

МЕХАНИЗМ СТИМУЛЯЦИИ МИОГЕНЕЗА ПОД ДЕЙСТВИЕМ ЯНТАРНОЙ КИСЛОТЫ ЧЕРЕЗ СУКЦИНАТНЫЙ РЕЦЕПТОР SUCNR1

© 2024 Ю.В. Абаленихина*, М.О. Исаева, П.Ю. Мыльников,
А.В. Щулькин, Е.Н. Якушева

Рязанский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова,
390026 Рязань, Россия; электронная почта: abalenihiina88@mail.ru

Поступила в редакцию 16.04.2024

После доработки 03.06.2024

Принята к публикации 11.06.2024

В исследовании на клетках линии C2C12 изучено влияние янтарной кислоты на процессы миогенеза. В диапазоне концентраций 10–1000 мкМ янтарная кислота стимулировала процесс миогенной дифференцировки, увеличивая количество факторов миогенеза MyoD (на всех этапах миогенеза) и миогенина (на этапе терминальной дифференцировки). Методом Вестерн-блот в клетках C2C12 выявлены специфические сукцинатные рецепторы SUCNR1, уровень которых снижался в процессе миогенеза. При добавлении янтарной кислоты к клеткам содержание внутриклеточного сукцината существенно не изменялось и уменьшалось в процессе миогенной дифференцировки. С применением специфического ингибитора белка Gai – коклюшного токсина – установлено, что стимуляция миогенеза C2C12 под действием янтарной кислоты реализуется через SUCNR1–Gai.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: миогенез, янтарная кислота, SUCNR1, инозитолмонофосфат, коклюшный токсин.

DOI: 10.31857/S0320972524070102 EDN: WMLQXO

ВВЕДЕНИЕ

Развитие скелетных мышц – это высокоорганизованный процесс, контролируемый эволюционно консервативными сетями транскрипционных факторов, сигнальными молекулами и некодирующими РНК, которые координируют экспрессию большого количества генов [1].

Семейство миогенных регуляторных транскрипционных факторов (Myf5, MyoD, Mrf4 и MyoG) является основным регулятором миогенеза. Myf5 и MyoD регулируют пролиферацию миобластов и переход на процесс миогенной дифференцировки клеток, а MRF4 и MyoG контролируют этап терминальной дифференцировки. Исследования с использованием нокаутных мышей показали, что

MyoD, Mrf4 и Myf5 регулируют миогенную детерминацию, в то же время MyoG, MyoD и Mrf4 контролируют терминальную дифференцировку миобластов [2, 3].

В настоящее время ведется активный поиск других факторов и сигнальных путей, участвующих в этом процессе [4, 5].

В некоторых исследованиях было показано, что янтарная кислота может стимулировать миогенез [6]. Однако механизм данного влияния не установлен. Можно предположить, что это действие реализуется через специфический сукцинатный рецептор (SUCNR1/GPR91).

SUCNR1 принадлежит к большому семейству рецепторов, связанных с G-белком (GPCR), которое делится на разные группы на основании сходства аминокислотной последовательности или типа лиганда. SUCNR1 относят к родопсин-подобному типу 8 GPCR [7].

SUCNR1 обнаружен во многих тканях и органах, например, в почках, сердце, печени, мозге, сетчатке и др. При анализе экспрессии в мышцах были получены противоречивые результаты.

Принятые сокращения: МН – тяжелые цепи миозина (myosin heavy chain); MyoD – фактор миогенной детерминации (myogenic determination factor 1); MyoG – миогенин (myogenic factor); SUCNR1 – сукцинатный рецептор (succinate receptor 1).

* Адресат для корреспонденции.

Данный рецептор был обнаружен у мышей [8], но не был выявлен у людей [9]. Экспрессия SUCNR1 во время миогенеза не изучалась.

SUCNR1 высокоспецифичен к сукцинату, структурно родственные аналоги и метаболиты цикла Кребса не могут его активировать, только малеат и метилмалонат вызывают слабый ответ [10].

Было показано, что SUCNR1 связывается как с белком Gai, так и с Gaq. Активация Gai приводит к снижению уровня cAMP, а Gaq запускает сигнальный каскад фосфолипазы C- β (PLC- β) [11]. Также было высказано предположение, что наблюдаемая мобилизация $[Ca^{2+}]_i$ при стимуляции SUCNR1 может быть связана с активацией PLC- β димером $\beta\gamma$ [12].

Учитывая все вышеизложенное, в настоящем исследовании мы стремились изучить механизм влияния янтарной кислоты на миогенез и оценить роль SUCNR1-Gai и SUCNR1-Gaq в данном процессе.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Культивирование клеток. Исследование выполнено *in vitro* на клеточной линии мышинных миобластов C2C12, предоставленной Институтом биологии гена РАН (Москва). Данная клеточная линия является классической моделью для изучения миогенной дифференцировки [13].

Клетки культивировали при 37 °C в атмосфере 5% CO₂ в инкубаторе WS-189C («World Science», Корея) в среде Игла, модифицированной Дульбекко (DMEM), с высоким содержанием глюкозы (4500 мг/литр), с добавлением L-глутамина (4 mM), 10% эмбриональной бычьей сыворотки («Biosera», Франция), 100 ед./мл и 100 мкг/мл пенициллина и стрептомицина («ПанЭко», Россия) соответственно. После достижения 70–90% конфлюэнтности клетки снимали с флакона добавлением раствора трипсин-ЭДТА (0,25% трипсина и 0,2% ЭДТА; «Sigma-Aldrich», Германия) и высевали в 6-луночные планшеты («Corning», США).

В ходе работы были сформированы следующие экспериментальные группы:

- *клетки до дифференцировки (0 день дифференцировки, контроль)* – инкубация клеток с питательной средой, содержащей 10% эмбриональной бычьей сыворотки до конфлюэнтности 50–60% (состояние, при котором очень немногие из клеток физически соприкасаются друг с другом);

- *инициация дифференцировки миобластов* – после достижения клетками конфлюэнтности 50–60% инициировали миогенную дифференцировку путем замены эмбриональной бычьей сыворотки в составе питательной среды DMEM

на 2%-ную лошадиную сыворотку («Sigma-Aldrich», Германия) – дифференцировочную среду [14, 15, 16]. На 1-, 4- и 7-й день дифференцировки анализировали выраженность морфологических и биохимических изменений;

- *влияние янтарной кислоты на миогенную дифференцировку миобластов* – вместе с дифференцировочной питательной средой к клеткам добавляли янтарную кислоту («Acros Organics», Бельгия) в концентрациях 10, 100 и 1000 мкМ. На 1-, 4- и 7-й день анализировали выраженность изменений в клетках;

- *оценка роли сукцинатных рецепторов во влиянии янтарной кислоты на миогенную дифференцировку миобластов* – вместе с дифференцировочной питательной средой к клеткам добавляли янтарную кислоту в концентрациях 10, 100 и 1000 мкМ и коклюшный токсин (ингибитор сигнального пути SUCNR1-Gai, 516560, «Sigma-Aldrich») в концентрации 100 нг/мл [17]. На 1-, 4- и 7-й день анализировали выраженность изменений в клетках;

- *влияние янтарной кислоты на индекс миогенеза* – янтарную кислоту в концентрации 100 мкМ вносили в питательную среду DMEM с 10%-ной эмбриональной бычьей сывороткой без замены на 2%-ную лошадиную сыворотку; срок инкубации – 7 дней.

Каждый эксперимент, каждый анализ в каждой концентрации выполняли в трех независимых повторях.

Визуализацию клеток выполняли с помощью инвертированного микроскопа Olympus CKX-53 («Olympus», Япония) с цифровой цветной камерой CCD 5 МПикс («DeltaPix», Дания), анализ результатов проводили с использованием программного обеспечения DeltaPix InSight.

После окончания экспериментальных воздействий клетки фиксировали 95%-ным этанолом (5 мин) и прокрашивали ядра миобластов раствором Романовского-Гимзе при комнатной температуре в течение 20–25 мин. Затем удаляли краситель, промывали клетки фосфатным буфером («ПанЭко») и микроскопировали.

Для количественной оценки процесса миогенной дифференцировки рассчитывали индекс миогенеза (IM) – долю ядер, находящихся в митотических фазах, содержащих два или более ядер по отношению к общему количеству ядер. Для анализа выбирали пять полей зрения в лунке 6-луночного планшета, площадь одной лунки планшета составляла 9,6 см² ($n = 3$) при увеличении 200 $\times$. Общее количество проанализированных ядер составляло 90–120 на поле зрения. Расчеты проводили по формуле (1):

$$IM = \frac{A - B}{C - 1} \times 100, \quad (1)$$

где IM – индекс миогенеза, A – количество ядер в многоядерных клеточных структурах, B – количество многоядерных клеточных структур, C – количество ядер в поле зрения [18, 19].

Вестерн-блот. После окончания экспериментов клетки лизировали NP40 Cell Lysis Buffer Thermo («Thermo Fisher Scientific», США) с ингибиторами протеаз («Sigma-Aldrich») в течение 30 мин при 4 °C и постоянном перемешивании из расчета 10^7 клеток на 100 мкл буфера.

Концентрации белка в пробах анализировали методом Бредфорда, используя Pierce Coomassie Plus (Bradford) Assay Kit («Thermo Fisher») [20].

Белки (20 мкг/образец) разделяли с помощью электрофореза в полиакриламидном геле, приготовленном с использованием 10% TGX Stain-Free FastCast Acrylamide Kit («Bio-Rad», США), и переносили на нитроцеллюлозные мембраны с помощью системы полусухого переноса (Transblot; «Bio-Rad»). Затем мембраны блокировали в течение 1 ч с помощью TBS 1% Casein Blocker («Bio-Rad») с добавлением 0,1% Tween 20 («Sigma-Aldrich»). Далее, инкубировали в течение ночи при 4 °C с первичными антителами в разведении 1 : 200: sc-53092, MYH1/2/3 (N3.36), мышинное моноклональное антитело («Santa Cruz Biotechnology, Inc», США); sc-53142, MyoD (G-1), мышинное моноклональное антитело («Santa Cruz Biotechnology, Inc»); sc-12732, миогенин (F5D), мышинное моноклональное антитело («Santa Cruz Biotechnology, Inc»); A08485, SUCNR1, кроличье поликлональное антитело («Boster Bio», Китай). Мембраны промывали TBST и затем инкубировали со вторичными антителами в разведении 1 : 4000 в течение 1 ч при комнатной температуре: кроличьи анти-мышинные IgG (H + L), HRP («Invitrogen», США); козьи анти-кроличьи IgG (H + L), HRP («Invitrogen»).

Содержание изучаемых белков оценивали относительно уровня белка домашнего хозяйства GAPDH (первичные мышинные моноклональные антитела: GAPDH Loading Control Monoclonal Antibody (GA1R), DyLight 68 («Invitrogen»); вторичные антитела: кроличьи антитела Rabbit-anti-Mouse IgG (H + L), HRP («Invitrogen»)).

Хемилюминесценцию регистрировали с помощью ChemiDocXRS+ («Bio-Rad»). Интенсивность полученных полос анализировали денситометрически с использованием программного обеспечения ImageLab («Bio-Rad»).

Анализ концентрации сукцината в лизате клеток. Концентрации сукцината в клеточном лизате анализировали с помощью ВЭЖХ-МС/МС (жидкостной хроматограф Ultimate 3000 и тройной квадрупольный масс-спектрометр TSQ Fortis («Thermo Fisher Scientific»)). Белки осаждали добавлением к образцу метанола в соотношении 1/1.

Хроматографическое разделение проводили на колонке C18 UCT Selectra (C18 4,6 мм × 100 мм; 5 мкм; 100 Å) с предколонкой Selectra C18 Guard Cartridges SLC-418 18GDC46-5UM; температура разделения – 40 °C, скорость потока – 0,5 мл/мин с использованием 0,1%-ного раствора муравьиной кислоты в качестве подвижной фазы А и метанола в качестве подвижной фазы Б. Программа градиента подвижной фазы (А/Б) была следующей: 0,0 мин – 90%/10%; 0,01 мин – 70%/30%; 3,5 мин – 50%/50%; 5 мин – 10%/90%; 7,5 мин – 90%/10%. Объем вводимой пробы – 10 мкл; время анализа – 7,5 мин. В данных условиях время удерживания сукцината составило 3,76–3,82 мин.

Ионизацию молекул сукцината проводили в негативном (отрицательном) режиме электроспрея при атмосферном давлении и напряжении 2500 В. Для количественного анализа использовали оптимизированный режим мониторинга селективных реакций (SRM) со следующими параметрами: 117 m/z → 98,7 m/z, энергия столкновения – 10 В, напряжение линз – 25 В; 117 m/z → 73,11 m/z (использовался для количественного анализа), энергия столкновения – 10 В.

Анализ концентрации инозитолмонофосфата в лизате клеток. Концентрацию инозитолмонофосфата в клеточном лизате также анализировали с помощью ВЭЖХ-МС/МС. Белки осаждали добавлением к образцу ацетонитрила в соотношении 1/1. Хроматографическое разделение проводили на колонке C18 UCT Selectra (C18 4,6 мм × 100 мм; 5 мкм; 100 Å) с предколонкой Selectra C18 Guard Cartridges SLC-418 18GDC46-5UM с использованием раствора 10 мМ формиата аммония в качестве подвижной фазы А и метанола в качестве подвижной фазы Б. Программа градиента подвижной фазы (А/Б) была следующей: 0,0 мин – 80%/20%; 2,5 мин – 30%/70%; 2,5 мин – 80%/20%. Объем вводимой пробы – 30 мкл; время анализа – 8 мин. В данных условиях время удерживания инозитолмонофосфата составило 2,2–2,23 мин.

Ионизацию молекул инозитолмонофосфата проводили в негативном (отрицательном) режиме электроспрея при атмосферном давлении и напряжении 3000 В. Для количественного анализа использовали оптимизированный режим мониторинга селективных реакций (SRM) со следующими параметрами: 259 m/z → 79 m/z (использовался для количественного анализа), энергия столкновения 20 В; 259 m/z → 97,1 m/z, энергия столкновения 20 В.

Анализ данных. Статистический анализ полученных данных проводился с использованием GraphPad Prism версия 8.1.2. Данные представлены как среднее арифметическое (M) ± стандартное отклонение (SD). Статистическую значимость различий при сравнении более чем двух групп

Таблица 1. Значения индекса миогенеза ($M \pm SD$, %) клеток линии C2C12 под действием янтарной кислоты (10, 100, 1000 мкМ), коклюшного токсина (Pertussis toxin (PT), 100 нг/мл) и их сочетанного применения на 1-, 4-, 7-й дни дифференцировки

Экспериментальная серия	Индекс миогенеза, %		
	1-й день дифференцировки	4-й день дифференцировки	7-й день дифференцировки
Дифференцировочная среда	15,4 $\pm$ 5,2	44,3 $\pm$ 13,8	77,2 $\pm$ 4,4
Коклюшный токсин (PT), 100 нг/мл	13,2 $\pm$ 4,1	16,3 $\pm$ 3,9*	23,2 $\pm$ 5,6*
Янтарная кислота, 10 мкМ	57,9 $\pm$ 4,4*	60,3 $\pm$ 5,6*	87,8 $\pm$ 4,4*
Янтарная кислота, 100 мкМ	77,5 $\pm$ 2,4*	85,4 $\pm$ 1,7*	92,6 $\pm$ 5,9*
Янтарная кислота, 1000 мкМ	81,9 $\pm$ 2,9*	74,8 $\pm$ 2,9*	89,6 $\pm$ 3,8*
Янтарная кислота, 10 мкМ + PT	23,2 $\pm$ 2,9 [^]	54,5 $\pm$ 7,0	40,3 $\pm$ 2,4*, [^]
Янтарная кислота, 100 мкМ + PT	47,4 $\pm$ 5,3*, [#]	64,5 $\pm$ 5,2*, [#]	65,5 $\pm$ 5,2*, [#]
Янтарная кислота, 1000 мкМ + PT	51,1 $\pm$ 5,0*, [°]	73,0 $\pm$ 5,4*	71,4 $\pm$ 8,3*

Примечание. * $p \leq 0,05$ – относительно соответствующего дня дифференцировки; [^] $p \leq 0,05$ – относительно группы янтарная кислота 10 мкМ; [#] $p \leq 0,05$ – относительно группы янтарная кислота 100 мкМ; [°] $p \leq 0,05$ – относительно группы янтарная кислота 1000 мкМ.

оценивали с помощью однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с последующим тестом Тьюки. Для сравнения двух групп использовали t -критерий Стьюдента. Значения $p < 0,05$ считали статистически значимыми.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Миогенная дифференцировка C2C12. Недифференцированные миобласты представляли собой плоские, веретенообразные или звездчатые клетки, которые диффузно располагались по лунке и были строго моноклеточными. Через 24 ч (1 день дифференцировки) после удаления бычьей сыворотки запускался процесс дифференцировки миобластов, происходило их удлинение и утолщение. К четвертому дню дифференцировки после замены бычьей сыворотки на лошадиную отмечалось появление мышечных трубочек, содержащих более двух ядер. Феномен прогрессивно нарастал и достигал максимального уровня к седьмому дню дифференцировки (рис. 1). Фиксировалось образование длинных многоядерных мышечных трубочек. Индекс миогенеза постепенно увеличивался и достигал максимального значения ($77,2 \pm 4,4\%$) к седьмому дню (табл. 1).

Относительное количество MyoD увеличивалось после замены питательной среды на дифференцировочную, достигая максимального уровня на 4-й день дифференцировки, а затем постепенно снижалось к седьмому дню, но все равно

превышало показатели контроля (рис. 2, а). Относительное количество белка миогенина (MyoG) – регуляторного белка миогенеза, необходимого для терминальной дифференцировки миобластов (рис. 2, б), и тяжелых цепей миозина (MYH) значительно повышалось в клетках на 7-й день дифференцировки и не менялось на 1-й и 4-й дни по сравнению со значениями до дифференцировки (рис. 2, в).

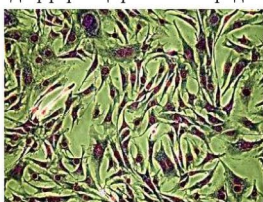
Методом Вестерн-блот нами было доказано наличие сукцинатных рецепторов в клетках линии C2C12. При этом в ходе миогенной дифференцировки относительное количество рецепторов прогрессивно уменьшалось (1–7 дни; рис. 2, г). В исследовании Wang et al. [8] было показано, что при мышечной нагрузке в икроножных мышцах мышей увеличивается количество сукцинатных рецепторов. Полученные результаты позволяют предположить, что SUCNR1, скорее всего, важен в процессе миогенеза, при завершении миогенеза его количество снижается. С этим может быть связан и тот факт, что SUCNR1 не обнаружены у взрослых людей (возраст 55 ± 7 лет) [9].

Таким образом, в настоящем исследовании подтвержден запуск процесса миогенеза при замене питательной среды на дифференцировочную и доказано наличие SUCNR1 в клетках C2C12, что, в свою очередь, дает возможность предположить участие янтарной кислоты в данном процессе.

Влияние янтарной кислоты на миогенную дифференцировку C2C12. Добавление в дифференцировочную среду янтарной кислоты в кон-

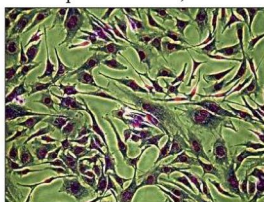
1 день дифференцировки

Дифференцировочная среда



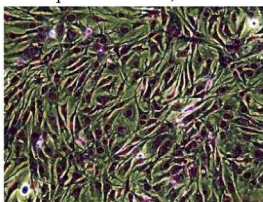
L = 122,52 мкм; B = 15,35 мкм

Янтарная кислота, 10 мкМ



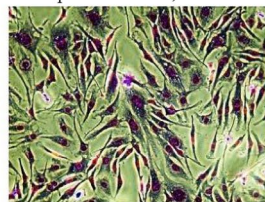
L = 226,43 мкм; B = 50,09 мкм

Янтарная кислота, 100 мкМ

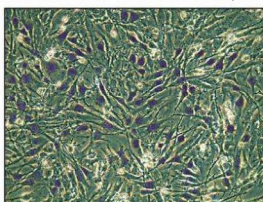


L = 183,80 мкм; B = 56,47 мкм

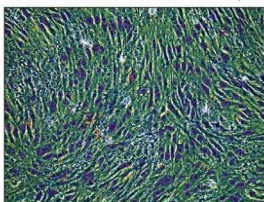
Янтарная кислота, 1000 мкМ



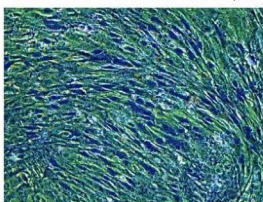
L = 159,36 мкм; B = 36,25 мкм

Дифференцировочная среда+
коклюшный токсин 100 нг/мл

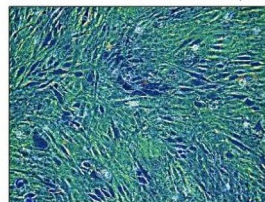
L = 98,83 мкм; B = 27,23 мкм

Янтарная кислота, 10 мкМ+
коклюшный токсин 100 нг/мл

L = 93,78 мкм; B = 18,10 мкм

Янтарная кислота, 100 мкМ+
коклюшный токсин 100 нг/мл

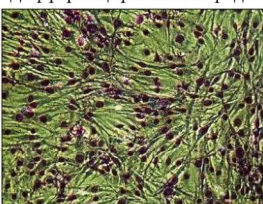
L = 118,13 мкм; B = 15,78 мкм

Янтарная кислота, 1000 мкМ+
коклюшный токсин 100 нг/мл

L = 85,37 мкм; B = 10,81 мкм

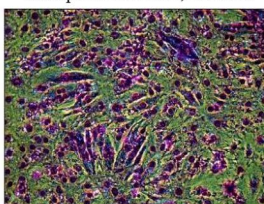
4 день дифференцировки

Дифференцировочная среда



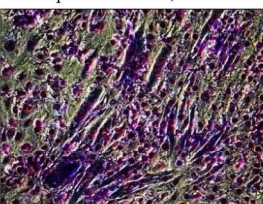
L = 129,11 мкм; B = 13,01 мкм

Янтарная кислота, 10 мкМ



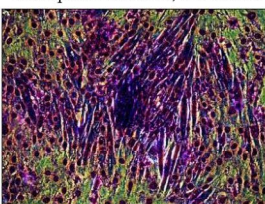
L = 235,09 мкм; B = 34,24 мкм

Янтарная кислота, 100 мкМ

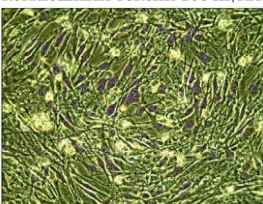


L = 245,34 мкм; B = 44,91 мкм

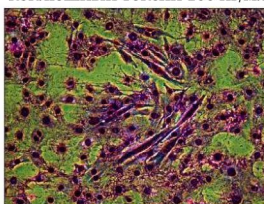
Янтарная кислота, 1000 мкМ



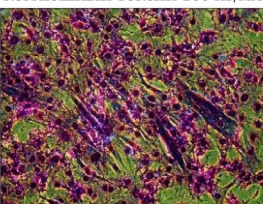
L = 249,48 мкм; B = 26,61 мкм

Дифференцировочная среда+
коклюшный токсин 100 нг/мл

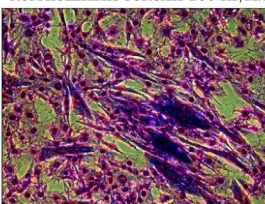
L = 97,49 мкм; B = 20,29 мкм

Янтарная кислота, 10 мкМ+
коклюшный токсин 100 нг/мл

L = 157,78 мкм; B = 32,27 мкм

Янтарная кислота, 100 мкМ+
коклюшный токсин 100 нг/мл

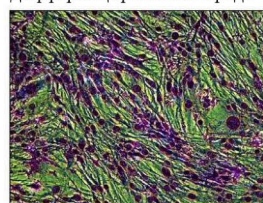
L = 268,62 мкм; B = 31,94 мкм

Янтарная кислота, 1000 мкМ+
коклюшный токсин 100 нг/мл

L = 209,17 мкм; B = 30,1 мкм

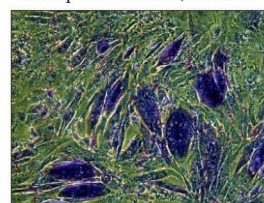
7 день дифференцировки

Дифференцировочная среда



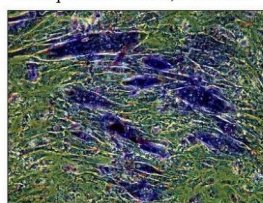
L = 185,24 мкм; B = 21,39 мкм

Янтарная кислота, 10 мкМ



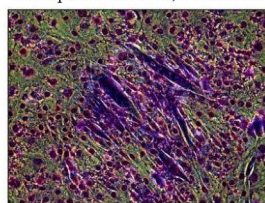
L = 229,28 мкм; B = 50,16 мкм

Янтарная кислота, 100 мкМ

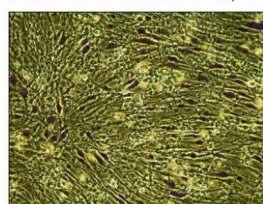


L = 301,21 мкм; B = 44,06 мкм

Янтарная кислота, 1000 мкМ



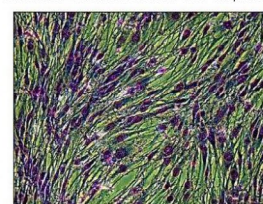
L = 250,33 мкм; B = 47,18 мкм

Дифференцировочная среда+
коклюшный токсин 100 нг/мл

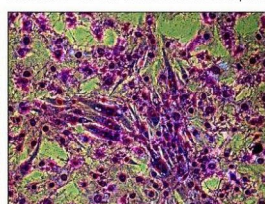
L = 122,64 мкм; B = 15,58 мкм

Янтарная кислота, 10 мкМ+
коклюшный токсин 100 нг/мл

L = 146,66 мкм; B = 18,81 мкм

Янтарная кислота, 100 мкМ+
коклюшный токсин 100 нг/мл

L = 168,48 мкм; B = 20,61 мкм

Янтарная кислота, 1000 мкМ+
коклюшный токсин 100 нг/мл

L = 172,43 мкм; B = 21,05 мкм

Рис. 1. Клетки C2C12 до дифференцировки и на разных стадиях дифференцировки. Фазово-контрастная микроскопия; 200×. Окрашивание ядер по Романовскому–Гимзе; L – длина миобластов; B – ширина миобластов

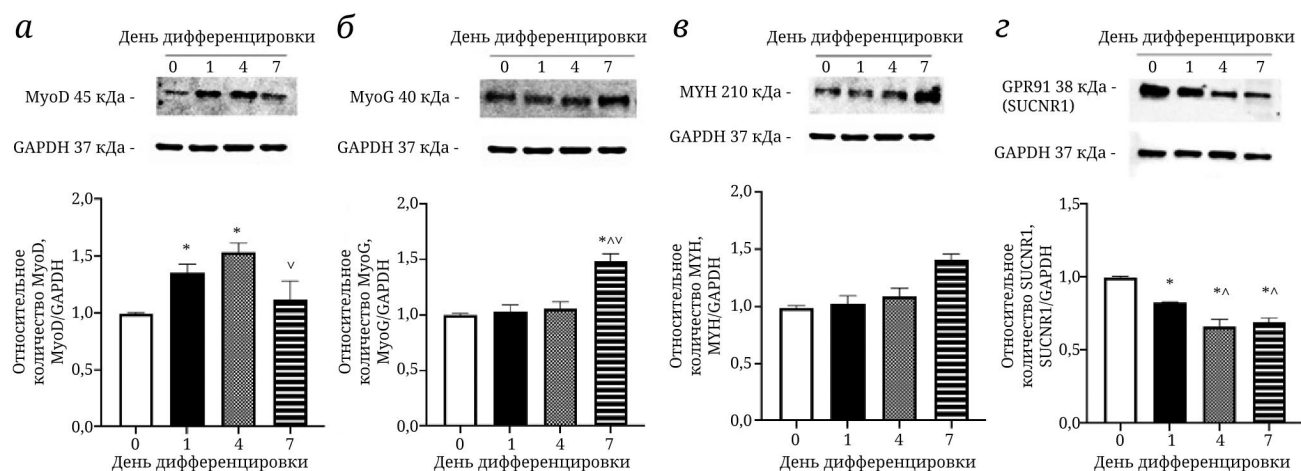


Рис. 2. Результаты вестерн-блот-анализа относительного количества MyoD (а), MyoG (б), MYH (в), SUCNR1 (г) в зависимости от дня дифференцировки клеток C2C12. * $p < 0,05$ – по сравнению с контролем (до дифференцировки); Δ $p < 0,05$ – по сравнению с первым днем дифференцировки; ^v $p < 0,05$ – по сравнению с четвертым днем дифференцировки

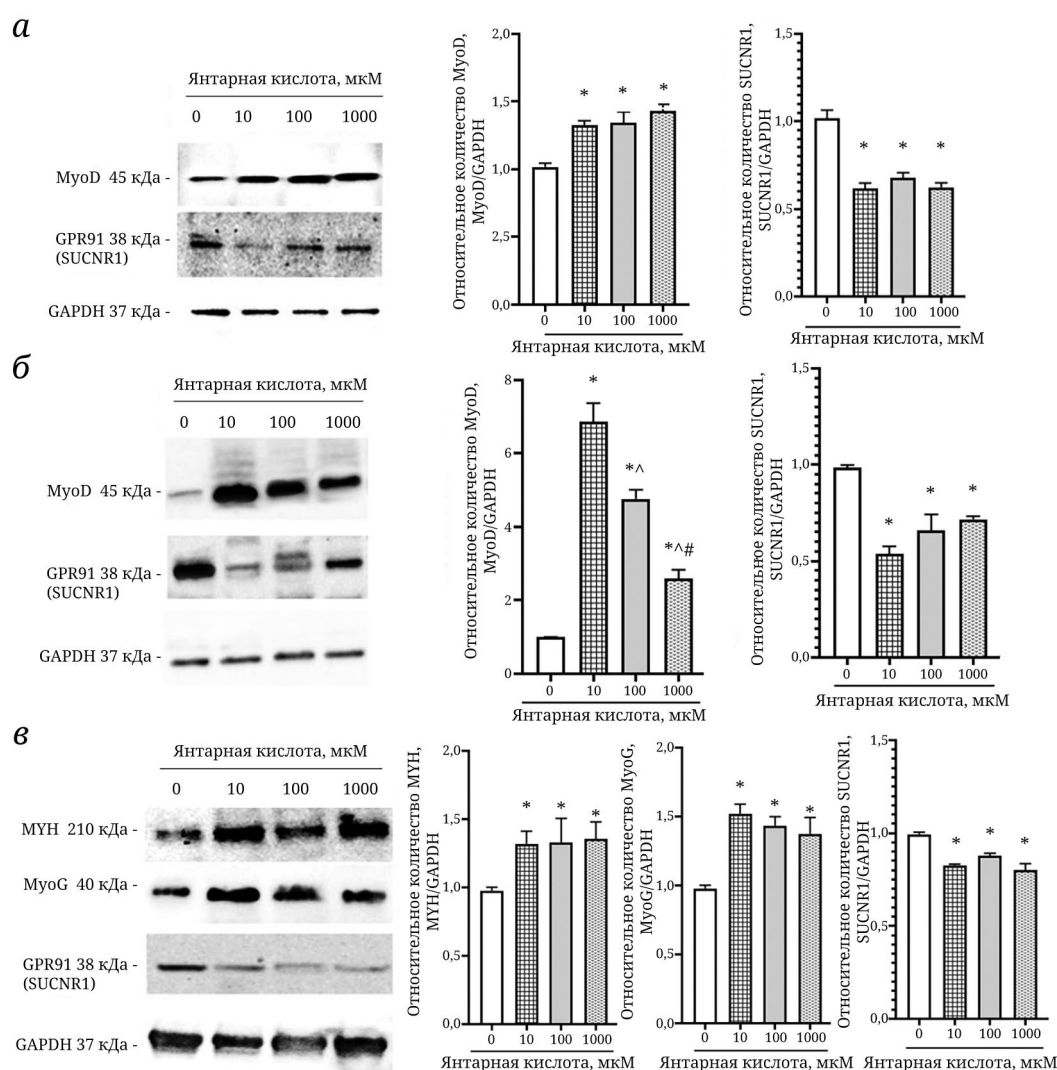


Рис. 3. Результаты вестерн-блот-анализа относительного количества MyoD и SUCNR1 на 1-й (а) и 4-й (б) дни дифференцировки; MYH, MyoG, SUCNR1 – на 7-й день дифференцировки (в) при воздействии янтарной кислоты в концентрациях 10, 100, 1000 мкМ на клетки C2C12. * $p < 0,05$ – по сравнению со значениями соответствующего дня дифференцировки без добавления янтарной кислоты

центрациях 10, 100 и 1000 мкМ вызывало ускорение миогенной дифференцировки C2C12. Это проявлялось в увеличении индекса миогенеза на 1-й, 4-й и 7-й дни по сравнению с показателями клеток в дифференцировочной среде без добавления сукцината (табл. 1).

На 1-й и 4-й дни дифференцировки при воздействии янтарной кислоты в концентрациях 10, 100, 1000 мкМ увеличивалось относительное количество MyoD (рис. 3, а и б), а на 7-й день возрастал уровень MyoG и MYH по сравнению со значениями на соответствующий день дифференцировки без добавления тестируемого вещества (рис. 3, в).

Стоит отметить, что максимальный прирост индекса миогенеза происходил на 1-й день дифференцировки, а увеличение MyoD и MyoG – на 4-й и 7-й день соответственно, то есть усиление индекса миогенеза несколько опережало активацию транскрипционных факторов.

Относительное количество сукцинатных рецепторов снижалось во все сроки эксперимента (1-й, 4-й и 7-й день) и при всех концентрациях янтарной кислоты (10–1000 мкМ) по сравнению с уровнем клеток без добавления вещества (рис. 3).

Таким образом, янтарная кислота во всех протестированных концентрациях ускоряет миогенную дифференцировку C2C12, что связано со снижением уровня SUCNR1. С другой стороны, понижение уровня рецептора может служить ответом на его стимуляцию лигандом. При активации рецепторов, связанных с G-белком, их лиганды также инициируют процессы десенсibilизации – адаптивный ответ, используемый клетками для остановки передачи сигналов G-белками, таким образом предотвращая потенциально вредные эффекты, которые могут возникнуть в результате персистенции стимуляции [21].

Полученные результаты также согласуются с данными других авторов. Например, на мышцах C57BL/6J было показано, что добавление в пищевой рацион животных 0,5% или 1% натриевой соли янтарной кислоты повышает выносливость к физическим нагрузкам, экспрессию тяжелой цепи I миозина, активность аэробных ферментов, потребление кислорода и биогенез митохондрий в скелетных мышцах [8].

Влияние янтарной кислоты на концентрацию внутриклеточного сукцината в процессе миогенной дифференцировки C2C12. При изучении концентрации сукцината в клетках C2C12 в процессе миогенной дифференцировки было показано, что его содержание постепенно снижалось, достигая минимальных значений к седьмому дню (рис. 4, а).

Сукцинат является субстратом цикла Кребса и поставщиком $FADH_2$ для дыхательной цепи

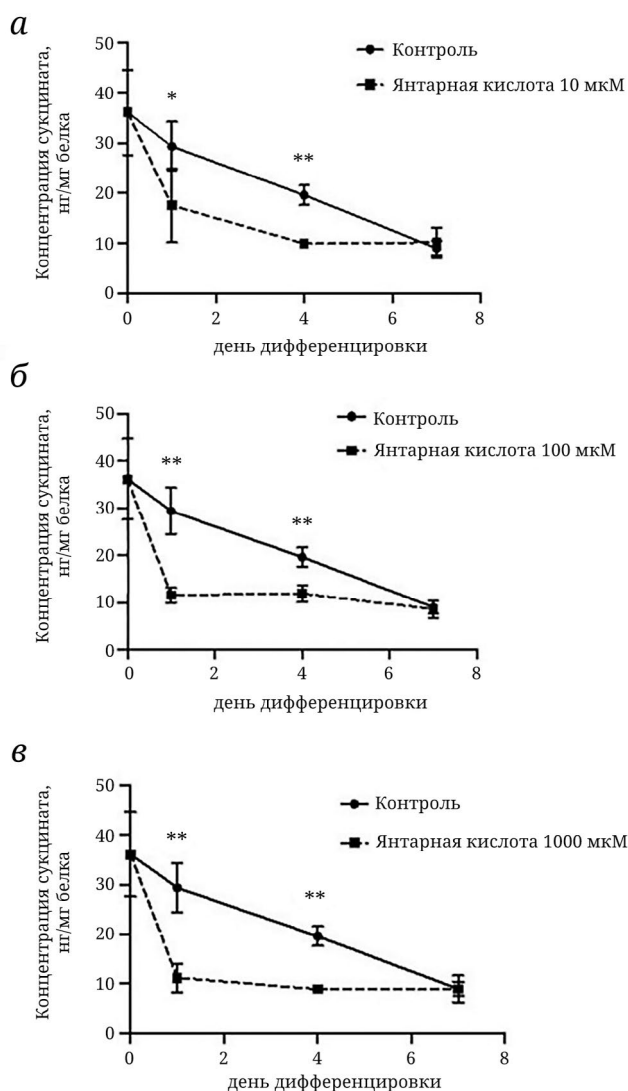


Рис. 4. Концентрация сукцината в клетках C2C12 в процессе их миогенной дифференцировки при внесении в питательную среду янтарной кислоты в концентрациях 10 (а), 100 (б) и 1000 (в) мкМ (метод детекции – ВЭЖХ-МС/МС). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ – статистически значимые различия между группами

митохондрий [22], поэтому можно было предположить, что выявленный эффект стимуляции миогенеза связан с его участием в метаболических процессах как субстрата. Однако нами было показано, что добавление янтарной кислоты в дифференцировочную среду во всех тестируемых концентрациях (10, 100 и 1000 мкМ) не только не приводило к увеличению концентрации сукцината в клетках линии C2C12 в процессе дифференцировки, но даже, наоборот, ускоряло процесс снижения. При этом достоверных различий между показателями клеток, инкубировавшихся с разными концентрациями янтарной кислоты, получено не было, что свидетельствует о том, что влияние янтарной кислоты на уровень сукцината не было дозозависимым. При этом стоит

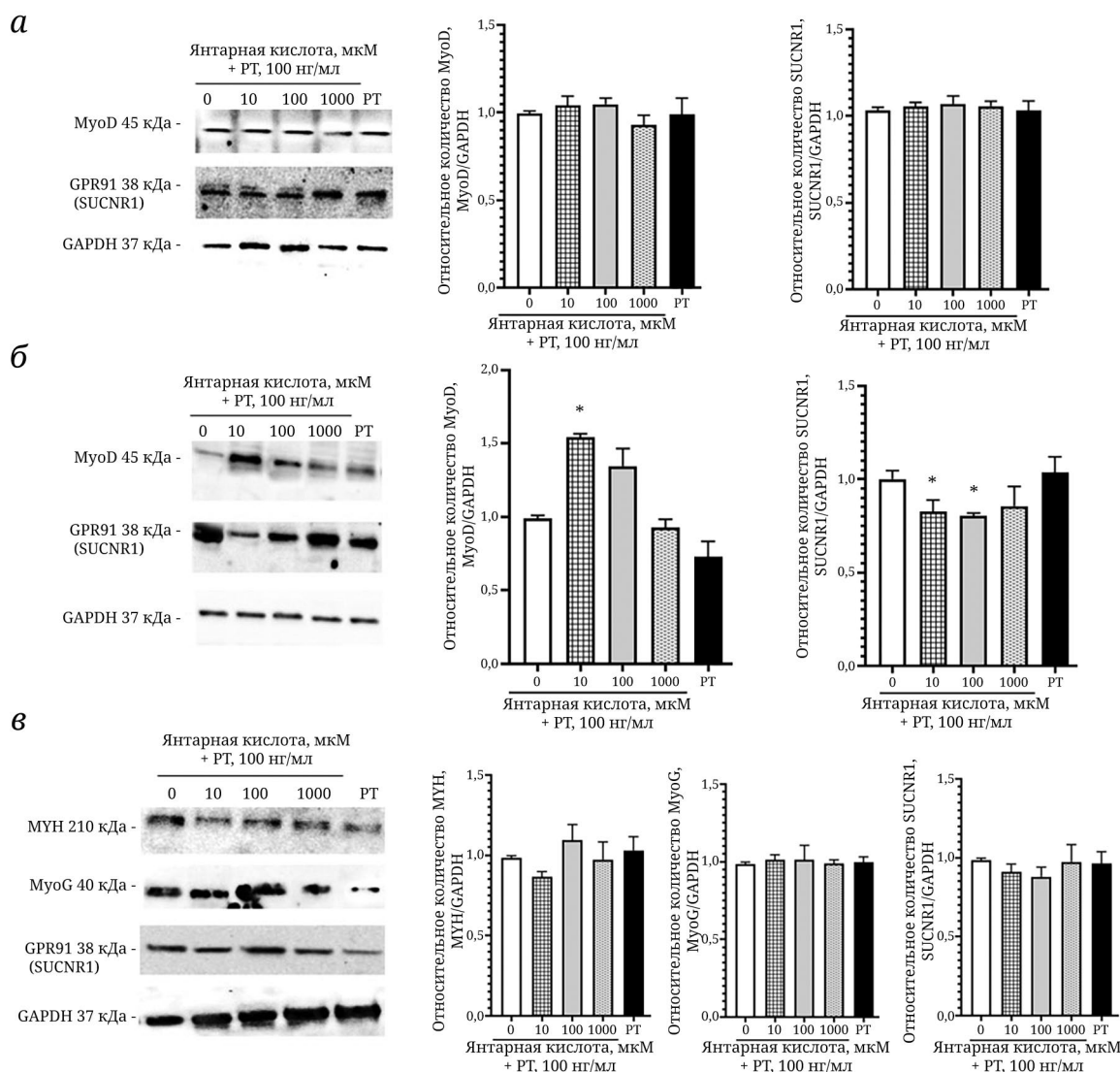


Рис. 5. Результаты вестерн-блот-анализа относительного количества MyoD и SUCNR1 на 1-й (а) и 4-й (б) дни дифференцировки; MYH, MyoG, SUCNR1 – на 7-й день дифференцировки (в) при воздействии янтарной кислоты в концентрациях 10, 100, 1000 мкМ, коклюшного токсина (Pertussis toxin (PT), 100 нг/мл) и их сочетанного применения на клетки C2C12. * $p < 0,05$ – по сравнению со значениями соответствующего дня дифференцировки без добавления янтарной кислоты

отметить, что концентрацию сукцината оценивали через 24 ч после внесения янтарной кислоты в питательную среду (рис. 4).

Полученные результаты свидетельствуют о том, что сукцинат, 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.

Влияние коклюшного токсина на миогенную дифференцировку C2C12 под действием янтарной кислоты. Предполагается, что SUCNR1 может реализовывать свои эффекты через белки Gai, $\beta\gamma$ и Gaq [11, 12]. Для оценки роли сигналь-

ного пути SUCNR1–Gai в стимуляции миогенеза под действием янтарной кислоты применяли специфический ингибитор Gai-белка – коклюшный токсин. Коклюшный токсин катализирует ADP-рибозилирование по остаткам цистеина (Cys351) на С-конце специфических α -субъединиц тримерных G-белков семейства Gi/o (Gi/Go) [23]. Показано, что коклюшный токсин может подавлять основные эффекты SUCNR1 [17].

Добавление коклюшного токсина в дифференцировочную среду приводило к практически полной остановке процессов миогенной дифференцировки. Индекс миогенеза на 4-й и 7-й дни дифференцировки был существенно ниже значений серии с применением изолированной дифференцировочной среды (табл. 1).

При добавлении коклюшного токсина к дифференцировочной среде, содержащей янтарную кислоту, на протяжении всех сроков эксперимента токсин подавлял миогенную дифференцировку, ускоренную сукцинатом, о чем свидетельствует достоверное снижение индекса миогенеза на 1-й, 4-й и 7-й дни (табл. 1).

Также на 1-й день дифференцировки применение коклюшного токсина препятствовало изменению уровня MyoD под действием янтарной кислоты, данный показатель достоверно не отличался от значений клеток, культивируемых в обычной дифференцировочной среде (без янтарной кислоты; рис. 5, а).

На 4-й день дифференцировки при воздействии коклюшного токсина в сочетании с сукцинатом в концентрации 10 мкМ уровень MyoD возрастал относительно четвертого дня дифференцировки, а в остальных концентрациях достоверно не изменялся (рис. 5, б).

На 7-й день дифференцировки коклюшный токсин нивелировал все изменения, вызванные добавлением янтарной кислоты в питательную среду: относительное количество MyoG и MYH достоверно от значений клеток на 7-й день дифференцировки без добавления янтарной кислоты не отличалось (рис. 5, в).

Уровень SUCNR1 при воздействии янтарной кислоты в присутствии коклюшного токсина статистически значимо не отличался от показателей клеток без ее воздействия (дифференцировочной среды). Известно, что коклюшный токсин может предотвращать интернализацию G-белка, связанного с рецептором при воздействии лиганда [24].

Дополнительно в рамках исследования было оценено влияние коклюшного токсина на концентрацию инозитолмонофосфата в клетках C2C12 при стимуляции миогенной дифференцировки янтарной кислотой, поскольку показано, что активация SUCNR1 сопровождается повышением его концентрации [11].

Добавление дифференцировочной питательной среды, содержащей янтарную кислоту, на 1-й день стимуляции миогенной дифференцировки приводило к постепенному нарастанию уровня инозитолмонофосфата в клетках C2C12, который достигал максимального значения к 30-й мин эксперимента.

Добавление коклюшного токсина в дифференцировочную среду вместе с янтарной кислотой препятствовало нарастанию уровня инозитолмонофосфата. Его концентрация достоверно не отличалась от показателей клеток при добавлении дифференцировочной питательной среды без внесения янтарной кислоты (рис. 6).

В совокупности полученные результаты свидетельствуют о том, что янтарная кислота стимули-

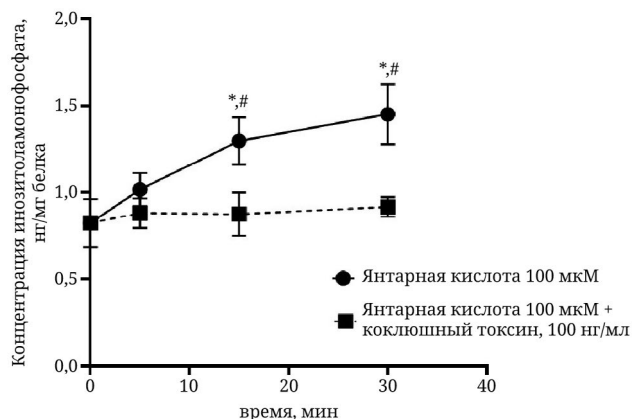


Рис. 6. Концентрация инозитолмонофосфата в клетках C2C12 в процессе их миогенной дифференцировки при внесении в питательную среду янтарной кислоты в концентрациях 10, 100 и 1000 мкМ (метод детекции – ВЭЖХ-МС/МС). * $p < 0,01$ – статистически значимые различия с показателями клеток до внесения сукцината, # $p < 0,01$ – статистически значимые различия с показателями при добавлении янтарной кислоты (100 мкМ) + коклюшный токсин (100 нг/мл)

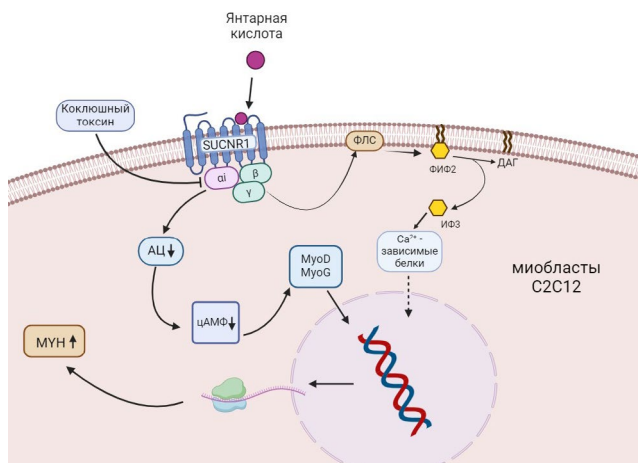


Рис. 7. Предполагаемый механизм действия янтарной кислоты на процесс миогенной дифференцировки клеток C2C12. АЦ – аденилатциклаза; ФЛС – фосфолипаза С; ФИФ2 – фосфатидилинозитол-1,5-дифосфат; DAG – диацилглицерол; ИФ3 – инозитол-3-фосфат. Механизма действия через белок $G_{\alpha i}$ обозначен полужирной стрелкой; механизм действия через белок $G_{\alpha q}$ – тонкой стрелкой; механизм действия через Ca^{2+} -зависимые белки – пунктирной стрелкой

рует миогенную дифференцировку C2C12, действуя через SUCNR1- $G_{\alpha i}$, а не через SUCNR1- $G_{\alpha q}$ (рис. 7).

Сделанные выводы согласуются с классическими представлениями о регуляции миогенеза. Известно, что повышенный внутриклеточный уровень cAMP может ингибировать экспрессию специфических генов, инициирующих миогенную дифференцировку, тогда как снижение cAMP может их активировать и запускать миогенез [25], например, за счет дефосфорилирования MyoD по остатку Ser200 [26].

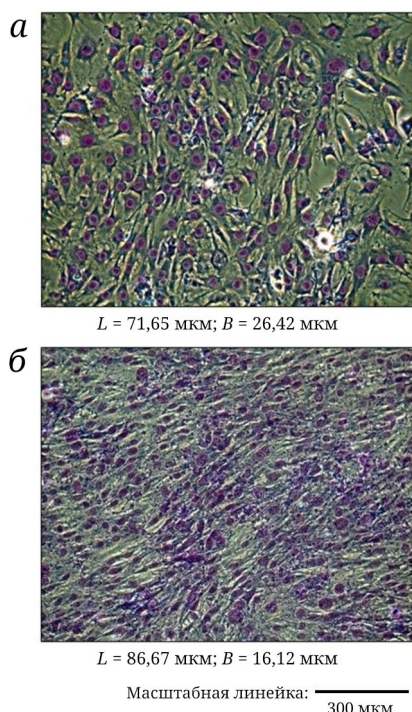


Рис. 8. Клетки C2C12 до дифференцировки (а) и при стимуляции миогенеза добавлением 100 мкМ сукцината (б). Фазово-контрастная микроскопия; 200×. Окрашивание ядер по Романовскому-Гимзе; L – длина миобластов, B – ширина миобластов

Выявленное в нашем исследовании опережение нарастания индекса миогенеза, по сравнению с нарастанием уровня MyoD, может быть связано именно с накоплением активной дефосфорилированной формы данного транскрипционного фактора под действием янтарной кислоты, а не с увеличением его общего количества.

Возможность стимуляции миогенной дифференцировки C2C12 янтарной кислотой без внесения дифференцировочной питательной среды. На завершающем этапе исследования нами была проверена гипотеза о возможности запуска миогенной дифференцировки клеток C2C12 при добавлении янтарной кислоты в культураль-

ную питательную среду, содержащую 10% фетальной бычьей сыворотки, без замены ее на дифференцировочную (содержащую 2% лошадиной сыворотки).

В ходе исследования было установлено, что янтарная кислота самостоятельно запускала процесс миогенной дифференцировки, о чем свидетельствовали морфологические изменения клеток. Индекс миогенеза увеличивался уже с первого дня дифференцировки и достигал максимального значения к седьмому дню – $42,1 \pm 3,0\%$ (рис. 8).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в настоящем исследовании на клетках миобластов C2C12 было установлено, что янтарная кислота запускает и ускоряет процесс миогенной дифференцировки, действуя через SUCNR1-Gai.

Вклад авторов. Абаленихина Ю.В. – дизайн исследования, проведение вестерн-блот-анализа, интерпретация результатов; Исаева М.О. – культивирование и визуализация клеток; Мыльников П.Ю. – выполнение ВЭЖХ-МС/МС-анализов; Шулькин А.В. – концепция и дизайн исследования, редактирование; Якушева Е.Н. – проверка критически важного интеллектуального содержания работ.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке внутривузовского гранта молодых ученых Рязанского государственного медицинского университета имени академика И.П. Павлова на 2023 год (Договор № 3/23).

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

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Xu, M., Chen, X., Chen, D., Yu, B., Li, M., He, J., and Huang, Z. (2020) Regulation of skeletal myogenesis by microRNAs, *J. Cell. Physiol.*, **235**, 87-104, <https://doi.org/10.1002/jcp.28986>.
2. Arnold, H. H., and Braun, T. (1996) Targeted inactivation of myogenic factor genes reveals their role during mouse myogenesis: a review, *Int. J. Dev. Biol.*, **40**, 345-353.
3. Lassar, A. B., Skapek, S. X., and Novitch, B. (1994) Regulatory mechanisms that coordinate skeletal muscle differentiation and cell cycle withdrawal, *Curr. Opin. Cell Biol.*, **6**, 788-794, [https://doi.org/10.1016/0955-0674\(94\)90046-9](https://doi.org/10.1016/0955-0674(94)90046-9).
4. Cuenda, A., and Cohen, P. (1999) Stress-activated protein kinase-2/p38 and a rapamycin-sensitive pathway are required for C2C12 myogenesis, *J. Biol. Chem.*, **274**, 4341-4346, <https://doi.org/10.1074/jbc.274.7.4341>.
5. Buckingham, M., and Vincent, S. D. (2009) Distinct and dynamic myogenic populations in the vertebrate embryo, *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **19**, 444-453, <https://doi.org/10.1016/j.gde.2009.08.001>.

6. Arneson-Wissink, P. C., Hogan, K. A., Ducharme, A. M., Samani, A., Jatoti, A., and Doles, J. D. (2020) The wasting-associated metabolite succinate disrupts myogenesis and impairs skeletal muscle regeneration, *JCSM Rapid Commun.*, **3**, 56-69, <https://doi.org/10.1002/rco2.14>.
7. Fredriksson, R., Lagerström, M. C., Lundin, L.-G., and Schiöth, H. B. (2003) The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints, *Mol. Pharmacol.*, **63**, 1256-1272, <https://doi.org/10.1124/mol.63.6.1256>.
8. Wang, T., Xu, Y. Q., Yuan, Y. X., Xu, P. W., Zhang, C., Li, F., Wang, L. N., Yin, C., Zhang, L., Cai, X. C., Zhu, C. J., Xu, J. R., Liang, B. Q., Schaul, S., Xie, P. P., Yue, D., Liao, Z. R., Yu, L. L., Luo, L., Zhou, G., Yang, J. P., He, Z. H., Du, M., Zhou, Y. P., Deng, B. C., Wang, S. B., Gao, P., Zhu, X. T., Xi, Q. Y., et al. (2019) Succinate induces skeletal muscle fiber remodeling via SUCNR1 signaling, *EMBO Rep.*, **9**, e47892, <https://doi.org/10.15252/embr.201947892>.
9. Abdelmoez, A. M., Dmytriyeva, O., Zurke, Y. X., Trauelsen, M., Marica, A. A., Savikj, M., Smith, J. A. B., Monaco, C., Schwartz, T. W., Krook, A., and Pillon, N. J. (2023) Cell selectivity in succinate receptor SUCNR1/GPR91 signaling in skeletal muscle, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, **324**, E289-E298, <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00009.2023>.
10. He, W., Miao, F. J., Lin, D. C., Schwandner, R. T., Wang, Z., Gao, J., Chen, J. L., Tian, H., and Ling, L. (2004) Citric acid cycle intermediates as ligands for orphan G-protein-coupled receptors, *Nature*, **429**, 188-193, <https://doi.org/10.1038/nature02488>.
11. Gilissen, J., Jouret, F., Pirotte, B., and Hanson, J. (2016) Insight into SUCNR1 (GPR91) structure and function, *Pharmacol. Ther.*, **159**, 56-65, <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2016.01.008>.
12. Harden T. K., Waldo G. L., Hicks S. N., and Sondek J. (2011) Mechanism of activation and inactivation of Gq/ phospholipase C- β signaling nodes, *Chem. Rev.*, **10**, 6120-6129, <https://doi.org/10.1021/cr200209p>.
13. Yaffe, D., and Saxel, O. (1977) A myogenic cell line with altered serum requirements for differentiation, *Differentiation*, **7**, 159-166, <https://doi.org/10.1111/j.1432-0436.1977.tb01507.x>.
14. Sin, J., Andres, A. M., Taylor, D. J., Weston, T., Hiraumi, Y., Stotland, A., Kim, B. J., Huang, C., Doran, K. S., and Gottlieb, R. A. (2016) Mitophagy is required for mitochondrial biogenesis and myogenic differentiation of C2C12 myoblasts, *Autophagy*, **12**, 369-380, <https://doi.org/10.1080/15548627.2015.1115172>.
15. Исаева М. О., Гаджиева Ф. Т., Абаленихина Ю. В., Шулькин А. В., Якушева Е. Н. (2023) Способ культивирования и механизмы регуляции этапов миогенеза клеточной линии C2C12, *Российский медико-биологический вестник им. академика И.П. Павлова*, **4**, 525-534, <https://doi.org/10.17816/PAVLOVJ375362>.
16. Буев Д. О., Емелин А. М., Яковлев И. А., Деев Р. В. (2020) Культивирование миобластов и миосателлитов *in vitro*, *Наука молодых (Eruditio Juvenium)*, **1**, 86-97, <https://doi.org/10.23888/HMJ20208186-97>.
17. Sundström, L., Greasley, P. J., Engberg, S., Wallander, M., and Ryberg, E. (2013) Succinate receptor GPR91, a G α (i) coupled receptor that increases intracellular calcium concentrations through PLC β , *FEBS Lett.*, **15**, 2399-2404, <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2013.05.067>.
18. Емелин А. М., Буев Д. О., Слабикова А. А., Яковлев И. А., Деев Р. В. (2019) Количественная оценка миогенной дифференцировки клеточной линии C2C12 с использованием полиэтиленгликоля и индуцированных сред *in vitro*, *Гены Клетки*, **14**, 87.
19. Sestili, P., Barbieri, E., Martinelli, C., Battistelli, M., Guescini, M., Vallorani, L., Casadei, L., D'Emilio, A., Falcieri, E., Piccoli, G., Agostini, D., Annibali, G., Paolillo, M., Gioacchini, A. M., and Stocchi, V. (2009) Creatine supplementation prevents the inhibition of myogenic differentiation in oxidatively injured C2C12 murine myoblasts, *Mol. Nutr. Food Res.*, **9**, 1187-1204, <https://doi.org/10.1002/mnfr.200800504>.
20. Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.*, **72**, 248-254, <https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>.
21. Kohout, T. A., and Lefkowitz, R. J. (2003) Regulation of G protein-coupled receptor kinases and arrestins during receptor desensitization, *Mol. Pharmacol.*, **1**, 9-18, <https://doi.org/10.1124/mol.63.1.9>.
22. Vercellino, I., and Sazanov, L. A. (2022) The assembly, regulation and function of the mitochondrial respiratory chain, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **2**, 141-161, <https://doi.org/10.1038/s41580-021-00415-0>.
23. Loch, C., and Antoine, R. (1995) A proposed mechanism of ADP-ribosylation catalyzed by the pertussis toxin S1 subunit, *Biochimie*, **5**, 333-340, [https://doi.org/10.1016/0300-9084\(96\)88143-0](https://doi.org/10.1016/0300-9084(96)88143-0).
24. Najimi, M., Gailly, P., Maloteaux, J. M., and Hermans, E. (2002) Distinct regions of C-terminus of the high affinity neurotensin receptor mediate the functional coupling with pertussis toxin sensitive and insensitive G-proteins, *FEBS Lett.*, **1-3**, 329-333, [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(02\)02285-8](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(02)02285-8).
25. Siow, N. L., Choi, R. C. Y., Cheng, A. W. M., Jiang, J. X. S., Wan, D. C. C., Zhu, S. Q., and Tsim, K. W. K. (2002) A Cyclic AMP-dependent pathway regulates the expression of acetylcholinesterase during myogenic differentiation of C2C12 cells, *J. Biol. Chem.*, **39**, 36129-36136, doi:10.1074/jbc.M206498200.
26. Kitzmann, M., Vandromme, M., Schaeffer, V., Carnac, G., Labbé, J. C., Lamb, N., and Fernandez, A. (1999) cdk1- and cdk2-mediated phosphorylation of MyoD Ser200 in growing C2 myoblasts: role in modulating MyoD half-life and myogenic activity, *Mol. Cell. Biol.*, **19**, 3167-3176, <https://doi.org/10.1128/MCB.19.4.3167>.

THE MECHANISM OF STIMULATION OF MYOGENESIS UNDER THE ACTION OF SUCCINIC ACID THROUGH THE SUCCINATE RECEPTOR SUCNR1

**Y. V. Abalenikhina*, M. O. Isayeva, P. Yu. Mylnikov, A. V. Shchulkin,
and E. N. Yakusheva**

Ryazan State Medical University, 390026 Ryazan, Russia; e-mail: abalenikhina88@mail.ru

In a study on cells of the C2C12 line, the effect of succinic acid on the processes of myogenesis was studied. In the concentration range of 10-1000 microns, succinic acid stimulated the process of myogenic differentiation, increasing the number of myogenesis factors MyoD (at all stages of myogenesis) and myogenin (at the stage of terminal differentiation). The Western blot method revealed specific succinate receptors SUCNR1 in C2C12 cells, the level of which decreased during myogenesis. When succinic acid was added to cells, the level of intracellular succinate did not change significantly and decreased during myogenic differentiation. Using a specific Gai protein inhibitor, pertussis toxin, it was found that stimulation of myogenesis of C2C12 under the action of succinic acid is realized through SUCNR1–Gai.

Keywords: myogenesis, succinic acid, SUCNR1, inositol monophosphate, pertussis toxin