

ВОЗМОЖНОЕ УЧАСТИЕ АДЕНОЗИНТРИФОСФОРНОЙ КИСЛОТЫ В МЕХАНИЗМАХ ВЛИЯНИЯ БЕЛКОВОЙ СЕНСИБИЛИЗАЦИИ НА ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА ДИАФРАГМЫ И СКЕЛЕТНЫХ МЫШЦ

Александр Юрьевич Теплов¹, Альберт Мансурович Фархутдинов^{1*},
Сергей Николаевич Гришин², Марсель Миргаязович Миннебаев¹, Владимир Иванович Торшин³

¹Казанский государственный медицинский университет,

²Казанский государственный технический университет им. А.Н. Туполева,

³Российский университет дружбы народов, г. Москва

Реферат

Цель. Изучение влияния аденозинтрифосфорной кислоты на сократительную функцию и неквантовую секрецию ацетилхолина в зоне концевой пластинки (Н-эффект) изолированных мышц мыши на фоне белковой сенсibilизации.

Методы. Эксперименты выполняли на белых мышах. Сенсibilизацию осуществляли яичным альбумином с гелем гидроксида алюминия. Механомиографические исследования проводили на препаратах изолированной диафрагмы и двух мышц голени в условиях изометрии. Сокращения регистрировали фотоэлектрическим преобразователем. Для изучения состояния постсинаптической мембраны мышечного волокна измеряли неквантовую секрецию ацетилхолина. Сравнивали показатели сокращения мышц до и после 5-минутной перфузии раствором аденозинтрифосфорной кислоты.

Результаты. У диафрагмы и камбаловидной мышцы динамика вектора силы мышечного сокращения коррелировала с изменениями Н-эффекта во всех изучаемых экспериментальных моделях. Однако степень этих изменений у сенсibilизированных животных менее выражена.

Вывод. Возможно, аденозинтрифосфорная кислота влияет на функциональные свойства обеих мышц при белковой сенсibilизации; изменение силы сокращения длинного разгибателя пальцев при сенсibilизации не связано с механизмами возбуждения мышцы, опосредованными аденозинтрифосфорной кислотой.

Ключевые слова: сократительные свойства, неквантовая секреция ацетилхолина, диафрагма, камбаловидная мышца, длинный разгибатель пальцев, белковая сенсibilизация, аденозинтрифосфорная кислота.

POSSIBLE INVOLVEMENT OF ADENOSINE TRIPHOSPHATE IN THE MECHANISMS OF PROTEIN SENSIBILIZATION EFFECT ON THE FUNCTIONAL PROPERTIES OF THE DIAPHRAGM AND SKELETAL MUSCLES

A.Yu. Teplov¹, A.M. Farkhutdinov¹, S.N. Grishin², M.M. Minnebaev¹, V.I. Torshin³. ¹Kazan State Medical University, ²Kazan State Technical University named after A.N. Tupolev, ³Russian Peoples' Friendship University, Moscow city.

Aim. To study the effect of adenosine triphosphate on the contractile function and non-quantum secretion of acetylcholine at the endplate zone (H-effect) of isolated mouse muscles on the background of protein sensibilization. **Methods.** The experiments were performed on white mice. Sensibilization was carried out by ovalbumin with an aluminum hydroxide gel. Mechanomyography studies were performed on isolated preparations of the diaphragm and of two leg muscles in isometric conditions. The contractions were recorded by a photoelectric converter. In order to study the condition of the postsynaptic membrane of the muscle fibers measured was the non-quantum secretion of acetylcholine. Compared were the parameters of muscle contraction before and after 5 min of perfusion with a solution of adenosine triphosphate. **Results.** In the diaphragm and in the soleus muscle the dynamics of the force vector of the muscular contraction correlated with the changes in the H-effect in all the studied experimental models. However, the extent of these changes in the sensibilized animals is less pronounced. **Conclusion.** It is possible that adenosine triphosphate affects the functional properties of both muscle during protein sensibilization; the change in the contraction force of the long extensor digitorum muscle during sensibilization is not related to the mechanisms of muscle excitation, mediated by adenosine triphosphate. **Keywords:** contractile properties, non-quantum secretion of acetylcholine, diaphragm, soleus muscle, long extensor digitorum muscle, protein sensibilization, adenosine triphosphate.

Бронхиальная астма сопровождается изменением функционального состояния дыхательных мышц, в первую очередь диафрагмы. При изучении патогенеза аллергии часто применяют модель белковой сенсibilизации мышцей [5, 6]. Ранее установлено, что при белковой сенсibilизации сократительные свойства полоски диафрагмы (состоящей из «быстрых» и «медленных» мышечных волокон) и «быстрой» скелетной мышцы голени мыши *in vitro* претерпевают разнонаправленные изменения, основную роль отводят холиноопосредованным процессам возбуждения постсинаптической мембраны [9]. Также была показана способность экзогенной аденозинтрифосфорной кислоты (АТФ) обратимо изменять

сократительную функцию и величину неквантовой секреции ацетилхолина мышцей несенсибилизированных мышцей [1, 4]. В качестве кофактора синаптической передачи АТФ влияет на процессы возбуждения мышечного волокна. В литературе есть указания на участие АТФ в иммунном ответе [10].

Цель работы — изучение влияния экзогенной АТФ на сократительный ответ, вызываемый холиномиметиком карбахолом (карбахолином), и величину неквантовой секреции ацетилхолина в зоне концевой пластинки изолированных поперечнополосатых мышц: «медленной» камбаловидной, «смешанной» диафрагмальной и «быстрой» (длинного разгибателя пальцев) интактных и сенсibilизированных мышцей.

Адрес для переписки: a.farkhutdinov@gmail.com

Эксперименты выполняли на белых мышах

обоого пола с массой тела 17–22 г. Сенсибилизацию осуществляли яичным альбумином с гелем гидроксида алюминия («Sigma», США), контроль — по методике И.С. Гушина и соавт. Механомиографические исследования проводили на препарате изолированной мышцы в условиях изометрии, которой достигали растяжением скелетной мышцы в течение 20 мин с помощью подвешивания груза массой 0,5 г, при постоянной перфузии раствором Кребса и температурном режиме 20–21°C. Сокращение регистрировали фотоэлектрическим преобразователем. Карбахолин применяли в субмаксимальных концентрациях, которые составляли для камбаловидной мышцы 5×10^{-4} М, для диафрагмальной мышцы — 2×10^{-4} М, для длинного разгибателя пальцев — 7×10^{-4} М. Оценивали силу (P_{∞}) сокращения мышцы в ответ на карбахолин.

Для изучения состояния постсинаптической мембраны мышечного волокна в области концевой пластинки с помощью стеклянных микроэлектродов (с сопротивлением 8–12 МОм, заполненных 2,5 М раствором калия хлорида) измеряли некантовую секрецию ацетилхолина [3]. Предварительно этилнитрофенилэтилфосфонатом (армином, «Татхимфармпрепараты», Россия) устраняли действие ацетилхолинэстеразы, после чего на мышцу в течение 8–12 мин апплицировали блокатор Н-холинорецепторов d-тубокурарин (ТБК) в концентрации 10^{-5} М. Разность значений мембранного потенциала до и после аппликации ТБК соответствует величине некантовой секреции ацетилхолина (Н-эффект).

Влияние АТФ («Boehringer Mannheim GmbH», Германия) оценивали путём сравнения показателей сокращения до и после 5-минутной перфузии 1×10^{-4} М раствором АТФ; время действия на мышцу определялось длительностью перфузии.

Полученные результаты подвергали статистической обработке с помощью пакета статистических программ («Biostatistica», S.A. Glantz, McGraw Hill).

У камбаловидной мышцы несенсибилизированной мышши инкубация с АТФ достоверно увеличивает P_{∞} , та же тенденция отмечена при белковой сенсибилизации. Изучение некантовой секреции ацетилхолина интактной мышши показало, что мембранный потенциал покоя, изначально составляющий $-70,9 \pm 1,7$ мВ ($n=150$), в присутствии ТБК возрастал до $-75,9 \pm 1,3$ мВ ($n=150$). После инкубации с АТФ мембранный потенциал покоя в присутствии ТБК возрастал, то есть инкубация с АТФ достоверно снижала Н-эффект. В условиях белковой сенсибилизации мембранный потенциал покоя, изначально составляющий $-69,4 \pm 0,9$ мВ ($n=150$), в присутствии ТБК возрастал до $-72,5 \pm 1,0$ мВ ($n=150$). После инкубации с АТФ мембранный потенциал покоя в присутствии ТБК возрастал, то есть при сенсибилизации инкубация с АТФ достоверно снижала Н-эффект.

Инкубация с АТФ достоверно увеличивала P_{∞} диафрагмальной мышши как у несенсибилизированных мышши, так и у подвергшихся белковой

сенсибилизации. Динамика некантовой секреции ацетилхолина показала, что мембранный потенциал покоя, изначально составляющий $-70,7 \pm 1,9$ мВ ($n=150$), в присутствии ТБК возрастал. После инкубации с АТФ мембранный потенциал покоя в присутствии ТБК увеличивался до $-71,5 \pm 0,5$ мВ, таким образом, Н-эффект у диафрагмы несенсибилизированной мышши при инкубации с АТФ достоверно снижался. При белковой сенсибилизации мембранный потенциал покоя, изначально составляющий $-70,0 \pm 1,5$ мВ ($n=150$), в присутствии ТБК возрастал до $-74,4 \pm 0,6$ мВ ($n=150$). При инкубации с АТФ мембранный потенциал покоя в присутствии ТБК повышался до $-71,5 \pm 0,6$ мВ ($n=150$), то есть при белковой сенсибилизации инкубация с АТФ достоверно снижала Н-эффект.

У длинного разгибателя пальцев несенсибилизированной мышши инкубация с АТФ достоверно снижала P_{∞} . В условиях белковой сенсибилизации инкубация с АТФ приводила к достоверному снижению P_{∞} . Изучение некантовой секреции ацетилхолина несенсибилизированной мышши показало, что мембранный потенциал покоя, изначально составляющий $-72,3 \pm 0,6$ мВ ($n=150$), в присутствии ТБК возрастал до $-77,4 \pm 1,6$ мВ ($n=150$). После инкубации с АТФ мембранный потенциал покоя в присутствии ТБК увеличивался до $-77,3 \pm 1,1$ мВ ($n=150$), то есть Н-эффект длинного разгибателя пальцев несенсибилизированной мышши при инкубации с АТФ практически не изменялся. Изучение некантовой секреции ацетилхолина в условиях сенсибилизации показало, что мембранный потенциал покоя, изначально составляющий $-73,9 \pm 0,5$ мВ ($n=150$), в присутствии ТБК повышался до $-79,7 \pm 1,7$ мВ ($n=150$). После инкубации с АТФ мембранный потенциал покоя в присутствии ТБК возрастал до $-79,3 \pm 1,4$ мВ ($n=150$). Инкубация с АТФ в условиях белковой сенсибилизации практически не изменяла значение Н-эффекта.

Обсуждая результаты исследования, хотелось бы указать на разный характер изменения сократительной функции всех трёх мышщ («быстрой», «смешанной» и «медленной») мышши при сенсибилизации. Причины этого заключаются как в исходных различиях их морфофункционального статуса, так и в механизмах, обеспечивающих эти изменения в процессе аллергической перестройки организма. Необходимо отметить, что у мышши нет поперечнополосатых мышщ, состоящих только из «медленных» мышечных волокон. Если длинный разгибатель пальцев на 97–100% состоит из «быстрых» мышечных волокон, камбаловидная содержит 50–60% «медленных», то диафрагма содержит 88,6% «быстрого» миозина, занимая промежуточное положение.

При белковой сенсибилизации сила сокращения «быстрой» мышши в ответ на карбахолин снижается, «смешанной» и «медленной» — возрастает. Обнаруженные различия, вероятно, отражают состояние поверхностной мембраны и холиноопосредованные процессы её возбуждения.

Подтверждением этому служит корреляция динамики силы сокращения и уровня некантовой секреции ацетилхолина в зоне концевой пластинки (Н-эффекта). Логично предположить, что у «смешанной» и «медленной» мышц увеличение силы сокращения в ответ на карбахоллин — следствие повышения чувствительности постсинапса к холинимиетику, отражением чего является снижение Н-эффекта. Уменьшение некантовой секреции ацетилхолина в зоне синапса вызывает снижение интенсивности механизмов десенсибилизации холинорецепторов постсинаптической мембраны. Соответственно, у «быстрой» мышцы наблюдается обратная картина. Снижение силы сокращения в ответ на карбахоллин — следствие уменьшения чувствительности её постсинапса к холинимиетику, что проявляется в увеличении Н-эффекта.

Причины обнаруженной вариабельности функциональных свойств изучаемых мышц при белковой сенсбилизации, возможно, заключаются в механизмах выделения кофакторов синаптической передачи. Исходя из данных Tsai T.L. и соавт. [10], показавших роль АТФ в иммунном ответе, мы предположили возможное участие пуринов в процессах изменения функционирования скелетных мышц при белковой сенсбилизации. Это привело нас к идее изучения (в рамках выбранных экспериментальных моделей) динамики функциональных свойств мышц сенсбилизированных и интактных мышцей до и после их инкубации с АТФ.

Наши исследования подтвердили, что при белковой сенсбилизации влияние АТФ на динамику функциональных свойств у всех мышцей демонстрирует ту же направленность, что указывает на отсутствие принципиальных различий в механизмах влияния пуринов на поперечнополосатые мышцей интактных и сенсбилизированных мышцей.

Однако если АТФ увеличивала силу сокращения диафрагмальной мышцей интактных животных на 26,8%, то у сенсбилизированных — лишь на 15,1%. Н-эффект у этой мышцей несенсбилизированных мышцей после влияния АТФ снижался до 28,8% исходного, у сенсбилизированных же — лишь до 54,5%. Менее выраженная динамика функциональных свойств диафрагмы, вызванная АТФ у сенсбилизированных мышцей в сравнении с контролем, позволяет предполагать её участие в механизмах функциональных изменений дыхательных мышцей при белковой сенсбилизации.

Динамика функциональных свойств «медленной» мышцей имеет сходную картину. Сила сокращения камбаловидной мышцей интактных животных возрастала на 24,3%, у сенсбилизированных — лишь на 12,2%. Н-эффект у этой мышцей несенсбилизированных мышцей после влияния АТФ снижался до 20% исходного значения, у сенсбилизированных — лишь до 67,7%.

У длинного разгибателя пальцев интактных животных снижение силы сокращения после влияния АТФ (до 72,6%) практически не отличалось

от таковой у сенсбилизированных (до 74,8%). Н-эффект после влияния АТФ достоверно не менялся ни у интактных, ни у сенсбилизированных мышцей. Отсутствие различий в изменении силы сокращения и уровня некантовой секреции ацетилхолина после влияния АТФ у обеих групп животных отвергает гипотезу о влиянии пуринов на сократительную функцию «быстрой» мышцей в условиях сенсбилизации.

Влияние АТФ в наших экспериментальных моделях включает прямое действие пуринов на сократительные структуры, секрецию медиатора, системы внутриклеточных посредников [1] и работу АТФ-зависимых калиевых каналов [10]. Оно осуществляется через Р₂-рецепторы, что подтверждается способностью сурамина устранять влияние АТФ во всех экспериментальных моделях. Кроме того, замена АТФ на аденозин, реализующий своё действие через аденозиновые Р₂-рецепторы [2], не изменяет ни параметров вызванного карбахоллином сокращения мышцей, ни величины Н-эффекта.

Различия в реакции на АТФ мышцей интактных и сенсбилизированных мышцей позволяют предположить её участие в иммунном ответе. В частности, в литературе показано, что АТФ, увеличивая синтез интерлейкина-1, может усиливать специфическое звено иммунитета [7]. Внеклеточная АТФ при генерации иммунного ответа помогает образованию активной каспазы-1, что в свою очередь обеспечивает секрецию биологически активных форм интерлейкина-1. Гиперэкспрессия рецептора Р2X7 приводит к секреции зрелого интерлейкина-1β [8].

Таким образом, белковая сенсбилизация как экспериментальная модель позволила выявить некоторые механизмы изменения в дыхательной мышцей при скрытой алергизации организма.

ВЫВОДЫ

1. Снижение функциональных свойств диафрагмы мышцей при белковой сенсбилизации, вызванное экзогенной АТФ, свидетельствует о развитии ранней резистентности дыхательных мышцей к внешним нагрузкам, которая появляется при обструктивных формах нарушения внешнего дыхания.

2. Отсутствие сходной динамики у «быстрой» мышцей (длинного разгибателя пальцев) мышцей показывает, что обнаруженные компенсаторные механизмы у основной дыхательной мышцей при бронхиальной астме определяются «медленными» мышечными волокнами. В изменении сократительной функции «быстрой» мышцей при белковой сенсбилизации можно ожидать участия иных, не связанных с АТФ механизмов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Фархутдинов А.М., Теплов А.Ю. Механизмы влияния экзогенной АТФ на сократительную функцию изолированных поперечнополосатых мышцей мышцей // Вестн. С.-Петерб. ун-в. Серия 11. Медицина. — 2010. — Вып. 2. — С. 238–244.

2. Burnstock G. Historical review: ATP as a neurotransmitter // Trends Pharm. Sci. — 2006. — Vol. 27. — P. 166–176.
3. Galkin A.V., Giniatullin R.A., Mukhtarov M.R., Svandova I. ATP but not adenosine inhibits nonquantal acetylcholine release at the mouse neuromuscular junction // Eur. J. Neur. — 2001. — Vol. 13. — P. 2047–2053.
4. Grishin S., Teplov A., Galkin A. et al. Different effects of ATP on the contractile activity of mice diaphragmatic and skeletal muscles // Neurochem. Int. — 2006. — Vol. 49. — P. 756–763.
5. Ji W., Chen X., Zhengrong C. et al. Therapeutic effects of anti-B7-1 antibody in an ovalbumin-induced mouse asthma model // Int. Immunopharmacol. — 2008. — Vol. 8. — P. 1190–1195.
6. 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. Pharmacol. — 2009. — Vol. 61. — P. 353–359.
7. Mariathasan S., Monack M. Inflammasome adaptors and sensors: intracellular regulators of infection and inflammation // Nat. Rev. Immunol. — 2007. — Vol. 7. — P. 31–40.
8. Solle M., Labasi J., Perregaux D. et al. Altered cytokine production in mice lacking P2X(7) receptors // J. Biol. Chemist. — 2001. — Vol. 276. — P. 125–132.
9. Teplov A., Grishin S., Mukhamedyarov M. et al. Ovalbumin-induced sensitization affects non-quantal acetylcholine release from motor nerve terminals and alters contractility of skeletal muscles in mice // Experim. Physiol. — 2009. — Vol. 94. — P. 264–268.
10. Tsai T.L., Chang S.Y., Ho C.Y. et al. Role of ATP in the ROS-mediated laryngeal airway hyperreactivity induced by laryngeal acid-pepsin insult in anesthetized rats // J. Applied Physiol. — 2009. — Vol. 106. — P. 1584–1592.

УДК 616.441-008.64: 612.084: 612.015.11: [615.252+615.272]

Е3

АКТИВНОСТЬ АНТИОКСИДАНТНЫХ ФЕРМЕНТОВ И ПРОЦЕССЫ СВОБОДНОРАДИКАЛЬНОГО ОКИСЛЕНИЯ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ГИПОТИРЕОЗЕ И КОРРЕКЦИИ ТИРЕОИДНЫХ СДВИГОВ ЙОДИРОВАННЫМ ПОЛИСАХАРИДНЫМ КОМПЛЕКСОМ

Феликс Хусаинович Камилев¹, Александр Николаевич Мамцев², Валерий Николаевич Козлов²,
Гузель Маратовна Абдуллина¹, Ольга Владимировна Лобырева^{2*}

¹Башкирский государственный медицинский университет, г. Уфа,

²Московский государственный университет технологий и управления им. К.Г. Разумовского

Реферат

Цель. Определение активности антиокислительных ферментов в ткани печени крыс на фоне тиамазолового гипотиреоза, а также после его коррекции йодосодержащим органоминеральным комплексом.

Методы. Исследования проводили на крысах, которые были разделены на четыре группы: первая — контрольная, у животных второй, третьей и четвертой групп вызывали гипотиреоз ежедневным внутрижелудочным введением тиамазола в дозе 2,5 мг на 100 г массы тела в течение 3 нед. Начиная с 22-го дня эксперимента, животные четвертой группы в течение месяца получали биологически активную добавку в дозе, обеспечивающей суточную потребность крыс в йоде, а животные третьей группы находились на стандартной диете вивария. Активность супероксиддисмутазы и глутатионпероксидазы определяли с помощью реактивов набора «RANSOD Randox» фирмы «Laboratories Ltd.», активность каталазы оценивали по методу М.А. Королюк.

Результаты. Экспериментальный гипотиреоз у крыс характеризовался снижением концентрации свободного тироксина, повышением содержания общего трийодтиронина и тиреотропного гормона. У животных, получавших тиамазол, активность супероксиддисмутазы составляла 85,6% уровня активности у контрольных животных, глутатионпероксидазы — 77,3% уровня интактных животных. Активность каталазы при гипотиреозе снижалась значительно — до 40% уровня контроля ($p \leq 0,001$). В гомогенате печени крыс, принимавших после воспроизведения гипотиреоза в течение 1 мес «йодбиополимер», активность супероксиддисмутазы почти достигла контрольных значений и составляла 95,5% активности интактных животных. Активность глутатионпероксидазы и каталазы даже несколько превышала контрольные значения, достигая соответственно 115,6 и 112,7% уровней активности в контроле ($p \leq 0,05$). В то же время у животных, находившихся на стандартном рационе, активность исследованных ферментов оставалась ниже контрольных значений, причём каталазы — значительно ниже (49,9% контроля, $p \leq 0,001$).

Вывод. Введение йодосодержащего биологически активного соединения на фоне гипотиреоза способствовало восстановлению активности тиреоидзависимых антиоксидантных ферментов, нормализации функционального состояния гипотизарно-тиреоидной системы и ингибированию процессов перекисного окисления липидов в печени животных.

Ключевые слова: экспериментальный гипотиреоз, тиреоидные гормоны, супероксиддисмутаза, глутатионпероксидаза, каталаза, хемилюминесценция, йодированный полисахаридный комплекс.

ACTIVITY OF ANTIOXIDANT ENZYMES AND PROCESSES OF FREE RADICAL OXIDATION IN EXPERIMENTAL HYPOTHYROIDISM AND CORRECTION OF THYROID SHIFTS WITH IODIZED POLYSACCHARIDE COMPLEXES
F.Kh. Kamilov¹, A.N. Mamtsev², V.N. Kozlov², G.M. Abdullina¹, O.V. Lobyreva². ¹Bashkir State Medical University, Ufa city, ²Moscow State University of Technologies and Management named after K.G. Razumovsky. **Aim.** To determine the activity of antioxidant enzymes in rat liver tissue on the background of thiamazole hypothyroidism, and also after its correction with iodine-containing organo-mineral complexes. **Methods.** Studies were conducted on rats, which were divided into four groups: the first group — the control, in animals of the second, third and fourth groups hypothyroidism was induced by daily intragastric administration of thiamazole at a dose 2.5 mg per 100 g body weight for the duration of 3 weeks. Beginning