

# ЭЛЕКТРОСТИМУЛЯЦИЯ КЛЕТОЧНОЙ КУЛЬТУРЫ C2C12 КАК МОДЕЛЬ ФИЗИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ЧЕЛОВЕКА

УДК/UDC 577.3:612.74

Поступила в редакцию 22.05.2024 г.



Информация для связи с автором:  
adyakova@yandex.ru

Доктор медицинских наук, доцент **Е.Ю. Дьякова**<sup>1</sup>

Аспирант **Юнь Юйфэнь**<sup>1</sup>

Аспирант **Е.А. Юганкина**<sup>1, 2</sup>

**А.Е. Черных**<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Национальный исследовательский Томский государственный университет, Томск

<sup>2</sup>Томский государственный педагогический колледж, Томск

## ELECTRICAL STIMULATION OF C2C12 CELL CULTURE AS A MODEL OF HUMAN PHYSICAL ACTIVITY

Dr. Med., Associate Professor **E.Yu. Dyakova**<sup>1</sup>

Postgraduate student **Yun Yuyfen**<sup>1</sup>

Postgraduate student **E.A. Yugankina**<sup>1, 2</sup>

**A.E. Chernykh**<sup>1</sup>

<sup>1</sup>National Research Tomsk State University, Tomsk

<sup>2</sup>Tomsk State Pedagogical College, Tomsk

### Аннотация

**Цель исследования** – посредством модели физических нагрузок оценить влияние электростимуляции на глюкозотранспортирующий механизм клеточной культуры C2C12.

**Методика и организация исследования.** Для исследования клетки случайно разделили на четыре группы: две группы контрольные и две экспериментальные (с инсулинорезистентностью). Инсулинорезистентность формировали с помощью высокоглюкозной среды (25 мМ). В каждой группе половина клеток подвергалась воздействию электростимуляции, вторая половина оставалась интактной. Половина клеток в каждой подгруппе обрабатывалась инсулином для запуска глюкозотранспортирующего механизма. Маркером работы данного механизма служило содержание в клетках фосфорилированной формы белка Akt (pAkt).

**Результаты исследования и выводы.** Выявлено, что в клетках с инсулинорезистентностью pAkt было меньше, по сравнению с контрольной группой. Добавление инсулина увеличивало содержание pAkt, но его уровень в экспериментальной группе оставался пониженным. Электростимуляция увеличивала концентрацию pAkt во всех группах, доводя уровень данного белка в экспериментальных группах до значений, сравнимых с контрольной группой. Физические нагрузки являются одним из методов лечения различных заболеваний и улучшения как психологического, так и функционального состояния организма. Доказано, что физическая активность положительно влияет на организм при инсулинорезистентности. Моделирование физических нагрузок на клеточных культурах с помощью электростимуляции позволяет выяснить механизмы такого положительного воздействия.

**Ключевые слова:** электростимуляция, модель физических нагрузок, инсулинорезистентность, клеточная культура.

### Abstract

**Objective of the study** was to using a physical exercise model, evaluate the effect of electrical stimulation on the glucose transport mechanism of the C2C12 cell culture.

**Methods and structure of the study.** For the study, the cells were randomly divided into 4 groups: 2 control groups and 2 experimental groups (with insulin resistance). Insulin resistance was formed using a high-glucose medium (25 mM). In each group, half of the cells were exposed to electrical stimulation, the other half remained intact. Half of the cells in each subgroup were treated with insulin to trigger the glucose transport mechanism. The content of the phosphorylated form of the Akt protein (pAkt) in the cells served as a marker for the operation of this mechanism.

**Results and conclusions.** It was found that in cells with insulin resistance, pAkt was lower compared to the control group. The addition of insulin increased pAkt content, but its level in the experimental group remained reduced. Electrical stimulation increased the concentration of pAkt in all groups, bringing the level of this protein in the experimental groups to values comparable to the control group. Physical activity is one of the methods for treating various diseases and improving both the psychological and functional state of the body. It has been proven that physical activity has a positive effect on the body with insulin resistance. Modeling physical activity on cell cultures using electrical stimulation makes it possible to elucidate the mechanisms of such positive effects.

**Keywords:** electrical stimulation, exercise model, insulin resistance, cell culture.

**Введение.** Для достижения целей научных изысканий наиболее востребованным методом исследования является моделирование тех или иных условий, процессов и систем. Например, для изучения влияния физической активности на такое метаболическое расстройство, как инсулинорезистентность, используются нагрузки бегового характера. Аэробные нагрузки считаются основным компонентом любого режима профилактики/лечения инсулинорезистентности [2].

Проведены эксперименты на мышах с целью определения влияния беговых нагрузок при формировании инсулинорезистентности на содержание белков-маркеров в тканях, чувствительных к инсулину: мышц, печени, бурого и белого жира [1, 4, 5]. Было обнаружено, что нагрузки положительно влияют на физическое состояние лабораторных животных. Однако механизм, связанный с глюкозотранспортирующей системой, на целостном организме отследить сложно. Для этой цели подходят эксперименты на клеточных культурах.

Имитацию физических нагрузок проводят с помощью метода электростимуляции на мышечных клетках. Используют при этом либо мышечные культуры из клеточных банков, либо первичные культуры миобластов, выделяемые из мышечной ткани животных. Такой подход позволяет минимизировать влияние неучтенных факторов и изучить отдельные механизмы. Ключевым фактором в реализации глюкозотранспортирующей функции клетки является белок Akt, фосфорилированная форма которого (pAkt) свидетельствует об активации данного пути.

**Цель исследования** – посредством модели физических нагрузок оценить влияние электростимуляции на глюкозотранспортирующий механизм клеточной культуры C2C12.

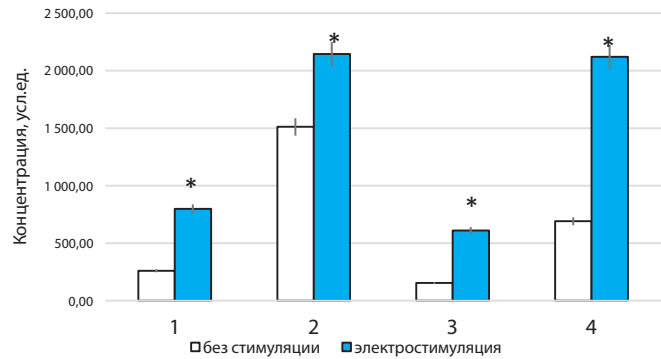
**Методика и организация исследования.** Исследование проводили на клеточной культуре миобластов мыши C2C12 (коллекция клеточных культур Института цитологии РАН, Санкт-Петербург). Клетки высевались с плотностью  $3 \times 10^4$  клеток/лунку в 8 шестилучных планшетов, содержащих среду DMEM с добавлением 5 мМ глюкозы, 10% инaktivированной нагреванием фетальной бычьей сыворотки (FBS), 100 единиц/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина. Клетки хранили в CO<sub>2</sub>-инкубаторе при 37 °C в увлажненной атмосфере. Через пять дней после посева клетки подвергались дифференцировке в среде DMEM, содержащей 5 мМ глюкозы, антибиотики, 2% телячьей сыворотку и 1 нМ инсулина. Морфологию клеток оценивали с помощью фазово-контрастной микроскопии при увеличении  $\times 400$  без предварительной фиксации.

Далее формировали две группы – экспериментальную (ЭГ, 24 лунки) и контрольную (КГ, 24 лунки). В планшетах ЭГ заменяли дифференцировочную среду с 5,5 мМ глюкозы на среду, содержащую 25 мМ глюкозы. В этих клетках формировалась инсулинорезистентность. В планшетах КГ в среду с 5,5 мМ глюкозы добавляли маннитол для уравнивания осмолярности. Клетки помещались на двое суток в CO<sub>2</sub>-инкубатор. Далее клетки подвергали процедуре serumstarvation – сывороточное голодание для приведения их к состоянию базальной активности [3]. Для этого клетки на 1 ч помещались в среду, не содержащую сыворотки, после этого среда заменялась на сывороточную.

Следующим этапом проводили электростимуляцию (в двух планшетах из ЭГ и в двух планшетах КГ) в течение 6 часов. Электроимпульсная стимуляция выполнялась с использованием генератора импульсов C-Pace (C-Pace EP, IonOptix, США) с напряжением 40 В, длительностью стимулов 10 мс и частотой 1 Гц. При этом из каждой группы КГ и ЭГ по два планшета оставались интактными (не подвергались электростимуляции).

После электростимуляции в половину лунок каждой подгрупп добавляли 10 нМ инсулина, а во вторую половину лунок – соответствующее количество сыворотки, планшеты помещали на 30 минут в инкубатор. После клетки промывали PBS и замораживали в жидком азоте. Далее готовили образцы, в которых определяли концентрацию белка методом Лоури. Проводили электрофорез в SDS-полиакриламидном геле в соответствии с методом Лэммли. Белки переносили из геля на нитроцеллюлозную мембрану (BioRad, США). Инкубацию со вторичными антителами, конъюгированными с HRP, проводили в течение 1 ч при комнатной температуре в 5% сухом молоке в PBST. Визуализацию комплексов антиген-антитело осуществляли с помощью набора ECL и ChemiDoc XRS + Molecular Imager (BioRad, США).

Статистическую обработку данных проводили с использованием пакета статистического анализа STATISTICA 12.0. Для проведения статистического анализа использовался U-критерий Манна–Уитни.



Содержание pAkt в образцах миоцитов при электростимуляции (1 – КГ без добавления инсулина, 2 – КГ с добавлением инсулина, 3 – ЭГ без добавления инсулина, 4 – ЭГ с добавлением инсулина)

**Результаты исследования и их обсуждение.** Фосфорилированная форма белка Akt обнаруживалась во всех исследуемых образцах. Концентрация pAkt в образцах, которые помещались в среду с повышенным содержанием глюкозы, была ниже, чем в контрольной группе, что свидетельствует о частично сформированной инсулинорезистентности в экспериментальной группе. При добавлении инсулина содержание pAkt увеличивалось, данный прирост был выше в контрольной группе (см. рисунок).

Из рисунка видно, что электростимуляция приводила к увеличению фосфорилированной формы Akt во всех группах. При этом его содержание в экспериментальной группе было почти таким же, как и в контрольной, при воздействии электростимуляции.

**Вывод.** Электростимуляция клеточной культуры как модель физической активности человека вызывает положительные сдвиги на клеточном уровне, отражающиеся, в частности, на глюкозотранспортирующей системе клетки. Повышение уровня фосфорилированной формы белка Akt после стимуляции свидетельствует о том, что физическая нагрузка при таком метаболическом нарушении, как инсулинорезистентность, повышает доступность клетки для глюкозы, улучшая состояние углеводного обмена организма в целом.

**Литература**

1. Захарова А.Н., Милованова К.Г., Орлова А.А., Коллантай О.В., Шувалов И.Ю., Капилевич Л.В. Окислительное фосфорилирование в ткани бурого жира у мышей с моделью сахарного диабета II типа после принудительных беговых нагрузок / А.Н. Захарова, К.Г. Милованова, А.А. Орлова и др. // Бюллетень сибирской медицины. – 2024. – Т. 23. – № 1. – С. 48 – 55.

**References**

1. Zakharova A.N., Milovanova K.G., Orlova A.A., Kollantay O.V., Shuvalov I.Yu., Kapilevich L.V. Oxidative phosphorylation in brown fat tissue in mice with a model of type II diabetes mellitus after forced running exercises. Byulleten sibirskoy meditsiny, publ. 2024. Vol. 23. No. 1. pp. 48-55.

2. Colberg S.R., Sigal R.J., Yardley J.E., Riddell M.C., Dunstan D.W., Dempsey P.C., Horton E.S., Castorino K., Tate D.F. Physical Activity, Exercise and Diabetes: A Position Statement of the American Diabetes Association. Diabetes Care. 2016. Nov;39(11):2065-2079.

3. Pirkmajer S., Chibalin A.V. Serum starvation: caveat emptor. Am. J. Physiol. Cell Physiol. 2011;301(2):272-279.

4. Zakharova A.N., Kironenko T.A., Milovanova K.G., Orlova A.A., Dyakova E.Yu., Kalinnikova Yu.G., Kabachkova A.V., Chibalin A.V., Kapilevich L.V. Treadmill Training Effect on the Myokines Content in Skeletal Muscles of Mice With a Metabolic Disorder Model. Front Physiol. 2021. Nov 10;12:709039.

5. Zakharova A.N., Kironenko T.A., Milovanova K.G., Orlova A.A., Dyakova E.Yu., Kalinnikova Yu. G., Chibalin A.V., Kapilevich L.V. Effect of Forced Treadmill Running on Skeletal Muscle Myokine Levels in Mice with a Model of Type II Diabetes Mellitus. Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology. 2021. Vol. 57. No. 4. pp. 904-912.