

На правах рукописи

Исаева Мария Олеговна

**Механизмы влияния янтарной кислоты на процесс
дифференцировки клеток линии C2C12**

1.5.4. Биохимия

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Рязань – 2024

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Рязанский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель:

доктор медицинских наук, доцент
Абаленихина Юлия Владимировна

Официальные оппоненты:

Брындина Ирина Георгиевна, доктор медицинских наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Ижевская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации, заведующий кафедрой патологической физиологии и иммунологии

Немировская Татьяна Леонидовна, доктор биологических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Государственный научный центр Российской Федерации Институт медико-биологических проблем Российской академии наук, ведущий научный сотрудник

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук

Защита состоится «__» _____ 2025 г. в ___ на заседании диссертационного совета 21.2.060.02, созданного на базе ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России по адресу: 390026 г. Рязань, ул. Высоковольтная, д. 9

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России (390026, г. Рязань, ул. Шевченко, д. 34, корп. 2) и на сайте www.rzgmu.ru

Автореферат разослан «_____» _____ 20__ г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат медицинских наук, доцент

Короткова Н.В.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования

Скелетная мышечная ткань обладает способностью регенерировать в ответ на действия внешних и внутренних повреждающих факторов. Восстановление миоволокон происходит за счет активации клеток–сателлитов, располагающихся между базальной мембраной и сарколеммой (Zammit P.S. et al., 2006). Миогенез – сложный процесс эмбрионального и постэмбрионального образования мышечной ткани, включающий в себя несколько стадий: пролиферация, дифференцировка и формирование миотрубочек с созреванием в миоволокна (Индейкин Ф.А. и др., 2018, Brooks N.E. et al., 2014).

Одними из главных факторов, участвующих в развитии и восстановлении мышечной ткани являются факторы семейства миогенных регуляторных факторов (MRF, *англ.: myogenic regulation factors*), которые включают в себя белок детерминации миобластов 1 (MyoD, *англ.: Myogenic determination protein 1*), миогенный фактор 5 (Myf5, *англ.: myogenic factor 5*), геркулин (MRF4, *англ.: herculin*) и миогенин (MyoG; *англ.: myogenin*). Согласно литературным данным MyoD экспрессируется на раннем этапе миогенеза, что указывает на его участие в дифференцировке миобластов (Ludolph D.C. et al., 1995, Tapscott S.J. et al., 1991). Экспрессия Myf5 идет в миосателлитах, следовательно, данный фактор регулирует пролиферацию миобластов (Ancel S. et al., 2024). MRF4 экспрессируется в зрелом миоволокне, контролируя рост мышечной ткани (Engquist E.N. et al., 2021). А экспрессия MyoG происходит на позднем этапе, данный фактор регулирует терминальную дифференцировку и формирование миотрубочек (Ganassi M. et al., 2018).

Янтарная кислота – метаболит цикла трикарбоновых кислот, а также источник протонов водорода для II комплекса дыхательной цепи (сукцинатдегидрогеназы). В настоящее время имеются свидетельства того, что метаболиты цикла Кребса играют важную роль и за пределами цикла. Так, янтарная кислота является внеклеточным лигандом, сопряженного с G-белком рецептора, известного как рецептор сукцината 1 (SUCNR1, GPR91, *англ.*

Succinate receptor 1), который экспрессирован в почках, печени, сердце, клетках сетчатки и, вероятно, во многих других тканях (Fonseca M. de C. et al., 2017, Maevsky E.I. et al., 2020). Кроме этого, показано, что янтарная кислота проявляет свое действие через HIF-1 α (Tannahill G.M. et al., 2013), что может иметь особенное значение при гипоксии мышечной ткани.

В настоящее время появляются работы, демонстрирующие участие янтарной кислоты в регуляции ремоделирования мышц в ответ на физическую нагрузку (Messner F. et al., 2021, Reddy A. et al., 2020), при этом подчеркивается роль сукцинатных рецепторов в этом процессе (Abdelmoez A.M. et al., 2023). В условиях функциональной разгрузки отмечается взаимосвязь сфингомиелиназного пути образования церамида и продукции АФК в скелетной мышце (Протопопов В.А. и др., 2024). Предлагается гипотеза о механизме регуляции активности SERCA и IP3-рецепторов при функциональной разгрузке мышц и их вкладе в избыточное накопление ионов кальция в миоплазме в данных условиях (Немировская Т.Л. и др., 2022). Тем не менее вопрос изучения механизмов молекулярного воздействия янтарной кислоты на миогенез мышечных клеток требует дальнейшего изучения. Янтарная кислота входит в состав различных биологически активных добавок и лекарственных средств. Одним из таких примеров является этилметилгидроксипиридина сукцинат, который используется как антиоксидантное и нейропротекторное средство, улучшает метаболизм и кровоснабжение мозга, стабилизирует клеточные мембраны (Воронина Т.А., 2020).

Таким образом, механизмы воздействия янтарной кислоты на миогенез клеток линии C2C12 на данный момент не изучались, поэтому заявленная тема диссертационного исследования является актуальной. Полученные результаты работы по механизмам регуляции миогенеза, в том числе транскрипционным факторам, участвующим в данном процессе, могут быть использованы в качестве инструмента запуска регенерации скелетной мышечной ткани в клетках линии C2C12. Определение ключевой роли SUCNR1 в биохимическом механизме действия янтарной кислоты, позволит рассматривать их в качестве

фармакологической мишени, что дополнит представления о возможностях терапевтического применения янтарной кислоты для улучшения функций и восстановления мышечной ткани.

Степень разработанности проблемы

Иммортализованная клеточная линия мышечных миоцитов C2C12 активно применяется в качестве экспериментальных моделей ряда патологий *in vitro*: старения, сахарного диабета, ожирения, гиперлипидемии, роста мышц, стеатоза печени и нарушения роста (Favreau C. et al., 2008, Fanzani A. et al., 2007, Wong C.Y. et al., 2020). Из-за наличия биохимических особенностей, характерных мышечных белков клеточная линия C2C12 часто используется в биомедицинских исследованиях для изучения метаболизма и дифференцировки скелетных мышц (Burattini S. et al., 2004, Ferri P. et al., 2009). Янтарная кислота является важным метаболитом цикла Кребса, который оказывает энергетическое и регуляторное действие, именно поэтому разрабатываются лекарственные препараты на ее основе.

В настоящее время продемонстрировано, что введение янтарной кислоты в рацион повышает выносливость, стимулирует синтез МУН I, активирует аэробные ферменты, увеличивает потребление кислорода и способствует образованию митохондрий в скелетных мышцах мышей. Однако сукцинат также подавляет активность лактатдегидрогеназы, уменьшает производство лактата и влияет на снижение экспрессии МУН IIb (Wang T. et al., 2019). Добавление диметилсукцината (аналог янтарной кислоты) в концентрации 8 мМ и сроком 48 часов к клеткам C2C12 вызывает снижение синтеза белка в миоцитах, угнетение MyoD, MyoG, МУН I и дальнейшее нарушение формирования многоядерных структур (Arneson-Wissink P.C. et al., 2020).

На базе ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России на протяжении нескольких лет разными научными группами ведутся исследования, посвященные миогенезу, функциям янтарной кислоты и этилметилгидроксипиридина сукцината. В лаборатории клеточных технологий Центральной научно-исследовательской лаборатории ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России

осуществлялось культивирование клеточной линии C2C12 (Бувев Д.О. и др., 2018, Емелин А.М. и др., 2019). На кафедре фармакологии проводятся исследования по изучению антиоксидантного и антигипоксанта действия этилметилгидроксипиридина сукцината (Якушева Е.Н. и др., 2018), также на кафедре биологической химии выполнялись работы, посвященные корректирующему действию сукцината в условиях гипоксии (Марсянова Ю.А. и др., 2021).

Янтарная кислота, выступая в качестве сигнальной молекулы, может реализовывать свои эффекты через SUCNR1 в мышечной ткани (Abdelmoez A.M. et al., 2023, Partridge T.A. et al., 1978). Стоит отметить, что острое воздействие янтарной кислоты увеличивает окислительное фосфорилирование и взрывную силу скелетных мышц по SUCNR1-зависимому пути (Xu G. et al., 2022).

На данный момент показано, что изменение условий среды влияет на миогенез клеток C2C12. Следовательно, необходимо охарактеризовать этапы миогенеза мышечных клеток C2C12 в стандартных условиях культивирования, чтобы избежать получения недостоверных данных при планировании экспериментов. Доказано, что в клетке активируется экспрессия более 30 генов мышечных белков, среди которых – тяжелые и легкие цепи миозина, α -актин, тропонины, десмин и др. (Legerlotz K. et al., 2008). Несмотря на имеющиеся научные данные, точные механизмы воздействия янтарной кислоты на миогенез и участие в нем сукцинатных рецепторов не описаны.

Цель исследования

Изучить механизмы действия янтарной кислоты на процесс дифференцировки клеток линии C2C12 и определить роль сукцинатных рецепторов (SUCNR1) в данном процессе.

Задачи исследования

1. Оценить влияние экзогенной янтарной кислоты на процесс дифференцировки клеток линии C2C12.

2. Проанализировать влияние лекарственного средства, содержащего янтарную кислоту – этилметилгидроксипиридина сукцината, на процесс

дифференцировки клеток линии C2C12.

3. Изучить участие SUCNR1, HIF-1 α и PXR в процессе дифференцировки клеток линии C2C12 под действием янтарной кислоты и этилметилгидроксипиридина сукцината.

4. Оценить внутриклеточную концентрацию сукцината при экзогенном воздействии янтарной кислоты.

5. Выявить механизм влияния янтарной кислоты и этилметилгидроксипиридина сукцината через SUCNR1 посредством G α i-белка.

Научная новизна

В ходе выполнения работы на клетках линии C2C12 *in vitro* впервые:

1. Показана роль янтарной кислоты в процессе миогенеза клеточной линии C2C12: повышение уровня специфических белков мышечной ткани – α -актина, MYH; транскрипционных факторов – MyoD, MyoG; индекса миогенеза; снижение относительного количества сукцинатных рецепторов (SUCNR1) и ускоренное превращение миобластов в миотубулы;

2. Установлено, что механизм воздействия янтарной кислоты на SUCNR1 реализуется посредством G α i-белка;

3. Выявлено, что HIF-1 α и PXR не принимают участия в процессе миогенной дифференцировки клеточной линии C2C12 при воздействии янтарной кислоты;

4. Доказано стимулирующее действие этилметилгидроксипиридина сукцината на миогенез клеточной линии C2C12, реализующиеся через SUCNR1 – G α i – сигнальный путь, предположительно за счет молекулы янтарной кислоты, входящей в его состав.

Теоретическая и практическая значимость работы

Исследование влияния янтарной кислоты на мышечную ткань представляет собой важный вклад в понимание биохимических и физиологических процессов, происходящих в организме. Работа помогает раскрыть новые биохимические пути и молекулярные механизмы, через которые янтарная кислота влияет на функциональное состояние мышечной ткани,

включая процессы регенерации, роста и восстановления.

При дальнейшем проведении дополнительных исследований полученные результаты работы могут быть использованы для создания новых препаратов и методов лечения заболеваний, связанных с нарушениями функций мышечной ткани, таких как миопатии, саркопения, а также при реабилитации после травм. Янтарная кислота может быть интегрирована в программы спортивного питания и восстановления, что позволит улучшить результаты тренировок, ускорить восстановление мышц после нагрузок и повысить общую спортивную продуктивность. Этилметилгидроксипиридина сукцинат уже применяется для лечения заболеваний, связанных с неврологическими и сердечно-сосудистыми патологиями. За счет того, что препарат стимулирует миогенез, открываются новые перспективы его применения в терапии мышечных заболеваний, таких как мышечные дистрофии, миозиты, травмы и возрастная атрофия мышц. Изучение в клинической практике позволит использовать этилметилгидроксипиридина сукцинат для реабилитационных программ, направленных на восстановление двигательной активности и мышечной силы у пациентов с неврологическими и сердечно-сосудистыми заболеваниями.

Результаты заявленного исследования демонстрируют возможное использование клеточной линии C2C12 *in vitro* в качестве экспериментальной модели мышечных патологий, а SUCNR1 можно рассматривать как терапевтическую мишень для действия янтарной кислоты и стимуляции миогенеза.

Методология и методы исследования

Исследование проведено на клетках линии C2C12. Клетки культивировали в 96-луночных и 6-луночных планшетах при 37°C и 5% содержании CO₂ в инкубаторе WS-189C (World Science, Корея) в Дульбекко модифицированной среде Игла (DMEM) с высоким содержанием глюкозы (4500 мг/л), с добавлением L-глутамин (4 мМ), 10% эмбриональной бычьей сыворотки, 100 ЕД/мл и 100 мкг/мл пенициллина и стрептомицина соответственно (все компоненты Sigma-Aldrich, США). Для стимуляции дифференцировки использовали 2% лошадиную

сыворотку (Sigma-Aldrich, США) (Yaffe D. et al., 1977).

В ходе работы были выполнены следующие серии экспериментов: изучение характерных этапов миогенеза клеток C2C12; исследование действия янтарной кислоты на этапы миогенеза клеточной линии C2C12 в концентрациях 1, 10, 100 и 1000 мкМ на раннем, среднем и позднем этапах миогенеза (1, 4, 7 дни дифференцировки); исследование действия этилметилгидроксипиридина сукцината на этапы миогенеза клеточной линии C2C12 в концентрациях 10, 100 и 1000 мкМ на раннем, среднем и позднем этапах миогенеза (1, 4, 7 дни дифференцировки); изучение механизма влияния янтарной кислоты и этилметилгидроксипиридина сукцината на миогенез (через HIF-1 α , PXR, SUCNR1).

Механизм действия янтарной кислоты и этилметилгидроксипиридина сукцината через SUCNR1 оценивали с помощью экспериментов с ингибитором SUCNR1 - Pertussis Toxin (Cayman Chemical Company, США). Индекс миогенеза и его изменения при добавлении янтарной кислоты и этилметилгидроксипиридина сукцината оценивали микроскопическим методом с добавлением раствора Романовского-Гимзе для окрашивания ядер. Цитотоксичность янтарной кислоты, этилметилгидроксипиридина сукцината, Pertussis Toxin оценивали по результатам МТТ-теста. Концентрации сукцината внутри клетки определяли методом ВЭЖХ МС/МС.

Относительное количество транскрипционных факторов MyoD, MyoG, HIF-1 α , PXR, SUCNR1 и мышечных специфических белков α -актина и тяжелых цепей миозина (MYH) оценивали методом вестерн-блот. Активность SUCNR1 определяли по концентрации инозитол-3-фосфата в цитоплазме клеток методом ВЭЖХ МС/МС. Полученные результаты обрабатывали статистическими методами.

Положения, выносимые на защиту

1. Янтарная кислота в концентрациях 10, 100 и 1000 мкМ ускоряет процесс миогенной дифференцировки клеток C2C12, стимулируя увеличение индекса миогенеза и повышение уровней MyoD, MyoG, MYH и α -актина.

2. Этилметилгидроксипиридина сукцинат в концентрациях 10, 100, 1000 мкМ стимулирует миогенную дифференцировку клеточной линии C2C12 за счет сукцината, о чем свидетельствуют морфологические изменения клеток и повышение уровня специфических мышечных белков α -актина, MYH и факторов миогенной дифференцировки – MyoD и миогенина.

3. Транскрипционные факторы HIF-1 α и PXR не участвуют в регуляции миогенеза клеток C2C12 янтарной кислотой в концентрациях 10, 100, 1000 мкМ и ЭМГПС в концентрациях 10, 100, 1000 мкМ.

4. Экзогенное воздействие янтарной кислоты не вызывает повышение внутриклеточной концентрации сукцината и увеличивает уровень инозитолмонофосфата.

5. Янтарная кислота и этилметилгидроксипиридина сукцинат стимулируют процесс миогенной дифференцировки в клетках миобластов C2C12, действуя через SUCNR1-G α i – сигнальный путь.

Степень достоверности и апробация результатов

Полученные результаты обладают достоверностью благодаря обширному объёму экспериментальных данных, собранных с применением высокотехнологичного оборудования и адекватных методов исследования, а также их систематизации и статистической обработке. Ключевые положения диссертации были изложены, обсуждены и включены в материалы конференций: VII Всероссийской научной конференции молодых специалистов, аспирантов, ординаторов. «Инновационные технологии в медицине: взгляд молодого специалиста» (Рязань, 2021); V Национального конгресса по регенеративной медицине (Москва, 2022); Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Биохимические научные чтения памяти академика РАН Е.А. Строева» (Рязань, 2022); VIII Всероссийской научной конференции молодых специалистов, аспирантов, ординаторов. «Инновационные технологии в медицине: взгляд молодого специалиста» (Рязань, 2022); научно-практической конференции «Наука и здоровье» посвященной 80-летию юбилею профессора, д.м.н., члена-корреспондента академии медицинских наук РК Каражановой Л.

К. (Семей, 2023); IV Всероссийской конференции студентов и молодых ученых с международным участием, посвященной 80-летию РязГМУ «Естественнонаучные основы медико-биологических знаний» (Рязань, 2023); XXIV Съезда физиологического общества им. И. П. Павлова. (Санкт-Петербург, 2023), 2-й Всероссийской научной конференции молодых ученых, посвященной 100-летию со дня рождения профессора А.А. Никулина и 80-летию Рязанского государственного медицинского университета имени академика И.П. Павлова «Достижения современной фармакологической науки» (Рязань, 2023); IX Всероссийской научной конференции молодых специалистов, аспирантов, ординаторов. «Инновационные технологии в медицине: взгляд молодого специалиста» (Рязань, 2023); Международного медицинского форума «Вузовская наука. Инновации» (Москва, 2024); III Международной научно-практической конференции «Клеточные технологии в экспериментальной медицине» (Курск, 2024), Всероссийской научной конференции с международным участием «Биохимия человека 2024» (Москва, 2024); VI Национальный Конгресс по регенеративной медицине (Санкт-Петербург, 2024).

Исследование выполнено при финансовой поддержке внутривузовского гранта молодых ученых Рязанского государственного медицинского университета им. акад. И.П. Павлова на 2023 (Договор № 3/23).

Внедрение результатов исследования в практику

Ключевые результаты диссертации успешно интегрированы и применяются в учебном процессе на кафедре биологической химии ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России и кафедре гистологии, цитологии и эмбриологии ФГБОУ ВО ЯГМУ Минздрава России, а также в научно-исследовательской деятельности ЦНИЛ ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России.

Личный вклад автора

Автор самостоятельно составил обзор литературы по рассматриваемой проблеме, разработал программу исследования, выполнил эксперименты *in vitro*, биохимические исследования, а также обработал и интерпретировал полученные данные, подготовив публикации по материалам диссертации. Вклад автора в

проведенное исследование составляет более 90%.

Сведения о публикациях по теме диссертации

По материалам диссертации опубликовано 14 печатных работ, полно отражающих основные положения диссертации, в том числе 4 статьи в журналах перечня ВАК при Минобрнауки России, из которых 3 публикации в журналах, входящих в цитатно-аналитическую базу данных Scopus, получено 2 патента РФ на изобретение.

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа изложена на 165 страницах и включает в себя следующие разделы: введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты исследования, обсуждение, выводы, практические рекомендации, перспективы дальнейшей разработки темы, список сокращений, список литературы. Диссертация иллюстрирована 72 рисунками и 18 таблицами. Список литературы представлен 199 источниками, из них 26 отечественных и 173 зарубежных авторов.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Исследование выполнялось на клеточной линии иммортализованных миобластов мышцы (C2C12), предоставленной ФГБУН ИБГ РАН, г. Москва. Клетки культивировали при 37°C и 5% содержании CO₂ в инкубаторе WS-189C (World Science, Корея) в среде Игла, модифицированной Дульбекко (DMEM), с высоким содержанием глюкозы (4500 мг/л), содержащей L-глутамин (4 мМ), 10% эмбриональной бычьей сыворотки, 100 ЕД/мл и 100 мкг/мл пенициллина и стрептомицина (все компоненты Sigma-Aldrich, США) соответственно. После достижения 70–90% конfluenceности клетки снимали с флакона добавлением раствора трипсин-ЭДТА (0,25% трипсина и 0,2% ЭДТА, Sigma-Aldrich, США), высевали в 6-луночные планшеты (Corning, США). После формирования монослоя инициировалась миогенная дифференцировка путем перевода клеток на дифференцировочную среду, содержащую 2% лошадиной сыворотки (Sigma-Aldrich, США).

Визуализацию клеток выполняли с помощью инвертированного микроскопа Olympus CKX-53 (Olympus, Япония) с цифровой цветной камерой (CCD 5 МПикс) на персональном компьютере DeltaPix InSight. Индекс миогенеза представляет собой долю ядер, находящихся в миотрубках, содержащих два или более ядра по отношению к общему количеству ядер (Емелин А. М. и др., 2019; Sestili P. et al, 2009). Оценку изображений осуществляли с помощью медицинской программы для анализа и обработки цифровых изображений ImageJ (США).

Относительное количество α -актина, MYH, MyoD, MyoG, PXR, HIF-1 α , SUCNR1, GAPDH оценивали методом вестерн-блот. Концентрации сукцината и инозитолмонофосфата в клеточном лизате анализировали с помощью ВЭЖХ-МС/МС (жидкостный хроматограф Ultimate 3000 и тройной квадрупольный масс-спектрометр TSQ Fortis, Thermo Fisher Scientific, США).

Экспериментальные группы и серии

Для каждой группы экспериментов было выполнено по 3 повторения.

I. Первая серия – изучение характерных этапов миогенеза клеток C2C12:

Первая группа – клетки до дифференцировки – инкубация 7 дней с питательной средой, содержащей 10% эмбриональной бычьей сыворотки;

Вторая группа – анализ изменений морфологии клеток и индекса миогенеза на раннем, среднем и позднем этапах миогенеза (1, 4, 7 дней дифференцировки соответственно);

Третья группа – оценка относительного количества специфических белков скелетной мышечной ткани (α -актина, MYH), транскрипционных факторов - MyoD, MyoG и сукцинатных рецепторов (SUCNR1) на 1, 4, 7 дни дифференцировки;

II. Вторая серия – исследование действия янтарной кислоты на этапы миогенеза клеточной линии C2C12:

Первая группа – изучение цитотоксического действия янтарной кислоты в концентрациях 1, 10, 100, 1000 мкМ на клетки линии C2C12;

Вторая группа – оценка изменения морфологии клеток и индекса

миогенеза при воздействии янтарной кислоты в концентрациях 1, 10, 100, 1000 мкМ на 1, 4, 7 дни дифференцировки;

Третья группа – определение относительного количества специфических белков скелетной мышечной ткани (α -актина, MYH) и транскрипционных факторов - MyoD, MyoG при воздействии янтарной кислоты в концентрациях 10, 100 и 1000 мкМ на 1, 4, 7 дни дифференцировки;

Четвертая группа – определение относительного количества транскрипционных факторов HIF-1 α , PXR при воздействии янтарной кислоты в концентрации 10 мкМ в течение 7 дней дифференцировки;

Пятая группа – определение относительного количества SUCNR1 при воздействии янтарной кислоты в концентрациях 10, 100 и 1000 мкМ в течение 1, 4, 7 дней дифференцировки;

Шестая группа – определение концентрации сукцината внутри клеток при воздействии янтарной кислоты в концентрациях 10, 100, 1000 мкМ;

III. Третья серия – исследование действия ЭМГПС на этапы миогенеза клеточной линии C2C12:

Первая группа – изучение цитотоксического действия ЭМГПС в концентрациях 10, 100, 1000 мкМ на клетки линии C2C12 - концентрацию ЭМГПС выбирали на основе концентраций янтарной кислоты, чтобы клетки подвергались воздействию эквимольного количества янтарной кислоты, входящего в состав лекарственного вещества;

Вторая группа – оценка изменения морфологии клеток и индекса миогенеза при воздействии ЭМГПС в концентрациях 10, 100, 1000 мкМ в течение 1, 4, 7 дней дифференцировки;

Третья группа – определение относительного количества специфических белков скелетной мышечной ткани (α -актина, MYH) и транскрипционных факторов - MyoD, MyoG при воздействии ЭМГПС в концентрациях 10, 100, 1000 мкМ в течение 1, 4, 7 дней дифференцировки;

Четвертая группа – определение относительного количества транскрипционных факторов HIF-1 α , PXR при воздействии ЭМГПС в

концентрации 10 мкМ в течение 7 дней дифференцировки;

Пятая группа – определение относительного количества SUCNR1 при воздействии ЭМГПС в концентрациях 10, 100 и 1000 мкМ в течение 1, 4, 7 дней дифференцировки;

IV. Четвертая серия – изучение механизмов влияния янтарной кислоты и ЭМГПС на миогенез через SUCNR1:

Первая группа – определение цитотоксического действия Pertussis toxin (ингибитор SUCNR1-Gαi сигнального пути) в концентрации 100 нг/мл на клетки линии C2C12;

Вторая группа – оценка изменения морфологии клеток и индекса миогенеза при самостоятельном действии Pertussis toxin в концентрации 100 нг/мл и в сочетании с янтарной кислотой или ЭМГПС в концентрациях 10, 100, 1000 мкМ в течение 1, 4, 7 дней дифференцировки;

Третья группа – определение относительного количества специфических белков скелетной мышечной ткани (α-актина, MYH), транскрипционных факторов - MyoD, MyoG и SUCNR1 при самостоятельном действии Pertussis toxin в концентрации 100 нг/мл и в сочетании с янтарной кислотой или ЭМГПС в концентрациях 10, 100, 1000 мкМ в течение 1, 4, 7 дней дифференцировки;

Четвертая группа – изучение самостоятельного действия янтарной кислоты в концентрации 100 мкМ на миобласты в недифференцировочной среде в течение 7 дней дифференцировки;

Пятая группа – оценка влияния Pertussis toxin на концентрацию инозитолмонофосфата в клетках C2C12 при стимуляции миогенной дифференцировки янтарной кислотой в концентрации 100 мкМ.

Статистический анализ данных проводили с помощью программ «Statsoft Statistica 13.0», Microsoft Excel 2016 и GraphPad Prism 10. Статистическую значимость различий оценивали дисперсионным анализом (ANOVA), множественные сравнения с контролем выполняли с помощью теста Даннетта. Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$.

Условные обозначения представлены в виде: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$; **** – $p < 0,0001$ статистически значимые отличия от показателей контроля. Данные в таблицах и графиках представлены в виде среднего арифметического (M) и стандартного отклонения ($\pm SD$) при нормальном распределении данных.

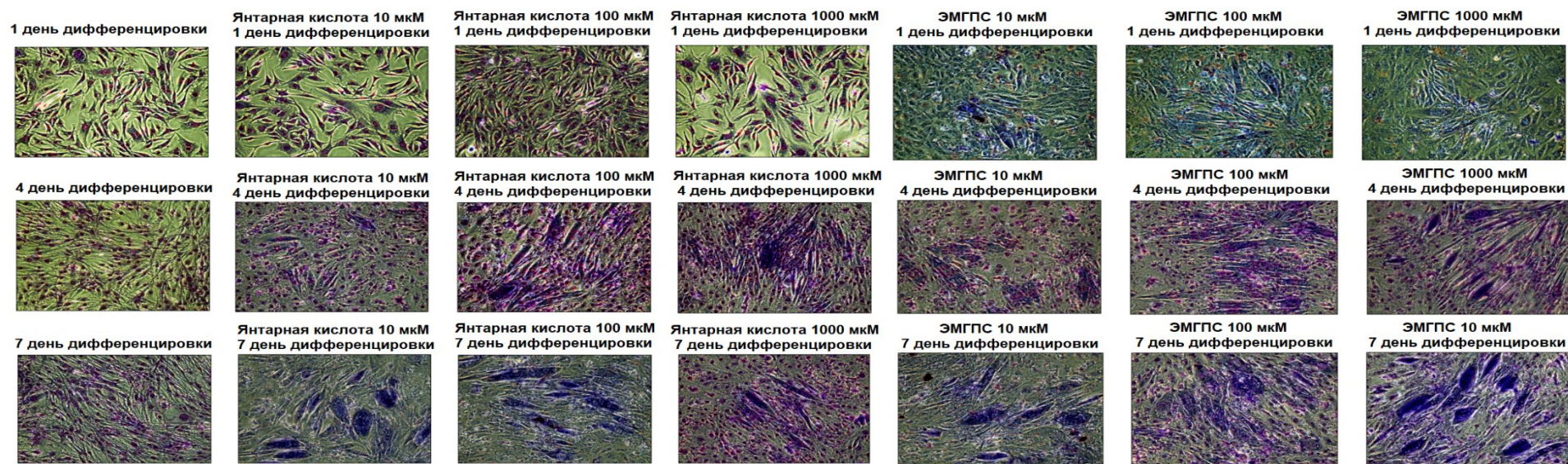
Результаты исследования и их обсуждение

В исследовании было получено, что на 1 день дифференцировки клеток C2C12 в дифференцировочной питательной среде наблюдалось увеличение количества MyoD, на 4 день дифференцировки – MyoD и α -актина, 7 день дифференцировки – MyoG и MYH. Таким образом, индукция MyoD происходит на раннем и среднем этапах миогенеза, α -актин – на среднем этапе, а индукция MyoG и MYH происходит на позднем этапе.

В ходе настоящего исследования было установлено, что янтарная кислота в концентрации 1 мкМ не оказывает дифференцировочного воздействия, а в концентрациях 10, 100 и 1000 мкМ стимулирует миогенную дифференцировку клеток линии C2C12, что проявляется увеличением индекса миогенеза, морфологическими изменениями (Рисунок 1, Таблица 1) и повышением уровня маркерных белков α -актина, MYH и факторов миогенной дифференцировки – MyoD и MyoG (Рисунок 2).

Нами было показано, что в ходе миогенной дифференцировки концентрация сукцината в клетках прогрессивно падает, достигая минимального уровня к 7 дню эксперимента, а добавление янтарной кислоты во всех концентрациях не только не приводит к повышению внутриклеточного уровня сукцината, а наоборот, ускоряет процесс снижения его содержания (Рисунок 3).

Полученные результаты свидетельствуют о том, что янтарная кислота, видимо, быстро метаболизируется и эффект стимуляции миогенеза реализуется не через влияние на метаболизм клеток и дыхательную цепь. Таким образом, янтарная кислота принимает участие в процессе дифференцировки миобластов не как энергетический субстрат, а как сигнальная молекула.



Масштабная линейка: 100 мкм

17 Рисунок 1 – Клеточная линия C2C12 до дифференцировки, 1, 4 и 7 дни дифференцировки, при воздействии янтарной кислоты и ЭМГПС в концентрациях 10, 100, 1000 мкМ
Примечание - Фазово-контрастная микроскопия, увеличение $\times 200$

Таблица 1 – Индекс миогенеза в клетках C2C12 при воздействии тестируемых веществ на 1,4,7 дни дифференцировки

| | Дни дифференцировки | Дифференцировочная среда | Янтарная кислота 10 мкМ | Янтарная кислота 100 мкМ | Янтарная кислота 1000 мкМ | Янтарная кислота 10 мкМ + РТ 100 нг/мл | Янтарная кислота 100 мкМ + РТ 100 нг/мл | Янтарная кислота 1000 мкМ + РТ 100 нг/мл |
|------------------|---------------------|--------------------------|-------------------------|--------------------------|---------------------------|--|---|--|
| Индекс миогенеза | 1 день | 0,15± 0,05 | 0,58±0,04**** | 0,78±0,02**** | 0,82±0,03**** | 0,23± 0,03* | 0,47±0,05**** | 0,51±0,05**** |
| | 4 день | 0,44±0,14 | 0,60±0,06**** | 0,85±0,02**** | 0,75±0,03**** | 0,55± 0,07* | 0,64±0,05**** | 0,73±0,05**** |
| | 7 день | 0,77±0,04 | 0,88±0,04*** | 0,93±0,01**** | 0,89±0,04* | 0,40± 0,02**** | 0,66±0,07 | 0,71±0,08* |
| | Дни дифференцировки | РТ 100 нг/мл | ЭМГПС 10 мкМ | ЭМГПС 100 мкМ | ЭМГПС 1000 мкМ | ЭМГПС 10 мкМ + РТ 100 нг/мл | ЭМГПС 100 мкМ + РТ 100 нг/мл | ЭМГПС 1000 мкМ + РТ 100 нг/мл |
| Индекс миогенеза | 1 день | 0,13±0,04 | 0,59±0,06**** | 0,78±0,01**** | 0,77±0,03**** | 0,64±0,03* | 0,62±0,04**** | 0,78±0,02**** |
| | 4 день | 0,16±0,04**** | 0,61±0,06* | 0,80±0,05**** | 0,84±0,05**** | 0,68±0,05**** | 0,70±0,04**** | 0,75±0,06**** |
| | 7 день | 0,23±0,06**** | 0,88±0,05** | 0,87±0,02** | 0,86±0,04*** | 0,66±0,03* | 0,74±0,03** | 0,64±0,05**** |

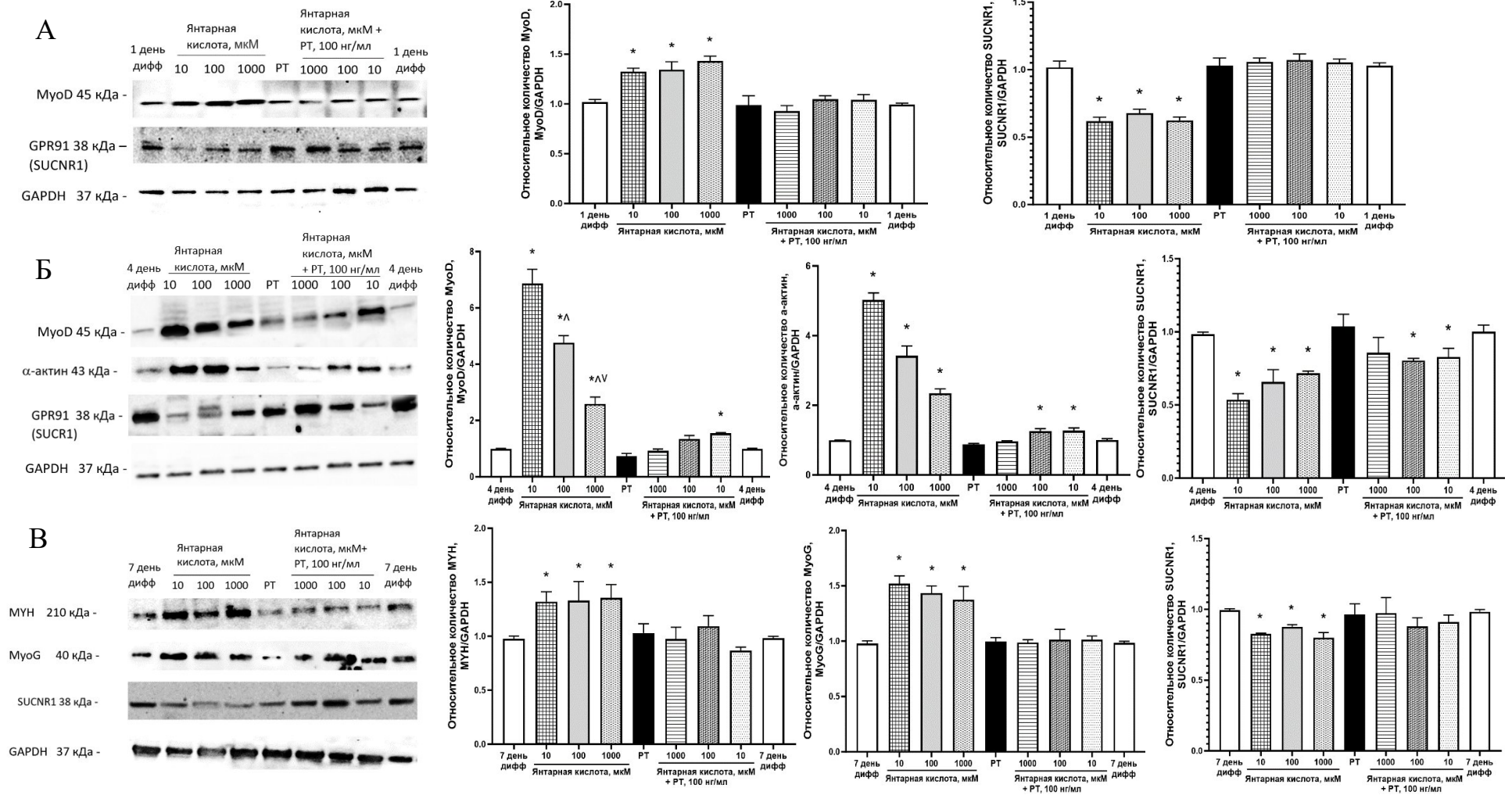


Рисунок 2 – Относительное количество MyoD, MyoG, MYH, α -актина, SUCNR1 в клетках линии C2C12 при самостоятельном действии янтарной кислоты в концентрациях 10, 100, 1000 мкМ и при её совместном воздействии с Pertussis toxin 100 нг/мл в течение 1 (А), 4 (Б), 7 (В) дней дифференцировки

Примечание - статистически значимые различия: * – относительно соответствующего дня дифференцировки, $p \leq 0,05$; ^ - относительно янтарной кислоты (10 мкМ), $p \leq 0,05$; v - относительно янтарной кислоты (100 мкМ), $p \leq 0,05$

В ходе нашего исследования было показано, что янтарная кислота не оказывает влияния на содержание HIF-1 α и PXR, возможно, эффект янтарной кислоты может реализоваться через SUCNR1. При воздействии янтарной кислоты количество SUCNR1 снижается в большей степени, чем при культивировании в дифференцировочной среде (без янтарной кислоты).

Для оценки роли SUCNR1-G α i сигнального пути в стимуляции миогенеза под действием янтарной кислоты применяли специфический ингибитор G α i-белка – коклюшный токсин (РТ, англ. pertussis toxin). В настоящем исследовании было установлено, что РТ подавляет миогенную дифференцировку, вызванную янтарной кислотой (Таблица 1). Уровень SUCNR1 при воздействии янтарной кислоты в присутствии РТ статистически значимо не отличался от показателей клеток без ее воздействия (в дифференцировочной среде) (Рисунок 2).

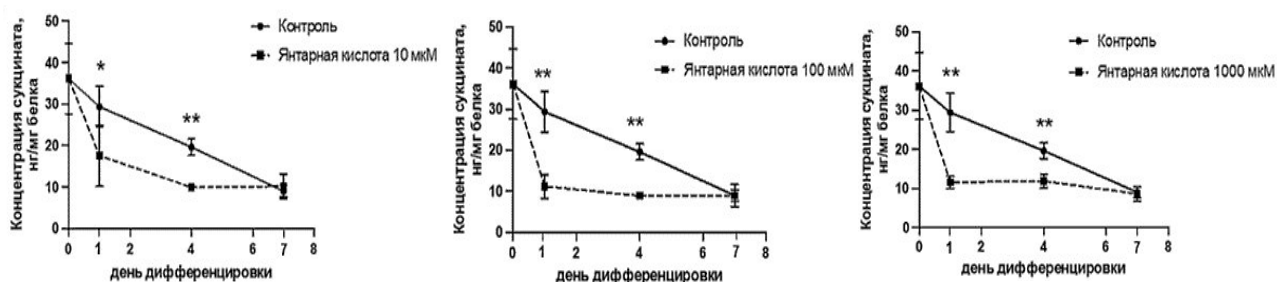
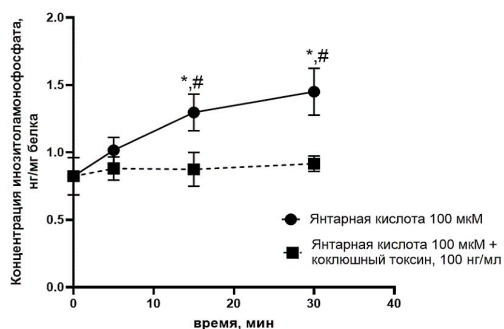


Рисунок 3 – Концентрация сукцината в клетках линии C2C12 в процессе их миогенной дифференцировки при внесении в питательную среду янтарной кислоты в концентрациях 10, 100 и 1000 мкМ

Добавление дифференцировочной питательной среды, содержащей янтарную кислоту, на первый день начала миогенной дифференцировки приводило к постепенному нарастанию уровня инозитолмонофосфата в клетках C2C12. Добавление РТ в дифференцировочную среду вместе с янтарной кислотой препятствовало нарастанию уровня инозитолмонофосфата (Рисунок 4А).

Таким образом, в настоящем исследовании на клетках миобластов C2C12 было установлено, что янтарная кислота запускает и ускоряет процесс миогенной дифференцировки, действуя через SUCNR1-G α i (Рисунок 4Б).

А



Б

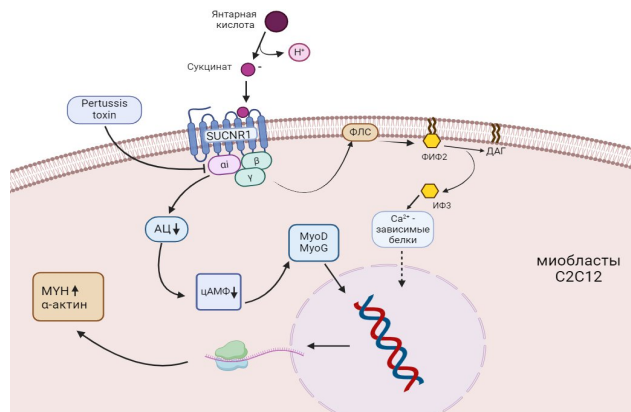


Рисунок 4 – Концентрация инозитолмонофосфата в клетках линии C2C12 в процессе миогенной дифференцировки при самостоятельном воздействии янтарной кислоты (100 мкМ) и совместно с Pertussis toxin в концентрации 100 нг/мл (А). Предполагаемый механизм действия янтарной кислоты на процесс миогенной дифференцировки клеток C2C12 (Б)

Примечание – статистически значимые различия: * - $p < 0,01$ – относительно клеток до внесения сукцината, # - $p < 0,01$ – относительно воздействия янтарной кислоты 100 мкМ + коклюшный токсин (100 нг/мл). АЦ – аденилатциклаза; ФЛС – фосфолипаза С; ФИФ2 – фосфатидилинозитол-1,5-дифосфат; ДАГ – диацилглицерол; ИФ3 – инозитол-3-фосфат; \longrightarrow механизма действия через белок $G\alpha i$; \longrightarrow - механизм действия через белок $G\gamma\beta$; \dashrightarrow механизм действия через Ca^{2+} -зависимые белки

Сукцинатсодержащий препарат ЭМГПС в концентрациях 10, 100, 1000 мкМ ускоряет процесс миогенной дифференцировки миобластов, о чем свидетельствуют морфологические изменения миобластов C2C12, увеличение индекса миогенеза (Рисунок 1, Таблица 1), а также повышение уровня специфических мышечных белков α -актина, МУН и факторов миогенной дифференцировки – MyoD и MyoG (Рисунок 5). При этом достоверных различий между содержанием изучаемых белков и транскрипционных факторов на фоне применения ЭМГПС и янтарной кислоты получено не было, что свидетельствует о том, что ЭМГПС оказывает влияние на миогенез за счет молекулы сукцината, входящей в его состав. РТ нивелировал стимулирующее действие ЭМГПС на дифференцировку клеток мышечной ткани (Рисунок 5, Таблица 1).

Таким образом, ЭМГПС ускоряет миогенную дифференцировку клеток линии C2C12, и эффект реализуется янтарной кислотой через SUCNR1- $G\alpha i$ – сигнальный путь.

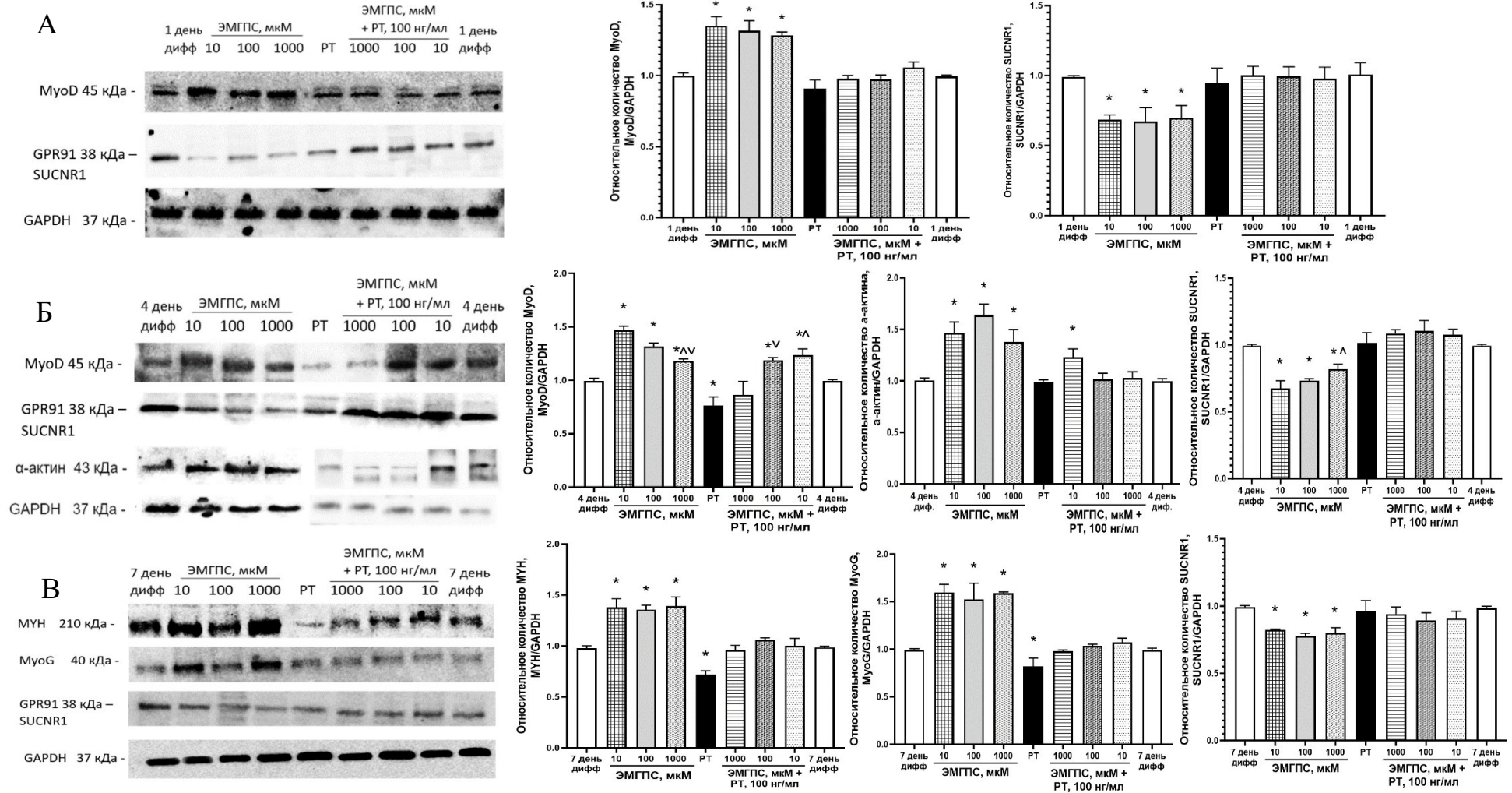


Рисунок 5 – Относительное количество MyoD, MyoG, MYH, α-актина, SUCNR1 в клетках линии C2C12 при самостоятельном действии ЭМГПС в концентрациях 10, 100, 1000 мкМ и при его совместном воздействии с Pertussis toxin 100 нг/мл в течение 1 (А), 4 (Б), 7 (В) дней дифференцировки

Примечание - статистически значимые различия: * - относительно соответствующего дня дифференцировки, $p \leq 0,05$; ^ – относительно ЭМГПС (10 мкМ), $p \leq 0,05$; v – относительно ЭМГПС (100 мкМ), $p \leq 0,05$

ВЫВОДЫ

1. Янтарная кислота в концентрации 1 мкМ не оказывает дифференцировочного воздействия на клетки C2C12. Янтарная кислота в концентрациях 10, 100 и 1000 мкМ стимулирует миогенез в клетках линии C2C12, что проявляется в морфологических изменениях (увеличение длины, ширины миобластов, количества многоядерных структур и ядер в них), повышении индекса миогенеза, относительного количества MyoD и MyoG, α -актина и MYH.

2. Этилметилгидроксипиридина сукцинат в концентрациях 10, 100 и 1000 мкМ дозозависимо ускоряет миогенную дифференцировку клеток линии C2C12, возможно, за счет сукцината, содержащегося в молекуле препарата, повышая уровень MyoD, MyoG, α -актина и MYH.

3. Доказано участие SUCNR1 в процессе миогенеза в клетках C2C12, относительное количество рецепторов снижается при активации процесса миогенеза. HIF-1 α и PXR не вносят вклад в индуцирующее действие янтарной кислоты и этилметилгидроксипиридина сукцината на процесс миогенеза.

4. Концентрация сукцината в цитоплазме клеток C2C12 при экзогенном воздействии янтарной кислоты (10, 100, 1000 мкМ) не изменялась по сравнению с соответствующим этапом дифференцировки, что связано с его регуляторным действием на миогенез, а не с энергетической функцией.

5. Янтарная кислота и этилметилгидроксипиридина сукцинат инициируют и ускоряют процесс миогенной дифференцировки в клетках C2C12 за счет действия сукцината через SUCNR1-G α i – сигнальный путь.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Рекомендуется проведение исследований для анализа целесообразности включения янтарной кислоты в пищевые добавки для спортсменов и людей, активно занимающихся физической культурой, для поддержания мышечной функции и восстановления после тренировки.

2. Рекомендуется изучить возможность включения препаратов янтарной кислоты в лечебные программы для пациентов с метаболическими

нарушениями, влияющими на мышечную функцию, таких как сахарный диабет типа 2 и ожирение.

3. Янтарная кислота может быть изучена в клинических исследованиях для ускорения восстановления мышечной ткани в астеническом периоде после травм или операций и в комплексной терапии для стимуляции регенерации мышц.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки России

1. Mechanism of Stimulation of Myogenesis under the Action of Succinic Acid through the Succinate Receptor SUCNR1 / Yu.V. Abalenikhina, **М.О. Исаева**, P.Yu. Mylnikov [et al.] – Text : visual // **Biochemistry (Moscow)**. – 2024. – Vol. 89, No. 7. – P. 1325-1335.

2. Изменение показателей миогенеза клеточной линии C2C12 при воздействии сукцината *in vitro* / **М.О. Исаева**, Ю.В. Абаленихина, Ф.Т. Гаджиева [и др.] – Текст : непосредственный // **Прикладные информационные аспекты медицины**. – 2024. – Т. 27, № 1. – С. 92-99.

3. Влияние этилметилгидроксипиридина сукцината на миогенез *in vitro* / Ю. В. Абаленихина, **М.О. Порошина**, А.Н. Рябков [и др.] – Текст : непосредственный // **Экспериментальная и клиническая фармакология**. – 2022. – Т. 85, № 6. – С. 14-18.

4. Механизм стимуляции миогенеза под действием этилметилгидроксипиридина сукцината / Ю.В. Абаленихина, **М.О. Исаева**, А.В. Щулькин [и др.] – Текст : непосредственный // **Химико-фармацевтический журнал**. – 2024. – Т. 58, № 6. – С. 10-17.

Статьи в других изданиях

1. Влияние сукцината на количество миозина в клетках линии C2C12 / **М.О. Порошина**, П.Ю. Мыльников, Ю.В. Абаленихина, А.В. Щулькин – Текст : непосредственный // **Инновационные технологии в медицине: взгляд молодого специалиста : Сборник докладов VII Всероссийской научной конференции молодых специалистов, аспирантов, ординаторов**. – Рязань, 2021. – С. 84-85.

2. Влияние сукцината на дифференцировку клеток C2C12 / **М.О. Порошина**, Ю.В. Абаленихина, А.В. Щулькин, Е.Н. Якушева – Текст : непосредственный // **Гены и Клетки**. – 2022. – Т. 17, № 3. – С. 188-189.

3. Динамика изменения уровня мышечных белков на этапах дифференцировки клеток C2C12 / **М.О. Порошина**, Ю.В. Абаленихина, П.Д. Ерохина, А.В. Щулькин – Текст : непосредственный // **Биохимические научные чтения памяти академика РАН Е.А. Строева : Тезисы докладов Всероссийской научно-практической конференции с международным участием**. – Рязань, 2022. – С. 64-66.

4. Влияние сукцината на миогенез (обзор литературы) / **М.О. Исаева**, Ю.В. Абаленихина, А.В. Щулькин, Е.Н. Якушева – Текст : непосредственный // **Инновационные технологии в медицине: взгляд молодого специалиста : Сборник докладов VIII Всероссийской научной конференции молодых специалистов, аспирантов, ординаторов**. – Рязань, 2022. – С. 136-137.

5. Способ культивирования и механизмы регуляции этапов миогенеза клеточной линии C2C12 / **М.О. Исаева**, Ф.Т. Гаджиева, Ю.В. Абаленихина [и др.] – Текст : непосредственный // **Российский медико-биологический вестник имени академика И. П. Павлова**. – 2023. –

Т. 31, № 4. – С. 525-534.

6. Способ культивирования клеток линии С2С12 / **М.О. Исаева**, Ф.Т. Гаджиева, Ю.В. Абаленихина, А.В. Шулькин – Текст : непосредственный // Естественнонаучные основы медико-биологических знаний : Сборник докладов IV Всероссийской конференции студентов и молодых ученых с международным участием, посвященной 80-летию РязГМУ. – Рязань, 2023. – С. 86-88.

7. Участие транскрипционных факторов MyoD и MyoG в дифференцировке клеточной линии С2С12 / **М.О. Исаева**, Ф.Т. Гаджиева, Ю.В. Абаленихина [и др.] – Текст : непосредственный // Сборник тезисов научно-практической конференции «Наука и здоровье» посвященная 80-летию юбилею профессора, д.м.н., члена-корреспондента академии медицинских наук РК Каражановой Л. К. – Семей, 2023. – С.208-210.

8. Участие сукцината в регуляции миогенеза клеток линии С2С12 / **М.О. Исаева**, Ф.Т. Гаджиева, Ю.В. Абаленихина, А.В. Шулькин – Текст : непосредственный // Сборник тезисов XXIV съезда физиологического общества им. И. П. Павлова. – Санкт-Петербург: ООО "Издательство ВВМ", 2023. – С. 247.

9. Влияние этилметилгидроксипиридина сукцината на миогенез клеточной линии С2С12 / **М.О. Исаева**, Ю.В. Абаленихина, А.В. Шулькин, Е.Н. Якушева – Текст : непосредственный // Достижения современной фармакологической науки : Сборник материалов Всероссийской конференции молодых ученых, посвященной 100-летию со дня рождения профессора А.А. Никулина и 80-летию Рязанского государственного медицинского университета имени академика И.П. Павлова – Рязань, 2023. – С. 24-26.

10. Участие сукцинатных рецепторов в миогенезе клеточной линии С2С12 / **М.О. Исаева**, Ю.В. Абаленихина, А.В. Шулькин, Е.Н. Якушева – Текст : непосредственный // Инновационные технологии в медицине: взгляд молодого специалиста : Сборник докладов IX Всероссийской научной конференции молодых специалистов, аспирантов, ординаторов. – Рязань, 2023. – С. 143-145.

Патенты

11. Патент № 2780589 С1 Российская Федерация, МПК А61К 49/00, С12N 5/02, С12N 5/071. Способ активации миогенной дифференцировки миобластов : № 2021129689 : заявл. 12.10.2021 : опубл. 28.09.2022 / Ю. В. Абаленихина, М. О. Порошина, А. В. Шулькин [и др.] ; заявитель Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования "Рязанский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова" Министерства здравоохранения Российской Федерации.

12. Патент № 2776045 С1 Российская Федерация, МПК А61К 49/00, С12N 5/02, С12N 5/077. Способ стимуляции миогенеза : № 2021131169 : заявл. 13.12.2021 : опубл. 12.07.2022 / Ю. В. Абаленихина, М. О. Порошина, А. В. Шулькин [и др.] ; заявитель Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования "Рязанский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова" Министерства здравоохранения Российской Федерации.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ЭМГПС – Этилметилгидроксипиридина сукцинат

HIF-1 α – гипоксия-индуцибельный фактор 1 α (англ.: Hypoxia-inducible factor 1 α)

MRF – миогенные регуляторные факторы (англ.: myogenic regulation factors)

MRF4 – геркулин (англ.: herculin)

Myf5 – миогенный фактор 5 (англ.: myogenic factor 5).

MYH – тяжелая цепь миозина (англ.: myosin heavy chain gene)

MyoD – белок детерминации миобластов 1 (англ.: Myogenic determination protein 1)

MyoG – миогенин (англ.: myogenin)

PT - коклюшный токсин (англ.: pertussis toxin)

PXR – прегнан X рецептор (англ.: pregnane X receptor)

SUCNR1, GPR91 – рецептор сукцината 1 (англ.: Succinate receptor 1)