

## ГИПЕРКАЛЬЦИЕВАЯ МОДЕЛЬ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ПОСТСИНАПТИЧЕСКИХ ЭФФЕКТОВ АТФ

© 2022 г. А.Е. Хайруллин\*, \*\*, #, С.Н. Гришин\*, А.Ю. Теплов\*, А.А. Еремеев\*\*, Т.В. Балтина\*\*, А.У. Зиганшин\*

\*Казанский государственный медицинский университет, ул. Бутлерова, 49, Казань, 420012, Россия

\*\*Казанский федеральный университет, ул. Кремлёвская, 18, Казань, 420008, Россия

#E-mail: khajrulli@yandex.ru

Поступила в редакцию 27.06.2022 г.

После доработки 27.06.2022 г.

Принята к публикации 11.07.2022 г.

Выявление пре- и постсинаптических эффектов АТФ методологически весьма сложная задача. Ранее мы использовали технику карбахолин-индуцированных сокращений для оценки вовлеченности P2-сигнализации в процессы синаптической передачи. Поиск моделей, позволяющих фиксировать постсинаптическое звено пуриnergической сигнализации в условиях электрической стимуляции привел нас к идее купировать пресинаптический сегмент АТФ-опосредованной модуляции. В экспериментах *in vitro* на выделенных нервно-мышечных препаратах *m. soleus* и *m. EDL* крысы методом изометрической электростимуляционной механомиографии выявлены постсинаптические эффекты АТФ на фоне гиперкальциевой среды. Так, влияние АТФ на фоне повышенного содержания  $\text{Ca}^{2+}$  проявилось в полуторном усилении сокращения на *m. soleus* и угнетении сократимости *m. EDL*, что соотносилось с данными, полученными ранее на карбахолин-вызванных сокращениях. Нами продемонстрированы АТФ-зависимые процессы, локализованные в постсинаптическом сегменте, способные вносить существенный вклад в реализацию механизмов адаптации в условиях гипотермии.

*Ключевые слова:* нервно-мышечный синапс, гиперкальциевая модель, АТФ, сурамин, постсинаптические эффекты.

DOI: 10.31857/S0006302922060205, EDN: LLXPKJ

Важная роль ионов кальция в регуляции функциональной активности почти всех клеток и тканей неоспорима. В покое концентрация свободного кальция в цитоплазме крайне мала – примерно в двадцать тысяч раз ниже, чем во внеклеточной среде. Повышение содержания ионов кальция до  $10^{-6}$ – $10^{-5}$  М запускает каскад биохимических реакций, в результате которых, например, может произойти экзоцитоз медиатора в синаптическую щель из нервного окончания.

К настоящему времени безусловно доказано, что в нервно-мышечном соединении АТФ модулирует амплитуду многоквантовых токов, активируя пресинаптические P2Y-рецепторы [1–3]. Угнетающее действие АТФ на амплитуду пресинаптических токов может быть обусловлено изменением активности кальциевых каналов, вход кальция через которые запускает процесс экзоцитоза синаптических везикул. Действительно, АТФ обратимо снижала  $\text{Ca}^{2+}$ -ток в перисинаптическом отделе аксона [4] и уменьшала амплитуду  $\text{Ca}^{2+}$ -транзientа, зарегистрированного в различ-

ных отделах нервной терминали лягушки [5]. Изменение амплитуды  $\text{Ca}^{2+}$ -транзientа отражает изменение концентрации свободных ионов кальция внутри терминали [6], и ее изменение при действии АТФ может свидетельствовать о влиянии этого пурина на активность пресинаптических кальциевых каналов. На нервной терминали функционируют несколько типов потенциал-зависимых кальциевых каналов [7].

В мионевральных синапсах теплокровных является не только пресинаптический, но и постсинаптический эффект АТФ [8–10]. При этом в синапсе «быстрой» мышцы эффект схож по знаку с негативным постсинаптическим, тогда как в «медленных» двигательных единицах он, наоборот, потенцирующий. Является ли постсинаптическое модулирующее действие АТФ в мионевральных синапсах теплокровных таким же  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимым?

### МЕТОДЫ

Исследования проводили на мышечных препаратах белых лабораторных крыс-самцов массой

140–180 г, которых содержали в группах по три-пять особей с водой и пищей *ad libitum*. Животных погружали в наркоз, вводя внутривенно этилэфрин натрия в дозе 40 мг/кг, обескровливали и выделяли на задних конечностях *m. soleus* (камбаловидную мышцу) и *m. EDL* (длинный разгибатель пальцев). Выделенные мышцы фиксировали вертикально, присоединяя один конец к датчику механической активности, и погружали в ванночки объемом 10 мл, заполненные раствором Кребса следующего состава (в мМ): NaCl – 118.0, KCl – 4.75, CaCl<sub>2</sub> – 2.5, NaHCO<sub>3</sub> – 24.8, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 1.18, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O – 1.18, глюкоза – 11, рН 7.4,  $t = 37.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$ . Термостат поддерживал заданное значение температуры. Мышцы были растянуты начальной нагрузкой в 1 г, далее оставались в покое на 30 мин для привыкания к среде.

Сокращения регистрировали сначала в нормальном растворе Кребса, а потом в растворе с повышенным содержанием ионов кальция (7.2 мМ).

Электростимуляцию проводили путем стимуляции культы нерва, которую помещали в сакшн-электрод оригинальной конструкции. Для раздражения использовали стимулятор MultiStim D330 (Digitimer Ltd, Великобритания). Сокращения мышц вызывали стимуляцией прямоугольными импульсами частотой 0.1 Гц, длиной 0.5 мс и амплитудой 10 В в течение 2 мин. Силу сокращений регистрировали изометрическим датчиком механической активности FSG-01 (Linton, Великобритания), аналоговый сигнал оцифровывали и обрабатывали с помощью системы сбора данных Biopack MP100WSW (Biopack, США). Средние значения всех сокращений, полученных в течение 2 мин (12 ответов), обрабатывали как один результат [11]. Сократительные ответы рассчитывали в процентах относительно исходных результатов, полученных в начале эксперимента.

Через 30 мин после фиксации ткани проводили контрольную стимуляцию мышц дважды с интервалом в 5 мин, удостоверившись в стабильности сократительных ответов, начинали экспериментальные процедуры.

В ванночку с раствором Кребса добавляли 100 мкМ АТФ и оценивали сократительные ответы мышцы через 10 мин. Далее ткань инкубировали с неселективным антагонистом P<sub>2</sub>-рецепторов сураминол (100 мкМ) в течение 20 мин с последующим добавлением АТФ и вновь регистрировали сократительные ответы.

Все полученные данные рассчитывали в процентах относительно исходных результатов, полученных в начале эксперимента при 37°C.

Влияние температуры на сократительную активность *m. soleus* и *m. EDL* оценивали в экспериментах с АТФ и сураминол при инициировании сокращения как электрическим полем, так и аппликацией карбахолина при температуре 37°C.

Далее температуру последовательно снижали до 34, 30, 26, 22, 18 и 14°C. При каждой температуре добавляли АТФ и оценивали сократительные ответы мышцы через 10 мин после аппликации. Далее ткань инкубировали с сураминол в течение 20 мин с последующим добавлением АТФ. Температуру раствора регулировали с помощью водяного насоса TE-8A (Techne, Великобритания), быстрое снижение температуры жидкости в водяном насосе проводили добавлением льда.

Результаты механомиографических экспериментов на *m. soleus* и *m. EDL* крысы анализировали с применением метода ANOVA. За достоверный принимали уровень значимости менее 0.05. Экспериментальные данные представлены как среднее арифметическое  $\pm$  стандартная ошибка среднего ( $n$  – число нервно-мышечных препаратов для механо-миографических экспериментов).

## РЕЗУЛЬТАТЫ

При увеличении концентрации внеклеточного кальция до 7.2 мМ сила сокращения «медленной» и «быстрой» двигательных единиц достоверно не изменилась. Так, при 37°C амплитуда сокращений составила  $102 \pm 8.2\%$  ( $n = 11, p > 0.05$ ) для *m. soleus* и  $104 \pm 3.9\%$  ( $n = 11, p > 0.05$ ) для *m. EDL* относительно сокращений при нормальном содержании кальция [12, 13].

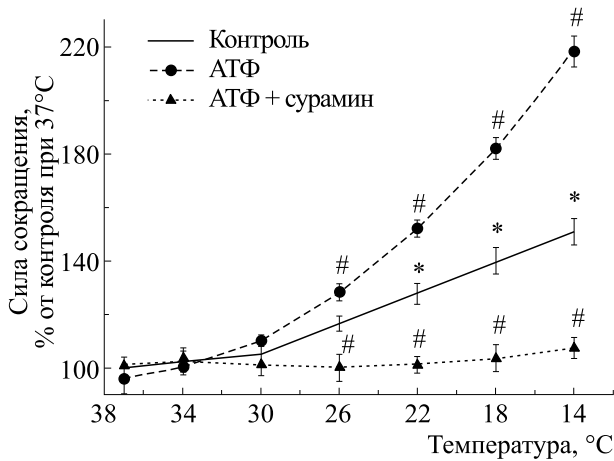
АТФ в концентрации 100 мкМ при 37°C никак достоверно не модифицировала силу сокращения камбаловидной мышцы ( $95.8 \pm 5.1\%$  от исходных значений до подачи агента,  $n = 11, p > 0.05$ ).

При понижении температуры омывающего камбаловидную мышцу раствора эффект экзогенной АТФ в концентрации 100 мкМ проявлялся в экспоненциальном повышении силы сокращения вплоть до полуторного увеличения при 14°C. Так, при этой температуре на 10-й минуте сила сокращения составила  $214.6 \pm 5.7\%$  ( $n = 12, p < 0.05$ ) от значения этого параметра до подачи АТФ при 37°C (рис. 1).

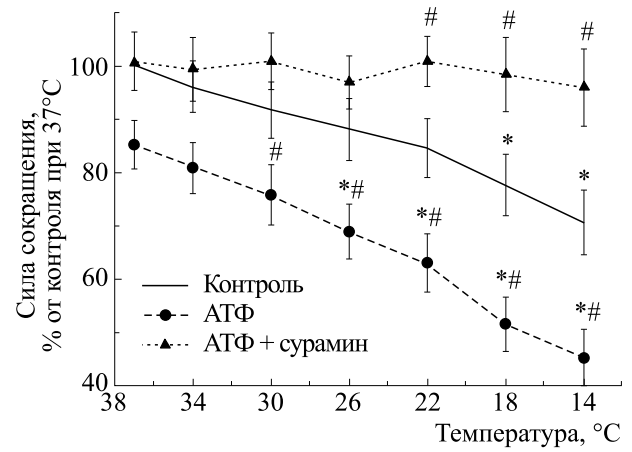
Неселективный антагонист P<sub>2</sub>-рецепторов сурамин в концентрации 100 мкМ отменял не только потенцирующий эффект экзогенной АТФ, но и гипотермия-ассоциированные изменения сократимости *m. soleus*.

При увеличении до 7.2 мМ концентрации внеклеточного кальция АТФ в концентрации 100 мкМ при 37°C угнетала силу сокращения мышцы длинного разгибателя пальцев ( $85.2 \pm 5.6\%$  от исходных значений до подачи АТФ,  $n = 11, p > 0.05$ ).

При понижении температуры омывающего исследуемую мышцу раствора проявлялось усиление ингибиторного эффекта экзогенной АТФ в концентрации 100 мкМ. Так, при этой температуре на 10-й минуте сила сокращения составила



**Рис. 1.** Эффекты АТФ при повышенной концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  (7.2 мМ) на силу вызванных электрическим током сокращений *m. soleus* в контроле и при аппликации сурамина в концентрации 100 мкМ при различных температурных режимах;  $n = 8 - 14$ ; \* -  $p < 0.05$  от эффекта при 37°C; # -  $p < 0.05$  от контроля.



**Рис. 2.** Эффекты АТФ при повышенной концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  (7.2 мМ) на силу вызванных электрическим током сокращений *m. EDL* в контроле и при аппликации сурамина в концентрации 100 мкМ, при различных температурных режимах;  $n = 8 - 14$ ; \* -  $p < 0.05$  от эффекта при 37°C; # -  $p < 0.05$  от контроля.

$43.1 \pm 4.6\%$  ( $n = 12$ ,  $p < 0.05$ ) от значения этого параметра до подачи АТФ (рис. 2).

Сурамин (100 мкМ) в инкубационной среде предупреждал не только влияние АТФ на мышцу, но и частично ингибиторный эффект гипотермии на сокращения *m. EDL*.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Высвобождение нейромедиатора из нервных окончаний позвоночных модулируется пуринами: действуя через пуриновые рецепторы, они изменяют квантовый состав [2–6]. Но общеизвестно, что при этом как квантовый состав, так и кинетика секреции нейротрансмиттера напрямую зависят от уровня  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  в пресинаптических окончаниях [14, 15].

Нами было показано в периневральном отведении, что именно АТФ, а не его метаболит аденозин (как считалось ранее) ингибирует кальциевый вход в терминаль мотонейрона [2–4]. АТФ оказывает пресинаптическое ингибиторное действие на квантовый состав как через активацию фосфолипазы  $A_2$ , так и посредством синтеза пероксида водорода [2]. В наших экспериментах последовательные продукты активации фосфолипазы  $A_2$  арахидоновая кислота и простагландин  $E_2$  так же, как и АТФ, на одну шестую снижали амплитуду кальциевой составляющей.

В представленной работе показана возможность выявления постсинаптических эффектов АТФ в условиях непрямого электростимуляции на фоне гиперкальциевой среды. Дана дифференцированная оценка степени участия АТФ-зависи-

мых механизмов в различных отделах мионеврального соединения. Использованная экспериментальная модель позволяет выявлять преимущественно постсинаптические эффекты пуринов, которые становятся более выражены в условиях гипотермии [16].

Существует данные, что гипотермия угнетает кальциевый ток через L-тип каналов [17]. Известно, что повышение концентрации внеклеточного кальция приводит к ряду пресинаптических эффектов, в том числе и к устранению пресинаптического ингибиторного действия АТФ [2, 8, 18]. С другой стороны, не обнаружено какого-либо значительного действия  $\text{Ca}^{2+}$  на постсинаптические холинорецепторы [19].

В наших экспериментах при повышенном содержании внеклеточного кальция при обычной электростимуляции воспроизводился потенцирующий эффект АТФ, который можно наблюдать при базовом перфузирующем растворе только при карбахолин-вызванных сократительных ответах [12, 13]. Это косвенно подтверждает постсинаптический характер действия данного пурина. Как известно, АТФ кроме выполнения в организме роли макроэрга является медиатором синаптической передачи [4].

Если при нормотермии АТФ не оказывает значимого эффекта на силу сокращения «медленной» мышцы, то гипотермия приводила к значительному приросту к силе сокращения и потенцирующему действию АТФ.

Различие динамики показателей, характеризующих постсинаптическое звено демонстрирует комплексную картину участия пуринов в адаптации мионеврального соединения к гипотермии.

## ВЫВОДЫ

Приведенные в данной статье данные определенно доказывают, что гиперкальциевая модель может использоваться для вычленения постсинаптических эффектов АТФ в работах на нервно-мышечных препаратах. Верификация данной модели как раз и дала доказательства того, что постсинаптические эффекты АТФ — как потенцирующий в «медленной» мышце, так и ингибирующий в «быстрой» мышце — являются кальций-независимыми.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках программы «Стратегическое академическое лидерство» (ПРИОРИТЕТ-2030) Казанского федерального университета, а также за счет средств субсидии, выделенной Казанскому государственному медицинскому университету Минздрава России на проведение научных исследований в рамках Программы развития Университета.

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все манипуляции с экспериментальными животными проведены в соответствии с Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых в научных исследованиях.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. J. G. Nicholls, A. R. Martin, B. G. Wallace, and P. A. Fuchs, Sinauer Associates, Inc. 672 (2001).
2. E. Sokolova, S. Grishin, A. Shakirzyanova, et al., *Eur. J. Neurosci.*, **18**, 1254 (2003).
3. С.Н. Гришин и А. У. Зиганшин, *Биол. мембраны*, **30**, (4), 243 (2013).
4. A. U. Ziganshin, C. H. V. Hoyle, A. E. Khairullin, and S. N. Grishin, *Int. J. Mol. Sci.*, **21** (17), 6423 (2020).
5. S. Grishin, A. Shakirzyanova, and A. Giniatullin, *Eur. J. Neurosci.*, **21**, 1271 (2005).
6. E. Khaziev, A. Golovyahina, and E. Bukharaeva, *Bio-NanoSci*, **7**, 254 (2017).
7. A. N. Tsentsevitsky, D. V. Samigullin, L. F. Nurullin, et al., in *Frogs: Genetic Diversity, Neural Development and Ecological Implications* (Nova Science Publishers, Inc., New York, 2014), pp. 179–194.
8. С. Н. Гришин, *Биол. мембраны*, **31** (3), 155 (2014).
9. A. E. Khairullin, A. Yu. Teplov, S. N. Grishin, et al., *Biophysics*, **64**, 812 (2019).
10. A. E. Khairullin, A. U. Ziganshin, and S. N. Grishin, *Biophysics*, **65**, 858 (2020).
11. R. A. Eshpay, A. E. Khairullin, R. G. Karimova, et al., *Genes and Cells*, **10** (4), 123 (2015).
12. A. U. Ziganshin, A. E. Khairullin, A. Y. Teplov, et al., *Muscle & Nerve*, **59** (4), 509 (2019).
13. A. U. Ziganshin, A. E. Khairullin, V. V. Zobov, et al., *Muscle & Nerve*, **55** (3), 417 (2017).
14. B. Katz and R. Miledi, *Proc. Roy. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, **16** (161), 496 (1965).
15. D. Samigullin, E. A. Bukharaeva, E. E. Nikolsky, and F. Vyskočil, *Physiol. Res.*, **54** (1), 129 (2005).
16. A. E. Khairullin, A. U. Ziganshin, and S. N. Grishin, *Biochemistry (Moscow). Suppl. Ser. A: Membrane and Cell Biology*, **11** (1), 1 (2017).
17. A. Findsen, J. Overgaard, and T. H. Pedersen, *J. Exp. Biol.*, **219**, 2340 (2016).
18. G. Burnstock, T. R. Arnett, and I. R. Orriss, *Purinergic Signal*, **9** (4), 541 (2013).
19. R. E. Poage and S. D. Meriney, *Physiology & Behavior*, **77** (4–5), 507 (2002).

## A High Calcium Level-Based Model for Identifying Postsynaptic Effects of ATP

A.E. Khairullin\*, \*\*, S.N. Grishin\*, A.Yu. Teplov\*, A.A. Ereemeev\*\*,  
T.V. Baltina\*\*, and A.U. Ziganshin\*

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

\*\*Kazan Federal University, Kremlevskaya ul. 18, Kazan, 420008 Russia

To identify the pre- and postsynaptic effects of ATP is indeed a methodological challenge. In our previous study, the role of P2 receptor signaling in synaptic transmission processes was evaluated using carbachol-induced skeletal muscle contractions. The search for models that can record the postsynaptic side of purinergic signaling during the application of electrical stimulation led to the idea of controlling the presynaptic terminal of ATP-mediated modulation. In *in vitro* experiments, the electromyograms and mechanomyograms during isometric contractions of isolated nerve-muscle preparations of rat soleus and extensor digitorum longus (EDL) muscles revealed postsynaptic effects of ATP in presence of high intracellular calcium level. Thus, the effects of ATP in presence of increased  $Ca^{2+}$  content were seen through contraction of soleus muscles that started to contract quicker by half and inhibition of contractility of EDL muscles; it was in accord with the data obtained earlier on carbachol-induced contractions. We have demonstrated ATP-dependent processes in the postsynaptic side that may contribute significantly to adaptation mechanisms in hypothermia.

*Keywords: neuromuscular synapse, hypercalcium model, ATP, suramin, postsynaptic effects*