

**ВЛИЯНИЕ ПРИНУДИТЕЛЬНЫХ БЕГОВЫХ НАГРУЗОК НА СОДЕРЖАНИЕ
ИЗОФОРМ Na^+/K^+ -АТФазы И ОДНОВАЛЕНТНЫХ КАТИОНОВ
В СКЕЛЕТНЫХ МЫШЦАХ МЫШЕЙ С МОДЕЛЬЮ
САХАРНОГО ДИАБЕТА II ТИПА**

© 2023 г. А. Н. Захарова¹, К. Г. Милованова¹, А. А. Орлова¹, Е. Ю. Дьякова¹,
Ю. Г. Калининкова¹, О. В. Коллантай¹, И. Ю. Шувалов¹,
А. В. Чибалин¹, Л. В. Капилевич¹, *

¹Национальный исследовательский Томский государственный университет, Томск, Россия
*E-mail: kapil@yandex.ru

Поступила в редакцию 05.09.2023 г.

После доработки 20.10.2023 г.

Принята к публикации 31.10.2023 г.

Изучено влияние принудительного бега в течение 1 ч ежедневно на протяжении 4 недель на содержание изоформ Na^+/K^+ -АТФазы и одновалентных катионов в скелетных мышцах мышей с моделью сахарного диабета II типа (СД II). Для формирования модели заболевания использовалась высокожировая диета, физические нагрузки в виде принудительного бега проводились в течение 4 недель. Содержание изоформ Na^+/K^+ -АТФазы и ионов Na^+ и K^+ в мышечной ткани *m. gastrocnemius* определялась методом вестерн-блоттинга и атомной абсорбционной спектрофотометрии соответственно. Показано, что формирование СД II у мышей сопровождается изменением содержания изоформ альфа 1 и 2 Na^+/K^+ -АТФазы в мышечной ткани. Эффект принудительных беговых нагрузок на содержание Na^+/K^+ -АТФазы в мышечной ткани выражен значительно и прежде всего различается в возрастных группах. Также можно отметить определенную зависимость влияния принудительных беговых нагрузок на содержание данного фермента от времени их применения. У молодых животных изменения концентраций одновалентных катионов натрия и калия после принудительных беговых нагрузок были выражены в меньшей степени. У возрастных мышей с моделью СД на фоне принудительных нагрузок наблюдалось возрастание содержания натрия и снижение содержания калия в мышечной ткани. Обнаруженные изменения обмена одновалентных катионов в мышечной ткани мышей при СД II под влиянием принудительных беговых нагрузок могут играть роль в реализации метаболических эффектов физической активности.

Ключевые слова: одновалентные катионы, Na^+/K^+ -АТФаза, беговая нагрузка, сахарный диабет

DOI: 10.31857/S0869813923120142, **EDN:** CHNRKQ

ВВЕДЕНИЕ

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 возрастанием концентрации глюкозы в крови [1–3]. Несмотря на значительное количество исследований метаболизма глюкозы, молекулярные механизмы его регуляции

в норме и патологии остаются недостаточно изученными [4]. 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 некоторых тканях и органах на клеточном и системном уровне [5, 6].

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 Лангерганса [7]. Поскольку ожирение в этом случае вызвано манипуляциями с питанием, а не с цитотоксическими веществами, считается, что такие модели более сходны с заболеванием у человека.

Мышечная ткань является основным потребителем энергии, где химическая энергия жирных кислот и глюкозы преобразуется в механическую [8]. Кроме того, мышечные клетки при сокращении способны продуцировать белковые сигнальные молекулы – миокины. Спектр вырабатываемых миокинов и их роль в метаболических процессах достаточно разнообразна. Миокины с помощью противовоспалительного воздействия на сами мышцы могут противодействовать резистентности к инсулину [9]. Кроме того, при физических упражнениях экспрессируются белковые молекулы, вовлеченные в процессы гликолиза и метаболизм аминокислот [10]. Следует отметить, что физическая активность оказывает естественное противовоспалительное действие и способствует активации метаболических процессов [11]. 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 [12, 13]. Поэтому предполагается, что эндокринные эффекты мышечной ткани также разнообразны в зависимости от режимов мышечного сокращения.

Однако механизмы влияния физической активности на резистентность мышечной ткани к инсулину при СД II до сих пор остаются предметом дискуссии. При этом внимание исследователей все больше привлекает роль одновалентных катионов в этих процессах. В многочисленных исследованиях было показано, что как у человека, так и у экспериментальных животных интенсивные физические упражнения способствуют увеличению $[Na^+]_i$ в 3–4 раза и уменьшению $[K^+]_i$ до 50% в скелетных мышцах за счет активации ионных каналов. Было также продемонстрировано, что выход K^+ из мышечных клеток во время упражнений приводит к повышению $[K^+]$ в интерстициальной жидкости скелетных мышц от 4–5 до 11–15 мМ. У людей интенсивные динамические и статические упражнения приводят к 2-кратному повышению уровня $[K^+]$ в венозной крови из-за его выхода из скелетных мышц, которые являются основным источником внутриклеточного K^+ в организме [14–20].

Увеличение внутриклеточного соотношения $[Na^+]_i/[K^+]_i$ является достаточным условием изменения транскрипции десятков универсальных и сотен тканеспецифических генов [21]. В ряде случаев эти изменения транскрипции не связаны с возможным приростом $[Ca^{2+}]_i$. Было показано, что в условиях гипоксии наблюдается увеличение соотношения $[Na^+]_i/[K^+]_i$, что может быть достаточным условием для изменения транскриптома этих клеток [21]. Было обнаружено, что диссипация трансмембранного градиента одновалентных катионов, вызванная ингибированием Na^+/K^+ -АТФазы, приводит к увеличению транскрипции генов *PTGS2* и *NR4A1* с помощью Са-кальмодулин-опосредованного фосфорилирования транскрипци-

онного фактора, способного связывать CRE-последовательности ДНК (CREB) и опосредованного кальцинейрином дефосфорилирования ядерного фактора активированных Т-клеток (NFAT) соответственно [21]. В наших предыдущих работах [22–24] доказано влияние диссипации градиентов одновалентных катионов на экспрессию генов и продукцию миокинов.

В литературе отмечается снижение активности Na^+/K^+ -АТФазы у больных СД по сравнению с лицами без диабета. Это снижение описано как в клетках скелетных мышц [25], так и миокарда [26] и эритроцитов [27]. При этом активность Na^+/K^+ -АТФазы не имела зависимости от возраста и пола обследованных лиц, оставалась низкой при всех сроках заболевания и недостоверно снижалась с увеличением продолжительности диабета. В то же время данный показатель имел обратную зависимость от уровня HbA1c.

Таким образом, поскольку сократительная активность мышечных клеток сопровождается диссипацией градиентов одновалентных катионов, которая является пусковым фактором изменения транскрипции генов [28–31], этот механизм можно рассматривать как один из вариантов пути реализации эффектов физической активности при сахарном диабете.

В связи со всем изложенным целью нашего исследования было изучить влияние физических нагрузок на содержание изоформ Na^+/K^+ -АТФазы и одновалентных катионов 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-исследовательский институт фармакологии и регенеративной медицины им. Е.Д. Гольдберга. Режим содержания животных: день/ночь: 12/12 ч, световой день начинался с 6:00, свободный доступ к пище и воде, температура в помещении 24°C.

Схема эксперимента представлена на рис. 1. Были сформированы экспериментальные группы мышей различного возраста. Группа молодых животных включалась в эксперимент в возрасте 4-х нед., группа возрастных животных включалась в эксперимент в возрасте 32-х нед.

Эксперимент продолжался 16 нед. До 12-й недели мыши каждой возрастной группы были разделены на 2 подгруппы (рис. 1):

- животные, находившиеся на жировой диете – 28 мышей;
- животные, получавшие стандартный рацион – 28 мышей;

Для формирования модели сахарного диабета II типа (СД II) использовалась высокожировая диета в течение 12 нед., которая была разработана специально для данного эксперимента. 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, в том числе 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 приготавливался на 5 дней и хранился при –20°C. В предварительных исследованиях, опубликованных нами ранее [32], 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.

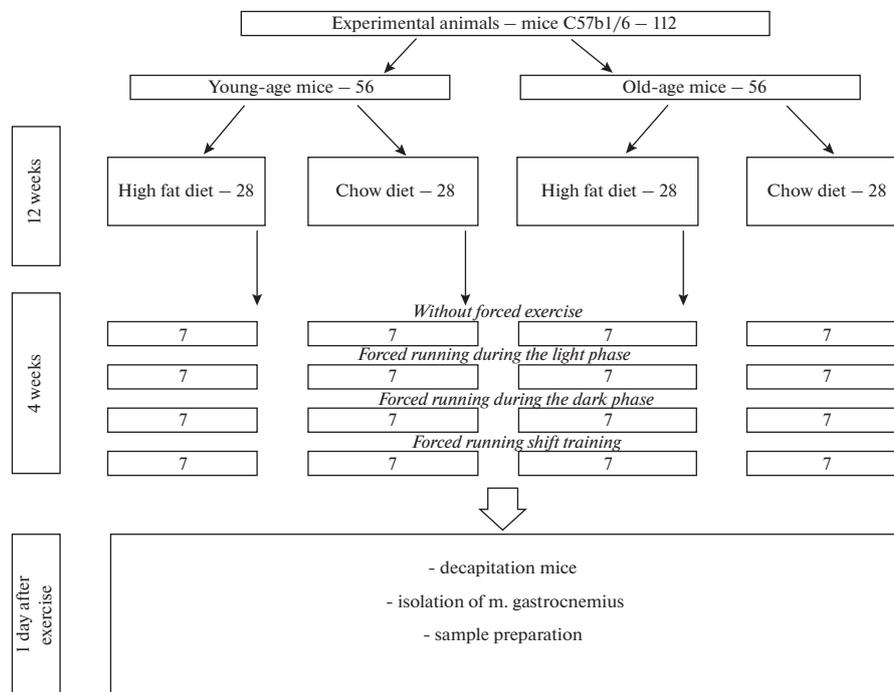


Рис. 1. Дизайн эксперимента.

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, в том числе на долю жиров приходилось 18% калорийности.

Начиная с 12-ой недели каждая группа животных была поделена на подгруппы – подвергавшихся (основная – 21 животное) и не подвергавшихся (контрольная – 7 животных) принудительным беговым нагрузкам (рис. 1).

Различные подгруппы основной группы мышей подвергались беговой нагрузке в разное время суток.

Группа А – подвергались беговой нагрузке в светлое время суток (с 8-00 до 10-00 ч) – 7 животных;

Группа В – подвергались беговой нагрузке в темное время суток (с 19-00 до 21-00 ч) – 7 животных;

Группа С – время принудительной беговой нагрузки чередовалось (переменный режим): первую и третью недели в темное время суток (с 19-00 до 21-00 ч), вторую и четвертую недели – в светлое время суток (с 8-00 до 10-00 ч) – 7 животных.

Для нормирования нагрузки была использована разработанная по нашему заказу беговая дорожка для мышей BMELAB SID-TM10 [33]. Принуждение к бегу осуществлялось электрическим раздражением, напряжение подавалось на металлическую сетку, расположенную на задней стенке камеры. Дорожка имела тумблер включения ленты, тумблер включения тока, регулятор скорости движения ленты, регулятор 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 нед. 6 раз в неделю, продолжительность нагрузки постепенно увеличивалась в течение первых 6 дней с 10 до 60 мин (прирост 10 мин в день) и не изменялась больше на протяжении следующих 3 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 выделялись *m. gastrocnemius*, мышечная ткань очищалась от соединительной и жировой ткани.

Определение Na^+/K^+ -АТФазы в мышечной ткани

Гомогенизацию мышечной ткани для вестерн-блоттинга проводили следующим образом: перед лизисом ткань сначала разрезали скальпелем на стеклянной пластине, находящейся на льду, на небольшие кусочки размером ~1 мм. Затем их переносили в холодный 1X RIPA буфер, содержащий (мМ) 137 NaCl, 2.7 KCl, 1 MgCl₂, 0.5 Na₂VO₄, 1% Triton X-100, 10% глицерина, 20 мМ Триса – рН 7, 1 мкг/мл лейпептина, 0.2 ПМСФ, 10 NaF, 1 ЭДТА, 1 ДТТ, 5 пиродифосфата натрия, 100 бензамидина) в специальные пробирки для гомогенизации с закручивающимися крышками и утолщенными стенками. Использовали 50 мкл буфера на 20 мг влажной мышечной ткани. Во время обработки материал хранился на льду. Затем в пробирки помещали металлические шарики диаметром 5 мм (Qiagen, Германия). Пробирки помещали в вихревой лабораторный миксер Digital Vortex-Genie 2 (Scientific Industries, Inc., США) на 15 мин при 4°С. Затем оставляли на мини-ротатор-шейкере (MP-1, Biosan, Латвия) в холодильнике на 1 ч. Далее центрифугировали при 13000 об/мин в течение 5 мин при 4°С и переносили прозрачный супернатант в новые четко маркированные пробирки. Отбиралось 20 мкл для определения концентрации общего белка в образце (метод Брэдфорда).

Для определения концентрации изоформ Na^+/K^+ -АТФазы в мышечной ткани проводили электрофорез в полиакриламидном геле в денатурирующих условиях согласно методу Laemmli (1970), используя 5%-ный концентрирующий (приготовлен на буферном растворе, содержащем 0.5 М трис-НCl, рН 6.8, 0.4% SDS) и 10%-ный разделяющий (приготовлен на буферном растворе, содержащем 1.5 М трис-НCl, рН 8.8, 0.4% SDS) гели. Камеру для электрофореза заполняли буфером, который содержал 1.92 М глицина, 250 мМ Tris-НCl (рН 8.6) и 1% SDS. Стоковый раствор полиакриламида содержал 30% акриламида и 0.8% N,N-метилен-бис-акриламида. Образцы белка для электрофореза готовили из общего гомогената мышцы, используя 4-кратный буфер (250 мМ Tris-НCl, рН 6.8, 8% SDS, 40% сахарозы, 0.05% бромфенолового синего, 5% β-меркаптоэтанола) и инкубировали в течение ночи при комнатной температуре. Для контроля молекулярной массы белка использовались маркеры молекулярной массы (Bio-Rad, США). Электрофорез проводили, используя камеру Mini-Protean III (Bio-Rad, США), начиная при силе тока 25 мА. После вхождения образцов в разделяющий гель силу тока увеличивали до 50 мА. Количество общего белка, нанесенного в каждую лунку, составляло 10 мкг. После электрофореза белки переносили из геля на PVDF мембрану (Bio-Rad, США) в буфере для переноса (25 мМ триса, 192 мМ глицина (рН 8.3), 20% этанола) в течение 1.5 ч при силе тока 400 мА. Для подготовки мембраны к иммунохимическому окрашиванию ее промывали несколько раз в растворе TBS (50 мМ Tris, рН 7.4, 150 мМ NaCl). Далее проводили блокирование 5%-ным сухим обезжиренным молоком (Bio-Rad, США), приготовленным на PBSt (PBS с добавлением Твин-20 0.1%). Блокировали в течение часа при комнатной температуре и при постоянном перемешивании.

Белки-мишени определяли путем инкубации в течение ночи при 4°C в 5%-ном сухом молоке в TBSt (100 мМ Трис, 1.5 М NaCl, 1% Твин-20) в разведении 1 : 1000 с первичными кроличьими поликлональными антителами против альфа-2-субъединицы Na⁺/K⁺-АТФазы (кат. № АВ9094-1, Sigma-Aldrich, США) и против альфа-1-субъединицы Na⁺/K⁺-АТФазы (кат. № 05-369, Sigma-Aldrich, США). Затем образец инкубировали со вторичными антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена (антимышинные, кат. № 1706516, антикроличьи, кат. № 1706515, BioRad, США) в течение 1 ч при комнатной температуре в 5%-ном сухом молоке в TBSt.

Комплексы антиген-антитело визуализировали с помощью набора ECL (Super-Signal West Dura, Thermo Scientific, США) и системы документирования (Chemi-Doc-It 2, UVP, Великобритания). Денситометрический анализ проводили с помощью программного обеспечения ImageJ. Данные вестерн-блоттинга представлены в относительных единицах по сравнению с контролем. В качестве референсного белка брали один образец белка у животного контрольной группы, и он служил референсным белком для всех остальных определений. Контрольные значения принимались за 100%.

Определение концентрации ионов Na⁺ и K⁺ в мышечной ткани

Препарирование мышц проводили с PBS буфером на льду, после выделения образцы помещали в промыточный раствор (100 мМ MgCl₂, 10 мМ Tris-HCl, pH 7.4) на льду и инкубировали в течение 15 мин, затем раствор меняли на свежий, данную процедуру повторяли 4 раза. Извлеченную мышцу взвешивали и разрезали на мелкие части, после чего помещали в микропробирку, содержащую 5%-ный раствор трихлоруксусной кислоты (ТХУ), для полного извлечения ионов из ткани.

Через сутки содержимое микропробирок гомогенизировали в стеклянном гомогенизаторе Поттера с тефлоновым пестиком. После этого дополнительно проводили ультразвуковую дезинтеграцию образцов с использованием “Bradson 450 Digital Sonifier” (Marshall Scientific) в течение 30 с с мощностью 15% от максимальной амплитуды, повторяли процедуру 3 раза до полной гомогенности суспензии. Полученный образец центрифугировали при 18000 g в течение 10 мин, супернатант переносили в пробирку для последующего измерения концентрации ионов. К осадкам добавляли лизирующий RIPA буфер, содержащий коктейль ингибиторов протеаз. При определении концентрации белка использовали модифицированный метод Лоури.

Содержание Na⁺ и K⁺ в экстрактах ТХУ определяли методом пламенной атомно-абсорбционной спектрометрии с использованием спектрометра “Квант-2м1” (Кортек, Россия) со смесью пропан–воздух. Для калибровки использовали растворы KCl (0.5–4 мг/л K⁺) и NaCl (0.05–2 мг/л Na⁺), содержащие 5% ТХУ. Содержание Na⁺ и K⁺ каждой пробы нормализовали по влажному весу соответствующей мышцы. Все растворы готовили с использованием дважды деионизованной воды.

Методы статистического анализа

Статистическую обработку данных проводили с использованием пакета Graph-Pad Prism. Уровень значимости при проверке гипотезы принадлежности двух выборок к одной генеральной совокупности оценивали по Kruskal–Wallis ANOVA test. Все данные имели ненормальное распределение признака. Для сравнения групп использовался двусторонний дисперсионный анализ с критерием множественного сравнения Тьюки и поправкой Холма–Сидака. Данные представлены в виде среднего значения и среднего квадратичного отклонения.

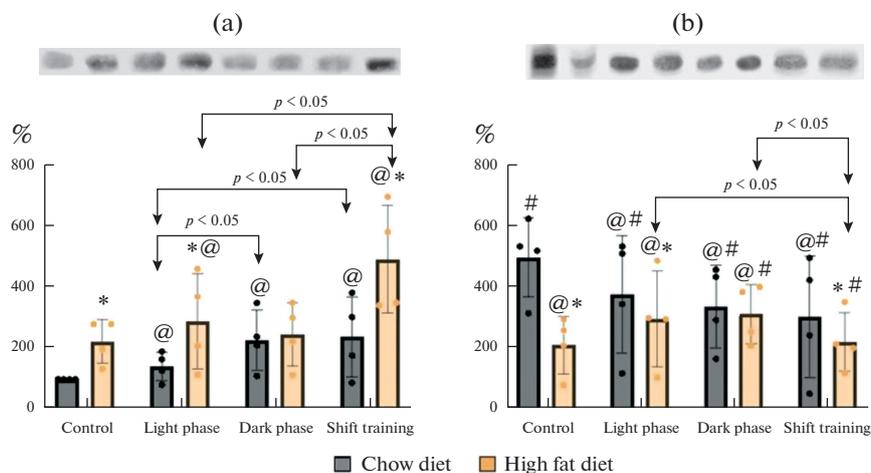


Рис. 2. Концентрация изоформы Na^+/K^+ -АТФазы альфа 1 в мышечной ткани мышей. Панель (а) – молодые мыши; панель (б) – возрастные мыши. Данные представлены как среднее \pm среднее квадратичное отклонение. * – достоверность различий ($p < 0.05$) с группой со стандартной диетой; # – достоверность различий ($p < 0.05$) с группой молодых мышей; @ – достоверность различий ($p < 0.05$) с контролем.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В первой части работы методом вестерн-блоттинга определялось содержание изоформ альфа 1 и альфа 2 Na^+/K^+ -АТФаз.

На рис. 2 представлено содержание изоформы альфа 1 Na^+/K^+ -АТФазы в мышечной ткани экспериментальных животных. Результаты представлены в процентах от контроля, за 100% принято содержание данного белка в мышечной ткани молодых мышей, находящихся на обычной диете и не подвергавшихся принудительному бегу.

Как видно из рис. 2а, жировая диета у молодых животных способствует увеличению содержания изоформы альфа 1 Na^+/K^+ -АТФазы в мышечной ткани. Принудительные беговые нагрузки способствовали увеличению содержания данного белка как у животных, получавших стандартную диету, так и жировую, но во втором случае – достоверно выше. Наибольший эффект оказывали занятия в переменном режиме, содержание изоформы альфа 1 Na^+/K^+ -АТФазы в мышечной ткани при этом возрастало в 4 раза. Эффекты занятий в темную и светлую фазу различались незначительно, особенно у мышей, получавших жировую диету. У животных, получавших стандартную диету, влияние принудительных беговых нагрузок на содержание данного фермента было выражено сильнее, если применялось в темную фазу, в сравнении со светлой.

Как видно из рис. 2б, у возрастных животных контрольной группы содержание изоформы альфа 1 Na^+/K^+ -АТФазы в мышечной ткани значительно выше по сравнению с молодыми животными. При этом питание жировой диетой у возрастных животных способствует снижению содержания данного фермента. Принудительные беговые нагрузки способствовали снижению содержания данного белка у животных, получавших стандартную диету независимо от режима нагрузок. Но содержание его все равно оставалось выше, чем у молодых животных, подвергавшихся аналогичным нагрузкам. Напротив, у животных, получавших жировую диету, со-

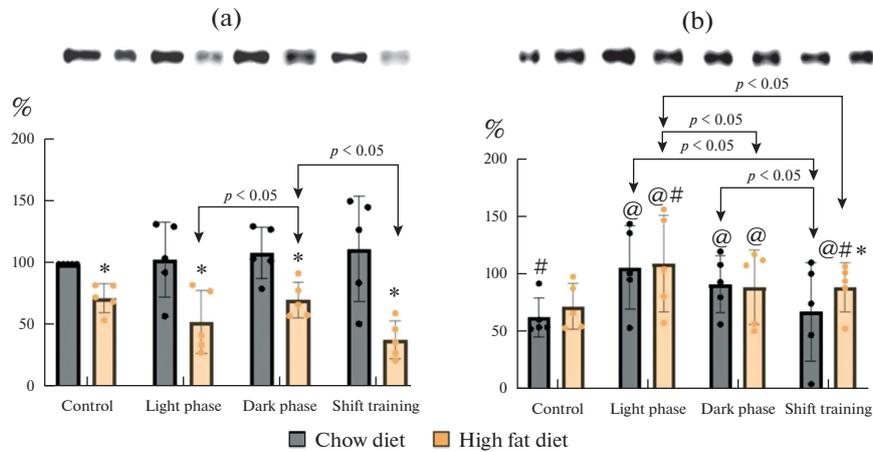


Рис. 3. Концентрация изоформы Na^+/K^+ -АТФазы альфа 2 в мышечной ткани мышей. Панель (а) – молодые мыши; панель (б) – возрастные мыши. Данные представлены как среднее \pm среднее квадратичное отклонение. * – достоверность различий ($p < 0.05$) с группой со стандартной диетой; # – достоверность различий ($p < 0.05$) с группой молодых мышей; @ – достоверность различий ($p < 0.05$) с контролем.

держание изоформы альфа 1 Na^+/K^+ -АТФазы в мышечной ткани увеличивалось, если нагрузка применялась в светлую или темную фазу, но не в переменном режиме. Однако это увеличение было менее выражено, чем у молодых животных. В целом на фоне принудительных беговых нагрузок содержание изоформы альфа 1 Na^+/K^+ -АТФазы в мышечной ткани мышей с моделью СД увеличивалось у молодых животных – при применении нагрузок в переменном режиме, у возрастных – в темную фазу.

На рис. 3 представлено содержание изоформы альфа 2 Na^+/K^+ -АТФазы в мышечной ткани экспериментальных животных. Результаты представлены в процентах от контроля, за 100% принято содержание данного белка в мышечной ткани молодых мышей, находящихся на стандартной диете и не подвергавшихся принудительному бегу.

Как видно из рис. 3а, жировая диета у молодых животных способствует некоторому снижению содержания изоформы альфа 2 Na^+/K^+ -АТФазы в мышечной ткани. Принудительные беговые нагрузки не влияли на содержание данного белка у молодых животных, получавших стандартную диету. В то же время у животных, получавших жировую диету, принудительные беговые нагрузки способствовали снижению содержания изоформы альфа 2 Na^+/K^+ -АТФазы в мышечной ткани, если нагрузка применялась в светлую фазу или в переменном режиме. Применение нагрузки в темную фазу не оказывало эффекта на содержание данного фермента у молодых животных.

Как видно из рис. 3б, у возрастных животных контрольной группы содержание изоформы альфа 2 Na^+/K^+ -АТФазы в мышечной ткани было вдвое ниже по сравнению с молодыми животными. При этом питание жировой диетой у возрастных животных не влияло на содержание данного фермента в мышечной ткани.

Принудительные беговые нагрузки способствовали увеличению содержания изоформы альфа 2 Na^+/K^+ -АТФазы в мышечной ткани у возрастных животных. Этот эффект был выражен как у животных, получавших стандартную диету (если

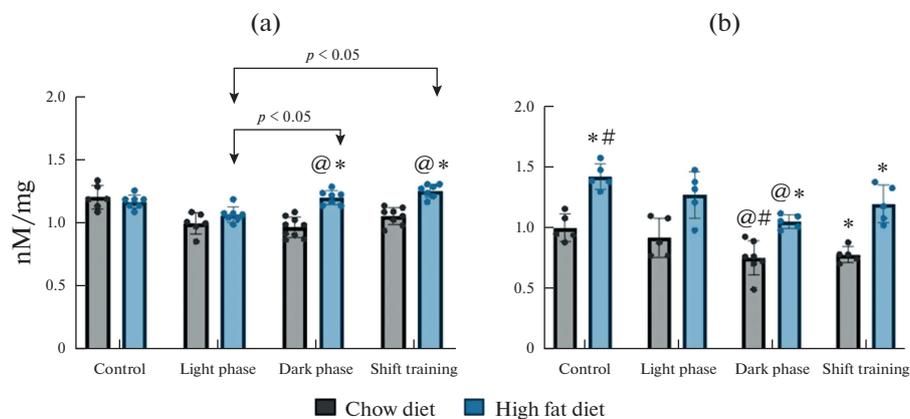


Рис. 4. Концентрация Na⁺ в мышечной ткани мышей (нМ/мг белка). Панель (а) – молодые мыши; панель (b) – возрастные мыши. Данные представлены как среднее ± среднее квадратичное отклонение. * – достоверность различий ($p < 0.05$) с группой со стандартной диетой; # – достоверность различий ($p < 0.05$) с группой молодых мышей; @ – достоверность различий ($p < 0.05$) с контролем.

нагрузки применялись в светлую или темную фазу, но не в переменном режиме), так и у животных, получавших жировую диету (во всех режимах применения нагрузок, но в наибольшей степени – в светлую фазу). В целом на фоне принудительных беговых нагрузок у животных, получавших жировую диету, содержание изоформы альфа 2 Na⁺/K⁺-АТФазы в мышечной ткани возрастных мышей было заметно выше, чем у молодых.

Во второй части работы концентрация катионов натрия и калия в мышечной ткани определялась методом атомной абсорбционной спектроскопии.

На рис. 4 представлена концентрация катионов натрия в мышечной ткани экспериментальных животных. Результаты представлены в нМ/мг белка.

Как видно из рис. 4а, жировая диета у молодых животных не влияет на концентрацию ионов натрия в мышечной ткани. Принудительные беговые нагрузки также достоверно не повлияли на этот показатель ни в одной группе мышей, получавших стандартную диету. Небольшое увеличение концентрации натрия в группе молодых мышей, получавших жировую диету, было отмечено при принудительных беговых нагрузках в темную фазу и при попеременном режиме.

Как видно из рис. 4б, жировая диета у возрастных животных способствовала увеличению концентрации ионов натрия в мышечной ткани. Принудительные беговые нагрузки приводили к снижению данного показателя, если применялись в темную фазу или в переменном режиме.

На рис. 5 представлена концентрация катионов калия в мышечной ткани экспериментальных животных. Результаты представлены в нМ/мг белка.

Как видно из рис. 5а, жировая диета у молодых животных способствует увеличению концентрации ионов калия в мышечной ткани. Принудительные беговые нагрузки приводили к возрастанию концентрации ионов калия в группах мышей, получавших стандартную диету, если нагрузка выполнялась в светлую или темную фазу. У мышей, получавших жировую диету, изменений со стороны концентрации ионов калия в мышечной ткани под влиянием нагрузок мы не зафиксировали.

Как видно из рис. 5б, жировая диета у возрастных животных способствовала значительному увеличению концентрации ионов калия в мышечной ткани. При-

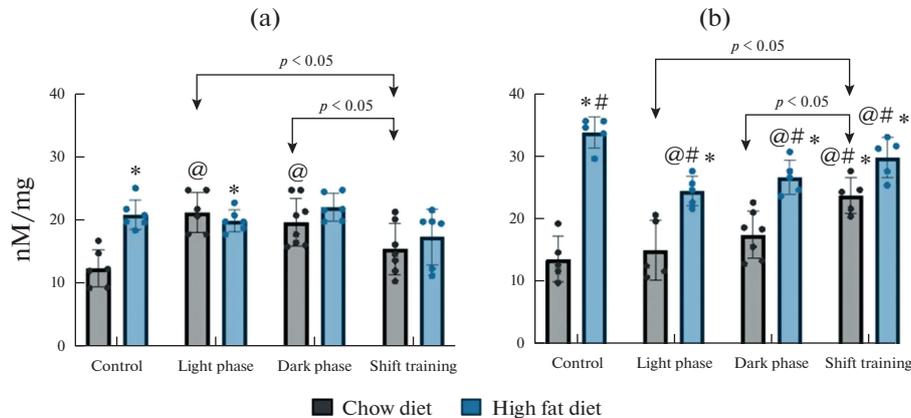


Рис. 5. Концентрация K^+ в мышечной ткани мышей (нМ/мг белка). Панель (а) – молодые мыши; панель (б) – возрастные мыши. Данные представлены как среднее \pm среднее квадратичное отклонение. * – достоверность различий ($p < 0.05$) с группой со стандартной диетой; # – достоверность различий ($p < 0.05$) с группой молодых мышей; @ – достоверность различий ($p < 0.05$) с контролем.

нудительные беговые нагрузки приводили к снижению данного показателя независимо от схемы их применения. У животных, получавших стандартную диету, концентрация ионов калия в мышечной ткани не изменялась под влиянием физических нагрузок.

В заключение можно отметить, что у молодых животных с моделью СД изменения концентраций одновалентных катионов натрия и калия после принудительных беговых нагрузок были выражены в меньшей степени. У возрастных мышей с моделью СД на фоне принудительных нагрузок наблюдалось возрастание содержания натрия и снижение содержания калия в мышечной ткани.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Подводя итог сказанному, следует отметить, что формирование метаболических расстройств, аналогичных СД II, у мышей сопровождается изменением содержания изоформы альфа 1 Na^+/K^+ -АТФазы в мышечной ткани *m. gastrocnemius*. У молодых животных отмечается увеличение, у возрастных – напротив, снижение. Содержание изоформы альфа 2 Na^+/K^+ -АТФазы в мышечной ткани *m. gastrocnemius* снижается при формировании СД II у молодых мышей. Эффект принудительных беговых нагрузок на содержание изоформ Na^+/K^+ -АТФазы в мышечной ткани *m. gastrocnemius* выражен значительно и прежде всего различается в возрастных группах. У молодых животных отмечается увеличение содержания изоформы альфа 1 Na^+/K^+ -АТФазы в мышечной ткани *m. gastrocnemius* и снижение содержания изоформы альфа 2 Na^+/K^+ -АТФазы в сравнении с величинами до применения беговых нагрузок. У возрастных животных отмечается увеличение содержания изоформы альфа 2 Na^+/K^+ -АТФазы в мышечной ткани *m. gastrocnemius* в сравнении с величинами до применения беговых нагрузок.

Полученные результаты, особенно в группе молодых животных, вступают в некоторое противоречие с литературными данными. В частности, Clausen [34] утверждает, что исследования изоформы альфа 2 субъединицы Na^+/K^+ -АТФазы выявили относительное увеличение ее количества в ответ на физическую нагрузку и прием глю-

кокортикоида дексаметазона. Можно предполагать, что в наших экспериментах физические нагрузки применялись в течение длительного времени (4 недели), что приводило к адаптивным изменениям. Также можно отметить определенную зависимость влияния принудительных беговых нагрузок на содержание данного фермента от времени их применения. В большей степени оказывают эффект нагрузки, применяемые в период сна (в светлую фазу дня), а также при чередовании фаз.

Описанные изменения содержания основного фермента, транспортирующего одновалентные катионы через клеточную мембрану, могут являться одной из причин изменения концентрации натрия и калия в мышечной ткани. У молодых животных абсолютные изменения этих концентраций после принудительных беговых нагрузок были выражены в меньшей степени, но изменение их соотношения было более значительным. У возрастных мышцей на фоне принудительных нагрузок наблюдалось возрастание содержания натрия и калия в мышечной ткани, но соотношение концентраций изменялось незначительно.

Обнаруженные изменения обмена одновалентных катионов в мышечной ткани мышцей при СД II под влиянием принудительных беговых нагрузок могут играть роль в реализации метаболических эффектов физической активности. Они могут быть связаны с особенностями $[Na^+]_i/[K^+]_i$ -зависимых путей 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.

Полученные результаты дают основания рассматривать систему одновалентных катионов как один из вариантов возможных механизмов влияния физической активности на резистентность мышечной ткани к инсулину при СД II. Данный механизм может быть связан с особенностями регуляции процессов транскрипции. Показано, что транскрипционные изменения при сокращении мышцей наиболее выражены в быстро сокращающихся мышечных волокнах типа IIa [35], доля которых у больных СД II увеличивается.

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 $[Na^+]_i$ в 3–4 раза и снижению $[K^+]_i$ на 50%, что сопровождается повышением $[K^+]_i$ в плазме и межклеточной жидкости [36]. Это позволяет предположить, что изменение концентрации $[Na^+]_i$ и $[K^+]_i$ может являться фактором, регулирующим метаболические перестройки в мышечных волокнах, в том числе, способность утилизировать глюкозу [30, 31]. В некоторых типах клеток повышение соотношения $[Na^+]_i/[K^+]_i$ приводило к экспрессии mRNA целого ряда регуляторных молекул [37].

ВЫВОДЫ

1. Формирование СД II у мышцей сопровождается изменением содержания изоформ альфа 1 и 2 Na^+/K^+ -АТФазы в мышечной ткани. Эффект принудительных беговых нагрузок на содержание изоформ Na^+/K^+ -АТФазы в мышечной ткани выражен значительно и различается в возрастных группах. На фоне принудительных беговых нагрузок у животных, получавших жировую диету, содержание изоформы альфа 2 Na^+/K^+ -АТФазы в мышечной ткани возрастных мышцей было заметно выше, чем у молодых.

2. Обнаружена зависимость влияния принудительных беговых нагрузок на содержание данного фермента от времени их применения. У молодых животных принудительные беговые нагрузки способствовали снижению содержания изоформы альфа 2 Na^+/K^+ -АТФазы в мышечной ткани, если нагрузка применялась в светлую фазу или в переменном режиме. У возрастных животных эффект регистрировался при всех режимах применения нагрузок, но в наибольшей степени – в светлую фазу.

3. У молодых животных с моделью СД изменения концентраций одновалентных катионов натрия и калия после принудительных беговых нагрузок были выражены в меньшей степени. У возрастных мышей с моделью СД на фоне принудительных нагрузок наблюдалось возрастание содержания натрия и снижение содержания калия в мышечной ткани.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены. Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием животных, соответствовали этическим стандартам, утвержденным правовыми актами РФ, принципам Базельской декларации и рекомендациям комиссии по биоэтике Биологического института Томского государственного университета (протокол № 32 от 02.12.2019 г.).

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 19-15-00118, <https://rscf.ru/project/19-15-00118-p>.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией данной статьи.

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента (З.А.Н., Ч.А.В. и К.Л.В.), сбор данных (К.О.В., О.А.А., Ш.И.Ю. и К.Ю.Г.), обработка данных (З.А.Н., М.К.Г., Д.Е.Ю.), написание и редактирование статьи (З.А.Н., М.К.Г. и К.Л.В.), одобрение финальной версии статьи, подлежащей публикации (Ч.А.В. и К.Л.В.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. 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>
2. 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>
3. Höjlund K (2014) Metabolism and insulin signaling in common metabolic disorders and inherited insulin resistance. *Dan Med J* 61(7): B4890.
4. 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>
5. 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>
6. Zakharova AN, Milovanova KG, Orlova, AA, Dyakova EY, Kalinnikova JG, Kollantay OV, Shuvalov IY, Chibalin AV, Kapilevich LV (2023) Effects of Treadmill Running at Different Light Cy-

- cles in Mice with Metabolic Disorders. *Int J Mol Sci* 24: 15132.
<https://doi.org/10.3390/ijms242015132>
7. *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
 8. *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>
 9. *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>
 10. *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(8): 1845–1854.
<https://doi.org/10.1007/s00125-015-3584-x>
 11. *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>
 12. *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): 370–373.
 13. *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* 30(8): 35.
<https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00035>
 14. *Jurkat-Rott K, Fauler M, Lehmann-Horn F* (2006) Ion channels and ion transporters of the transverse tubular system of skeletal muscle. *J Muscle Res Cell Motil* 27: 275–290.
<https://doi.org/10.1007/s10974-006-9088-z>
 15. *Sejersted OM, Sjogaard G* (2000) Dynamics and consequences of potassium shifts in skeletal muscle and heart during exercise. *Physiol Rev* 80: 1411–1481.
<https://doi.org/10.1152/physrev.2000.80.4.1411>
 16. *McDonough AA, Thompson CB, Youn JH* (2002) Skeletal muscle regulates extracellular potassium. *Am J Physiol Ren Physiol* 282: F967–F974.
<https://doi.org/10.1152/ajprenal.00360.2001>
 17. *McKenna MJ, Bangsbo J, Renaud JM* (2008) Muscle K^+ , Na^+ , and Cl^- -disturbances and Na^+ - K^+ pump inactivation: implications for fatigue. *J Appl Phys* 104: 288–295.
<https://doi.org/10.1152/jappphysiol.01037.2007>
 18. *Murphy KT, Nielsen OB, Clausen T* (2008) Analysis of exercise-induced Na^+ - K^+ exchange in rat skeletal muscle. *Exp Physiol* 93: 1249–1262.
<https://doi.org/10.1113/expphysiol.2008.042457>
 19. *Cairns SP, Lindinger MI* (2008) Do multiple ionic interactions contribute to skeletal muscle fatigue? *J Physiol* 586: 4039–4054.
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.2008.155424>
 20. *Orlov SN, Koltsova SV, Kapilevich LV, Gusakova SV, Dulin NO* (2015) KCC1 and NKCC2: The pathogenetic role of cation-chloride cotransporters in hypertension. *Genes & Diseases* 2: 186–196.
<https://doi.org/10.1016/j.gendis.2015.02.007>
 21. *Smolyaninova LV, Koltsova SV, Sidorenko SV, Orlov SN* (2017) Augmented gene expression triggered by Na^+ , K^+ -ATPase inhibition: Role of Ca_i^{2+} -mediated and – independent excitation-transcription coupling. *Cell Calcium* 68: 5–13.
<https://doi.org/10.1016/j.ceca.2017.10.002>
 22. *Sidorenko S, Klimanova E, Milovanova K, Lopina OD, Kapilevich LV, Chibalin AV, Orlov SN* (2018) Transcriptomic changes in C2C12 myotubes triggered by electrical stimulation: Role of Ca_i^{2+} -mediated and Ca_i^{2+} -independent signaling and elevated $[Na^+]_i/[K^+]_i$ ratio. *Cell Calcium* 76: 72–86.
<https://doi.org/10.1016/j.ceca.2018.09.007>
 23. *Kapilevich LV, Kironenko TA, Zaharova AN* (2015) Skeletal muscle as an endocrine organ: role of $[Na^+]_i/[K^+]_i$ -mediated excitation-transcription coupling. *Genes & Diseases* 2: 328–336.
<https://doi.org/10.1016/j.gendis.2015.10.001>
 24. *Lauritzen HP, Brandauer J, Schjerling P* (2013) Contraction and AICAR stimulate IL-6 vesicle depletion from skeletal muscle fibers *in vivo*. *Diabetes* 62: 3081–3092.
<https://doi.org/10.2337/db12-1261>

25. Jannot MF, Dufayet De La Tour DT, Coste P (2002) Na/K ATPase activity in Diabetic Patient Metabolism. *Diabetes mellitus* 51(3): 284–291.
26. Shamansurova ZM, Mukhamedova FA, Tsoi AG, Tashmanova AB, Alieva AV, Akhbarova NA (2009) Abnormal Na-K-ATPase activity in erythrocytes from patients with diabetes mellitus. *Diabetes mellitus* 12(2): 55–57.
<https://doi.org/10.14341/2072-0351-5399>
27. Chistyakova OV, Sukhov IB, Dobretsov MG, Kubasov IV (2020) Study of Na/K-ATPase activity in the myocardium of rats under experimental conditions of prediabetes and diabetes mellitus. *J Evol Biochem Physiol* 56(2): 166–168.
<https://doi.org/10.1134/S0022093020020118>
28. Kapilevich LV, Milovanova KG, Sidorenko SV, Fedorov DA, Kironenko TA, Zakharova AN, Dyakova EYu, Orlov SN (2020) Influence of dynamic and static loads on the content of sodium and potassium in mouse skeletal muscles. *Bull Exp Biol Med* 169(1): 4–7.
<https://doi.org/10.1007/s10517-020-04811-y>
29. Klimanova EA, Sidorenko SV, Tverskoi AM, Shiyan AA, Smolyaninova LV, Kapilevich LV, Guskova SV, Maksimov GV, Lopina OD, Orlov SN (2019) Search for Intracellular Sensors Involved in the Functioning of Monovalent Cations as Secondary Messengers. *Biochemistry (Moscow)* 84(11): 1280–1295.
<https://doi.org/10.1134/S0006297919110063>
30. Shiyan AA, Sidorenko SV, Fedorov D, Klimanova EA, Smolyaninova LV, Kapilevich LV, Grygorczyk R, Orlov SN (2019) Elevation of intracellular Na⁺ contributes to expression of early response genes triggered by endothelial cell shrinkage. *Cell Physiol Biochem* 53(4): 638–647.
<https://doi.org/10.33594/000000162>
31. Smolyaninova LV, Shiyan AA, Kapilevich LV, Lopachev AV, Fedorova TN, Klementieva TS, Moskovtsev AA, Kubatiev AA, Orlov SN (2019) Transcriptomic changes triggered by ouabain in rat cerebellum granule cells: Role of α 3- and α 1-Na⁺,K⁺-ATPase-mediated signaling. *PLoS One* 14(9): e0222767.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0222767>
32. 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 Siber Med* 18(3): 53–61.
<https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-3-53-61>
33. Zakharova AN, Kalinnikova Y, Negodenko ES, Orlova AA, Kapilevich LV (2020) Experimental simulation of cyclic training loads. *Teor Prakt Fizich Kult* 10: 26–27.
34. Clausen T (2013) Quantification of Na, K pumps and their transport rate in skeletal muscle: Functional significance. *J General Physiol* 142(4): 327–345.
<https://doi.org/10.1085/jgp.201310980>
35. Raue U, Trappe TA, Estrem ST, Qian H-R, Helvering LM, Smith RC, Trappe S (2012) Transcriptomic 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>
36. McKenna MJ, Bangsbo J, Renaud JM (2008) Muscle K⁺, Na⁺, and Cl⁻ disturbances and Na⁺-K⁺ pump inactivation: implications for fatigue. *J Appl Phys* 104: 288–295.
<https://doi.org/10.1152/jappphysiol.01037.2007>
37. 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 [Ca²⁺]_i-independent excitation-transcription coupling. *PLoS One* 7: e38032.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038032>

**Influence of Forced Running Loads on the Content
of Na⁺/K⁺-ATPase Isoforms and Monovalent Cations in Skeletal Muscles
of Mice with a Model of Type II Diabetes Mellitus**

**A. N. Zakharova^a, K. G. Milovanova^a, A. A. Orlova^a, E. Yu. Dyakova^a, Yu. G. Kalinnikova^a,
O. V. Kollantay^a, I. Yu. Shuvalov^a, A. V. Chibalin^a, and L. V. Kapilevich^a, ***

^aNational Research Tomsk State University, Tomsk, Russia

*e-mail: kapil@yandex.ru

The effect of forced running for 1 hour daily for 4 weeks on the content of Na⁺/K⁺-ATPase isoforms and monovalent cations in the skeletal muscles of mice with a model of type II diabetes mellitus (DM-II) was studied. To form a model of the disease, a high-fat diet was used, and physical activity in the form of forced running was carried out for 4 weeks. The content of Na⁺/K⁺-ATPase isoforms and Na⁺ and K⁺ ions in muscle tissue of

m. gastrocnemius was determined by Western blotting and atomic absorption spectrophotometry, respectively. It has been shown that the formation of DM-II in mice is accompanied by changes in the content of Na⁺/K⁺-ATPase alpha 1 and 2 isoforms in muscle tissue. The effect of forced running loads on the content of Na⁺/K⁺-ATPase in muscle tissue is significant and primarily differs in age groups. One can also note a certain dependence of the influence of forced running loads on the content of this enzyme on the time of their use. In young animals, changes in the concentrations of monovalent sodium and potassium cations after forced running loads were less pronounced. In aged mice, against the background of forced loads, an increase in the content of sodium and decrease in the content of potassium in muscle tissue was observed. The detected changes in monovalent cations content in the muscle tissue of mice with diabetes mellitus II under the influence of forced running loads may play a role in the implementation of the metabolic effects of physical activity.

Keywords: monovalent cations, Na⁺/K⁺-ATPase, muscles, running load, diabetes mellitus