

ОЦЕНКА СОКРАТИТЕЛЬНОЙ ФУНКЦИИ ДИАФРАГМАЛЬНОЙ МЫШЦЫ mSOD1 ТРАНСГЕННЫХ МЫШЕЙ С МОДЕЛЬЮ БОКОВОГО АМИОТРОФИЧЕСКОГО СКЛЕРОЗА

Л.Р. Нуриева^{1,2}, Р.Р. Исламов¹, П.Н. Григорьев¹, А.А. Ризванов²,
А.Л. Зефирова¹, М.А. Мухамедьяров¹

¹ Казанский государственный медицинский университет, Казань, Россия

² Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

Evaluation of contractile function of diaphragmatic muscle in mSOD1 transgenic mice with model of amyotrophic lateral sclerosis

L.R. Nurieva^{1,2}, R.R. Islamov¹, P.N. Grigoryev¹, A.A. Rizvanov², A.L. Zefirov¹, M.A. Mukhamedyarov¹

¹ Kazan State Medical University, Kazan, Russia

² Kazan (Volga region) Federal University, Kazan, Russia

Боковой амиотрофический склероз (БАС) — неизлечимое нейродегенеративное заболевание, характеризующееся прогрессирующей гибелью мотонейронов, развитием атрофий и параличей скелетных мышц. Главной непосредственной причиной смертности у пациентов с БАС является паралич дыхательной мускулатуры. В настоящей работе нами были исследованы сократительные характеристики диафрагмальной мышцы mSOD1 трансгенных мышей с моделью БАС до манифестации (3–4 мес.) и после развития симптомов заболевания (6–7 мес.). В миографических экспериментах с электрической стимуляцией мышцы было выявлено увеличение силы и длительности одиночного мышечного сокращения, силы суммированных мышечных сокращений (5–50 Гц) и массы диафрагмальной мышцы у mSOD1 симптомных мышей в сравнении с досимптомными и мышами дикого типа. Отсутствие изменений со стороны порога сокращения и кривой «сила-стимул» у mSOD1 симптомных мышей свидетельствует о том, что выявленные нарушения не связаны с изменением возбудимости мышечных волокон. Результаты исследования могут объясняться активацией компенсаторных механизмов в системе «мотонейрон — нервно-мышечный синапс — скелетная мышца» в ответ на развитие нейродегенеративного процесса. Полученные сведения расширяют современные представления о патогенезе бокового амиотрофического склероза и могут быть использованы для оценки скорости прогрессирования болезни у mSOD трансгенных животных.

Ключевые слова: боковой амиотрофический склероз, mSOD1 трансгенные мыши, диафрагма, одиночное мышечное сокращение, тетаническое сокращение.

Боковой амиотрофический склероз (БАС) — неизлечимое фатальное нейродегенеративное заболевание, характеризующееся прогрессирующей гибелью верхних и нижних мотонейронов, развитием атрофий и параличей скелетных мышц. Одним из проявлений болезни является развитие дыхательной недостаточности вследствие парезов и параличей дыхательных мышц; у пациентов наблюдается парадоксальное дыхание (на вдохе живот западает, на выдохе выпячивается), происходит снижение жизненной емкости легких и учащение дыхания. Дыхательная недостаточность вследствие паралича дыхательной мускулатуры является главной непосредственной причиной смертности у пациентов с БАС [1], при этом основное значение в ее развитии имеет патология нижнего мотонейрона.

Существуют «нисходящая» и «восходящая» гипотезы патогенеза БАС — в зависимости от того, какие структуры в цепочке «верхний мотонейрон — нижний мотонейрон — скелетная мышца» поражаются в пер-

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) — incurable neurodegenerative disease, which is characterized by progressive loss of motoneurons, atrophy and paralysis of skeletal muscles. The main immediate cause of death in ALS patients is a paralysis of the respiratory muscles. In the present study we investigated the contractile characteristics of diaphragm muscle of mSOD1 transgenic mice with ALS model at presymptomatic (3–4 MO) and symptomatic (6–7 MO) stages of the disease. In myographic experiments under electrical stimulation of muscle we showed an increase in force and duration of a single muscle contraction, force of summed muscle contractions (5–50 Hz), diaphragmatic muscle mass at mSOD1 symptomatic mice compared to presymptomatic and wild-type mice. The absence of changes in the contraction threshold and «force-stimulus» curve at symptomatic mSOD1 mice suggests that found differences are not related to changes in the excitability of muscle fibers. Results of the study may be explained in terms of activation of compensatory mechanisms in the «motoneuron — neuromuscular synapse — skeletal muscle» in response to the development of neurodegenerative process. Presented findings extend current understanding of the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis and can be used to estimate the rate of progression of the disease in mSOD transgenic animals.

Key words: amyotrophic lateral sclerosis, mSOD1 transgenic mice, diaphragm, single muscle contraction, tetanic contraction.

вую очередь [2]. Согласно «восходящей» гипотезе, патологический процесс начинается в скелетной мышце (или нервно-мышечном синапсе) [3], что приводит к запуску дегенерации нижнего, а затем верхнего мотонейрона [4]. Вместе с тем, в настоящее время имеется недостаточно сведений о функциональном состоянии скелетных мышц при БАС в ходе развития болезни, что ограничивает наши представления о патогенезе заболевания.

В настоящей работе нами были исследованы сократительные характеристики диафрагмальной мышцы mSOD1 трансгенных мышей с моделью БАС на симптомной и досимптомной стадиях болезни.

Материал и методы

Экспериментальные животные

В качестве модели БАС использовались трансгенные мыши генотипа B6SJL-Tg(SOD1-G93A) dl1Gur/J (далее — mSOD1 мыши), экспрессирующие

мутантный человеческий ген, кодирующий цитозольный фермент Cu/Zn-супероксиддисмутаза SOD1 (Gly93 замещен на аланин в позиции 93). Этот ген ответственен за 15–20% семейных случаев БАС [5]. mSOD1 мыши становятся парализованными на одну или более конечностей, начиная с 6–7-месячного возраста, при этом продолжительность их жизни с момента появления симптомов составляет около двух месяцев. Линия была закуплена в Jackson Laboratory (США) и содержалась в питомнике лабораторных животных «Пушино» (Пушино, Московская область). Для проведения экспериментов были использованы три группы животных: 1) mSOD1 мыши на «досимптомной стадии» болезни (возраст 3–4 мес.), далее – mSOD1-PREsymp мыши ($n = 6$); 2) mSOD1 мыши с манифестировавшей стадией заболевания (возраст 6–5 мес.), далее – mSOD1-SYMP мыши ($n = 7$); 3) мыши дикого типа (возраст 3–4 мес.), далее – WT мыши ($n = 8$). Наличие симптомов определялось путем визуального наблюдения и методов подвешивания за хвост согласно рекомендациям Jackson Laboratories. Исследование одобрено локальным этическим комитетом Казанского государственного медицинского университета.

Миография

Эксперименты проводились на изолированных диафрагмальных мышцах мышей при помощи стандартной миографической методики на 4-канальной установке BIOPAC MP150 (США). Животных подвергали общей анестезии, перерезали сонные артерии, а затем выделяли мышцу. В процессе эксперимента мышцу перфузировали раствором следующего состава: NaCl 125 mM; KCl 2,5 mM; CaCl₂ 2 mM; NaH₂PO₄ 1 mM; MgCl₂ 1 mM; глюкоза 11 mM; pH раствора поддерживали на уровне 7,3. Диафрагмальную мышцу делили на 4 сектора, затем секторы диафрагмы одним концом фиксировали на держателе, а другим к тензометрическому датчику, помещали в резервуар с перфузионным раствором объемом 20 мл и стимулировали через платиновые электроды супрамаксимальными электрическими стимулами длительностью 2 мс с частотой 0,1 Гц. Мышце придавали оптимальное натяжение (при котором сила сокращения максимальна), затем следовал период приработки (60 мин), после чего начинали регистрацию сократительных ответов.

Регистрация и анализ данных

Сократительные ответы регистрировали на компьютере при помощи программы IcqKnowledge 4.0. Для дальнейшего анализа применяли оригинальную компьютерную программу Eiph (разработчик – к.б.н. А.В. Захаров). В каждом эксперименте определяли абсолютную и относительную силу одиночного мышечного сокращения (стимуляция с частотой 0,1 имп/с) и тетанических сокращений (40 стимулов с частотой 5, 10, 20, 30, 40, 50 имп./с), зависимость силы сокращения мышцы от силы стимула (кривая «сила-стимул»), порог сокращения, массу мышцы. Амплитуда стимула представлена в виде задаваемых на стимуляторе значений в вольтгах. Относительная сила сокращения вычислялась путем деления абсолютной силы (г) на массу мышечной полоски (г). Результаты представлены в виде среднего значения и стандартной ошибки среднего значения, статистическая значимость различий оценивалась

при помощи *t*-критерия Стьюдента, при этом отличия считались достоверными при $p < 0.05$.

Результаты

У WT мышей абсолютная и относительная силы одиночного мышечного сокращения составили $0,484 \pm 0,072$ г и $65,10 \pm 12,68$, длительность фаз укорочения, расслабления и общее время сокращения $0,038 \pm 0,001$, $0,049 \pm 0,001$ и $0,087 \pm 0,003$ с, соответственно (рис. 1А). Электрический порог сокращения составил $2,44 \pm 0,18$ В, масса мышечной полоски $8,23 \pm 0,74$ мг. Кривая «сила-стимул» имела характерную S-образную форму (рис. 1В). При высокочастотной стимуляции наблюдалась суммация сократительных ответов и рост амплитуды сокращения, амплитуда тетануса зависела от частоты стимуляции (рис. 1Б, Г). При стимуляции с частотой 50 имп./с абсолютная и относительная силы сокращения составили $2,047 \pm 0,454$ г и $280,24 \pm 73,73$, соответственно.

У мышей группы ALS-PREsymp не наблюдалось достоверных отличий силы и временных параметров одиночного мышечного сокращения, порога сокращения, амплитуды тетанических сокращений от группы WT (табл. 1, рис. 1). Масса мышечной полоски составила $6,4 \pm 0,8$, что достоверно не отличается от WT мышей. Достоверные отличия были выявлены лишь в нескольких значениях силы сокращения в начальной части кривой «сила-стимул» (рис. 1В), что может свидетельствовать о некотором снижении возбудимости мышцы в группе ALS-PREsymp в сравнении с группой WT.

У мышей ALS-SYMP наблюдался ряд выраженных отличий параметров сократимости от остальных групп мышей (табл., рис. 1). Абсолютная сила одиночного мышечного сокращения составила $1,094 \pm 0,195$ г, что достоверно больше, чем в группах WT и ALS-PREsymp; относительная сила одиночного сокращения также была выше, однако недостоверно. Наблюдалось возрастание длительности фазы расслабления и общего времени одиночного мышечного сокращения. Наконец, у мышей ALS-SYMP сила тетанических сокращений была значительно больше в сравнении с группами WT и ALS-SYMP, при этом были выявлены достоверные различия только для абсолютной силы (рис. 1Г). Очевидно, менее выраженные различия в относительной силе сокращений между группами связаны с большей средней массой мышечной полоски в группе ALS-SYMP ($9,9 \pm 0,9$ мг, достоверно больше в сравнении с группой ALS-PREsymp).

Обсуждение

Поскольку мышечная слабость является главной причиной инвалидизации и смерти пациентов с БАС, важной задачей является понимать, как болезнь влияет на функцию скелетных мышц. Дисфункция скелетных мышц может быть связана не только с атрофией и денервационными изменениями, но и с рядом других факторов: нарушением нервно-мышечной передачи, нарушением кальциевой сигнализации, электромеханического сопряжения и т.д. При этом до сих пор остается неясно, что является первичным в патогенезе БАС – патология мотонейронов или дегенерация самой мышцы и нервно-мышечного синапса?

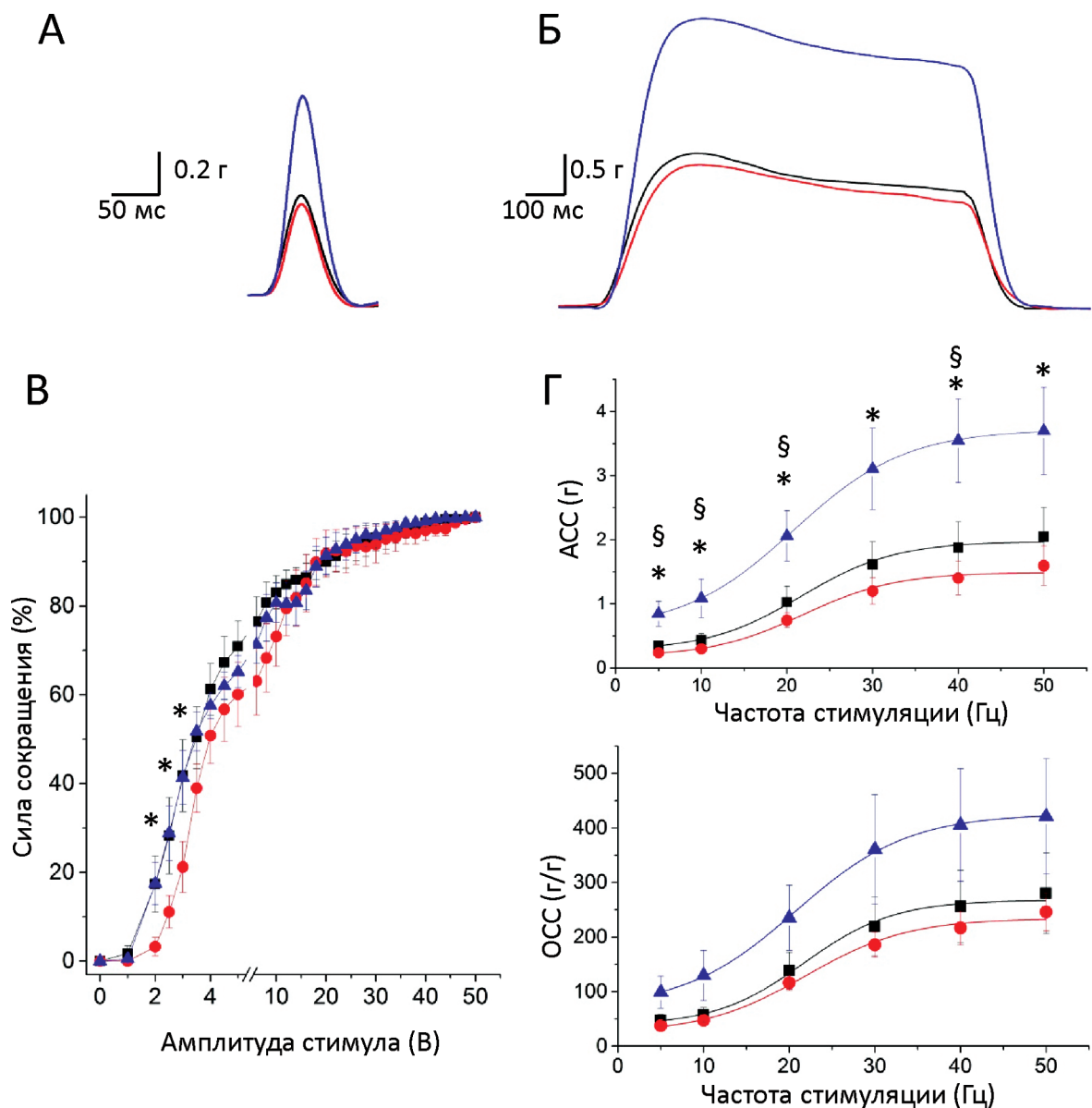


Рис. 1. Сократительные характеристики диафрагмы у *mSOD1* мышей: А – механограмма одиночного мышечного сокращения; Б – механограмма тетанического мышечного сокращения (40 Гц); В – кривая «сила-стимул»; Г – зависимость абсолютной (верхний график) и относительной (нижний график) силы тетанического сокращения мышцы от частоты стимуляции. WT мыши – черный, ALS-PREsymp – красный, ALS-SYMP – синий. ACC – абсолютная сила сокращения, OCC – относительная сила сокращения.

* – различия при сравнении ALS-SYMP и ALS-PREsymp статистически значимы при $p < 0,05$;

§ – различия при сравнении ALS-SYMP и WT мышей статистически значимы при $p < 0,05$ показаны

Параметры одиночных мышечных сокращений диафрагмы *mSOD1* мышей

Исследованные параметры	Группы мышей		
	WT	ALS-PREsymp	ALS-SYMP
АС ОМС (г)	0,484±0,072*	0,315±0,065*	1,094±0,195
ОС ОМС (г/г)	65,1±12,68	49,36±8,87	125,06±31,92
Фаза укорочения ОМС (мс)	0,038±0,001	0,037±0,001	0,041±0,001
Фаза расслабления ОМС (мс)	0,049±0,001*	0,049±0,001	0,057±0,004
Общее время ОМС (мс)	0,087±0,003	0,086±0,002*	0,099±0,005
Порог сокращения (В)	2,44±0,18	2,5±0,18	2±0,22

ОМС – одиночное мышечное сокращение; АС – абсолютная сила; ОС – относительная сила; * – различия при сравнении с группой ALS-SYMP статистически значимы при $p < 0,05$.

В нашей работе мы выявили дисфункцию диафрагмальной мышцы на симптомной стадии болезни у mSOD1 мышей, при этом были получены, казалось бы, парадоксальные результаты – выявлено увеличение силы одиночных и суммированных мышечных сокращений. Однако, следует учесть, что диафрагма вовлекается в патологический процесс в последнюю очередь, следовательно, при наличии симптомов параличей и парезов в конечностях функция диафрагмы может быть сохранена. Кроме того, было установлено достоверное увеличение массы мышечной полоски диафрагмы у ALS-SYMP мышей, что может отчасти объяснить увеличение абсолютной (но не относительной) силы сокращения мышцы. Мы не можем ответить на вопрос, с чем связано увеличение мышечной массы диафрагмы, однако есть сведения об увеличении поперечной площади сечения мышечных волокон у пациентов с медленным прогрессированием БАС [6]. Отсутствие изменений со стороны порога сокращения и кривой «сила-стимул» свидетельствует о том, что увеличение сократительных ответов диафрагмы не связано с изменением возбудимости мышечных волокон.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Hardiman O. Management of respiratory symptoms in ALS. *J. Neurol.* 2011; 258: 359-65.
2. Kiernan M.C., Vucic S., Cheah B.C. et al. Amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet* 2011; 377: 942-55.
3. Dupuis L., Loeffler J.P. Neuromuscular junction destruction during amyotrophic lateral sclerosis: insights from transgenic models. *Curr. Opin. Pharmacol.* 2009; 9: 341-6.
4. Dadon-Nachum M., Melamed E., Offen D. The «dying-back» phenomenon of motor neurons in ALS. *J. Mol. Neurosci.* 2011; 43: 470-7.

Усиление сократительных свойств диафрагмы у mSOD1 мышей может объясняться активацией в ответ на развитие нейродегенеративного процесса компенсаторных механизмов, таких как модуляция нейротрофического контроля мышцы, изменение сократительных свойств мышечных волокон, гипертрофия мышечных волокон, изменения процессов внутриклеточной кальциевой сигнализации и др. [7].

Полученные сведения расширяют наши представления о патогенезе бокового амиотрофического склероза и могут быть использованы для оценки скорости прогрессирования болезни у mSOD трансгенных животных.

Благодарности

Работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда № 14-15-00847. Авторы выражают благодарность кандидату биологических наук Андрею Захарову за помощь в анализе экспериментальных данных.

5. Rosen D.R., Siddique T., Patterson D. et al. Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* 1993; 362: 59-62.

6. Krivickas L.S., Yang J.I., Kim S.K. et al. Skeletal muscle fiber function and rate of disease progression in amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle Nerve* 2002; 26: 636-43.

7. Johnson R.A., Mitchell G.S. Common mechanisms of compensatory respiratory plasticity in spinal neurological disorders. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 2013; 189: 419-28.

Поступила: 20.08.2014