БИОФИЗИКА, 2022, том 67, № 6, с. 1220–1223

БИОФИЗИКА СЛОЖНЫХ СИСТЕМ

УДК 577.3

ПУРИНЕРГИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ АДАПТАЦИИ РАЗЛИЧНЫХ ТИПОВ ДВИГАТЕЛЬНЫХ ЕДИНИЦ В УСЛОВИЯХ АЛЛЕРГИЧЕСКОЙ ПЕРЕСТРОЙКИ

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

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

***Казанский федеральный университет, ул. Кремлевская, 18, Казань, 420008, Россия*

#E-mail: khajrulli@yandex.ru

Поступила в редакцию 27.06.2022 г.
После доработки 27.06.2022 г.
Принята к публикации 11.07.2022 г.

На изолированных двигательных мышцах мыши: «быстрой» (m. EDL) и «медленной» (m. soleus) методом изометрической электростимуляционной механомиографии выявлена роль пресинаптического звена сигнализации в процессах адаптации к аллергии. Различия в динамике функциональных характеристик мышц под влиянием экзогенной АТФ у интактных и сенсибилизированных яичным альбумином животных демонстрируют участие пуринергических механизмов в развитии приспособительных изменений в пресинаптическом звене «быстрой» мышцы, и меньшее вовлечение этих механизмов на сходной структуре у «медленной» мышцы. В процессе белковой сенсибилизации комплексная работа АТФ зависимых механизмов как пост-, так и пресинаптической мембраны обеспечивает адекватную перестройку сократительной функции локомоторных мышц в условиях аллергии, и у разных мышц эти механизмы существенно различаются.

Ключевые слова: белковая сенсибилизация, аллергия, АТФ, мышь, m. EDL, m. soleus.

DOI: 10.31857/S0006302922060157, **EDN:** LLXGMU

Изучение механизмов динамики сократительной функции мышечной системы в условиях аллергической перестройки остаются актуальными в современной спортивной медицине [1, 2]. В частности, как известно, обязательная вакцинация спортсменов перед соревнованиями приводит к изменению функции локомоторных мышц. Ранее нами было показано, что в условиях аллергии различные двигательные мышцы меняют силу своего сокращения на холиномиметик *in vitro*, что указывает на участие в механизмах адаптации постсинаптического звена сигнализации. Была продемонстрирована роль пуринергических механизмов в этих процессах. При этом у мышц с различным волоконным составом способность изменять силу своего сокращения на карбахолин после апликации экзогенной АТФ проявляется в разной степени. Механизмы адаптации в условиях развивающейся аллергии у разных мышц также существенно различаются. В частности, если «медленная» мышца в условиях белковой сенсибилизации увеличивала силу своего карбахолин-индуцированного сокращения, то у «быстрой» мышцы наблюдалась обратная картина [3, 4]. И если у «медленной» мышцы постсинаптический эффект обеспечивался АТФ-зависимыми механизмами, то у «быстрой» мышцы их реализация осуществлялась каким-то иным путем. Адаптация перечисленных мышц к аллергическим изменениям не ограничивается постсинаптическим звеном сигнализации, и мы можем предполагать иные механизмы реализации этих эффектов.

Целью настоящего исследования явилось изучение роли пуринергических механизмов различных двигательных мышц мыши: «быстрой» – m. EDL и «медленной» – m. soleus в процессах адаптации организма при аллергической перестройке.

МЕТОДЫ

Подготовительные процедуры. Эксперименты проводили на изолированных нервно-мышечных препаратах m. soleus и m. EDL 24 белых мышей обоего пола, массой 25–32 г. Животных содержали в специальных боксах на обычном пищевом режиме, со свободным доступом к воде. Опытную группу животных предварительно сенсибилизировали овальбумином [3]. В качестве контроля использовали несенсибилизированных мышей.

Сокращение: БС – белковая сенсибилизация.

Условия проведения экспериментов по регистрации параметров сокращения. Мышечный препарат помещали вертикально в термостатируемых ванночках объемом 10 мл. Один конец мышцы был зафиксирован, другой при помощи лигатуры крепили к датчику механической активности. Ванночку заполняли модифицированным раствором Кребса следующего состава (в мМ): NaCl – 118.0, KCl – 4.75, $CaCl_2$ – 2.5, $NaHCO_3$ – 24.8, KH_2PO_4 – 1.18, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 1.18, глюкоза – 11.0, pH 7.4 ± 0.1. Условия изометрии достигались растяжением препарата мышцы в ванночке в течении 20 мин с силой 0.5 г при постоянной перфузии раствором при температуре 37°C. Сократительные реакции изолированной мышцы вызывались при помощи электрического стимулятора MultiStim D330 (Digitimer, Великобритания) [5]. Прямоугольные электрические импульсы частотой 0.1 Гц и длительностью 0.5 мс наносились в течении двух минут (12 пиков). Среднее значение силы всех 12 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) [6, 7]. Результаты исследования наблюдали на мониторе и хранили на персональном компьютере.

Эффекты пуринергических агонистов и антагонистов. В начале эксперимента сократительные ответы мышц на электрическую стимуляцию регистрировались дважды с интервалом 5 мин (для оценки стабилизации ответов). Раствор АТФ добавляли в концентрации 100 мкМ в ванночку с раствором Кребса, через 10 мин инкубации записывали сократительные ответы на электрическую стимуляцию. Затем ткань промывали несколько раз и инкубировали в течение 20 мин антагонистом (сурамином в концентрации 100 мкМ). После этого добавляли агонист (АТФ в концентрации 100 мкМ) и сократительные ответы записывали повторно. Все сократительные ответы вычисляли в процентах от исходных сокращений.

Достоверность различий. Статистическую обработку данных проводили с помощью программы для 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 рассматривали как значимые при $p < 0.05$.

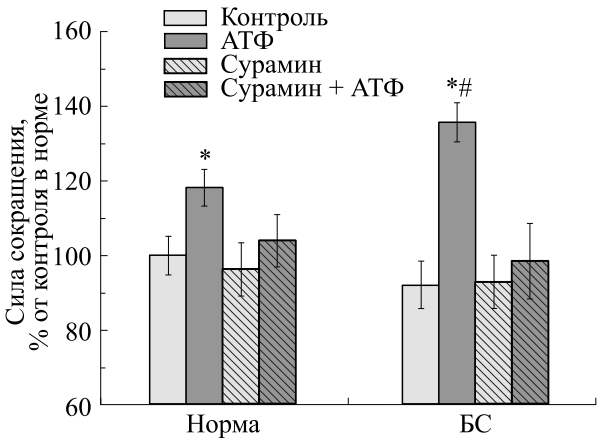

Рис. 1. Сила сокращений *m. EDL* мыши, вызванных электрической стимуляцией у интактных («Норма», $n = 14$) и сенсибилизированных («БС», $n = 10$) животных, в отсутствие и в присутствии АТФ (100 мкМ) и сурамина (100 мкМ). Результаты представлены в виде $M \pm m$ в % от исходных величин, принятых за 100%; * – $p < 0.05$ от контроля в норме, # – $p < 0.05$ относительно эффектов в норме.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

«Быстрая» мышца в условиях электростимуляции снижала силу своего сокращения при белковой сенсибилизации (БС). Если у несенсибилизированной мыши она составляла 302.4 ± 15.7 мг ($n = 14$), то в опытной серии - 278.5 ± 19.3 мг ($n = 10$).

Действие экзогенной АТФ (100 мкМ) на m. EDL обеих групп животных демонстрировало следующую динамику силы сокращения. У несенсибилизированных мышей этот показатель возрастал до 357.4 ± 14.8 мг, то есть на 18.2% ($n = 14$, $p < 0.05$); у сенсибилизированных животных – до 410.3 ± 15.7 мг, то есть на 47.3% относительно контроля ($n = 10$, $p < 0.05$, рис. 1). Более выраженное увеличение силы сокращения «быстрой» мышцы у второй группы животных (18.2% против 47.3%; $p < 0.05$) свидетельствует об участии пуринергических механизмов пресинаптических образований в процессах адаптации. Инкубация мышцы с сурамином (100 мкМ) полностью предупреждала влияние АТФ на силу сокращений.

«Медленная» мышца в условиях электростимуляции увеличивала силу своего сокращения при БС. Если у несенсибилизированной мыши она была 411.5 ± 18.5 мг ($n = 14$), то в опытной серии – 533.3 ± 29.2 мг ($n = 10$).

Влияние экзогенной АТФ на m. soleus обеих групп животных на различия в силе сокращения носило потенцирующий характер. Мы получили следующие значения. У несенсибилизированных мышей показатель силы сокращения возрастал до

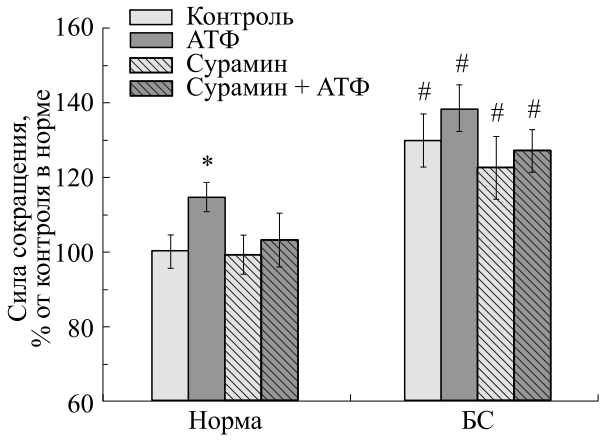

Рис. 2. Сила сокращений m. soleus мыши, вызванных электрической стимуляцией, интактных («Норма», $n = 14$) и сенсибилизированных («БС», $n = 10$) животных в отсутствие и в присутствии АТФ (100 мкМ) и сурамина (100 мкМ). Результаты представлены в виде $M \pm m$ в % от исходных величин, принятых за 100%; * – $p < 0.05$ от контроля в норме, # – $p < 0.05$ относительно эффектов в норме.

471.1 ± 16 мг ($n = 14$, $p < 0.05$). У сенсибилизированных животных до 568.7 ± 25.5 мг ($n = 10$, $p > 0.05$, рис. 2). Различия в АТФ-опосредованном потенцировании силы сокращений до 14.5% в норме и до 8.6% при сенсибилизации не носят статистически достоверного характера. Инкубация мышцы с сурамином (100 мкМ) полностью предупреждала влияние АТФ на силу сокращений.

Таким образом, у m. EDL в процессе сенсибилизации подключаются пуринергические механизмы адаптации в пресинаптическом звене сигнализации. В противоположность этому, у m. soleus в сходных структурах данные механизмы задействованы незначительно либо вовсе не вовлекаются.

ОБСУЖДЕНИЕ

Существуют данные, подтверждающие наличие постсинаптических и пресинаптических эффектов пуринов [8]. Определенную сложность в исследования вносит тот факт, что в физиологических условиях влияние АТФ и метаболитов в нервно-мышечном синапсе минимально, но становится более выраженным в некоторых патофизиологических ситуациях, таких как стресс [9], гипогравитация [10], травмы [11], ишемия или гипотермия [6, 7, 12, 13]. Кроме того, существуют данные, демонстрирующие разнонаправленность действия АТФ в нервно-мышечном синапсе разных типах двигательных единиц.

Модель электростимуляционной механомиографии позволяет анализировать процессы в пресинаптическом образовании. Результаты экспериментов показывают, что в «быстрых» и «медленных» мышцах мыши в условиях БС включаются различные механизмы адаптации. Сенсибилизация разнонаправленно влияет на силу сокращения различных мышц *in vitro*. Если у «быстрой» мышцы она незначительно снижалась, то у «медленной» мышцы существенно возрастала.

Сравнение силы сокращения до и после апликации АТФ демонстрирует работу пуринергических механизмов, которые существенно различаются у разных мышц, как у контрольных, так и у сенсибилизированных животных.

Невысокая лабильность силы сокращения «медленной» мышцы в условиях электростимуляции до и после воздействия АТФ у контрольных и сенсибилизированных мышей свидетельствует о малом вовлечении пуринергических механизмов пресинаптической мембраны в процессах адаптации этой мышцы к аллергии.

Соотношение результатов, полученных на двух моделях инициации сокращения – электростимуляцией и холиномиметиком [3] позволяет отделить участие пост- и пресинаптической мембраны в процессах адаптации. В частности, у «медленной» мышцы в условиях аллергической перестройки показана работа АТФ-зависимых механизмов постсинаптической мембраны.

«Быстрая» мышца в условиях электростимуляции незначительно снижала силу своего сокращения, что обеспечивается механизмами пресинаптической мембраной. «Медленная» мышца, напротив, в условиях электростимуляции существенно увеличивает силу своего сокращения. Но адаптация в условиях развивающейся аллергии реализуется за счет работы постсинаптической мембраны и АТФ-зависимые механизмы пресинаптической мембраны в адаптации не участвуют.

Полученные методом непрямой электростимуляции данные дополняют общую схему изменений синаптических структур различных двигательных мышц, что обеспечивает развитие сложных механизмов адаптации при аллергической перестройке организма.

ВЫВОДЫ

Механизмы адаптации у «быстрых» и «медленных» локомоторных мышц мыши в условиях аллергической перестройки организма имеют существенные различия. В условиях электростимуляции увеличение силы сокращения m. EDL *in vitro* сенсибилизированной мыши после влияния экзогенной АТФ в сравнении с контролем более выражено. Адаптация «быстрой» мышцы в описанных условиях реализуется через пуринер-

гические механизмы пресинаптической мембраны.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках программы «Стратегическое академическое лидерство» (ПРИОРИТЕТ-2030) Казанского федерального университета, а также за счет средств субсидии, выделенной Казанскому государственному медицинскому университету Минздрава России на проведение научных исследований в рамках Программы развития Университета.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все манипуляции с экспериментальными животными проведены в соответствии с Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых в научных исследованиях.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. R. Kjøbsted, N. Munk-Hansen, J. B. Birk, et al., Diabetes, **66** (3), 598 (2017).
2. D. Shrikrishna, R. J. Tanner, J. Y. Lee, et al., Chest, **146** (4), 932 (2014).
3. A. Y. Teplov, S. N. Grishin, M. A. Mukhamedyarov, et al., Exp. Physiol., **94** (2), 264 (2009).
4. А. Ю. Теплов, А. М. Фархутдинов, О. В. Теплов и др., Бюл. эксперим. биологии и медицины, **150** (9), 262 (2010).
5. L. P. Boulet and P. M. O'Byrne, New Engl. J. Med., **372** (7), 641 (2015).
6. A. U. Ziganshin, A. E. Khairullin, V. V. Zobov, et al., Muscle & Nerve, **55** (3), 417 (2017).
7. A. U. Ziganshin, A. E. Khairullin, A. Y. Teplov, et al., Muscle & Nerve, **59** (4), 509 (2019).
8. A. U. Ziganshin, A. E. Khairullin, C. H. V. Hoyle, and S. N. Grishin, Int. J. Mol. Sci., **21**, 6423 (2020).
9. A. Ziganshin, R. Kamaliev, A. Gabdrakhmanov, et al., Int. J. Pharmacol., **14** (8), 1198 (2018).
10. A. E. Khairullin, S. N. Grishin, and A. A. Eremeev, Biophysics, **64** (5), 828 (2019).
11. A. E. Khairullin, D. V. Efimova, V. A. Markosyan et al., Biophysics, **66** (3), 483 (2021).
12. A. E. Khairullin, A. Y. Teplov, S. N. Grishin, et al., Biophysics, **64**, 812 (2019).
13. A. E. Khairullin, A. U. Ziganshin, and S. N. Grishin, Biophysics, **65**, 858 (2020).

Purinergic Mechanisms of Adaptation of Different Types of Motor Units in the Conditions of Allergic Reorganization

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

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

***Kazan Federal University, Kremlevskaya ul. 18, Kazan, 420008 Russia*

The role for presynaptic signaling was found in the processes of adaptation to allergies during isometric contractions of mouse EDL (fast) and soleus (slow) muscles evoked by electrical stimulation and mechanomyography. Differences in the dynamics of functional characteristics of muscles under the influence of exogenous ATP in intact and egg albumin-sensitized animals demonstrate that purinergic mechanisms are involved more in the development of adaptive changes in the presynaptic side of the "fast" muscle than in the «slow» muscle. In the process of protein sensitization, the complex work of ATP-dependent mechanisms of the postsynaptic membrane and the presynaptic membrane ensures an adequate reorganization of the contractile function of locomotor muscles in case of allergy and these mechanisms differ significantly in different muscles.

Keywords: protein sensitization, allergy, ATP, mouse, m. EDL, m. soleus