

УДК 612.741:616-056.3:616.74-02-092.9

## **АДАПТАЦИОННЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ РАЗЛИЧНЫХ ДВИГАТЕЛЬНЫХ МЫШЦ МЫШИ В УСЛОВИЯХ АЛЛЕРГИЧЕСКОЙ ПЕРЕСТРОЙКИ ОПРЕДЕЛЯЮТСЯ НЕ ТОЛЬКО СОСТОЯНИЕМ ПОСТСИНАПТИЧЕСКОЙ МЕМБРАНЫ**

Теплов А.Ю.

*ФГБОУ ВО Казанский ГМУ Минздрава России, Казань, e-mail: Alikteplov@mail.ru*

Исследовались механизмы пластичности «быстрых» и «медленных» двигательных мышц мыши *in vitro* в условиях белковой сенсибилизации (БС). Показано, что как в динамике сократительной функции, так и уровня малонового диальдегида (МДА) у разных скелетных мышц (СМ) при БС обнаружены существенные различия. В механизмах изменения силы сокращения в этих условиях существенная роль отводится как холиноопосредованным процессам возбуждения постсинаптической мембраны, так и изменениям последующих этапов системы электромеханического сопряжения (ЭМС). Показано участие в этом калийзависимых процессов сокращения. Кроме того, показано, что характер и степень изменений силы сокращения изучаемых мышц в условиях БС находятся в прямой зависимости от состояния систем про- и антиоксидантного равновесия. Высказывается предположение, что обнаруженные изменения в физиологии и биохимии скелетных мышц являются отражением процессов их адаптации к условиям аллергической перестройки и носят для «быстрых» и «медленных» СМ разнонаправленный характер. Изучение адаптивных механизмов скелетных мышц при аллергической перестройке позволит обнаружить новые возможности коррекции их функции, а также определить стратегию воздействия на конкретные двигательные мышцы с учетом их волоконного состава.

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

## **CHANGE ADAPTATION OF DIFFERENT MOTOR MUSCLES MOUSE IN THE ALLERGIC ALTERATION IS DETERMINED NOT ONLY BY THE STATE OF THE POSTSYNAPTIC MEMBRANE**

Теплов А.Ю.

*Kazan state medical university, Kazan, e-mail: Alikteplov@mail.ru*

We investigated the mechanisms of plasticity "fast" and "slow" *in vitro*, mouse muscle motor protein in a sensitization (PS). It is shown that the dynamics in both contractile function, and in the study of the level of malondialdehyde (MDA) varies from skeletal muscle (SM) at the PS found significant differences. The mechanisms of change in power reduction under these conditions a significant role to play as a holinomediated processes of excitation of the postsynaptic membrane, and changes in subsequent stages of the electromechanical coupling system (EMS). The participation of the potassium-dependent reduction processes. In addition, it is shown that the nature and degree of changes in the studied muscle contraction forces under PS are directly dependent on the state of systems and pro-antioxidant balance. It is suggested that the observed changes in the physiology and biochemistry of skeletal muscle are a reflection of their adaptation to the conditions of restructuring and are allergic to "fast" and "slow" SM multidirectional nature. Study of adaptive mechanisms in skeletal muscle allergic rearrangement allow assume their new variants correction functions as well as determine the effect on specific strategy muscle motor in accordance with their fiber composition.

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

Интерес к изучению патогенеза аллергических заболеваний до настоящего времени остается чрезвычайно высоким. Изменение реактивности мышечной системы и, в частности, механизмов пластичности поперечно полосатых мышц в условиях аллергии в деталях слабо исследованы. Актуальность же данной проблемы определяется запросами спортивной биологии и медицины. Хорошо известны факты влияния 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, которые появляются в организме в ходе формирования аллергической реакции [3]. Ранее нами было показано, что БС изменяет карбахолиновое сокращение как «быстрых», так и «медленных» СМ голени мышцы *in vitro* [7, 11]. Это проявляется как в динамике, так и в направленности этих изменений. Обнаруженные различия затрагивают механизмы возбуждения постсинаптической мембраны, в которых АТФ играет роль кофактора синаптической передачи. Однако в механизмах изменения силы мышцы существенную роль играют не только процессы возбуждения мембраны мышечных волокон (МВ) [8, 9], но и последующие этапы системы электромеханического сопряжения (ЭМС), возможность выявления которых с помощью регистрации сократительных свойств была показана нами ранее [5]. Кроме того, в патогенезе аллергических заболеваний важную роль играет оксидативный стресс, одним из ключевых маркеров которого является малоновый диальдегид (МДА) [12].

**Цель:** изучить изменение в условиях БС: 1) сократительной функции *in vitro* поперечнополосатых мышц мыши («медленной» – *m. soleus* и «быстрой» – *m. EDL*) при ее генерации различными гуморальными агентами: карбахолином (КХ) и хлоридом калия (КСI); 2) содержания МДА в сыворотке крови и ткани вышеперечисленных мышц.

**Материалы и методы.** Эксперименты проводились на мышах, 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) парентерально, дважды [3]. В эксперимент животные забирались на пике сенсibilизации. Механомиографические исследования проводились на препарате изолированной мышцы в условиях изометрии. Сокращение регистрировалось с помощью датчика силы. Сократительная функция анализировалась по силе и скорости сокращения мышцы на КХ и КСИ в субмаксимальной и максимальной концентрациях.

Сокращение изолированной СМ на повышение концентрации ионов  $K^+$  является простым и доступным «тестом» для изучения процессов ЭМС [5]. Отношение максимальной силы мышцы при сокращении ее на КХ к максимальной силе, развиваемой мышцей при сокращении на КСИ ( $P_{КХmax}/P_{КСImax}$ ), предоставляет возможность количественно отделять участие холиноопосредованных процессов возбуждения мембраны МВ от последующих этапов ЭМС.

Количественное определение малонового диальдегида (МДА) проводилось в сыворотке крови и в гомогенатах мышц контрольных и сенсibilизированных мышей. Определение МДА в сыворотке и в мышцах определялся по реакции с тиобарбитуровой кислотой (ТБК) при высокой температуре в кислой среде.

Полученные результаты подвергались статистической обработке (BIOSTATISTICA, S.A. Glantz, McGraw Hill). Для анализа данных использовались параметрические и непараметрические критерии. При вероятности ( $p$ ) не больше 0,05 разницу считали достоверной. Результаты представлены в виде  $X \pm Sx$  ( $n$ ), где  $X$  – среднее арифметическое значение,  $Sx$  – средняя ошибка,  $n$  – количество наблюдений.

**Результаты.** КХ в субмаксимальной концентрации ( $7 \times 10^{-4}M$ ) вызывал сокращение m.EDL несенсибилизированной мышцы с силой  $76,6 \pm 6,1$  мг и скоростью  $14,3 \pm 1,6$  мг/сек. При БС сила «быстрой» мышцы уменьшалась до  $61,9 \pm 12,2$  мг, скорость практически не менялась –  $13,6 \pm 4,1$  мг/сек. Сокращение m.EDL несенсибилизированной мышцы на максимальную концентрацию КХ ( $4 \times 10^{-3}M$ ) имела скорость –  $11,15 \pm 1,97$  мг/сек. При БС этот показатель снижался – до  $4,62 \pm 1,68$  мг/сек ( $p < 0,05$ ).

У m.soleus несенсибилизированной мышцы КХ в субмаксимальной концентрации ( $5 \times 10^{-4}M$ ) вызывал сокращение силой  $237,8 \pm 20,6$  мг и скоростью  $13,1 \pm 1,0$  мг/сек. БС увеличивала силу –  $353,2 \pm 23,1$  мг ( $p < 0,01$ ) и скорость –  $16,6 \pm 1,5$  мг/сек сокращения «медленной» мышцы. Максимальная концентрация КХ ( $2 \times 10^{-3}M$ ) вызывала сокращение «медленной» мышцы несенсибилизированной мышцы со скоростью  $24,64 \pm 3,65$  мг/сек. БС снижала этот показатель до  $13,44 \pm 2,43$  мг/сек ( $p < 0,05$ ).

Сила сокращения m.EDL на максимальные концентрации агониста ( $4 \times 10^{-3}M$ ) и КСI ( $250$  ммоль/л) в контроле имела значения:  $103,83 \pm 15,70$  мг и  $136,69 \pm 6,73$  мг ( $P_{KXmax}/P_{KClmax}$  –  $75,9\%$ ) и при БС изменялась соответственно  $52,13 \pm 14,66$  мг ( $p < 0,05$ ) и  $142,72 \pm 23,83$  мг ( $P_{KXmax}/P_{KClmax}$  –  $36,5\%$ ), т.е. показатель  $P_{KXmax}/P_{KClmax}$  при БС снизился до  $48,1\%$  от контроля.

Для m.soleus сила сокращения на агонист в максимальной концентрации ( $2 \times 10^{-3}M$ ) и КСI ( $150$  ммоль/л) в контроле имела значения:  $322,32 \pm 30,18$  мг и  $643,23 \pm 69,59$  мг ( $P_{KXmax}/P_{KClmax}$  –  $50,1\%$ ) при БС изменялась соответственно до  $475,14 \pm 52,66$  мг ( $p < 0,05$ ) и  $1470,49 \pm 186,05$  мг ( $p < 0,01$ ) ( $P_{KXmax}/P_{KClmax}$  –  $32,3\%$ ), т.е. показатель  $P_{KXmax}/P_{KClmax}$  при БС снизился до  $64,5\%$  от контроля.

Уровень в сыворотке крови МДА при БС снизился с  $2,65 \pm 0,88$  до  $1,65 \pm 0,4$  мкМ/л ( $n=8$ ,  $p < 0,05$ ). В ткани m.soleus МДА снизился с  $237,36 \pm 73,67$  мкМ/кг до  $119,46 \pm 24,65$  мкМ/кг ( $p < 0,05$ ), в m.EDL незначительно увеличился с  $111,02 \pm 25,61$  мкМ/кг до  $127,99 \pm 8,93$  мкМ/кг.

**Обсуждение.** На изолированных СМ мышцы показано, что при БС обе мышцы изменяют характеристики своего сокращения на КХ. Угнетается скорость сокращения. Изменение же силовых характеристик сокращения носило разнонаправленный характер. У «быстрой» они снижались, у «медленной» – возрастали. БС гипотетически может затрагивать в СМ поверхностную мембрану, включая постсинаптическую, механизмы ЭМС либо систему сократительных белков. Совокупность обнаруженных изменений свидетельствует, что в

механизмах адаптации участвуют различные этапы сократительного процессы. Снижение скорости свидетельствует, что при БС у всех мышц возникают однонаправленные изменения системы ЭМС. Различия же в изменениях силы, которые характеризуют холиноопосредованные процессы возбуждения МВ, носят для «быстрых» и «медленных» мышц разнонаправленный характер.

При сокращении на КХ сила мышцы находится в прямой зависимости от чувствительности к холиномиметику. Очевидно, что причины обнаруженных нами изменений кроются как в исходных различиях морфофункционального статуса исследуемых объектов [1, 3], так и в механизмах его динамики в процессе аллергической перестройки.

Ранее нами было показано, что у «медленной» (*m.soleus*) мышцы мыши в адаптационных механизмах при БС участвует АТФ [7, 11]. Очевидно, что в этих условиях изменение чувствительности P2 рецепторов пресинаптической мембраны мионеврального соединения приводит к адекватному изменению тока неквантовой секреции ацетилхолина (Ах), что влияет на чувствительность постсинаптической мембраны к холиномиметику. В качестве объяснения этих, в общем-то лабораторных эффектов, мы можем предположить несколько механизмов. Во-первых, повышение уровня АТФ в среде, в том числе и в ткани самой мышцы, вызывает десенситизацию пуриновых (предположительно P2Y) рецепторов пресинаптической мембраны, что снижает их чувствительность к экзогенной АТФ, вносимой в ванночку в ходе эксперимента. По этой причине у «медленной» мышцы динамика неквантовой секреции Ах и силы сокращения мышцы на холиномиметик к экзогенной АТФ в условиях БС отличается от таковых в контроле. Вторым из возможных объяснений служит следующее. В экспериментальных моделях, используемых в приведенных исследованиях у интактной мышцы, экзогенная АТФ при добавлении в ванночку почти полностью устраняет неквантовый выход Ах. Для большей наглядности максимальное проявление эффекта АТФ достигается подбором концентрации и временем экспозиции вещества, в ходе чего запас возможностей реализации данного биологического механизма существенно (почти полностью) истощается. В условиях БС наличие в среде эндогенной АТФ, которая появляется в ткани мышцы, в ходе генерации аллергической реакции частично перекрывает потенциал снижения неквантовой секреции Ах, и добавление на этом фоне в ванночку экзогенной АТФ уже не позволяет проявляться ожидаемому результату.

Таким образом, в основе развития резистентности как к длительным внешним нагрузкам, так и при экспериментальной аллергии у «медленных» фазных мышц лежат АТФ-зависимые механизмы регуляции их чувствительности к Ах. В условиях целостного организма эти процессы проявляются увеличением работоспособности при продолжительной физической деятельности. Сходные механизмы определяют снижение

утомляемости дыхательных мышц при гипоксии, возникающей при функциональной недостаточной системы внешнего дыхания.

Нами получены сократительные ответы *in vitro* *m.EDL* и *m.soleus* мышцы на различные гуморальные агенты. Для обеих мышц определены субмаксимальные и максимальные концентрации обоих инициаторов сокращения. Анализ сокращения на КХ позволяет оценивать как холиноопосредованные процессы возбуждения, так и последующие этапы работы МВ [11]. Калиевая контрактура является удобным «тестом» для изучения процессов ЭМС [5]. Использование в анализе показателя  $P_{KXmax}/P_{KClmax}$  (соотношение максимальных сил сокращения на разные гуморальные инициаторы) предоставляет возможность вычленять этапы, определяемые внутриклеточными механизмами ЭМС, от процессов возбуждения мышечной мембраны.

Существенные различия в характеристиках сократительных ответов «быстрых» и «медленных» мышц голени мыши на КХ и КСI позволяют предполагать следующее. Вариабельность карбахолиновых сокращений имеет морфологическую основу. Разница в силе напрямую связана с составом волокон. *m.Soleus* мышцы содержит 50–60 % «медленных» волокон, а *m.EDL* на 97–100 % состоит из «быстрых» [10]. Размеры концевой пластинки у МВ «медленной» мышцы (*m.soleus*) в 3 раза протяженнее, чем у МВ «быстрой» (*m.EDL*). Соответственно, большая сила сокращения «медленной» мышцы на КХ является следствием большей ее чувствительности к холиномиметику и обусловлена большим числом холинорецепторов (ХР) в области синапса.

Литературные источники свидетельствуют – изменения МВ при сенсibilизации затрагивают поверхностную мембрану [1], механизмы ЭМС либо систему сократительных белков. Соответственно, способность БС изменять сократительные свойства СМ мышцы имеет неоднозначную природу. Разнонаправленность вектора динамики силы сокращения на КХ у *m.soleus* и *m.EDL* указывает, что различия функциональных изменений двух мышц при БС обеспечиваются, в первую очередь, холиноопосредованными процессами возбуждения мембраны МВ. Угнетение скорости карбахолиновых ответов обеих мышц определяет механизмы ЭМС в качестве участников процесса адаптации СМ в условиях БС.

Динамика скорости калиевой контрактуры свидетельствует о неоднозначной способности  $Ca^{2+}$ -зависимых механизмов у мышц с различным фенотипом к адаптации в условиях БС, что подтверждается анализом, соотношением  $P_{KXmax}/P_{KClmax}$ . В обоих случаях оно снижается, однако, для «быстрой» мышцы более выражено (до 48,1% от исходной), чем для «медленной» (до 64,5 %). Таким образом, разнонаправленное влияние БС на силу КХ-вызванного сокращения и скорость сокращения на КСI у «медленной» и «быстрой» мышц является проявлением адаптации, что определяет пластичность этих мышц. Дальнейшее

изучение механизмов адаптации СМ в условиях аллергии откроет новые способы коррекции их функции и наметит стратегию медикаментозного воздействия с учетом волоконного состава конкретных мышц.

Сопоставление динамики силы сокращения с изменением уровня МДА подтверждает способность БС по-разному менять механизмы внутриклеточного гомеостаза у различных СМ. Увеличение силы «медленной» мышцы коррелирует со снижением МДА, что отражает работу механизмов компенсации как в увеличении 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 при БС в «медленной» мышце опосредовано является причиной изменений, как на мембране, так и в цитоплазме ее МВ. АТФ-зависимые механизмы регулируют сокращение СМ посредством воздействия на систему внутриклеточных посредников [2, 4, 6]. Это подвергается изменениям нарушения баланса систем про- и антиоксидантного равновесия. Данное предположение подтверждается сходством динамики малонового диальдегида с активностью АТФ-синтазы, показанной Yarian CS et all. [12] на поперечнополосатых (сердечной и скелетных) мышцах мыши. МДА, являясь маркером окислительного стресса, определяет состояние ряда мембранных и митохондриальных белков и, как следствие – динамику механизмов электромеханического сопряжения в двигательных мышцах при аллергической перестройке организма.

**Заключение.** Механизмы пластичности двигательных мышц в условиях БС определяется работой механизмов ЭМС, локализованных как на холинозбудимой постсинаптической мембране, так и в цитоплазме МВ. Изменение чувствительности постсинапса к Ах у различных типов мышц является причиной разнонаправленной динамики силы сокращения на холиномиметик. Кроме того, сила сокращения различных СМ при БС коррелирует 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 проявляется крайне незначительными изменениями в динамике МДА.

### Список литературы

1. Адо А.Д. Белковые спектры и фосфолипидный состав мембран, обогащенных холинорецепторами из скелетных мышц крыс в условиях сенсбилизации / А.Д. Адо, Н.В. Стомахина, Л.М. Тулуевская, В.Н. Федосеева // Бюлл. экп. биол. медицины. – 1984. – Т.99. – № 7. – С. 84-86.

2. Гришин С.Н., Зиганшин А.У. Роль пуринов в нервно-мышечной передаче // Биологические мембраны: журнал мембранной и клеточной биологии. – 2013. – Т. 30. – № 4. – С. 243.
3. Гущин И.С. Экспериментальная модель для разработки и оценки способов контроля немедленной аллергии / И.С. Гущин, А.И. Зебрева, Н.Л. Богуш и др. // Патол. физиол. и эксперимент. Терапия. – 1986. – № 4. – С. 18-23.
4. Зиганшин А.У. P2-рецепторы как перспективные мишени действия будущих лекарств // Казанский медицинский журнал. – 2016. – Т. 97. – № 1. – С. 135-141.
5. Теплов А.Ю. Влияние белковой сенсибилизации на сократительные свойства “быстрых” и “медленных” мышц мыши *in vitro* / А.Ю. Теплов // Нижегородский медицинский журнал. – 2006. – № 3. – С. 21-24.
6. Теплов А.Ю. Возможные механизмы изменения сократительной функции изолированных поперечнополосатых мышц мыши при аллергической перестройке организма / А.Ю. Теплов, А.М. Фархутдинов, С.Н. Гришин // Профилактическая и клиническая медицина (Вестник Санкт-Петербургской государственной медицинской академии им. И.И. Мечникова). – 2010. – № 1 (34). – С.105-110.
7. Теплов А.Ю. Возможные механизмы влияния белковой сенсибилизации на функциональные свойства изолированных *m.soleus* и *m.EDL* мышц / А.Ю. Теплов, А.М. Фархутдинов, О.В. Теплов, С.Н. Гришин, М.М. Миннебаев // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2010. – Т. 150. – № 9. – С. 262-265.
8. Фархутдинов А.М. Механизмы влияния экзогенной АТФ на сократительную функцию изолированных поперечнополосатых мышц мыши / А.М. Фархутдинов, А.Ю. Теплов // Вестник Санкт-Петербургского университета. Сер. 11. – 2010. – Вып.2. – С.238-244.
9. Burnstock G. Historical review: ATP as a neurotransmitter/ G. Burnstock // Trends Pharmacol Sci. – 2006. – V.27, № 3. – P.166-176.
10. Florendo J.A. Electrophysiologic differences between mouse extensor digitorum longus and soleus / J.A. Florendo, P.K. Reger, Law // Exp Neurol. 1983; Nov; 82(2): 404-12.
11. Teplov A. Ovalbumin-induced sensitization affects non-quantal acetylcholine release from motor nerve terminals and alters contractility of skeletal muscles in mice / A. Teplov, S. Grishin, M. Mukhamedyarov, et al. // Exp Physiol. 2009 Feb; 94(2):264-268.
12. 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.