

ХАРАКТЕРИСТИКИ ИНДИВИДУАЛЬНЫХ СОКРАТИТЕЛЬНЫХ ОТВЕТОВ, СЛЕДУЮЩИХ В СОСТАВЕ ТЕТАНУСОВ В МЕДЛЕННЫХ СКЕЛЕТНЫХ МЫШЦАХ КРЫСЫ В УСЛОВИЯХ МОДУЛЯЦИИ ОСВОБОЖДЕНИЯ Ca^{2+} ИЗ САРКОПЛАЗМАТИЧЕСКОГО РЕТИКУЛУМА

Кубасов И.В., Арутюнян Р.С., Матросова Е.В.

Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН

пр. Тореза, 44, г. Санкт-Петербург, 194223, РФ

e-mail: elizaveta.matrosowa@yandex.ru

Аннотация. При прямой стимуляции *m. Soleus* пачками из 5, 10 и 50 стимулов с частотой 20 Гц в контроле ($n = 16$) наблюдалось двухфазное изменение амплитуды конечных сократительных ответов ($КСО_N$) в зависимости от N , где N - количество индивидуальных сократительных ответов в составе тетануса. Так, первоначальное снижение амплитуды $КСО_N$ сменялось последующим и существенным укорочением их полуспада по отношению к начальному ответу. При действии кофеина в концентрациях 5 мМ ($n = 6$) и 10 мМ ($n=4$), на фоне развития характерных стационарных контрактурных ответов наблюдалось усиление депрессии $КСО_5$. Время полуспада $КСО_{50}$ на фоне действия кофеина в обеих концентрациях по-прежнему оставалось значительно короче значений одиночных ответов, регистрируемых как на фоне действия кофеина, так и в контроле. В отличие от контроля и действия кофеина, амплитуда $КСО_5$ и $КСО_{10}$ на фоне 10 мкМ дантролена ($n=5$) сохранялась на уровне значений, близких к величине первого ответа, а $КСО_{50}$ демонстрировал значительно меньший рост, чем это наблюдалось в контрольных мышцах. Кроме того, действие дантролена вызывало дополнительное расслабление мышцы в покое. Кофеин (10 мМ) на фоне действия дантролена восстанавливал динамику изменения амплитудно-временных характеристик конечных сократительных ответов до значений, близких к контролю. Полученные данные могут быть интерпретированы в поддержку ранее выдвинутого предположения об участии " Ca^{2+} -вызванного освобождения Ca^{2+} " в качестве дополнительного механизма электромеханического сопряжения в скелетных мышцах в условиях их тетанической стимуляции [1, 2].

Ключевые слова: дантролен, кофеин, риадиноновые рецепторы, скелетные мышцы, Ca^{2+} -АТФаза саркоплазматического ретикулума, электромеханическое сопряжение

CHARACTERISTICS OF INDIVIDUAL CONTRACTILE RESPONSES WITHIN THE TETANUS IN RAT SLOW SKELETAL MUSCLES UNDER CONDITIONS OF MODULATION OF Ca^{2+} RELEASE FROM SARCOPLASMIC RETICULUM

Kubasov I.V., Aratyunyan R.S., Matrosova E.V.

Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry

of the Russian Academy of Sciences (IEPhB RAS)

pr. Torez, 44, Saint-Petersburg, 194223, Russia

e-mail: elizaveta.matrosowa@yandex.ru

Abstract. During direct stimulation of *m. Soleus* by train of 5, 10 and 50 stimuli with a frequency of 20 Hz in the control ($n=16$) was observed a biphasic change in the amplitude of the last contractile responses (LCR_N) depending on N , where N is number of individual contractile responses within the tetanus. Thus, an initial decrease of LCR_N amplitude was replaced by their subsequent growth associated with a significant shortening of the half-relaxation time. Caffeine at concentrations of 5 mM ($n=6$) and 10 mM ($n=4$), while preserving the overall two phase character of the responses exacerbated LCR_5 depression during the initial inhibitory phase. LCR_{50} half-relaxation time during the action of both caffeine concentrations remained still considerably shorter than the individual responses recorded either in the presence of caffeine or in control. In contrast to the control and caffeine effects, LCR_5 and LCR_{10} amplitude during the action of 10 мкМ of dantrolene ($n=5$) remained at the level close to the value of the first response, and LCR_{50} amplitude demonstrated a significantly smaller increase than was observed in the control muscle. Additionally, dantrolene enhanced muscle relaxation at rest. Caffeine (10 mM) restored the dynamics of changes of amplitude-time characteristics of the last contractile responses caused by dantrolene to values close to the control. These data can be interpreted to support the previously suggested theory about the participation of " Ca^{2+} -dependent Ca^{2+} release" as an additional mechanism of excitation-contraction coupling in skeletal muscle under conditions of tetanic stimulation [1, 2]. This work is supported by RSF №15-15-20008.

Keywords: dantrolene, caffeine, ryanodine receptors, skeletal muscles, Ca^{2+} -ATPase of the sarcoplasmic reticulum, excitation-contraction coupling.

Введение.

Считается, что в основе формирования одиночного сократительного ответа в скелетных мышцах лежит механизм деполяризацией-индуцируемого освобождения Ca^{2+} (" $depolarization-induced Ca^{2+}$ release", DICR) [3-5]. Однако важной, и до конца не решенной проблемой, является вопрос о том, насколько этот путь самодостаточен для обеспечения мышечной функции при работе в режиме тетануса. В этих условиях существенное значение могут играть достаточно большое количество дополнительных динамических факторов, не являющихся определяющими для одиночного сокращения. Таким образом, каждый последовательный ответ в составе тетануса зависит от условий, формируемых предыдущими элементарными ответами. Эти факторы могут

существенно различаться в мышечных волокнах функционально различных типов в зрелых мышцах млекопитающих [3]. Особый интерес представляет вопрос о возможности вовлечения, в дополнение к DICR, Ca^{2+} -индуцируемого освобождения Ca^{2+} (“ Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release”, CICR), так как есть основания полагать, что в определенных условиях (контрактура, тетанус, утомление, гипоксия, окислительный стресс, и др.) мышцы могут переходить к использованию этого механизма [1, 5].

В предыдущих исследованиях нами было показано, что в медленных мышцах в ходе их прямой электрической стимуляции с частотой 20 Гц по мере увеличения числа ответов в составе тетанусов (N) наблюдается двухфазное изменение амплитуды KCO_N , ведущее, в конечном итоге, к их значительному росту. В соответствии с этими и рядом других данных, нами было высказано предположение о том, что в основе наблюдаемого роста амплитуды KCO_N могут лежать механизмы, опосредованные подключением через CICR дополнительного пула рианодиновых рецепторов (РиР), не сопряженных непосредственно с дигидропиридиновыми рецепторами (ДГПР) [2]. С целью проверки данной гипотезы, в представленной работе нами был выполнен анализ параметров KCO_N , регистрируемых в контроле и на фоне модулирующего воздействия на РиР (и, следовательно, на уровень освобождения Ca^{2+}) медленных скелетных мышц крысы ряда фармакологических агентов.

Материалы и методы.

Исследования проводились на изолированных медленных мышцах (m. Soleus) крыс линии Вистар обоего пола весом 250-300 г. Животные содержались в стандартных условиях вивария. Все эксперименты выполнялись в соответствии с «Правилами проведения работ с подопытными животными», утвержденными комиссией по этике Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН. Анестезию осуществляли внутрибрюшинным введением нембутала (50 мг/кг). Изолированную мышцу помещали в термостатируемую экспериментальную камеру объемом 10 мл, заполненную раствором Рингера следующего состава (мМ): 137 NaCl, 5 KCl, 2 CaCl_2 , 2 MgCl_2 , 24 NaHCO_3 , 1 NaH_2PO_4 , 11 глюкоза, (pH 7.2-7.4). Температура раствора поддерживалась на уровне 25-26 °C. На протяжении всего времени проведения эксперимента раствор аэрировался карбогеном (95 % O_2 и 5 % CO_2). Прямое раздражение мышцы осуществлялось через пару хлорированных пластинчатых серебряных электродов, фиксированных на внутренних боковых поверхностях стенок камеры, стимулами длительностью 5 мс, формируемыми электронным стимулятором ЭСУ-2. Регистрация мышечных ответов осуществлялась в изометрическом режиме с помощью тензорезистора КТД 7Б, соединенного с входом усилителя. Выделение конечных сократительных ответов осуществлялось из состава тетанических ответов мышцы на пачки из 5, 10 и 50 стимулов с частотой 20 Гц. Как показано на рисунке 1, последовательно регистрировались одиночные сокращения и пары смежных тетанусов, вызываемых пачками стимулов, различающимися между собой на 1 стимул (N_{-1} и N).

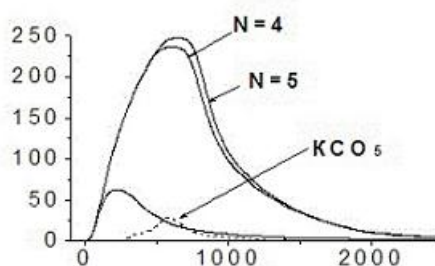


Рисунок 1 – Пример выделения конечного сократительного ответа. По оси абсцисс – время (мс), по оси ординат – сила сокращения (мН). Пунктирный трек - KCO_5 , выделенный из состава тетанического ответа на пачку из 5 стимулов с частотой 20 Гц. Сплошными треками представлены одиночное мышечное сокращение и смежные тетанические ответы (N) на 4 и 5 стимулов

После регистрации одиночных и тетанических ответов осуществлялось совмещение последних с началом первого стимула и графическое вычитание смежных пар тетанусов с составом N и N_{-1} . Выделенные таким образом сократительные ответы представляли собой отображение конечного сократительного ответа (KCO_N) в составе тетануса из N ответов. Далее сопоставлялись амплитудно-временные характеристики одиночного ответа, являющегося одновременно первым сократительным ответом в составе тетануса, и KCO_N , а именно, KCO_5 , KCO_{10} , KCO_{50} и KCO_{100} (см. рис. 2). При статистической обработке анализировались значения силы, длительности восходящей фазы (T_v) и полуспада (T_{nc}) одиночных и выделенных сократительных ответов.

Регистрация и анализ потенциалов действия индивидуальных мышечных волокон в составе m. Soleus осуществлялась в соответствии с ранее описанным методом [6]. Прямое раздражение мышцы осуществлялось в тех же условиях и диапазонах, что и при выполнении механографических исследований (одиночная стимуляция и пачки стимулов из 5, 10, 50 и 100 стимулов с частотой 20 Гц). Микропипетки были изготовлены из стекла C52 на установке МЭ-4. Кончик пипетки предварительно оплавлялся и его внутренний диаметр был равен 1-1.5 мкм. Соппротивление кончика пипетки, с физиологическим раствором, составляло 1,5-2 МΩ. Пипетка подводилась к мышечному волокну при помощи микроманипулятора ММ-33 (Sutter Instrument Company, США) под визуальным контролем микроскопа Carl Zeiss Jena (Германия). Запись данных, хранение и обработка производилась при

помощи АЦП NI USB-6211 (National Instruments) и программного пакета Clampfit и Origin 7.5. Представленные в тексте и на графиках данные приведены в виде средних значений величин с их ошибками.

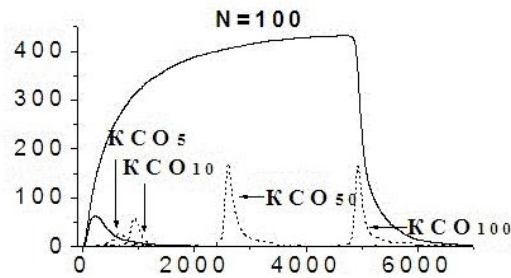


Рисунок 2 – Реконструированная динамика развития KCO_N в составе максимального тетануса ($N=100$). По оси абсцисс – время (мс), по оси ординат – сила сокращения (мН). Пунктирными треками и стрелками отмечены KCO_N , выделенные из состава тетанических ответов одной и той же мышцы на пачки из 5, 10, 50 и 100 стимулов с частотой 20 Гц. Сплошными треками представлены одиночное мышечное сокращение и тетанический ответ

Результаты и обсуждение.

При прямой стимуляции *m. Soleus* пачками стимулов ($N=5$, $N=10$ и $N=50$) с частотой 20 Гц наблюдается типичная картина двухфазного изменения амплитуды KCO_N . В ходе развития тетанического ответа на первоначальном этапе имеет место кратковременная депрессия амплитуд начальных элементарных ответов (KCO_5), сменяющаяся их ростом до значений, более чем вдвое превышающих одиночный сократительный ответ (для KCO_{50} – KCO_{100}). При этом сами тетанические ответы сохраняют непрерывную динамику роста (см. рис. 2). Таким образом, можно говорить о том, что тетанусы в *m. Soleus* не являются результатом простой суммации исходных ответов, регистрируемых при одиночной стимуляции.

В качестве основной гипотезы может выступать предположение о существовании в пределах саркомеров медленных скелетных мышечных волокон морфо-функциональных латеральных микродоменов, включающих зону локализации рианодиновых рецепторов и начальных участков актино-миозинового комплекса. Локальное накопление Ca^{2+} в таких микродоменах может вызывать переход начальных участков мышечных саркомеров в состояние частичной контрактуры. Суперпозиция одиночного сокращения и KCO_{50} демонстрирует развитие у последнего выраженного низкоамплитудного плато, на фоне которого формируется высокоамплитудный ответ, имеющий характерное смещение пика вправо по временной оси (см. рис.3, а). Кроме того, как показано на рисунке 3, б, рост KCO_{50} сопровождался существенным укорочением его $T_{пс}$, что в конечном выражении приводит к укорочению времени полуспада интегрального тетанического ответа. Формирование плато может объясняться взаимодействием Ca^{2+} с оставшейся частью свободных сайтов на тропонине С в этом микродомене. Иными словами, оно представляет собой остаточный сократительный ответ начальных участков миофибриллярного комплекса на освобождение Ca^{2+} из СР. Характеристики его восходящей фазы и спада практически совпадают с этими же параметрами одиночных сократительных ответов (см. рис.3, а), что дает основание полагать, что формирование одиночного сократительного ответа в *m. Soleus* происходит в зоне предполагаемых латеральных микродоменов.

Пиковые значения концентрации ионов Ca^{2+} в центральном участке саркомера для KCO_{50} практически вдвое превышает уровень Ca^{2+} в микродомене при вызове одиночного сократительного ответа.

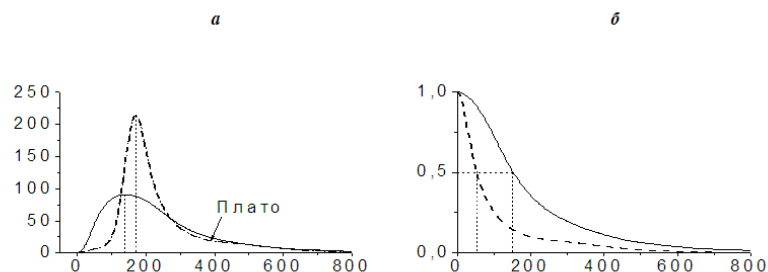


Рисунок 3 – Суперпозиция одиночного сокращения и KCO_{50} (а) и нисходящих фаз этих же ответов, нормализованных к 1 (б). Каждый трек представляет усредненный ответ по данным из 6 экспериментов. По оси абсцисс – время (мс), по оси ординат (а) – сила сокращения (мН). Сплошным и пунктирным треками представлены, соответственно, одиночное сокращение и KCO_{50} этой же мышцы и их фазы спадов. Пунктирными линиями обозначены проекции максимальных значений амплитуд и времени полуспадов

Предположительно, такой выраженный потенцирующий эффект может быть связан с активацией дополнительного пула «молчащих» рианодиновых рецепторов, не связанных напрямую с ДГПР. Существование такого пула подтверждается рядом данных, свидетельствующих о том, что в скелетных мышцах, в среднем, только 50 % RиP_1 осуществляет непосредственное взаимодействие с ДГПР [7]. При этом в медленных мышечных волокнах соотношение RиP_1 /ДГПР может быть значительно ниже, чем в быстрых [3].

Изменения амплитудно-временных характеристик КСO_N по всей выборке контрольных экспериментов представлены в таблице 1. Поскольку дальнейших достоверных изменений амплитудно-временных характеристик КСO_N при увеличении состава тетанусов до 100 ответов не наблюдалось, значения КСO_{100} в таблице не представлены.

Таблица 1 – Средние значения амплитудно-временных характеристик КСO_N , выделенных из состава соответствующих тетанических ответов *m. Soleus* ($n=16$) в контроле (в % к одиночному ответу)

| КСO_N | Амплитуда | T_b | $T_{\text{пс}}$ |
|-------------------|--------------|-------------|-----------------|
| КСO_5 | 54 ± 8 | 89 ± 12 | 65 ± 15 |
| КСO_{10} | 128 ± 11 | 81 ± 11 | 54 ± 13 |
| КСO_{50} | 218 ± 14 | 66 ± 14 | 44 ± 8 |

Влияние кофеина на КСO_N . При действии кофеина в концентрации 5 мМ, наблюдалось значительное увеличение амплитуды, T_b , и $T_{\text{пс}}$ одиночного сокращения. Амплитуда максимальных тетанических ответов также возрастала, но $T_{\text{пс}}$, в отличие от одиночных сокращений, достоверно не отличалось от контроля. При последующем воздействии на эти же препараты в течение 20 минут кофеина в концентрации 10 мМ наблюдалось значительное усиление стационарной мышечной контрактуры. На этом фоне сила одиночных ответов и тетанусов существенно снижалась, вплоть до полного их исчезновения в ряде экспериментов, так как при таких концентрациях запас Ca^{2+} в СР постепенно полностью истощается, что сопровождается развитием мощной контрактуры и депрессией одиночных и тетанических ответов. Действие 5 мМ кофеина переводит мышцу в состояние активации СІСР, сопровождаемой максимальным ростом амплитудно-временных характеристик одиночного ответа на фоне умеренного контрактурного ответа. При действии 10 мМ кофеина происходит дальнейшее усиление СІСР и развитие значительного контрактурного ответа, сопровождаемых ослаблением роста КСO_{50} (см. табл. 2). Эти данные подтверждают ожидаемое нами ограничение последующего развития СІСР в условиях его исходной активации.

Таблица 2 – Средние значения амплитудно-временных характеристик КСO_N на фоне действия кофеина (в % к одиночному ответу)

| КСO_N | Амплитуда | T_b | $T_{\text{пс}}$ |
|---------------------------|--------------|--------------|-----------------|
| Кофеин 5 мМ (n=6) | | | |
| КСO_5 | 31 ± 8 | 55 ± 8 | 31 ± 9 |
| КСO_{10} | 48 ± 11 | 45 ± 11 | 27 ± 7 |
| КСO_{50} | 114 ± 18 | 33 ± 10 | 22 ± 4 |
| Кофеин 10 мМ (n=4) | | | |
| КСO_5 | 15 ± 4 | 128 ± 11 | 56 ± 8 |
| КСO_{10} | 26 ± 7 | 125 ± 13 | 25 ± 6 |
| КСO_{50} | 46 ± 9 | 125 ± 14 | 21 ± 5 |

Влияние дантролена на КСO_N и его совместное действие с кофеином. В предварительной серии экспериментов нами была подобрана концентрация дантролена, вызывающая приблизительно двукратное снижение силы одиночного ответа (10 мкМ). Добавление в раствор, содержащий дантролен, кофеина в концентрации 10 мМ, вызывало рост амплитуды и $T_{\text{пс}}$ одиночных сократительных ответов, сопровождающихся двукратной депрессией КСO_5 и последующим значительным ростом выделенных ответов. Таким образом, в наших экспериментах дантролен вызывал не только снижение силы одиночных и тетанических ответов, но и приводил к существенному замедлению динамики развития КСO_N , а кофеин устранял эти изменения.

В условиях наших экспериментов такое двухфазное действие кофеина проявлялось при его концентрациях в омывающем растворе 5 и 10 мМ. Блокада части рианодиновых рецепторов 10 мкМ дантролена ведет к смещению роста КСO_N до максимума от $N=50$ (в интактных мышцах) до $N=100$ (дантролен). В контексте нашей гипотезы это может означать, что снижение уровня освобождения Ca^{2+} из СР тормозит активацию СІСР. То, что такое действие дантролена устраняется кофеином, служит дополнительным ее подтверждением.

Таким образом, полученные нами данные дают дополнительные основания полагать, что ДІСР не является основным или единственным механизмом в формировании тетанических ответов мышц медленного типа. Постепенное увеличение внутриклеточной концентрации в ходе частотной активации этих мышц ведет к усилению силы КСO_N . Поскольку такое потенцирование в значительной степени модифицируется агонистами и антагонистами RиP (кофеин, дантролен), регулируемыми освобождением Ca^{2+} из СР, высока вероятность того, что

в условиях тетанической активации медленных мышц происходит подключение механизма CICR, который обеспечивает почти двукратный рост силы конечных сократительных ответов в составе тетанусов. Факт усиления депрессии KCO_5 на фоне действия кофеина и ее ослабления на фоне действия дантролена достаточно хорошо согласуется с нашими представлениями о существовании в медленных мышечных волокнах морфофункциональных микродоменов, локализованных в начальных отделах саркомеров. Что касается укорочения спадов KCO_N , наблюдаемого нами как в контроле, так и на фоне действия кофеина и дантролена, то механизм(ы) этого явления пока остаются неясным.

Характеристики внеклеточно регистрируемых ПД одиночных мышечных волокон в условиях частотной стимуляции. На начальных этапах прямой стимуляции мышц (5 стимулов) достоверных изменений регистрируемых в конце пачки ПД не наблюдалось, тогда как сила KCO_5 демонстрировала свое более чем двукратное падение. По мере увеличения числа стимулов в составе пачек наблюдалась усиливающаяся депрессия амплитуд внеклеточных ПД без изменения их временных характеристик (T_v и T_{pc}), что, вероятно, связано с частичной инактивацией Na-каналов сарколеммы. В условиях одиночной стимуляции такая инактивация, как правило, ведет к снижению силы сократительных ответов. Однако, как показывает рост KCO_N при составе пачек 50 и 100 стимулов, это правило не действует. Таким образом, динамика развития внеклеточно регистрируемых ПД не коррелирует с динамикой формирования KCO_N . Соответственно, уровень освобождения Ca^{2+} регулируется, вероятнее всего, внутриклеточными факторами, которые могут иметь множественную природу.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФ №15-15-20008.

Список литературы / References:

1. Nasledov G.A., Katina I.E., Zhitnicova Yu.V. Changes in functioning of electromechanical connection during tetanic contraction. *Neurosci. Behav. Physiol.*, 2007, vol. 37 (2), pp. 153-159.
2. Кубасов И.В., Арутюнян Р.С., Матросова Е.В. Трансформация индивидуальных сократительных ответов, следующих в составе тетанусов в быстрых и медленных скелетных мышцах крысы. *Журн. эвол. биох. и физиол.*, 2015, т. 52, № 1, с. 42-50. [Kubasov I.V., Aratyunyan R.S., Matrosova E.V. Transformation of individual contractile responses within the tetanus in the fast and slow rat skeletal muscles. *Zhurnal evolyutsionnoj biohimii i fiziologii*, 2015, vol. 52, no. 1, pp. 42-50. (In Russ.)]
3. Schiaffino S., Reggiani C. Fiber types in mammalian skeletal muscles. *Physiol. Rev.*, 2010, vol. 91, pp. 1447-1531.
4. Lamb G.D. Excitation-contraction coupling in skeletal muscle: comparisons with cardiac muscle. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, 2000, vol. 27. pp. 216-224.
5. Endo M. Calcium-induced calcium release in skeletal muscle. *Physiol. Rev.*, 2009, vol. 80, pp. 1153-1176.
6. Кубасов И.В., Арутюнян Р.С., Добрецов М.Г., Матросова Е.В. Действие инсулина на сократительные и электрические ответы скелетных мышц крысы. *Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова.*, 2012, т. 99, № 10, с. 1200-1213. [Kubasov I.V., Aratyunyan R.S., Dobretsov M.G., Matrosova E.V. The effect of insulin on the contractile and electrical responses of rat skeletal muscle. *Rossijskij fiziologicheskij zhurnal im. I.M. Sechenova*, 2012, vol. 99, no. 10, pp. 1200-1213. (In Russ.)]
7. Bers D.M., Stiffel V.M. Ratio of ryanodine to dihydropyridine receptors in cardiac and skeletal muscle and implications for E-C coupling. *Am. J. Physiol.*, 1993, vol. 264, pp. 1587-1593.