

МЕХАНИЗМЫ ИЗМЕНЕНИЯ СОКРАТИТЕЛЬНОЙ ФУНКЦИИ ПОПЕРЕЧНО-ПОЛОСАТЫХ МЫШЦ МЫШИ *IN VITRO* ПРИ БЕЛКОВОЙ СЕНСИБИЛИЗАЦИИ. УЧАСТИЕ АТФ

Изучалось участие АТФ в механизмах влияния белковой сенсibilизации (БС) на сократительную функцию и некантовую секрецию ацетилхолина в зоне концевой пластинки (Н-эффект) изолированных скелетных мышц голени (*m. soleus* и *m. extensor digitorum longus* (*m. EDL*)) и полосок *m. diaphragma* мышцы. У *m. soleus* и *m. diaphragma* динамика вектора силы мышечного сокращения коррелирует с изменениями Н-эффекта во всех изучаемых экспериментальных моделях. Однако степень этих изменений у сенсibilизированных животных менее выражена. Предполагается, что АТФ является участником механизмов изменения функциональных свойств *m. soleus* и *m. diaphragma* при БС и отражает развитие механизмов резистентности в этих мышцах к внешним нагрузкам. Причины изменения силы сокращения *m. EDL* при БС не связаны с АТФ-опосредованными механизмами возбуждения мышцы.

Ключевые слова: сократительные свойства, некантовая секреция ацетилхолина, *m. diaphragma*, *m. soleus*, *m. extensor digitorum longus*, мышшь, белковая сенсibilизация, АТФ.

Развитие бронхиальной астмы сопровождается изменением функционального состояния дыхательных мышц, и, в первую очередь диафрагмы. Белковая сенсibilизация (БС) мышцей – экспериментальная модель, которая широко распространена в практике исследования патогенеза аллергических заболеваний [9]. Диафрагма является «смешанной» мышцей и состоит как из «быстрых», так и «медленных» мышечных волокон (МВ) [5]. Ранее нами было показано, что при БС сократительные свойства полоски диафрагмы и «быстрой» и «медленной» скелетной мышцы (СМ) голени мышцы *in vitro* [9] претерпевают существенные, разнонаправленные изменения. Причем, основная роль в механизмах этих изменений отводится холиноопосредованным процессам возбуждения постсинаптической мембраны.

Ранее была показана способность экзогенной АТФ обратимо изменять сократительную функцию и величину некантовой секреции ацетилхолина вышперечисленных мышц несенсibilизированных мышцей [4]. В качестве кофактора синаптической передачи АТФ влияет на процессы возбуждения МВ. Кроме того, АТФ участвует в механизмах генерации иммунного ответа [7].

Цель работы

Изучение роли экзогенной АТФ в механизмах изменения сократительной функции изолированных поперечно-полосатых мышцей мышцей при БС: «медленной» – камбаловидной (*m. soleus*), «смешанной» – диафрагмальной (*m. diaphragma*) и «быстрой» – длинного разгибателя пальцев (*m. extensor digitorum longus* – *m. EDL*).

Проведено комплексное исследование. У интактных и сенсibilизированных мышцей сравнивались результаты влияния экзогенной АТФ на: 1) показатели сократительного ответа мышцей, вызываемого агонистом – холиномиметиком карбахолоном (КХ) и 2) величину некантовой секреции ацетилхолина (АХ) в зоне концевой пластинки.

Материалы и методы

Эксперименты проводились на белых мышцах, обоего пола, массой тела 17-22 г. Животные сенсibilизировались овальбумином (ОА) с гелем гидроокиси алюминия (2 мкг сухого вещества геля + 150 мкг ОА в 0,5 мл физиологического раствора, «Sigma», USA) парентерально, дважды [3]. Вторая инъекция – через 14 дней после первой. В эксперимент животные забирались на пике сенсibilизации – на 7-10 день после второй сенсibilизирующей инъекции. Механомиографические исследования проводились на препарате изолированной мышцей в условиях изометрии, которая достигалась растяжением СМ в течение 20 минут с силой 0,5 г при постоянной перфузии раствором Кребса и температурном режиме – 20-21°С. Сокращение регистрировалось фотоэлектрическим преобразователем [2]. Агонист – КХ исследовался в субмаксимальных концентрациях, которые составляли для: *m. soleus* – 5×10^{-4} М, *m. diaphragma* – 2×10^{-4} М, *m. EDL* – 7×10^{-4} М. Оценивалась сила (Рос) сокращения мышцей на КХ.

Для изучения состояния постсинаптической мембраны МВ в области концевой пластинки, с помощью стеклянных микроэлектродов (сопротивлением 8-12 МΩ, заполненных 2,5 М КСl) измеряли некантовую секрецию Ах [9]. Для опре-

деления ее величины сначала армином («Татхим-фармпрепараты», Россия) устранялось действие ацетилхолинэстеразы, после чего на мышцу в течение 8-12 минут апплицировался блокатор Н-холинорецепторов d-тубокурарин (ТБК – 10^{-5} М). Разница значений мембранного потенциала (МП) до и после аппликации ТБК соответствует величине некантовой секреции АХ (Н-эффект).

Влияние на мышцы АТФ («Boehringer Mannheim GmbH», Germany) оценивалось сравнением показателей сокращения до и после 5 минутной перфузии их раствором, содержащим АТФ в заданной молярной концентрации (1×10^{-4} М); время действия ее на мышцу определялось длительностью перфузии.

Полученные результаты подвергались статистической обработке (BIostatistica, S.A. Glantz, McGraw Hill).

Результаты исследования

У *m. soleus* несенсибилизированной мыши инкубация с АТФ увеличивает P_{oc} со $180,5 \pm 6,8$ до $224,3 \pm 12,9$ мг ($p < 0,01$). В условиях БС инкубация с АТФ увеличивает P_{oc} *m. soleus* с $235,67 \pm 19,55$ до $264,33 \pm 21,09$ мг ($p < 0,01$). Изучение некантовой секреции Ах *m. soleus* несенсибилизированной мыши показало, что инкубация с АТФ снижала значение Н-эффекта с $5,0 \pm 0,7$ до $1,0 \pm 0,5$ мВ ($p < 0,05$). При БС инкубация с АТФ снижала значение Н-эффекта с $3,1 \pm 0,6$ до $2,1 \pm 0,5$ мВ ($p < 0,05$).

У *m. diaphragma* несенсибилизированной мыши инкубация с АТФ увеличивает P_{oc} с $335,2 \pm 93,47$ до $425,2 \pm 100,9$ мг ($p < 0,05$). В условиях БС инкубация с АТФ увеличивает P_{oc} с $469,83 \pm 86,78$ до $540,67 \pm 80,34$ мг ($p < 0,05$). Н-эффект у *m. diaphragma* несенсибилизированной мыши при инкубации с АТФ снижался с $5,2 \pm 0,4$ до $1,5 \pm 0,5$ мВ ($p < 0,001$). При БС инкубация с АТФ снижала значение Н-эффекта с $4,4 \pm 0,5$ до $2,4 \pm 0,6$ мВ ($p < 0,001$).

У *m. EDL* несенсибилизированной мыши инкубация с АТФ снижает P_{oc} , с $75,2 \pm 5,43$ до $52,4 \pm 5,8$ мг ($p < 0,01$). В условиях БС инкубация с АТФ приводила к снижению P_{oc} *m. EDL* с $59,5 \pm 3,3$ до $44,5 \pm 3,3$ мг ($p < 0,01$). Н-эффект *m. EDL* несенсибилизированной мыши при инкубации с АТФ практически не изменялся: $5,1 \pm 0,4$ мВ до инкубации и $4,8 \pm 0,5$ мВ ($p > 0,05$) после инкубации. В условиях БС инкубация с АТФ так же практически не изменяла этот показатель: $5,8 \pm 0,5$ мВ до инкубации и $5,3 \pm 0,5$ мВ ($p > 0,05$) после инкубации.

Обсуждение

Показано, что БС изменяет сократительную функцию всех изученных нами мышц мыши. При-

чем, характер изменений для «быстрой» мышцы с одной стороны, «смешанной» и «медленной» с другой существенно различается. Причины этого кроются как в исходных различиях их морфо-функционального статуса [5,6], так и в механизмах, обеспечивающих эти изменения в процессе аллергической перестройки организма. Необходимо отметить, что у мышей нет поперечно-полосатых мышц, состоящих только из «медленных» *MV*. *M. soleus* содержит 50-60% «медленных» *MV*, *m. EDL* на 97-100% состоит из «быстрых» [6]. *M. diaphragma* с 88,6% быстрого миозина [5] занимает между ними промежуточное положение.

При БС сила сокращения «быстрой» мышцы на КХ снижается, «медленной» и «смешанной» возрастает. Разнонаправленность этих изменений свидетельствует, что обнаруженные различия отражают, в первую очередь, состояния поверхностной мембраны [1] и холиноопосредованные процессы ее возбуждения. Сопоставление динамики силы с изменением уровня некантовой секреции Ах в зоне концевой пластинки (Н-эффекта) подтверждают это предположение. При БС вектор изменения силы коррелирует с изменением Н-эффекта. Логично предположить, что у «смешанной» и «медленной» мышц увеличение силы сокращения на Кх является следствием увеличения чувствительности постсинапса к холиномиметику, отражением чего является снижение Н-эффекта (Рисунок 1, 2). Снижение некантовой секреции Ах в зоне синапса вызывает снижение интенсивности механизмов десенситизации холинорецепторов (ХР) постсинаптической мембраны. Соответственно, у «быстрой» мышцы наблюдается обратная картина. Снижение силы сокращения на КХ является следствием уменьшения чувствительности ее постсинапса к холиномиметику, что проявляется в увеличении Н-эффекта (Рисунок 3).

Причины обнаруженной вариабельности функциональных свойств изучаемых мышц при БС заключаются, возможно, в механизмах выделения кофакторов синаптической передачи. Исходя из данных Tsai TL et al. [10], показавших роль АТФ в генерации иммунного ответа мы предположили возможное участие пуринов в процессах изменения функции поперечно-полосатых мышц при БС. Это подсказало нам идею изучения, в рамках выбранных экспериментальных моделей динамики функциональных свойств изучаемых мышц (полоски *m. Diaphragma*, *m. Soleus* и *m. EDL*) сенсибилизированных и интактных мышей до и после инкубации их с АТФ.

Наши исследования, подтвердившие полученные ранее результаты [4] показали, что АТФ повышает силу сокращения на КХ у полоски

m.Diaphragma и m.Soleus и снижает этот показатель у m.EDL. Уровень некантовой секреции АХ у m.Diaphragma и m.Soleus снижается, у m.EDL не изменяется. У m.Diaphragma и m.Soleus вектор динамики силы и величины Н-эффекта при влиянии АТФ совпадал с таковыми при БС, что позволило предположить нам последовательность событий, когда увеличение силы сокращения является следствием возрастания чувствительности постсинапса к холинмиметику (Рисунок 1, 2). В условиях сенсбилизации влияние АТФ на динамику вышеперечисленных свойств и у m.Diaphragma, и у m.Soleus демонстрирует ту же направленность, что указывает на отсутствие принципиальных различий в механизмах влияния пуринов на «медленную» и «смешанную» мышцы

интактных и сенсбилизированных мышцей (Рисунок 1, 2).

Однако, если АТФ увеличивала силу сокращения m.Diaphragma интактных животных на 26,8%, то у сенсбилизированных – лишь на 15,1%. Н-эффект у этой мышцы несенсбилизированных мышцей после влияния АТФ снижался до 28,8% от исходного, у сенсбилизированных же лишь до 54,5%. Менее выраженная динамика функциональных свойств m.Diaphragma, вызванная АТФ у сенсбилизированных мышцей в сравнении с контролем позволяет нам предполагать ее участие в механизмах функциональных изменений дыхательных мышц при БС.

У «медленной» мышцы динамика функциональных свойств имеет сходную картину. Если

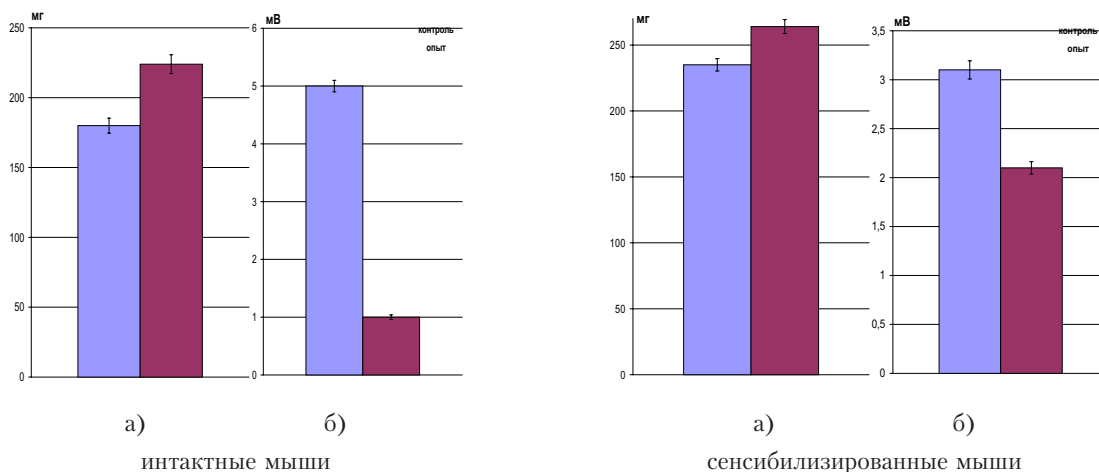


Рисунок 1. Функциональные характеристики изолированной m.soleus интактных (n=8) и сенсбилизированных (n=6) мышцей до (контроль) и после (опыт) влияния АТФ: а) сила сокращения, вызванного Кх (5x10⁻⁴ М) б) величина Н эффекта (n=150)

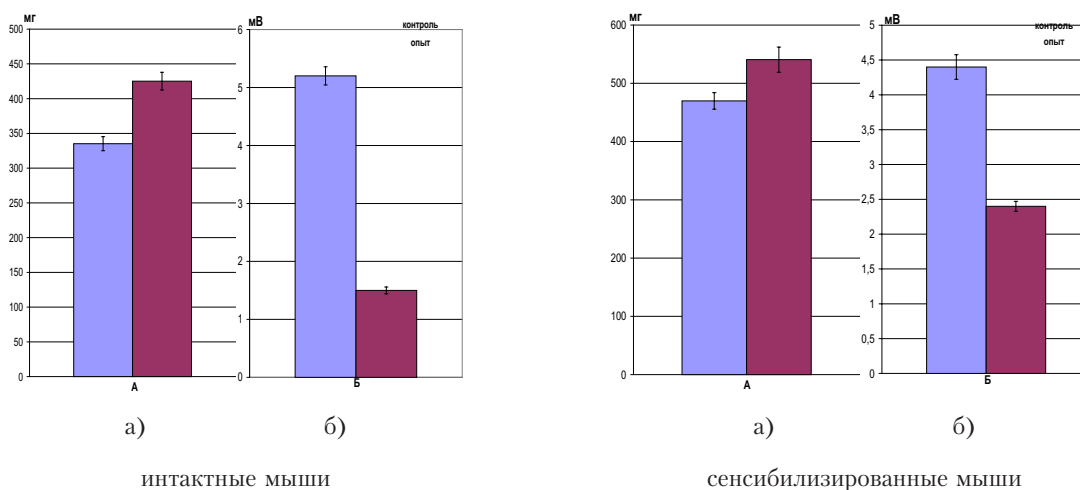


Рисунок 2. Функциональные характеристики изолированной полоски диафрагмы интактной (n=10) и сенсбилизированной (n=7) мышцей до (контроль) и после (опыт) влияния АТФ: а) сила сокращения, вызванного Кх (2x10⁻⁴ М) б) величина Н эффекта (n=150)

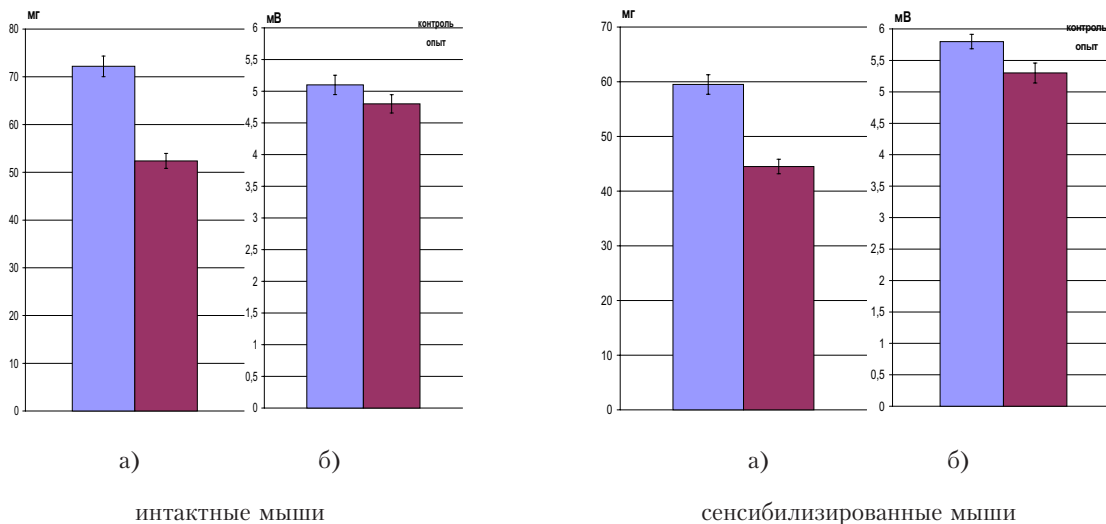


Рисунок 3. Функциональные характеристики изолированной m.EDL интактной (n=8) и сенситизированной (n=6) мышцы до (контроль) и после (опыт) влияния АТФ: а) сила сокращения, вызванного Кх (7×10^{-4} М) б) величина Н эффекта (n=150)

сила сокращения m.soleus интактных животных после влияния АТФ возросла на 24,3%, то у сенситизированных – лишь на 12,2%. Н-эффект m.soleus несенситизированных мышцей после влияния АТФ снижался до 20% от исходного, у сенситизированных же лишь до 67,7%. Менее выраженная динамика функциональных свойств m.soleus, вызванная АТФ у сенситизированных мышцей в сравнении с контролем так же позволяет нам предполагать ее участие в механизмах функциональных изменений «медленных» мышц при БС (Рисунок 1).

У m.EDL интактных животных снижение силы сокращения после влияния АТФ (до 72,6%) практически не отличалась от таковой у сенситизированных (до 74,8%). Н-эффект m.EDL после влияния АТФ достоверно не менялся ни у интактных ни у сенситизированных мышцей. Отсутствие различий в изменении силы сокращения и уровня некантовой секреции АХ после влияния АТФ у обеих групп животных свидетельствует о неучастии пуринов в механизмах изменения сократительной функции «быстрой» мышцей, вызванных БС (Рисунок 3).

Возможные пути влияния АТФ в наших экспериментальных моделях весьма разнообразны и включают в себя прямое действие пуринов на контрактильные структуры, секрецию медиатора, системы внутриклеточных посредников [4] и работу АТФ-

зависимых калиевых каналов [10]. Кроме того, можно предположить участие АТФ на некоторых этапах генерации иммунного ответа. В частности, в литературе показано, что АТФ, увеличивая продукции интерлейкина-1 способна усиливать специфическое звено иммунитета [7]. Внеклеточная АТФ при генерации иммунного ответа помогает образованию активной каспазы-1, что в свою очередь обеспечивает секрецию биологически активных форм интерлейкина-1. Гиперэкспрессия рецептора P_2X_7 приводит к секреции зрелого интерлейкина-1Я [8].

Выводы.

При белковой сенситизации снижается динамика функциональных свойств диафрагмы мышцей, вызванная экзогенной АТФ. Это свидетельствует о развитии механизмов резистентности дыхательных мышцей к внешним нагрузкам, возникающих при обструктивных формах нарушения внешнего дыхания аллергической природы.

Наличие сходных изменений у «медленной» m.soleus мышцей и их отсутствие у «быстрой» m.EDL позволяет предположить, что обнаруженные механизмы компенсации основной дыхательной мышцей при бронхиальной астме определяются изменениями в «медленных» мышечных волокнах. В изменении сократительной функции «быстрой» мышцей при БС можно ожидать участие иных, не связанных с АТФ механизмов.

12.10.2011

Список литературы:

1. Адо А.Д., Стомахина Н.В., Тулуевская Л.М. и др. Белковые спектры и фосфолипидный состав мембран, обогащенных холинорецепторами из скелетных мышцей крыс в условиях сенситизации // Бюлл. эксп. биол. Медицины.- 1984.- Т.99.- №7.- с.84-86.
2. Ахметзянов Р.Х., Филиппов Е.Б. Измерение силовых характеристик мышечных волокон с помощью фотоэлектрического преобразователя // Физиол. ж. СССР.- 1986.- т.72.- №3.- с.387-390.

3. Гушин И.С., Зебрева А.И., Богуш Н.Л. и др. Экспериментальная модель для разработки и оценки способов контроля немедленной аллергии // Патол. физиол. и эксперимент. Терапия.- 1986.- №4.- с.18-23.
4. Фархутдинов А.М., Теплов А.Ю. Механизмы влияния экзогенной АТФ на сократительную функцию изолированных поперечно-полосатых мышц мыши // Вестник Санкт-Петербургского университета.- Сер11.- вып.2.- 2010.- с.238-244.
5. Blank S., Chen V, Ianuzzo CD. Biochemical characteristics of mammalian diaphragms // Respir. Physiol.- 1988.- V.74.- № 1.- P.115-125.
6. Florendo J.A., Reger J.F., Law P.K. Electrophysiologic differences between mouse extensor digitorum longus and soleus // Exp. Neurol.- 1983.- Nov.82(2).- с.404-412.
7. Mariathasan S., Monack M. Inflammasome adaptors and sensors: intracellular regulators of infection and inflammation // Nat.Rev.Immunol.- 2007.- V.7.- p.31-40.
8. Solle M, Labasi J., Perregaux D. et al. Altered cytokine production in mice lacking P2X(7) receptors // J.Biol.Chem.- 2001.- v.276.- p.125-132.
9. Teplov A., Grishin S, Mukhamedyarov M, et al. Ovalbumin-induced sensitization affects non-quantal acetylcholine release from motor nerve terminals and alters contractility of skeletal muscles in mice // Exp. Physiol.- 2009.- Feb.94(2).- p.264-268.
10. Tsai TL, Chang SY, Ho CY. et al. Role of ATP in the ROS-mediated laryngeal airway hyperreactivity induced by laryngeal acid-pepsin insult in anesthetized rats // J. Appl. Physiol.- 2009.- May.106(5).- p.1584-92.

Сведения об авторах: **Торшин Владимир Иванович**, заведующий кафедрой нормальной физиологии Российского университета дружбы народов, профессор, д.б.н., профессор
117198, Россия, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 8, тел. (495)4345266, e-mail: vtorshin@mail.ru
Теплов Александр Юрьевич, доцент кафедры патофизиологии
Казанского государственного медицинского университета, к.б.н., доцент
420012, Россия, г. Казань, ул. Бутлерова д.49, тел. (843)2345950, e-mail: AlikTeplov@mail.ru

UDC 53.083.32:612.741:616-056.3:616.74-02-092.9

Torshin V.I.¹, Teplov A.Y.²

¹Peoples' Friendship University of Russia

²Kazan State Medical University

CHANGE MECHANISM OF CONTRACTILE FUNCTION OF STRIATED MUSCLE MOUSE IN VITRO BY PROTEIN SENSITIZATION. INVOLVEMENT OF ATP

We investigated the involvement of ATP in the mechanism of the effect of protein sensitization (PS) on contractile function and non-quantum secretion of acetylcholine in the area of end-plate (H-effect) of isolated skeletal muscles of leg (m. soleus and m. extensor digitorum longus (m. EDL)) and stripes m. diaphragma mouse. In m. soleus and m. diaphragma dynamics of the force vector of muscle contraction is correlated with changes in the H-effect in all the studied experimental models. However, the extent of these changes in sensitized animals is less pronounced. It has been suggested that ATP is a party change in the mechanisms of functional properties m. soleus and m. diaphragma in PS and reflects the development of resistance mechanisms in these muscles to external loads. The reasons for the changes in contraction force m. EDL PS not related to ATP-mediated excitation mechanism of the muscle.

Keywords: contractile properties, nonquantum secretion of acetylcholine, m. diaphragma, m. soleus, m. extensor digitorum longus, mouse, protein sensitization, ATP.