

УДК 577.3

ВЛИЯНИЕ ИОНОВ ЦЕЗИЯ НА ИНГИБИТОРНЫЙ ЭФФЕКТ ПУРИНОВ В МИОНЕВРАЛЬНОМ СИНАПСЕ

© 2021 г. А.Е. Хайруллин*, В.В. Валиуллин, А.Ю. Теплов, А.Р. Шайхутдинова, Н.М. Каштанова, С.Н. Гришин

Казанский государственный медицинский университет, 420012, Казань, ул. Бутлерова, 49

*E-mail: khajrulli@yandex.ru

Поступила в редакцию 16.06.2021 г.

После доработки 25.06.2021 г.

Принята к публикации 01.07.2021 г.

Для выявления участия K^+ -каналов в механизме ингибиторного пресинаптического действия пуриновых соединений в нервно-мышечном синапсе холоднокровных животных изучали эффекты АТФ и аденозина на параметры токов концевой пластинки нервно-мышечного синапса лягушек *Rana ridibunda*, в том числе и на фоне модулирующих синаптическую передачу ионов цезия. Наблюдалось различие между эффектами ионов цезия на амплитуду токов концевой пластинки при его получасовом и часовом сроке действия, что отмечалось нами ранее и в присутствии ионов бария, являющегося блокатором некоторых подтипов калиевых каналов. В случае часового воздействия цезия ингибиторный эффект аденозина на амплитуду токов концевой пластинки оставался стабильным, в то время как угнетающее действие на амплитуду постсинаптических ответов АТФ при этом уменьшалось в ~2.5 раза. Полученные данные могут свидетельствовать о том, что пресинаптический угнетающий эффект АТФ на секрецию трансмиттера из нервных окончаний реализуется через Cs^+ -чувствительные калиевые каналы нервной терминали.

Ключевые слова: мионевральный синапс, ионы цезия, ингибиторный эффект пуринов, блокаторы калиевых каналов, АТФ.

DOI: 10.31857/S0006302921060089

Широко известно собственное модуляционное действие по принципу отрицательной обратной связи котрансмиттера АТФ на квантовый состав медиатора в синапсах фазных мышц амфибий [1–3]. Выделяясь из синаптических везикул нервного окончания мотонейрона совместно с основным медиатором ацетилхолином, АТФ угнетает квантовую секрецию медиатора из пресинаптических окончаний мотонейронов, действуя на P2-рецепторы, в то время как конечный продукт его распада – аденозин – реализует свое действие через аденозиновые рецепторы [4]. Известно, что пурины – это ингибиторы синаптической передачи [5], а такое действие можно оказывать, либо блокируя кальциевые, либо активируя калиевые ионные каналы [6].

Многочисленными исследованиями показано, что калиевые каналы обнаруживают наибольшее разнообразие подтипов по сравнению с другими ионными каналами [7–9]; так, различают кальций-зависимые калиевые каналы, калиевые каналы внутреннего выпрямления, двупоровые

калиевые каналы и потенциал-зависимые калиевые каналы. В реализации пресинаптического действия пуринов отмечено участие каналов задержанного выпрямления и А-типа калиевых каналов – представителей потенциалозависимых калиевых каналов [8, 10].

Ранее нами было показано, что 4-аминопиридин, блокатор калиевых каналов А-типа, существенно снижает ингибиторный эффект АТФ на секрецию медиатора [10]. Это может означать, что калиевые каналы А-типа участвуют в ингибиторном эффекте АТФ на экзоцитоз медиатора в синаптическую щель. Однако, несмотря на то что 4-аминопиридин считается специфическим блокатором А-типа калиевых каналов [11], во многих случаях обнаруживается его блокирующая способность и на калиевые каналы задержанного выпрямления, что объясняется близкими структурными, кинетическими и фармакологическими свойствами этих подтипов ионных каналов [8].

Для выявления конкретного подтипа калиевого канала, предположительно участвующего в пресинаптическом ингибиторном действии АТФ, мы провели эксперименты на нервно-мы-

Сокращение: ТКП – токи концевой пластинки.

шечном препарате озерной лягушки в цезиевой среде, учитывая, что ионы цезия блокируют каналы задержанного выпрямления, но не калиевые каналы А-типа [12].

МЕТОДЫ

Эксперименты проводили на изолированном нервно-мышечном препарате «седалищный нерв – портняжная мышца» лягушек *Rana ridibunda* [6]. В течение эксперимента нервно-мышечный препарат непрерывно перфузировали раствором Рингера для холоднокровных животных следующего состава (в мМ/л): NaCl – 115.0, KCl – 2.5, CaCl₂ – 1.8, NaHCO₃ – 11.0, рН раствора поддерживали на уровне 7.3.

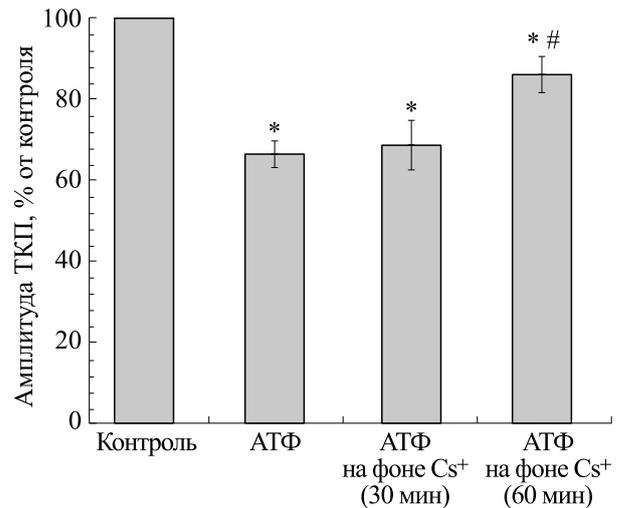
Для непрямого раздражения препарата нерв располагали на серебряных электродах в герметичной увлажненной камере, изолированной от ванночки, в которую помещали мышцу. Для регистрации токов концевой пластинки (ТКП) нерв раздражали прямоугольными импульсами сверхпороговой амплитуды длительностью 0.2–0.4 мс с частотой 0.03 Гц [10, 13].

Вызванную квантовую секрецию оценивали по параметрам вызванных токов концевой пластинки [6]. Для отведения ТКП потенциальный и токовый микроэлектроды фокусировали и вводили в область концевой пластинки мышечного волокна. Накопление и усреднение треков ТКП производили с помощью персонального компьютера с периодом опроса 5–20 мкс на точку. Расчет параметров ТКП проводили при помощи оригинального программного обеспечения [10]. Все вещества вводили через систему перфузии со скоростью 2 мл/мин. При оценке аддитивного действия АТФ и аденозин подавали через 30 и 60 мин после введения ионов цезия.

РЕЗУЛЬТАТЫ

При фиксации потенциала на уровне –40 мВ средняя амплитуда многоквантовых токов концевой пластинки составила 138 ± 25 нА ($n = 25$). Через 15 мин добавления в инкубационную среду аденозина в концентрации 100 мкМ наблюдали снижение амплитуды ТКП до $70.5 \pm 2.9\%$ ($n = 11$, $p < 0.05$) от исходных значений. Эффект аденозина на амплитуду токов был обратим, и после отмывания раствором Рингера амплитуда сигнала восстанавливалась до исходных величин ($n = 25$; $p > 0.05$).

Как показано на рисунке, через 15 мин добавления в инкубационную среду АТФ в концентрации 100 мкМ наблюдалось снижение амплитуды ТКП до двух третей от контрольного значения. Таким образом, снижение амплитуды ТКП при действии АТФ и аденозина при одной и той же



Эффекты АТФ в концентрации 100 мкМ на амплитуду ТКП в контроле и на фоне получасового и часового действия ионов цезия; * – $p < 0.05$ от контроля; # – $p < 0.05$ от базового действия АТФ.

концентрации было аналогичным. При этом, как и при действии аденозина, в случае добавления АТФ падение амплитуды ТКП было обратимым, что было обнаружено при отмывке образцов физиологическим раствором Рингера.

Цезий в концентрации 2 мМ к 30-й минуте своего действия вызывал повышение амплитуды ТКП на $44.3 \pm 9.2\%$ ($n = 8$, $p < 0.05$) по сравнению с контролем, и этот эффект затем сменялся почти полным восстановлением исходной амплитуды постсинаптических ответов. Так, к 60-й минуте действия цезия амплитуда ТКП составила $110.1 \pm 8.3\%$ ($n = 8$, $p > 0.05$) от контроля.

На 30-й минуте после внесения цезия эффекты пуринов не были модифицированы. Так, аденозин в этих условиях снижал амплитуду ТКП до $72.0 \pm 3.6\%$ ($n = 7$, $p < 0.05$) и, как это показано на рисунке, АТФ полностью воспроизводил свой базовый эффект по снижению амплитуды ТКП.

Через час после действия ионов цезия добавление 100 мкМ АТФ приводило лишь к небольшому угнетению амплитуды ТКП, почти в 2.5 раза меньшему по отношению к базовому эффекту этого пурина. В отличие от АТФ, ингибирующий синаптическую секрецию эффект аденозина и после часового выдерживания препарата в Cs⁺ сохранялся в полной мере: $69.8 \pm 5.1\%$ ($n = 8$, $p < 0.05$) от контроля.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В нашем исследовании мы оценивали модулирующее квантовый выброс медиатора действие АТФ и аденозина на фоне ионов цезия, блокатора калиевых ионных каналов [12]. Из-

вестно, что помимо достаточно сложных органических соединений, таких как ибериотоксин, харибдотоксин и апамин, некоторые подтипы калиевых каналов блокируются одно- и двухвалентными катионами — Cs^+ и Ba^{2+} [8, 12]. Конечно, эти катионы не такие высокоспецифичные блокаторы калиевых каналов, как упомянутые ранее яды скорпионов и пчел, но, тем не менее, их использование вносит свой вклад в исследование разнообразных подтипов калиевых ионных каналов [8, 12], а возможные механизмы их участия в ряде дисфункций мионеврального перехода не изучены.

При исследовании действия Cs^+ на амплитуду ТКП на различных сроках инкубации обнаружено, что к 30-й минуте он вызывал повышение амплитуды ТКП почти в полтора раза по сравнению с контролем, а к 60-й минуте амплитуда ТКП восстанавливалась до исходной. Подобное различие эффектов кратковременного и длительного присутствия Cs^+ может также получить объяснение медленно развивающимся внутриклеточным действием этих ионов. Аналогичный двухфазный характер имеет и эффект ионов бария, блокатора некоторых подтипов калиевых каналов [7]. Так, в присутствии 2.5 мМ Ba^{2+} мы наблюдали сначала увеличение, а потом снижение амплитуды ТКП [10]. Для функционирования K^+ -каналов имеет значение и время взаимодействия с агентами.

Ранее были опубликованы данные о частичном устранении 4-аминопиридином (блокатором калиевых каналов А-типа и задержанного выпрямления) пресинаптического ингибиторного действия АТФ [10]. Подобное наблюдалось и в обнаруженном нами эффекте АТФ на фоне ионов цезия, которые из двух упомянутых подтипов каналов блокируют калиевые каналы задержанного выпрямления. Все это в совокупности может означать, что калиевые каналы задержанного выпрямления участвуют в реализации эффектов АТФ. При этом ранее всегда отмечалось [14, 15], что 4-аминопиридин, помимо прочих эффектов, резко усиливает приток ионов Ca^{2+} в двигательное нервное окончание, и частичная отмена ингибиторного действия АТФ на фоне этого агента могла быть связана с известным ослаблением ингибиторного эффекта пурина на фоне повышенной концентрации кальция [10, 14]. Полученные нами данные свидетельствуют, что ингибиторный эффект АТФ на амплитуду ТКП опосре-

дован, в том числе, активацией калиевых каналов задержанного выпрямления.

И, наоборот, отсутствие изменения в ингибиторном действии аденозина в цезиевой среде говорит о том, что уже известное почти полное устранение ингибиторного эффекта этого пурина под действием 4-аминопиридина [10] связано именно с блокадой А-типа калиевых каналов.

Исходя из полученных данных, мы полагаем, что пресинаптический угнетающий эффект АТФ на секрецию трансмиттера из нервных окончаний реализуется, в том числе, через Cs^+ -чувствительные калиевые каналы нервной терминали.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Проведенные эксперименты полностью соответствуют действующим национальным и международным нормам в области этики.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. S. N. Grishin and A. U. Ziganshin, *Biochemistry (Moscow) Suppl. Ser. A: Membrane and Cell Biology* **9** (1), 13 (2015).
2. R. A. Cunha and J. A. Ribeiro, *Life Sci.* **68** (2), 119 (2000).
3. K. J. Todd and R. Robitaille, *Pflugers Arch.* **452** (5), 608 (2006).
4. G. Burnstock, T. R. Arnett, and I. R. Orriss, *Purinergic Signal.* **9** (4), 541 (2013).
5. A. U. Ziganshin, C. H. V. Hoyle, A. E. Khairullin, and S. N. Grishin, *Int. J. Mol. Sci.* **21** (17), 6423 (2020).
6. С. Н. Гришин и А. У. Зиганшин, *Биол. мембраны* **30** (4), 243 (2013).
7. N. A. Castle, D. G. Haylett, and D. H. Jenkinson, *Trends Neurosci.* **12** (2), 59 (1989).
8. A. Meir, S. Ginsburg, A. Butkevitch, et al., *Physiol. Rev.* **79** (3), 1019 (1999).
9. J. G. Nicholls, A. R. Martin, B. G. Wallace, and P. A. Fuchs, *Sinauer Associates, Inc.* 672 (2001).
10. S. Grishin, A. Shakirzyanova, A. Giniatullin, et al., *Eur. J. Neurosci.* **21**, 1271 (2005).
11. G. Russo, S. Masetto, and I. Prigioni, *Neuroreport* **6** (3), 425 (1995).
12. S. Zhang, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **290** (3), 1038 (2006).
13. E. V. Ponomareva, E. V. Kachaeva, E. G. Altaeva, et al., *Biophysics* **53** (6), 615 (2008).
14. S. N. Grishin, *Biochemistry (Moscow) Suppl. Ser. A: Membrane and Cell Biology* **10** (2), 99 (2016).
15. B. Katz and R. Miledi, *Proc. Roy. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **205** (1160), 369 (1979).

The Influence of Cesium Ions on the Inhibitory Effect of Purines in Neuromuscular Synapse

**A.E. Khairullin, V.V. Valiullin, A.Yu. Teplov, A.R. Shaihtudinova,
N.M. Kashtanova, and S.N. Grishin**

Kazan State Medical University, ul. Butlerova 49, Kazan, 420012 Russia

To reveal the participation of K^+ -channels in the mechanism of inhibitory presynaptic action of purine compounds in the neuromuscular synapse of cold-blooded animals, we studied the effects of ATP and adenosine on the parameters of the currents of the end plate of the neuromuscular synapse in frogs *Rana ridibunda*, including against the background of modulating synaptic transmission of cesium ions. A difference was observed between the effects of cesium ions on the amplitude of the end-plate currents during its half-hour and hourly duration of action, which we noted earlier in the presence of barium ions, which is a blocker of some subtypes of potassium channels. In the case of an hourly exposure to cesium, the inhibitory effect of adenosine on the amplitude of end-plate currents remained stable, while the inhibitory effect on the amplitude of postsynaptic ATP responses decreased by ~2.5 times. The data obtained may indicate that the presynaptic inhibitory effect of ATP on the secretion of the transmitter from the nerve endings is realized through the Cs^+ -sensitive potassium channels of the nerve terminal.

Keywords: myoneural synapse, cesium ions, inhibitory effect of purines, potassium channel blockers, ATP