

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

ПЛАСТИЧНОСТЬ «БЫСТРЫХ» И «МЕДЛЕННЫХ» СКЕЛЕТНЫХ МЫШЦ МЫШИ В УСЛОВИЯХ БЕЛКОВОЙ СЕНСИБИЛИЗАЦИИ. СОКРАЩЕНИЕ IN VITRO НА ХОЛИНОМИМЕТИК И KCl**Митрофанов М.С., Фархутдинов А.М., Теплов А.Ю.***ГБОУ ВПО «Казанский государственный медицинский университет» Минздрава России, Казань, e-mail: Alikteplov@mail.ru*

В представленной работе исследовано влияние аллергической перестройки организма на сократительную функцию изолированных скелетных мышц (СМ) голени мыши. Показано, что при белковой сенсibilизации (БС) как «быстрая» (m. EDL), так и «медленная» (m. soleus) СМ изменяют свои сократительные свойства. Вектор этих изменений для мышц с различным фенотипом носит разнонаправленный характер. Сила сокращения, вызванного агонистом холиномиметиком карбахолином (КХ) у «медленной» мышцы повышается, у «быстрой» – убывает. Скорость сокращения на гуморальный агент KCl при БС у m. EDL снижается, у m. soleus возрастает. Высказывается предположение, что изменения сократительной функции СМ обусловлены как изменениями холиноопосредованных процессов возбуждения мембраны мышечных волокон (МВ), так и изменениями в системе электромеханического сопряжения (ЭМС).

Ключевые слова: скелетная мышца, сократительные свойства, белковая сенсibilизация

PLASTICITY OF «FAST» AND «SLOW» SKELETAL MUSCLES OF THE MOUSE OF PROTEINACEOUS SENSITIZATION. CONTRACTION IN VITRO ON CHOLINOMIMETIK AND KCl**Mitrofanov M.S., Farkhutdinov A.M., Teplov A.Y.***Kazan state Medical University, Kazan, e-mail: Alikteplov@mail.ru*

In work influence of allergic reorganization of an organism on contractility function of the isolated skeletal muscles (SM) of a shin of a mouse is investigated. It is shown that at the protein sensitization (PS) as «fast» (m. EDL), and «slow» (m. soleus) of CM change the contractility properties. The vector of these changes for muscles with various phenotype has multidirectional character. Force of the reduction caused by a cholinomimetic Carbacholinum (KH) in a «slow» muscle increases, at «fast» – decreases. Speed of reduction on KCl at BS at m. EDL decreases, at m. soleus increases. It is suggested that changes of the CM contractility function are caused as changes the cholinomediator of processes of excitement of a membrane of the muscle fibers (MF), and changes in system of electromechanical connection (EMC).

Keywords: skeletal muscle, contractility properties, protein sensitization

Аллергическая перестройка организма сопровождается изменением морфофункционального состояния скелетных мышц (СМ) теплокровных животных [2]. Белковая сенсibilизация (БС) в качестве экспериментальной модели широко используется в медико-биологических исследованиях в практике изучения аллергии. Одним из ярких проявлений процессов адаптации является показанная ранее в условиях БС функциональная вариабельность мышечной системы [11]. Широкий спектр механизмов, обеспечивающих развитие приспособительных процессов при аллергии, включает как изменение поверхностной мембраны [1, 11], так и калий зависимые процессы возбуждения сократительных структур [12]. И, если механизмы, в том числе и калий-опосредованные, функциональной вариабельности гладкомышечных органов при аллергии изучены достаточно подробно, то вопросы пластичности СМ в вышеуказанных условиях остаются совершенно не исследованными. Актуальность же данной проблемы определяется нераскрытыми путями компенсаторных изменений в работе

двигательных мышц при обязательной вакцинации спортсменов перед соревнованиями. Изучение механизмов участия калийзависимых процессов в адаптации различных скелетных мышц к условиям аллергической перестройки позволит предположить новые варианты коррекции их функции, а также наметить возможную стратегию медикаментозного воздействия на конкретные поперечнополосатые мышцы с учетом их волоконного состава.

Цель – изучить возможные различия во влиянии белковой сенсibilизации на сократительные ответы мышц голени мыши in vitro: «быстрой» (длинного разгибателя пальцев – m. EDL) и «медленной» (камбаловидной – m. soleus), вызываемые гуморальными агентами – холиномиметиком карбахолином (КХ) хлоридом калия (KCl).

Материалы и методы исследования

Эксперименты проводились на мышках, 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]. 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 мышцы в условиях изометрии, которая достигалась растяжением препарата мышцы в течение 20 минут с силой 0,5 г при постоянной перфузии раствором типа Кребса. Сокращение регистрировалось с помощью датчика силы. Агонист (КХ) исследовался в концентрациях от 2×10^{-5} М до 3×10^{-3} М. КСI – в концентрациях от 50 до 250 ммоль/л. Сократительная функция анализировалась по силе и скорости сокращения мышцы на КХ и КСI в субмаксимальной и максимальной концентрациях.

Сокращение изолированной СМ на повышение концентрации ионов K^+ является удобным «тестом» для изучения процессов ЭМС [9]. Отношение максимальной силы, способной развивать мышцей при сокращении на КХ к максимальной силе, развиваемой мышцей при сокращении на КСI (P_{KXmax}/P_{KClmax}) позволяет количественно отделять роль холиноопосредованных процессов возбуждения мембраны МВ от механизмов ЭМС.

Результаты исследования и их обсуждение

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

У m.soleus несенсibilизированной мышцы КХ в субмаксимальной концентрации (5×10^{-4} М) вызывал сокращение силой $237,8 \pm 20,6$ мг и скоростью $13,1 \pm 1,0$ мг/сек. БС приводила к увеличению силы – $353,2 \pm 23,1$ мг ($p < 0,01$) и скорости – $16,6 \pm 1,5$ мг/сек сокращения «медленной» мышцы. Максимальная концентрация КХ (2×10^{-3} М) вызывала сокращение «медленной» мышцы несенсibilизированной мышцы со скоростью $24,64 \pm 3,65$ мг/сек. При БС этот показатель «медленной» мышцы снижался – до $13,44 \pm 2,43$ мг/сек ($p < 0,05$).

Сила сократительных ответов m.EDL на максимальные концентрации агониста (4×10^{-3} М) и КСI (250 ммоль/л) в контроле имела следующие значения: $103,83 \pm 15,70$ мг и $136,69 \pm 6,73$ мг ($P_{KXmax}/P_{KClmax} - 75,9\%$) при БС становилась 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 сократительных ответов на агонист в максимальной концентрации (2×10^{-3} М) и КСI (150 ммоль/л), которая 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.

В ходе экспериментов получены сократительные ответы m.EDL и m.soleus мышцы *in vitro* на гуморальные агенты. Для обеих мышц определены рабочие – субмаксимальные и максимальные – концентрации обоих инициаторов сокращения. Анализ карбахолинового сокращения позволяет оценивать как холиноопосредованные процессы возбуждения МВ, так и последующие этапы работы миоцита [5]. Калиевая контрактура является удобным «тестом» для изучения процессов ЭМС [6, 10]. Использование в анализе показателя P_{KXmax}/P_{KClmax} (соотношение силы сокращения на разные гуморальные его инициаторы) предоставляет возможность вычленять этапы, определяемые механизмами ЭМС от предшествующих.

Сокращения «быстрых» и «медленных» мышц голени мышцы на КХ и КСI существенно различаются друг от друга. Вариабельность карбахолиновых ответов 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» [8]. Размеры концевой пластинки у МВ «медленной» мышцы (m.soleus) в 3 раза протяженнее, чем у МВ «быстрой» (m.EDL) [7]. Соответственно большая сила сокращения «медленной» мышцы на КХ является следствием большей ее чувствительности к холиномиметику и обусловлена большим числом холинорецепторов (ХР) в области синапса.

Обнаруженные различия в сокращениях обеих мышц на КСI согласуются с данными Dulhanty A.F. [6] и Lorcovich H. [10]. Эти авторы, работая на различных мышцах мышцы, подтвердили высказанное еще Жуковым Е.К. [4] и Наследовым Г.А. [5] предположение, что калиевая контрактура характеризует систему ЭМС и для каждого типа мышечных волокон (МВ) имеет свои особенности.

БС изменяет сократительные свойства СМ мышцы. По данным литературы, изменения МВ при сенсibilизации затрагивают

поверхностную мембрану [1, 11], механизмы ЭМС либо систему сократительных белков [2]. Нами показана вариабельность как силы, так и скорости сокращения обеих мышц на КХ в этих условиях. Разнонаправленность вектора динамики силы у *m.soleus* и *m.EDL* свидетельствует, что различия функцио-

нальных изменений двух мышц при БС обеспечиваются, в первую очередь, холино-посредованными процессами возбуждения мембраны МВ. Угнетение скорости карбахолиновых ответов обеих мышц указывает на механизмы ЭМС как на участников процесса адаптации СМ в условиях БС.

Таблица 1

Параметры сокращения *m.EDL* и *m.soleus* in vitro на КХ в субмаксимальной и максимальной концентрации в норме (контроль) и при белковой сенсibilизации (опыт)

Мышца	Концентрация	Условия Эксперимента	Параметры сокращения	
			Рос, мг	Вос, мг/с
<i>m.EDL</i>	Субмаксимальная 7×10^{-4} М КХ	Контроль $n = 26$	$76,59 \pm 6,51$	$14,26 \pm 1,55$
		Опыт $n = 5$	$61,92 \pm 12,42$	$13,62 \pm 4,09$
	Максимальная 4×10^{-3} М КХ	Контроль $n = 10$	$103,83 \pm 15,70$	$11,15 \pm 1,97$
		Опыт $n = 5$	$52,13 \pm 14,66$	$4,62 \pm 1,68^*$
<i>m.soleus</i>	Субмаксимальная 5×10^{-4} М КХ	Контроль $n = 28$	$237,77 \pm 20,61$	$13,10 \pm 0,99$
		Опыт $n = 11$	$353,24 \pm 23,11^{**}$	$16,62 \pm 1,50$
	Максимальная 2×10^{-3} М КХ	Контроль $n = 17$	$322,32 \pm 30,18$	$24,64 \pm 3,65$
		Опыт $n = 12$	$475,14 \pm 52,66^*$	$13,44 \pm 2,43^*$

Примечание. * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$.

Таблица 2

Параметры сокращения *m.EDL* и *m.soleus* in vitro на КСI в субмаксимальной и максимальной концентрации в норме (контроль) и при белковой сенсibilизации (опыт)

Мышца	Концентрация	Условия Эксперимента	Параметры сокращения	
			Рос, мг	Вос, мг/с
<i>m.EDL</i>	Субмаксимальная 200 мМ КСI	Контроль $n = 33$	$95,86 \pm 15,48$	$13,48 \pm 1,25$
		Опыт $n = 7$	$105,03 \pm 29,06^*$	$13,25 \pm 4,16$
	Максимальная 250 мМ КСI	Контроль $n = 26$	$136,69 \pm 6,73$	$16,71 \pm 2,27$
		Опыт $n = 5$	$142,72 \pm 23,83$	$7,86 \pm 1,11^{**}$
<i>m.soleus</i>	Субмаксимальная 110 мМ КСI	Контроль $n = 26$	$478,10 \pm 38,57$	$20,44 \pm 1,74$
		Опыт $n = 10$	$967,93 \pm 222,05^*$	$29,44 \pm 2,67^*$
	Максимальная 150 мМ КСI	Контроль $n = 22$	$643,23 \pm 69,59$	$21,31 \pm 2,33$
		Опыт $n = 12$	$1470,49 \pm 186,05^{**}$	$40,62 \pm 3,20^{***}$

Примечание. * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$.

Разнонаправленность изменений скорости калиевой контрактуры свидетельствует о неоднозначной способности Ca^{2+} зависимых механизмов сокращения мышц с различным фенотипом к адаптации в условиях БС. Это подтверждается анализом $\text{P}_{\text{KXmax}}/\text{P}_{\text{KClmax}}$. В обоих случаях показатель снижается, однако, для «быстрой» мышцы более выражено (до 48,1 % от исходной), чем для «медленной» (до 64,5 %). Очевидно, что оба факта разнонаправленного влияния БС на «медленную» и «быструю» мышцы: и на силу КХ-вызванного сокращения, и на скорость калиевой контрактуры являются проявлением механизмов адаптации, определяющих пластичность СМ.

Механизмы, обеспечивающие пластичность СМ при БС, включают как холиноопосредованные процессы возбуждения, так и этапы ЭМС, и для мышц с различным фенотипом имеют свои характерные особенности. Детальное раскрытие способностей СМ к адаптации при аллергической перестройке позволит предположить новые варианты коррекции их функции, а так же наметить возможную стратегию медикаментозного воздействия с учетом волоконного состава конкретной двигательной мышцы.

Выводы

Механизмы пластичности поперечнополосатых мышц мышцы в условиях БС включают изменение функциональных свойств, затрагивающее как холиноопосредованные процессы возбуждения мембраны МВ, так и механизмы ЭМС, и в характере этих изменений у «быстрых» и «медленных» мышц имеются существенные различия.

Список литературы

1. Адо А.Д., Стомахина Н.В., Тулуевская Л.М., Федосеева В.Н. Белковые спектры и фосфолипидный состав мембран, обогащенных холинорецепторами из скелетных мышц крыс в условиях сенсибилизации. Бюл. эксперим. биол. медицины. – 1984. – Т. 99, № 7. – С. 84–86.
2. Гушин И.С. Анафилаксия гладкой и сердечной мускулатуры. – М.: Медицина, 1973. – 175 с.
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. Жуков Е.К. Очерки по нервно-мышечной физиологии. – Л.: Наука, 1969. – 288 с.
5. Наследов Г.А. Тоническая мышечная система позвоночных. – Л.: Наука, 1981. – 187 с.
6. Dulhunty A.F. Slow potassium contractures in mouse limb muscles. J. Physiol. 1981. – № 314. – С. 91–105.
7. Fahim M.A., Holley J.A., Robbins N. Topographic comparison of neuromuscular junctions in mouse slow and fast twitch muscles. Neuroscience. – 1984. Sep. – № 13(1). P. 227–35.
8. Florendo J.A., Reger J.F., Law P.K. Electrophysiologic differences between mouse extensor digitorum longus and soleus. Exp Neurol. – 1983. Nov. – № 82(2). – P. 404–12.

9. Lawler J.M., Hu Z., Barnes W.S. Effect of reactive oxygen species on K⁺ contractures in the rat diaphragm. J. Appl. Physiol. – 1998. – V. 84, № 3. – P. 948–953.

10. Lorcovich H Potassium contractures in mouse limb muscles. J. Physiol. – 1983. – № 343. – P. 569–576.

11. Teplov A.Y., Grishin S.N., Mukhamedyarov M.A., Ziganshin A.U., Zefirov A.L., Palotas A. Ovalbumin-induced sensitization affects non-quantal acetylcholine release from motor nerve terminals and alters contractility of skeletal muscles in mice. Experimental Physiology. – 2009. – № 94 (2). – P. 264–268.

12. Yuan P., Leonetti M.D., Hsiung Y., MacKinnon R. Open Structure of the Ca²⁺ Gating Ring in the High-Conductance Ca²⁺-Activated K⁺ Channel. Nature. – 2011. – № 481(7379). – P. 94–97.

References

1. Ado A.D., Stomahina N.V., Tuluevskaia L.M., Fedoseeva V.N. Belkovye spektry i fosfolipidnyj sostav membran, obogashennykh holinoreceptorami iz skeletnykh myshc krys v usloviyah sensibilizatsii. Bjul. jeksperim. biol. mediciny. 1984. T. 99, no. 7. pp. 84–86.
2. Gushhin I.S. Anafilaksija gladkoj i serdechnoj muskulatury. M.: Medicina, 1973. 175 p.
3. Gushhin I.S., Zebreva A.I., Bogush N.L. i dr. Jeksperimental'naja model' dlja razrabotki i ocenki sposobov kontrolja nemedlennoj allergii. Patol. fiziol. i jeksperiment. terapija. 1986. no.4. pp. 18–23.
4. Zhukov E.K. Oчерки po nervno-myshechnoj fiziologii. – L.: Nauka, 1969. 288 p.
5. Nasledov G.A. Tonicheskaia myshechnaja sistema pozvonochnyh. – L.: Nauka; 1981. 187 p.
6. Dulhunty A.F. Slow potassium contractures in mouse limb muscles. J. Physiol. 1981. no. 314. pp. 91–105.
7. Fahim M.A., Holley J.A., Robbins N. Topographic comparison of neuromuscular junctions in mouse slow and fast twitch muscles. Neuroscience. 1984. Sep. no. 13(1). pp. 227–35.
8. Florendo J.A., Reger J.F., Law P.K. Electrophysiologic differences between mouse extensor digitorum longus and soleus. Exp Neurol. 1983. Nov. no. 82(2). pp. 404–12.
9. Lawler J.M., Hu Z., Barnes W.S. Effect of reactive oxygen species on K⁺ contractures in the rat diaphragm. J. Appl. Physiol. 1998. V. 84, no. 3. pp. 948–953.
10. Lorcovich H Potassium contractures in mouse limb muscles. J. Physiol. 1983. no. 343. pp. 569–576.
11. Teplov A.Y., Grishin S.N., Mukhamedyarov M.A., Ziganshin A.U., Zefirov A.L., Palotas A. Ovalbumin-induced sensitization affects non-quantal acetylcholine release from motor nerve terminals and alters contractility of skeletal muscles in mice. Experimental Physiology. 2009. no. 94 (2). pp. 264–268.
12. Yuan P., Leonetti M.D., Hsiung Y., MacKinnon R. Open Structure of the Ca²⁺ Gating Ring in the High-Conductance Ca²⁺-Activated K⁺ Channel. Nature. 2011. no. 481(7379). pp. 94–97.

Рецензенты:

Исламов Р.Р., д.м.н., профессор, заведующий кафедрой медицинской биологии и генетики ГБОУ ВПО «Казанский государственный медицинский университет» Минздрава России, г. Казань;

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

Работа поступила в редакцию 29.12.2014.