

**ВЛИЯНИЕ ПРИНУДИТЕЛЬНЫХ БЕГОВЫХ НАГРУЗОК
НА СОДЕРЖАНИЕ МИОКИНОВ В СКЕЛЕТНЫХ МЫШЦАХ МЫШЕЙ
С МОДЕЛЬЮ САХАРНОГО ДИАБЕТА II ТИПА**

© 2021 г. А. Н. Захарова¹, Т. А. Кироненко¹, К. Г. Милованова¹, А. А. Орлова¹,
Е. Ю. Дьякова¹, Ю. Г. Калинин^{1,3}, А. В. Чибалин^{1,3}, Л. В. Капилевич^{1,2,*}

¹Национальный исследовательский Томский государственный университет, Томск, Россия

²Сибирский государственный медицинский университет, Томск, Россия

³Департамент молекулярной медицины и хирургии, секция интегративной физиологии
Каролинский институт, Стокгольм, Швеция

*E-mail: kapil@yandex.ru

Поступила в редакцию 16.01.2021 г.

После доработки 23.02.2021 г.

Принята к публикации 03.03.2021 г.

Изучено влияние принудительных беговых нагрузок на содержание некоторых цитокинов в скелетных мышцах мышей с моделью сахарного диабета II типа. Для формирования модели заболевания использовалась высокожировая диета; физические нагрузки в виде принудительного бега проводились в течение 4-х недель. Концентрация миокинов в мышечной ткани *m. gastrocnemius* определялась методом иммуноферментного анализа. Формирование диабета у мышей сопровождалось возрастанием концентрации IL-6 и снижением концентрации IL-15 в мышечной ткани. Принудительные беговые нагрузки по-разному влияли на содержание миокинов в мышечной ткани у здоровых и больных мышей. У здоровых животных наблюдалось снижение концентрации IL-6 и IL-15 и увеличение концентрации лейкоemia-ингибирующего фактора (LIF) в мышечной ткани после 4-х недель регулярного принудительного бега. В то же время у мышей с диабетом концентрации IL-6 и IL-15 после нагрузок возрастала, а LIF – напротив, снижалась. Концентрация NRP3 в мышечной ткани мышей оказалась нечувствительной ни к формированию сахарного диабета, ни к регулярному принудительному бегу.

Ключевые слова: миокины, цитокины, мышцы, беговая нагрузка, сахарный диабет II типа

DOI: 10.31857/S0869813921060157

Скелетные мышцы традиционно рассматривались как важная часть опорно-двигательного аппарата, которая обеспечивает выполнение локомоций, активности за счет потребления энергетических ресурсов [1]. В то же время уже довольно давно появились сведения, что на фоне физической активности повышается содержание в плазме крови ряда цитокинов, в том числе фактора некроза опухолей TNF- α , интерлейкинов IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-15 и лейкоemia-ингибирующего фактора (LIF) [2–5]. В начале 2000-х годов было установлено, что скелетные мышцы способны продуцировать IL-6, с чем связано возрастание его содержания в плазме крови после физической нагрузки [6]. Этот факт подтверждался выявлением транскрипции IL-6 mRNA в ядрах мышечных клеток, выделенных из биоптатов чело-

веческих мышц после выполнения однократного упражнения [7]. В последующее десятилетие сформировалось представление об эндокринной функции скелетных мышц, благодаря которой они способны продуцировать цитокины и другие пептиды [8]. Многие исследователи обозначают эти соединения как миокины, отмечая их способность оказывать различные физиологические эффекты [9–11].

Сахарный диабет II типа (СД II) считают одной из важнейших проблем современности, на него приходится около 90% случаев диабета. Его патогенез связан с резистентностью к инсулину в периферических тканях и, вследствие этого, с возрастанием концентрации глюкозы в крови [12–14]. Несмотря на значительное количество исследований метаболизма глюкозы, молекулярные механизмы его регуляции в норме и патологии остаются недостаточно изученными [15]. Особенно актуальным остается и вопрос немедикаментозного лечения метаболических расстройств, в том числе и при помощи физических нагрузок. Метаболические изменения под влиянием физических нагрузок – очень сложный процесс, который одновременно включает интегративные и адаптивные реакции в нескольких тканях и органах на клеточном и системном уровне [16].

Мышечная ткань является основным потребителем энергии, где химическая энергия жирных кислот и глюкозы преобразуется в механическую [17]. Кроме того, белковые сигнальные молекулы, продуцируемые мышцами при сокращении – миокины – оказывают значительное влияние на обмен глюкозы и механизмы инсулинорезистентности. Спектр вырабатываемых миокинов и их роль в метаболических процессах достаточно разнообразна. Миокины с помощью противовоспалительного воздействия на сами мышцы могут противодействовать резистентности к инсулину [18]. Кроме того, при физических упражнениях экспрессируются белковые молекулы, вовлеченные в процессы гликолиза и метаболизм аминокислот [19]. Следует отметить, что физическая активность оказывает естественное противовоспалительное действие и способствует улучшению метаболизма [20]. Поэтому мышечной ткани может принадлежать значительная роль в коррекции метаболических нарушений. В предыдущих исследованиях нами было доказано, что содержание в крови некоторых цитокинов (IL-6, IL-8, IL-15, LIF) при различных физических нагрузках изменяется неодинаково [21, 22]. Поэтому предполагается, что эндокринные эффекты мышечной ткани также разнообразны в зависимости от режимов мышечного сокращения.

Одной из моделей формирования диабета является содержание животных на высокожировой диете. Питание с высоким содержанием жиров может привести к ожирению, гиперинсулинемии и измененному гомеостазу глюкозы из-за недостаточной компенсации со стороны островков [23]. Поскольку ожирение в этом случае вызвано манипуляциями с питанием, а не с цитотоксическими веществами, считается, что такие модели более сходны с заболеванием у человека.

В связи со всем изложенным целью нашего исследования было изучить влияние физических нагрузок на содержание некоторых цитокинов в скелетных мышцах мышей с моделью сахарного диабета II типа.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В качестве объекта исследования использовались мыши-самцы линии C57bl/6. Мыши были получены из вивария Томского национального исследовательского медицинского центра Российской академии наук, Научно-исследовательского института фармакологии и регенеративной медицины им. Е.Д. Гольдберга. Возраст мышей на момент начала эксперимента составлял 4 нед. Режим содержания жи-

вотных: день/ночь: 12/12 ч., световой день начинался с 6:00, свободный доступ к пище и воде, температура в помещении 24°C.

Исследование проводилось в соответствии с принципами Базельской декларации и было одобрено комиссией по биоэтике Биологического института Томского государственного университета (протокол № 32 от 02.12.2019).

Эксперимент продолжался 16 нед. До 12-й нед. мыши были разделены на 2 группы:

- животные, находившиеся на жировой диете – 14 мышей.
- животные, получавшие стандартный рацион – 14 мышей.

Для формирования модели сахарного диабета II типа (СД II) использовалась высокожировая диета в течение 12 нед., которая была разработана специально для данного эксперимента. Подробно состав и энергетическая ценность корма описаны в нашей предыдущей работе [24].

Первая группа мышей с начала эксперимента питалась специально приготовленным кормом с высокой калорийностью. Вторая группа питалась кормом для лабораторных животных “Прокорм” (ЗАО Биопро, Новосибирск): пшеница, ячмень, отруби, глютен кукурузный, мука рыбная, белковая кормосмесь, масло подсолнечное, шрот соевый; калорийность – 3000 ккал/кг, на долю жиров приходилось 18% калорийности.

Корм для первой группы был приготовлен на основе описанного выше корма “Прокорм” (50%) с включением животного (свиной жир, 20%) и растительного (подсолнечное масло, 10%) жира, сахара (15%), сухого молока (5%); калорийность – 5100 ккал/кг, на долю жиров приходилось 59% калорийности. Продукты измельчались в блендере в гомогенную смесь, после чего масса формировалась в гранулы диаметром до 10 мм и высушивалась в духовом шкафу при 300°C. Корм готовился на 5 дней и хранился при –20°C. В предварительных исследованиях, опубликованных нами ранее [24], было показано, что использование высокожировой диеты у мышей приводит к увеличению массы тела и формированию ожирения, гипергликемии, снижению толерантности к глюкозе и гиперинсулинемии. Все это свидетельствует о высокой степени адекватности разработанной экспериментальной модели заболеванию диабетом II типа.

Начиная с 12-ой нед., каждая группа животных была поделена на две подгруппы – подвергавшихся (основная) и не подвергавшихся (контрольная) принудительным беговым нагрузкам.

Для нормирования нагрузки была использована разработанная по нашему заказу беговая дорожка для мышей BMELAB SID-TM10 [25]. Принуждение к бегу осуществлялось электрическим раздражением, напряжение подавалось на металлическую сетку, расположенную на задней стенке камеры. Дорожка имела тумблер включения ленты, тумблер включения тока, диммер скорости движения ленты и диммер силы тока, рычаг изменения угла наклона ленты. Мыши на дорожке были изолированы друг от друга стенками из оргстекла. Покрытие движущейся ленты имело резиновую шероховатую поверхность. Сверху дорожка закрывалась прозрачной крышкой из оргстекла.

Принудительные беговые нагрузки проводились в течение 4-х нед. 6 раз в нед. в период с 8-00 до 10-00, продолжительность нагрузки постепенно увеличивалась в течение первых 6-ти дней с 10-ти до 60-ти мин (прирост 10 мин в день) и не изменялась больше на протяжении следующих 3-х нед. Каждую неделю изменялся угол подъема полотна беговой дорожки (от 0° до 10°) и скорость ее вращения (от 15 до 18 м/мин). Один раз в неделю нагрузки не выполнялись (на 7-й день).

Умерщвление экспериментальных животных проводилось методом декапитации через 24 ч после последней нагрузки. С обеих задних конечностей отпрепаро-

вывались *m. gastrocnemius*, мышечная ткань очищалась от соединительной и жировой ткани и замораживалась в жидком азоте. Собранные образцы хранились в морозильной камере при температуре -80°C .

Навеска ткани массой 18 мг отделялась на холоде, ткань измельчалась на более мелкие фрагменты и помещалась в пробирку с лизирующим буфером и 3 железными шариками для гомогенизации размером 0.3 мм. Состав лизирующего буфера: (мМ) NaCl – 137, KCl – 2.7, MgCl₂ – 1, трис(гидроксиметил)аминометана pH 7.8–20, этилендиаминтетрауксусная кислота – 1, дитиотриэтол – 1, пирофосфат натрия – 5, бензмидин – 1, фенилметилсульфонил фторид – 0.2, фторид натрия – 10; Тритон X-100 – 1%, глицерол – 10%, леупептин – 1 мкг/мл.

Гомогенизация образцов проводилась при 2850 об/мин в течение 15 мин с использованием лабораторного гомогенизатора TissueLyser LT (Qiagen, Германия). Затем для более качественного растворения пробирки с образцами, лизирующим раствором и 3 шариками для гомогенизации помещались на качалку и инкубировались (лизировались) в течение 1 ч при 4°C . По истечению указанного времени из пробирки извлекались шарики при помощи магнита. Все процедуры проводились на холоде. Затем пробирки с образцами центрифугировались при 10000 g в течение 5 мин при 4°C .

Для определения общего белка в образце использовали метод Bradford (стандарты готовились в концентрации от 0 до 0.25 мг/мл, хранение готовых образцов осуществлялось при -80°C). Из полученного гомогената готовили разведение в 20 и 40 раз. Затем 10 мкл пробы 20- и 40-кратного разведения в 2-х повторах добавляли в плоскодонную плашку для иммуноферментного анализа (ИФА), добавляли по 200 мкл раствора Bradford и инкубировали 5 мин. Измерение оптической плотности проводили при 620 нм на микропланшетном спектрофотометре (Anthos 2010).

Определение концентрации цитокинов в растворе производили методом ИФА. Были использованы наборы для ИФА с антителами к соответствующим белкам: интерлейкин 6 (IL-6), нейтрофил-активирующий белок 3 (Neutrophil Activating Protein 3 – NAP3, он же хемокиновый лиганд 1 – CXCL-1), лейкозингибирующий фактор (LIF) – Platinum ELISA Kit, (eBioscience, Австрия); интерлейкин 15 (IL-15) – RayBio® IL-15 ELISA Kit (RayBio®, США).

Статистическая обработка данных проводилась с использованием пакета статистического анализа STATISTICA 8.0. Достоверность рассчитывали по Kruskal–Wallis ANOVA test. Данные представлены в виде $\text{Xcp} \pm \text{SE}$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Концентрация IL-6 в мышечной ткани у мышей, питавшихся стандартным кормом, под влиянием хронических принудительных физических нагрузок снижалась более чем в три раза (рис. 1). В то же время у мышей с моделью СД II концентрация IL-6 в мышцах исходно была на 20% выше, чем у интактных животных. Принудительные физические нагрузки у этих мышей потенцировали дальнейший рост концентрации IL-6 в мышцах – она возрастала еще на 15% (рис. 1).

IL-6 относится к числу наиболее известных воспалительных цитокинов. Он синтезируется активированными моноцитами/макрофагами, фибробластами, эндотелиальными клетками при воспалении, травмах, гипоксии, воздействии бактериальных эндотоксинов [26]. Биологическая роль IL-6, в первую очередь, заключается в индукции восстановительных механизмов и активации иммунной защиты. Кроме того, известно угнетающее действие IL-6 на воспалительную реакцию путем торможения синтеза фактора некроза опухоли TNF α [27].

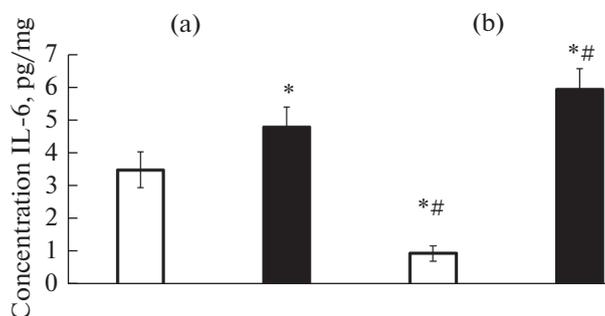


Рис. 1. Концентрация IL-6 в мышечной ткани мышей.

По оси ординат – концентрация цитокина, пг/мг белка.

(a) – контрольная группа (без принудительных нагрузок).

(b) – основная группа (животные, подвергавшиеся принудительному бегу). Светлые столбики – животные, получавшие стандартный рацион, темные столбики – животные, находившиеся на жировой диете.

Данные представлены в виде $\bar{X} \pm SE$.

– достоверность различий между основной и контрольной группой, $p < 0.05$;

* – достоверность различий между группами со стандартным и жировым рационом, $p < 0.05$.

В настоящее время установлена роль IL-6 в регуляции обмена веществ. В жировых клетках IL-6 усиливает окисляцию жира, а также стимулирует секрецию и активность липопротеинлипазы. В клетках печени IL-6 способствует высвобождению глюкозы, стимулирует расщепление гликогена [11].

В мышечных клетках IL-6, наоборот, усиливает эффекты инсулина, стимулирует усвоение глюкозы. При физических упражнениях IL-6 является медиатором продуцирования глюкозы. Также было показано, что IL-6 может активировать АМФ-зависимые протеинкиназы для стимуляции липолиза и окисления жиров [9]. Таким образом, IL-6 оказывает эндокринные эффекты, обеспечивая увеличение производства энергии через увеличение продукции глюкозы в печени и стимуляции липолиза в жировой ткани [28].

Концентрация IL-15 в мышечной ткани у мышей, питавшихся стандартным кормом, под влиянием хронических принудительных физических нагрузок снижалась вдвое (рис. 2). В то же время у мышей с моделью СД II концентрация IL-15 в мышцах исходно была снижена на 30%. Принудительные физические нагрузки у этих мышей, в отличие от питавшихся стандартным кормом, потенцировали повышение концентрации IL-15 в мышцах – она возрастала на 10% (рис. 2).

IL-15 называют вездесущим цитокином, так как он активно экспрессируется множеством клеток в различных тканях и органах, участвует в процессах созревания, выживания и дифференцировки не только иммунокомпетентных, но и многих других клеток [29]. Показано, что IL-15 снижает отложение липидов в преадипцитах и массу белой жировой ткани [30]. Можно предполагать, что увеличение концентрации IL-15 в мышечной ткани мышей с СД II может потенцировать миогенез и энергообмен.

Концентрация LIF в мышечной ткани у мышей, питавшихся стандартным кормом, под влиянием хронических принудительных физических нагрузок возрастала на 15% (рис. 3). В то же время у мышей с моделью СД II концентрация LIF в мышцах исходно не отличалась от интактных животных. Принудительные физические

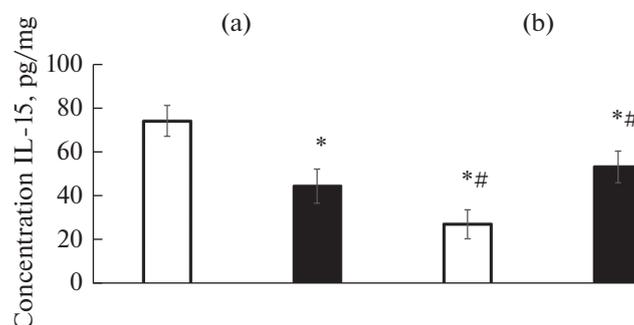


Рис. 2. Концентрация IL-15 в мышечной ткани мышей.

Обозначения те же, что на рис. 1.

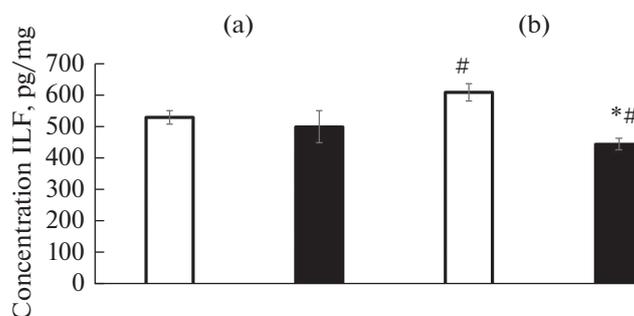


Рис. 3. Концентрация LIF в мышечной ткани мышей.

Обозначения те же, что на рис. 1.

нагрузки у этих мышей потенцировали снижение концентрации LIF в мышцах — она уменьшалась на 10% (рис. 3).

LIF индуцирует пролиферацию клеток, которые считаются необходимыми для гипертрофии и регенерации мышц [31, 32]. В связи с вышеизложенным, в настоящее время широко обсуждается роль интерлейкинов и других миокинов в патогенезе и терапии метаболических нарушений, заболеваний сердечно-сосудистой системы, легких и опорно-двигательного аппарата [9, 33]. Возможно, именно с этими эффектами связаны противоположно направленные изменения концентрации LIF в мышечной ткани здоровых и больных СД II мышей.

Концентрация NRP3 в мышечной ткани у мышей, питавшихся стандартным кормом, и у мышей с моделированием СД II достоверно не различалась, хотя отмечена тенденция к увеличению ее у больных животных. Физические нагрузки также не оказывали достоверного влияния на содержание NRP3 в мышечной ткани (рис. 4).

Существует предположение, что некоторые из хемокинов продуцируются мышечными клетками в процессе сокращения [34]. Выработка CXCL1 мышцами и его содержание в сыворотке крови значительно увеличивается в ответ на однократную физическую нагрузку [35]. Однако, по всей вероятности, указанные эффекты проявляются только при острой однократной физической нагрузке и не регистрируются при длительных хронических воздействиях.

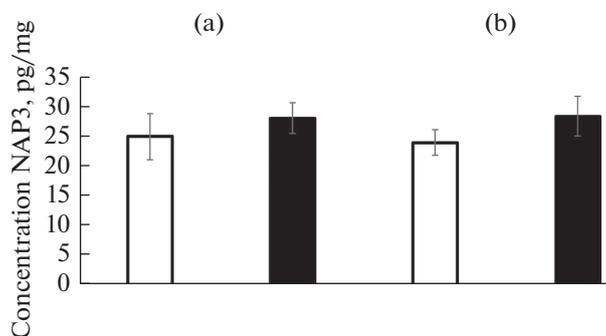


Рис. 4. Концентрация NAP3 в мышечной ткани мышей. Обозначения те же, что на рис. 1.

Особенности влияния физической нагрузки на содержание миокинов в мышечной ткани у мышей могут быть связаны с различиями в клеточном составе мышц. Скелетная мышца весьма гетерогенна — кроме миоцитов она содержит целый ряд клеток — фибробласты, перициты, адипоциты, чей вклад в общий объем производства цитокинов определен недостаточно [36]. Относительное содержание этих клеток, а также их вовлечение в вызванную физической нагрузкой продукцию цитокинов может отличаться у здоровых животных и у животных с моделью СД II. В дополнение к гетерогенности ткани, было показано, что скелетные миоциты могут быть подразделены на 3 различных фенотипа, каждый из которых имеет свои особенности биоэнергетических механизмов, при СД II преобладают так называемые белые мышечные волокна и снижается доля красных волокон [37].

Еще один механизм, обеспечивающий описанные различия, может быть связан с особенностями транскрипционных механизмов. Показано, что транскрипционные изменения при сокращении мышц наиболее выражены в быстро сокращающихся мышечных волокнах типа IIa [38], доля которых у больных СД II увеличивается, что также, несомненно, отражается на интенсивности продукции миокинов.

Также весьма вероятным является участие в регуляции продукции миокинов диссипации мембранных ионных градиентов. Повышение концентрации внутриклеточного кальция от ~ 0.1 до 1 мкМ при сокращении влияет на экспрессию многих генов, то есть является важным фактором запуска транскрипционных механизмов [39–41]. Введение крысам в камбаловидную мышцу Ca^{2+} -ионофора иономицина в течение одного часа приводит к пятикратному увеличению IL-6 mRNA [42]. Воздействие на C2C12 миобласты Ca^{2+} -ионофором A23187 резко увеличивало транскрипцию IL-6 mRNA [43]. Используя ту же модель упражнений *in vitro*, было показано, что внеклеточный Ca^{2+} -хелатор EGTA снижает в два раза накопление CXCL при электрической стимуляции [44].

Возбуждение миоцитов сопровождается изменением трансмембранного градиента одновалентных катионов вследствие притока Na^+ и оттока K^+ через потенциал-зависимые и Ca^{2+} -чувствительные ионные каналы. В мышечных клетках человека и экспериментальных животных длительные упражнения приводят к увеличению $[\text{Na}^+]_i$ в 3–4 раза и снижению $[\text{K}^+]_i$ на 50%, что сопровождается повышением $[\text{K}^+]_i$ в плазме и межклеточной жидкости [45]. Это позволяет предположить, что

увеличение соотношения $[Na^+]_i/[K^+]_i$ является фактором, стимулирующим продукцию миокинов [38, 45]. В некоторых типах клеток повышение соотношения $[Na^+]_i/[K^+]_i$ приводило к экспрессии mRNA ряда цитокинов, в том числе IL-6 [46].

ОГРАНИЧЕНИЯ

Основное ограничение в трактовке результатов данного исследования связано с дифференцировкой источников продукции цитокинов в мышечной ткани. Как мы упоминали в обсуждении, такими источниками могут являться как мышечные клетки, так и другие типы клеток, в том числе, инфильтрирующие мышечную ткань макрофаги или другие иммунные клетки. Однако многочисленные исследования, в том числе и наши собственные исследования на культуре миобластов, ссылки на которые приведены выше, непосредственно подтверждают значительное усиление продукции цитокинов именно мышечными клетками при физической нагрузке. Очевидно, что вклад “мышечной компоненты” в продукцию цитокинов в мышечной ткани значителен.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Подводя итог сказанному, следует отметить, что формирование СД II у мышей сопровождается возрастанием концентрации IL-6 и снижением концентрации IL-15 в мышечной ткани. Физические нагрузки по-разному влияют на содержание миокинов в мышечной ткани у здоровых и больных СД II мышей. У здоровых животных наблюдается снижение концентрации IL-6 и IL-15 и увеличение концентрации LIF в мышечной ткани после 4 нед. регулярного принудительного бега. В то же время у мышей с СД II концентрации IL-6 и IL-15 после нагрузок возрастала, а LIF – напротив, снижалась. Концентрация NAR3 в мышечной ткани мышей оказалась нечувствительной ни к формированию СД II, ни к регулярному принудительному бегу.

Обнаруженные различия могут иметь в своей основе целый ряд механизмов. Клеточный состав скелетных мышц и фенотипические особенности мышечных волокон, изменяясь в результате метаболических нарушений и регулярных тренировок, могут модифицировать процессы продукции миокинов. Важное значение также играют особенности транскрипционных механизмов в мышечных волокнах, среди которых наиболее значимыми являются HIF-1 α , $[Ca^{2+}]_i$, $[Na^+]_i/[K^+]_i$ -зависимые пути внутриклеточной сигнализации. Модификация этих механизмов под влиянием метаболических расстройств и физических нагрузок представляет значительный интерес, так как является перспективным путем воздействия на процессы метаболизма как на клеточном, так и на системном уровне, что весьма актуально для поиска новых путей коррекции метаболических расстройств при СД II.

ВКЛАД АВТОРОВ

З.А.Н., Д.Е.Ю., Ч.А.В. и К.Л.В. внесли вклад в разработку концепции и методологии исследования, анализ результатов, написание статьи и редактирование. К.Т.А., М.К.Г., О.А.А. и К.Ю.Г. принимали непосредственное участие в выполнении экспериментальных исследований.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что исследование проводилось при отсутствии каких-либо коммерческих или финансовых отношений, которые могли бы быть истолкованы как потенциальный конфликт интересов.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено за счет гранта РФФИ № 19-15-00118.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Frontera WR, Ochala J (2015) Skeletal muscle: a brief review of structure and function. *Calcif Tissue Int* 96: 183–195.
<https://doi.org/10.1007/s00223-014-9915-y>
2. Sprenger H, Jacobs C, Nain M, Gressner A, Prinz H, Wesemann W, Gerns D (1992) Enhanced release of cytokines, interleukin-2 receptors, and neopterin after long-distance running. *Clin Immun Immunopathol* 63: 188–195.
[https://doi.org/10.1016/0090-1229\(92\)90012-d](https://doi.org/10.1016/0090-1229(92)90012-d)
3. Drenth JP, Van Uum SH, van Deuren MG, Pesman J, Van der Ven-Jongekrijg J, Van der Meer JW (1995) Endurance run increases circulation IL-6 and IL-1ra but downregulates *ex vivo* TNF- α and IL-1 α production. *J Appl Physiol* 79: 1497–1503.
<https://doi.org/10.1152/jappl.1995.79.5.1497>
4. Nehlsen-Cannarella SL, Fagoaga OR, Nieman DC, Henson DA, Butterworth DE, Schmitt RL, Bailey EM, Warren BJ, Utter A, Davis JM (1997) Carbohydrate and the cytokine response to 2.5 h of running. *J Appl Physiol* 82: 1662–1667.
<https://doi.org/10.1152/jappl.1997.82.5.1662>
5. Ostrowski K, Ronde T, Asp S, Schjerling P, Pedersen BK (1999) Pro- and anti-inflammatory cytokine balance in strenuous exercise in humans. *J Physiol* 515: 287–291.
<https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.1999.287ad.x>
6. Steensberg A, van Hall G, Osada T, Sacchetti M, Saltin B, Pedersen B (2000) Production of interleukin-6 in contracting human skeletal muscles can account for the exercise-induced increase in plasma interleukin-6. *J Physiol* 529: 237–242.
<https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.2000.00237.x>
7. Keller C, Steensberg A, Pilegaard H, Osada T, Saltin B, Pedersen BK, Neufer PD (2001) Transcriptional activation of the IL-6 gene in human contracting skeletal muscle: influence of muscle glycogen content. *FASEB J* 15: 2748–2750.
<https://doi.org/10.1096/fj.01-0507fje>
8. Капилевич ЛВ, Кабачкова АВ, Захарова АН, Лалаева ГС, Кироненко ТА, Дьякова ЕЮ, Орлов СН (2016) Секреторная функция скелетных мышц: механизмы продукции и физиологические эффекты миокинов. *Успехи физиол наук* 47(2): 7–26. [Kapilevich LV, Kabachkova AV, Zakharova AN, Lalaeva GS, Kironenko TA, Dyakova EYu, Orlov SN (2016) Secretory Function of Skeletal Muscles: Producing Mechanisms and Myokines Physiological Effects. *Uspekhi Fiziol Nauk* 47(2): 7–26. (In Russ)]. PMID: 27530041
9. Pedersen BK, Febbraio MA (2008) Muscle as an endocrine organ: focus on muscle-derived interleukin-6. *Physiol Rev* 88: 1379–1406.
<https://doi.org/10.1152/physrev.90100.2007>
10. Izuka K, Machida T, Hirafuji M (2014) Skeletal muscle is an endocrine organ. *J Pharmacol Sci* 125: 125–131.
<https://doi.org/10.1254/jphs.14r02cp>
11. Pedersen BK, Febbraio MA (2012) Muscles, exercise and obesity: skeletal muscle as a secretory organ. *Nat Rev Endocrinol* 8: 457–465.
<https://doi.org/10.1038/nrendo.2012.49>
12. Groop LC, Eriksson JG (1992) The etiology and pathogenesis of non-insulin-dependent diabetes. *Ann Med* 24(6): 483–489.
<https://doi.org/10.1002/dmr.5610090503>
13. Fujimaki S, Kuwabara T (2017) Diabetes-induced dysfunction of mitochondria and stem cells in skeletal muscle and the nervous system. *Int J Mol Sci* 18(10): 2147.
<https://doi.org/10.3390/ijms18102147>
14. Højlund K (2014) Metabolism and insulin signaling in common metabolic disorders and inherited insulin resistance. *Dan Med J* 61(7): B4890. PMID: 25123125

15. Nagy C, Einwallner E (2018) Study of In vivo glucose metabolism in high-fat diet-fed mice using oral glucose tolerance test (OGTT) and insulin tolerance test (ITT). *J Vis Exp* 7(131): 1–12. <https://doi.org/10.3791/56672>
16. Huh JY (2018) The role of exercise-induced myokines in regulating metabolism. *Arch Pharm Res* 41(1): 14–29. <https://doi.org/10.1007/s12272-017-0994-y>
17. Meneilly GS (2001) Pathophysiology of diabetes in the elderly. In: *Diabetes in old age*. John Wiley & Sons 155–164. <https://doi.org/10.1002/0470842326.ch2>
18. Brandt C, Pedersen BK (2010) The role of exercise-induced myokines in muscle homeostasis and the defense against chronic diseases. *J Biomed Biotechnol* 520258. <https://doi.org/10.1155/2010/520258>
19. Hansen JS, Zhao X, Irmeler M, Liu X, Hoene M, Scheler M, Li Y, Beckers J, Hrab de Angelis M, Häring HU, Pedersen BK, Lehmann R, Xu G, Plomgaard P, Weigert C (2015) Type 2 diabetes alters metabolic and transcriptional signatures of glucose and amino acid metabolism during exercise and recovery. *Diabetologia* 58: 1845–1854. <https://doi.org/10.1007/s00125-015-3584-x>
20. Karstoft K, Pedersen BK (2016) Exercise and type 2 diabetes: focus on metabolism and inflammation. *Immunol Cell Biol* 94: 146–150. <https://doi.org/10.1038/icb.2015.101>
21. Kapilevich L, Zakharova A, Kabachkova A, Kironenko T, Milovanova K, Orlov S (2017) Different impact of physical activity on plasma myokines content in athletes and untrained volunteers. *FEBS J* 284(1): 373–373. WOS:000409918904202
22. Kapilevich LV, Zakharova AN, Kabachkova AV, Kironenko TA, Orlov SN (2017) Dynamic and static exercises differentially affect plasma cytokine content in elite endurance- and strength-trained athletes and untrained volunteers. *Front Physiol* 8: 35. <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00035>
23. Winzell MS, Ahren B (2004) The high-fat diet-fed mouse: a model for studying mechanisms and treatment of impaired glucose tolerance and type 2 diabetes. *Diabetes* 53(3): S215–S219. https://doi.org/10.2337/diabetes.53.suppl_3.s215
24. Kapilevich LV, Zakharova AN, Dyakova EYu, Kalinnikova JG, Chibalin AV (2019) Mice experimental model of diabetes mellitus type ii based on high fat diet. *Bull Siberian Med* 18(3): 53–61. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-3-53-61>
25. Zakharova AN, Kalinnikova Y, Negodenko ES, Orlova AA, Kapilevich LV (2020) Experimental simulation of cyclic training loads. *Teor Prakt Fizich Kult* 10: 26–27.
26. Шварц В (2009) Регуляция метаболических процессов интерлейкином-6. Цитокины и воспаление 3: 3–10 [Schwartz V (2009) Regulation of metabolic processes by interleukin-6. Cytokines and Inflamm 3:3–10. (In Russ)].
27. Pedersen BK, Steensberg A, Fischer C, Keller C, Keller P, Plomgaard P, Febbraio M, Saltin B (2003) Searching for the exercise factor: is IL-6 a candidate? *J Muscle Res Cell Motil* 24(2–3): 113–119. <https://doi.org/10.1023/a:1026070911202>
28. Pedersen BK, Fischer CP (2007) Beneficial health effects of exercise: the role of IL-6 as a myokine. *Trends Pharmacol Sci* 28: 152–156. : <https://doi.org/10.1016/j.tips.2007.02.002>
29. Малашенкова ИК, Казанова ГВ, Дидковский НА (2014) Интерлейкин-15: строение, сигналинг и роль в иммунной защите. *Молек мед* 3: 9–20. [Malashenkova IK, Casanova GV, Didkovsky NA (2014) Interleukin-15: structure, signaling and role in immune defense. *Molec Med* 3: 9–20. (In Russ)].
30. Quinn LS, Strait-Bodey L, Anderson BG, Argilés JM, Havel PJ (2005) Interleukin-15 stimulates adiponectin secretion by 3T3-L1 adipocytes: evidence for a skeletal muscle-to-fat signaling pathway. *Cell Biol Int* 29: 449–457. <https://doi.org/10.1016/j.cellbi.2005.02.005>
31. Broholm C, Pedersen BK (2010) Leukemia inhibitory factor – an exercise-induced myokine. *Exerc Immunol Rev* 16: 77–85. PMID:20839492
32. Srikuea R, Esser KA, Pholpramool C (2011) Leukemia factor is expressed in rat gastrocnemius muscle after contusion and increases proliferation of rat L6 myoblasts via c-Myc signalling. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 38: 501–509. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1681.2011.05537.x>
33. Pedersen BK, Saltin B (2015) Exercise as medicine – evidence for prescribing exercise as therapy in 26 different chronic diseases. *Scand J Med Sci Sports* 25: 1–72. <https://doi.org/10.1111/sms.12581>
34. Pedersen L, Pilegaard H, Hansen J, Brandt C, Adser H, Hidalgo J, Olesen J, Pedersen BK, Hojman P (2011) Exercise-induced liver chemokine CXCL-1 expression is linked to muscle-derived interleu-

- kin-6 expression *J Physiol* 589(6): 1409–1420.
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.2010.200733>
35. Pedersen L, Olsen CH, Pedersen BK, Hojman P (2012) Muscle-derived expression of the chemokine CXCL1 attenuates diet-induced obesity and improves fatty acid oxidation in the muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 302(7): 831–840.
<https://doi.org/10.1152/ajpendo.00339.2011>
 36. Peake JM, Gatta PD, Suzuki K, Nieman DC (2015) Cytokine expression and secretion by skeletal muscle cells: regulatory mechanisms and exercise effects. *Exercise Immunol Rev* 21: 8–25. PMID: 25826432
 37. Fitts RH, Widrick JJ (1996) Muscle mechanics: adaptations with exercise-training. *Exerc Sport Sci Rev* 24: 427–473. PMID: 8744258
 38. Raue U, Trappe TA, Estrem ST, Qian H-R, Helvering LM, Smith RC, Trappe S (2012) Transcriptional signature of resistance exercise adaptations: mixed muscle and fiber type specific profiles in young and old adults. *J Appl Physiol* 112: 1625–1636.
<https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00435.2011>
 39. Gundersen K (2011) Excitation-transcription coupling in skeletal muscle: the molecular pathways of exercise. *Biol Rev* 86: 564–600.
<https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.2010.00161.x>
 40. Kapilevich LV, Kironenko TA, Zaharova AN, Kotelevtsev YV, Dulin NO, Orlov SN (2015) Skeletal muscle as an endocrine organ: role of $[Na^+]_i/[K^+]_i$ -mediated excitation-transcription coupling. *Gen Diseases* 2: 328–336.
<https://doi.org/10.1016/j.gendis.2015.10.001>
 41. Ma H, Groth RD, Wheeler DG, Barrett CF, Tsien RW (2011) Excitation-transcription coupling in sympathetic neurons and the molecular mechanism of its initiation. *Neurosci Res* 70: 2–8.
<https://doi.org/10.1016/j.neures.2011.02.004>
 42. Holmes AG, Watt MJ, Carey AL, Febbraio MA (2004) Ionomycin, but not physiological doses of epinephrine, stimulates skeletal muscle interleukin-6 mRNA expression and protein release. *Metabolism* 53:1492–1495.
<https://doi.org/10.1016/j.metabol.2004.05.015>
 43. Whitham M, Chan MHS, Pal M, Matthews VB, Prelovsek O, Lunke S, El-Osta A, Broenneke H, Alber J, Brüning JC, Wunderlich FT, Lancaster GI, Febbraio MA (2012) Contraction-induced interleukin-6 gene transcription in skeletal muscle is regulated by c-Jun terminal kinase/activator protein-1. *J Biol Chem* 287:10771–10779.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M111.31058>
 44. Nedachi T, Hatakeyama H, Kono T, Sato M, Kanzaki M (2009) Characterization of contraction-inducible CXC chemokines and their roles in C2C12 myocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 297: E866–E878. :
<https://doi.org/10.1152/ajpendo.00104.2009>
 45. McKenna MJ, Bangsbo J, Renaud JM (2008) Muscle K^+ , Na^+ , and Cl^- disturbances and Na^+ - K^+ pump inactivation: implications for fatigue. *J Appl Physiol* 104: 288–295.
<https://doi.org/10.1152/jappphysiol.01037.2007>
 46. Koltsova SV, Trushina Y, Haloui M, Akimova OA, Tremblay J, Hamet P, Orlov SN (2012) Ubiquitous $[Na^+]_i/[K^+]_i$ -sensitive transcriptome in mammalian cells: evidence for $[Ca^{2+}]_i$ -independent excitation-transcription coupling. *PLoS One* 7: e38032.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038032>

Effect of Treadmill Running Exercise Training on the Content of Myokines in the Skeletal Muscles of Mice with Type II Diabetes Mellitus Model

A. N. Zakharova^a, T. A. Kironenko^a, K. G. Milovanova^a, A. A. Orlova^a, E. Yu. Dyakova^a, Yu. G. Kalinnikova^a, A. V. Chibalin^{a,c}, and L. V. Kapilevich^{a,b,*}

^aNational Research Tomsk State University, Tomsk, Russia

^bSiberian State Medical University, Tomsk, Russia

^cDepartment of Molecular Medicine and Surgery, Integrative Physiology, Karolinska Institute, Stockholm, Sweden

*e-mail: kapil@yandex.ru

The effect of treadmill running exercise training on the content of some cytokines in the skeletal muscles of mice with a model of type II diabetes mellitus was studied. To develop a model of the disease, a high fat feeding for 12 weeks was used, physical activity in the form of forced running was carried out for 4 weeks. The concentration of myokines

in the muscle tissue of *m. gastrocnemius* was determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The development of diabetes in mice is accompanied by an increase in the concentration of inflammatory cytokines IL-6 and a decrease in the concentration of IL-15 in skeletal muscle tissue. 4 weeks treadmill running exercise training has a different effect on the content of myokines in healthy and sick mice. In healthy animals, there was a decrease in IL-6 and IL-15 concentration and an increase in LIF concentration in skeletal muscle tissue after 4 weeks of regular forced running. At the same time, in diabetic mice, the concentrations of IL-6 and IL-15 increased after exercise, while LIF, on the contrary, decreased. The concentration of NAP3 in the skeletal muscle tissue of mice was insensitive to either the formation of diabetes mellitus II or to regular treadmill running exercise training.

Keywords: myokines, cytokines, muscles, physical activity, diabetes mellitus