УДК 616-092:612.085.2:616.097:612.741

ИЗМЕНЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ МАЛОНОВОГО ДИАЛЬДЕГИДА КАК ВОЗМОЖНАЯ ПРИЧИНА ИЗМЕНЧИВОСТИ СОКРАТИТЕЛЬНОЙ ФУНКЦИИ ДВИГАТЕЛЬНЫХ МЫШЦ МЫШИ IN VITRO В УСЛОВИЯХ БЕЛКОВОЙ СЕНСИБИЛИЗАЦИИ

Фархутдинов А.М., Теплов А.Ю., Митрофанов М.С., Валеева И.Х.

ГБОУ ВПО «Казанский государственный медицинский университет» Минздрава России, Казань, Россия (420012, Казань, Бутлерова, 49), e-mail: Alikteplov@mail.ru

В экспериментах in vitro показана способность белковой сенсибилизации (БС) изменять силу сокращения, вызванного агонистом карбахолином и уровень малонового диальдегида (МДА) у поперечно-полосатых мышц мыши: «быстрой» m. extensor digitorum longus и «медленной» m. soleus. У «медленной» мышцы увеличение силы сокращения при БС коррелирует со снижением уровня МДА, что, очевидно, является следствием как увеличения чувствительности мембраны мышечных клеток к агонисту, так и изменения внутриклеточных механизмов электромеханического сопряжения (ЭМС). У «быстрой» мышцы при БС сила сокращения уменьшается, уровень МДА не изменяется. Количественные изменения МДА в двигательных мышцах при БС могут, предположительно, явиться причиной функциональных сдвигов как на мембране, так и в цитоплазме миоцитов. Очевидно, что эти изменения являются проявлением механизмов компенсации. Вклад в эти процессы различных мышечных волокон неоднозначен, что мы и наблюдаем в динамике силы сокращения «быстрой» и «медленной» мышц голени при БС.

Ключевые слова: скелетная мышца, сократительные свойства, белковая сенсибилизация, малоновый диальдегид

CHANGES IN THE CONTENT OF MALONDIALDEHYDE AS A POSSIBLE CAUSE VARIABILITY CONTRACTILE FUNCTION MOTOR MUSCLE MOUSE IN VITRO IN THE PROTEIN SENSITIZATION

Farkhutdinov A.M., Teplov A.Y., Mitrofanov M.S., Valeeva I.K.

Kazan state Medical University, Kazan, Russia, (420012, Kazan, Butlerov str., 49), e-mail: Alikteplov@mail.ru

In in vitro experiments demonstrated the ability of the protein sensitization (PS) to change the force of contraction caused by the agonist carbachol and the level of malondialdehyde (MDA) in striated muscles of the mouse: «fast» m. extensor digitorum longus and «slow» m. soleus. The «slow» muscle increase the force of contraction when the PS is correlated with the decrease in MDA level, which is obviously the result of both an increase in the sensitivity of the muscle cell membrane to the agonist, and changes in intracellular mechanisms electromechanical coupling (EMC). The «fast» muscles at the PS decreases contractile force and does not change the level of MDA. Quantitative changes of MDA in motor muscles in the PS could conceivably cause functional changes in the membrane and in the cytoplasm of muscle cells. Obviously, these changes are a manifestation of compensation mechanisms. Contribution to this different muscle fibers ambiguous that we observe in the force of contraction of the dynamics of «fast» and «slow» leg muscles at the PS.

Keywords: skeletal muscle contractile properties, protein sensitization, malondialdehyde.

Проблема аллергических заболеваний является актуальной в современной биологии и медицине. Одно из ее проявлений — изменение реактивности мышечной системы. Если механизмы функциональной вариабельности гладкомышечных органов при аллергии изучены достаточно подробно, то вопросы пластичности поперечно-полосатых мышц в этих условиях остаются совершенно неисследованными. Актуальность же данной проблемы определяется в том числе и запросами спортивной биологии и медицины, а именно влиянием белковой сенсибилизации (БС) на функцию двигательных мышц при обязательной вакцинации спортсменов перед соревнованиями. Очевидно, что при аллергической

перестройке ткань скелетных мышц (СМ) не может оставаться нечувствительной к гуморальным факторам, появляющимся в организме в ходе формирования аллергической реакции [8]. В патогенезе аллергических заболеваний важную роль играет оксидативный стресс, одним из ключевых маркеров которого является малоновый диальдегид (МДА) [7]. Ранее было показано, что БС изменяет сократительные свойства «быстрых» и «медленных» скелетных мышц (СМ) голени in vitro [3, 8], причем в динамике этих изменений обнаружены существенные различия. В механизмах изменения силы сокращения существенную роль играют как процессы возбуждения мембраны мышечных волокон (МВ) [3], так и последующие этапы системы электромеханического сопряжения (ЭМС) [2]. Для изучения возможного влияния МДА на механизмы изменчивости сократительной функции изолированных скелетных мышц мыши при БС нами было проведено комплексное исследование.

Цель. Изучить изменение в условиях БС:

1) сократительной функции различных поперечно-полосатых мышц мыши («медленной» – m.soleus и «быстрой» – m.EDL);
2) содержания в ткани этих мышц МДА.

Материалы и методы. Эксперименты проводились на мышах обоего пола, массой тела 17–22 г. Животные сенсибилизировались яичным альбумином (ОА) с гелем гидроокиси алюминия («Sigma», США) [8]. Контрольным животным вместо ОА вводили стерильный физиологический раствор в том же объеме и тем же способом.

Количественное определение малонового диальдегида проводилось в сыворотке крови и в гомогенатах мышц контрольных и сенсибилизированных мышей. Определение МДА в сыворотке проводили по Рахмановой Т.И. и др. 2009 [1], в мышцах — реакцией с тиобарбитуровой кислотой (ТБК) при высокой температуре в кислой среде. Навеска ткани мышцы замораживалась в фарфоровой ступке жидким азотом и тщательно растиралась. Гомогенат растворялся в буферном растворе (pH 7,4) и после добавления трихлоруксусной кислоты (ТХУ) центрифугировался 15 мин при 5000 об/мин в ОПН-8 («Лабтех», Россия). Супернатант смешивался с ТБК и помещался в кипящую водяную баню на 10 мин. Измерение оптической плотности велся после охлаждения на СФ-103 при длине волны 532 нм против контроля на реактивы [1].

Механомиографические исследования проводились на препарате изолированной мышцы в условиях изометрии, которая достигалась растяжением СМ в течение 20 мин с силой 0,5 г при постоянной перфузии раствором Кребса. Сокращение регистрировалось датчиком силы. Агонист – карбахолин (Кх) — исследовался в субмаксимальных концентрациях, которые составляли: для m.EDL — $7x10^{-4}$M, m.soleus — $5x10^{-4}$ M.

Сократительная функция мышцы анализировалась по силе сокращения на КХ, которая соотносилась с массой мышечного препарата. Эвтаназия животного производилась введением летальной дозы этаминала натрия. Данные подвергались статистической обработке с использованием t-критерия Стьюдента.

Результаты. Если уровень содержания в сыворотке крови молекулярного продукта ПОЛ – МДА при БС снизился с 2,65 ±0,88 до 1,65±0,4 мкМ/л (n=8, p<0,05), то в ткани различных поперечно-полосатых мышц его изменение имело разнонаправленный характер: в m.soleus МДА снизился с 237,36±73,67 мкМ/кг до 119,46±24,65 мкМ/кг (p<0,05), в m.EDL незначительно увеличился с 111,02±25,61 мкМ/кг до 127,99±8,93 мкМ/кг.

Механомиографические исследования показали, что «медленная» m.soleus несенсибилизированной мыши сокращалась на Кх с силой 35,61±1,67 мг/мм^3. БС приводила к увеличению этого показателя до 54,18±4,99 мг/мм^3 (p<0,01). «Быстрая» m.EDL несенсибилизированной мыши сокращалась на Кх с силой 9,94±0,39 мг/мм^3. БС уменьшала эту характеристику до 5,65±0,82 мг/мм^3 (p<0,01).

Обсуждение. Результаты экспериментов свидетельствуют, что БС изменяет содержание молекулярного продукта ПОЛ – МДА как в сыворотке крови, так и в ткани изучаемых мышц мыши. Снижение МДА в сыворотке крови свидетельствует об отсутствии воспалительного процесса, который, как правило, сопровождается повышением этого показателя [6, 7] и может наблюдаться при развитии аллергии. МДА является одним из ключевых маркеров перекисного окисления липидов при оксидативном стрессе и характеризует состояние внутриклеточной среды миоцитов, демонстрируя степень ее повреждения вследствие изменения уровня свободных радикалов. Определяясь балансом про- и антиоксидантных систем, он является одним из факторов (показателей), обеспечивающих работу механизмов ЭМС в мышечных волокнах [7]. В наших экспериментах изменение МДА в ткани различных поперечно-полосатых мышц было неоднозначным. Если у m.soleus он снижался, то у m.EDL изменение не носило достоверного характера.

Мышь — классический объект иммунологических и аллергических исследований [2]. Динамика сократительных свойств изучаемых мышц в условиях БС указывает на процессы, происходящие в этих тканях при аллергической перестройке организма. Морфофункциональные изменения при БС способны затрагивать как поверхностную мембрану МВ [3], так и последующие этапы ЭМС [2]. Направленность векторов изменения силы «быстрой» и «медленной» мышц свидетельствует о принципиальных различиях в механизмах, определяющих эти изменения [8]. Снижение силы карбахолинового сокращения у «быстрой» мышцы и возрастание этого показателя у «медленной» подтверждают тот факт, что при БС различия в изменениях затрагивают в первую очередь процессы возбуждения МВ

и носят у обеих мышц разнонаправленный характер. Противоположное влияние БС на силовые характеристики разных СМ отражают коренные различия в их функциональной организации, что является следствием развития механизмов компенсации к возможным моторным нарушениям в ходе формирования аллергической реакции. Вклад в это различных мышечных волокон неоднозначен. Причины кроются как в исходном морфофункциональном статусе исследуемых объектов, так и в вариантах его изменения в процессе БС. Необходимо отметить, что у мышей нет двигательных мышц, состоящих исключительно из «медленных» МВ, что определяется в первую очередь подвижным образом жизни этих животных. Как известно, m.soleus мыши содержит 50–60% «медленных» МВ, m.EDL на 97–100% состоит из «быстрых» [5].

Ранее нами была показана роль АТФ в динамике сократительной функции различных СМ в условиях БС [8]. Мы предположили участие АТФ в двух взаимодополняющих механизмах. Меняющаяся интенсивность секреции АТФ как кофактора синаптической передачи, определенная в качестве одной из причин вариабельности силы карбахолинового сокращения наглядно демонстрирует роль пуринов в механизмах пластичности при аллергии [3]. Кроме того, из литературы известно, что АТФ участвует в генерации иммунного ответа [9]. Одновременное участие АТФ в регуляции неквантовой секреции ацетилхолина и в развитии аллергической реакции позволяет предполагать вариабельность концентрации внеклеточной АТФ в качестве одной из причин изменения возбудимости миоцитов, определяющих функциональное состояние СМ при БС. Однако способность БС у различных СМ по-разному менять механизмы внутриклеточного гомеостаза подтверждается сопоставлением динамики силы сокращения с изменением уровня МДА. У «медленной» мышцы увеличение силы коррелирует со снижением МДА, что, очевидно, является проявлением работы механизмов компенсации и выражается как увеличением чувствительности мембраны МВ к агонисту, так и изменениями в системе последующих этапов ЭМС. У «быстрой» мышцы снижение силы не связано с уровнем МДА. Динамика альдегида в «медленной» мышце при БС может опосредованно являться причиной функциональных сдвигов как на мембране МВ, так и в последующих этапах ЭМС.

Показанная ранее способность АТФ-зависимых механизмов регулировать сокращение СМ посредством воздействия на систему внутриклеточных посредников [4] подвергается возможным функциональным изменениям в условиях БС вследствие нарушения баланса систем про- и антиоксидантного равновесия. Данное предположение подтверждается корреляцией изменений уровня малонового альдегида с активностью АТФ-синтазы, показанной Yarian CS et all. [10] на поперечно-полосатых (сердечной и скелетных) мышцах мыши. МДА, являясь маркером окислительного стресса, характеризует состояние ряда

мембранных и митохондриальных белков и, очевидно, опосредованно определяет динамику механизмов электромеханического сопряжения в двигательных мышцах при аллергической перестройке организма.

Заключение. Пластичность двигательных мышц в условиях БС определяется динамикой комплекса механизмов ЭМС, локализованных как на холиновозбудимой постсинаптической мембране, так и в цитоплазме МВ. При этом изменение чувствительности постсинапса к Ах у различных типов мышц является причиной разнонаправленной динамики силы сокращения на холиномиметик. В настоящем исследовании показана корреляция силы сокращения различных СМ при БС с изменением одного из ключевых маркеров перекисного окисления липидов, каким является МДА. В «медленной» мышце рост силы сокращения совпадает с изменением диальдегида. «Быстрая» мышца оказывается более устойчивой к оксидативному стрессу, что, очевидно, достигается работой компенсаторных механизмов и определяется крайне незначительными изменениями в динамике факторов про- и антиоксидантного равновесия.

Вывод

Пластичность поперечно-полосатых мышц мыши в условиях аллергической перестройки определяется изменением функциональных свойств, которые затрагивают как возбуждение мышечной мембраны, так и внутриклеточные механизмы ЭМС. Этот процесс в значительной степени зависит от баланса систем про- и антиоксидантного равновесия, и в характере этих изменений у «быстрых» и «медленных» мышц имеются существенные различия.

Список литературы

1. Методы оценки оксидативного статуса: учебно-методическое пособие для вузов / Т.И. Рахманова, Л.В. Матасова, А.В. Семенихина, О.А. Сафонова, А.В. Макеева, Т.Н. Попова. - Воронеж: Изд-во ВГУ, 2009. — 64 с.

2. Митрофанов М.С., Фархутдинов А.М., Теплов А.Ю. Пластичность «быстрых» и «медленных» скелетных мышц мыши в условиях белковой сенсибилизации. Сокращение in vitro на холиномиметик и KCl //Фундаментальные исследования. — 2014, № 12, Ч. 10, с. 2150–2153.

3. Теплов А.Ю. Пластичность мышечной системы в условиях белковой сенсибилизации. Участие холинергических и пуринергических механизмов / Теплов А.Ю., Фархутдинов А.М., Торшин В.И. Теплов О.В., Миннебаев М.М. // Вестник новых медицинских технологий. 2014. Т. 21, № 1. С. 6–12.

4. Теплов А.Ю. Роль протеинкиназы-С в механизмах влияния АТФ на сократительную функцию изолированной полоски диафрагмы мыши / Теплов А.Ю., Гришин С.Н., Зиганшин А.У., Зефиров А.Л. // Бюл. эксперим. биологии медицины. 2006. Т 141. № 4.— С. 389–392.
5. Fahim M.A. Topographic comparison of neuromuscular junctions in mouse «slow» and «fast» twitch muscles / M.A. Fahim, J.A. Holley, N. Robbins // Neuroscience. – 1984. – № 13 (1). – P. 227–235.
6. Jacobson GA, Yee KC, Ng CH. Elevated plasma glutathione peroxidase concentration in acute severe asthma: comparison with plasma glutathione peroxidase activity, selenium and malondialdehyde. — Scand J Clin Lab Invest. 2007; 67(4):423-30.
7. Romieu I. Exhaled breath malondialdehyde as a marker of effect of exposure to air pollution in children with asthma //Romieu I, Barraza-Villarreal A, Escamilla-Nuñez C, Almstrand AC, Diaz-Sanchez D, Sly PD, Olin AC. — J Allergy Clin Immunol. 2008 Apr; 121(4):903-9.
8. Teplov A. Ovalbumin-induced sensitization affects non-quantal acetylcholine release from motor nerve terminals and alters contractility of skeletal muscles in mice / Teplov A., Grishin S, Mukhamedyarov M, et al. // Exp Physiol. 2009 Feb;94(2):264-268.
9. Tsai TL. Role of ATP in the ROS-mediated laryngeal airway hyperreactivity induced by laryngeal acid-pepsin insult in anesthetized rats / Tsai TL, Chang SY, Ho CY, Kou YR. // J Appl Physiol. 2009 May;106(5):1584-92.
10. Yarian CS, Rebrin I, Sohal RS. Aconitase and ATP synthase are targets of malondialdehyde modification and undergo an age-related decrease in activity in mouse heart mitochondria.// Biochem Biophys Res Commun. 2005 Apr 29;330(1):151-6.

Рецензенты:

Сайфутдинов М.С., д.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории патологии осевого скелета и нейрохирургии ФГБУ «РНЦ «ВТО» им. Академика Г.А. Елизарова» Минздрава России, г. Курган;

Ерохин А.Н., д.м.н., доцент, ведущий научный сотрудник лаборатории патологии осевого скелета и нейрохирургии ФГБУ «РНЦ «ВТО» им. Академика Г.А. Елизарова» Минздрава России, г. Курган.