

УЛЬТРАСТРУКТУРНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ И МОДУЛЯЦИЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ В СИСТЕМЕ КАЛЬЦИЕВОЙ РЕГУЛЯЦИИ СКЕЛЕТНЫХ МЫШЦ КРЫСЫ ПРИ ИЗНУРЯЮЩЕЙ ФИЗИЧЕСКОЙ НАГРУЗКЕ

© *Е. А. Корф*,¹ *И. В. Кубасов*,¹ *М. С. Вонский*,² *А. В. Новожилков*,¹ *А. Л. Рунов*,² *Е. В. Курчакова*,² *Е. В. Матросова*,¹ *Т. В. Тавровская*,¹ *Н. В. Гончаров*^{1, 3, *}

¹Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург, 194223,

²Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064, и

³Научно-исследовательский институт гигиены, профпатологии и экологии человека ФМБА России, Санкт-Петербург, 188663;

* электронный адрес: ngoncharov@gmail.com

В эксперименте с использованием модели принудительного плавания крыс прослежена связь между экспрессией генов, ответственных за синтез основных белков регуляции баланса ионов кальция, и ультраструктурными характеристиками быстрых (*m. extensor digitorum longus*, EDL) и медленных (*m. soleus*, SOL) скелетных мышц в условиях продолжительной физической нагрузки. Через 1 сут после окончания цикла нагрузок в мышцах SOL не обнаружили изменений в уровне транскрипции пяти исследованных генов. Выявили небольшое количество элементов триад (Т-трубочек и цистерн ретикулума) в контроле и незначительное повышение их количества после цикла нагрузок. Кроме того, отмечен полиморфизм и дефекты митохондрий в мышцах SOL, что свидетельствует о вовлечении этих органелл в регуляцию баланса ионов кальция. В мышцах EDL адаптация к нагрузкам связана главным образом с усилением системы откачки ионов Ca^{2+} из саркоплазмы и удержания их в цистернах саркоплазматического ретикулума (СР), где главным буфером кальция является кальсеквестрин. Показано, что в этих условиях экспрессия гена *SERCA1* повышается более чем на порядок, а гена *CASQ1* — в 3 раза. Данные электронной микроскопии свидетельствуют о ведущей роли триадного комплекса в поддержании гомеостаза кальция в мышцах EDL, а также о более выраженной деструкции этих мышц по сравнению с мышцами SOL. Исходно высокий уровень развития триад и вероятная активация механизма CICR (calcium-induced calcium release) в быстрых мышцах служат, по-видимому, основной причиной их повреждения в условиях изнуряющей нагрузки. Предполагается, что адаптация мышц SOL преимущественно связана со структурной модификацией митохондриального аппарата, тогда как адаптация мышц EDL обусловлена главным образом модификацией систем выведения ионов кальция из саркоплазмы и удержания его в СР кальсеквестрином.

Ключевые слова: *m. soleus*, *m. extensor digitorum longus*, кальций, электромеханическое сопряжение, изнуряющая нагрузка.

Принятые сокращения: АФК — активные формы кислорода, ДГПР -дигидропиридиновые рецепторы, ОТ-кПЦР — количественная полимеразная цепная реакция после обратной транскрипции, РиР — рианодинновый рецептор, СР — саркоплазматический ретикулум, ЭМС — электромеханическое сопряжение, CICR — calcium-induced Ca^{2+} release, DICR — depolarization-induced Ca^{2+} release, EDL — *m. extensor digitorum longus*, быстрые (белые) скелетные мышцы, SOL — *m. soleus*, медленные (красные) мышцы.

Исследование молекулярно-клеточных механизмов развития мышечного утомления и восстановления мышечной функции — важнейшее направление функциональной биохимии и молекулярной биологии. В организме развитие утомления представляет собой многоуровневый процесс, в котором помимо мышечной участвуют многие другие ткани и системы. Новые методы исследования механизмов электромеханического сопряжения (ЭМС) в скелетных мышечных волокнах способствовали формированию представлений о значительной роли в развитии утомления субклеточных структур мышечных волокон (Т-трубочек, митохондрий, саркоплазматическо-

го ретикулума и миофибрилл), а также посттрансляционных изменений рецепторов, ионных каналов и регуляторных белков (Allen et al., 2008; Ean et al., 2010; Ferraro et al., 2014; Debold, 2015). Установлено, что деполаризация мембраны скелетного мышечного волокна вызывает высвобождение ионов кальция, депонированных в саркоплазматическом ретикулуме (СР), за счет прямого взаимодействия локализованных на мембране Т-системы дигидропиридиновых рецепторов (ДГПР) с рианодинновыми (РиР) на мембране СР — так называемый механизм индуцированного деполаризацией высвобождения Ca^{2+} (depolarization-induced Ca^{2+} release, DICR) с последующей

активацией контрактильного аппарата (Marty, Fauré, 2016).

В кардиомиоцитах высвобождение Ca^{2+} обеспечивается за счет входа Ca^{2+} в цитоплазму через ДГПР с последующей активацией Ca^{2+} -индуцированного высвобождения Ca^{2+} (CICR). CICR является основным звеном ЭМС в сердечных мышцах и в скелетных мышцах беспозвоночных, включая ракообразных (Györke, Palade, 1992; 1994), и более древним филогенетически, чем DICR. Есть основания полагать, что механизм DICR в скелетных мышцах млекопитающих не является жестко детерминированным, и в определенных условиях (контрактура, тетанус, утомление, гипоксия, оксидативный стресс и др.) в этих мышцах может работать механизм CICR (Наследов и др., 2004; Nasledov et al., 2007; Endo, 2009). Несмотря на то что DICR в скелетных мышечных волокнах и CICR в кардиомиоцитах достаточно хорошо изучены, механизмы, регулирующие их настройку, особенности функционирования в условиях интенсивной физической нагрузки и утомления нуждаются в дополнительных исследованиях. До сих пор неясно, какие звенья ЭМС и кальциевой регуляции в скелетных мышцах различного типа (быстрых и медленных) являются наиболее чувствительными к интенсивной физической нагрузке. Не до конца понятен вопрос о функциональной значимости изоформ саркоплазматической Ca^{2+} -АТФазы, которая у млекопитающих представлена изоформой SERCA1 в быстрых и SERCA2 в медленных мышцах (Рубцов, 2005). В научной литературе нет данных о взаимосвязи механизмов регуляции кальция и ультроструктурных характеристик медленных и быстрых мышц, полученных в рамках одной экспериментальной модели физической нагрузки и утомления.

Для более полного понимания механизмов влияния интенсивной физической нагрузки на мышечную функцию используют специально разработанные тренировочные методики с последующим анализом биохимических и морфометрических характеристик мышц (Ean et al., 2010; Morissette et al., 2014; Janssens et al., 2015; Huang et al., 2016). Ранее мы исследовали физиологические особенности сократительного ответа быстрых (*m. extensor digitorum longus*, EDL) и медленных (*m. soleus*, SOL) скелетных мышц лабораторных животных (крыс) (Кубасов и др., 2016а, 2016б) и проводили сравнительный анализ двух моделей физической нагрузки — принудительного плавания и бега на тредмиле (Новожилов и др., 2014).

Цель настоящей работы — исследовать экспрессию генов, кодирующих белки-регуляторы баланса ионов кальция в быстрых и медленных скелетных мышцах крысы, после цикла принудительного плавания, включающего в себя периоды адаптации к воде, нормированной и предельной плавательной нагрузки, а также установить взаимосвязь этих параметров с данными электронно-микроскопического анализа.

Материал и методика

Модель принудительного плавания. Крысамцов Вистар массой 200 ± 10 г содержали в стандартных условиях вивария. Условия содержания экспериментальных животных соответствовали «Правилам лабораторной практики в Российской Федерации (GLP)» (утверждено приказом Министерства здравоохранения

Российской Федерации от 19.06.2003 № 267). Крыс предварительно адаптировали к воде в течение 5 сут при температуре воды $32^\circ C$. На 6-е сут проводили тестирование с грузом массой 7 % от массы тела: плавание по 3 мин с интервалом 1 мин при температуре воды $28^\circ C$ до полного утомления. По результатам тестирования крыс рандомизировали и формировали контрольную ($n = 6$) и экспериментальную ($n = 12$) группы. Крыс контрольной группы в дальнейшем не подвергали нагрузке. 7-й день каждой недели был выходным, т. е. животных нагрузке не подвергали. В течение 6 дней 2-й нед эксперимента крыс экспериментальной группы подвергали нормированной нагрузке: плавание по 3 мин с интервалом 1 мин при температуре воды $28^\circ C$ с таким же грузом, общая продолжительность плавания составляла примерно 50 % от показателя тестирования. В 1-й день 3-й нед эксперимента проводили промежуточное тестирование (плавание по 3 мин с интервалом 1 мин при температуре воды $28^\circ C$ до полного утомления), затем в течение последующих 5 дней — опять нормированное плавание при тех же условиях. В течение 4 дней 4-й нед эксперимента — ежедневное плавание при тех же условиях до полного утомления (критерий — погружение в воду на 10 с). На 4-й день 4-й нед эксперимента через 5 мин после окончания нагрузки брали кровь из хвостовой вены для определения уровня лактата с целью биохимического контроля интенсивности физической нагрузки. Лактат в цельной крови определяли фотометрическим методом с помощью портативного биохимического анализатора Accutrend Plus (Roche Diagnostics GmbH, Германия). Данные представлены в виде медианы (min; max). На 5-й день, т. е. через 1 сут после окончания плавательной нагрузки, животных наркогизировали и умерщвляли посредством декапитации гильотиной, после чего извлекали мышцы EDL и SOL для проведения морфологических и биохимических исследований. Фрагменты мышц для последующего ОТ-кПЦР-анализа немедленно замораживали в жидком азоте и хранили при $-70^\circ C$.

ПЦР в реальном времени после обратной транскрипции. Цитоплазматическую РНК из тканей мышц выделяли методом фенольно-термического фракционирования (Георгиев, Мантьева, 1962). Чистоту и концентрацию выделенной РНК определяли спектрофотометрически на приборе BioSpec-nano (Shimadzu, Япония). Остатки геномной ДНК, присутствующие в препаратах РНК, удаляли гидролизом ДНКазой I, не содержащей РНКаз (Thermo Scientific, США). Обратную транскрипцию 2 мкг препарата мРНК проводили с использованием набора реагентов ОТ-1 (ЗАО Синтол, Москва) с праймерами олиго(dT)₁₅ в соответствии с рекомендациями фирмы-производителя. Для нормирования результатов ПЦР в реальном времени после обратной транскрипции (ОТ-кПЦР) был проведен выбор референсного гена из числа конститутивно экспрессируемых генов, использованных ранее в подобных исследованиях: гены циклофилина А (*CypA*), бета-актина (*ActB*), фосфоглицераткиназы 1 (*Pgk-1*), гипоксантин-гуанинфосфорибозилтрансферазы (*HPRT*), рибосомального белка 13А (*Rpl13A*), белка-активатора тирозин-3-монооксигеназы/триптофан-5-монооксигеназы (*YWHAZ*) и ТАТА-связывающего белка (*Tbp*).

Выбор праймеров осуществляли с использованием программы primer-BLAST, анализируя базы данных нуклеотидных последовательностей NCBI с учетом эк-

зон-интронной структуры для исключения амплификации геномной ДНК. Для анализа кандидатных референсных генов использовали препараты мРНК 3 крыс каждой экспериментальной группы. Стабильность экспрессии оценивали, обрабатывая результаты ОТ-кПЦР с использованием алгоритмов geNorm (Vandesompele et al., 2002), Normfinder (Andersen et al., 2004), BestKeeper (Pfaffl et al., 2004) и сравнительного метода $\Delta\Delta Ct$ (Silver et al., 2006). Окончательную обработку и ранжирование результатов выполняли с использованием программного обеспечения Reffinder (Xie et al., 2012). Наилучшую стабильность экспрессии в экспериментальных условиях настоящего исследования показал ген *Rpl13*, используемый далее в качестве референсного. Целевыми генами исследования являлись *CASQ1* (кальсеквестрин скелетных мышц), *SERCA1* (Са-АТФаза саркоплазматического ретикулама быстрых мышечных волокон), *SERCA2* (Са-АТФаза саркоплазматического ретикулама медленных мышечных волокон), *RYR1* (рианодиновый рецептор скелетных мышц) и *CACNA1S* (субъединица альфа-1 дигидропиридинового рецептора). Эффективность кПЦР оценивали, используя метод последовательных разведений препаратов кДНК. Результаты ОТ-кПЦР анализировали с использованием пакета REST-2009 (Pfaffl et al., 2002; Vandesompele et al., 2002).

Трансмиссионная электронная микроскопия. После декапитации наркотизированных животных извлекали мышцы EDL и SOL, разрезали их на фронтальные пластины (слайсы) толщиной 1—1.5 мм и фиксировали в 2.5%-ном растворе глутаральдегида на 0.1 М натрий-какодилатном буфере (pH 7.2—7.4) при 4 °С. Через 20 мин из пластин вырезали кусочки размером около 1 мм², которые дополнительно фиксировали в свежем охлажденном растворе глутаральдегида в течение 1.5 ч. Затем их промывали трехкратно в том же буфере по 10 мин в каждой порции. Дофиксацию проводили в 1%-ном растворе OsO₄ на 0.1 М натрий-какодилатном буфере (pH 7.2—7.4) в течение 1—1.5 ч при комнатной температуре. После трехкратной промывки в натрий-какодилатном буфере материал дегидратировали в растворах этилового спирта восходящей концентрации (в объемных %): 50, 70, контрастирование в 3%-ном растворе уранил-ацетата на этаноле (70 %) не менее 12—24 ч, 80, 90, 96 и 100 %. Завершали дегидратацию в охлажденной смеси абсолютного спирта-ректификата и ацетона (1 : 1) в течение 20 мин, а затем в чистом ацетоне до 30 мин. Далее кусочки пропитывали смесью эпоксидных смол (аралдитов), разбавленных ацетоном в соотношениях 3 : 1, 1 : 1, 1 : 3 по 2 ч и 1 : 7 до 12 ч. Затем 2—4 ч выдерживали в чистой смеси аралдитов, после чего кусочки заливали в отдельные блоки с новой порцией смолы. Полимеризацию проводили в термостате при 37 °С в течение 24 ч, затем при 60 °С в течение последующих 2 сут. Из полученных блоков изготавливали полутонкие (1 мкм) срезы на ультратоме LKB III и V (LKB, Швеция) и ультратонкие (0.05—0.10 мкм) срезы на ультратоме Leica EM UC7 (Leica, Швейцария). Для предварительной оценки срезы фиксировали на предметных стеклах и окрашивали метиленовым или толуидиновым синим (0.1%-ные водные растворы). Ультратонкие срезы толщиной 40—60 нм помещали на сеточки или бленды и окрашивали методом тройного контрастирования по Рейнольдсу цитратом свинца и спиртовым насыщенным раствором уранил-ацетата. Просмотр и фотосъемку производили на электронных микроскопах Hitachi-300 (High-Tech Япо-

ния), JEM-2100HC (JEOL, Япония) и Tecnai G² (FEI, Company, Нидерланды).

Использованные реактивы: глутаральдегид, какодилатный буфер, четырехокись осмия, смесь аралдитов, метиленовый синий и толуидиновый синий (Sigma-Aldrich, США); уранил-ацетат (Polysciences Inc., США); ацетон и цитрат свинца (Вектон, Россия).

Результаты

Средняя продолжительность плавания крыс экспериментальной группы в последний 4-й день предельной нагрузки (4-я нед эксперимента) составила 9.5 мин, средний уровень лактата через 5 мин после окончания нагрузки — 13.0 ммоль/л (7.8, 16.8), через 1 ч он восстановился до уровня 4.3 ммоль/л (3.1, 5.2). Трехкратное повышение лактата после физической нагрузки свидетельствует о достаточно высокой ее интенсивности; мы полагаем, что применяемая модель адекватна для решения поставленных задач.

Экспрессия генов, ответственных за регуляцию баланса кальция в миоцитах. По результатам ОТ-кПЦР после принудительного плавания крыс в белых мышцах EDL было зарегистрировано наибольшее повышение экспрессии гена Са-АТФазы 1-го типа *SERCA1* — в 11.5 раз по сравнению с контролем ($P = 0.0001$), экспрессия гена кальсеквестрина *CASQ1* повышена в 3 раза ($P = 0.03$). Экспрессия генов дигидропиридиновых, рианодиновых каналов и Са-АТФазы 2-го типа повышена в 2—4 раза, однако для этой группы генов выявленные изменения статистически недостоверны ($P > 0.05$). В мышцах SOL для исследованных генов статистически значимых изменений по сравнению с контролем не выявлено, хотя следует отметить тенденцию к повышению экспрессии генов *RyR1* и *CACNA1S* (см. таблицу).

Полученные данные свидетельствуют о том, что в разработанной нами модели принудительного плавания нагрузка приходится главным образом на белые мышцы, адаптация которых обусловлена выведением ионов кальция из саркоплазмы с помощью Са-АТФазы и удержания его в СР кальсеквестрином. Отсутствие значимых изменений в экспрессии генов дигидропиридиновых и рианодиновых каналов свидетельствует о том, что они играют второстепенную (вспомогательную) роль в механизмах адаптации.

Структуры электромеханического сопряжения скелетных мышц контрольных крыс. На периферии и между миофибриллами мышечных волокон SOL находится большое количество митохондрий (рис. 1). Мышцы имеют слаборазвитую сеть канальцев СР вокруг миофибрилл, которые часто соприкасаются с мембранами митохондрий. Т-трубочки представлены либо в виде отдельных удлиненных тонких фрагментов, либо в составе триад. Контакты между мембранами митохондрий и других внутриклеточных структур относительно недавно привлекли внимание исследователей. Отмечается важная роль контактов ретикула в системе внутриклеточной сигнализации, метаболизма и трафика метаболитов (Prinz, 2014).

Ультраструктурные исследования EDL контрольных животных выявили в их саркоплазме значительные скопления зерен гликогена между миофибриллами и цистернами СР (рис. 2). Гликоген концентрируется и вокруг митохондрий, расположенных лишь в краевой зоне миоци-

Показатели экспрессии генов в быстрых (EDL) и медленных (SOL) мышцах крыс после цикла принудительного плавания по отношению к экспрессии в контрольной группе (100 %)

Ген	Экспрессия, %	95%-ный доверительный интервал	P
Мышцы EDL			
CASQ1 (n = 10)	297.5 ^a	93—1356.9	0.03
SERCA1 (n = 10)	1146.4 ^b	506.4—2377	0.0001
SERCA2 (n = 6)	172.0	9.4—3242.5	0.616
RyR1 (n = 10)	222.8	35.5—1183.9	0.094
CACNA1S (n = 10)	392.9	34.6—8895.6	0.162
Мышцы SOL			
CASQ1 (n = 11)	105	46.3—269.7	0.867
SERCA1 (n = 11)	88.1	1.0—623.5	0.868
SERCA2 (n = 11)	80.0	31.4—312.6	0.569
RyR1 (n = 11)	190.3	15.2—1139.3	0.332
CACNA1S (n = 11)	139.2	18.6—1368.6	0.552

Примечание. n — число животных; отличия от контроля достоверны при ^a $P < 0.5$ и ^b $P < 0.001$.

тов. В быстрых мышцах хорошо развита система каналов CP и T-трубочек между пучками миофибрилл (рис. 3), которые формируют структуры ЭМС. T-трубочки (Tt) в некоторых участках располагаются продольно вдоль каналов CP и в зависимости от соотношения компонентов ЭМС могут формировать триады (CP—Tt—CP) или диады (CP—Tt).

Ультраструктурные изменения мышц после цикла физической нагрузки. Под влиянием изнуряющей физической нагрузки в мышцах SOL отмечается гипертрофия одних миофибрилл в сочетании с дистрофией других (рис. 4). Изменения митохондрий после цикла физической нагрузки отличаются полиморфизмом. При этом наряду с деструкцией одних митохондрий вы-



Рис. 1. Ультраструктура скелетных мышц SOL контрольных крыс.

Саркоплазматическая сеть (CP) вокруг миофибрилл (МФ); длинные стрелки указывают на участки плотных соединений миофибрилл с мембраной митохондрий (Мх), T-трубочки (Tt) представлены либо в виде отдельных удлиненных тонких фрагментов, либо в составе триад (T); Z — Z-линия; контакты между митохондриями отмечены короткими стрелками. Трансмиссионная электронная микроскопия. 10 000×.

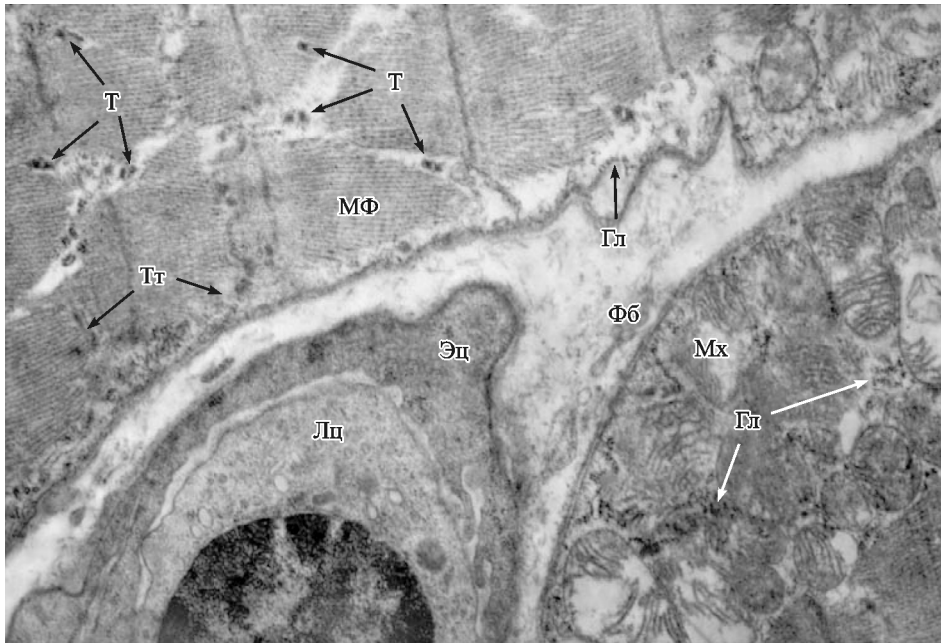


Рис. 2. Ультраструктура скелетных мышц EDL контрольных крыс.

На продольном срезе белых мышечных волокон видны каналцы СР вокруг миофибрилл (МФ). Хорошо развита система Т-трубочек (Тт), образующая многочисленные триады (Т). Между МФ в саркоплазме и цистернами СР встречаются скопления зерен гликогена (Гл) наряду с триадами (Т) и отдельно лежащими Тт. Гл концентрируется и вокруг митохондрий (Мх), расположенных лишь в краевой зоне миоцитов. В просвете поперечно срезанного капилляра, лежащего между двумя мышечными клетками, находится лейкоцит (Лц). В интерстициальном пространстве видны отростки фибробластов (Фб); Эц — эндотелиоцит. Увел.: 12 000× (а) и 10 000× (б).

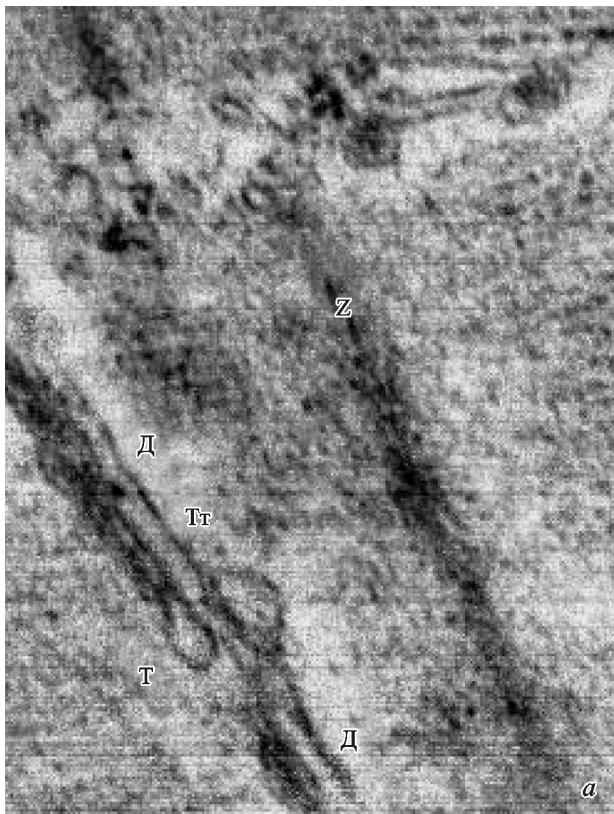


Рис. 3. Структуры электромеханического сопряжения мышечных волокон EDL контрольных крыс.

а — Т-трубочка (Тт), идущая почти параллельно Z-линии (Z), формирует диады (Д) с электронно-плотными цистернами СР, расположенными вдоль Тт, а в центральной ее части вместе с двумя цистернами ретикулама, лежащими перпендикулярно, образуется триада (Т). б — оптически пустые Тт соединяются в Д и Т с электронно-плотными цистернами СР. 35 000×.

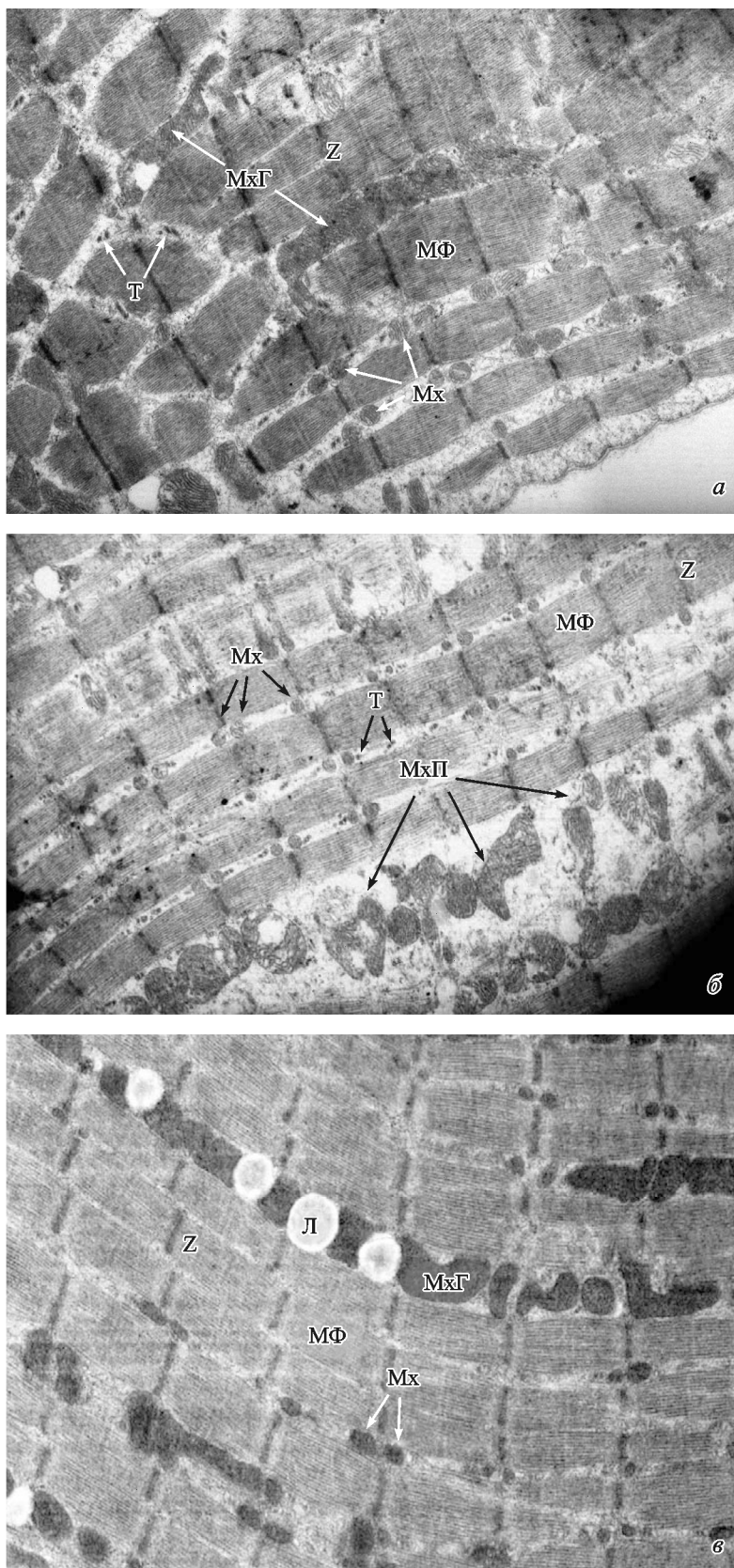


Рис. 4. Ультраструктура SOL после цикла физической нагрузки.

a — гипертрофия пучков миофибрилл (МФ) в сочетании с мегаконией (МхГ). *б* — дистрофическое истощение МФ, плейокопия (МхП). *в* — слияние митохондрий (Мх) в единую энергетическую сеть, липидное (Л) перерождение отдельных участков Мх. Увел.: 6000× (*a, б*) и 9000× (*в*).

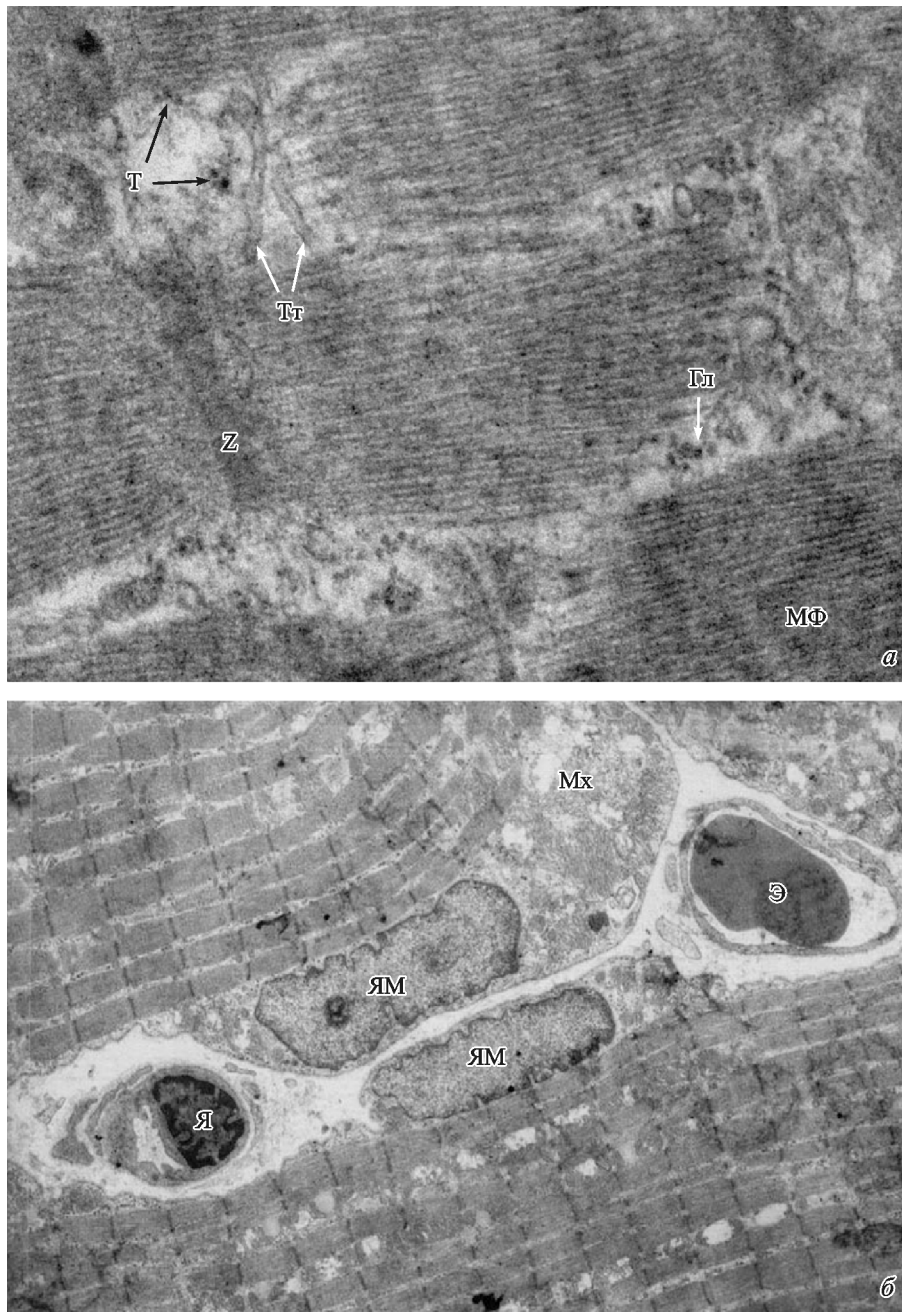


Рис. 5. Ультраструктура SOL после цикла физической нагрузки.

a — перекрещивающиеся и (или) контактирующие между собой Т-трубочки (Тт). *б* — повышенная плотность капилляров; наличие эухроматина в ядре (Я) эндотелиоцита свидетельствует о транскрипционной активности, что, очевидно, сопряжено с ангиогенезом. Мх — митохондрии, Э — эритроцит, ЯМ — ядро миоцита, Z — Z-линия. Увел.: 25 000× (*a*) и 3000× (*б*).

является компенсаторная гипертрофия других: увеличение их размеров (мегакокия), возрастание общей численности (плейококия), уплотнение крист (гиперплазия внутренней поверхности), образование специфических контактов между митохондриями, формирование из них протяженных цепочек, образование «энергетических миофибрилярных кластеров» в результате контактов пучков миофибрилл и митохондриальных конгломератов. Кроме того, встречаются вновь образованные митохондрии, плотно упакованные кристами, которые, как правило, попарно расположены по обе стороны от Z-линии между миофибриллами (рис. 4, *a*, *б*). Выявлены участки слияния

пучков миофибрилл по два и даже по три в один (рис. 4, *a*; 5, *б*), очаги дистрофического истончения мышечных волокон с поврежденными митохондриями (рис. 4, *б*). В межпучковых промежутках повышено количество Т-трубочек (рис. 5, *a*). Однако триад и других конфигураций комплексов ЭМС немного, как и в контроле. К морфологическим признакам адаптационных процессов к физической нагрузке можно отнести усиление кровоснабжения SOL за счет новых капилляров (рис. 5, *б*).

Морфологическая картина повреждения EDL под влиянием физической нагрузки включает в себя «растворение» I-диска и разрушение Z-полосы (рис. 6, *б*). Мы-

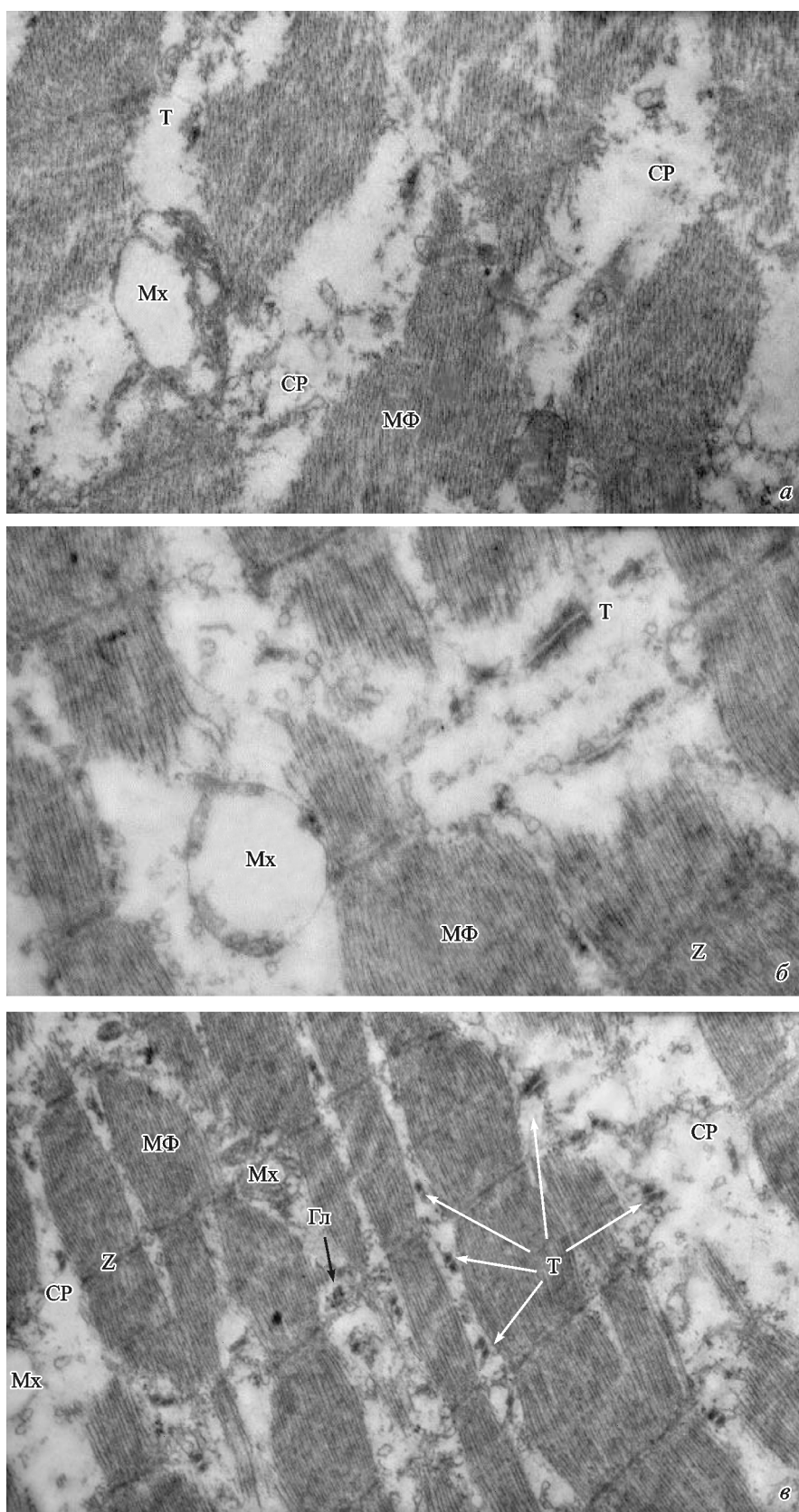


Рис. 6. Деструкция мышцы EDL крыс после цикла физической нагрузки.

a — повреждения миофибрилл (MФ) создают мраморный рисунок пучков, дополненный отчетными межпучковыми пространствами; CP фрагментирован, хотя триады (Т) различимы; Mx — митохондрии. *б* — очаговые повреждения в зоне I-полосы лежащих рядом пучков MФ, включая Z-линию (Z), а также вакуолизация миоцитов за счет деградации митохондрий (Mx), *в* — разрывы и дезорганизация пучков MФ на протяжении нескольких саркомеров, цистерны CP фрагментированы; Гл — гранулы гликогена. Увел.: 15 000× (*a*, *б*) и 10 000× (*в*).

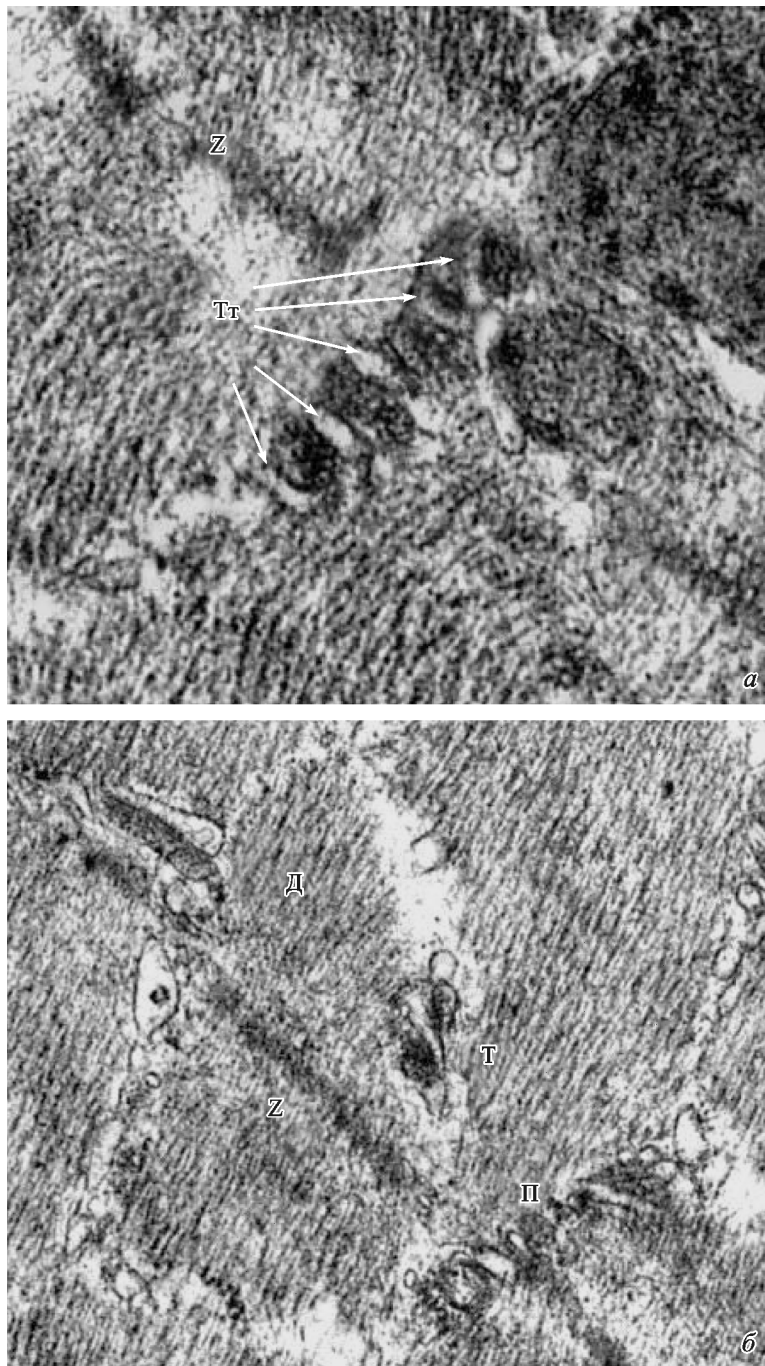


Рис. 7. Структуры ЭМС в мышце EDL после цикла физической нагрузки.

a — полиада, состоящая из пяти Т-трубочек (Тт, *стрелки*) и чередующихся с ними цистерн СР. *б* — диада (Д) и триада (Т) состоят из более объемных по сравнению с нормой структур. Ниже, вдоль той же Z-линии (Z) располагается полиада (П); Увел.: 35 000× (*a*) и 33 000× (*б*).

шечные волокна неплотно прилегают друг к другу, характерная дистрофия миофибрилл сочетается с многочисленными разрывами мышечных волокон. Митохондрии немногочисленны, с просветленным и размытым матриксом. В то же время отмечена высокая плотность Т-трубочек и мембранных структур СР, которые часто состоят из множества (до 10) контактирующих между собой структур (полиады), которые, как правило, локализуются в области Z-линии (рис. 7). Профили отдельных мембранных структур ретикулума более объемны, чем в миоцитах контрольных животных. Цистерны СР слегка отечны и

оптически пусты, однако многие миоциты имеют хорошо сформированные пучки миофибрилл и ядра с признаками повышенной функциональной активности (ядрышки, извитой контур поверхности).

Обсуждение

Многие вопросы, связанные с функционированием структур ЭМС в скелетных мышцах, остаются открытыми. Анализ экспрессии тех или иных генов и посттранс-

ляционных изменений звеньев ЭМС представляется исключительно важным для понимания процессов непатологической природы, но существенно влияющих на формирование мышечной функции в таких условиях как интенсивные физические нагрузки или полное их отсутствие, например в условиях невесомости. Решением обозначенных выше проблем может стать идентификация соответствующих мишеней как для терапевтического воздействия, так и для повышения функциональной устойчивости исследуемых мышц в превентивных целях. Заложенный в ранних исследованиях стереотип однозначной детерминации ЭМС исключительно рамками DICR существенно снизил последующий интерес к исследованию альтернативных или дополнительных механизмов реализации мышечной функции, в частности Ca^{2+} -индуцированного высвобождения Ca^{2+} , CICR. Одной из причин таких ограничений является преимущественное изучение механизмов ЭМС в рамках вызова одиночного ответа.

Однако в реальных условиях скелетные мышцы функционируют в тетаническом режиме частотной активации в диапазоне импульсации соответствующих мотонейронов. Именно тетанические ответы обеспечивают полноценную мышечную функцию. Они сопровождаются существенными изменениями ионных градиентов и активности ионтранспортирующих систем саркоплазматической мембраны, важнейшими из которых являются системы транспорта ионов Ca^{2+} . Поскольку каждый последовательный ответ в составе тетануса зависит от условий, формируемых предыдущими ответами, роль отдельных компонент комплекса ЭМС и результаты тетанических сокращений могут существенно различаться в быстрых и медленных мышечных волокнах млекопитающих (Schiaffino, Reggiani, 2010) и нуждаются в специальных исследованиях при использовании различных экспериментальных моделей. Одной из таких моделей служит модель принудительного плавания крыс (Новожилов и др., 2014).

В нашем эксперименте впервые прослежена связь между: 1) степенью повреждения быстрых и медленных скелетных мышц, 2) морфологическими изменениями митохондрий и триадных структур, а также 3) экспрессией генов, ответственных за синтез основных белков системы регуляции баланса ионов кальция в условиях продолжительной физической нагрузки. Через 1 сут после окончания цикла в медленных (красных) мышцах SOL не выявлено достоверных изменений уровня транскрипции пяти исследованных генов, хотя почти 2-кратное повышение экспрессии гена рианодинового канала на фоне гораздо менее выраженной модуляции экспрессии гена дигидропиридинового канала может свидетельствовать о некотором повышении роли механизмов CICR в медленных мышцах. Малое количество триадных комплексов в контроле и незначительное повышение их количества после физической нагрузки, согласно ультроструктурным данным, дает дополнительные свидетельства в пользу таких предположений. В медленных мышцах мобилизация кальция обусловлена главным образом реципрокным взаимодействием митохондрий и РиР, так называемым сопряжением возбуждения и метаболизма (Rossi et al., 2009): первичное высвобождение ионов Ca^{2+} из ретикулума через РиР посредством механизма DICR обуславливает Ca^{2+} -зависимую активацию цикла Кребса и производство АТФ в митохондриях (ортоградный сигналинг), тогда как синтезированный АТФ расходуется и на рабо-

ту саркоплазматической Са-АТФазы (ретроградный сигналинг). РиР считается одним из редокс-сенсоров, его окисление и (или) нитрозилирование нарушает взаимодействие со вспомогательными белками (кальмодулином, триадином и FKBP12), что повышает вероятность открытия канала (Hidalgo et al., 2005; Durham et al., 2008; Witherspoon, Meilleur, 2016).

Умеренная генерация АФК митохондриями или другими источниками способствует дополнительному выходу кальция из ретикулума через РиР, что временно повышает сократительную способность мышц и работоспособность, однако дальнейший рост АФК ведет к неконтролируемому выходу кальция и снижению работоспособности мышц (Cheng et al., 2016; He et al., 2016). Помимо митохондрий важнейшими источниками АФК в мышцах являются NADPH-оксидазы и ксантин-оксидаза (Надеев и др., 2014; He et al., 2016). Снижение производства АТФ в митохондриях медленных мышц при сохранении мембранного потенциала митохондрий обуславливает снижение активности саркоплазматической Са-АТФазы и аккумуляцию ионов кальция в митохондриях посредством трех каналов — унипортера, быстрого транспортера кальция и митохондриального РиР (Rossi et al., 2009). Т. е. происходит перераспределение кальция между компартментами, обусловленное спецификой медленных мышц, в которых кальциевая емкость митохондрий существенно превышает емкость ретикулума.

Молекулярным буфером кальция в митохондриях являются полифосфаты, однако при дальнейшем снижении АТФ происходит увеличение размеров полифосфатов, так что они становятся причиной деполяризации митохондрий и их гибели (Angelova et al., 2016; Solesio et al., 2016). Отмеченные нами дефекты митохондрий, их полиморфизм в мышцах SOL, в том числе мегакония и повышенная электронная плотность вследствие большого количества полифосфатов со связанными ионами Ca^{2+} , свидетельствуют в пользу такого развития событий. Не исключено, что эти события могут быть причиной существенного снижения силы сократительных ответов SOL после цикла плавательной нагрузки.

Ультроструктурные особенности быстрых мышц EDL (малое количество митохондрий, но хорошо развитая система триад) диктуют иной сценарий в условиях изнуряющей нагрузки. Механизмы CICR, по-видимому, играют более существенную роль в этих мышцах, и адаптация направлена главным образом на откачку ионов Ca^{2+} в структуры ретикулума, где главным буфером кальция является кальсеквестрин. Экспрессия гена *SERCA1* статистически значимо повышается более чем на порядок, а гена *CASQ1* — в 3 раза. При этом следует отметить выраженную тенденцию к повышению экспрессии *CACNA1S* в 4 раза и *RyR1* более чем в 2 раза, что позволяет предполагать ослабление роли CICR в пользу DICR. Ультроструктурные данные подтверждают повышенную роль структур ЭМС в мышцах EDL и свидетельствуют о том, что мышцы EDL в условиях экстремальной нагрузки подвержены большей деструкции, чем мышцы SOL.

Перегрузка мышц кальцием в сочетании с дефицитом АТФ — главная причина повреждения мышц в условиях изометрического сокращения (гладкого тетануса) (Fredsted et al., 2007). В быстрых мышечных волокнах основным путем синтеза АТФ является гликолиз, а энергетическим источником — гликоген, локализующийся в трех субклеточных регионах: внутри миофибрилл, между ними и под сарколеммой (Nielsen et al., 2014). Из этих

трех депо ведущую роль в регуляции уровня саркоплазматического кальция играет интрамиофибрилярный гликоген. Принципиальное отличие в реакции быстрых мышц от медленных на физическую нагрузку состоит в том, что энергетический источник в быстрых мышцах не находится в отдельном компартменте, который мог бы еще и депонировать кальций, поэтому перегрузка саркоплазмы ионами Ca^{2+} ведет к активации кальпаина-1, протеолитической деструкции десмина и других костяжных белков, после чего наблюдается нейтрофильная инфильтрация мышечной ткани, сменяющаяся инфильтрацией макрофагами (Yu, 2013; Baumert et al., 2016). Биологический смысл активации кальпаинов ионами кальция может состоять в том, что одна из изоформ, кальпаин-3, является активатором $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обменника (изоформа 3, NCX3), обеспечивая «аварийную» откачку кальция в наружную среду при разобщении аппарата ЭМС (Michel et al., 2016).

Таким образом, высокий уровень развития структур ЭМС и вероятная активация механизма SICR в белых мышцах служат причиной их (само)повреждения в условиях изнуряющей нагрузки. Мы полагаем, что адаптация SOL связана с посттрансляционными изменениями митохондриального аппарата, тогда как адаптация EDL обусловлена усилением экспрессии генов, ответственных за механизмы выведения ионов кальция из саркоплазмы и удержания его в CP кальсеквестрином. Дигидропиридиновые и рианодинновые каналы играют второстепенную роль в механизмах адаптации. Более того, можно предположить, что повышение их синтеза обусловлено необходимостью компенсации утраченных структур ЭМС, либо «трансформацией» быстрых мышц, в результате которой повышается доля мышечных волокон типа 2A. Для проверки этого предположения необходимо исследовать экспрессию генов тяжелых цепей миозина, обуславливающих фенотип мышечных волокон.

Авторы выражают благодарность Н. М. Парамоновой за помощь в подготовке материала для электронной микроскопии.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект 15-15-20008).

Список литературы

Георгиев Г. П., Мантьева В. Л. 1962. Информационная и рибосомальная РНК хромосомно-ядрышкового аппарата, методы разделения и нуклеотидный состав. Биохимия. 23 (5): 949—953. (Georgiev G. P., Mant'eva V. L. 1962. Informational and ribosomal RNA, of chromosome-nucleolar apparatus, methods of separating, and nucleotide composition. Biochemistry (Moscow). 23 (5): 949—953.)

Кубасов И. В., Арутюнян П. С., Матросова Е. В. 2016а. Трансформация индивидуальных сократительных ответов, следующих в составе тетанусов в быстрых и медленных скелетных мышцах крысы. Журн. эволюц. биохим. и физиол. 52 (1): 46—55. (Kubasov I. V., Arutyunyan P. S., Matrosova E. V. 2016a. Transformation of the individual contractile responses within the tetanic train in fast- and slow-twitch rat skeletal muscles. J. Evol. Biochem. Physiol. 52 (1): 46—55.)

Кубасов И. В., Арутюнян П. С., Матросова Е. В., Кубасов И. И. 2016б. Характеристики индивидуальных сократительных ответов, следующих в составе тетанусов в медленных скелетных мышцах крысы в условиях модуляции освобождения Ca^{2+} из саркоплазматического ретикулума. Журн. эволюц.

биохим. физиол. 52 (5): 337—345. (Kubasov I. V., Arutyunyan P. S., Matrosova E. V., Kubasov I. I. 2016b. Characteristics of the individual contractile responses within the tetanic train in slow-twitch rat skeletal muscles during modulation of Ca^{2+} release from sarcoplasmic reticulum. J. Evol. Biochem. Physiol. 52 (5): 337—345.)

Надеев А. Д., Зинченко В. П., Авдонин П. В., Гончаров Н. В. 2014. Токсические и сигнальные эффекты активных форм кислорода. Токсикол. вестник. 2: 22—27. (Nadeev A. D., Zinchenko V. P., Avdonin P. V., Goncharov N. V., 2014. Toxic and signaling effects of the reactive oxygen species. Toxikol. vestnik. 2: 22—27.)

Наследов Г. А., Катина И. Е., Кобзева М. А. 2004. О функционировании электромеханической связи на разных стадиях контрактурного сокращения. Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова. 90 (3): 327—338. (Nasledov G. A., Katina I. E., Kobzeva M. A. 2004. On the functioning of the electromechanical coupling in various stages of reduction of the contracture. Rossiiskii fiziologicheskii zhurnal imeni I. M. Sechenova/Rossiiskaia Akademiia Nauk. 90 (3): 327—338.)

Новожилов А. В., Тавровская Т. В., Войтенко Н. Г., Маслова М. Н., Гончаров Н. В., Морозов В. И. 2014. Эффективность экстракта зеленого чая в эксперименте с использованием двух моделей физической нагрузки. Биол. эксперим. биол. мед. 158 (9): 327—332. (Novozhilov A. V., Tavrovskaya T. V., Voytenko N. G., Maslova M. N., Goncharov N. V., Morozov V. I. 2014. The efficiency of the green tea extract in the experiment using two exercise models. Bull. Exp. Biol. Med. 158 (9): 327—332.)

Рубцов А. М. 2005. Са-АТРаза саркоплазматического ретикулума: молекулярная организация, механизм функционирования и особенности регуляции активности. Успехи биол. наук. 45: 235—268. (Rubtsov A. M. 2005. Ca-ATPase of the sarcoplasmic reticulum: molecular organization, functioning mechanism and the regulation of the activity differences. Uspekhi Biologicheskikh Nauk. 45: 235—268.)

Allen D. G., Lamb G. D., Westerblad H. 2008. Skeletal muscle fatigue: cellular mechanisms. Physiol. Rev. 88: 287—332.

Andersen C. L., Jensen J. L., Orntoft T. F. 2004. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. Cancer Res. 64: 5245—5250.

Angelova P. R., Baev A. Y., Berezhnov A. V., Abramov A. Y. 2016. Role of inorganic polyphosphate in mammalian cells: from signal transduction and mitochondrial metabolism to cell death. Biochem. Soc. Trans. 44: 40—45.

Baumert P., Lake M. J., Stewart C. E., Drust B., Erskine R. M. 2016. Genetic variation and exercise-induced muscle damage: implications for athletic performance, injury and ageing. Eur. J. Appl. Physiol. 116: 1595—1625.

Cheng A. J., Yamada T., Rassier D. E., Andersson D. C., Westerblad H., Lanner J. T. 2016. Reactive oxygen/nitrogen species and contractile function in skeletal muscle during fatigue and recovery. J. Physiol. 594 (18): 5149—5160.

Debold E. P. 2015. Potential molecular mechanisms underlying muscle fatigue mediated by reactive oxygen and nitrogen species. Front. Physiol. 6: 239.

Durham W. J., Aracena-Parks P., Long C., Rossi A. E., Gonnasekera S. A., Boncompagni S., Galvan D. L., Gilman C. P., Baker M. R., Shirokova N., Protasi F., Dirksen R., Hamilton S. L. 2008. RyR1 S-nitrosylation underlies environmental heat stroke and sudden death in Y522S RyR1 knockin mice. Cell. 133: 53—65.

Ean B., Carson B. P., Garcia-Roves P. M., Chibalin A. V., Sarsfield F. M., Barron N., McCaffrey N., Moyna N. M., Zierath J. R., O'Gorman D. J. 2010. Exercise intensity-dependent regulation of peroxisome proliferator-activated receptor coactivator-1 mRNA abundance is associated with differential activation of upstream signalling kinases in human skeletal muscle. J. Physiol. 588: 1779—1790.

Endo M. 2009. Calcium-induced calcium release in skeletal muscle. Physiol. Rev. 89: 1153—1176.

- Ferraro E., Giammaroli A. M., Chiandotto S., Spoletini I., Rosano G. 2014. Exercise-induced skeletal muscle remodeling and metabolic adaptation: redox signaling and role of autophagy. *Antioxid. Redox. Signal.* 21 : 154—176.
- Fredsted A., Gissel H., Madsen K., Clausen T. 2007. Causes of excitation-induced muscle cell damage in isometric contractions: mechanical stress or calcium overload? *Amer. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 292 : 2249—2258.
- Györke S., Palade P. 1992. Calcium-induced calcium release in crayfish skeletal muscle. *J. Physiol.* 457 : 195—210.
- Györke S., Palade P. 1994. Ca²⁺-dependent negative control mechanism for Ca²⁺-induced Ca²⁺ release in crayfish muscle. *J. Physiol.* 476 : 315—322.
- He F., Li J., Liu Z., Chuang C. C., Yang W., Zuo L. 2016. Redox mechanism of reactive oxygen species in exercise. *Front. Physiol.* 7 : 486.
- Hidalgo C., Donoso P., Carrasco M. A. 2005. The ryanodine receptors Ca²⁺ release channels: cellular redox sensors? *IUBMB Life.* 57 : 315—322.
- Huang C. C., Wang T., Tung Y. T., Lin W. T. 2016. Effect of exercise training on skeletal muscle SIRT1 and PGC-1 α expression levels in rats of different age. *Int. J. Med. Sci.* 13 : 260—270.
- Janssens S., Jonkers R. A., Groen A. K., Nicolay K., van Loon L. J., Prompers J. J. 2015. Effects of acute exercise on lipid content and dietary lipid uptake in liver and skeletal muscle of lean and diabetic rats. *Amer. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 309 : 874—883.
- Marty I., Fauré J. 2016. Excitation-contraction coupling alterations in myopathies. *J. Neuromuscul. Dis.* 3 : 443—453.
- Michel L. Y., Hoenderop J. G., Bindels R. J. 2016. Calpain-3-mediated regulation of the Na⁺-Ca²⁺ exchanger isoform 3. *Pflugers Arch.* 468 : 243—255.
- Morissette M. P., Susser S. E., Stammers A. N., O'Hara K. A., Gardiner P. F., Sheppard P., Moffatt T. L., Duhamel T. A. 2014. Differential regulation of the fiber type-specific gene expression of the sarcoplasmic reticulum calcium-ATPase isoforms induced by exercise training. *J. Appl. Physiol.* 117 : 544—555.
- Nasledov G. A., Katina I. E., Zhitnikova Y. V. 2007. Changes in the functioning of the electromechanical connection during tetanic contraction. *Neurosci. Behav. Physiol.* 37 : 153—159.
- Nielsen J., Cheng A. J., Ortenblad N., Westerblad H. 2014. Subcellular distribution of glycogen and decreased tetanic Ca²⁺ in fatigued single intact mouse muscle fibres. *J. Physiol.* 592 : 2003—2012.
- Pfaffl M. W., Horgan G. W., Dempfle L. 2002. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res.* 30 : e36.
- Pfaffl M. W., Tichopad A., Prgomet C., Neuvians T. P. 2004. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper-Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnol. Lett.* 26 : 509—515.
- Prinz W. A. 2014. Bridging the gap: membrane contact sites in signaling, metabolism, and organelle dynamics. *J. Cell Biol.* 205 : 759—769.
- Rossi A. E., Boncompagni S., Dirksen R. T. 2009. Sarcoplasmic reticulum-mitochondrial symbiosis: bidirectional signaling in skeletal muscle. *Exerc. Sport. Sci. Rev.* 37 : 29—35.
- Schiaffino S., Reggiani C. 2010. Fiber types in mammalian skeletal muscles. *Physiol. Rev.* 91 : 1447—1531.
- Silver N., Best S., Jiang J., Thein S. L. 2006. Selection of housekeeping genes for gene expression studies in human reticulocytes using real-time PCR. *BMC Mol. Biol.* 7 : 33.
- Solesio M. E., Demirkhanyan L., Zakharian E., Pavlov E. V. 2016. Contribution of inorganic polyphosphate towards regulation of mitochondrial free calcium. *Biochim. biophys. acta.* 1860 : 1317—1325.
- Vandesompele J., De Preter K., Pattyn F., Poppe B., Van Roy N., De Paeppe A., Speleman F. 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* 3 (7) : research0034.1-research0034.11. PMID : 12184808.
- Witherspoon J. W., Meilleur K. G. 2016. Review of RyR1 pathway and associated pathomechanisms. *Acta Neuropathol. Commun.* 4 : 121.
- Xie F., Xiao P., Chen D., Xu L., Zhang B. 2012. miRDeepFinder: a miRNA analysis tool for deep sequencing of plant small RNAs. *Plant. Mol. Biol.* 80 : 75.
- Yu Z. B. 2013. Tetanic contraction induces enhancement of fatigability and sarcomeric damage in atrophic skeletal muscle and its underlying molecular mechanisms. *Zhongguo Ying Yong Sheng Li Xue Za Zhi.* 29 : 525—533.

Поступила 3 II 2017

ULTRASTRUCTURAL CHANGES AND MODULATION OF GENE EXPRESSION
IN THE CALCIUM REGULATION SYSTEM
OF RAT SKELETAL MUSCLES UNDER EXHAUSTIVE EXERCISE

E. A. Korf,¹ I. V. Kubasov,¹ M. S. Vonsky,² A. V. Novozhilov,¹
A. L. Runov,² E. V. Kurchakova,²
E. V. Matrosova,¹ T. V. Tavrovskaya,¹ N. V. Goncharov^{1, 3, *}

¹ I. M. Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry RAS, St. Petersburg, 194223;

² Institute of Cytology RAS, St. Petersburg, and ³ Research Institute of Hygiene, Occupational Pathology and Human Ecology, St. Petersburg, 188663;

* E-mail: ngoncharov@gmail.com

In the experiment with rats, a model of forced swimming was applied to trace a relation of the expression of genes responsible for the synthesis of essential proteins regulating the calcium ion balance with the ultrastructural characteristics of fast-twitch (m. extensor digitorum longus, EDL) and slow-twitch (m. soleus, SOL) skeletal muscles under prolonged exercises. A day after the end of the exercise, no significant changes in any of the five investigated genes were revealed in the SOL. A small number of excitation-contraction coupling (ECC) structures in the control and a slight increase in their amount after exercises was noted. Polymorphism and mitochondrial defects within SOL muscles indicate the importance of these structures in the regulation of calcium balance. In the EDL muscles adaptation mechanisms aimed mainly at pumping Ca²⁺ ions to the sarcoplasmic reticulum, where calsequestrin is the main calcium buffer. Expression of the *SERCA1* increased by an order, and that of the *CASQ1* increased by three times. Electron microscopy data indicate on the leading role of triads in the maintenance of calcium homeostasis in the EDL muscles, as well as a greater destruction of these musc-

les compared to SOL after exhausting exercises. The high level of triads and a possible activation of CICR (calcium-induced calcium release) mechanism in fast-twitch muscles could be the cause of their damage upon exhaustive exercises. Adaptation of the SOL muscles is associated with the development of the mitochondrial apparatus, while adaptation of the EDL muscles is caused by the calcium removal from the sarcoplasm with Ca-ATPase and retaining it in the sarcoplasmic reticulum by calsequestrin.

Key words: m. soleus, m. extensor digitorum longus, calcium, excitation-contraction coupling, exhaustive exercise.
