

ВЛИЯНИЕ МОДЕЛИРОВАНИЯ ГРАВИТАЦИОННОЙ РАЗГРУЗКИ НА ПОСТСИНАПТИЧЕСКУЮ ОРГАНИЗАЦИЮ АЦЕТИЛХОЛИНОВЫХ РЕЦЕПТОРОВ И АКТИВНОСТЬ АЦЕТИЛХОЛИНЭСТЕРАЗЫ В МИОНЕВРАЛЬНЫХ СИНАПСАХ БЫСТРОЙ И МЕДЛЕННОЙ МЫШЦ КРЫСЫ

© *О. В. Тяпкина*^{1, 2} *Л. Ф. Нуруллин*^{1, 2} *К. А. Петров*^{1, 3} *Е. М. Волков*^{2, *}

¹ Казанский институт биохимии и биофизики КНЦ РАН,

² Казанский государственный медицинский университет МЗ РФ и

³ Институт органической и физической химии им. А. Е. Арбузова КНЦ РАН, Казань;

* электронный адрес: euroworm@mail.ru

Иммунофлуоресцентными методами показаны следующие факты. У крыс после 35-суточного антиортостатического вывешивания задних конечностей в мионевральных синапсах быстрых и медленных мышц усиливается интенсивность флуоресценции и уменьшается площадь окрашивания ацетилхолиновых рецепторов; увеличиваются интенсивность флуоресценции и площадь окрашивания ацетилхолинэстеразы; изменяются соотношение количества ацетилхолиновых рецепторов на постсинаптической мембране и ацетилхолинэстеразы и их пространственное расположение относительно друг друга. Данные перестройки соответствуют электрофизиологическим данным об уменьшении амплитуды миниатюрных токов концевых пластинок в обеих мышцах. Выявленные перестройки в мионевральных синапсах сопровождаются уменьшением объема мышечных волокон. Опорная разгрузка (моделирование гипогравитации) приводит к увеличению функциональной активности ацетилхолинэстеразы на фоне снижения площади постсинаптической мембраны, занятой ацетилхолиновыми рецепторами, что приводит к снижению амплитуды постсинаптических возбуждающих потенциалов и тем самым к снижению порога надежности передачи возбуждения от нерва к мышце.

Ключевые слова: моделирование гипогравитации, быстрые и медленные мышцы, ацетилхолинэстераза, ацетилхолиновые рецепторы.

Принятые сокращения: АОВ — антиортостатическое вывешивание, АХ — ацетилхолин, АХЭ — ацетилхолинэстераза, ГДС — гипогравитационный двигательный синдром, МПКП — миниатюрные потенциалы концевой пластинки, МТКП — миниатюрные токи концевой пластинки, ПКП — потенциалы концевой пластинки.

Отсутствие силы тяжести во время космического полета или моделирование невесомости во время лабораторных экспериментов приводит к развитию в скелетных мышцах млекопитающих так называемого гипогравитационного двигательного синдрома, или ГДС. Данный синдром выражается рядом функциональных, а также морфологических изменений в нервно-мышечной системе испытуемых. Так, наблюдаются частичная атрофия мышечных волокон, изменения миозинового профиля и снижение силы сокращения, а также уровня электрической активности мышц (Григорьев и др., 2004). При этом наибольшим изменениям подвергаются прежде всего «медленные» мышцы, участвующие в поддержании позы. Гипогравитационная разгрузка не только затрагивает непосредственно мышечные волокна, но и влияет практически на все звенья цепочки мотонейрон—синапс—мышечное волокно. Показаны изменения в мотонейронах (Islamov et al., 2011), а также получены данные об изменениях вызванной, спонтанной квантовой и неквантовой секреции ацетилхолина (АХ) в синапсах мышц быстрого и медленного типов (Wood, Slater, 2001; Тяпки-

на и др., 2013). Кроме того, снижается активность ацетилхолинэстеразы (АХЭ) в мионевральных синапсах животных в условиях моделируемой гипогравитации (Tang et al., 2002), что сопровождается снижением уровня мРНК АХЭ в быстрых, но не в медленных мышцах (Pregelj, Skeletj, 2002). По другим данным, активность АХЭ, наоборот, увеличивается в «медленной» мышце в аналогичных условиях (Dettbarn et al., 1985). Таким образом, данные о влиянии гипогравитации на активность АХЭ противоречивы. Не менее важной характеристикой мионеврального синапса являются особенности распределения и плотность АХ-рецепторов на постсинаптической мембране. Влияние гипогравитационной разгрузки на характеристики постсинаптической АХ-чувствительности в полной мере не изучали. Отсутствуют также сведения о корреляции активности АХЭ и постсинаптической чувствительности к АХ в нервно-мышечных синапсах животных, находящихся длительное время в условиях моделируемой гипогравитации.

В связи с этим цель настоящей работы заключалась в изучении особенностей распределения АХЭ и ацетилхо-

линового канально-рецепторного комплекса нервно-мышечных синапсов «медленной» и «быстрой» мышц крысы при развитии ГДС на модели антиортостатического вывешивания (АОВ) задних конечностей.

Материал и методика

Эксперименты проводили на половозрелых самцах крыс линии Вистар массой 260—280 г. Все процедуры с животными проводили в соответствии с правилами, рекомендованными Физиологической секцией Российского национального комитета по биологической этике (Генин и др., 2001).

Подопытные животные в течение 35 сут находились в условиях АОВ задних конечностей (общепринятая модель гипогравитационной разгрузки (Morey-Holton, Globus, 2002)). Контрольная группа животных находилась в обычных условиях вивария. В экспериментах использовали нервно-мышечные препараты «медленной» (*m. Soleus*) и «быстрой» (*m. Extensor digitorum longus* (EDL)) мышц. Нервно-мышечные препараты для электрофизиологических исследований выделяли непосредственно перед экспериментом под эфирным наркозом.

Электрофизиологические методы. Изолированный нервно-мышечный препарат помещали в специальную ванночку, через которую в течение всего эксперимента протекал (5 мл/мин) раствор Рингера—Кребса, предварительно аэрированный газовой смесью (95 % кислорода и 5 % углекислого газа). Состав раствора (ммоль/л): 120 NaCl, 5 KCl, 2 CaCl₂, 1 MgCl₂, 23 NaHCO₃, 1 NaH₂PO₄ и 11 глюкозы; pH раствора поддерживали на уровне 7.2—7.4. Эксперименты проводили при 20.0 ± 0.3 °C.

Отведение потенциалов и миниатюрных потенциалов концевой пластинки (ПКП и МПКП соответственно) производили внутриклеточно, используя стандартную микроэлектродную технику. Вызванные ПКП регистрировали в условиях стимуляции нерва с частотой 0.5 имп/с. Для предотвращения мышечных сокращений в перфузионный раствор добавляли блокатор Na⁺-каналов μ -conotoxin GIIIB в концентрации 2 · 10⁻⁶ моль/л. Каждую серию экспериментов проводили на 5—7 мышцах. В отдельном препарате регистрировали 100—200 МПКП или столько же миниатюрных токов концевой пластинки (МТКП). МТКП отводили с помощью стандартной методики двухэлектродной фиксации мембранного потенциала на уровне 60 мВ.

Иммунофлуоресцентные методы. Выделенные нервно-мышечные препараты в течение 30 мин фиксировали в 3%-ном растворе *p*-формальдегида и отмывали 3 раза по 30 мин в фосфатном буферном растворе. Мышцы последовательно инкубировали: 30 мин в 0.3%-ном растворе Тритона X-100; 15 мин в растворе, состоящем из 5 % козьей сыворотки, 1 % бычьего сывороточного альбумина (BSA) и 0.01 % Тритона X-100; 15 мин в растворе, состоящем из 1 % BSA и 0.01 % Тритона X-100. Все эти растворы были приготовлены на основе фосфатного буфера. Далее нервно-мышечные препараты инкубировали в течение 15 ч при 4 °C с первичными кроличьими поликлональными антителами к АХЭ (разведение 1 : 200). Препараты отмывали в фосфатном буфере 3 раза по 30 мин и инкубировали 1 ч при комнатной температуре с козьими антителами против кролика, конъюгированными с Alexa 488 (1 : 500).

Визуализацию зон концевых пластинок в нервно-мышечных препаратах производили окрашиванием постсинаптических никотиновых АХ-рецепторов с помощью α -бунгаротоксина. Для этого препараты инкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре с α -бунгаротоксином, конъюгированным с тетраметилродаминизотиоцианатом (TRITC) в концентрации 20 мкг/мл. После всех этих процедур нервно-мышечные препараты помещали в специальный раствор, препятствующий выгоранию флуорохромов (Antifading), и размещали на предметном стекле для микроскопического исследования. Использовали лазерный сканирующий конфокальный микроскоп Zeiss LSM 510 Meta и масляный иммерсионный объектив 63× (Carl Zeiss, Германия). Настройки программы и интенсивности лазеров были одинаковыми во всех сериях экспериментов. Полученные 8-битные изображения анализировали в программе ImageJ 1.43 (НИН, США); оценивали уровень флуоресценции в отн. ед. оттенков серого цвета.

Гистологические методы. Для анализа диаметра мышечных волокон использовали по 5—6 скелетных мышц в каждой группе. В каждой мышце подсчитывали не менее 100 мышечных волокон. Криостатные срезы готовили из свежемороженой в жидком азоте ткани. Полученные срезы толщиной 20 мкм окрашивали метиленовым синим по общепринятому протоколу (Richardson et al., 1960). Изображения получали на микроскопе Olympus BX51WI с помощью камеры AxioCamMRm и программы Axio Vision Rel. 4.6.3 (Carl Zeiss, Германия). Оцифрованные изображения поперечных срезов спинного мозга анализировали с помощью программы ImageJ 1.43 (НИН, США). Зона интереса ограничивалась при помощи функции свободного выделения.

Для статистической обработки данных использовали параметрический *t*-критерий Стьюдента (*t*-тест). Различие между двумя совокупностями считали достоверным при $P < 0.05$.

Использовали следующие реактивы: μ -conotoxin GIIIB (Alomone Labs, Израиль); *p*-формальдегид, Тритон X-100, BSA, α -бунгаротоксин, конъюгированный с TRITC, метиленовый синий и раствор против выгорания флуорохромов (Antifading) (Sigma, США); первичные антитела к АХЭ (Santa Cruz Biotechnologies, США); козы антитела против кролика, конъюгированные с Alexa 488 (Invitrogen, США).

Результаты

Электрофизиологические данные. В группе контрольных крыс средние значения амплитуды ПКП и МПКП в *m. Soleus* составили 44.2 ± 0.8 и 0.8 ± 0.06 мВ соответственно, в *m. EDL* — 51.2 ± 1.3 и 1.0 ± 0.06 мВ соответственно ($n = 40$). У животных после 35-суточного АОВ задних конечностей амплитуда ПКП в обеих мышцах уменьшалась (по сравнению с ПКП у интактных животных): в *m. Soleus* до 34.6 ± 2.0, в *m. EDL* — до 37.6 ± 1.6 мВ ($n = 40$, $P < 0.05$). При этом средние значения амплитуды МПКП составили в синапсах *m. Soleus* 0.82 ± 0.03, в *m. EDL* — 0.74 ± 0.04 мВ ($n = 40$, $P < 0.05$).

В группе контрольных крыс показатели амплитуд МТКП были ниже в *m. Soleus* (4.1 ± 0.1 нА), чем в *m. EDL* (4.6 ± 0.2 нА; $n = 50$). У животных через 35 сут АОВ амплитуда МТКП в синапсах обеих мышц падала. Так, у животных подопытной группы амплитуда МТКП в

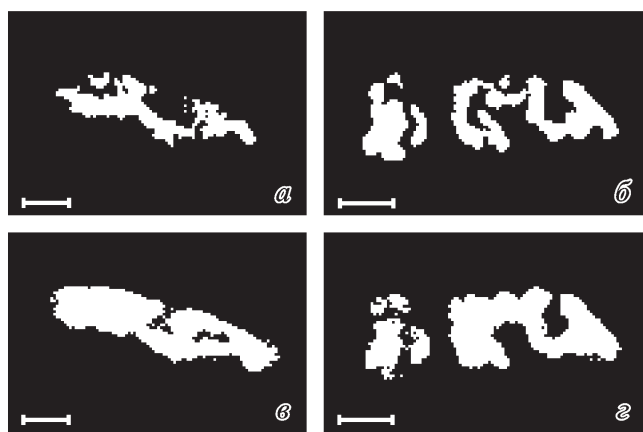


Рис. 1. Увеличение флуоресцентного свечения нервно-мышечных синапсов *m. Soleus* после 35-суточного антиортостатического вывешивания (АОВ) задних конечностей крыс.

a, в — флуоресценция в контроле; *б, г* — после АОВ. *a, б* — окрашивание α -бунгаротоксином, конъюгированным с TRITC; *в, г* — флуоресцентное мечение антителами к ацетилхолинэстеразе (АХЭ). Масштабные отрезки — 10 мкм.

синапсах *m. Soleus* и *m. EDL* уменьшалась соответственно на 30 и 44 % от значений, зарегистрированных у животных контрольной группы ($n = 50$, $P < 0.05$).

Иммунофлуоресцентные и гистологические данные. В группе контрольных крыс интенсивность и площадь флуоресцентного свечения АХ-рецепторов, меченных α -бунгаротоксином, составила в *m. Soleus* 64.3 ± 1.3 отн. ед. и 745.5 ± 49 мкм² соответственно, в *m. EDL* — 65.5 ± 1.5 отн. ед. и 632.9 ± 55 мкм² соответственно ($n = 50$) (рис. 1, *a*; 2, *a*). У подопытных крыс после АОВ задних конечностей средние значения интенсивности флуоресценции составили в *m. Soleus* 82.4 ± 2.9 , в *m. EDL* — 115.2 ± 2.8 отн. ед. ($n = 50$); при этом средние значения площадей флуоресцентного окрашивания составили в *m. Soleus* 425.2 ± 30 , в *m. EDL* — 512.7 ± 27 мкм² ($n = 50$) (рис. 1, *б*; 2, *б*).

Иммунофлуоресцентное окрашивание на АХЭ у животных контрольной группы показало, что средние значения интенсивности и площади свечения составили: в *m. Soleus* 100.6 ± 2.3 отн. ед. и 402.6 ± 66.4 мкм² (рис. 1, *в*), в *m. EDL* 104.8 ± 2.1 отн. ед. и 234.6 ± 25.7 мкм² ($n = 50$) (рис. 2, *в*). У подопытных животных средние значения интенсивности флуоресценции составили: в *m. Soleus* 118.6 ± 1.6 , в *m. EDL* 136.1 ± 3.4 отн. ед. ($n = 50$); при этом среднее значение площади флуоресцентного окрашивания в *m. Soleus* составляло 345.1 ± 33.0 , в *m. EDL* 338.9 ± 30.7 мкм² ($n = 50$). Площадь окрашивания в этих мышцах изменялась неодинаково: в *m. Soleus* уменьшалась на 14 % (рис. 1, *г*), а в *m. EDL*, наоборот, увеличивалась на 39 % ($n = 50$, $P < 0.05$) (рис. 2, *г*).

Анализ соотношения интенсивностей флуоресценции АХ-рецепторов и АХЭ показал, что количество рецепторов относительно АХЭ возрастает в мионевральных синапсах *m. Soleus* на 8, а в *m. EDL* — на 27 %. Отношение площади окрашивания рецепторов на постсинаптической мембране к площади окрашивания АХЭ в синапсе *m. Soleus* и *m. EDL* уменьшалось соответственно на 33 и 42 %.

Хорошо известно, что характерным признаком ГДС является мышечная атрофия, сопровождающаяся уменьшением площади поперечного сечения мышечных воло-

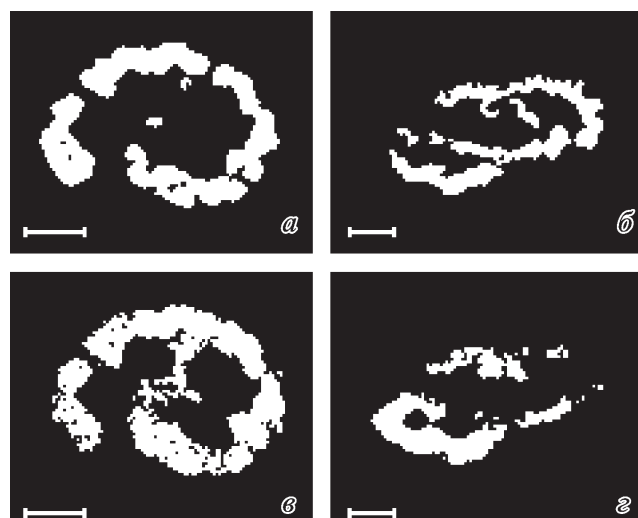


Рис. 2. Увеличение флуоресцентного свечения нервно-мышечных синапсов *m. EDL* после 35-суточного АОВ задних конечностей крыс.

a—г — то же, что и на рис. 1. Масштабные отрезки — 10 мкм.

кон (Григорьев, Шенкман, 2008). Уменьшение площадей, занимаемых флуоресцентным окрашиванием АХ-рецепторов, и АХЭ прямо связано с уменьшением объема мышечного волокна на фоне редукции мышечной массы. Так, падение мышечной массы *m. Soleus* составило 48, а *m. EDL* — 30 %. При этом уменьшение площади поперечного сечения мышечных волокон в *m. Soleus* и *m. EDL* составило 63 (рис. 3, *a, б*) и 59 % (рис. 3, *в, г*) соответственно.

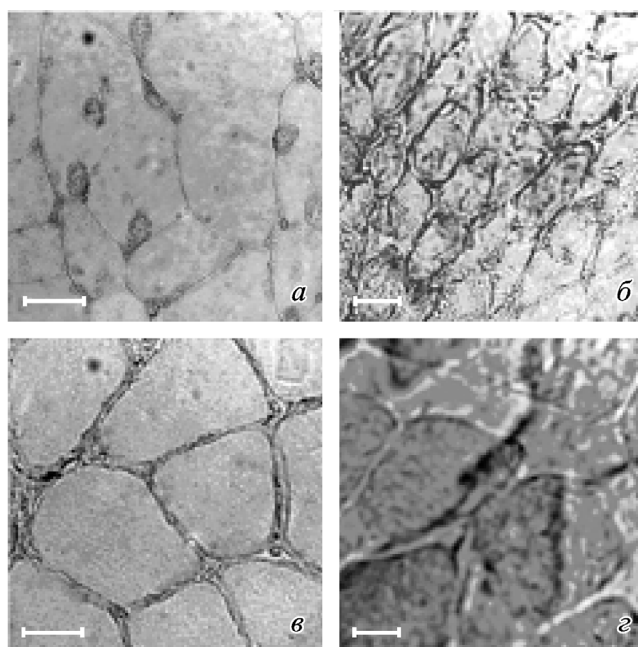


Рис. 3. Уменьшение площади поперечного сечения мышечных волокон после 35-суточного АОВ задних конечностей крыс. *a, б* — *m. Soleus*; *в, г* — *m. EDL*. *a, в* — в контроле; *б, г* — после АОВ. Масштабные отрезки — 40 мкм.

Обсуждение

Результаты электрофизиологических экспериментов показали, что после моделирования эффектов гипогравитации в мионевральных синапсах мышц «медленного» и «быстрого» типов происходит снижение амплитуд ПКП (снижение амплитуды МПКП наблюдается только в т. EDL), а также амплитуды МТКП. Последнее более информативно, поскольку амплитуда МТКП не зависит от кабельных свойств мембраны мышечного волокна. Снижение амплитуды ПКП при стандартной частотной стимуляции и прежде всего МТКП можно объяснить двумя основными механизмами: 1) снижением чувствительности постсинаптической мембраны к АХ, что может быть связано с уменьшением площади, занятой АХ-рецепторами; 2) с увеличением активности АХЭ. Для более детальной оценки состояния постсинаптической мембраны были проведены исследования с применением методов флуоресцентной окраски АХ-рецепторов и АХЭ мышечных волокон. У подопытных животных после окрашивания АХ-рецепторов с помощью меченного TRITC α -бунгаротоксина, высокоспецифичного блокатора АХ-рецепторов Н-типа скелетных мышц (Anderson, Cohen, 1974), было выявлено увеличение интенсивности окрашивания и уменьшение площади окрашивания. Окрашивание антителами к АХЭ показало увеличение интенсивности флуоресценции в обеих мышцах, однако площадь окрашивания в «медленной» т. Soleus оставалась неизменной, в то время как в «быстрой» т. EDL увеличивалась. Рост уровня интенсивности окрашивания АХ-рецепторов можно объяснить прежде всего увеличением их количества на единицу площади из-за уменьшения объема (атрофии) мышечных волокон. В пользу данного предположения говорит уменьшение площади окрашивания АХ-рецепторов на постсинаптической мембране. В то же время в «быстрой» т. EDL площадь иммунофлуоресцентного пятна, получаемого при окрашивании АХЭ, увеличивалась при уменьшении диаметра мышечных волокон. Отношение интенсивности флуоресценции АХ-рецепторов к интенсивности флуоресценции АХЭ сместилось в сторону увеличения интенсивности свечения рецепторов. В то же время соотношение площади, занимаемой АХ-рецепторами, к площади, занимаемой АХЭ, существенно уменьшилось. Таким образом, уменьшение амплитуды ПКП и МТКП можно объяснить возрастанием количества и площади, занимаемой АХЭ в нервно-мышечном синапсе.

Таким образом, на основании полученных данных можно прийти к следующему заключению. Опорная разгрузка (моделирование гипогравитации) приводит к увеличению функциональной активности АХЭ на фоне снижения площади постсинаптической мембраны, занятой АХ-рецепторами, что приводит к снижению амплитуды постсинаптических возбуждающих потенциалов и тем самым к снижению порога надежности передачи возбуждения от нерва к мышце.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты 13-04-00164 и 12-04-01414), президента РФ (№ НШ-5584.214.4) и программы № 7 президиума РАН.

Список литературы

- Генин А. М., Ильин А. Е., Капланский А. С., Касаткина Т. Б., Кузнецова К. А., Пестов И. Д., Смирнова Т. А. 2001. Биоэтические правила проведения исследований на человеке и животных в авиационной, космической и морской медицине. *Авиакосмич. и экологич. медицина*. 35 (4): 14—20. (Genin A. M., Il'in A. E., Kaplanskii A. S., Kasatkina T. B., Kuznetsova K. A., Pestov I. D., Smirnova T. A. 2001. Bioethics of research on humans and animals in aviation, space and marine medicine. *Aviakosm. Ekolog. Med.* 35 (4): 14—20.)
- Григорьев А. И., Козловская И. Б., Шенкман Б. С. 2004. Роль опорной афферентации в организации тонической мышечной системы. *Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова*. 90 (5): 508—521. (Grigor'ev A. I., Kozlovskaya I. B., Shenkman B. S. 2004. The role of support afferents in organisation of the tonic muscle system. *Ros. Fiziol. Zh. im. I. M. Sechenova*. 90 (5): 508—521.)
- Григорьев А. И., Шенкман Б. С. 2008. Скелетная мышца в безопорном мире. Еще одно приложение физиологии сигнальных систем. *Вестн. РАН*. 78 (4): 337—345. (Grigor'ev A. I., Shenkman B. S. 2008. Skeletal Muscle in the Unweighting World. Another application of physiology of sign stimulus systems. *Vestnik RAS*. 78 (4): 337—345.)
- Тяпкина О. В., Маломуж А. И., Нуруллин Л. Ф., Никольский Е. Е. 2013. Квантовая и неквантовая секреция ацетилхолина в мионевральных синапсах мышц разного функционального типа при моделировании гипогравитации. *Докл. РАН*. 488 (1): 1—4. (Tyapkina O. V., Malomouzh A. I., Nurullin L. F., Nikolskiy E. E. 2013. Quantal and non-quantal acetylcholine release at neuromuscular junctions of muscles of different types in a model of hypogravity. *Dokl. Biol. Sci.* 448: 4—6.)
- Anderson M. J., Cohen M. W. 1974. Fluorescent staining of acetylcholine receptors in vertebrate skeletal muscle. *J. Physiol.* 237: 385—400.
- Dettbarn W. D., Groswald D., Gupta R. C., Misulis K. E. 1985. Use and disuse and the control of acetylcholinesterase activity in fast and slow twitch muscle of rat. In: *Molecular basis of nerve activity*. Berlin: Walter de Gruyter. 567—588.
- Islamov R. R., Mishagina E. A., Tyapkina O. V., Shajmardanova G. F., Ereemeev A. A., Kozlovskaya I. B., Nikolskiy E. E., Grigor'ev A. I. 2011. Mechanisms of spinal motoneurons survival in rats under simulated hypogravity on earth. *Acta Astronautica*. 68: 1469—1477.
- Morey-Holton E. R., Globus K. 2002. Hindlimb unloading rodent model: technical aspects. *J. Appl. Physiol.* 92: 1367—1377.
- Pregelj P., Sketelj J. 2002. Role of load bearing in acetylcholinesterase regulation in rat skeletal muscles. *J. Neurosci. Res.* 67: 114—121.
- Richardson K. C., Jarett L., Finke E. H. 1960. Embedding in epoxy resins for ultrathin sectioning in electron microscopy. *Stain Technol.* 35: 313—323.
- Tang B., Fan X. L., Wu S. D. 2002. Acetylcholinesterase activity in soleus muscle intrafusal and extrafusal fibres in tail suspended rats. *Space Med. Med. Eng. (Beijing)*. 15: 317—321.
- Wood S. J., Slater C. R. 2001. Safety factor at the neuromuscular junction. *Prog. Neurobiol.* 64: 393—429.

Поступила 5 III 2014

INFLUENCE OF MODELING OF GRAVITATIONAL UNLOADING ON THE POSTSYNAPTIC ACETYLCHOLINE RECEPTOR ORGANIZATION AND ACETYLCHOLINESTERASE ACTIVITY IN NEUROMUSCULAR SYNAPSES OF RAT FAST AND SLOW MUSCLES

O. V. Tyapkina^{1,2} *L. F. Nurullin*^{1,2} *K. A. Petrov*^{1,3} *E. M. Volkov*^{2,*}

¹ Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics KSC RAS,

² Kazan State Medical University and

³ A. E. Arbutov Institute of Organic and Physical Chemistry KSC RAS, Kazan;

* e-mail: euroworm@mail.ru

Using immunofluorescent techniques, we have revealed that, after 35 days of rats hindlimb unloading, neuromuscular synapses of fast and slow muscles show enhanced fluorescence intensity and decreased area of fluorescent staining of acetylcholine receptors; increased fluorescent intensity and area of fluorescent staining for acetylcholinesterase. The ratio of the number of postsynaptic acetylcholine receptors and the amount of acetylcholinesterase changed as well as their spatial position in relation to each other. These rearrangements correspond to electrophysiological data on the reduction of the amplitude of the miniature endplate currents in both muscles. Identified synapses restructuring accompanied by a decrease in the volume of muscle fibers. Hindlimb unloading (simulation of hypogravity) leads to an increase in functional activity of acetylcholinesterase on the background of reduced postsynaptic membrane area occupied by acetylcholine receptors. This leads to a decrease in the amplitude of excitatory postsynaptic potentials thereby reducing the nerve-muscle excitation transmission safety factor.

Key words: hypogravity modeling, fast and slow muscles, acetylcholinesterase, acetylcholine receptors.
