

DOI: 10.1134/S0869813918120099

ПРЕДОТВРАЩЕНИЕ АТРОФИИ ТЕНОТОМИРОВАННОЙ КАМБАЛОВИДНОЙ МЫШЦЫ КРОЛИКА ПРИ ДЕНЕРВАЦИИ. НЕЙРОТРОФИЧЕСКОЕ ВЛИЯНИЕ

© О. В. Туртикова,¹ Э. Г. Алтаева,¹ К. А. Шарло,¹
А. А. Еремеев,² Н. Ф. Ахметов,² М. Э. Балтин,²
Т. В. Балтина,² Б. С. Шенкман¹

¹ Институт медико-биологических проблем РАН, Москва, Россия
E-mail: olga_tur@list.ru

² Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

В 30—40-х гг. XX в. Р. Лейбсон и А. Г. Гинецинским с коллегами были проведены эксперименты на кроликах, в которых показано, что изменения при тенотомии камбаловидной мышцы полностью элиминируются, если одновременно производится перерезка седалищного нерва. Авторы сделали вывод, что атрофия от бездеятельности является активным процессом и развивается при участии сигналов, проводимых по передним корешкам соматического нерва. Целью настоящего исследования было подтверждение описанного выше феномена и исследование предполагаемых нейротрофических механизмов.

Эксперимент был проведен на кроликах калифорнийской породы в возрасте двух месяцев. Денервация устраняла морфологические признаки атрофии и дегенерации тенотомированной *m. soleus* кролика на 11-й день воздействия, предотвращала гибель и деградацию мышечных волокон, а также рост соединительной ткани. Колхицин при тенотомии действовал аналогично денервации (10 мМ раствор наносили на седалищный нерв на 10 мин), но дегенеративные изменения оставались более выраженными. Денервация или применение колхицина при тенотомии предотвращала снижение площади поперечного сечения быстрых волокон, поддерживая ее на уровне интактного контроля.

Денервацией или применением колхицина в *m. soleus* предотвращался вызванный тенотомией рост экспрессии рецепторов к нейротрофическим факторам (TrkB, TrkC) и изменялась экспрессия некоторых нейротрофинов. При денервации на фоне тенотомии мРНК TrkB снижалась в 3.4 раза ($p < 0.05$), TrkC — в 3.2 раза ($p < 0.01$) по сравнению с тенотомированной контралатеральной конечностью, при применении колхицина — в 3.6 ($p < 0.01$) и 2.9 ($p < 0.05$) раза соответственно.

Ключевые слова: атрофия мышц от бездеятельности, тенотомия, денервация, нейротрофины, колхицин.

Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова. Т. 104. № 12. С. 1489—1502. 2018

O. V. Turtikova,¹ E. G. Altaeva,¹ K. A. Sharlo,¹ A. A. Ereemeev,² N. F. Ahmetov,² M. E. Baltin,² T. V. Baltina,² B. S. Shenkman.¹ PREVENTION OF RABBIT TENOTOMIZED SOLEUS MUS-

In the 1930—1940s R. G. Leibson and A. G. Ginetsinsky with colleagues carried out the experiments where it was shown that the changes in tenotomized rabbit soleus muscle are completely eliminated if the nerve is cut at the same time. The authors concluded that atrophy from inactivity is not a passive process, but it is an active result of neural influences which are carried out by the ventral roots of sciatic nerve. The nature of these influences has not been studied and nervous control is not clear.

The present study was carried out on 2-month old Californian rabbits to confirm the described phenomenon and to investigate the assumed neurotrophic mechanisms. The morphological signs of atrophy and degeneration of tenotomized rabbit muscles, muscle fiber death and growth of connective tissue were eliminated on day 11 of exposure by simultaneous Achilles tenotomy. The effect of colchicine application on the tenotomized muscle was almost the same as denervation (10 mM solution was applied at the sciatic nerve for 10 min), but in the case of colchicine the degenerative changes were more pronounced. Denervation of the tenotomized muscle or colchicine application maintained the fast fiber cross-sectional area at the level of intact control.

Sciatic nerve denervation or colchicine application prevented the rise in soleus muscle TrkB and TrkC expression and altered some neurotrophin expression. Denervation with tenotomy decreased TrkB mRNA expression by 3.4 times ($p < 0.05$), TrkC — by 3.2 times ($p < 0.05$), NT3-by 3.4 times ($p < 0.05$) compared with the tenotomized contralateral limb, colchicine with tenotomy — by 3.6 and 2.9 times respectively ($p < 0.05$).

Key words: skeletal muscle disuse atrophy, tenotomy, denervation, neurotrophic factors, m. soleus, colchicine.

RUSSIAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY. V. 104. N 12. P. 1489—1502. 2018

В последние годы интенсивно изучаются механизмы мышечной атрофии от бездействия [14], в основном применительно к исследованию внутриклеточных сигнальных систем и ростовых факторов. В то же время недостаточно внимания уделяется нервным механизмам, запускающим развитие атрофических изменений. В связи с этим наше внимание привлекли работы советских классиков нервно-мышечной физиологии 40-х гг. XX в. А. Г. Гинецинского и его коллег, в которых были выявлены признаки прямой нейрогенной стимуляции атрофических процессов и которые практически не цитируются [2]. Нам представляется важным и интересным дополнить эти исследования с помощью методов современной физиологии.

В 1945 г. была опубликована статья, в которой сообщалось об открытии прямого действия спинальных двигательных центров на развитие атрофии при тенотомии мышц голени у кролика [2]. Авторы попытались дополнить существующие представления об атрофии от бездействия как о пассивном процессе, вызывающем уменьшение массы мышечного волокна. Атрофия вызывалась перерезкой ахиллова сухожилия в комбинации с различными способами нарушения нервной регуляции.

Мышца, подвергнутая тенотомии, осложненной денервацией, на протяжении первых 10 дней атрофировалась в значительно меньшей степени, чем мышца противоположной стороны, у которой было просто перерезано сухожилие. Если бы атрофия при тенотомии была пассивным процессом, то добавление денервации, фактора, самого по себе вызывающего атрофию, должно было бы ускорить потерю в весе, вызываемую тенотомией. Сама по себе денервация давала потерю в весе около 18 %, также и денервация вместе с тенотомией, т. е. на денервированной мышце атрофия от бездеятельности вовсе не развивалась.

Для более полного заключения об активной зависимости атрофии от бездеятельности от нервных влияний авторы исследовали параметры, на которые денервация и атрофия влияют в противоположных направлениях: активность мышечной холинэстеразы (ХЭ) и содержание миоглобина. Р. А. Лейбсон [4, 5] изучила активность ХЭ в *m. soleus* при различных формах атрофии. При денервации активность ХЭ на 11-й день была в пределах нормы, а при тенотомии почти в 3 раза превышала норму. Мышца, на которую тенотомия оказала влияние, на 11-й день должна была обнаружить повышенную активность ХЭ. Однако активность ХЭ в тенотомированной денервированной мышце не отличалась от нормы. При денервации возрастало содержание миоглобина в *m. soleus*, при тенотомии оно уменьшалось, а при денервации с тенотомией возрастало, как при чистой денервации. Эти две серии опытов однозначно доказали, что тенотомия не оказывает никакого влияния в условиях денервации.

Наконец, на *m. soleus* кошки поставили опыты, в которых тенотомия комбинировалась с экстирпацией брюшной цепочки симпатического нерва, с перерезкой задних корешков или одновременно передних и задних корешков в спинно-мозговом канале. Исследования показали, что феномен задержки атрофии при тенотомии после денервации не связан ни с симпатическими волокнами, ни с волокнами заднекорешковыми, а связан, очевидно, с функцией передних корешков спинного мозга [2]. При любом из методов оценки оказывалось, что те изменения, которые вносит перерезка сухожилия, полностью элиминируются, если одновременно с тенотомией производится перерезка нерва. Отсюда авторы заключили, что атрофия при тенотомии не пассивна, не является следствием выпадения каких-либо условий, а требует для своего развития активных влияний, осуществляемых через передние корешки соматического нерва. Природа этих влияний до сих пор не изучена и неясно, с какими отделами мозга они связаны.

При тенотомии мышцы ее электрическая активность, по-видимому, полностью или частично сохранена, хотя литература на эту тему противоречива [15, 19, 26, 32]. Однако помимо нейромоторного контроля нервная система контролирует скелетные мышцы посредством нейротрофических механизмов с помощью высвобождения растворимых факторов из нервных окончаний в нервномышечных синапсах. Е. М. Волков, используя метод блокады аксоплазматического транспорта колхицином, установил, что работа активных ионных насосов, селективная ионная проводимость, распределение на поверхностной мембране никотиновых холинорецепторов и потенциал-чувствительных натриевых ионных каналов и их функции находятся под нейротрофическим контролем двигательного отдела соматической нервной системы [1]. Считается, что общие эффекты нейротрофического контроля мышц — это дифференцировка и поддержание дифференцированного состояния мышечных волокон [1, 6].

О влиянии нейротрофинов на метаболизм скелетных мышц в настоящее время известно немного. Однако имеются экспериментальные свидетельства того, что нейротрофический фактор мозга (BDNF) оказывает стимулирующее действие на утилизацию жирных кислот в мышечных волокнах, причем это действие BDNF опосредовано повышением уровня фосфорилирования АМФ-активируемой протеинкиназы (АМПК) [27]. В то же время известно, что АМПК демонстрирует ингибирующую активность по отношению к ключевой системе регуляции анаболических процессов mTOR [10, 20]. Активность фосфорилирования АМПК при гипогравитационной атрофии максимальна на

План эксперимента и состав экспериментальных групп

Группа	Левая лапа	Правая лапа	Количество	Воздействие
К	Контроль	Контроль	4	—
К-Т	»	Тенотомия	4	Перерезка ахиллова сухожилия
К-Д	»	Денервация	4	Перерезка седалищного нерва выше места бифуркации
Т-ТД	Тенотомия	Тенотомия + денервация	4	Перерезка ахиллова сухожилия + перерезка седалищного нерва
Т-ТКлх	»	Тенотомия + колхицин	4	Перерезка ахиллова сухожилия + наложение на седалищный нерв ватного тампона, смоченного в 10 мМ колхицине на 10 мин
К-Клх	Контроль	Контроль + колхицин	1	Нанесение 10 мМ колхицина на 10 мин

14-е сутки [28], поэтому мы предполагаем, что нейротрофины, в частности BDNF, могут стимулировать атрофию примерно на этих сроках.

Наша гипотеза состоит в том, что в условиях функциональной разгрузки при наличии электрической активности мышцы усиливается секреция нейротрофинов нервными терминалями и их рецепция мышечными волокнами, а этот процесс может привести к супрессии анаболических путей и интенсификации атрофических процессов.

Целью настоящего исследования было подтверждение факта предотвращения атрофии тенотомированной мышцы кролика при денервации (феномена Лейбсон—Гинецинского) и попытка исследования нейротрофических механизмов этого явления.

В задачи работы входило: 1) повторить эксперимент А. Г. Гинецинского на кроликах; показать факт предотвращения атрофии камбаловидной мышцы кролика при денервации на фоне тенотомии; 2) оценить развитие атрофии тенотомированной *m. soleus* на фоне блокирования аксонного транспорта в седалищном нерве цитостатиком колхицином; 3) определить уровень экспрессии в *m. soleus* генов рецепторов нейротрофинов TrkC и TrkB и самих нейротрофинов BDNF и NT-3, NT4.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперимент был проведен на кроликах калифорнийской породы в возрасте двух месяцев и представлял собой повторение эксперимента А. Г. Гинецинского с введением дополнительной группы с колхицином (см. таблицу). Исследование проводилось в соответствии с рекомендациями локального этического комитета Казанского федерального университета.

ОПЕРАЦИИ НА ЖИВОТНЫХ

1. Денервация. Животное фиксировали на операционном столе спиной вверх. Операцию проводили в асептических условиях под общим изофлуранным наркозом. Седалищный нерв перерезали в средней трети бедра выше места бифуркации, затем рану послойно зашивали;

2. Перерезка ахиллова сухожилия (тенотомия). Под общим наркозом в асептических условиях выделяли ахиллово сухожилие в месте прикрепления к стопе и иссекали его фрагмент длиной 2—3 мм, после чего рану зашивали;

3. Блокада быстрого аксонного транспорта аппликацией колхицина на седалищный нерв.

Для того чтобы заблокировать аксотранспорт, сохранив при этом электрическую проводимость, на седалищный нерв накладывали колхицин. Под общим наркозом в асептических условиях, стараясь максимально сохранять целостность мышц, обнажали участок седалищного нерва в средней трети бедра, затем на нерв накладывали ватный тампон, пропитанный 10 мМ колхицином в физрастворе на 10 мин, избегая попадания колхицина на окружающие ткани (нерв изолировали стерильным кусочком резины).

Перед декапитированием у животных группы Т-ТКлх и кроликов К-Клх регистрировали ЭМГ активность *m. soleus* с целью проверить наличие проводимости седалищного нерва после наложения колхицина. Стимуляция с использованием биполярных игольчатых электродов осуществлялась одиночными прямоугольными импульсами длительностью 0.5 мс с частотой 1 стимул в 30 с с силой стимулов от 0.1 до 20 В. Для нанесения стимула, усиления и регистрации ответов использовалась экспериментальная установка на базе А-М Systems и DataWave. Определяли максимальные амплитуды и порог возникновения Н- и М-ответов [7, 8, 21]. Электромиография подтвердила, что колхицин не вызывал химической денервации и проводимость нерва была сохранена при существенном снижении амплитуды М- и Н-ответов.

Декапитирование животных проводилось на 11-е сутки. Камбаловидные мышцы немедленно выделяли, взвешивали и замораживали в жидком азоте.

ИССЛЕДОВАНИЯ МЫШЦ

Морфологические исследования. Скелетные мышцы были выделены и взвешены, в том числе определяли сухую массу для определения степени атрофии. Для определения гистологической структуры мышечной ткани проводили окрашивание гематоксилин-эозином по стандартной методике: гематоксилин — 5 мин, промывка в дистиллированной воде, эозин-30 с, использовались реактивы фирмы Sigma. После просветления в Ultra Clear срезы заключали в синтетическую среду для заключения Ultra Kitt.

Площадь поперечного сечения волокон и соотношения изоформ тяжелых цепей миозина определяли методом иммуногистохимии. С помощью криомикротомы делали поперечные срезы замороженной мышцы толщиной 10 мкм. Срезы инкубировали с антителами против тяжелых цепей миозина быстрого или медленного типов МНС I и МНС II Sigma (1 : 400 в PBS) во влажной камере при 37 °С в течение часа. Затем антитела отмывали в PBS 3×5 мин. Инкубацию со вторичными антителами, конъюгированными с Alexa Fluor 488, Thermo Fisher Scientific (1 : 400 в PBS) проводили в течение 40 мин при комнатной температуре. После отмывки вторичных антител срезы заключали в среду, стабилизирующую флуоресцентную метку Vector Labs. Изображения фиксировали с помощью флуоресцентного микроскопа Leica Q500MC с встроенной цифровой фотокамерой, увеличение ×20. Анализ изображений проводили с помощью программы Image J. Измеряли площадь поперечного сечения по крайней мере 250 волокон. Подсчитывали число волокон медленного и быстрого типов.

Контрольной к оперированной конечности являлась конечность противоположной стороны. Данные представлены в виде среднего значения \pm стандартная ошибка среднего.

Анализ экспрессии генов. Анализ уровня экспрессии м-РНК (ПЦР) нейротрофинов NT-3, NT4, BDNF и рецепторов к ним TrkC и TrkB был проведен методом ПЦР в реальном времени, совмещенной с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР). Тотальная РНК была экстрагирована из 10 мг замороженной *m. soleus* при помощи RNeasy Micro Kit (QIAGEN, Германия). Все образцы были обработаны протеиназой К и ДНКазой I. Концентрация РНК была определена спектрофотометрически. Для обратной транскрипции использовали водный раствор 1 мкг РНК, олиго(dT)₁₅, случайные гексануклеотиды d(N)₆, обратную транскриптазу MMLV («Синтол», Россия). Обратную транскрипцию проводили при 37 °С в течение 60 мин согласно стандартному протоколу. Полученные образцы кДНК были помещены на хранение при –84 °С для проведения ПЦР в реальном времени. Праймеры были сконструированы с помощью программного обеспечения Lasergene (DNASTAR) и PrimerBlast (PubMed). TrkB-F — GGATAACCCACCCACATGA; TrkB-R—CCCAATATCATTCGCTGCA; TrkC-F—CCAGTGTGACCTTCCTGAGA; TrkC-R—CCAGCGTCAAGTTAATGGC; NT3-F—AAACGAGATGCAAAGAGGCC; NT3-R—TTTCTCGACAAGGCACACAC; BDNF-F—GGTGACAGCGGCAGACAAAAGAGC; BDNF-R—TAAGGGCCCGCATACGACTG; NT4-F—CAGCTGTGGGAGGAGTGATG; NT4-R—CACTGTGAATCCCCTCCGTC. Для проведения ПЦР использовались реагенты фирмы «Синтол». Этапы реакции: 1-й цикл — 5 мин при 95 °С; 2-й цикл по 44 повтора — 15 с при 93 °С, 15 с при T_m, 15 с при 72 °С; 3-й цикл: — 6 мин 45 с при 72 °С, 30 с при 65 °С; 4-й цикл по 61 повтору — 15 с при 65 °С; 5-й цикл — 10 мин при 15 °С. Анализ продуктов амплификации проводился путем плавления в амплификаторе от 72 до 95 °С с шагом 0.5 °С, последующим электрофорезом аликвоты образца в 2%-ном агарозном геле с бромистым этидием и секвенированием. В качестве референса использовался ген *Rpl5*: RPL5-F—GATTGCGTATGCCCGTATAG; RPL5-R—CTCCAGTCACCTCCACTTG. Различия между группами считали статистически значимыми при $p < 0.05$. Данные по экспрессии генов представлены в виде диаграмм размаха.

Статистическая обработка данных. Достоверность отличий от противоположной конечности оценивали Т-критерием Вилкоксона, а от контрольной группы — критерием Краскела—Уоллиса при уровне значимости $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

По окончании эксперимента (на 11-й день) снижение массы тенотомированной *m. soleus* в группе К-Т составило 59 % по сравнению с неоперированной конечностью ($p < 0.01$). Атрофия контрольной денервированной мышцы (группа К-Д) развивалась медленнее, снижение массы составило 25 % ($p < 0.05$). При этом масса тенотомированной денервированной мышцы (в группе Т-ТД) почти вдвое превышал вес тенотомированной мышцы контралатеральной конечности ($p < 0.05$). Применение колхицина на тенотомированной мышце (Т-ТКлх) давало тенденцию к увеличению массы на 23 % по сравнению с тенотомированной мышцей без колхицина. Для высушенных целых мышц эти изменения были аналогичными (рис. 1). Однако процентное содержание сухого вещества в мышце достоверно снижалось только при те-

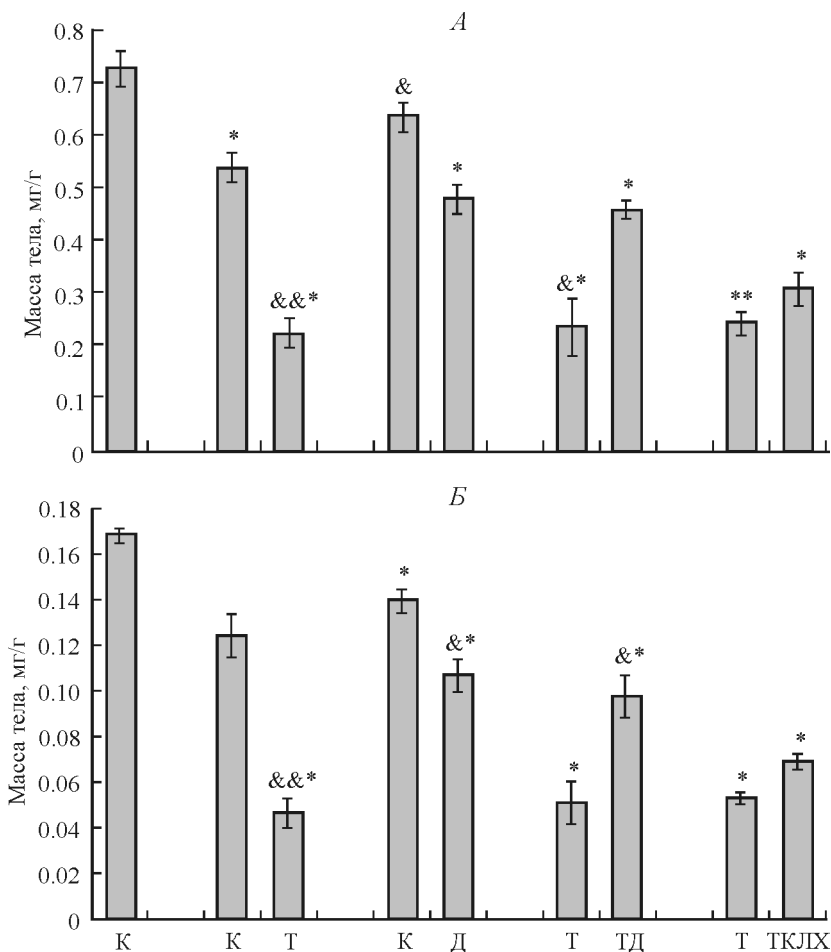


Рис. 1. Относительная масса (А) и относительная сухая масса *m. soleus* (Б), мг/г.

К — интактный контроль, К-Т (левая лапа — контрольная, правая — тенотомия), К-Д (левая — контрольная, правая — денервация), Т-ТД (левая — тенотомия, правая — тенотомия с денервацией), Т-ТКЛХ (левая — тенотомия, правая — тенотомия с колхицином). Сравнение проводили между средними значениями правой и левой конечности внутри групп, а также с группой интактного контроля. *, ** Статистически значимое отличие от интактного контроля, &, && — статистически значимое отличие от противоположной конечности, $p < 0.05$; $p < 0.01$ соответственно.

нотомии (в группе К-Т) на 10 % ($p < 0.05$), что говорит о большей скорости деградации или снижении синтеза белка по сравнению с другими воздействиями. При тенотомии с денервацией или колхицином такого снижения не происходило.

Морфологически атрофия тенотомированной мышцы характеризовалась выраженными дегенеративными изменениями: неоднородностью размеров мышечных волокон — гигантскими и мелкими, вплоть до исчезновения, вакуолизацией и инфильтрацией, замещением волокон соединительной тканью, поражением сердцевин мышечных волокон, наличием центральных ядер, очагов регенерации. В денервированной мышце (К-Д) также наблюдались все признаки денервационной атрофии, уменьшение размеров волокон, их группировка, фиброз.

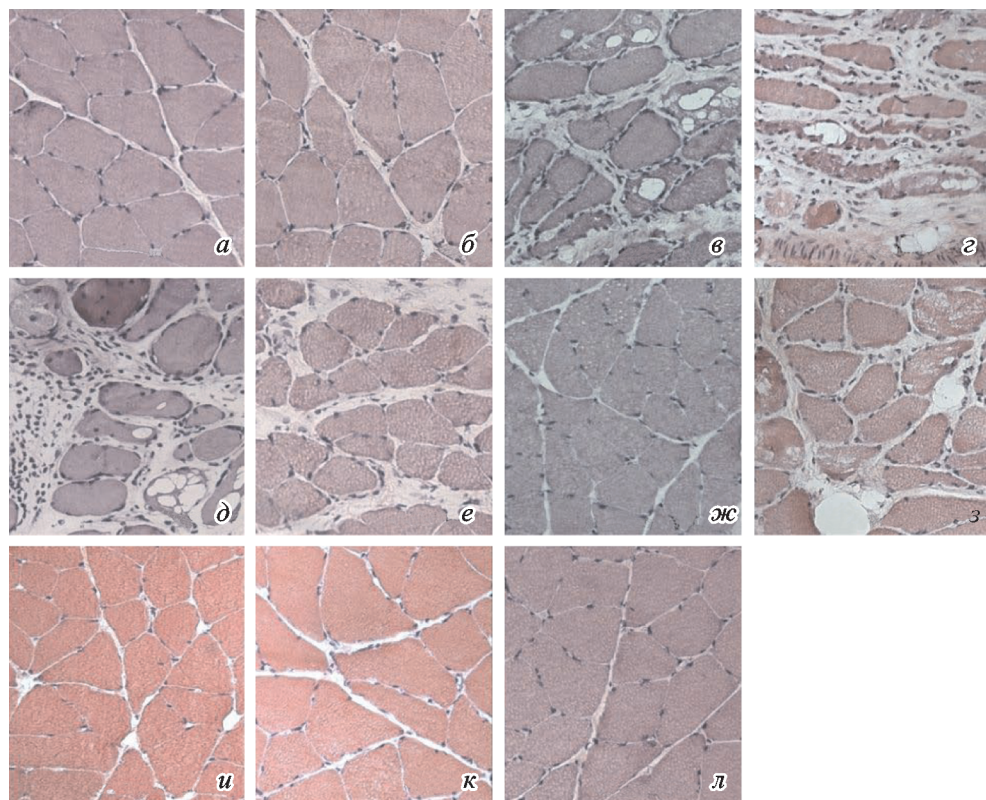


Рис. 2. Поперечные срезы *m. soleus* кролика; окрашивание гематоксилин-эозином. Увеличение $\times 200$.

а — контроль к тенотомии, *б* — контроль к денервации, *в* — тенотомия (к ТД), *г* — тенотомия (к ТКлх), *д* — тенотомия, *е* — денервация, *ж* — тенотомия + денервация, *з* — тенотомия + колхицин, *и* — контроль к колхицину, *к* — колхицин, *л* — интактный контроль.

В тенотомированной денервированной *m. soleus* (Т-ТД) не было гистологических признаков атрофии, в то время как мышца контралатеральной конечности была атрофирована. Несмотря на прирост в массе мышцы, денервация на фоне тенотомии не способствовала существенному увеличению средней площади поперечного сечения мышечных волокон, но предотвращала их гибель и деградацию, а также рост соединительной ткани. Число волокон на 1 мм^2 площади среза при тенотомии было вдвое меньше, чем при тенотомии с денервацией (121 ± 14 и 233 ± 16 соответственно; $p < 0.01$). При тенотомии с колхицином (Т-ТКлх) присутствовали большие разрастания соединительной ткани, но морфологические характеристики волокон были сохранены, их размеры не были уменьшены по сравнению с противоположной конечностью (рис. 2).

Размеры быстрых волокон тенотомированной *m. soleus* были снижены на 40 % ($p < 0.05$) в группе (К-Т), 20 % ($p < 0.05$) в группе (Т-ТД), 38 % ($p < 0.05$) в группе (Т-ТКлх) по сравнению с интактным контролем. После денервации, так же как и после применения колхицина на фоне тенотомии, размеры быстрых МВ не отличались от таковых у интактного контроля.

Тенотомия сама по себе вызывала сдвиг миозинового фенотипа в быструю сторону относительно контралатеральной конечности ($p < 0.05$). Сдвиг в бы-

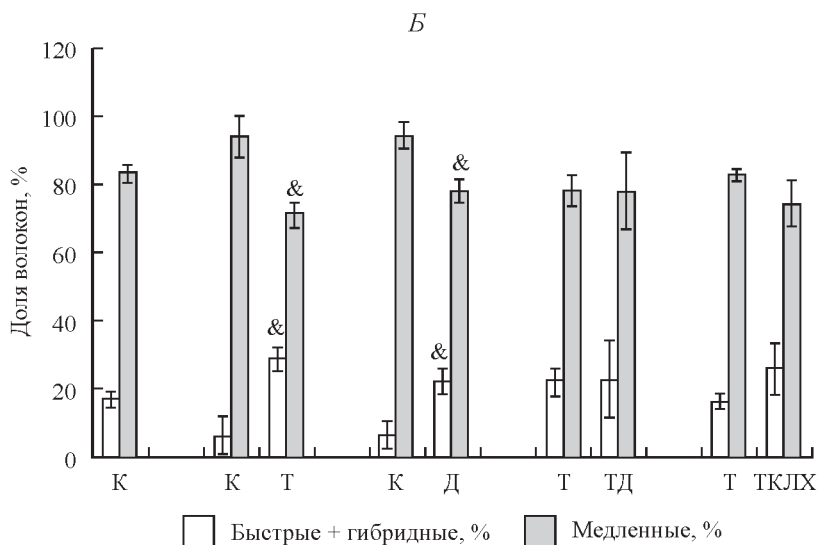
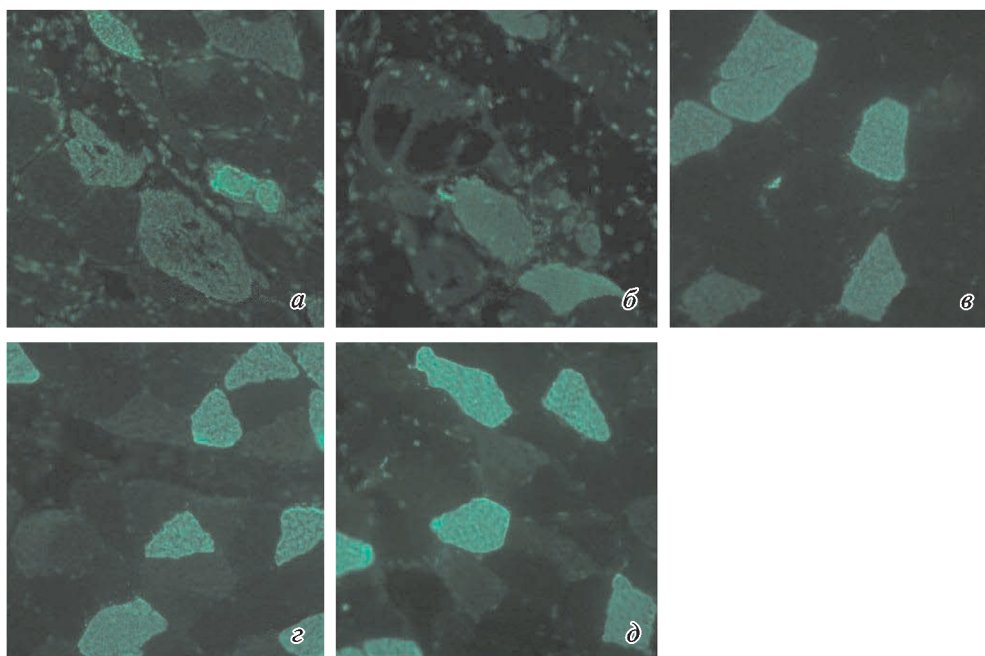


Рис. 3. А — поперечные срезы *m. soleus* кролика, окрашенные против быстрых изоформ тяжелых цепей миозина (Alexa Fluor 488). Светятся волокна, содержащие быстрые изоформы ТЦМ. Увеличение $\times 200$. а — тенотомия (Д), б — тенотомия (Клх), в — интактный контроль, г — тенотомия + денервация, д — тенотомия + колхицин. Б — состав волокон *m. soleus* по содержанию изоформ тяжелых цепей миозина. & Статистически значимое отличие от противоположной конечности, $p < 0.05$. Остальные обозначения те же, что и на рис. 1.

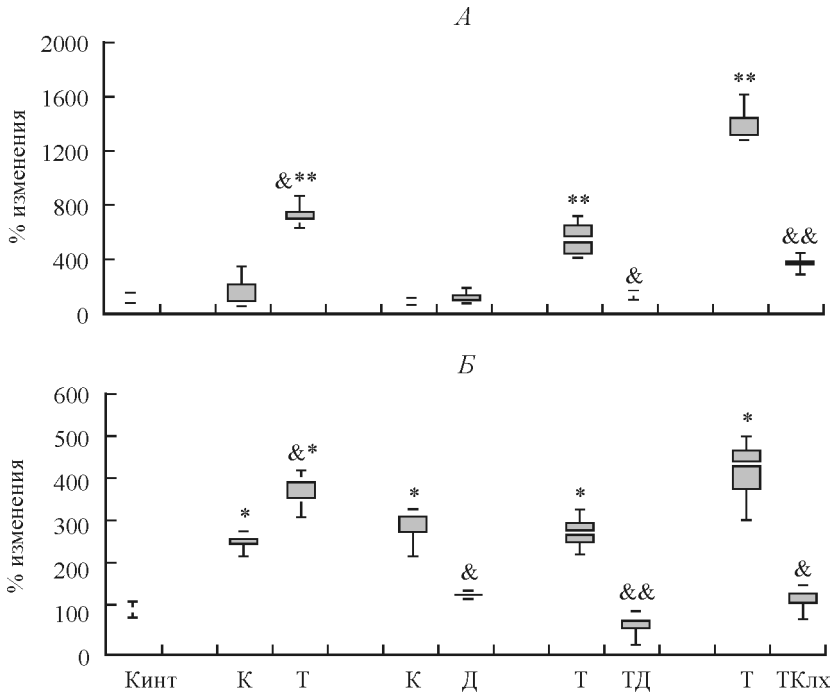


Рис. 4. Экспрессия мРНК рецепторов к нейротрофинам TrkB (А) и TrkC (Б) в m. soleus. Обозначения те же, что и на рис. 1.

струю сторону при тенотомии возникал в основном за счет гибели медленных волокон и снижения их общего количества. Также и при чистой денервации доля медленных волокон достоверно снижалась. В группах Т-ТД и Т-ТКлх соотношение быстрых и медленных МВ не отличалось между правой и левой конечностями (рис. 3, А, Б).

На рис. 4 представлены данные ПЦР по экспрессии в m. soleus мРНК рецепторов к нейротрофинам. Нейротрофины, активирующие рецептор TrkB — BDNF, NT-4 и NT-3. TrkB связывает BDNF и NT-4 лучше, чем NT-3. Рецептор TrkC связывает только NT3.

Тенотомия вызывала рост в m. soleus экспрессии мРНК рецепторов к нейротрофинам TrkB (в 8.7 раза, $p < 0.05$) и в меньшей степени TrkC (в 1.5 раза, $p < 0.05$) по сравнению с контрольной конечностью. Как денервация, так и применение колхицина на фоне тенотомии снижало экспрессию этих протеинкиназ до уровня интактного контроля. Денервация на фоне тенотомии в группе Т-ТД вызывала снижение экспрессии TrkB (в 3.4 раза, $p < 0.05$) и TrkC (в 3.2 раза, $p < 0.01$) по сравнению с тенотомированной контрлатеральной конечностью, колхицин в группе (Т-ТКлх) в 3.6 ($p < 0.01$) и 2.9 раза соответственно ($p < 0.05$).

Экспрессия мышечного BDNF между конечностями достоверно не отличалась при всех типах воздействия, а при денервации и тенотомии с денервацией была достоверно ниже интактного контроля ($p < 0.05$). мРНК нейротрофинов NT4 и NT3 достоверно снижалась при денервации ($p < 0.01$), в том числе с тенотомией ($p < 0.05$) (рис. 5).

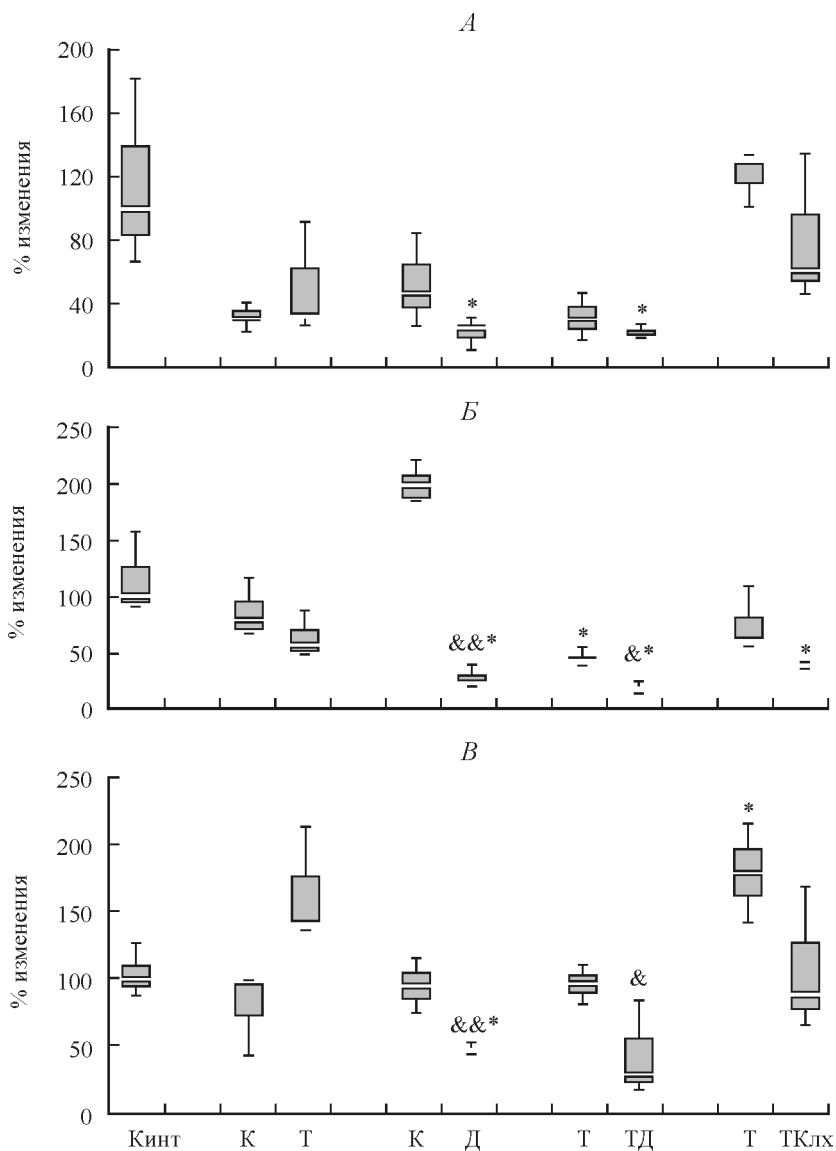


Рис. 5. Экспрессия нейротрофинов в камбаловидной мышце: BDNF (А), NT4 (Б), NT3 (В).
Обозначения те же, что и на рис. 1.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Наши исследования подтвердили обнаруженный Р. Лейбсон и А. Г. Гинецинским в 40-х гг. XX в. феномен предотвращения атрофии тенотомированной камбаловидной мышцы кролика от денервации [2, 4, 5]. Денервация практически полностью устраняла морфологические признаки атрофии и дегенерации тенотомированной *m. soleus* кролика на 11-й день воздействия (предотвращала их появление). Колхицин действовал аналогично, но дегенеративные изменения оставались более заметными.

Факт предотвращения атрофии полностью совпадает с данными А. Г. Гинецинского и согласуется с другими авторами [17, 22, 23, 31]. В поздних работах подтверждается, что атрофия *m. soleus* кролика после 3-недельной тенотомии была существенно менее серьезной, если одновременно с ней производили перерезку спинного мозга. Авторы заключили, что атрофия при тенотомии камбаловидной мышцы регулируется супраспинальными влияниями [23]. На других животных, в частности на крысах и мышах, также было показано благотворное влияние денервации на морфологическое состояние тенотомированной мышцы [31], но не всегда оно сопровождалось анаболическим эффектом. А. Г. Гинецинский писал, что сама возможность постановки данных экспериментов является в некоторой степени случайностью, так как у других животных, в частности мышей и крыс, атрофия от денервации происходит быстрее, чем от тенотомии [2]. У мышей тенотомия, проведенная одновременно с денервацией, задерживала атрофию камбаловидной мышцы всего на 2 дня, а после этого уже не было разницы по атрофии между экспериментальными группами [22].

Тенотомия вызывала сдвиг миозинового фенотипа мышцы в быструю сторону по сравнению с контралатеральной неоперированной конечностью, в то время как в тенотомированной денервированной конечности не было отличий по доле медленных волокон по сравнению с противоположной тенотомированной конечностью. Сдвиг в медленную сторону при денервации на фоне тенотомии подтверждается данными более ранних морфологических исследований [11, 22]. При наложении колхицина на фоне тенотомии мы не получили достоверного сдвига в быструю сторону, но наблюдали тенденцию к этому.

Ранее экспрессия быстрого миозина *de novo* в медленной камбаловидной мышце была показана в экспериментах с блокадой аксонного транспорта морских свинок [3]. Ее инициирует, по-видимому, прекращение воздействия на мышцу нейрогенных факторов. Например, известно, что нейротрофин 4/5 вовлечен в механизмы трансформации мышечных волокон [12]. Было показано, что внутримышечные инъекции NT-4/5 в камбаловидную мышцу новорожденных крысят усиливают трансформацию миозинового фенотипа в сторону медленного типа, которая предотвращается удалением эндогенного NT4 с помощью TrkB-IgG [25]. Интересно, что добавление другого лиганда к TrkB не влияет на ход трансформации миозинов. Некоторые исследования показывают также и роль NT3 в морфологии мышц [29, 30].

Мы не обнаружили значительного увеличения размеров волокон при денервации и тенотомии по сравнению с тенотомией, тогда как А. Г. Гинецинский пишет о приросте площади поперечного сечения волокон до контрольного уровня. По-видимому, средняя площадь поперечного сечения не совсем корректно отражает атрофические процессы при тенотомии, которые характеризуются как образованием гигантских волокон, так и уменьшением их размеров и сокращением количества вплоть до полного их исчезновения с замещением соединительной тканью и жировыми включениями.

Поскольку нейротрофины играют роль в поддержании энергетического баланса, инсулинового сигналинга и метаболизма скелетных мышц [27], мы предположили, что атрофию при тенотомии могло уменьшить прекращение поступления в мышцу нейротрофических факторов. Известно, что BDNF, поступающий в мышцу аксотранспортом по двигательному нерву посредством АМФ зависимой протеинкиназы АМПК — основного энергетического сенсора клетки, ингибирует систему регуляции анаболических процессов mTOR [10, 20]. Действительно, тенотомия вызывала рост экспрессии рецепторов к

нейротрофинам (TrkC, TrkB), который подавлялся денервацией и колхицином, при этом масса *m. soleus* была вдвое меньше, чем при тенотомии с денервацией, и на 30 % меньше, чем при тенотомии с колхицином. Вероятно, рост экспрессии рецепторов к нейротрофинам при тенотомии связан с изменением энергетического метаболизма в тенотомированной мышце. Этот вопрос требует дальнейшего изучения.

В заключение важно отметить, что строго контрольной противоположную конечность считать нельзя, так как многократно описаны физиологические, биохимические и анатомические контралатеральные эффекты [16, 24]. Изменение состояния контралатерального спинального двигательного центра обусловлено активацией внутриспинальных нейронных систем [13]. После тенотомии одной из икроножных мышц показано симметричное увеличение возбудимости мотонейронов в двигательном центре противоположной икроножной мышцы [9]. Вероятно, степень действия контралатеральных эффектов может быть разной, их точный вклад непонятен.

Работа поддержана грантом РФФИ № 17-04-01970.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

[1] Волков Е. М., Поletaев Г. И. Влияние денервации и возможные механизмы нейротрофического контроля хемочувствительной и электрогенной мембран скелетных мышечных волокон. Успехи физиол. наук. 13(3): 9—30. 1982. [Volkov E. M., Poletaev G. I. Effect of denervation and possible mechanisms of neurotrophic control of chemosensitive and electrogenic membranes of skeletal muscle fibers. *Succesiu Physiol. Sci.* 13(3): 9—30. 1982. (In Russ.)].

[2] Гинецинский А. Г., Барбашова З. И., Гинецинская Т. А., Шамарина Н. М. Значение нервного фактора в атрофии от бездеятельности. Тр. Физиол. ин-та. 1 : 44—51. 1945. [Ginetsinsky A. G., Barbashova Z. I., Ginetsinskaya T. A., Shamarina N. M. The role of the nervous factor in atrophy from inactivity. *Proc. Physiol. Institute.* 1 : 44—51. 1945. (In Russ.)].

[3] Исламов Р. Р., Валиуллин В. В. Нервная регуляция пластичности скелетной мышцы. Неврологический вестник им. В.М. Бехтерева. 46(3): 56—64. 2014. [Islamov R. R., Valiullin V. V. Nervous regulation of skeletal muscle plasticity. *Neurol. Herald. J. Them. V. M. Bechterew.* 46(3): 56—64. 2014. (In Russ.)].

[4] Лейбсон Р. Г. Бюл. эксперим. биологии и медицины. 7: 522. 1939. [Leibson R. Bull. *Exp. Biol. Med.* 7: 522. 1939. (In Russ.)].

[5] Лейбсон Р. Г. Изв. АН СССР. Сер. биол. 7 : 25. 1943. [Leibson R. *Proc. Acad. Sci. USSR. Ser. Biol.* 7: 25. 1943. (In Russ.)] — цит. по: [2].

[6] Улумбеков Э. Г., Резвяк Н. П. Нервный контроль структурно-функциональной организации мышцы. Л. Наука. 1980. [Ulumbekov E. G., Rezvyak N. P. *Nervnyy kontrol strukturno-funktsionalnoy organizatsii myshtsy.* L. Nauka. 1980). *Ulumbekov E. G., Rezvyak N. P. Nervous control of the structural and functional organization of the muscle.* L. Science. 1980].

[7] Иоффе М. Е. Кортико-спинальные механизмы инструментальных двигательных реакций. М. Наука, 1975. [(Ioffe M. E. *Kortiko-spinalnyye mekhanizmy instrumentalnykh dvigatelnykh reaktsiy.* M. Nauka. 1975). *Ioffe M. E. Cortico-spinal mechanisms of instrumental motor reactions.* M. Science. 1975].

[8] Коц Я. М. Организация произвольного движения: нейрофизиологические механизмы. М. Наука, 1975. [Kots Ya. M. *The organization of voluntary movement: neurophysiological mechanisms.* M. Science. 1975].

[9] Baltina T. V., Eremeev A. A., Pleshchinskii I. N. The state of the contralateral neuromotor apparatus of the rat in conditions of unilateral tenotomy. *Neurosci. Behav. Physiol.* 36 (4). 385—389. 2006.

[10] Bolster D. R., Crozier S. J., Kimball S. R., Jefferson L. S. AMP-activated protein kinase suppresses protein synthesis in rat skeletal muscle through down-regulated mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling. *J. Biol. Chem.* 277(27): 23 977—23 980. 2002.

- [11] Buller A. J., Lewis D. M. Some observations on the effects of tenotomy in the rabbit. *J. Physiol.* 178: 326—342. 1965.
- [12] Carrasco D. I., English A. W. Neurotrophin 4/5 is required for the normal development of the slow muscle fiber phenotype in the rat soleus. *J. Exp. Biol.* 206(13): 2191—2200. 2003.
- [13] Eremeev A. A., Baltina T. V., Eremeev A. M., Zefirov T. L. Motor function disturbances: contralateral effects. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2014. 158(1): 1—3. 2014.
- [14] Gao Y., Arfat Y., Wang H., Goswami N. Muscle Atrophy Induced by Mechanical Unloading: Mechanisms and potential countermeasures. *Rev. Front Physiol.* 20 (9): 235. 2018.
- [15] Elder G. C., Toner L. V. Muscle shortening induced by tenotomy does not reduce activity levels in rat soleus. *J. Physiol.* 512(1): 251—265. 1998.
- [16] Gerren R. A., Luttges M. W. Functional changes in undamaged sciatic nerves and spinal cord of mice following nerve damage. *Exp Neurol.* 65(3): 587—607. 1979.
- [17] Hnik P. The effect of deafferentation upon muscle atrophy due to tenotomy in rats. *Physiol. Bohemoslov.* 13: 209—215. 1964.
- [18] Jamali A. A., Afshar P., Abrams R. A., Lieber R. L. Skeletal muscle response to tenotomy. *Rev. Muscle Nerve.* 23: 851—862. 2000.
- [19] Karpati G., Carpenter S., Eisen A. Experimental core-like lesions and nemaline rods. A correlative, morphological and physiological study. *Archives Neurol.* 27: 237—251. 1972.
- [20] Kimura N., Tokunaga C., Dalal S., Richardson C., Yoshino K., Hara K., Kemp B. E., Witters L. A., Mimura O., Yonezawa K. A possible linkage between AMP-activated protein kinase (AMPK) and mammalian target of rapamycin (mTOR) signalling pathway. *J. Biol. Chem.* 277(27): 23 977—23 980. 2002.
- [21] Magladery J. W., McDougal D. B., jr. Electrophysiological studies of nerve and reflex activity in normal man. I. Identification of certain reflexes in the electromyogram and the conduction velocity of peripheral nerve fibers. *Bull. Johns Hopkins Hosp.* 86(5): 265—290. 1950.
- [22] McLachlan E. M. Rapid atrophy of mouse soleus muscles after tenotomy depends on an intact innervation. *Neurosci. Lett.* 25(3): 269—274. 1981.
- [23] McMinn R. M. H., Vrbova G. Morphological changes in red and pale muscles following Tenotomy. *Nature.* 195: 509. 1962.
- [24] Menendez J. A., Cubas S. C. Changes in contralateral protein metabolism following unilateral sciatic nerve section. *J. Neurobiol.* 21(2): 303—312. 1990.
- [25] Mousavi K., Jasmin B. J. BDNF is expressed in skeletal muscle satellite cells and inhibits myogenic differentiation. *J. Neurosci.* 26(21): 5739—5749. 2006.
- [26] Nelson P. G. Functional consequences of tenotomy in hindlimb muscles of the cat. *J. Physiol.* 201(2): 321—333. 1969.
- [27] Pedersen B. K., Pedersen M., Krabbe K. S., Bruunsgaard H., Matthews V. B., Febbraio M. A. Role of exercise-induced brain-derived neurotrophic factor production in the regulation of energy homeostasis in mammals. *Rev. Exp. Physiol.* 94(12): 1153—1160. 2009.
- [28] Vilchinskaya N. A., Mochalova E. P., Nemirovskaya T. L., Mirzoev T. M., Turtikova O. V., Shenkman B. S. Rapid decline in MyHC I(β) mRNA expression in rat soleus during hindlimb unloading is associated with AMPK dephosphorylation. *J. Physiol.* 595(23): 7123—7134. 2017.
- [29] Simon M., Terenghi G., Green C. J., Coulton G. R. Differential effects of NT-3 on reinnervation of the fast extensor digitorum longus (EDL) and the slow soleus muscle of rat. *Eur. J. Neurosci.* 12(3): 863—871. 2000.
- [30] Sterne G. D., Coulton G. R., Brown R. A., Green C. J., Terenghi G. Neurotrophin-3-enhanced nerve regeneration selectively improves recovery of muscle fibers expressing myosin heavy chains 2b. *J. Cell Biol.* 139(3): 709—715. 1997.
- [31] Talesara C. L., Jasra P. K. Modifications in the histochemical and biochemical changes in tenotomized rat soleus by denervation. *Pflügers Arch.* 407(2): 178—181. 1986.
- [32] Vrbova G. The effect of tenotomy on the speed of contraction of fast and slow mammalian muscles. *J. Physiol.* 161: 25. 1963.

Поступила в редакцию 12.11.2018
 После доработки 19.11.2018
 Принята к публикации 05.12.2018