

<https://doi.org/10.29001/2073-8552-2023-38-1-106-109>  
УДК 57.085.23:611-018.6:615.841:577.175.722

## Влияние электростимуляции на содержание pAkt в клеточной культуре миоцитов в условиях гипергликемии

Е.Ю. Дьякова, А.Е. Черных, К.Г. Милованова, А.В. Чибалин, Л.В. Капилевич

Национальный исследовательский Томский государственный университет,  
634050, Российская Федерация, Томск, пр. Ленина, 36

### Аннотация

Проблемы исследования молекулярных механизмов патогенеза, инсулинорезистентности и поиска новых путей их коррекции по-прежнему остаются актуальными.

**Цель:** изучить влияние электростимуляции на содержание pAkt в клеточной культуре миобластов мыши C2C12, культивируемых в условиях гипергликемии.

**Материал и методы.** Изучалось влияние электростимуляции на содержание pAkt в клеточной культуре миобластов мыши C2C12, культивируемых в условиях гипергликемии. Клетки культивировались в среде, содержащей 25 мМ глюкозы и подвергались воздействию электроимпульсной стимуляции в течение 2, 6 и 24 ч.

**Результаты.** Показано, что культивирование миобластов C2C12 в среде с избытком глюкозы сопровождается снижением содержания pAkt в клетках, тогда как импульсная электростимуляция от 2 до 6 ч способствует увеличению содержания данного фермента и восстановлению чувствительности путей его фосфорилирования к воздействию инсулина.

**Заключение.** Полученные результаты позволяют предположить, что сократительная активность мышечных клеток способствует восстановлению чувствительности к инсулину и способности поглощать глюкозу, задействуя те же регуляторные и транспортные пути, которые страдают при развитии сахарного диабета 2-го типа.

|                                              |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
|----------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Ключевые слова:</b>                       | миоциты, инсулинорезистентность, клеточная культура, электростимуляция.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
| <b>Конфликт интересов:</b>                   | авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| <b>Прозрачность финансовой деятельности:</b> | исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда в рамках научного проекта № 19-15-00118, <a href="https://rscf.ru/project/19-15-00118/">https://rscf.ru/project/19-15-00118/</a> .                                                                                                                                                                                  |
| <b>Соответствие принципам этики:</b>         | исследование было одобрено локальным этическим комитетом биологического института ТГУ (протокол № 32 от 02 декабря 2019 г.).                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| <b>Для цитирования:</b>                      | Дьякова Е.Ю., Черных А.Е., Милованова К.Г., Чибалин А.В., Капилевич Л.В. Влияние электростимуляции на содержание pAkt в клеточной культуре миоцитов в условиях гипергликемии. <i>Сибирский журнал клинической и экспериментальной медицины</i> . 2023;38(1):106–109. <a href="https://doi.org/10.29001/2073-8552-2023-38-1-106-109">https://doi.org/10.29001/2073-8552-2023-38-1-106-109</a> . |

## Effect of electrical stimulation on the content of pAkt in myocyte cell culture under hyperglycemia

Elena Y. Dyakova, Anton E. Chernykh, Kseniya G. Milovanova,  
Alexander V. Chibalin, Leonid V. Kapilevich

National Research Tomsk State University,  
36, Lenin str., Tomsk, 634050, Russian Federation

### Abstract

**Introduction.** The problems of studying the molecular mechanisms of pathogenesis, insulin resistance and finding new ways to correct them are still relevant.

**Aim:** To study the effect of electrical stimulation on the amount of pAkt in a cell culture of C2C12 mouse myoblasts cultivated under hyperglycemic conditions.

**Material and Methods.** We studied the effect of electrical stimulation on the amount of pAkt in a cell culture of C2C12 mouse myoblasts cultivated under hyperglycemic conditions. Cells were cultured in a medium containing 25 mM glucose and subjected to electrical impulse stimulation for 2, 6, and 24 hours.

Дьякова Елена Юрьевна, e-mail: [adyakova@yandex.ru](mailto:adyakova@yandex.ru).

**Results.** It has been shown that the cultivation of C2C12 myoblasts in a medium with excess glucose is accompanied by a decrease in the amount of pAkt in cells, while pulsed electrical stimulation from 2 to 6 hours increases the concentration of this enzyme and restores the sensitivity of its phosphorylation pathways to insulin.

**Conclusions.** The results obtained suggest that the contractile activity of muscle cells contributes to the restoration of cell sensitivity to insulin and the ability to absorb glucose, using the same regulatory and transport pathways that are affected in the development of type 2 diabetes.

|                                        |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
|----------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Keywords:</b>                       | myocytes, insulin resistance, cell culture, electrical stimulation.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| <b>Conflict of interest:</b>           | the authors do not declare a conflict of interest                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| <b>Financial disclosure:</b>           | the reported study was funded by RSF according to the research project No. 19-15-00118, <a href="https://rscf.ru/project/19-15-00118/">https://rscf.ru/project/19-15-00118/</a> .                                                                                                                                                                                                                     |
| <b>Adherence to ethical standards:</b> | the study was approved by the local ethics committee of the TSU Biological Institute (protocol No. 32 dated December 02, 2019).                                                                                                                                                                                                                                                                       |
| <b>For citation:</b>                   | Dyakova E.Y., Chernykh A.E., Milovanova K.G., Chibalin A.V., Kapilevich L.V. Effect of electrical stimulation on the content of pAkt in myocyte cell culture under hyperglycemia. <i>The Siberian Journal of Clinical and Experimental Medicine</i> . 2023;38(1):106–109. <a href="https://doi.org/10.29001/2073-8552-2023-38-1-106-1009">https://doi.org/10.29001/2073-8552-2023-38-1-106-1009</a> . |

## Введение

Проблемы исследования молекулярных механизмов патогенеза, инсулинорезистентности и поиска новых путей их коррекции по-прежнему остаются актуальными, так как эти состояния оказывают существенное влияние на качество и продолжительность жизни человека, во многом определяют процессы здорового старения и работоспособности в старшем возрасте [1]. Особый интерес вызывают позитивные эффекты физических нагрузок, которые способствуют снижению инсулинорезистентности и восстановлению способности мышечных клеток утилизировать глюкозу [2]. Однако механизмы реализации этого эффекта до настоящего времени остаются дискуссионными. Перспективным путем их изучения являются эксперименты на клеточных культурах [3, 4].

Цель: изучить влияние электростимуляции на содержание pAkt в клеточной культуре миоцитов мыши C2C12, культивируемых в условиях гипергликемии.

## Материал и методы

Работа выполнялась на клеточной культуре миоцитов мыши C2C12 (источник – коллекция клеточных культур Института цитологии РАН, Санкт-Петербург). Клетки высевались с плотностью  $3 \times 10^4$  клеток/лунку в 16 шестилуночных планшетов, содержащих среду Игла, модифицированную Дульбекко (DMEM), с добавлением 5 mM глюкозы, 10% инактивированной нагреванием фетальной бычьей сыворотки (FBS), 100 единиц/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина и хранили при 37 °C в увлажненной атмосфере с 5% CO<sub>2</sub>. Через 3–5 дней после посева, когда клетки достигали 70–80% конфлюэнтности, они подвергались дифференцировке в среде DMEM, содержащей 5 mM глюкозы, антибиотики, 2% телячью сыворотку и 1 nM инсулин. Среду дифференцировки меняли ежедневно. Морфологию клеток оценивали с помощью фазово-контрастной микроскопии при увеличении  $\times 400$  без предварительной фиксации.

После окончания дифференцировки планшеты с клетками случайным образом разделялись на две группы – экспериментальную (ЭГ, 48 лунок) и контрольную (КГ, 48 лунок). В планшетах ЭГ заменяли дифференцировочную среду с 5,5 mM глюкозы на среду, содержащую 25 mM глюкозы. В планшетах КГ в среду с 5,5 mM глюкозы до-

бавляли маннитол для уравнивания осмолярности. Клетки помещались на 2 дня в инкубатор.

Далее клетки подвергали электростимуляции (которую мы рассматривали как моделирование физической нагрузки). Для того чтобы привести все клетки к состоянию базальной активности, в каждой группе проводили метод serum starvation – сывороточное голодание [5]. Для этого клетки на 1 ч помещались в среду, не содержащую сыворотки, после этого среда заменялась на сывороточную.

Каждая группа разделялась на 4 подгруппы по 12 лунок. Одна подгруппа в каждой группе оставалась интактной, а три – подвергались воздействию электроимпульсной стимуляции в течение 2, 6 и 24 ч соответственно. 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.

Сразу после завершения электростимуляции в 6 лунок в каждой подгруппе добавляли 10 нм инсулина, а в 6 лунок – аналогичное количество сыворотки, после чего планшеты помещали в инкубатор на 30 мин, затем клетки промывали PBS и замораживали в жидком азоте. Материал хранили в морозильной камере при температуре –80 °C.

Клеточные лизаты получали солиubilизацией клеточных преципитатов в 1 x PBS (pH 7,4) и повторным замораживанием и плавлением. Концентрацию белка определяли с помощью метода Лоури. Электрофорез в SDS-полиакриламидном геле проводили в соответствии с методом Лэммли с 5% стекирующим гелем и 12% бегущим гелем. Белки переносили из геля на нитроцеллюлозную мембрану (BioRad, США) с последующим блокированием 5% сухим молоком (Valio, Финляндия) в 1 x PBST (PBS с добавлением Tween 20 0,1%) в течение 1 ч при комнатной температуре. Обнаружение скелетного тропонина-T с использованием инкубации в течение ночи с 10 мкг/мл антител к тропонину-T каждое при 4 °C в 5% сухом молоке в PBST. Инкубацию с 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).

Для контроля состояния глюкозотранспортирующих систем определяли содержание фосфорилированной

формы протеинкиназы pAkt. Определение выполняли методом вестерн-блот с применением специфических антител anti-pAkt (ser427).

Статистическую обработку данных проводили с использованием пакета статистического анализа STATISTICA 8.0. Нормальность распределения показателя в сравниваемых группах оценивали по критерию Шапиро – Уилка. Так как гипотеза о нормальности распределения показателей не подтверждалась, концентрации белка pAkt в подгруппах представлены медианами ( $Me$ ) и межквартильными интервалами ( $Q_1$ ;  $Q_3$ ), а для проверки гипотезы об отсутствии различий в независимых подгруппах использовали непараметрический критерий Манна – Уитни. Различия считали значимыми при достигнутом уровне значимости  $p < 0,05$ .

Исследование было одобрено локальным этическим комитетом Биологического института ТГУ (протокол № 32 от 02 декабря 2019 г.).

## Результаты

Белок pAkt обнаруживался во всех исследуемых образцах. В ЭГ его содержание было ниже, чем в КГ. Добавление инсулина приводило к достоверному увеличению содержания pAkt в обеих группах, однако в КГ прирост был значительно выше, чем в ЭГ (таблица). Очевидно, что в данной модели инсулинорезистентность формируется лишь частично.

После 2-часовой электроимпульсной стимуляции наблюдалось некоторое увеличение содержания pAkt в обеих группах. После добавления инсулина прирост фосфорилированной формы фермента был выше, чем в подгруппе без стимуляции, особенно существенный прирост отмечался в ЭГ. После 6-часовой электроимпульсной стимуляции прирост содержания pAkt был более выражен, чем после 2 ч. Однако после 24-часовой электроимпульсной стимуляции мы наблюдали значительное снижение прироста содержания pAkt во всех подгруппах клеток. Возрастание содержания pAkt при добавлении инсулина наблюдалось и в ЭГ, и в КГ в равной степени.

**Таблица.** Содержание pAkt в образцах гомогенизированных миоцитов после воздействия электростимуляции

**Table.** pAkt content in samples of homogenized myocytes after electrical stimulation

| Стимуляция<br>Stimulation             | Предобработка<br>Pretreatment | Группы (Groups) $Me (Q_1; Q_3)$ |                                   |
|---------------------------------------|-------------------------------|---------------------------------|-----------------------------------|
|                                       |                               | Контрольная<br>Control          | Экспериментальная<br>Experimental |
| Без стимуляции<br>Without stimulation | Интakтные<br>Intact           | 261 (229; 295)                  | 155 (127; 179)*                   |
|                                       | Инсулин<br>Insulin            | 1512 (1458; 1577)#              | 692 (655; 738)*#                  |
| 2 ч (2 hours)                         | Интakтные<br>Intact           | 499 (462; 439)                  | 611 (668; 741)*                   |
|                                       | Инсулин<br>Insulin            | 1855 (1764; 1929)#              | 1452 (1399; 1507)*#               |

## Литература / References

1. Cloete L. Diabetes mellitus: an overview of the types, symptoms, complications and management. *Nurs. Stand.* 2022;37(1):61–66. DOI: 10.7748/ns.2021.e11709.
2. Gabriel B.M., Zierath J.R. The limits of exercise physiology: from per-

Окончание табл.  
End of table

| Стимуляция<br>Stimulation | Предобработка<br>Pretreatment | Группы (Groups) $Me (Q_1; Q_3)$ |                                   |
|---------------------------|-------------------------------|---------------------------------|-----------------------------------|
|                           |                               | Контрольная<br>Control          | Экспериментальная<br>Experimental |
| 6 ч (6 hours)             | Интakтные<br>Intact           | 611 (571; 559)                  | 799 (755; 8420)*                  |
|                           | Инсулин<br>Insulin            | 2145 (2033; 2227)#              | 2120 (2048; 2204)#                |
| 24 ч (24 hours)           | Интakтные<br>Intact           | 428 (381; 484)                  | 497 (448; 562)                    |
|                           | Инсулин<br>Insulin            | 1045 (989; 1112)#               | 981 (931; 1039)#                  |

Примечание: \* – достоверность различий между экспериментальной и контрольной группой,  $p < 0,05$ ; # – достоверность различий между интактными клетками и клетками, стимулированными инсулином,  $p < 0,05$ .

Note: \* – significance of differences between the experimental and control groups,  $p < 0.05$ ; # – significance of differences between intact cells and cells stimulated by insulin,  $p < 0.05$ .

Таким образом, культивирование миоцитов C2C12 в среде с избытком глюкозы сопровождается снижением содержания p-Akt в клетках, тогда как импульсная электростимуляция от 2 до 6 ч способствует увеличению содержания данного фермента и восстановлению чувствительности путей его фосфорилирования к воздействию инсулина.

## Обсуждение

Akt представляет собой серин- или треонинкиназу. Akt играет решающую роль в развитии инсулинорезистентности мышечной и жировой ткани, регулируя стимулированный инсулином перенос GLUT4, изменения активности Akt обнаруживаются в различных клетках при диабете и инсулинорезистентности. Фосфорилирование Akt снижается в адипоцитах и скелетных мышцах пациентов с сахарным диабетом 2-го типа. В адипоцитах активация Akt2 тесно коррелирует с транслокацией GLUT4 посредством активирования инсулином [6, 7]. У мышей с нокаутом Akt2 или Akt3, но не Akt1, развивается диабет с гипергликемией, гиперинсулинемией, нарушениями транспорта и поглощения глюкозы в мышцах [6].

## Заключение

Полученные результаты позволяют предположить, что сократительная активность мышечных клеток способствует восстановлению чувствительности клеток к инсулину и способности поглощать глюкозу, задействуя те же регуляторные и транспортные пути, которые страдают при развитии сахарного диабета 2-го типа. Эти данные могут быть особенно полезны в широкой области исследований молекулярного механизма поглощения глюкозы миоцитами, резистентности к инсулину, диабета и ожирения.

formance to health. *Cell Metab.* 2017;25(5):1000–1011. DOI: 10.1016/j.cmet.2017.04.018.

3. Luo W., Ai L., Wang B.F., Zhou Y. High glucose inhibits myogenesis and induces insulin resistance by down-regulating AKT signaling. *Biomed. Pharmacother.* 2019;120:109498. DOI: 10.1016/j.biopha.2019.109498.
4. Zhang L., Wang J., Zhao Y.T., Dubielecka P., Qin G., Zhuang S. et al.

- Deletion of PRAK Mitigates the Mitochondria Function and Suppresses Insulin Signaling in C2C12 Myoblasts Exposed to High Glucose. *Front. Pharmacol.* 2021;12:698714. DOI: 10.3389/fphar.2021.698714.
5. Pirkmajer S., Chibalin A.V. Serum starvation: caveat emptor. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2011;301(2):272–279. DOI: 10.1152/ajpcell.00091.2011.
  6. Kim B., Feldman E.L. Insulin resistance in the nervous system. *Trends Endocrinol. Metab.* 2012;23(3):133–141. DOI: 10.1016/j.tem.2011.12.004.
  7. Kang S., Kim C.-H., Jung H., Kim E., Song H.-T., Lee J.E. Agmatine ameliorates type 2 diabetes induced-Alzheimer's disease-like alterations in high-fat diet-fed mice via reactivation of blunted insulin signaling. *Neuropharmacology.* 2017;113(Part A):467–479. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2016.10.029.

## Информация о вкладе авторов

Дьякова Е.Ю. участвовала в разработке общей концепции и дизайна исследования, проведении исследования, получении, анализе и интерпретации данных, написала первую версию рукописи, подготовила ее для публикации.

Черных А.Е. участвовал в проведении исследования, получении, анализе и интерпретации данных.

Милованова К.Г. участвовала в разработке общей концепции и дизайна исследования, проведении исследования, получении, анализе и интерпретации данных.

Чибалин А.В. участвовал в создании концепции и дизайна исследования, внес вклад в доработку исходного варианта рукописи.

Капилевич Л.В. участвовал в создании концепции и дизайна исследования, внес вклад в доработку исходного варианта рукописи.

## Information on author contributions

Dyakova E.Y. – contribution to the development of the general concept and design of the study; study completion; data generation, analysis, and interpretation; writing the first version of the manuscript; and preparation of the manuscript for publication.

Chernykh A.E. – participation in the study, data obtaining, analyzing and interpreting.

Milovanova K.G. – contribution to the development of the general concept and design of the study; study completion; data generation, analysis, and interpretation.

Chibalin A.V. – participation in concept development and design of the study and contribution to the revision of the manuscript original version.

Kapilevich L.V. – participation in concept development and design of the study and contribution to the revision of the manuscript original version.

## Сведения об авторах

**Дьякова Елена Юрьевна**, д-р мед. наук, доцент, профессор кафедры спортивно-оздоровительного туризма, спортивной физиологии и медицины, факультет физической культуры, Национальный исследовательский Томский государственный университет. ORCID 0000-0001-7653-2386.

E-mail: [adyakova@yandex.ru](mailto:adyakova@yandex.ru).

**Черных Антон Евгеньевич**, студент, факультет физической культуры, Национальный исследовательский Томский государственный университет. ORCID 0000-0002-6802-4987.

E-mail: [anthonyairblack@gmail.com](mailto:anthonyairblack@gmail.com).

**Милованова Ксения Геннадьевна**, канд. биол. наук, доцент, кафедра спортивно-оздоровительного туризма, спортивной физиологии и медицины, факультет физической культуры, Национальный исследовательский Томский государственный университет. ORCID 0000-0002-3038-3298.

E-mail: [naffys@mail.ru](mailto:naffys@mail.ru).

**Чибалин Александр Валерьевич**, канд. мед. наук, доцент кафедры спортивно-оздоровительного туризма, спортивной физиологии и медицины, факультет физической культуры, Национальный исследовательский Томский государственный университет. ORCID 0000-0002-6339-6271.

E-mail: [alexander.chibalin@ki.se](mailto:alexander.chibalin@ki.se).

**Капилевич Леонид Владимирович**, д-р мед. наук, профессор, заведующий кафедрой спортивно-оздоровительного туризма, спортивной физиологии и медицины, факультет физической культуры, Национальный исследовательский Томский государственный университет. ORCID 0000-0002-2316-576X.

E-mail: [kapil@yandex.ru](mailto:kapil@yandex.ru).

## Information about the authors

**Elena Y. Dyakova**, Dr. Sci. (Med.), Associate Professor, Professor, Department of Sports and Health Tourism, Sports Physiology and Medicine, Faculty of Physical Education, National Research Tomsk State University. ORCID 0000-0001-7653-2386.

E-mail: [adyakova@yandex.ru](mailto:adyakova@yandex.ru).

**Anton E. Chernykh**, Student, Faculty of Physical Education, National Research Tomsk State University. ORCID 0000-0002-6802-4987.

E-mail: [anthonyairblack@gmail.com](mailto:anthonyairblack@gmail.com).

**Kseniya G. Milovanova**, Cand. Sci. (Biol.), Associate Professor, Department of Sports and Health Tourism, Sports Physiology and Medicine, Faculty of Physical Education, National Research Tomsk State University. ORCID 0000-0002-3038-3298.

E-mail: [naffys@mail.ru](mailto:naffys@mail.ru).

**Alexander V. Chibalin**, Cand. Sci. (Med.), Associate Professor, Department of Sports and Health Tourism, Sports Physiology and Medicine, Faculty of Physical Education, National Research Tomsk State University. ORCID 0000-0002-6339-6271.

E-mail: [alexander.chibalin@ki.se](mailto:alexander.chibalin@ki.se).

**Leonid V. Kapilevich**, Dr. Sci. (Med.), Professor, Head, Department of Sports and Health Tourism, Sports Physiology and Medicine, Faculty of Physical Education, National Research Tomsk State University. ORCID 0000-0002-2316-576X.

E-mail: [kapil@yandex.ru](mailto:kapil@yandex.ru).

✉ **Elena Y. Dyakova**, e-mail: [adyakova@yandex.ru](mailto:adyakova@yandex.ru).

Received October 21, 2022

✉ **Дьякова Елена Юрьевна**, e-mail: [adyakova@yandex.ru](mailto:adyakova@yandex.ru).

Поступила 21.10.2022