

Возможные механизмы изменения функциональных свойств полоски диафрагмы мышцы при белковой сенсibilизации

А. Ю. Теплов¹, А. М. Фархутдинов¹, О. В. Теплов¹, С. Н. Гришин²

Possible mechanisms of changing in the functional properties of a mouse diaphragmal muscle strip for protein sensitization

A. Yu. Teplov¹, A. M. Farkhutdinov¹, O. V. Teplov¹, S. N. Grishin²

¹Казанский государственный медицинский университет, г. Казань (ректор – профессор А. С. Созинов), кафедра патофизиологии (заведующий – профессор М. М. Миннебаев); ²Национальный исследовательский университет, г. Казань (ректор – чл.-корр. АН РТ, профессор Г. С. Дьяконов), кафедра телевидения и мультимедийных систем (заведующий – д.т.н., проф. О. Г. Морозов)

Исследованы механизмы влияния аллергической перестройки организма на сократительную функцию полоски диафрагмы (ДМ) мышцы. Показано, что при белковой сенсibilизации (БС) возрастает сила сокращения (Рос), вызванного холинотропным карбахолом (Кх), у ДМ *in vitro* и снижается некантовая секреция (НС) ацетилхолина (Ах) в зоне концевой пластинки. Увеличение Рос на Кх является следствием повышения чувствительности постсинаптической мембраны мышечных волокон к холинотропнику, что обусловлено снижением уровня НС Ах в зоне концевой пластинки. Экзогенная АТФ также увеличивает Рос и снижает НС АХ полосок ДМ и интактных, и сенсibilизированных мышцей. Вектор динамики Рос мышцы на Кх при всех вариантах экспериментальных воздействий коррелирует с изменением НС Ах. Однако степень этих изменений у мышце сенсibilизированного животного менее выражена, чем у несенсibilизированного. Высказывается предположение, что меньшая изменчивость функциональных свойств, вызванная АТФ, у ДМ сенсibilизированных мышцей в сравнении с контролем является свидетельством развития механизмов резистентности к внешним нагрузкам у дыхательных мышц, которая появляется при бронхоспастическом синдроме и бронхиальной астме.

Ключевые слова: диафрагмальная мышца; сократительные свойства; некантовая секреция; белковая сенсibilизация; АТФ; мышца.

The mechanisms of influencing the organism allergic reorganization on the contractile function of a mouse diaphragm (MD) muscle strip have been studied. It has been demonstrated that in case of protein sensitization (PS) the increase of the power of the contraction (PC) produced by cholinomimetic carbacholin (ChC) in MD *in vitro* is observed, as well as the decrease of acetylcholine (ACh) nonquantum secretion (NQS) in the zone of end plate. PC increase under ChC is a consequence of the cholinomimetic sensitivity increase of muscle fiber postsynaptic membrane due to the decrease of ACh NQS in the zone of end plate. Exogenous ATP also increases PC and decreases ACh NQS of MD in both intact and sensitized mice. The vector of muscle PC dynamics under the cholinomimetic correlates with ACh NQS for all the variants of experimental influence. However, the extent of these changes in the muscle of a sensitized animal is less pronounced than in a non-sensitized animal. It is speculated that the lesser variability of functional properties caused by ATP in MD of sensitized mice compared with control is an evidence of developing mechanisms of the resistance for external loads in respiratory muscles, which appears for bronchospastic syndrome and bronchial asthma.

Keywords: diaphragmal muscle; contractile properties; nonquantum secretion; protein sensitization; ATP; mouse.

Аллергическая перестройка организма, изменяя функциональные свойства поперечнополосатых мышц, затрагивает холинотропные механизмы их возбуждения [1]. Данное предположение было подтверждено нашими исследованиями *in vitro*, выполненными на «быстрых» и «медленных» мышцах голени мышцы [4, 5, 7], в которых было показано изменение характеристик сокращения поперечнополосатых мышц мышцы на холинотропник карбахолин и некантовой секреции ацетилхолина в зоне концевой пластинки при белковой сенсibilизации.

Ранее на тех же объектах и в тех же экспериментальных моделях была показана способность экзогенной АТФ обратимо изменять сократительную функцию и величину некантовой секреции ацетилхолина [9, 11]. Одним из объяснений механизмов обнаруженного действия стало предположение, что АТФ влияет на холинотропные процессы возбуждения мышечных волокон (МВ).

Диафрагма, являясь основной дыхательной мышцей, изменяет свои сократительные свойства в условиях нарушенной бронхиальной проводимости при заболеваниях, имеющих в своей основе аллергический компонент, таких как бронхоспастический синдром и бронхиальная астма [12, 13, 16].

Принимая во внимание тот факт, что АТФ, являясь эндогенным модулятором функции поперечнополосатых мышц [9], одновременно способна участвовать в механизмах генерации иммунного ответа [14], мы исследовали влияние экзогенной АТФ на функциональные свойства диафрагмы *in vitro* у несенсibilизированных и сенсibilизированных чужеродным белком мышцей.

Цель работы: изучение влияния экзогенной АТФ на сократительные свойства и уровень некантовой секреции Ах в зоне концевой пластинки полосок диафрагмы интактных и сенсibilизированных мышцей.

Исследование сократительной функции поперечнополосатой мышцы экспериментального животного проводилось методом регистрации сократительных свойств *in vitro*, в изометрическом режиме с помощью фотоэлектрического преобразователя [2].

Эксперименты проводились на препаратах изолированных мышц мыши — диафрагме. Препарат мышцы помещался в термостатируемую ванночку и одним концом крепился к датчику фотоэлектрического преобразователя. Другой конец жестко фиксировался в ванночке. Мышца при постоянной перфузии физиологическим раствором типа Кребса растягивалась в течение 20–30 минут с силой, достаточной для достижения изометрического режима сокращения. Сокращение мышцы вызывалось карбахолином (Кх) в конечной концентрации 2×10^{-4} М, раствор которого добавлялся в ванночку микродозатором при остановленной перфузии. Кривая сокращения регистрировалась самописцем Н-327–1. Для оценки сократительных свойств полоски скелетной мышцы было использовано 3 параметра, позволяющих достаточно объективно отражать функциональное состояние исследуемой полоски мышцы: 1) время развития максимального напряжения (СТ); 2) сила одиночного сокращения (Рос); 3) скорость сокраще-

ния (Vос), определяемая отношением $P_{ос} / СТ$. Сила сокращения определялась в миллиграммах; временные характеристики — в секундах; скорость сокращения — отношением мг/сек.

Неквантовую секрецию Ах измеряли с помощью стеклянных микроэлектродов (сопротивлением 8–12 МΩ, заполненных 2,5 М КСl) [10]. Для определения ее величины сначала армином 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 неквантовой секреции Ах (Н-эффект).

Методы сенсibilизации мышцей яичным альбумином с гелем гидроокиси алюминия и контроля сенсibilизации подробно описаны в работе И. С. Гушина и соавт. [3].

Влияние на диафрагму АТФ (перфузия в концентрации 1×10^{-4} Мв течение 5 минут) изучалось сравнением показателей сокращения до и после перфузии мышцы раствором, содержащим изучаемое вещество в заданной молярной концентрации; время действия его на мышцу определялось длительностью перфузии.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Изучение сократительной функции полоски диафрагмы мыши показало, что карбахолин в концентрации 2×10^{-4} М вызывает ее сократительный ответ со следующими характеристиками: СТ — $11,3 \pm 0,63$ сек; Рос — $335,2 \pm 93,47$ мг; Vос — $31,0 \pm 1,7$ мг/сек. Белковая сенсibilизация изменяет эти показатели: СТ — $13,71 \pm 0,42$ сек, Рос — $469,83 \pm 86,78$ мг ($p < 0,01$), Vос — $32,08 \pm 0,89$ мг/сек, приводя к достоверному увеличению силы сокращения.

Изучение неквантовой секреции Ах в диафрагме показало, что МП покоя, изначально составляющий $(-70,7) \pm 1,9$ мВ ($n = 150$), в присутствии ТБК возрастал до $(-75,9) \pm 0,7$ мВ ($n = 150$). Таким образом, Н-эффект в контроле составлял $5,2 \pm 0,4$ мВ ($n = 150$). В условиях белковой сенсibilизации МП покоя, изначально составляющий $(-70,0) \pm 1,5$ мВ ($n = 150$), в присутствии ТБК возрастал до $(-74,4) \pm 0,6$ мВ ($n = 150$). То есть значение Н-эффекта снижалось, составляя в описанных условиях эксперимента $4,4 \pm 0,5$ мВ ($n = 150$) ($p < 0,05$).

Изучение влияния АТФ на сократительную функцию диафрагмы несенсibilизированной мышцей показало, что карбахолин в концентрации 2×10^{-4} М вызывает сократительный ответ полоски мышцы силой $335,2 \pm 93,47$ мг. Инкубация с АТФ увеличивает этот показатель до $425,2 \pm 100,9$ мг ($p < 0,01$).

Изучение неквантовой секреции Ах в диафрагме показало, что МП покоя, изначально составляющий $(-70,7) \pm 1,9$ мВ ($n = 150$), в присутствии ТБК возрастал до $(-75,9) \pm 0,7$ мВ ($n = 150$). Таким образом, Н-эффект в контроле составлял $5,2 \pm 0,4$ мВ ($n = 150$).

После инкубации с АТФ МП покоя, изначально составляющий $(-70,0) \pm 0,4$ мВ ($n = 150$), в присутствии ТБК возрастал до $(-71,5) \pm 0,5$ мВ ($n = 150$). То есть значение Н-эффекта снижалось, составляя в описанных условиях эксперимента $1,5 \pm 0,5$ мВ ($n = 150$) ($p < 0,001$).

Изучение влияния АТФ на сократительную функцию диафрагмы сенсibilизированной мышцей показало, что карбахолин в концентрации 2×10^{-4} М вызывает сократительный ответ полоски мышцы силой $469,83 \pm 86,78$ мг. Инкубация с АТФ увеличивает этот показатель до $540,67 \pm 80,34$ мг ($p < 0,01$).

Изучение неквантовой секреции Ах в диафрагме сенсibilизированной мышцей показало, что МП покоя, изначально составляющий $(-70,0) \pm 1,5$ мВ ($n = 150$), в присутствии ТБК возрастал до $(-74,4) \pm 0,6$ мВ ($n = 150$). Таким образом, Н-эффект в контроле составлял $4,4 \pm 0,5$ мВ ($n = 150$). После инкубации с АТФ МП покоя, изначально составляющий $(-69,1) \pm 0,4$ мВ ($n = 150$), в присутствии ТБК возрастал до $(-71,5) \pm 0,6$ мВ ($n = 150$). То есть значение Н-эффекта снижалось, составляя в описанных условиях эксперимента $2,4 \pm 0,6$ мВ ($n = 150$) ($p < 0,001$).

Предварительная перфузия сураминоном (100 мкМ) устраняла влияние АТФ на Кх-вызванное сокращение диафрагмальной мышцей и неквантовую секрецию Ах как интактных, так и сенсibilизированных мышцей. Аденозин в той же концентрации, что и АТФ не влиял на неквантовую секрецию Ах и не изменял сократительных свойств полоски диафрагмы как интактных, так и сенсibilизированных мышцей.

ОБСУЖДЕНИЕ

Наши исследования показали, что сенсibilизация мышцы к яичному альбумину приводит к увеличению силы сокращения полоски диафрагмальной мышцы и снижает уровень неквантовой секреции Ах в зоне концевой пластинки. Увеличение силы сокращения на Кх до 140,16 % является следствием увеличения чувствительности постсинапса к холиномиметику (ослабление механизмов десенситизации холинорецепторов постсинаптической мембраны), отражением чего является снижение Н-эффекта до 84,61 % (рис. 1).

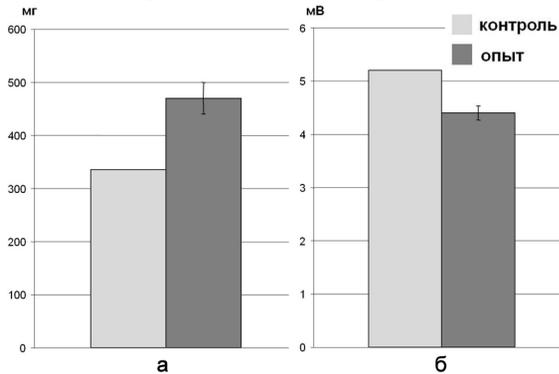


Рис. 1. Влияние белковой сенсibilизации на функциональные характеристики изолированной полоски диафрагмы мышцы: а — силу сокращения, вызванного Кх (2×10^{-4} М); б — величину Н-эффекта

Обнаруженная динамика свидетельствует, что белковая сенсibilизация затрагивает, в первую очередь, холиноопосредованные процессы возбуждения МВ. Дальнейшие наши исследования были посвящены поиску возможных причин, определяющих вариабельность функциональных свойств мышц при белковой сенсibilизации. Изменения функциональных свойств холиновозбудимой мембраны, лежащие в их основе, могут являться следствием изменений, возникающих в механизмах выделения кофакторов синаптической передачи. Исходя из данных Tsai T. L. et al. [17], показавших участие АТФ в генерации иммунного ответа, мы предположили возможное участие в процессах изменения функции поперечнополосатых мышц при белковой сенсibilизации пуринов. Это определило изучение нами, в рамках выбранных экспериментальных моделей, динамики функциональных свойств полоски диафрагмы мышцы после инкубации мышцы с АТФ.

Вопрос влияния АТФ (в том числе и экзогенной) на СМ имеет самостоятельную ценность, поскольку механизмы регуляции их функций с участием пуринов, в отличие от гладкой и сердечной мышц, до настоящего времени исследованы очень слабо.

Нами показано, что экзогенная АТФ повышает силу сокращения полоски диафрагмы мышцы на КХ и снижает уровень неквантовой секреции Ах. Вектор динамики силы и величины Н-эффекта совпал с таковыми при БС, что позволило нам предположить аналогичную последовательность изменения. Увеличение силы сокращения мышцы на Кх после перфузии с АТФ является следствием возрастания

чувствительности постсинапса к холиномиметику. Угнетение неквантовой секреции Ах в зоне синапса вызывает снижение механизмов десенситизации ХР постсинаптической мембраны, что приводит к возрастанию ее чувствительности к Кх (рис. 2).

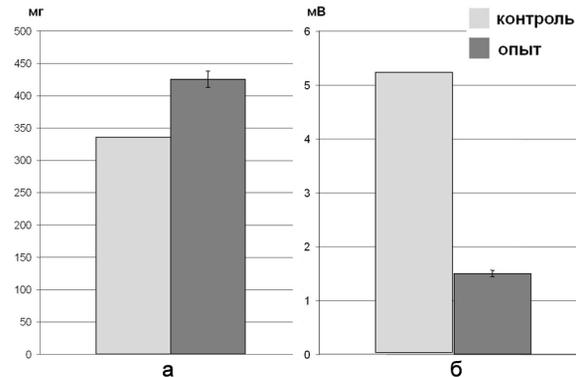


Рис. 2. Функциональные характеристики изолированной полоски диафрагмы интактной мышцы до (контроль) и после (опыт) влияния АТФ: а — сила сокращения, вызванного Кх (2×10^{-4} М) (n = 10); б — величина Н-эффекта (n = 150)

Изучение влияния АТФ на динамику вышеперечисленных функциональных свойств диафрагмы сенсibilизированных мышцей демонстрирует ту же направленность, что указывает на отсутствие принципиальных различий в механизмах влияния пуринов на мышцы сенсibilизированных и интактных мышцей (рис. 3).

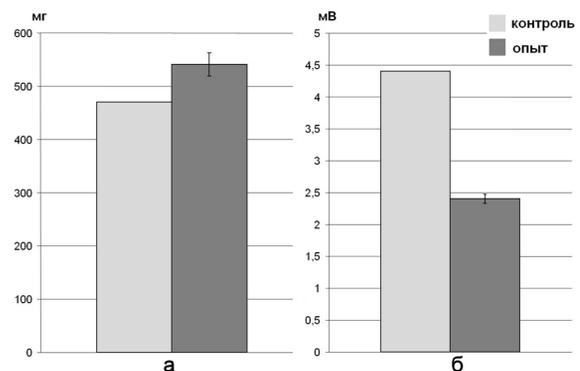


Рис. 3. Функциональные характеристики изолированной полоски диафрагмы сенсibilизированной мышцы до (контроль) и после (опыт) влияния АТФ: а — сила сокращения, вызванного Кх (2×10^{-4} М) (n = 7); б — величина Н-эффекта (n = 150)

Однако количественная оценка этих изменений выявляет определенные различия, указывающие на АТФ как на одного из участников изменения холиноопосредованных механизмов возбуждения в работе дыхательных мышц при белковой сенсibilизации. И у сенсibilизированных, и у интактных животных экзогенная АТФ увеличивала силу сокращения на Кх и уменьшала величину Н-эффекта. Однако, если сила сокращения мышцы у интактных животных возрастала на 26%, то у сенсibilизированных — лишь на 15%. Н-эффект диафрагмы несенсibilизированных мышцей после влияния АТФ снижался до 28,8% от исходного, у сенсibilизированных же лишь до 54,5%. Менее выра-

женная динамика функциональных свойств диафрагмы, вызванная АТФ у сенсibilизированных мышцей в сравнении с контролем, позволяет нам предполагать ее участие в механизмах изменений функциональных свойств дыхательных мышц, вызванных белковой сенсibilизацией.

Реализация постсинаптических эффектов на диафрагме мышцы аналогична таковым у большинства других скелетных мышц и осуществляется через P2-рецепторы. Подтверждением этому служат как литературные данные, так и результаты собственных исследований. Во-первых, сурамин, антагонист P2-рецепторов, устранял влияние АТФ во всех экспериментальных моделях. Кроме того, замена в наших экспериментах АТФ на аденозин, реализующий свое действие не через P2, а через аденозиновые P1-рецепторы [8], не вызывала изменения ни параметров КХ-вызванного сокращения диафрагмы, ни величины Н-эффекта.

К сожалению, в литературе нам не встретилось работ об участии пуринов в механизмах изменения функции поперечнополосатых мышц при аллергии. Однако результаты наших экспериментов свидетельствуют, что внеклеточная АТФ может являться участником изменения свойств диафрагмальной мышцы при сенсibilизации животного к чужеродному белку. Механизмы эти весьма разнообразны и включают в себя как прямое действие пуринов на контрактильную функцию дыхательных мышц, так и их влияние на не-

которые этапы генерации иммунного ответа. В первом случае — это влияние АТФ на секрецию медиатора и системы внутриклеточных посредников поперечнополосатых мышц [6, 9, 10]. Также мы можем предположить ее влияние на работу АТФ-зависимых калиевых каналов [17]. Во втором случае, в литературе показана способность АТФ, участвуя в увеличении продукции интерлейкина-1, усилить специфическое звено иммунитета [14]. Внеклеточная АТФ при генерации иммунного ответа помогает образованию активной каспазы-1, что, в свою очередь, обеспечивает секрецию биологически активных форм интерлейкина-1. Гиперэкспрессия рецептора P2X7 приводит к секреции зрелого интерлейкина-1 β [15].

Являясь экспериментальной моделью аллергии, белковая сенсibilизация позволяет изучать механизмы как патологических, так и компенсаторных изменений, возникающих в системе внешнего дыхания. В нашей работе было показано, что сенсibilизация животных приводит к увеличению силы сокращения полоски диафрагмы мышцы на Кх. Этот факт, а также меньшая изменчивость функциональных свойств диафрагмы, вызванная АТФ у сенсibilизированных мышцей в сравнении с контролем, является возможным свидетельством развития механизмов резистентности, устойчивости к внешним нагрузкам у дыхательных мышц, которая должна появляться у них при бронхоспастическом синдроме и бронхиальной астме.

ВЫВОДЫ

1. Увеличение силы сокращения на карбахолин диафрагмальной мышцы мышцей *in vitro* при белковой сенсibilизации является следствием повышения чувствительности постсинаптической мембраны мышечных волокон к холинмиметику, что обусловлено снижением уровня неквантовой секреции ацетилхолина в зоне концевой пластинки.

2. Увеличение силы сокращения полоски диафрагмы мышцей на карбахолин, вызванное экзоген-

ной АТФ, обусловлено снижением уровня неквантовой секреции ацетилхолина в зоне концевой пластинки.

3. Белковая сенсibilизация снижает динамику функциональных свойств диафрагмы мышцей, вызванную экзогенной АТФ, угнетая увеличение силы сокращения мышцей на карбахолин вследствие адекватного снижения неквантовой секреции ацетилхолина в зоне концевой пластинки.

ЛИТЕРАТУРА

1. Белковые спектры и фосфолипидный состав мембран, обогащенных холинорецепторами из скелетных мышц крыс в условиях сенсibilизации / А. Д. Адо, Н. В. Стомахина, Л. М. Тулуевская, В. Н. Федосеева // Бюл. эксперим. биологии и 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. журн. СССР. 1986. Т. 72, № 3. С. 387–390.
3. Экспериментальная модель для разработки и оценки способов контроля немедленной аллергии / И. С. Гущин [и др.] // Патол. физиология и эксперимент. терапия. 1986. № 4. С. 18–23.
4. Теплов А. Ю. Влияние белковой сенсibilизации на сократительные свойства «быстрых» и «медленных» мышцей мышцей *in vitro* // Нижегород. мед. журн. 2006. № 3. С. 21–24.
5. Теплов А. Ю., Гришин С. Н., Зефирова А. Л. Возможные механизмы влияния белковой сенсibilизации на сократительную функцию «быстрых» и «медленных» мышцей мышцей // БЭБМ. 2009. Т. 147, № 5. С. 487–492.
6. Роль протеинкиназы-С в механизмах влияния АТФ на сократительную функцию изолированной полоски диафрагмы мышцей / А. Ю. Теплов [и др.] // БЭБМ. 2006. Т. 141, № 4. С. 389–392.
7. Фархутдинов А. М., Гришин С. Н., Теплов А. Ю. Влияние белковой сенсibilизации на сократительную функцию изолированной «быстрой» мышцей мышцей определяется состоянием постсинаптической мембраны // Гений ортопедии. 2009. № 4. С. 30–32.
8. Burnstock G. Historical review: ATP as a neurotransmitter // Trends Pharmacol. Sci. 2006. Vol. 27, No 3. P. 166–176.
9. ATP but not adenosine inhibits nonquantal acetylcholine release at the mouse neuromuscular junction / A. V. Galkin [et al.] // Eur. J. Neurosci. 2001. Vol. 13, No 11. P. 2047–2053.
10. The effect of non-quantal acetylcholine release on quantal miniature currents at mouse diaphragm / R. A. Giniatullin [et al.] // J. Physiol. 1993. Vol. 466. P. 105–114.
11. Different effects of ATP on the contractile activity of mice diaphragmatic and skeletal muscles / S. Grishin [et al.] // Neurochem. Int. 2006. Vol. 49, No 8. P. 756–763.
12. Therapeutic effects of anti-B7-1 antibody in an ovalbumin-induced mouse asthma model / W. Ji [et al.] // Int. Immunopharmacol. 2008. Vol. 8, No 9. P. 1190–1195.

13. Kim S. H., Lee Y. C. Piperine inhibits eosinophil infiltration and airway hyperresponsiveness by suppressing T cell activity and Th2 cytokine production in the ovalbumin-induced asthma model // *J. Pharm. Pharmacol.* 2009. Vol. 61, No 3. P. 353–359.
14. Mariathasan S., Monack M. Inflammasome adaptors and sensors: intracellular regulators of infection and inflammation // *Nat. Rev. Immunol.* 2007. Vol. 7, No 1. P. 31–40.
15. Altered cytokine production in mice lacking P2X (7) receptors / M. Solle [et al.] // *J. Biol. Chem.* 2001. Vol. 276, No 1. P. 125–132.
16. Ovalbumin-induced sensitization affects non-quantal acetylcholine release from motor nerve terminals and alters contractility of skeletal muscles in mice / A. Teplov [et al.] // *Exp. Physiol.* 2009. Vol. 94, No 2. P. 264–268.
17. Role of ATP in the ROS-mediated laryngeal airway hyperreactivity induced by laryngeal acid-pepsin insult in anesthetized rats / T. L. Tsai [et al.] // *J. Appl. Physiol.* 2009. Vol. 106, No 5. P. 1584–1592.

Рукопись поступила 08.06.10.

Сведения об авторах:

1. Теплов Александр Юрьевич — Казанский государственный медицинский университет, г. Казань, кафедра патофизиологии, доцент, к. б. н.; e-mail: AlikTeplov@mail.ru
2. Гришин Сергей Николаевич — Национальный исследовательский университет, г. Казань, кафедра телевидения и мультимедийных систем, к. б. н.; e-mail: sngrichin@mail.ru.
3. Фархутдинов Альберт Мансурович — Казанский государственный медицинский университет, г. Казань, кафедра патофизиологии, аспирант; e-mail: am_farkhutdinov@mail.ru.
4. Теплов Олег Вадимович — Казанский государственный медицинский университет, г. Казань, студент 5 курса педиатрического факультета.