

ПУРИНЕРГИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ АДАПТАЦИИ ДИАФРАГМЫ МЫШИ В УСЛОВИЯХ АЛЛЕРГИЧЕСКОЙ ПЕРЕСТРОЙКИ

© 2022 г. А.Е. Хайруллин, А.Ю. Теплов, С.Н. Гришин, А.У. Зиганшин

Казанский государственный медицинский университет, 420012, Казань, ул. Бутлерова, 49

E-mail: khajrulli@yandex.ru

Поступила в редакцию 11.01.2022 г.

После доработки 11.01.2022 г.

Принята к публикации 24.01.2022 г.

В экспериментах *in vitro* на полоске диафрагмальной мышцы мыши методом изометрической электростимуляционной механомиографии выявлена роль синаптической модуляции в процессах адаптации двигательной единицы к аллергии. Различия в сократительной активности мышцы под влиянием экзогенной АТФ у интактных и сенсibilизированных яичным альбумином животных демонстрируют участие пуринергических механизмов в развитии приспособительных изменений. В процессе сенсibilизации взаимодействие АТФ-зависимых механизмов как пост-, так и пресинаптической мембраны обеспечивает адекватную перестройку сократительной функции дыхательных мышц к бронхоконстрикции.

Ключевые слова: *m. diaphragma*, мышца, АТФ, белковая сенсibilизация, аллергия.

DOI: 10.31857/S0006302922030206, EDN: APYFUH

Механизмы адаптации поперечнополосатых мышц, обеспечивающих внешнее дыхание, при бронхиальной астме остаются до конца не изученными. Актуальность этой проблемы определяется как широким распространением аллергических заболеваний, так и вопросами спортивной медицины. В частности, хорошо известно, что среди участников олимпийских сборных скандинавских стран по зимним видам спорта встречается много астматиков [1, 2]. При обструкции воздухоносных путей в условиях повышения внешней нагрузки и развития вслед за этим гипоксии дыхательная мускулатура для компенсации возникающей кислородной недостаточности вынуждена работать интенсивнее. За счет чего происходит эта интенсификация, до конца не ясно. В предыдущих исследованиях нами было показано, что адаптация дыхательных мышц в условиях сенсibilизации обеспечивается АТФ-зависимыми механизмами, реализуемыми на постсинаптической мембране [3]. При белковой сенсibilизации АТФ как медиатор синаптической передачи нервно-мышечного соединения в значительной степени определяет динамику сократительной функции поперечнополосатых мышц. В этих работах показана роль постсинаптического звена реализации механизмов адаптации, на котором определяется его чувствительность к холиномиметику. В частности, различия в изменении силы сокращения на карбахоллин *in vitro* при

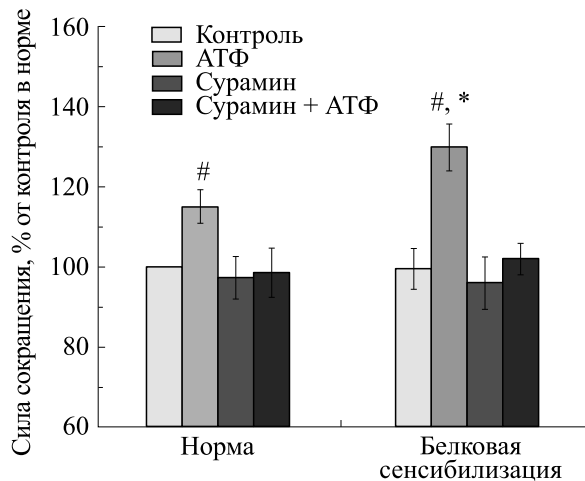
влиянии экзогенной АТФ на мышцы интактных и сенсibilизированных животных коррелируют с вектором изменения тока некантовой секреции ацетилхолина [3]. Пресинаптические структуры не могут оставаться непричастными к процессу адаптации, однако их вовлеченность в описанных условиях остается совершенно неизученной.

Цель данной работы заключалась в изучении роли пуринергической синаптической модуляции диафрагмы (*m. diaphragma*) мышцы в адаптации к аллергической перестройке.

МЕТОДЫ

Подготовительные процедуры. Эксперименты проводили на изолированных препаратах *m. diaphragma* 24 белых мышей обоего пола массой 25–32 г. Животных содержали в специальных боксах на обычном пищевом режиме, со свободным доступом к воде. Мышей сенсibilизировали яичным альбумином [3]. В качестве контроля использовали несенсibilизированных животных. Для эксперимента мыши были обескровлены под анестезией (этаминал натрия, 40 мг/кг), после чего из центральной части левой *m. diaphragma* выделяли полоску шириной 2–3 мм и длиной 15–18 мм.

Условия проведения экспериментов по регистрации параметров сокращения. Мышечный



Сила сокращений *m. diaphragma* мышцы, вызванных электрической стимуляцией интактных («Норма», $n = 14$) и сенсibilизированных («Белковая сенсibilизация», $n = 10$) животных в отсутствие и в присутствии АТФ (100 мкМ) и сурамина (100 мкМ). Результаты представлены в виде $M \pm m$ в % от исходных величин, принятых за 100%; # – $p < 0.05$ от контроля в норме, * – $p < 0.05$ от эффекта АТФ в норме.

препарат помещали вертикально в термостатируемую ванночку объемом 10 мл. Один конец мышцы был зафиксирован, другой конец при помощи лигатуры крепили к датчику механической активности. Ванночку заполняли модифицированным раствором Кребса следующего состава (в мМ): NaCl – 118.0, KCl – 4.75, CaCl₂ – 2.5, NaHCO₃ – 24.8, KH₂PO₄ – 1.18, MgSO₄·7H₂O – 1.18, глюкоза – 11.0, pH 7.4 ± 0.1. Условия изометрии достигались растяжением препарата мышцы в ванночке в течение 20 мин с силой 0.5 г при постоянной перфузии раствором при температуре 37°C. Сократительную реакцию изолированной мышцы вызывали при помощи электрического стимулятора MultiStim D330 (Digitimer, Великобритания) [2, 3]. Прямоугольные электрические импульсы частотой 0.1 Гц и длительностью 0.5 мс наносили в течение двух минут (двенадцать пиков). Среднее значение силы всех двенадцати сокращений анализировали как один результат. Силу сокращения оценивали в граммах. Ответы записывали с помощью изометрического механического датчика FSG-01 (Linton Instrumentation, Великобритания) и аналого-цифрового преобразователя MP100WSW (Biopack, США) [4, 5]. Результаты исследования наблюдали на мониторе и сохраняли на персональном компьютере.

Эффекты пуринергических агонистов и антагонистов. В начале эксперимента сократительные ответы диафрагмы на электрическую стимуляцию регистрировали дважды с интервалом 5 мин (для оценки стабилизации ответов). Затем в ван-

ночку с раствором Кребса добавляли раствор АТФ в концентрации 100 мкМ, через 10 мин инкубации записывали сократительные ответы на электрическую стимуляцию. Далее ткань промывали несколько раз и инкубировали в течение 20 мин антагонистом (сурамином в концентрации 100 мкМ). После этого добавляли агонист (АТФ 100 мкМ) и повторно записывали сократительные ответы. Все сократительные ответы вычисляли в процентах от исходных сокращений.

Достоверность различий. Статистическую обработку данных проводили с помощью программы статистической обработки SPSS Statistics. Проверку соответствия полученных данных нормальному распределению проводили с помощью критерия Колмогорова. Рассчитывали средние арифметические анализируемых параметров и стандартную ошибку. Статистическую значимость наблюдаемых изменений оценивали с помощью критерия Стьюдента для независимых и попарно сопряженных выборок. Различия рассматривались как значимые при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Электростимуляция полоски *m. diaphragma* сенсibilизированного животного практически не вызывала изменения силы ее сокращения в сравнении с контролем. Если у последних она составляла 542 ± 24 мг ($n = 14$), то в случае белковой сенсibilизации – 538 ± 27 мг ($n = 10$). Влияние экзогенного АТФ на мышцы обеих групп показало следующую динамику. У несенсibilизированных мышцей сила сокращения повышалась до 623 ± 23 мг, т.е. до $115.1 \pm 4.2\%$ ($n = 14$), а в условиях белковой сенсibilизации – до 703.5 ± 31.4 мг, т.е. до $129.8 \pm 5.8\%$ ($n = 10$). Более выраженное потенцирование сокращения дыхательной мышцы после влияния АТФ у второй группы в сравнении с первой (115.1% против 129.8%; $p < 0.05$) (см. рисунок) свидетельствует об участии пуринергических механизмов пресинаптических образований в адаптации *m. diaphragma* к белковой сенсibilизации. Инкубация мышцы с сурамином (100 мкМ) полностью предупреждала влияние АТФ на силу сокращений.

ОБСУЖДЕНИЕ

В представленной работе показана возможность комплексного подхода к изучению адапционных механизмов, которые развиваются в дыхательной мышце в условиях экспериментальной патологии. Дана дифференцированная оценка степени участия АТФ-зависимых механизмов в различных отделах мионеврального соединения. Используемая экспериментальная модель позволяет выявлять преимущественно пресинаптические эффекты пуринов, постсинаптические

эффекты становятся более выражены в условиях гипотермии [4–7].

Результаты исследований показали, что у диафрагмальной мышцы мыши в ходе аллергической перестройки при электростимуляции в присутствии экзогенной АТФ механизмы реализации сократительной функции претерпевают существенные изменения. Как известно, кроме выполнения в организме роли макроэрга АТФ является комедиатором синаптической передачи [8]. В предыдущих работах нами было показано, что в этих условиях пуринергические механизмы участвуют в изменении чувствительности постсинаптической мембраны диафрагмальной мышцы к холин timerметике [9]. В настоящем исследовании продемонстрировано, что АТФ-зависимые процессы, локализованные и в пресинаптическом образовании, также вносят свой вклад в реализацию механизмов адаптации в условиях белковой сенсibilизации.

Если сама белковая сенсibilизация не оказывает значимого действия на силу сокращения диафрагмы, то инкубация с экзогенной АТФ приводила к росту этого показателя, причем у животных сенсibilизированной и контрольной групп степень этого увеличения существенно различалась. Обнаружено возрастание этого показателя у сенсibilизированных животных по сравнению с контрольными, что свидетельствует об участии пуринергических механизмов в процессах адаптации мышцы к условиям белковой сенсibilизации.

Различие динамики показателей, характеризующих пресинаптическое образование демонстрирует комплексную картину участия пуринов в адаптации мионеврального соединения к аллергической перестройке организма.

Диафрагмальная мышца во время подготовки к перспективной бронхоконстрикции внешне практически не меняет своих сократительных свойств. Однако начинают развиваться механизмы, которые в перспективе обеспечат повышение ее работоспособности. Участие АТФ как комедиатора в работе и пре-, и постсинаптической мембраны свидетельствует о сложных взаимоотношениях между этими процессами в различных частях мионеврального соединения, что регулирует сократительную деятельность дыхательной мышцы при аллергических реакциях.

Как известно, клетками-мишенями первого порядка в анафилактическом сокращении скелетных мышц теплокровных являются тучные клетки как источник гистамина, необходимого для реализации анафилактического сокращения мышц. Чувствительность скелетных мышц к гистамину регулируется нейротрофическим контролем; блокада аксонального транспорта аппликацией колхицина на седалищный нерв, сохраня-

ющая импульсацию по аксону, не приводит к появлению гиперчувствительности к гистамину, что делает невозможным ее сокращение на этот медиатор. Действие трофических факторов и импульсная активность мотонейрона регулирует синтез белков гистаминовых рецепторов по независимым механизмам [10]. Вероятно, таким образом белковая сенсibilизация изменяет функциональные характеристики мионеврального перехода за счет увеличения чувствительности постсинаптической терминали к холин timerметике и гистамину. Кроме этого, в немногочисленных источниках говорится о частичном изменении гистохимического профиля белкового состава мышц в результате белковой сенсibilизации, которое заключается в небольшом увеличении «быстрых» мышечных волокон [11, 12].

Описанные механизмы определяют способность организма противостоять гипоксии при ожидаемом снижении проходимости воздухоносных путей. Очевидно, что при реализации функции внешнего дыхания АТФ-зависимые механизмы в различных отделах мионеврального соединения взаимно дополняют друг друга. Этим в условиях необходимого роста работоспособности обеспечивается адаптация сократительных структур диафрагмы. Таким образом, поддерживается адекватный режим внешнего дыхания в условиях аллергической перестройки, что в свою очередь позволяет организму заранее подготовиться к предстоящим изменениям.

ВЫВОДЫ

Адаптация дыхательных мышц при аллергической перестройке обеспечивается пуринергическими механизмами и заключается в готовности противостоять перспективной гипоксии, возникающей вследствие бронхоспастического синдрома. Рост работоспособности *m. diaphragma* мышцы, компенсирующей кислородную недостаточность при обструкции воздухоносных путей, обеспечивается АТФ-опосредованными процессами как на уровне пре-, так и постсинаптических структур этой мышцы.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. P. Kippelen, F. Friemel, and P. Godard, *Rev. Mal. Respir.* **20** (3), 385 (2003).
2. L. P. Boulet and P. M. O'Byrne, *New Engl. J. Med.* **372** (7), 641 (2015).
3. A. Y. Teplov, S. N. Grishin, M. A. Mukhamedyarov, et al., *Exp. Physiol.* **94** (2), 264 (2009).
4. A. U. Ziganshin, A. E. Khairullin, V. V. Zobov, et al., *Muscle & Nerve* **55** (3), 417 (2017).
5. A. U. Ziganshin, A. E. Khairullin, A. Y. Teplov, et al., *Muscle & Nerve* **59** (4), 509 (2019).
6. A. E. Khairullin, A. Yu. Teplov, S. N. Grishin, et al., *Biophysics* **64**, 812 (2019).
7. A. E. Khairullin, A. U. Ziganshin, and S. N. Grishin, *Biophysics* **65**, 858 (2020).
8. A. U. Ziganshin, A. E. Khairullin, C. H. V. Hoyle, and S. N. Grishin, *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 6423 (2020).
9. А. Ю. Теплов, А. М. Фархутдинов, В. И. Торшин и др., *Вестн. новых мед. технологий* **21**, 6 (2014).
10. V. V. Valiullin and A. M. Devyataev, *Allergy* **50**, 381 (1995).
11. I. M. Vikhlyantsev and Z. A. Podlubnaya, *Biophysics* **53** (6), 592 (2008).
12. A. M. Devyataev and V. V. Valiullin, *Bull. Exp. Biol. Med.* **117** (2), 194 (1994).

Purinergic Mechanisms in the Adaptation of Mouse Diaphragm to Allergic Disorders

A.E. Khairullin, A.Yu. Teplov, S.N. Grishin, and A.U. Ziganshin

Kazan State Medical University, ul. Butlerova 49, Kazan, 420012 Russia

In vitro study of a muscle strip from mouse diaphragm, while performing isometric contractions using mechanomyography during the application of electrical stimulation, revealed that synaptic modulation contributes to the processes of adaptation of the motor unit to allergy. Differences in muscle contractile activity under the influence of exogenous ATP in intact and egg albumin-sensitized animals demonstrate the involvement of purinergic mechanisms in the development of adaptive changes. In the process of sensitization, the interaction between pre- and postsynaptic ATP-dependent mechanisms ensures proper rearrangements in the contractile function of the respiratory muscles to bronchoconstriction.

Keywords: m. diaphragma, mouse, ATP, protein sensitization, allergy