

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ КОНЦЕВЫХ ПЛАСТИНОК КАМБАЛОВИДНОЙ МЫШЦЫ КРЫСЫ ПРИ КРАТКОВРЕМЕННОМ НАРУШЕНИИ ДВИГАТЕЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ

© 2019 г. В.В. Кравцова, Е.А. Сабурова, И.И. Кривой

Санкт-Петербургский государственный университет, 199034, Санкт-Петербург, Университетская наб., 7/9

E-mail: iikrivoi@gmail.com

Поступила в редакцию 04.07.2019 г.

После доработки 04.07.2019 г.

Принята к публикации 12.07.2019 г.

Проведен анализ распределения никотиновых холинорецепторов, степени их фрагментации, площади концевых пластинок, а также мембранной локализации $\alpha 2$ -изоформы Na,K-АТФазы в камбаловидной мышце крысы после функциональной разгрузки (метод антиортостатического вывешивания) в течение 1–3 суток. После разгрузки наблюдалось усиление фрагментации концевых пластинок, сопровождающееся снижением площадей отдельных фрагментов; общая площадь концевых пластинок не изменялась. Плотность распределения никотиновых холинорецепторов также не изменялась, однако наблюдалось достоверное снижение плотности распределения $\alpha 2$ -изоформы Na,K-АТФазы. Предположительно, выявленные изменения являются результатом адаптационных перестроек в скелетной мышце, которые развиваются не только при хронических нарушениях, но уже на ранних этапах двигательной дисфункции.

Ключевые слова: моторная концевая пластинка, никотиновый холинорецептор, изоформы Na,K-АТФазы, двигательная активность.

DOI: 10.1134/S000630291905017X

Моторная концевая пластинка нервно-мышечного синапса позвоночных представляет собой высокоспециализированную область сарколеммы, лежащую непосредственно под двигательным нервным окончанием [1,2]. Мембрана концевой пластинки характеризуется исключительно высокой плотностью распределения никотиновых холинорецепторов (нХР), которые образуют отдельные кластеры (фрагменты) [3]. В кластеризации нХР и стабилизации концевой пластинки важную роль играют холестерин и липидные плотники, кроме того, нХР молекулярно и функционально взаимодействуют с $\alpha 2$ -изоформой Na,K-АТФазы [4]. После освобождения из нервного окончания кванты ацетилхолина активируют нХР, что приводит к генерации потенциала концевой пластинки. Процесс трансформации этого локального потенциала в распространяющийся потенциал действия мышечного волокна является одним из ключевых этапов, от которого зависит не только надежность нервно-мышечной передачи, но и ее пластичность [1,2].

Ультраструктура нервно-мышечного соединения и концевой пластинки существенно зависят от двигательной активности. Снижение двигательной активности сопровождается многочисленными нарушениями структуры концевой пластинки, включая изменение ее площади и усиление фрагментации в распределении нХР. Подобные нарушения наблюдаются после денервации [5] и продолжительной функциональной разгрузки [6], при возрастных изменениях [3], при миодистрофии [7–9] и других формах мышечной патологии [10].

Дестабилизация концевой пластинки, сопровождающаяся нарушением структуры липидных плотников и снижением активности $\alpha 2$ -изоформы Na,K-АТФазы, наблюдалась уже в течение первых 6–12 ч снижения двигательной активности камбаловидной мышцы крысы [11–13]. В данной работе нами впервые исследованы последствия функциональной разгрузки задних конечностей крысы в течение одних-трех суток. Проведен анализ распределения нХР, степени их фрагментации, площади концевых пластинок, а также мембранной локализации $\alpha 2$ -изоформы Na,K-АТФазы.

Сокращения: нХР — никотиновые холинорецепторы, АМРК — АМФ-активируемая протеинкиназа.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Работа проведена на изолированных нервно-мышечных препаратах камбаловидных мышц самцов крыс линии Wistar массой 190–210 г. Крысы были разделены на две группы – контрольную и группа крыс, которых подвергали антиортостатическому вывешиванию задних конечностей (hindlimb suspension, HS) в течение 24 или 72 ч традиционным способом [14].

Сразу после выделения мышцу с отрезком нерва помещали в экспериментальную камеру с физиологическим раствором следующего состава (в мМ): NaCl – 137; KCl – 5; CaCl₂ – 2; MgCl₂ – 2; NaHCO₃ – 24; NaH₂PO₄ – 1; глюкоза – 11; pH 7,4. Раствор аэрировали карбогеном (95% O₂ + 5% CO₂). Для определения локализации nXP и α 2-изоформы Na,K-АТФазы в области моторной концевой пластинки использовали соответственно α -бунгаротоксин (tetramethylrhodamine- α -bungarotoxin; Biotium, США) в концентрации 1 мкМ и меченный специфической флуоресцентной меткой BODIPY убаин (Ouabain-Bodipy; Invitrogen, США) в концентрации 1 мкМ, как описано ранее [15]. Опыты проводили при комнатной температуре (около 22°C). Для получения изображений применяли конфокальную систему Leica TCS SP5 с объективом 63 $\times$ и числовой апертурой 1.30; обработку изображений проводили с помощью программы ImageJ.

Использовали химреактивы производства Sigma (США). Статистическую обработку проводили с помощью программы Origin Pro 8 (ORIGIN Software, США) и критериев Стьюдента и ANOVA. В тексте, таблице и на рисунках приведены средние значения величин с их ошибками ($M \pm S.E.$).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В контроле были исследованы 32 концевые пластинки (9 мышц от шести крыс); через 24 ч разгрузки – 19 концевых пластинок (7 мышц от пяти крыс) и через 72 ч разгрузки – 24 концевые пластинки (4 мышцы от трех крыс).

Примеры изображений распределения nXP и α 2-изоформы Na,K-АТФазы в концевых пластинках в различных условиях показаны на рис. 1. Сигналы от nXP, меченных α -бунгаротоксином, и α 2-изоформы Na,K-АТФазы, меченной убаином, были сконцентрированы в области концевой пластинки и совпадали при наложении, что соответствует полученным ранее данным [15]. Такая локализация сохранялась и после проведенной разгрузки (рис. 1).

Хорошо известно, что nXP в пределах концевой пластинки распределены в виде отдельных фрагментов [3]. Через 24 и 72 ч разгрузки наблюдалось достоверное устойчивое усиление фраг-

ментации (увеличение количества фрагментов) концевых пластинок, сопровождающееся снижением площадей отдельных фрагментов. В результате общая площадь концевых пластинок не изменялась (рис. 2, а–в). Интенсивность флуоресценции α -бунгаротоксина, т.е. плотность распределения nXP, также не изменялась после разгрузки (рис. 2г). Таким образом, наша модель кратковременной разгрузки существенно отличается по этому показателю от моделей хронической двигательной дисфункции – мышей линий mdx (модель миодистрофии Дюшенна) и Bla/J (одна из моделей дисферлинопатии), у которых наблюдалось снижение плотности распределения nXP [8,9]. В то же время через 24 и 72 ч разгрузки наблюдалось достоверное снижение относительной интенсивности флуоресценции убаина (α 2-изоформы Na,K-АТФазы) (рис. 2д), что может отражать снижение плотности распределения этого белка в мембране концевой пластинки. Аналогичный эффект был обнаружен у мышей Bla/J [9].

Необходимо отметить, что в контроле наблюдалась достоверная отрицательная корреляция между интенсивностью флуоресценции α -бунгаротоксина в отдельных фрагментах концевых пластинок от площади этих фрагментов (рис. 3а). Аналогичная корреляция наблюдалась и для флуоресценции убаина (рис. 3б). Причина существования такой корреляционной зависимости не ясна, но можно предположить, что эта корреляция отражает соответствующую зависимость плотности распределения nXP и α 2-изоформы Na,K-АТФазы от размера фрагментов. Через 24 ч разгрузки сохранялась лишь тенденция к такой корреляции, а через 72 ч разгрузки корреляция полностью отсутствовала (рис. 3а и 3б). Механизм этого явления неизвестен, можно лишь предположить, что при двигательной разгрузке происходит не только усиление фрагментации концевой пластинки, но и перераспределение nXP и α 2-изоформы Na,K-АТФазы в мембране. Поскольку локализация белков в плазматической мембране принципиально зависит от липидного окружения, важную роль в такой перестройке может играть нарушение структуры липидной структуры концевой пластинки, наблюдаемое уже в первые сутки разгрузки [12,16].

Необходимо отметить, что мы наблюдали также высокодостоверную положительную корреляционную зависимость между интенсивностью флуоресценции убаина и α -бунгаротоксина в отдельных фрагментах (рис. 3в). Аналогичную зависимость наблюдали и в концевых пластинках камбаловидных мышц мышей линий C57Bl/6 и Bla/J (одна из моделей дисферлинопатии) [9]. Такая корреляционная зависимость сохранялась и после 24 и 72 ч разгрузки (рис. 3в). Если, как мы полагаем, эта корреляция отражает молекулярное

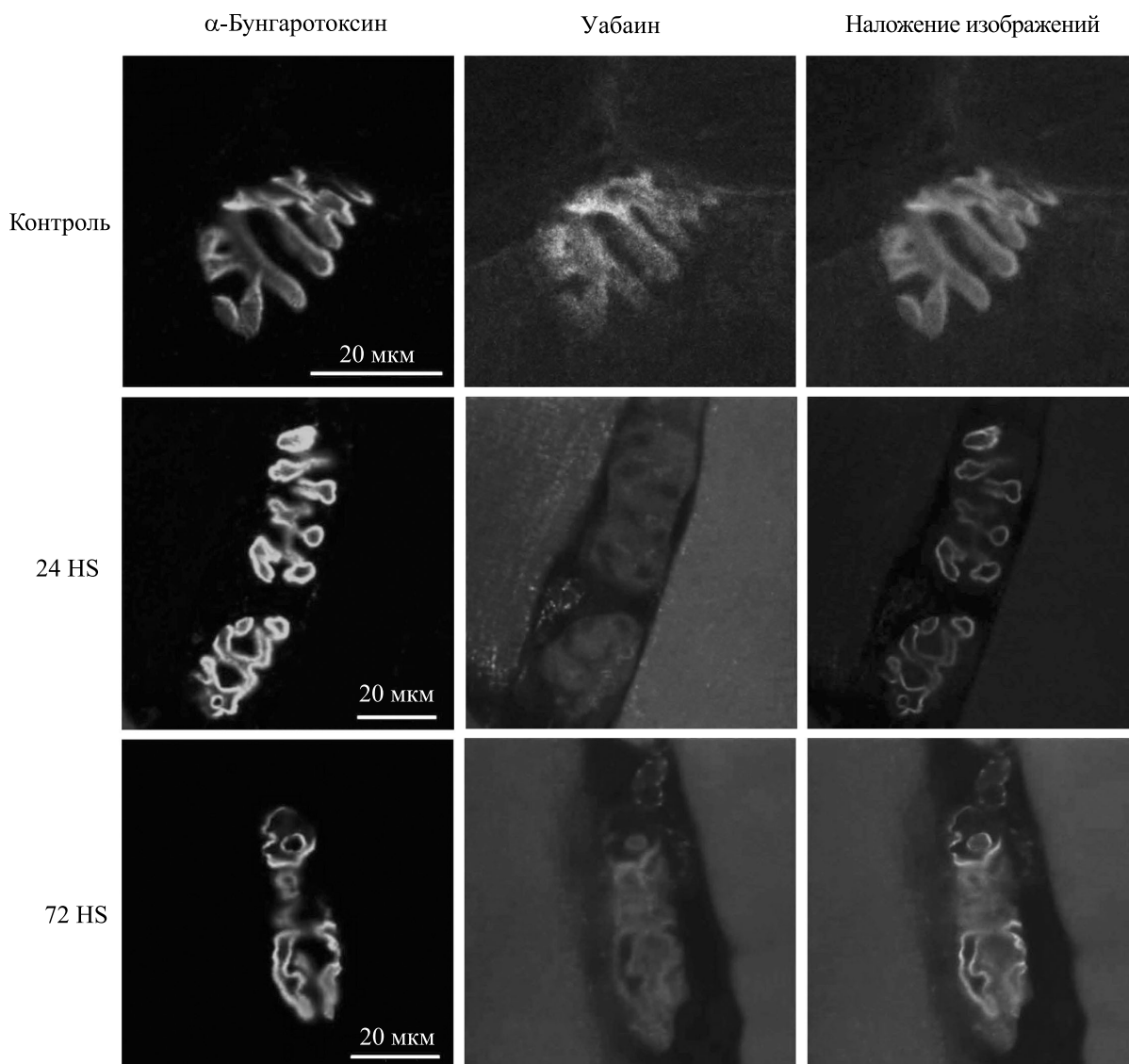


Рис. 1. Примеры изображений распределения нХР, меченных α -бунгаротоксином, и $\alpha 2$ -изоформы Na,K-АТФазы, меченной убаином, в концевых пластинках камбаловидных мышц контрольной крысы и крыс через 24 ч и 72 ч разгрузки.

взаимодействие между нХР и $\alpha 2$ -изоформой Na,K-АТФазы, можно предположить, что, несмотря на возможное перераспределение нХР и $\alpha 2$ -изоформы в мембране, молекулярное взаимодействие этих белков сохраняется и после разгрузки.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Несмотря на отличия в степени нарушений структурной организации концевых пластинок в мышцах с различной функциональной специализацией (диафрагма и камбаловидная мышца мышей mdx и Bla/J, как было показано в работах [8,9]; камбаловидная мышца крысы, как показано в данной работе), функциональные наруше-

ния $\alpha 2$ -изоформы Na,K-АТФазы наблюдаются во всех случаях. При этом снижение плотности распределения нХР в мембране наблюдается только при хроническом нарушении двигательной активности у мышей mdx и Bla/J [8,9]. Предположительно, наблюдаемые изменения являются результатом адаптационных перестроек в скелетной мышце, которые развиваются не только при хронических нарушениях, но уже на ранних этапах двигательной дисфункции. Молекулярный механизм такой адаптационной пластичности неизвестен. Одним из возможных регуляторов является АМФ-активируемая протеинкиназа (AMP-activated protein kinase, AMPK). В скелетной мышце AMPK является ключевым регулятором мышечного метаболизма, процессов тран-

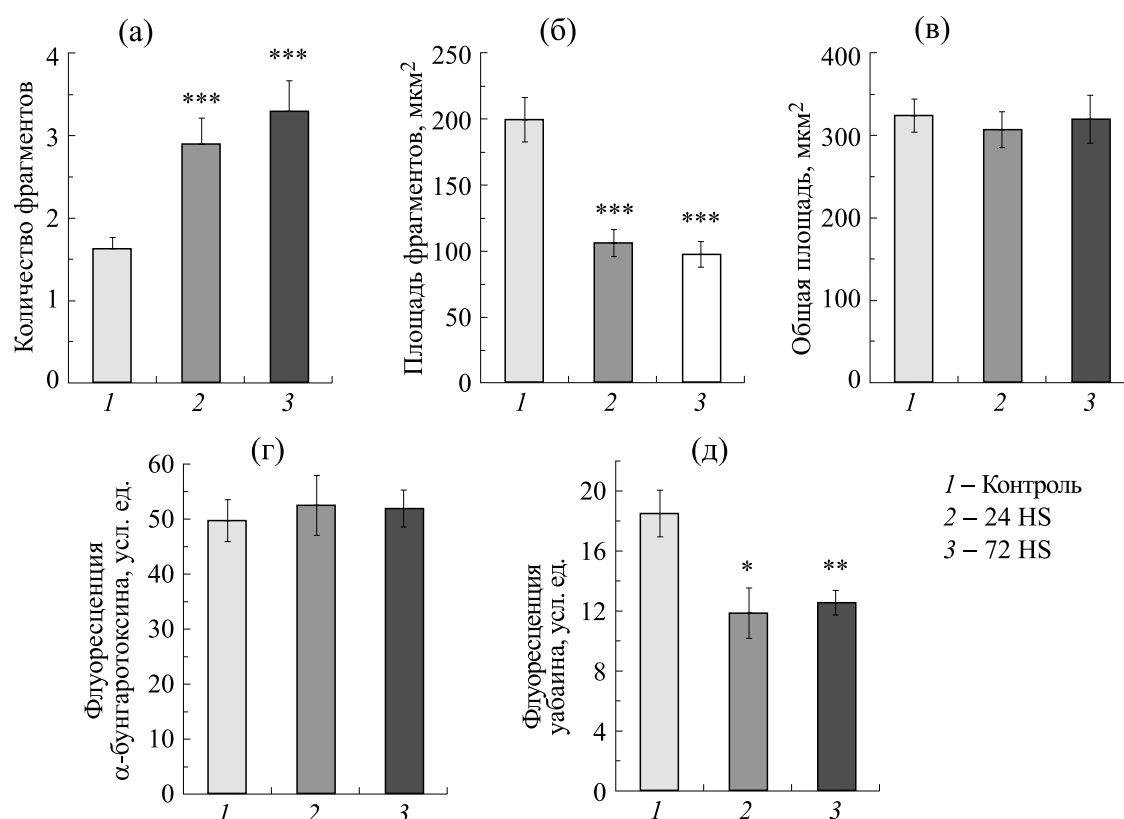


Рис. 2. Характеристики концевых пластинок камбаловидной мышцы крысы при двигательной разгрузке (HS – метод антиортостатического вывешивания) в течение 24 и 72 ч: (а) – среднее количество фрагментов в индивидуальных концевых пластинках, (б) – средняя площадь фрагментов, (в) – средняя общая площадь концевых пластинок, (г) – относительная интенсивность флуоресценции (усл. ед.) α-бунгаротоксина (нХР), (д) – относительная интенсивность флуоресценции (усл. ед.) уабаина (α2-изоформа Na,K-АТФазы); * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$ и *** – $p < 0,001$ по сравнению с контролем.

скрипции, аутофагии и многих других [17], причем уровень АМРК непосредственно связан с мышечной активностью [18]. В камбаловидной мышце крысы снижение уровня фосфорилирования АМРК [13,18,19], сопровождающееся снижением электрогенной активности α2-изоформы Na,K-АТФазы [11], наблюдается уже в первые сутки двигательной разгрузки. Важно отметить, что в скелетной мышце АМРК влияет также и на активность Na,K-АТФазы [20,21]. АМРК можно рассматривать также в качестве важного фактора поддержания структурно-функциональной организации нервно-мышечного соединения. Так, фармакологическая активация АМРК с помощью препарата AICAR (5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide) препятствует структурным нарушениям нервно-мышечного соединения и развитию симптомов мышечной атрофии [19,22]. Превентивное введение AICAR способно также стабилизировать структуру концевых пластинок и предотвращать деполяризацию мембраны, вызываемую двигательной разгрузкой [23]. Полученные нами новые факты могут быть полезными с точки зрения поиска путей коррекции мышеч-

ной дисфункции, основанных на знании молекулярных механизмов адаптационной пластичности скелетной мышцы.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность Ресурсному центру «Развитие молекулярных и клеточных технологий» Санкт-Петербургского государственного университета и лично Н.А. Костину за помощь в проведении работ с конфокальной микроскопией.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 18-15-00043).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все применимые международные, национальные и институциональные принципы ухода и использования животных при выполнении работы

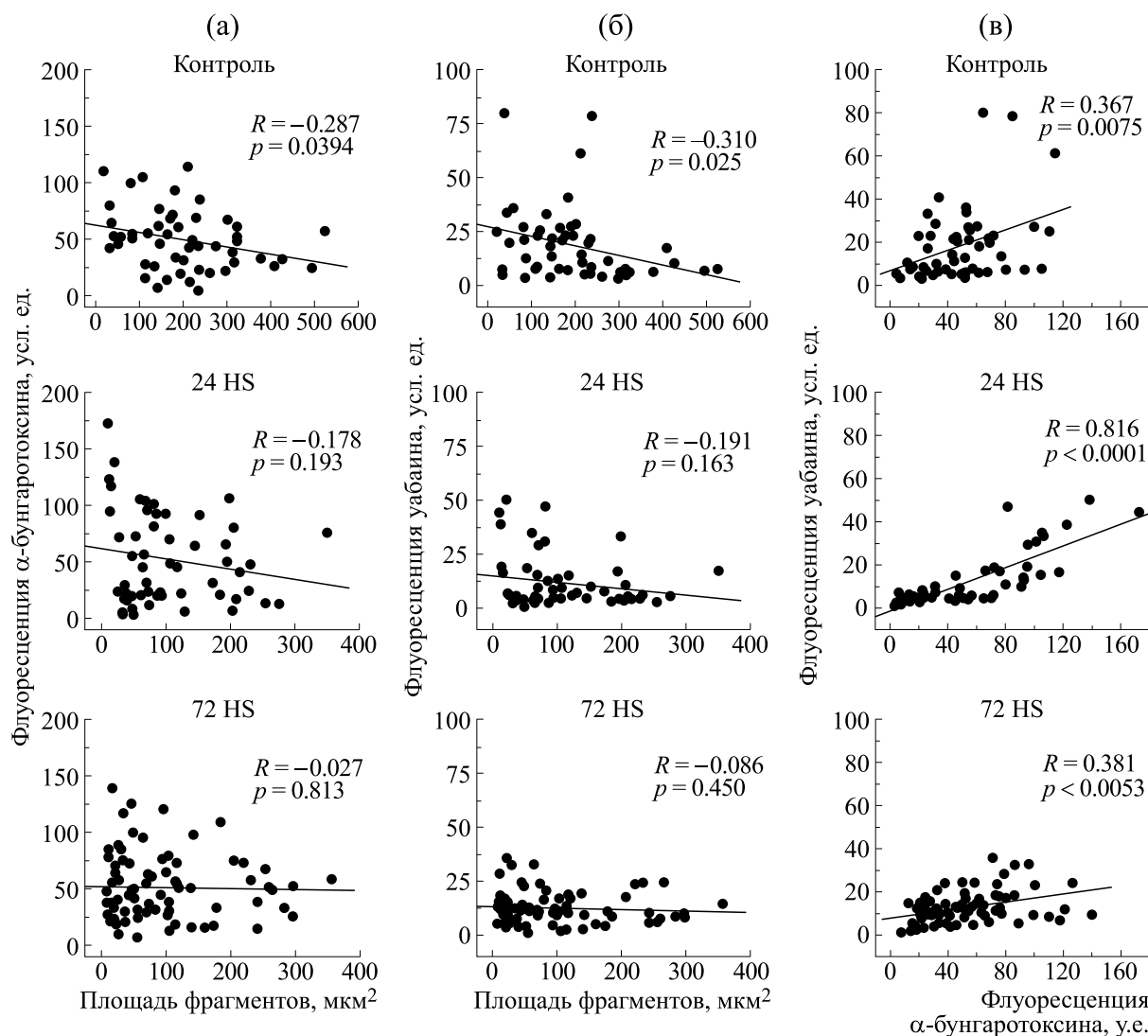


Рис. 3. Корреляционные зависимости интенсивности флуоресценции α -бунгаротоксина (усл. ед., nXP) и убаина (усл. ед., $\alpha 2$ -изоформа Na,K-АТФазы) в отдельных фрагментах концевых пластинок камбаловидной мышцы крысы при двигательной разгрузке (HS — метод антиортостатического вывешивания) в течение 24 и 72 ч. Представлены зависимости интенсивности флуоресценции α -бунгаротоксина (а) и убаина (б) от площади фрагментов; взаимозависимость интенсивности флуоресценции убаина и α -бунгаротоксина в отдельных фрагментах (в).

были соблюдены. Условия содержания животных и приемы работы с ними соответствовали нормам международного и российского законодательства.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. S. J. Wood and C. R. Slater, *Prog. Neurobiol.* **64**, 393 (2001).
2. C. R. Slater, *Int. J. Mol. Sci.* **18** (10), pii: E2183 (2017). DOI: 10.3390/ijms18102183.
3. S. Willadt, M. Nash, and C. R. Slater, *Sci. Rep.* **6**, 24849 (2016). DOI: 10.1038/srep24849.
4. I. I. Krivoi and A. M. Petrov, *Int. J. Mol. Sci.* **20**, 1046 (2019). DOI: 10.3390/ijms20051046.
5. P. Yampolsky, P. G. Pacifici, and V. Witzemann, *Eur. J. Neurosci.* **31**, 646 (2010).
6. M. R. Deschenes and M. H. Wilson, *J. Neurobiol.* **57**, 246 (2003).
7. E. M. van der Pijl, M. van Putten, E. H. Niks, et al., *Eur. J. Neurosci.* **43**, 1623 (2016).
8. V. V. Kravtsova, N. A. Timonina, G. F. Zakir'yanova, et al., *Neurochem. J.* **12**, 305 (2018). DOI: 10.1134/S1819712418040049.
9. V. V. Kravtsova, E. V. Bouzinova, V. V. Machkov, et al., *Bull. Exp. Biol. Med.* **166**, 593 (2019). DOI: 10.1007/s10517-019-04398-z.
10. D. J. Falk, A. G. Todd, S. Lee, et al., *Hum. Mol. Genet.* **24**, 625 (2015).

11. V. V. Kravtsova, A. M. Petrov, V. V. Matchkov, et al., *J. Gen. Physiol.* **147**, 175 (2016). DOI: 10.1085/jgp.201511494.
12. A. M. Petrov, V. V. Kravtsova, V. V. Matchkov, et al., *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **312**, C627 (2017). DOI: 10.1152/ajpcell.00365.2016.
13. A. V. Chibalin, B. Benziane, G. F. Zakyrjanova, et al., *J. Cell. Physiol.* **233**, 6329 (2018). DOI: 10.1002/jcp.26594.
14. E. Morey-Holton, R. K. Globus, A. Kaplansky, and G. Durnova, *Adv. Space Biol. Med.* **10**, 7 (2005).
15. J. A. Heiny, V. V. Kravtsova, F. Mandel, et al., *J. Biol. Chem.* **285**, 28614 (2010). DOI: 10.1074/jbc.M110.150961.
16. I. G. Bryndina, M. N. Shalagina, A. V. Sekunov, et al., *Neurosci. Lett.* **664**, 1 (2018). DOI: 10.1016/j.neulet.2017.11.009.
17. D. G. Hardie, B. E. Schaffer, and A. Brunet, *Trends Cell. Biol.* **26**, 190 (2016). DOI: 10.1016/j.tcb.2015.10.013.
18. N. A. Vilchinskaya, I. I. Krivoi, and B. S. Shenkman, *Int. J. Mol. Sci.* **19**, 3558 (2018). DOI: 10.3390/ijms19113558.
19. N. A. Vilchinskaya, E. P. Mochalova, T. L. Nemirovskaya, et al., *J. Physiol.* **595**, 7123 (2017). DOI: 10.1113/JP275184.
20. M. S. Ingwersen, M. Kristensen, H. Pilegaard, et al., *J. Membrane Biol.* **242**, 1 (2011). DOI: 10.1007/s00232-011-9365-7.
21. B. Benziane, M. Bjornholm, S. Pirkmajer, et al., *J. Biol. Chem.* **287**, 23451 (2012). DOI: 10.1074/jbc.M111.331926.
22. C. Cerveró, N. Montull, O. Tarabal, et al., *Neurotherapeutics* **13**, 198 (2016). DOI: 10.1007/s13311-015-0399-x.
23. В. В. Кравцова, Н. А. Вильчинская, В. Л. Розломий и др., *Биохимия* **84**, 1335 (2019). DOI: 10.1134/S0320972519090112.

Structural and Functional Characteristic Features of Rat Soleus Endplates under Short-Term Disruption of Motor Activity

V.V. Kravtsova, E.A. Saburova, and I.I. Krivoi

St. Petersburg State University, Universitetskaya nab. 7/9, St. Petersburg, 199034 Russia

In this study, we analyzed distribution of nicotinic acetylcholine receptors, the degree of fragmentation of endplates and their area, and membrane localization of the Na,K-ATPase $\alpha 2$ isoform in the rat soleus muscle after functional unloading (the method of hindlimb suspension) for 1–3 days. After unloading, increased endplate fragmentation, accompanied by a decrease in the area of individual fragments was observed; the total area of the endplates was not changed. The distribution density of nicotinic acetylcholine receptors also remained unaltered, however, a significant decrease in the distribution density of the Na,K-ATPase $\alpha 2$ isoform was observed. Presumably, identified changes resulted from adaptive skeletal muscle remodeling, developing not only under chronic disorders, but even in the early stages of motor dysfunction.

Keywords: motor endplate, nicotinic acetylcholine receptor, Na,K-ATPase isoforms, motor activity