

МИОНЕВРАЛЬНАЯ ПЕРЕДАЧА В БАРИЕВОЙ СРЕДЕ

© 2022 г. С.Н. Гришин, А.Е. Хайруллин, А.Ю. Теплов, М.А. Мухамедьяров

*Казанский государственный медицинский университет, 420012, Казань, ул. Бутлерова, 49**E-mail: sgrishin@inbox.ru*

Поступила в редакцию 11.01.2022 г.

После доработки 01.02.2022 г.

Принята к публикации 02.02.2022 г.

Исследована проблема мионевральной передачи амфибий (озерной лягушки) в бескальциевой среде. Известно, что для инициации выхода нейромедиатора в синаптическую щель необходима активация потенциал-зависимых кальциевых каналов. В начальных экспериментах была воссоздана описанная многими авторами картина угнетения вызванных постсинаптических ответов вплоть до их полного исчезновения в бескальциевой внешней среде. В экспериментах после замены перфузионного раствора Рингера с нормальным ионным содержанием Ca^{2+} на бескальциевый, но с эквивалентным содержанием Ba^{2+} , амплитуда токов концевой пластинки упала более чем в десять раз, однако сохранялась в течение всего времени наблюдения – более 1 ч. Далее для чистоты эксперимента был использован кофеин – миметик выброса содержимого рианодин-чувствительных кальциевых депо. После подачи (и отмывки) 100 мкМ кофеина вызванные ответы в исключительно бариевой среде возобновлялись (в особой специфической сверхзатянутой неровной форме) только в условиях продления потенциала действия нервного окончания путем аппликации 4-аминопиридина в концентрации 100 мкМ, причем всего лишь в несколько первых минут. В дальнейшем вызванные токи вновь прекращались, наблюдались лишь «вспышки» миниатюрных постсинаптических токов в ответ на каждую стимуляцию. Таким образом, подтверждена принципиальная возможность иницированной ионами бария нервно-мышечной передачи, хотя и в весьма специфических экспериментальных условиях.

Ключевые слова: нервно-мышечный синапс, ионы бария, металлы щелочноземельной группы, потенциал-зависимые кальциевые каналы, вызванная квантовая секреция.

DOI: 10.31857/S0006302922030176, EDN: APNOGP

Хорошо известно, что потенциал действия, доходя до синаптического окончания, вызывает многоквантовый выход нейромедиатора, который активируют потенциал-зависимые кальциевые каналы [1]. В научной литературе обсуждается вопрос о проводимости этими каналами некальциевых двухвалентных катионов как общем свойстве нейрональной мембраны [2, 3]. Так, в ГАМК-ергических синапсах гиппокампа крысы при замене в базовом растворе Ca^{2+} на Sr^{2+} синаптическая передача осуществлялась, но менее эффективно. То же самое наблюдалось и при замене Ca^{2+} на Ba^{2+} [4].

В главную подгруппу второй группы периодической системы входят следующие металлы (в порядке возрастания номеров и размеров): бериллий, магний, кальций, стронций, барий и радий. Фактором, влияющим на проницаемость ионно-

го канала, является не размер иона. В первую очередь важную роль играет его способность как к гидратированию/дегидратированию, так и к связыванию в поре ионного канала [2].

Вклад вышеперечисленных катионов в создание примембранных фиксированных заряженных группировок описан еще в 1853 году Г. Гельмгольцем [5]. Далее М. Гуи [6] и Д. Чэпмен [7], основываясь на представлениях о двойном электрическом слое, независимо друг от друга связали этот эффект с количественным значением поверхностного потенциала. В последующем эти взгляды были существенно модифицированы О. Штерном [8]. Согласно их представлениям, введение в перфузионный раствор Ca^{2+} и других ионов вышеперечисленного ряда, приводит к изменению потенциала поверхностной мембраны. Причиной этого служит образование экранирующего слоя противоионов и нейтрализация зарядов соответствующих группировок.

Сокращение: ТКП – токи концевой пластинки.

Если бы действие Ca^{2+} и других катионов описываемого ряда определялось только путем экранирования поверхностных зарядов, то значение в процессе имела бы как валентность ионов, так и их концентрация. При наличии же связывания эффект должен зависеть также от химических характеристик ионов, которые определяют константу их связывания с фиксированными группировками [9].

Показано, что двухвалентные катионы в сопоставимых концентрациях оказывают различное влияние на потенциал-зависимые характеристики поверхностной мембраны, то есть они действительно связываются с фиксированными группировками. На Ca^{2+} -каналах скелетных мышечных волокон была исследована возможность связывания Ca^{2+} и Ba^{2+} [10]. Карбоксильную группу при этом рассматривали в качестве наиболее вероятной основы такой связи. Описание энергетического профиля Ca^{2+} -канала, по мнению авторов, может осуществляться в рамках модели с одной энергетической ямой и двумя энергетическими барьерами.

В 2014 г. были опубликованы результаты кристаллографического анализа селективного кальциевого фильтра, встроенного в гомотетраммерный бактериальный NaV -канал [11]. Приведенные данные показывают взаимодействие гидратированных ионов Ca^{2+} с двумя высокоаффинными Ca^{2+} -связывающими сайтами и последующим третьим низкоаффинным сайтом, который координирует движение иона Ca^{2+} внутрь клетки. Первый, входной сайт селективного фильтра образован четырьмя карбоксильными боковыми цепями, которые играют важную роль в селективности к ионам Ca^{2+} . Четыре карбоксильные группы и четыре основные карбонильные группы образуют второй сайт, который служит мишенью блокирующего действия как Cd^{2+} , так и Mn^{2+} . Последний сайт образован только четырьмя основными карбонильными группами, формирующими выход для катиона в центральную полость. Эта архитектура пор предполагает перемещение ионов Ca^{2+} через фильтр канала в процессе поэтапного связывания.

Что касается третьей группы теорий – аллостерической модуляции структуры Ca^{2+} канала – образующиеся в результате такого взаимодействия молекулярные изменения имеют важные физиологические и патофизиологические последствия. Аллостерическое подавление некоторых порообразующих $\text{Ca}_v\alpha_1$ -субъединиц ($\text{Ca}_v2.3$, $\text{Ca}_v3.2$) ионами Zn^{2+} и Cu^{2+} может играть важную роль в регуляции тока катионов [12].

Существуют множественные свидетельства, что в центральных нейронах моллюсков Ba^{2+} и Sr^{2+} являются более эффективными переносчиками некоторых компонентов тока через Ca^{2+} -каналы мембраны, чем сам Ca^{2+} [13–16]. Замена в перфузионном растворе Ca^{2+} на Ba^{2+} в сходных концентрациях позволила оценить роль предварительной деполяризации мембраны в инактивации входящего тока Ca^{2+} [17–20].

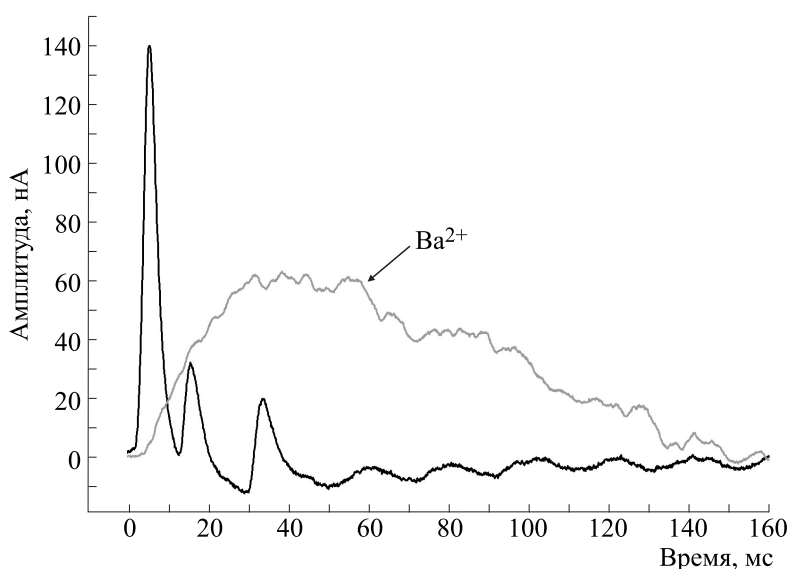
В наших предшествующих исследованиях на мотонейронах лягушки [21] показано, что при использовании ионов Sr^{2+} в периневральном Ca^{2+} токе инактивация в терминали двигательного нейрона определялась повышением концентрации внутриклеточного Ca^{2+} , которая обладает возвратным блокирующим действием [22].

МЕТОДИКА

Эксперименты по регистрации токов концевой пластинки (ТКП) проводили *in vitro* на препарате: *n. ichiatikus* – *m. sartorius Rana ridibunda*. Декапитацию осуществляли под эфирным наркозом. Сухожилие дистального конца мышцы брали на лигатуру, мышцу отсепаровывали до места вхождения в нее нерва. После вскрытия брюшной полости седалищный нерв брали на лигатуру у места вхождения в спинной мозг и выделяли до места вхождения в мышцу. Для предотвращения сокращений мышцы ее волокна поперечно рассекали.

Непрямое раздражение нерва проводили с помощью серебряных электродов в отдельной герметической увлажненной камере, изолированной от ванночки, в которую помещали мышечный препарат. Герметизацию отсека с нервом осуществляли тонкой пластиной, покрытой слоем вазелина. Электростимуляцию нерва для регистрации токов концевой пластинки осуществляли прямоугольными импульсами сверхпороговой амплитуды длительностью 0.2–0.4 мс с частотой 0.03 Гц.

Вызванную квантовую секрецию оценивали по амплитудно-временным параметрам вызванных ТКП, которые отводили потенциальным и токовым микроэлектродами в области концевой пластинки мышечного волокна. Оценку результатов – накопления и усреднения ТКП – осуществляли с помощью персонального компьютера с периодом опроса 5–20 мкс на точку. Расчет параметров спада токов концевой пластинки проводили при помощи программного обеспечения Origin. Мышечный препарат перфузировали раствором Рингера со скоростью 2 мл/мин.



ТКП при потенциале действия нервного окончания в условиях его продления, вызванного аппликацией 100 мкМ 4-аминопиридина. Показан трек ТКП при полном отсутствии Ca^{2+} (с эквимольной заменой на Ba^{2+}) на фоне ТКП при нормальном содержании Ca^{2+} . В последнем заметна характерная повторная активность. Представлены репрезентативные результаты отдельных опытов.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Эксперименты в среде, свободной от двухвалентных катионов. При фиксации потенциала на уровне -40 мВ средняя амплитуда многоквантовых ТКП в обычном растворе Рингера составила 138 ± 25 нА ($n = 10$). Спад токов описывался одной экспонентой с постоянной времени спада 1.41 ± 0.12 мс ($n = 10$).

В бескальциевом перфузионном растворе наблюдалось постепенное снижение амплитуды ТКП. После получаса содержания в свободном от ионов Ca^{2+} растворе ТКП переставали наблюдаться.

Эксперименты в бариевой среде. После замены в перфузионном растворе Ca^{2+} на эквимольное содержание Ba^{2+} амплитуда ТКП упала более чем в десять раз, но сохранялась все время наблюдения — более одного часа ($n = 9$).

Кофеин (100 мкМ) — агонист рианодин-чувствительных рецепторов кальциевых депо — в бариевой среде вызвал возобновление ответов, которые имели специфическую сверхзатянутую неровную форму (см. рисунок). Данная картина наблюдалась исключительно в условиях аппликации 4-аминопиридина (100 мкМ) и лишь в течение нескольких первых минут ($n = 9$). В дальнейшем вызванные токи прекращались. Наблюдалась лишь «вспышки» миниатюрных постсинаптических токов в ответ на каждую стимуляцию.

ОБСУЖДЕНИЕ

Как известно, в перфузионной среде, в которой Ca^{2+} заменен на Ba^{2+} , действие основных эндогенных модуляторов на мионевральную передачу кардинально изменяется [23], что, естественно, затрагивает и саму ацетилхолиновую трансмиссию. Тем интереснее данные работы [24], согласно которым амплитуда спонтанных ТКП не зависит от внеклеточной концентрации ионов Ca^{2+} . Корреляция между ними и частотой возникновения миниатюрных потенциалов здесь не прослеживается, что подтверждается и другими работами [25, 26].

Сохранение спонтанных ответов концевой пластинки в нервно-мышечном синапсе лягушки в растворах, не содержащих Ca^{2+} , но при его замене на Mg^{2+} , указывает на «дуальный» механизм выхода квантов ацетилхолина в мионевральных синапсах, о чем авторы работы [25] высказывались еще в 1954 г. Вскоре после этого стало известно, что в нервно-мышечном синапсе теплокровных (диафрагма крысы *in vitro*) частота спонтанных постсинаптических ответов снижается как при снижении концентрации Ca^{2+} , так и при увеличении содержания Mg^{2+} [27–29]. Позже было показано, что в поддержании спонтанного выхода квантов медиатора в мионевральных синапсах крысы ионы Sr^{2+} равноэффективны ионам Ca^{2+} . Кроме того, Co^{2+} , Pb^{2+} , Zn^{2+} и La^{3+} увеличивали время роста миниатюрных потенциалов, но были не в состоянии поддерживать квантовый

релиз достаточно долгое время [30]. Была показана также способность Ba^{2+} наравне с Ca^{2+} поддерживать спонтанную секрецию в синапсе диафрагмы мыши [31].

Ранее нами было показано, что в случае полной замены в растворе Ca^{2+} на Ba^{2+} наблюдалось двухфазное изменение положительной составляющей периневрального тока седалищного нерва лягушки [32]. После нескольких минут действия ионов Ba^{2+} амплитуда положительной компоненты увеличивалась на треть. В случае полной замены Ca^{2+} на Ba^{2+} в концентрации 1.8 мМ мы наблюдали двухфазное изменение последней положительной составляющей периневрального тока. После пятиминутного действия ионов Ba^{2+} амплитуда положительной компоненты увеличивалась примерно на треть. К двадцатой минуте этот показатель возрастал уже до двух третей от контроля.

Приведенные в данной статье результаты показали, что после замены перфузионного раствора Рингера с нормальным ионным содержанием на бескальциевый, но с эквимоллярным содержанием Ba^{2+} , амплитуда токов концевой пластинки упала более чем в десять раз, но сохранялась больше часа. Далее использовали кофеин (агонист выброса Ca^{2+} из рианодин-чувствительных депо) с целью истощения запасов внутриклеточного Ca^{2+} .

После подачи (и отмывки) кофеина в бариевой среде вызванные ответы возобновлялись только в условиях аппликации 4-аминопиридина, хотя и имели специфическую сверхзатянутую неровную форму. Эффект наблюдался всего лишь в течение нескольких первых минут, после чего вызванные токи вновь прекращались. При этом в ответ на каждую стимуляцию наблюдались лишь «вспышки» миниатюрных постсинаптических токов, что напоминает ответ на серию стимуляции в гипокальциевом растворе. Однако в нашем случае мы имели дело с одиночными нервными импульсами. Появление в первые минуты ТКП соответствует начальному подъему амплитуды последней положительной составляющей периневрального ответа при замене Ca^{2+} на Ba^{2+} .

В 1950 г. авторы работы [33] нашли, что в бескальциевой среде потенциал действия доходит до нервных окончаний. Однако, им не удалось зарегистрировать вызванные ТКП. В предельных гипокальциевых растворах вызванный одиночным нервным импульсом постсинаптический ответ не бывает крупнее, чем один миниатюрный. В этих условиях серия нервных импульсов вызывает случайный выброс небольших токов концевой пластинки. Вариация их амплитуд описывается ступенчатой модой, что, по-видимому, соответствует кратности разрядов этих токов [24].

Наблюдаемые в наших экспериментах результаты имели сходную картину.

Одни авторы сообщают о вызванных ТКП в бариевой среде [26], другим не удалось зарегистрировать их вне специальных условий [34]. В литературе также отмечалось, что Ba^{2+} -потенциалы являются очень неустойчивыми и быстро ослабевают при повторном вызове [35]. Однако отмечалось и то, что запускающий экзоцитоз везикул при одноквантовом выходе медиатора низкопороговый Ca^{2+} -связывающий сайт, активирующийся в области Ca^{2+} -макродомена, обнаруживает сходную чувствительность к ионам Ca^{2+} , Sr^{2+} и Ba^{2+} [36]. Наиболее вероятным молекулярным кандидатом сайта служит высокоаффинная изоформа одного из белков мембраны везикул – синаптотагмин III, у которого обнаружена способность связывать перечисленные катионы [37].

Приведенные результаты собственных исследований являются подтверждением принципиальной возможности нервно-мышечной передачи, инициированной ионами Ba^{2+} . Однако это возможно лишь в весьма специфических условиях эксперимента.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все применимые международные, национальные и институциональные принципы ухода и использования животных при выполнении работы были соблюдены.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. M. A. Mukhamedyarov, S. N. Grishin, A. L. Zefirov, and A. Palotas, *Pflügers Arch.* **458** (3), 563 (2009).
2. П. Г. Костюк, *Кальций и клеточная возбудимость* (Наука, М., 1986).
3. С. Н. Гришин, *Кальциевый ток* (Изд-во Казан. гос. техн. ун-та, Казань, 2010).
4. T. Ohno-Shosaku, S. Sawada, K. Hirata, and C. Yamamoto, *Neurosci. Res.* **20** (3), 223 (1994).
5. H. Helmholtz, *Annalen der Physik und Chemie* **165** (6), 211 (1853).
6. M. Gouy, *J. Phys. Theor. Appl.* **9**, 457 (1910).
7. D. L. Chapman, *Phil. Mag. & J. Sci.* **25** (6), 475 (1913).
8. O. Z. Stern, *Electrochemistry* **30**, 508 (1924).
9. P. G. Kostyuk, *Neuroscience* **92** (4), 1157 (1999).
10. G. Cota and E. Stefani, *J. Physiol.* **351**, 135 (1984).
11. L. Tang, T. M. Gamal El-Din, J. Payandeh, et al., *Nature* **505** (7481), 56 (2014).

12. F. Neumaier, M. Dibué-Adjei, J. Hescheler, and T. Schneider, *Prog. Neurobiol.* **301** (15), 24 (2015).
13. B. Katz and R. Miledi, *J. Physiol.* **203** (2), 459 (1969).
14. D. A. Nachshen and M. P. Blaustein, *J. Gen. Physiol.* **79** (6), 1065 (1982).
15. H. D. Lux and K. Nagy, *Pflugers Arch.* **391** (3), 252 (1981).
16. R. DiPolo, C. Caputo, and F. Bezanilla, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80** (6), 1743 (1983).
17. D. Tillotson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76** (3), 1497 (1979).
18. P. Brehm, R. Eckert, and D. Tillotson, *J. Physiol.* **306**, 193 (1980).
19. R. Eckert and D. L. Tillotson, *J. Physiol.* **314**, 265 (1981).
20. A. M. Brown, K. Morimoto, Y. Tsuda, and D. L. Wilson, *J. Physiol.* **320**, 193 (1981).
21. S. N. Grishin, *Biochemistry (Mosc.), Suppl. Ser. A: Membrane and Cell Biology* **8** (3), 213 (2014).
22. M. A. Mukhamedyarov, S. N. Grishin, A. L. Zefirov, and A. Palotas, *Brain Res. Bull.* **69**, 652 (2006).
23. A. U. Ziganshin, A. E. Khairullin, C. H. V. Hoyle, and S. N. Grishin, *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 6423 (2020).
24. P. Fatt and B. Katz *Cold. Spring. Harb. Symp. Quant. Biol.* **17**, 275 (1952).
25. J. Del Castillo and B. Katz, *J. Physiol.* **124** (3), 553 (1954).
26. Z. L. Blioch, I. M. Glagoleva, E. A. Liberman, and V. A. Nenashev, *J. Physiol.* **199** (1), 11 (1968).
27. A. W. Liley, *J. Physiol.* **134** (2), 427 (1956).
28. J. I. Hubbard, *J. Physiol.* **159**, 507 (1961).
29. D. Elmqvist and D. S. Feldman, *J. Physiol.* **181** (3), 487 (1965).
30. R. Anwyl, T. Kelly, and F. Sweeney, *Brain. Res.* **246** (1), 127 (1982).
31. M. J. Curtis, D. M. Quastel, and D. A. Saint, *J. Physiol.* **373**, 243 (1986).
32. S. N. Grishin, *Biochemistry (Moscow), Suppl. Ser. A: Membrane and Cell Biology* **10** (2), 99 (2016).
33. P. Fatt and B. Katz, *J. Physiol.* **111**, 46 (1950).
34. E. M. Silinsky, *Br. J. Pharmacol.* **59** (1), 215 (1977).
35. I. S. Magura, *J. Membr. Biol.* **35** (3), 239 (1977).
36. G. Neves, A. Neef, and L. Lagnado, *J. Physiol.* **535**, 809 (2001).
37. A. L. Zefirov and P. N. Grigor'ev, *Neurosci. Behav. Physiol.* **40** (4), 389 (2010).

Neuromuscular Transmission in a Barium Environment

S.N. Grishin, A.E. Khairullin, A.Y. Teplov, and M.A. Mukhamedyarov

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

The problem of the neuromuscular junction of amphibians (lake frogs) in a calcium-free medium was studied. It is known that activation of potential-dependent calcium channels is necessary to initiate the release of neurotransmitter into the synaptic cleft. In our initial experiments, we demonstrated depression of evoked postsynaptic responses up to their complete disappearance in a calcium-free environment as it was described by many authors. In our experiments, when Ringer's solution that contained a normal ionic content of Ca^{2+} was replaced with a calcium-free Ringer that had an equimolar content of Ba^{2+} , the amplitude of the end plate currents decreased by a factor of more than ten, although it remained at the same level during the entire observation time for more than one hour. Then, caffeine, that was required to initiate calcium release from ryanodine-sensitive Ca^{2+} stores, was used for fairness. Responses elicited by 100 μM caffeine exclusively after the administration of barium were observed again (in a specific overtightened uneven shape) only after the application of 4-aminopyridine (100 μM) and lasted just the first few minutes. Further, the evoked currents were blocked again, only "flashes" of miniature postsynaptic currents were seen in response to each stimulation. In this work, we have confirmed the fundamental possibility of neuromuscular junction initiated by barium ions, even under very specific experimental conditions.

Keywords: neuromuscular junction, barium ions, alkaline earth metals, potential-dependent calcium channels, induced quantum secretion