effects of b-blockage and angiotensin-converting enzyme inhibition // Hypertension. 2005. № 45. P. 1024–1028.

подавление активности альфа-2-Na⁺, K⁺-АТФазы. Описанные выше эксперименты позволили нам приступить к изучению роли изменения градиентов натрия и калия в регуляции транскрипции миотубул C2C12 в.

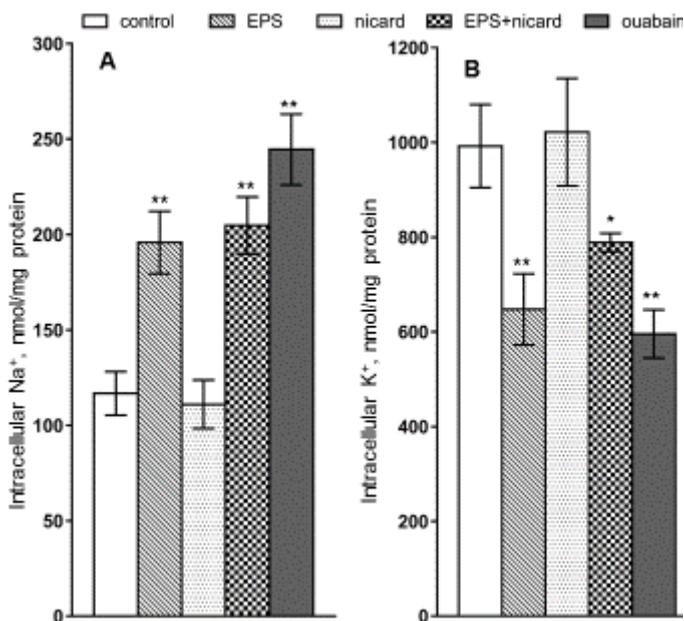


Рис. 50. Влияние электростимуляции (ЭПС), никардипина и убаина на внутриклеточное содержание Na⁺ (A) и K⁺ (B) в миотубулах C2C12. Клетки подвергали воздействию ЭПС с напряжением 40 В, длительностью стимулов 10 мс и частотой 1 Гц при наличии 10 мкМ никардипина и 30 мкМ убаина в течение 2 часов. Среднее значение ± стандартное отклонение получены в трех независимых экспериментах, выполненных в четырех повторениях. * и ** – p = 0,0062 и 0,0001 по сравнению с контролем соответственно¹

Как видно из рис. 50, 2-часовая электростимуляция миотубул C2C12 с напряжением 40 В, продолжительностью стимулов

¹ Sidorenko S., Klimanova E., Milovanova, K., Lopina O.D., Kapilevich L.V., Chibalin A.V., Orlov S.N. Transcriptomic changes in C2C12 myotubes triggered by electrical stimulation: Role of Ca²⁺_i-mediated and Ca²⁺_i-independent signaling and elevated [Na⁺]_i/[K⁺]_i ratio // Cell Calcium. 2018. V. 76. P. 72–86.

10 мс и частотой 1 Гц увеличила содержание Na^+_i на ~70% ($p < 0,01$) и уменьшила K^+_i на 70% ($p < 0,05$). Мы обнаружили, что 30 микроМ убаин увеличил Na^+_i в ~2 раза и уменьшил K^+_i на ~35%, таким образом имитируя действие электростимуляции по этим параметрам. Основываясь на этих результатах, мы использовали убаин в этой концентрации в дальнейших экспериментах.

В предварительных экспериментах мы обнаружили, что 3-часовая инкубация миотубул C2C12 с хелаторами внеклеточного и внутриклеточного Ca^{2+} (EGTA и ВАРТА-АМ соответственно) привели к повышению в ~ 4 раза соотношения $[\text{Na}^+]_i/[\text{K}^+]_i$.

Это наблюдение согласовывается с предыдущими результатами, полученными в клетках гладких мышц кровеносных сосудов¹, и может быть вызвано усиленной проницаемостью для моновалентных катионов каналов потенциалных транзиторных рецепторов (TRPM4, TRPM6, TRPM7)², а также потенциал-зависимых³ и Ca^{2+} -каналов, активирующихся при высвобождении внутриклеточного Ca^{2+} ⁴. Учитывая это, мы использовали никардипин в качестве ингибитора потенциал-зависимых Ca^{2+} -каналов L-типа, которые играют ключевую роль в сокращении скелетной мышцы⁵.

¹ Orlov S.N., Aksentsev S.L., Kotelevtsev S.V. Extracellular calcium is required for the maintenance of plasma membrane integrity in nucleated cells // *Cell Calcium*. 2005. V. 38. P. 53–57; Koltsova S.V., Tremblay J., Hamet P., Orlov S.N. Transcriptomic changes in Ca^{2+} -depleted cells: role of elevated intracellular $[\text{Na}^+]/[\text{K}^+]$ ratio // *Cell Calcium*. 2015. V. 58. P. 317–324.

² Gonzales A.L., Earley S. Endogenous cytosolic Ca^{2+} buffering is necessary for TRPM4 activity in cerebral artery smooth muscle cells // *Cell Calcium*. 2012. V. 51. P. 82–93.

³ Suarez-Kurtz G., Katz G.M. Currents carried by sodium ions through transient calcium channels in clonal GH3 pituitary cells // *Pflugers Arch*. 1987. V. 410. P. 345–347.

⁴ Minke B., Cook B. TRP channel proteins and signal transduction // *Physiol. Rev*. 2002. № 82. P. 429–472; DeHaven W.L., Smyth J.T., Boyles R.R., Putney J.W. Calcium inhibition and calcium potentiation of Orai1, Orai2, and Orai3 calcium release-activated calcium channels // *J. Biol. Chem*. 2007. № 282. P. 17548–17556.

⁵ Jurkat-Rott K., Fauler M., Lehmann-Horn F. Ion channels and ion transporters of the transverse tubular system of skeletal muscle // *J. Muscle Res. Cell. Motil*. 2006. № 27. P. 275–290; Rebeck R.T., Karunasekara Y., Board P.G., Beard N.A., Casarotto M.G., Dulhunty A.F. Skeletal muscle excitation-contraction coupling: who are the dancing partners? // *Int. J. Biochem. Cell Biol*. 2014. № 48. P. 28–38; Dulhunty A.F., Wei-

Рис. 50 показывает, что 2-часовая электростимуляция миотубул C2C12 сопровождается ритмическими увеличениями $[Ca^{2+}]_i$, измеренными по соотношению F340/F380 флуоресценции Fura-2. При концентрации 10 мкМ никардипин полностью блокировал колебания $[Ca^{2+}]_i$, вызванные электростимуляцией, без какого-либо влияния на максимальное приращение отношения F340/F380, вызванное ионофором Ca^{2+} A23187. Важно отметить, что мы не обнаружили значительного действия никардипина на внутриклеточное содержание одновалентных катионов в контрольных миотубулах C2C12, а также прирост Na^+ , вызванный их электростимуляцией (рис. 50).

Для изучения влияния электростимуляции на транскрипцию генов мы использовали технологию Affymetrix¹. Мы обнаружили, что при 2-часовой инкубации миотубул C2C12 с электростимуляцией экспрессия 1 392 транскриптов увеличилась до 8,35 раз и экспрессия 1 823 транскриптов уменьшилась до 3,78 раз (табл. 14). При отсутствии электростимуляции ингибирование с помощью никардипина потенциал-зависимых Ca^{2+} -каналов L-типа приводило к незначительным транскриптомным изменениям. Следует отметить, что с никардипином электростимуляция увеличивала до 5,47 раз и уменьшала до 3,23 раз содержание 931 и 2 177 транскриптов соответственно. Умеренное ингибирование Na^+ , K^+ -АТФазы 30 микроМ убаином приводило к появлению дифференциально экспрессирующихся 1 943 транскриптов, с максимальной кратностью повышения и понижения экспрессии в 1,86 и 2,86 соответственно. Поскольку никардипин устранял вызванные электростимуляцией колебания $[Ca^{2+}]_i$ (рис. 51), мы предложили подразделить транскриптомные изменения в миотубулах, подвергнутых электростимуляции, на три главных категории: Ca^{2+}_i -опосредованные транскриптомные изменения, т.е. транскриптомные изменения,

LaPierre L., Casarotto M.G., Beard N.A. Core skeletal muscle ryanodine receptor calcium release complex // Clin. Exp. Pharmac. Physiol. 2017. № 44. P. 3–12.

¹ Sidorenko S.V., Klimanova E.A., Milovanova K., Lopina O.D., Kapilevich L.V., Chibalin A.V., Orlov S.N. Transcriptomic changes in C2C12 myotubes triggered by electrical stimulation: role of Ca^{2+} -mediated and Ca^{2+} -independent signaling and elevated $[Na^+]_i/[K^+]_i$ ratio // Cell Calcium. 2018. V. 76. P. 72–86.

устраняемые никардипином; Ca^{2+}_i -независимые транскриптомные изменения, т.е. изменения транскрипции, обнаруженные как при наличии, так и при отсутствии никардипина, и Ca^{2+}_i -ингибированные транскриптомные изменения, т.е. изменения, обнаруженные исключительно при наличии никардипина.

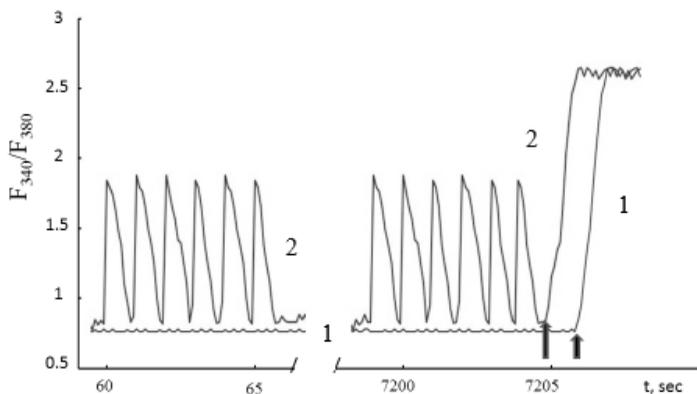


Рис. 51. Влияние электрической импульсной стимуляции при наличии (1) и отсутствии (2) 10 мкМ никардипина на внутриклеточную концентрацию Ca^{2+} , оцениваемую по соотношению флуоресценции Fura-2 F340/F380. Добавления 2 мкМ A23187 показаны стрелками¹

На рис. 52 показано, что на экспрессию 2 073 и 1 142 транскриптов электростимуляция влияет через Ca^{2+}_i -опосредованные и Ca^{2+}_i -независимые механизмы сопряжения возбуждения и транскрипции соответственно. Дифференциальная экспрессия 1 966 транскриптов, обнаруженная исключительно в миотубулах при наличии никардипина, ингибируется сигнальными путями, которые активируются колебаниями $[\text{Ca}^{2+}]_i$, вызванными электростимуляцией.

¹ Sidorenko S., Klimanova E., Milovanova, K., Lopina O.D., Kapilevich L.V., Chibalin A.V., Orlov S.N. Transcriptomic changes in C2C12 myotubes triggered by electrical stimulation: Role of Ca^{2+}_i -mediated and Ca^{2+}_i -independent signaling and elevated $[\text{Na}^+]_i/[\text{K}^+]_i$ ratio // Cell Calcium. 2018. V. 76. P. 72–86.

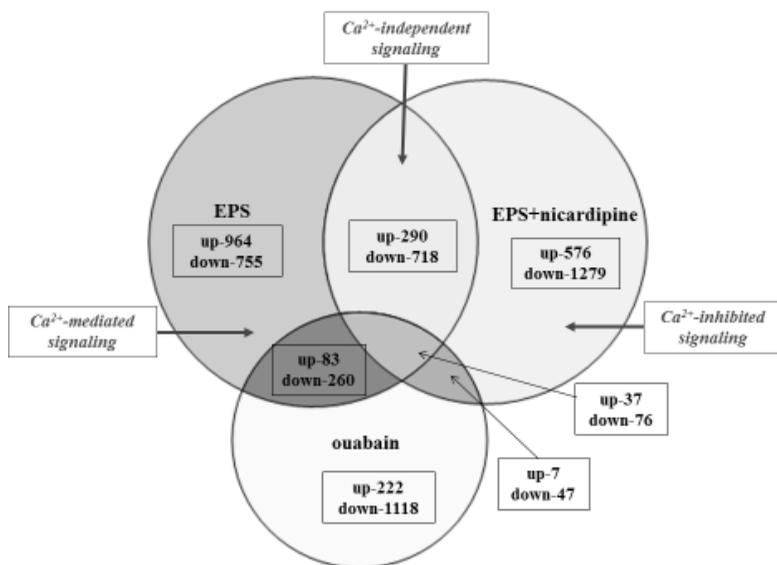


Рис. 52. Диаграмма Венна, представляющая распределение дифференциально экспрессированных транскриптов, идентифицированных в миотубулах C2C12, подвергшихся воздействию 30 мкМ уабаина или электростимуляции при отсутствии и наличии 10 мкМ никардипина. Число увеличивающихся (up) и понижающихся (down) транскриптов в соответствующих областях показаны внутри черных блоков¹

Мы наблюдали очень достоверную ($p < 10^{-5}$) положительную ($R^2 = 0,9732$) корреляцию между экспрессией транскриптов, затронутых EPS при наличии и отсутствии никардипина, что указывает на общие механизмы, лежащие в основе Ca^{2+}_i -независимого сопряжения возбуждения и транскрипции.

Сравнительный анализ выявил 456 транскриптов, экспрессия которых была изменена в миотубулах, подвергнутых электростимуляции, а также в миотубулах, подвергнутых прибли-

¹ Sidorenko S., Klimanova E., Milovanova, K., Lopina O.D., Kapilevich L.V., Chibalin A.V., Orlov S.N. Transcriptomic changes in C2C12 myotubes triggered by electrical stimulation: Role of Ca^{2+}_i -mediated and Ca^{2+}_i -independent signaling and elevated $[\text{Na}^+]_i/[\text{K}^+]_i$ ratio // Cell Calcium. 2018. V. 76. P. 72–86.

тельно тому же самому повышению $[Na^+]_i/[K^+]_i$ соотношения при наличии 30 мкМ убаина. Набор общих транскриптов, обнаруженных в обработанных убаином и EPS миотубулах, может быть далее разделен на убаин-чувствительные гены, дифференцированная экспрессия которых в подвергнутых электростимуляции клетках происходит через Ca^{2+} -независимые пути (у 37 транскриптов повышается и у 76 транскриптов понижается экспрессия) и Ca^{2+} -опосредованную сигнализацию (у 83 транскриптов повышается и у 260 понижается экспрессия) (рис. 52).

В течение прошлых двух десятилетий несколько исследовательских групп представили данные о том, что, наряду с каноническими $[Na^+]_i/[K^+]_i$ -опосредованными клеточными процессами, убаин и другие кардиотонические стероиды (cardiotonic steroids, CTSs) могут влиять на клетки независимо от ингибирования Na^+/K^+ -насоса, т.е. могут быть рассмотрены как новый класс стероидных гормонов. В этой связи мы приступили к изучению роли диссипации иных градиентов в изменениях транскриптома клеток при действии кардиотонических стероидов. Для достижения этой цели мы исследовали относительное влияние $[Na^+]_i/[K^+]_i$ -опосредованной и $[Na^+]_i/[K^+]_i$ -независимой сигнализации на транскриптомные изменения, вызванные эндогенными CTSs убаином и маринобуфагенином (marinobufagenin MBG) в эндотелиальных клетках пупочной вены человека (HUVES)¹. Мы обнаружили, что продление инкубации HUVES с 6 до 96 ч резко увеличило кажущееся сродство к убаину, оцененное потерей $[K^+]_i$ и приростом $[Na^+]_i$. Шестичасовая инкубация HUVES со 100 и 3,000 нМ убаина привела к повышению соотношения $[Na^+]_i/[K^+]_i$ в ~15 и 80 раз и изменяла экспрессию 258 и 2 185 транскриптов соответственно. Ни соотношение $[Na^+]_i/[K^+]_i$, ни транскриптом не были подвержены воздействию 6-часовой инкубации с 30 нМ убаином.

¹ Sidorenko S.V., Klimanova E.A., Milovanova K., Lopina O.D., Kapilevich L.V., Chibalin A.V., Orlov S.N. Transcriptomic changes in C2C12 myotubes triggered by electrical stimulation: role of Ca^{2+} -mediated and Ca^{2+} -independent signaling and elevated $[Na^+]_i/[K^+]_i$ ratio // Cell Calcium. 2018. V. 76. P. 72–86. URL: <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2018.09.007>

96-часовая инкубация с 3 нМ убаином или 30 нМ MBG повышала соотношение $[Na^+]_i / [K^+]_i$ в~14 и 3 раза и приводила к дифференциальной экспрессии 880 и 484 транскриптов соответственно. Эти параметры не были изменены после 96-й инкубации с 1 нМ убаином или 10 нМ MBG. Таким образом, наши результаты демонстрируют, что повышение соотношения $[Na^+]_i / [K^+]_i$ является обязательным условием для транскриптомных изменений, вызванных убаином.

Функциональная характеристика генов, чувствительных к электростимуляции, демонстрирующих самые высокие изменения транскрипции в ответ на электростимуляцию миотубул C2C12 (табл. 15–22), 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* (табл. 17), 12 гистонных групп (табл. 15 и 17) и 29 *microRNAs* (табл. 15–22). Эти гены могут рассматриваться в качестве промежуточных продуктов дифференциальной экспрессии генов позднего ответа, включая миокины, экспрессия которых была слегка увеличена через 2 ч электростимуляции¹ и далее потенцирована после продления электростимуляции до 48 ч². Эта гипотеза согласовывается с накоп-

¹ Sidorenko S.V., Klimanova E.A., Milovanova K., Lopina O.D., Kapilevich L.V., Chibalin A.V., Orlov S.N. Transcriptomic changes in C2C12 myotubes triggered by electrical stimulation: role of Ca²⁺-mediated and Ca²⁺-independent signaling and elevated $[Na^+]_i/[K^+]_i$ ratio // *Cell Calcium*. 2018. V. 76. P. 72–86. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2018.09.007>.

² Nedachi T., Fujita H., Kanzaki M. Contractile C2C12 myotube model for studying exercise-inducible responses in skeletal muscle // *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2008. № 295. E1191–E1204; Nikolic N., Bakke S.S., Kase E.T., Rudberg I., Halle I.F., Rustan A.C., Thoresen G.H., Aas V. Electrical pulse stimulation of cultured human skeletal muscle cells as an in vitro model of exercise // *PLoS One*. 2012. № 7. e33203; Whitham M., Chan M.H.S., Pal M., Matthews V.B., Prelovsek J., Wunderlich F.T., Lancaster G.I., Febbraio M.A. Contraction-induced interleukin-6 gene transcription in skeletal muscle is regulated by c-Jun terminal kinase/activator protein-1 // *J. Biol. Chem.* 2012. № 287. P. 10771–10779.

лением IRGs в биоптатах скелетной мышцы, полученных от людей после интенсивных упражнений¹.

Во-вторых, электростимуляция привела к почти 3-кратному повышению Ptgс2, кодирующего синтазу простагландинов (включая простагландин E2, PGE2), известную также как циклооксигеназа 2-го типа (COX-2) (табл. 17). Ранее повышенное содержание мРНК и белка COX-2 наблюдалось при сокращении скелетных мышц человека². 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 человека³. 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. В табл. 17 показано, что 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 мРНК Hsph1, кодирующего HSP 110 кДа, и Dnajb, кодирующего HSP40, стимулирующего активность АТФ-азы HSP70, прини-

¹ Broholm C., Laye M.J., Brandt C., Vadalasetty R., Pilegaard H., Pedersen B.K., Scheele C. LIF is a contraction-induced myokine stimulating human myocyte proliferation // J. Appl. Physiol. 2011. № 111. P. 251–259.

² Carroll C.C., O'Connor D.T., Steinmeyer R., Del Mundo J.D., McMullan D.R., Whitt J.A., Ramos J.E., Gonzales R.J. The influence of acute resistant exercise on cyclooxygenase-1 and -2 activity and protein levels in human skeletal muscle // Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 2013. № 305. P. R24–R30; Weinheimer E.M., Jemiolo B., Carroll C.C., Harber M.P., Haus J.M., Burd N.A., LeMoine J.K., Trappe S.W., Trappe T.A. Resistance exercise and cyclooxygenase (COX) expression in human skeletal muscle: implications for COX-inhibiting drugs and protein synthesis // Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 2007. № 292. P. R2241–R2248; Buford T.W., Cooke M.B., Willoughby D.S. Resistance exercise-induced changes of inflammatory gene expression within human skeletal muscle // Eur. J. Appl. Physiol. 2009. № 107. P. 463–471.

³ Standley R.A., Liu S.Z., Jemiolo B., Trappe S.W., Trappe T.A. Prostaglandin E2 induces transcription of skeletal muscle mass regulators interleukin-6 and muscle RING finger-1 in humans // Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids. 2013. № 88. P. 361–364.

мающего участие в сворачивании и предотвращении агрегации белка. Показано, что интенсивные физические нагрузки повышают содержание HSP70 в плазме¹. Важно отметить, что внеклеточный HSP70 регулирует экспрессию провоспалительных цитокинов, в том числе и ИЛ-6². Следует, однако, обозначить, что повышение уровня Hsp70 в плазме во время интенсивных физических нагрузок, вероятно, вызвано повышением локальной температуры циркулирующих моноцитов, а не электрической стимуляцией клеток скелетных мышц³.

В-четвертых, электрическая стимуляция увеличила в 6 раз содержание мРНК Hmx1, кодирующей гемоксигеназу-1 (табл. 17). 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. Рап и коллеги сообщили, что 60-минутное воздействие на миотубулы C2C12 электростимуляцией (45 V / 5 Hz / 20 ms) привело к 10-кратному увеличению флуоресценции зонда, чувствительного к воздействию кислорода⁴. Важно отметить, что, помимо железа и би-

¹ Ogura Y., Naito H., Akin S., Ichinoseki-Sekine N., Kurosaka M., Kakigi R., Sugiura T., Powers S.K., Katamoto S., Demirel H.A. Elevation of body temperature is an essential factor for exercise-increased extracellular heat shock protein 72 level in rat plasma // *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2008. № 294. R1600–R1607; Amorium F., Yamada P., Robergs R., Schneider S., Moseley P. Effects of whole-body heat acclimation on cell injury and cytokine responses in peripheral blood mononuclear cells // *Eur. J. Appl. Physiol.* 2011. № 111. P. 1618.

² Asea A., Kraeft S.K., Kurt-Jones E.A., Stevenson M.A., Chen L.B., Finberg R.W., Koo G.C., Calderwood S.K. HSP70 stimulates cytokine production through aCD14-dependant pathway, demonstrating its dual role as a chaperone and cytokine // *Nature Med.* 2000. № 6. P. 435–442.

³ Ogura Y., Naito H., Akin S., Ichinoseki-Sekine N., Kurosaka M., Kakigi R., Sugiura T., Powers S.K., Katamoto S., Demirel H.A. Elevation of body temperature is an essential factor for exercise-increased extracellular heat shock protein 72 level in rat plasma // *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2008. № 294. R1600–R1607; Gibson O.R., Dennis A., Parfitt T., Taylor L., Watt P.W., Maxwell N.S. Extracellular Hsp72 concentration relates to a minimum endogenous criteria during exercise-heat exposure // *Cell Stress Chaperones.* 2014. № 19. P. 389–400.

⁴ Pan H., Xu X., Hao X., Chen Y. Changes of myogenic reactivity oxygen species and interleukin-6 in contracting skeletal muscle cells // *Oxidative Medicine and Cellular Longevity.* 2012. doi:10.1155/2012/145418.

ливердина, деградация гема, катализируемая Htoх1, 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 адреномедулина (Adm, табл. 17) расслабляющего кровеносные сосуды через активацию аденилциклазы. Роль этих генов в усилении тока крови в тренирующейся мышце, остается неизвестной.

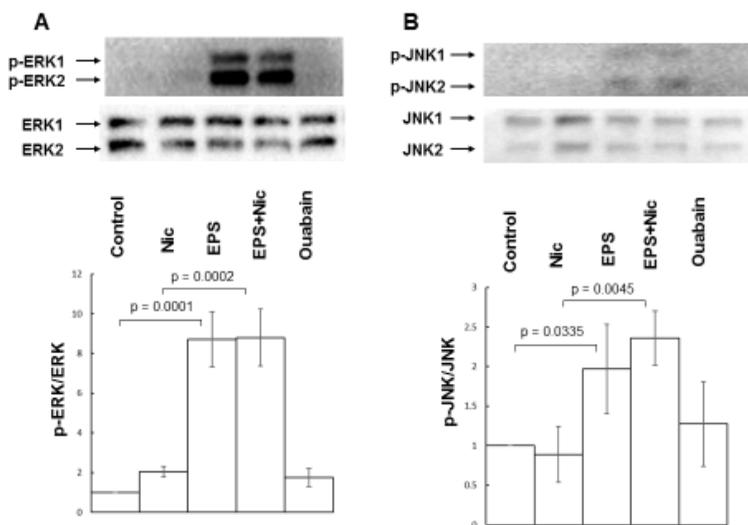


Рис. 53. Образец Western blots и относительное содержание фосфорилированных Erk1/2 (A) и JNK1/2 (B) в контрольных миотубулах C2C12 и после 2-часового воздействия 30 мкМ уабаина или электростимуляции (EPS) при отсутствии и наличии 10 мкМ никардипина. Содержание белков в контрольных клетках принималось равным 1,0. Данные, полученные в трех независимых экспериментах, представлены как среднее значение \pm стандартное отклонение¹

На экспрессию генов влияют разнообразные протеинкиназы и фосфатазы, контролирующие фосфорилирование факторов

¹ Sidorenko S., Klimanova E., Milovanova, K., Lopina O.D., Kapilevich L.V., Chibalin A.V., Orlov S.N. Transcriptomic changes in C2C12 myotubes triggered by electrical stimulation: Role of Ca²⁺_i-mediated and Ca²⁺_i-independent signaling and elevated [Na⁺]_i/[K⁺]_i ratio // Cell Calcium. 2018. V. 76. P. 72–86.

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 (рис. 53), серин / треонин-киназы Akt1, также известной как протеинкиназа B (PKB) (рис. 54) сАМР-связывающего белка CREB (рис. 55, A) и циклического АМР-зависимого транскрипционного фактора ATF-1 (рис. 55, B).

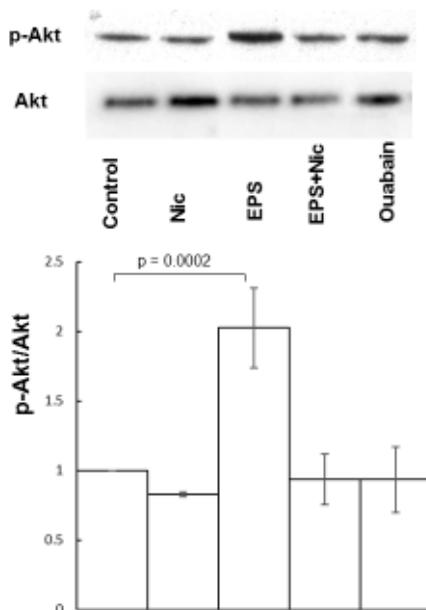


Рис. 54. Образец Western blots и относительное содержание фосфорилированного Akt в контрольных миотубулах C2C12 после 2-часового воздействия 30 мкМ убаина или электростимуляции (EPS) при отсутствии и наличии 10 мкМ никардипина. Содержание белков в контрольных клетках принималось равным 1,0. Данные, полученные в трех независимых экспериментах, представлены как среднее значение ± стандартное отклонение¹

¹ Sidorenko S., Klimanova E., Milovanova, K., Lopina O.D., Kapilevich L.V., Chibalin A.V., Orlov S.N. Transcriptomic changes in C2C12 myotubes triggered by electrical stimulation: Role of Ca²⁺_i-mediated and Ca²⁺_i-independent signaling and elevated [Na⁺]_i/[K⁺]_i ratio // Cell Calcium. 2018. V. 76. P. 72–86.

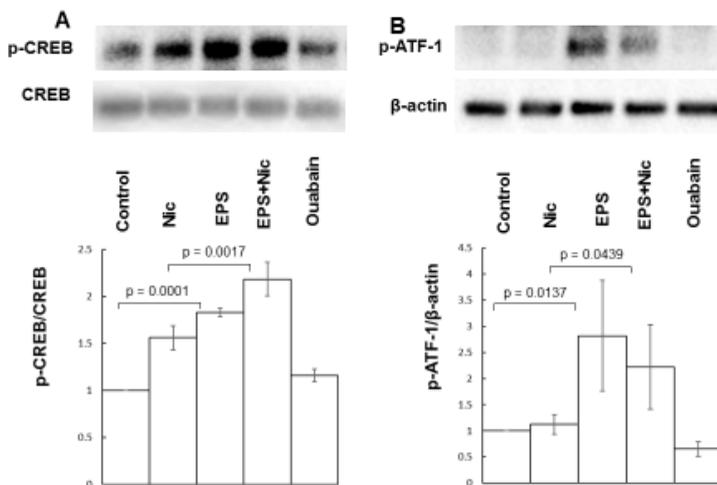


Рис. 55. Образец Western blots и относительное содержание фосфорилированных CREB (A) и Atf-1 (B) в контрольных миотубулах C2C12 и после 2-часового воздействия 30 мкМ уабаина или электроостимуляции (EPS) при отсутствии и наличии 10 мкМ никардипина. Содержание белков в контрольных клетках принималось равным 1,0. Данные, полученные в трех независимых экспериментах, представлены как среднее значение \pm стандартное отклонение¹

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 ч².

Приросты фосфорилирования ERK1/2, JNK1/2 и CREB сохранялись при наличии никардипина, что свидетельствует о том, что имеются Ca²⁺-независимые промежуточные звенья пе-

¹ Sidorenko S., Klimanova E., Milovanova, K., Lopina O.D., Kapilevich L.V., Chibalov A.V., Orlov S.N. Transcriptomic changes in C2C12 myotubes triggered by electrical stimulation: Role of Ca²⁺-mediated and Ca²⁺-independent signaling and elevated [Na⁺]/[K⁺]_i ratio // Cell Calcium. 2018. V. 76. P. 72–86.

² Whitham M., Chan M.H.S., Pal M., Matthews V.B., Prelovsek J., Wunderlich F.T., Lancaster G.I., Febbraio M.A. Contraction-induced interleukin-6 gene transcription in skeletal muscle is regulated by c-Jun terminal kinase/activator protein-1 // J. Biol. Chem. 2012. № 287. P. 10771–10779.

редачи 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 электростимуляции, что указывает на влияние Ca^{2+} -опосредованных сигнальных путей. Ни электростимуляция, ни убаин не влияли на фосфорилирование серина-529 в регуляторе транскрипции NFkB, треонина 286/287 в Ca^{2+} /кальмодулин-зависимой протеинкиназе II (CaMKII), а также фосфорилирование серина-79 в ацетил-СоА карбоксилазе (ACC) и серина-317 в Unc-51, используемых в качестве маркера активации AMPK.

Мы заметили, что электростимуляция привела к очень умеренному приращению содержания РНК, кодирующих IL-6 и несколько других миокинов (табл. 23). Ранее было показано, что в миотубулах C2C12, подвергшихся электростимуляции в течение 4, 24 и 48 часов, содержание мРНК IL-6 было увеличено 3-кратно¹. Важно отметить, однако, что увеличение электростимуляции в течение более 3 часов уменьшало жизнеспособность дифференцируемых клеток C2C12². Исходя из этого наблюдения, в данной работе мы ограничили электростимуляцию до 2 часов. Мы твердо убеждены в том, что усиленная экспрессия IGR и COX-2, вызванная кратковременным воздействием электростимуляции, играет ключевую роль в продукции миокинов, наблюдаемых в миотубулах при длительном возбуждении. Мы планируем проверить эту гипотезу в предстоящих экспериментах.

¹ Nedachi T., Fujita H., Kanzaki M. Contractile C2C12 myotube model for studying exercise-inducible responses in skeletal muscle // *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2008. № 295. E1191–E1204; Nikolic N., Bakke S.S., Kase E.T., Rudberg I., Halle I.F., Rustan A.C., Thoresen G.H., Aas V. Electrical pulse stimulation of cultured human skeletal muscle cells as an in vitro model of exercise // *PLoS One.* 2012. № 7. e33203; Whitham M., Chan M.H.S., Pal M., Matthews V.B., Prelovsek J., Wunderlich F.T., Lancaster G.I., Febbraio M.A. Contraction-induced interleukin-6 gene transcription in skeletal muscle is regulated by c-Jun terminal kinase/activator protein-1 // *J. Biol. Chem.* 2012. № 287. P. 10771–10779.

² Danilov K., Sidorenko S.V., Milovanova K., Klimanova E.A., Kapilevich L.V., Orlov S.N. Electrical pulse stimulation decreases electrochemical Na⁺ and K⁺ gradients in C2C12 myotubes // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2017. № 493. P. 875–878.

Т а б л и ц а 14

Транскриптомные изменения в миотубулах C2C12, вызванные EPS, никардипином и убаином¹

	Количество дифференциально экспрессирующихся транскриптов	Повышение транскриптов		Снижение транскриптов	
		Количество	Максимальная кратность	Количество	Максимальная кратность
EPS	3 215	1 392	8,35	1 823	3,78
Никардипин, 10 мМ	608	270	1,75	338	1,96
EPS + никардипин	<u>3 108</u>	<u>931</u>	<u>5,47</u>	<u>2 177</u>	<u>3,23</u>
Убаин, 30 мМ	1 934	387	1,86	1 547	2,86

Примечание. Транскрипты, содержание которых было изменено более чем в 1,2 раза ($p < 0,05$) по сравнению с контрольными и обработанными никардипином клетками, показаны обычным шрифтом и *курсивом* соответственно

Т а б л и ц а 15

Гены, экспрессия которых активируется EPS в отсутствие никардипина (Ca²⁺-опосредованная сигнализация)²

Обозначение гена	Кратность изменения	ANOVA p-значение	Функциональные категории
Hist1h3c	3,27	4,42E-03	HS
Hist1h3a	3,02	1,89E-02	HS
<i>Olfir764-ps1</i>	<i>2,08</i>	<i>1,99E-02</i>	<i>OVR</i>
Hist1h2bk	2,06	9,40E-03	HC
Mettl7a3	2,02	2,70E-02	O
<i>Olfir1047</i>	<i>1,9</i>	<i>3,11E-02</i>	<i>OVR</i>
Hist1h4n	1,9	7,35E-03	HC
<i>Olfir1251</i>	<i>1,89</i>	<i>3,46E-02</i>	<i>OVR</i>
Mir29a	1,84	4,37E-02	MR
Cst6	1,82	1,06E-02	PS

¹ Sidorenko S., Klimanova E., Milovanova, K., Lopina O.D., Kapilevich L.V., Chibalin A.V., Orlov S.N. Transcriptomic changes in C2C12 myotubes triggered by electrical stimulation: Role of Ca²⁺-mediated and Ca²⁺-independent signaling and elevated [Na⁺]_i/[K⁺]_i ratio // Cell Calcium. 2018. V. 76. P. 72–86.

² Ibid.

Обозначение гена	Кратность изменения	ANOVA p-значение	Функциональные категории
Mageb3	1,81	2,24E-02	IR
Rpl37	1,79	1,53E-03	PS
Atp6v0c	1,78	4,62E-03	O
Fabp5	1,74	7,39E-03	O
Trav13d-4	1,73	4,29E-02	IR
Depdc7	1,7	7,08E-03	S
Eif4a2	1,7	6,21E-04	PS
Hist1h2ac	1,69	4,65E-02	HC
Ceno	1,68	2,81E-02	O
Mir1957a	1,67	2,99E-03	MR
Mir20a	1,67	6,65E-03	MR
Sowahc	1,65	5,04E-03	O
Gapdh	1,62	2,44E-02	O
Rpl27a	1,61	3,01E-03	PS
<i>Olfir593</i>	<i>1,61</i>	<i>2,89E-03</i>	<i>OR</i>
Ppp1r18os	1,61	2,38E-02	S
Mirlet7f-1	1,61	1,98E-02	MR
Hist1h2bh	1,61	3,41E-02	HC
Mug2	1,6	2,35E-02	O
<i>Olfir1183</i>	<i>1,6</i>	<i>1,44E-02</i>	<i>OVR</i>
Rpl7a-ps3	1,6	4,12E-02	PS
BC094916	1,6	3,55E-02	O
Nkpd1	1,59	2,73E-02	O
Hist2h3b	1,59	6,49E-03	HC
Nxt1	1,59	1,25E-02	O
Mir17hg	1,59	6,06E-04	MR
Actg1	1,59	2,04E-02	O

Примечание. В данной таблице перечислены гены, кодирующие транскрипты, экспрессия которых была активирована EPS при отсутствии никардипина более чем в 1,56 раза. Гистоновые кластеры и обонятельные рецепторы показаны **жирным** шрифтом и *курсивом* соответственно. HC – кластеры гистонов; IR – иммунный / воспалительный ответ; MR – микроРНК; O – другие категории или неизвестная функция; OVR – обонятельные / вомероназальные рецепторы; PS – синтез белка, свертывание и катаболизм; S – сигнализация; TR – регуляция транскрипции.

**Гены, экспрессия которых ингибируется EPS при отсутствии
никардипина (Ca²⁺-опосредованная сигнализация)¹**

Обозначение гена	Кратность изменения	ANOVA р-значение	Функциональные категории
Mir466f-4	-2,53	1,27E-02	MR
Mir3092	-2,16	2,75E-03	MR
Mir3471-1	-2,02	8,19E-04	MR
Mir761	-2,01	2,97E-03	MR
Zfp300	-1,99	4,55E-02	TR
Vmn1r2	-1,95	3,23E-03	OVR
Lce3c	-1,95	8,78E-03	O
Vmn2r55	-1,94	5,47E-04	OVR
Ighv1-75	-1,88	2,70E-02	IR
Mir344d-2	-1,87	1,37E-03	MR
Igkv1-135	-1,86	3,17E-02	IR
Mir5123	-1,82	2,28E-03	MR
Mir466j	-1,82	5,22E-03	MR
Vmn1r119	-1,76	3,51E-03	OVR
Olfir523	-1,76	2,42E-02	OVR
Mir1839	-1,76	4,82E-02	MR
Mir3473d	-1,73	1,20E-02	MR
Mir709	-1,72	1,80E-02	MR
Csf2rb	-1,72	3,60E-02	IR
Ighv2-9	-1,72	3,21E-02	IR
Mir15a	-1,7	3,01E-02	MR
Ston2	-1,7	7,23E-04	O
Olfir1226	-1,69	3,32E-02	OVR
Vmn1r193	-1,68	3,08E-02	OVR
Mrgpra2b	-1,67	3,69E-02	S
Mir206	-1,67	4,68E-03	MR
Vmn2r113	-1,66	4,57E-02	OVR
mt-Tr	-1,65	3,51E-02	PS
Vmn1r25	-1,65	4,95E-02	OVR
Olfir1269	-1,65	4,44E-03	OVR
Vmn1r148	-1,64	6,90E-03	PVR
Mir301b	-1,64	2,25E-02	MR
Olfir1383	-1,63	4,99E-02	OVR
Cd300lh	-1,62	7,72E-03	IR

¹ Sidorenko S., Klimanova E., Milovanova, K., Lopina O.D., Kapilevich L.V., Chibalin A.V., Orlov S.N. Transcriptomic changes in C2C12 myotubes triggered by electrical stimulation: Role of Ca²⁺_i-mediated and Ca²⁺_i-independent signaling and elevated [Na⁺]_i/[K⁺]_i ratio // Cell Calcium. 2018. V. 76. P. 72–86.

Обозначение гена	Кратность изменения	ANOVA p-значение	Функциональные категории
Krtap4-13	-1,62	1,32E-02	O
Olfir372	-1,61	1,09E-02	OVR
Igkv17-121	-1,61	4,95E-03	IR
Mir103-2	-1,61	1,69E-02	MR
Olfir1219	-1,6	6,24E-03	OVR
Il1r2	-1,6	2,26E-02	IR

Примечание. В этой таблице перечислены гены, кодирующие транскрипты, экспрессия которых была увеличена в клетках, обработанных EPS, более чем в 1,6 раза. МикроРНК и обонятельные / вомероназальные рецепторы показаны **жирным** шрифтом и *курсивом* соответственно. Для функциональных категорий см. табл. 15.

Т а б л и ц а 17

Гены, экспрессия которых активируется EPS при отсутствии и при наличии никардинина (Ca²⁺-независимая сигнализация)¹

Обозначение гена	Кратность изменения (EPS)	ANOVA p-значения (EPS)	Кратность изменения (никардинин +EPS)	ANOVA p-value (никардинин +EPS)	Функциональная категория
Hmox1	6,37	8,00E-06	5,47	3,00E-05	O
Hspa1a	5,04	1,30E-05	3,77	2,00E-05	PS
Hspa1b	4,5	1,70E-04	3,95	6,36E-07	PS
Ier2	3,8	1,04E-04	3,09	1,40E-05	TR
Fos	3,58	2,40E-05	3,14	2,80E-05	TR
Dnajb1	3,57	3,00E-06	3,64	1,90E-05	PS
Hsph1	3,48	2,60E-05	2,95	7,77E-04	PS
Egr1	3,33	8,20E-05	2,95	3,85E-04	TR
Hist1h2bj	3,25	2,10E-02	1,76	1,17E-02	HC
Rgs2	3,04	2,30E-05	2,29	5,33E-04	S
Phlda1	3	1,38E-04	3,4	3,55E-04	S
Arc	2,9	3,40E-05	2,85	9,50E-05	S
Ddit3	2,78	3,59E-04	2,28	7,10E-05	TR
Ptgs2	2,74	4,05E-04	2,32	3,60E-05	O
Hist1h2ai	2,69	1,62E-03	1,4	4,77E-02	HC
Tmem95	2,68	1,20E-05	2,67	1,44E-02	O
Myc	2,58	2,12E-04	2,43	3,68E-04	TR
Egr2	2,56	3,60E-05	2,51	2,70E-04	TR
Hist4h4	2,53	1,98E-04	2,11	6,03E-03	HC
Mir1938	2,44	2,16E-03	2,14	2,81E-03	MR
Atf3	2,41	8,88E-04	2,3	5,42E-04	TR

¹ Sidorenko S., Klimanova E., Milovanova, K., Lopina O.D., Kapilevich L.V., Chibalov A.V., Orlov S.N. Transcriptomic changes in C2C12 myotubes triggered by electrical stimulation: Role of Ca²⁺ i-mediated and Ca²⁺ i-independent signaling and elevated [Na⁺]_i/[K⁺]_i ratio // Cell Calcium. 2018. V. 76. P. 72–86.

Обозначение гена	Кратность изменения (EPS)	ANOVA р-значения (EPS)	Кратность изменения (никардипин +EPS)	ANOVA р-value (никардипин +EPS)	Функциональная категория
Hist1h3e	2,39	1,21E-03	2,26	1,59E-03	HC
Fos1	2,38	1,68E-03	2,39	3,02E-04	TR
Rab26os	2,36	9,91E-04	1,74	7,34E-04	S
Dusp6	2,36	2,52E-03	2,25	3,58E-03	S
Hist1h2bm	2,35	1,94E-03	1,42	2,58E-03	HC
Btg2	2,34	5,95E-04	1,91	3,30E-04	TR
Fosb	2,28	3,60E-04	2,05	3,22E-03	TR
Adm	2,28	8,24E-04	2,06	9,05E-04	S
Dusp5	2,25	2,80E-05	2,04	9,97E-04	S
Mir450b	2,24	2,58E-03	2,58	6,11E-03	MR
Ftl1	2,23	1,99E-03	1,52	5,44E-03	O
BC031361	2,23	3,17E-03	1,44	2,89E-03	O
Snord14e	2,22	1,74E-04	2,06	7,60E-05	O
Id3	2,17	9,58E-07	1,77	3,60E-03	TR
Ccl7	2,16	3,64E-04	1,69	1,90E-05	IR

Примечание. В этой таблице перечислены гены, кодирующие транскрипты, содержание которых в клетках, обработанных EPS, было увеличено более чем в 2,16 раза. Регуляторы транскрипции, включая кластеры гистонов, выделены **жирным** шрифтом; кластеры гистонов подчеркнуты; белки теплового шока выделены *курсивом*. Для функциональных категорий см. табл. 15.

Т а б л и ц а 18

Гены, экспрессия которых ингибируется EPS при отсутствии и при наличии никардипина (Ca²⁺-независимая сигнализация)¹

Обозначение гена	Кратность изменения (EPS)	ANOVA р-значения (EPS)	Кратность изменения (никардипин +EPS)	ANOVA р-значения (никардипин+EPS)	Функциональная категория
mt-Ts2	-2,52	4,14E-03	-2,66	5,71E-04	PS
Dleu2	-2,49	6,21E-04	-2,66	3,59E-04	O
n-R5s27	-2,35	3,52E-03	-1,74	8,06E-03	PS
Mir3094	-2,3	1,65E-02	-2,21	1,14E-02	MR
Mir568	-2,22	7,39E-04	-2,35	3,79E-03	MR
Mir721	-2,16	6,98E-04	-1,7	2,18E-03	MR
mt-Tt	-2,15	1,60E-05	-2,25	1,05E-03	PS

¹ Sidorenko S., Klimanova E., Milovanova, K., Lopina O.D., Kapilevich L.V., Chibalov A.V., Orlov S.N. Transcriptomic changes in C2C12 myotubes triggered by electrical stimulation: Role of Ca²⁺_i-mediated and Ca²⁺_i-independent signaling and elevated [Na⁺]_i/[K⁺]_i ratio // Cell Calcium. 2018. V. 76. P. 72–86.

Обозначение гена	Кратность изменения (EPS)	ANOVA р-значения (EPS)	Кратность изменения (никардипин +EPS)	ANOVA р-значения (никардипин+EPS)	Функциональная категория
Mir149	-2,14	1,34E-04	-1,44	2,80E-02	MR
Mir1930	-2,05	1,01E-02	-1,43	4,87E-03	MR
Mir133b	-2	3,69E-03	-2,42	5,70E-05	MR
Mir145a	-1,95	1,42E-03	-1,85	8,22E-03	MR
Rps15a-ps6	-1,93	1,43E-02	-1,71	1,42E-02	PS
Mir872	-1,91	2,50E-02	-1,7	9,64E-03	MR
Kmt2d	-1,88	1,15E-04	-1,62	1,55E-03	O
Gan	-1,87	8,80E-05	-1,78	5,34E-03	O
Heatr5b	-1,86	3,70E-02	-1,82	1,99E-02	O
mt-Tk	-1,82	1,99E-03	-1,62	1,62E-02	PS
<i>Hoxc4</i>	<i>-1,81</i>	<i>3,72E-02</i>	<i>-1,42</i>	<i>6,37E-04</i>	<i>TR</i>
Spaca6	-1,79	4,10E-04	-1,3	1,83E-03	O
Tpd52l2	-1,78	5,71E-03	-2,21	1,84E-04	O
<i>Hoxc5</i>	<i>-1,76</i>	<i>7,22E-04</i>	<i>-2,11</i>	<i>6,99E-04</i>	<i>TR</i>
Olfrl303	-1,76	1,37E-03	-1,72	4,00E-05	OVR
E2f8	-1,75	1,86E-04	-1,85	1,45E-04	PS
<i>Pou2fl</i>	<i>-1,75</i>	<i>2,41E-04</i>	<i>-1,41</i>	<i>1,48E-03</i>	<i>TR</i>
Sorbs2	-1,75	3,78E-03	-1,22	3,50E-03	O
Sumo3	-1,74	7,28E-03	-1,43	1,78E-02	S
Hipk2	-1,74	9,42E-04	-1,51	1,29E-04	S
n-R5s26	-1,73	8,35E-03	-2,56	2,12E-02	PS
Mir16-2	-1,73	6,87E-03	-1,41	2,42E-02	MR
Mir5125	-1,73	7,38E-04	-1,78	9,45E-03	MR
Sh3pxd2a	-1,72	8,00E-04	-1,46	6,60E-05	O
Tram2	-1,71	3,02E-03	-1,51	7,65E-04	PS
Tns1	-1,66	5,10E-05	-1,48	8,15E-04	S
Gpatch8	-1,66	6,69E-04	-1,54	4,78E-03	O
Nav1	-1,66	2,83E-04	-1,44	6,15E-04	O
<i>Zbtb39</i>	<i>-1,65</i>	<i>5,07E-03</i>	<i>-1,51</i>	<i>4,04E-03</i>	<i>TR</i>
<i>Srcap</i>	<i>-1,65</i>	<i>1,70E-03</i>	<i>-1,49</i>	<i>5,95E-04</i>	<i>TR</i>
Nav2	-1,65	4,68E-04	-1,4	1,23E-02	O

Примечание. В этой таблице перечислены гены, кодирующие транскрипты, содержание которых в клетках, обработанных EPS, уменьшилось более чем в 1,64 раза. МикроРНК и регуляторы транскрипции показаны **жирным** шрифтом и *курсивом* соответственно. Для функциональных категорий см. табл. 15.

**Гены, экспрессия которых активируется как уабином, так и EPS
посредством Ca²⁺-опосредованной сигнализации¹**

Обозначение гена	Кратность изменения (EPS)	ANOVA р-значения (EPS)	Кратность изменения (уабин)	ANOVA р-значения (уабин)	Функциональная категория
<i>Olfrl251</i>	1,89	3,46E-02	1,46	2,67E-03	OVR
Mir29a	1,84	4,37E-02	1,67	3,08E-02	MR
Rpl37	1,79	1,53E-03	1,4	5,09E-03	PS
Atp6v0c	1,78	4,62E-03	1,6	2,65E-03	O
Eif4a2	1,7	6,21E-04	1,32	8,72E-03	PS
Mir1957a	1,67	2,99E-03	1,56	1,47E-02	MR
Rpl27a	1,61	3,01E-03	1,37	1,19E-02	PS
<i>Olfrl183</i>	1,6	1,44E-02	1,27	4,71E-02	OVR
Ppan	1,56	3,13E-03	1,49	4,96E-03	O
Ndufb11	1,55	3,17E-03	1,52	1,18E-02	O
Ovgpl	1,54	9,40E-03	1,31	3,78E-02	O
Mir328	1,53	9,39E-03	1,73	2,39E-02	MR
Rpl18a	1,51	4,94E-02	1,34	2,76E-02	PS
Ighv3-3	1,48	2,72E-02	1,54	1,15E-02	IR
Rhod	1,46	3,11E-02	1,26	3,77E-03	S
Cd59b	1,46	1,80E-02	1,39	9,61E-03	IR
Atp5e	1,45	8,77E-03	1,24	3,20E-02	O
Kir3dl2	1,45	1,03E-02	1,24	3,84E-02	IR
Adgrl4	1,43	4,05E-03	1,31	1,13E-02	S
Taf1d	1,43	7,67E-03	1,43	2,48E-02	TR
Tuba4a	1,4	2,62E-03	1,4	1,12E-02	O
Cyp2c40	1,37	7,29E-04	1,21	3,40E-03	O
Cdo1	1,35	5,20E-03	1,31	4,67E-03	O
Gpank1	1,34	8,67E-03	1,21	4,26E-02	O
Rnd3	1,33	1,54E-02	1,24	3,76E-02	S
Enoph1	1,33	2,70E-03	1,29	1,87E-02	O

¹ Sidorenko S., Klimanova E., Milovanova, K., Lopina O.D., Kapilevich L.V., Chibalov A.V., Orlov S.N. Transcriptomic changes in C2C12 myotubes triggered by electrical stimulation: Role of Ca²⁺_i-mediated and Ca²⁺_i-independent signaling and elevated [Na⁺]_i/[K⁺]_i ratio // Cell Calcium. 2018. V. 76. P. 72–86.

Обозначение гена	Кратность изменения (EPS)	ANOVA р-значения (EPS)	Кратность изменения (уабаин)	ANOVA р-значения (уабаин)	Функциональная категория
Cebpa	1,33	4,58E-03	1,42	1,28E-02	TR
Syne1	1,32	8,63E-04	1,3	1,37E-02	O
Fen1	1,32	2,52E-02	1,25	4,36E-02	O
Ak4	1,32	1,23E-02	1,28	4,19E-02	S
Csrnp1	1,32	1,18E-02	1,84	2,46E-04	S
Ankrd2	1,31	2,91E-02	1,23	1,71E-02	O
Mir379	1,3	2,64E-02	1,4	2,53E-03	MR
Ppp1r10	1,3	1,26E-02	1,27	6,40E-03	S
Wsb1	1,29	1,05E-02	1,25	1,45E-02	PS
Gem	1,29	3,53E-03	1,24	4,10E-03	S
Zrsr1	1,28	4,00E-02	1,34	3,54E-02	TR
Tigd3	1,28	3,22E-02	1,32	1,40E-02	O
Rpusd4	1,28	3,67E-03	1,26	6,48E-03	O
Rassf1	1,28	7,36E-03	1,35	1,30E-02	S

Примечание. В этой таблице перечислены гены, кодирующие транскрипты, содержание которых в клетках, обработанных EPS, было увеличено более чем в 1,27 раза. МикроРНК и обонятельные / вомероназальные рецепторы показаны **жирным** шрифтом и *курсивом* соответственно. Для функциональных категорий см. табл. 15.

Т а б л и ц а 20

Гены, экспрессия которых ингибируется как уабаином, так и EPS посредством Ca²⁺ опосредованной сигнализации¹

Обозначение гена	Кратность изменения (EPS)	ANOVA р-значения (EPS)	Кратность изменения (уабаин)	ANOVA р-значения (уабаин)	Функциональная категория
Mir3471-1	-2,02	8,19E-04	-1,71	3,51E-03	MR
Mir761	-2,01	2,97E-03	-1,77	2,68E-03	MR
Zfp300	-1,99	4,55E-02	-1,58	8,54E-03	TR
Lce3c	-1,95	8,78E-03	-1,28	1,29E-02	O
<i>Vmn1r2</i>	<i>-1,95</i>	<i>3,23E-03</i>	<i>-1,81</i>	<i>2,26E-02</i>	<i>OVR</i>

¹ Sidorenko S., Klimanova E., Milovanova, K., Lopina O.D., Kapilevich L.V., Chibalov A.V., Orlov S.N. Transcriptomic changes in C2C12 myotubes triggered by electrical stimulation: Role of Ca²⁺_i-mediated and Ca²⁺_i-independent signaling and elevated [Na⁺]_i/[K⁺]_i ratio // Cell Calcium. 2018. V. 76. P. 72–86.

Обозначение гена	Кратность изменения (EPS)	ANOVA р-значения (EPS)	Кратность изменения (уабаин)	ANOVA р-значения (уабаин)	Функциональная категория
<i>Vmn2r55</i>	-1,94	5,47E-04	-1,44	3,16E-03	OVR
Mir344d-2	-1,87	1,37E-03	-1,95	7,61E-04	MR
Mir466j	-1,82	5,22E-03	-1,41	1,62E-02	MR
Mir1839	-1,76	4,82E-02	-1,44	4,38E-03	MR
<i>Olfr523</i>	-1,76	2,42E-02	-1,38	2,83E-02	OVR
<i>Vmn1r119</i>	-1,76	3,51E-03	-1,59	1,02E-03	OVR
Mir3473d	-1,73	1,20E-02	-1,48	4,43E-02	MR
<i>Ighv2-9</i>	-1,72	3,21E-02	-1,66	2,05E-02	IR
Mir15a	-1,7	3,01E-02	-1,42	3,36E-02	MR
Mir206	-1,67	4,68E-03	-1,76	1,01E-02	MR
<i>Olfr1269</i>	-1,65	4,44E-03	-1,41	4,13E-03	OVR
mt-Tr	-1,65	3,51E-02	-1,47	1,22E-02	PS
Krtap4-13	-1,62	1,32E-02	-1,26	2,94E-02	O
<i>Olfr1219</i>	-1,6	6,24E-03	-1,55	8,58E-03	OVR
Mir467c	-1,59	3,46E-03	-1,61	3,80E-04	MR
<i>Ighv1-72</i>	-1,58	8,88E-03	-1,31	2,94E-03	IR
<i>Olfr724</i>	-1,57	3,51E-02	-2,09	2,32E-02	OVR
<i>Trem1</i>	-1,56	3,59E-02	-1,3	8,32E-03	IR
Mir7-2	-1,56	1,69E-03	-1,53	1,97E-02	MR
<i>Olfr987</i>	-1,54	6,19E-03	-1,24	6,16E-03	OVR
<i>Fbp1</i>	-1,53	1,14E-02	-1,47	5,53E-03	O
<i>Traj46</i>	-1,51	3,02E-02	-1,54	2,27E-02	IR
<i>Kprp</i>	-1,48	7,71E-04	-1,38	1,77E-03	O
BC048602	-1,47	1,53E-02	-1,36	4,77E-02	O
<i>Defa25</i>	-1,47	2,72E-02	-1,57	5,78E-03	O
<i>Olfr127</i>	-1,46	4,91E-02	-1,52	3,00E-02	OVR
<i>Crisp3</i>	-1,46	1,20E-02	-1,48	4,81E-02	O
<i>Adgrd2-ps</i>	-1,46	1,79E-02	-1,47	3,91E-02	O
<i>Cd51</i>	-1,46	1,51E-03	-1,53	2,43E-03	IR
Mir665	-1,45	1,80E-03	-1,35	1,86E-02	MR
<i>Phf11b</i>	-1,45	3,42E-02	-1,22	2,86E-02	O
Mir467a-3	-1,45	9,43E-03	-1,43	9,88E-03	MR
<i>Pdzk1</i>	-1,44	4,49E-02	-1,42	2,73E-04	O
<i>Ifna7</i>	-1,43	2,69E-02	-1,64	4,26E-03	IR
Mir383	-1,43	1,12E-02	-1,62	1,74E-02	MR

Примечание. В этой таблице перечислены гены, кодирующие транскрипты, экспрессия которых была снижена в клетках, обработанных EPS, более чем в 1,43 раза. МикроРНК и обонятельные / вомероназальные рецепторы показаны **жирным** шрифтом и *курсивом* соответственно. Для функциональных категорий см. табл. 15.

**Гены, экспрессия которых активируется как уабином, так и EPS
посредством Ca²⁺-независимой сигнализации¹**

Обозначение гена	Кратность изменения (EPS)	ANOVA р-значения (EPS)	Кратность изменения (Ник+EPS)	ANOVA р-значения (Ник+ES vs. Ник)	Кратность изменения (уабиин)	ANOVA р-значения (уабиин)	Функциональная категория
Hspa1a	5,04	1,30E-05	3,77	2,00E-05	1,26	4,42E-02	PS
Ptgs2	2,74	4,05E-04	2,32	3,60E-05	1,52	1,35E-02	O
Tmem95	2,68	1,20E-05	2,67	1,44E-02	1,34	9,85E-04	O
Fos11	2,38	1,68E-03	2,39	3,02E-04	1,34	4,73E-02	TR
Ftl1	2,23	1,99E-03	1,52	5,44E-03	1,46	1,43E-02	O
Ccl7	2,16	3,64E-04	1,69	1,90E-05	1,34	1,62E-03	IR
Ier3	2,13	3,10E-05	2,18	1,60E-04	1,53	1,50E-04	TR
Spata4	2,04	2,62E-03	1,42	8,75E-03	1,43	3,24E-03	O
Pgf	2,02	1,24E-03	1,78	2,73E-03	1,21	2,09E-02	O
Cd68	2	1,58E-03	1,91	9,53E-04	1,47	1,16E-03	IR
Nfkbiz	1,9	1,21E-03	1,9	2,46E-03	1,33	2,82E-02	TR
Tnfsf9	1,86	4,87E-04	1,43	4,52E-03	1,25	2,72E-02	IR
Ccin	1,79	2,66E-02	1,66	6,81E-03	1,39	3,04E-02	O
Dusp4	1,77	1,44E-02	1,42	7,39E-03	1,49	3,83E-02	S
Ier5	1,76	4,20E-04	1,76	9,60E-03	1,27	2,44E-02	TR
Plk3	1,75	3,70E-04	1,53	1,29E-03	1,25	3,56E-03	S
Lag3	1,74	1,77E-03	1,94	1,16E-03	1,57	1,41E-03	IR
Ereg	1,73	7,89E-03	1,37	4,87E-03	1,45	1,66E-02	S
Nfkbia	1,63	1,09E-03	1,58	3,39E-03	1,5	3,96E-04	TR
Snord93	1,63	8,52E-03	1,3	4,46E-02	1,21	4,27E-02	O
Insg1	1,56	3,32E-03	1,51	3,84E-03	1,22	1,76E-02	TR
Zbth2	1,53	7,10E-03	1,35	4,99E-02	1,24	1,47E-02	TR
Akr1b3	1,51	1,69E-02	1,37	5,59E-03	1,86	4,88E-03	O
Polg2	1,46	1,34E-04	1,59	1,17E-02	1,3	5,40E-04	O
Pcf11	1,42	3,36E-03	1,47	5,54E-03	1,25	2,71E-02	TR

¹ Sidorenko S., Klimanova E., Milovanova, K., Lopina O.D., Kapilevich L.V., Chibalov A.V., Orlov S.N. Transcriptomic changes in C2C12 myotubes triggered by electrical stimulation: Role of Ca²⁺_i-mediated and Ca²⁺_i-independent signaling and elevated [Na⁺]_i/[K⁺]_i ratio // Cell Calcium. 2018. V. 76. P. 72–86.

Обозначение гена	Кратность изменения (EPS)	ANOVA р-значения (EPS)	Кратность изменения (Ник+EPS)	ANOVA р-значения (Ник+ES vs. Ник)	Кратность изменения (уабаин)	ANOVA р-значения (уабаин)	Функциональная категория
Fhdc1	1,42	8,16E-03	1,36	1,45E-02	1,69	1,63E-03	IR
Tmem251	1,37	5,20E-05	1,22	1,01E-02	1,21	5,81E-04	O
Tmed2	1,36	1,62E-02	1,39	5,49E-03	1,33	6,62E-03	O
Cdc6	1,35	4,95E-03	1,27	3,07E-02	1,24	5,88E-03	O
Epha2	1,35	1,21E-02	1,45	7,05E-03	1,23	1,77E-03	S
Mtfr2	1,34	7,43E-04	1,51	1,16E-02	1,43	4,18E-04	O
Rnf225	1,27	4,27E-02	1,24	2,70E-02	1,4	1,66E-02	O

Примечание. В этой таблице перечислены гены, кодирующие транскрипты, экспрессия которых была увеличена в клетках, обработанных EPS, более чем в 1,26 раза. Регуляторы транскрипции выделены **жирным** шрифтом. Для функциональных категорий см. табл. 15.

Таблица 22

Гены, экспрессия которых ингибируется как уабаином, так и EPS посредством Ca²⁺-независимой сигнализации¹

Обозначение гена	Кратность изменения (EPS)	ANOVA р-значения (EPS)	Кратность изменения (Ник+EPS)	ANOVA р-значения (Ник+ES vs. Ник)	Кратность изменения (уабаин)	ANOVA р-значения (уабаин)	Функциональная категория
<i>mt-Ts2</i>	-2,52	4,14E-03	-2,66	5,71E-04	-1,45	2,44E-02	PS
Dleu2	-2,49	6,21E-04	-2,66	3,59E-04	-1,32	4,64E-02	O
<i>mt-Tt</i>	-2,15	1,60E-05	-2,25	1,05E-03	-1,31	1,06E-02	PS
Mir145a	-1,95	1,42E-03	-1,85	8,22E-03	-1,35	4,69E-02	MR
<i>mt-Tk</i>	-1,82	1,99E-03	-1,62	1,62E-02	-1,49	4,20E-03	PS
E2f8	-1,75	1,86E-04	-1,85	1,45E-04	-1,22	2,73E-04	PS
Sorbs2	-1,75	3,78E-03	-1,22	3,50E-03	-1,36	4,87E-02	O
Rgma	-1,64	3,50E-03	-1,59	8,64E-04	-1,21	1,01E-02	O
Zbtb20	-1,63	6,80E-05	-1,45	2,57E-02	-1,21	1,86E-02	TR
Zfp386	-1,62	9,46E-04	-1,75	1,68E-03	-1,28	1,25E-03	TR

¹ Sidorenko S., Klimanova E., Milovanova, K., Lopina O.D., Kapilevich L.V., Chibalov A.V., Orlov S.N. Transcriptomic changes in C2C12 myotubes triggered by electrical stimulation: Role of Ca²⁺-mediated and Ca²⁺-independent signaling and elevated [Na⁺]_i/[K⁺]_i ratio // Cell Calcium. 2018. V. 76. P. 72–86.

Обозначение гена	Кратность изменения (EPS)	ANOVA р-значение (EPS)	Кратность изменения (Ник+EPS)	ANOVA р-значение (Ник+ES vs. Ник)	Кратность изменения (уабин)	ANOVA р-значение (уабин)	Функциональная категория
Xlr5c	-1,61	2,66E-03	-1,56	2,93E-02	-1,32	3,13E-02	O
Zfp933	-1,6	1,95E-02	-1,69	5,17E-03	-1,44	4,46E-02	TR
Zfp935	-1,56	2,87E-02	-1,86	1,92E-03	-1,36	1,45E-02	TR
Zfp329	-1,53	5,02E-03	-1,61	8,29E-03	-1,31	1,79E-02	TR
Snai2	-1,52	1,73E-03	-1,25	4,81E-03	-1,33	1,34E-02	TR
Zfp759	-1,49	2,90E-02	-1,62	1,05E-03	-1,77	2,06E-02	TR
Uppt	-1,47	9,76E-04	-1,52	1,29E-02	-1,26	2,29E-02	O
Zfp799	-1,44	4,34E-03	-1,8	1,43E-04	-1,52	9,65E-03	TR
Clec2d	-1,41	3,01E-03	-1,96	1,43E-03	-1,31	1,08E-02	IR
Zkscan8	-1,4	1,00E-02	-1,61	7,42E-03	-1,43	4,94E-03	TR
<i>mt-Tm</i>	<i>-1,37</i>	<i>8,43E-03</i>	<i>-1,35</i>	<i>9,49E-03</i>	<i>-1,39</i>	<i>2,85E-03</i>	<i>PS</i>
Ahnak2	-1,36	7,39E-03	-1,23	2,74E-03	-1,21	1,05E-03	S
Rhob	-1,35	1,89E-03	-1,3	8,20E-05	-1,23	1,36E-03	S
Ttc28	-1,34	1,56E-03	-1,3	4,52E-03	1,22	1,02E-02	O
Zfp39	-1,34	3,44E-03	-1,32	2,52E-03	-1,33	5,32E-03	TR
Sspn	-1,33	9,94E-04	-1,38	8,79E-03	-1,22	1,02E-03	O
Lfng	-1,32	7,25E-03	-1,4	1,56E-03	-1,23	3,27E-03	O
Osr2	-1,32	3,53E-02	-1,25	1,17E-02	-1,22	4,89E-02	O
Dclre1c	-1,31	6,80E-03	-1,29	1,97E-02	-1,22	1,91E-02	O
Pik3ip1	-1,28	1,93E-02	-1,41	1,81E-02	-1,39	1,54E-02	S
Pex26	-1,28	1,27E-02	-1,32	2,37E-03	-1,29	2,89E-02	O
Mir1933	-1,27	2,89E-02	-1,36	2,51E-02	-1,39	1,66E-02	MR
Jpx	-1,26	7,68E-04	-1,42	1,91E-02	-1,23	2,00E-03	O
Ttc14	-1,23	2,60E-02	-1,43	1,30E-02	-1,25	1,01E-02	O
Pnrc2	-1,22	1,01E-02	-1,22	2,41E-02	-1,23	9,69E-03	O
Zfp781	-1,21	4,50E-02	-1,57	2,26E-03	-1,46	1,70E-03	TR

Примечание. В этой таблице перечислены гены, кодирующие транскрипты, экспрессия которых была ингибирована EPS более чем в 1,2 раза. Белки цинкового пальца и митохондриально кодируемые тРНК показаны **жирным** шрифтом и *курсивом* соответственно. Для функциональных категорий см. табл. 15.

Влияние электростимуляции на содержание мРНК, кодирующих миокины¹

Обозначение гена	Название гена	Кратность изменения	ANOVA р-значение	Источник
Angpt14	Angiopoietin-like 4	1,20	0,015	²
Apln	Aplin	1,39	0,013	³
Ccl2	Chemokine (C-C motif) ligand 2	1,80	0,004	⁴
Cxcl1	Chemokine (C-X-C motif) ligand 1	1,43	0,018	⁵
Il-6	Interleukin-6	1,31	0,017	⁶

Примечание. В таблице перечислены миокины, дифференциальная экспрессия которых была обнаружена в скелетных мышцах, полученных от людей после интенсивных упражнений, и в миотубулах, обработанных EPS¹.

¹ Sidorenko S., Klimanova E., Milovanova, K., Lopina O.D., Kapilevich L.V., Chibalin A.V., Orlov S.N. Transcriptomic changes in C2C12 myotubes triggered by electrical stimulation: Role of Ca²⁺_i-mediated and Ca²⁺_i-independent signaling and elevated [Na⁺]_i/[K⁺]_i ratio // Cell Calcium. 2018. V. 76. P. 72–86.

² Norheim F., Hjorth M., Langieite T.M., Lee S., Holen T., Bindesboll C., Stadheim H.K., Gulseth H.L., Birkeland K.I., Kielland A. et al. Regulation of angiopoietin-like protein 4 during and after exercise // Physiol. Rep. 2014. № 2. doi: 10.14814/phy2.12109-e12109; Catoire M., Alex S., Paraskevopoulos N., Mattijssen F., Evers-van Gogh I., Schaart G., Jeppesen J., Kneppers A., Mensik M., Voshpol P.J. et al. Fatty acid-inducible ANGPTL4 governs lipid metabolic response to exercise // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2014. № 111. P. 1043–1052.

³ Besse-Patin A., Montastier E., Vinel C., Castan-Laurell I., Louche K., Dray C., Daviaud D., Mir L., Marques M.A., Thalamos C. et al. Effect of endurance training on skeletal muscle myokine expression in obese men: identification of apelin as a novel myokine // Int. J. Obes. (Lond). 2014. № 38. P. 707–713.

⁴ Miyatake S., Bilan P.J., Pillon N.J., Klip A. Contracting C2C12 myotubes release CCL2 in an NF-κB-dependent manner to induce monocyte chemoattraction // Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 2016. № 310. E160–E170; Gjevestad G.O., Hamarsland H., Raastad T., Ottestad I., Christensen J.J., Eckardt K., Drevon C.A., Biong A.S., Ulven S.M., Holven K.B. Gene expression is differentially regulated in skeletal muscle and circulating immune cells in response to an acute bout of high-load strength exercise // Genes Nutr. 2017. № 2. doi: 10.1186/s12263-017-0556-4.

⁵ Nedachi T., Hatakeyama H., Kono T., Sato M., Kanzaki M. Characterization of contraction-inducible CXC chemokines and their roles in C2C12 myocytes // Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 2009. № 297. E866–E878; Pourteymour S., Eckardt K., Holen T., Langieite T., Lee S., Jensen J., Birkeland K.I., Drevon C.A., Hjorth M. Global mRNA sequencing of human skeletal muscle: search for novel exercise-regulated myokines // Mol. Metab. 2017. № 29. P. 352–365.

⁶ Nikolic N., Bakke S.S., Kase E.T., Rudberg I., Halle I.F., Rustan A.C., Thoresen G.H., Aas V. Electrical pulse stimulation of cultured human skeletal muscle cells as an in vitro model of exercise // PLoS One. 2012. № 7. e33203; Ostrowski K., Rohde T., Zacho M., Asp S., Pedersen B.K. Evidence that interleukin-6 is produced in human skeletal muscle during prolonged running // J. Physiol. 2018. № 508. P. 949–953.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Мы живем в быстро меняющемся мире, сопровождающимся системным снижением физической активности. Физические упражнения давно признаны приоритетным фактором профилактики нарушений метаболизма, психического здоровья, рака молочной железы, болезней сердечно-сосудистой и иммунной системы. В этой связи миокины все чаще рассматриваются не только как патофизиологическая основа профилактического действия физических нагрузок, но и как потенциальное средство для лечения больных с ревматическими заболеваниями, сахарным диабетом, ожирением, атеросклерозом. В этой связи идентификация начальных механизмов регуляции секреции миокинов в ответ на физическую нагрузку, выполненная в нашей работе, в будущем позволит разработать новые подходы к лечению перечисленных выше социально значимых заболеваний, связанных с современными условиями жизни. Результаты нашей работы имеют практическое значение для решения целого ряда проблем, имеющих ключевое значение для социального развития Российской Федерации, таких, как профилактика и лечение социально значимых заболеваний, увеличение продолжительности активной жизни, обеспечение здорового старения.

¹ Nikolic N., Bakke S.S., Kase E.T., Rudberg I., Halle I.F., Rustan A.C., Thoresen G.H., Aas V. Electrical pulse stimulation of cultured human skeletal muscle cells as an in vitro model of exercise // *PLoS One*. 2012. № 7. e33203; Nedachi T., Hatakeyama H., Kono T., Sato M., Kanzaki M. Characterization of contraction-inducible CXC chemokines and their roles in C2C12 myocytes // *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2009. № 297. E866–E878; Miyatake S., Bilan P.J., Pillon N.J., Klip A. Contracting C2C12 myotubes release CCL2 in an NF- κ B-dependent manner to induce monocyte chemoattraction // *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2016. № 310. E160–E170; Pourteymour S., Eckardt K., Holen T., Langleite T., Lee S., Jensen J., Birkeland K.I., Drevon C.A., Hjorth M. Global mRNA sequencing of human skeletal muscle: search for novel exercise-regulated myokines // *Mol. Metab.* 2017. № 29. P. 352–365; Ostrowski K., Rohde T., Zacho M., Asp S., Pedersen B.K. Evidence that interleukin-6 is produced in human skeletal muscle during prolonged running // *J. Physiol.* 2018. № 508. P. 949–953.

Новаторский характер выполненной работы позволяет глубже погрузиться в физиологию упражнений скелетных мышц, раскрывает новые пути применения различных форм физической активности в целях лечения и профилактики социально значимых заболеваний, формирования «здорового старения», пролонгирования периода активной жизнедеятельности.

С.Н. Орлов, Л.В. Каплевич

Об авторах

Орлов Сергей Николаевич, ведущий научный сотрудник научного управления Томского государственного университета, заведующий лабораторией физико-химии биологических мембран Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова.

Капилевич Леонид Владимирович, заведующий кафедрой спортивно-оздоровительного туризма, спортивной физиологии и медицины Томского государственного университета.

Дьякова Елена Юрьевна, профессор кафедры спортивно-оздоровительного туризма, спортивной физиологии и медицины Томского государственного университета.

Захарова Анна Николаевна, доцент кафедры спортивно-оздоровительного туризма, спортивной физиологии и медицины Томского государственного университета.

Кабачкова Анастасия Владимировна, доцент кафедры спортивно-оздоровительного туризма, спортивной физиологии и медицины Томского государственного университета.

Калинникова Юлия Геннадьевна, старший преподаватель кафедры спортивно-оздоровительного туризма, спортивной физиологии и медицины Томского государственного университета.

Климанова Елизавета Андреевна, младший научный сотрудник научного управления Томского государственного университета, преподаватель кафедры биохимии Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова.

Кироненко Татьяна Александровна, аспирант кафедры спортивно-оздоровительного туризма, спортивной физиологии и медицины Томского государственного университета.

Милованова Ксения Геннадьевна, аспирант кафедры спортивно-оздоровительного туризма, спортивной физиологии и медицины Томского государственного университета.

Сидоренко Светлана Вадимовна, младший научный сотрудник научного управления Томского государственного университета, младший научный сотрудник лаборатории физико-химии биологических мембран Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова.

ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение	3
Глава 1. СЕКРЕТОРНАЯ ФУНКЦИЯ СКЕЛЕТНЫХ МЫШЦ: МЕХАНИЗМЫ ПРОДУКЦИИ И ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ МИОКИНОВ	8
1.1. Классификация миокинов	8
1.2. Физиологическое значение миокинов	13
1.3. Мышечное сокращение – главный регулятор продукции миокинов	23
1.4. Внутриклеточные механизмы регуляции транскрипции и продукции миокинов	30
1.4.1. Ca^{2+} -зависимые процессы	30
1.4.2. Снижение парциального давления кислорода (гипоксия)	33
1.4.3. Фосфорилирование и соотношение АТФ/АДФ	37
1.5. Вовлечение миокинов в патогенетические механизмы и их роль в терапевтических и профилактических эффектах физических упражнений	41
Глава 2. СОДЕРЖАНИЕ МИОКИНОВ В ПЛАЗМЕ КРОВИ ПОСЛЕ ФИЗИЧЕСКИХ НАГРУЗОК РАЗЛИЧНОГО ХАРАКТЕРА У СПОРТСМЕНОВ И НЕТРЕНИРОВАННЫХ ЛИЦ	46
2.1. Дизайн и методы исследования	46
2.2. Влияние статической нагрузки на продукцию миокинов у спортсменов и нетренированных волонтеров	51
2.3. Влияние динамической нагрузки на продукцию миокинов у спортсменов и нетренированных волонтеров	54
Глава 3. СОДЕРЖАНИЕ МИОКИНОВ В ПЛАЗМЕ КРОВИ ПОСЛЕ ФИЗИЧЕСКИХ НАГРУЗОК РАЗЛИЧНОГО ХАРАКТЕРА У ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ	61
3.1. Дизайн и методы исследования	61
3.2. Влияние динамической нагрузки на содержание миокинов в плазме крови у мышей	63
3.3. Влияние статической нагрузки на содержание миокинов в плазме крови у мышей	68

Глава 4. ДИССИПАЦИЯ ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКИХ ГРАДИЕНТОВ ОДНОВАЛЕНТНЫХ КАТИОНОВ КАК ФАКТОР РЕГУЛЯЦИИ ПРОДУКЦИИ МИОКИНОВ В КУЛЬТУРЕ МИОБЛАСТОВ С2С12	77
4.1. Физическая нагрузка как фактор диссипации ионных градиентов	77
4.2. Изменение внутриклеточной концентрации натрия и калия как фактор регуляции транскрипции и трансляции: доказательства Ca ²⁺ -независимого механизма	83
4.2.1. Трансмембранный перенос одновалентных катионов и соотношение [Na ⁺] _i /[K ⁺] _i в безкальциевом растворе	83
4.2.2. Влияние ингибиторов Na ⁺ , K ⁺ -АТФазы на профиль экспрессии генов в безкальциевой среде и при наличии хелаторов кальция	87
4.2.3. Влияние ингибиторов Na ⁺ , K ⁺ -АТФазы на процессы транскрипции и трансляции в безкальциевой среде и при наличии хелаторов кальция	97
4.2.4. Поиск внутриклеточных сенсоров одновалентных ионов	106
4.3. Изменение внутриклеточной концентрации натрия и калия как фактор регуляции экспрессии генов в условиях гипоксии	109
4.3.1. Влияние убаина, безкальциевой среды и гипоксии на внутриклеточное содержание одновалентных ионов и АТФ	112
4.3.2. Идентификация и функциональная характеристика [Na ⁺] _i /[K ⁺] _i -чувствительного транскриптома сосудистых гладкомышечных клеток крысы	115
4.3.3. Поиск подмножества генов <i>in silico</i> , на экспрессию которых влияют как повышение отношения [Na ⁺] _i /[K ⁺] _i , так и гипоксия	135
4.3.4. Роль HIF-1α и [Na ⁺] _i /[K ⁺] _i -опосредованной сигнализации	136
4.3.5. Локализация (A/G) CGTG элементов гипоксии в пределах 59-UTR	142
4.4. Роль одновалентных катионов в регуляции экспрессии генов при электростимуляции миобластов	151
Заключение	184

Научное издание

ОРЛОВ Сергей Николаевич
КАПИЛЕВИЧ Леонид Владимирович
ДЬЯКОВА Елена Юрьевна
ЗАХАРОВА Анна Николаевна
КАБАЧКОВА Анастасия Владимировна
КАЛИННИКОВА Юлия Геннадьевна
КЛИМАНОВА Елизавета Андреевна
КИРОНЕНКО Татьяна Александровна
МИЛОВАНОВА Ксения Геннадьевна
СИДОРЕНКО Светлана Вадимовна

СКЕЛЕТНЫЕ МЫШЦЫ КАК ЭНДОКРИННЫЙ ОРГАН

Редактор
Компьютерная верстка А.И. Лелююр
Дизайн обложки Л.Д. Кривцовой

Подписано к печати 26.12.2018 г. Формат 60×84^{1/16}.
Бумага для офисной техники. Гарнитура Times.
Печ. л. 11,6. Усл. печ. л. 10,8. Тираж 250 экз. Заказ № 3498.

Отпечатано на оборудовании
Издательского Дома
Томского государственного университета
634050, г. Томск, пр. Ленина, 36
Тел. 8+(382-2)–52-98-49
Сайт: <http://publish.tsu.ru>
E-mail: rio.tsu@mail.ru

ISBN 978-5-94621-765-1



9 785946 217651