

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ  
СТАТЬИ

ВКЛАД КАЛЬЦИЕВЫХ КАНАЛОВ L-ТИПА В СЕКРЕЦИЮ АЦЕТИЛХОЛИНА  
В НЕРВНО-МЫШЕЧНЫХ СОЕДИНЕНИЯХ ЛЯГУШКИ И МЫШИ  
ПРИ АКТИВНЫХ И ИНАКТИВИРОВАННЫХ ПОТЕНЦИАЛ-ЗАВИСИМЫХ  
КАЛИЕВЫХ КАНАЛАХ

© 2019 г. А. Н. Ценцевичский<sup>1,2</sup>, В. Ф. Хузахметова<sup>1,2</sup>,  
Э. Ф. Хазиев<sup>1,2</sup>, И. В. Ковязина<sup>1,2,3,\*</sup>

<sup>1</sup>Казанский институт биохимии и биофизики ФИЦ КазНЦ РАН, Казань, Россия

<sup>2</sup>Казанский федеральный университет, Казань, Россия

<sup>3</sup>Казанский государственный медицинский университет, Казань, Россия

\*E-mail: irina.kovyazina@list.ru

Поступила в редакцию 24.06.2019 г.

После доработки 23.07.2019 г.

Принята к публикации 03.08.2019 г.

Исследование посвящено изучению вклада  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов L-типа в вызванную секрецию ацетилхолина из двигательных нервных окончаний лягушки и мыши при активных и инактивированных потенциал-зависимых  $\text{K}^{+}$ -каналах. Оценивали эффекты специфического блокатора  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов L-типа нитрендипина на квантовый состав токов концевой пластинки и временной ход секреции квантов ацетилхолина в интактных препаратах и после предварительной блокады потенциал-активируемых  $\text{K}^{+}$ -каналов 4-аминопиридином (4-АП) в условиях сниженного и физиологического уровня  $\text{Ca}^{2+}$  в среде. Флуоресцентным методом измеряли кальциевый транзиент, отражающий интегральный вход  $\text{Ca}^{2+}$  в нервное окончание, и осуществили компьютерное моделирование процессов, лежащих в основе экзоцитоза при наличии двух типов  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов (N- и L-типов) и разной длительности потенциала действия нервного окончания. Показано, что в синапсах лягушки  $\text{Ca}^{2+}$ -каналы L-типа вносят вклад в вызванную секрецию ацетилхолина и при активных  $\text{K}^{+}$ -каналах, но только в условиях сниженного уровня  $\text{Ca}^{2+}$  в среде; при инактивации потенциал-зависимых  $\text{K}^{+}$ -каналов вклад каналов L-типа в секреторный процесс становится менее существенным. При физиологическом уровне  $\text{Ca}^{2+}$  участие каналов L-типа в вызванной секреции ацетилхолина проявляется, как и в синапсах мыши, лишь в условиях блокады потенциал-зависимых  $\text{K}^{+}$ -каналов.

*Ключевые слова:* нервно-мышечный синапс, калиевый канал, кальциевый канал, ацетилхолин

DOI: 10.1134/S0869813919100108

В нервно-мышечных синапсах основными пресинаптическими  $\text{Ca}^{2+}$ -каналами, инициирующими нейросекрецию, являются каналы N-типа ( $\text{Ca}_v2.2$ ) у амфибий, а в синапсах млекопитающих – P/Q-типа ( $\text{Ca}_v2.1$ ) [1, 2]. Ранее было показано, что вход  $\text{Ca}^{2+}$  в нервное окончание через  $\text{Ca}^{2+}$ -каналы L-типа ( $\text{Ca}_v1.1$ ) также вносит вклад в процесс вызванного квантового освобождения ацетилхолина (АХ) в моторных синапсах лягушки и мыши [3–7]. Иммуногистохимический анализ показал наличие

Ca<sup>2+</sup>-каналов L-типа в области нервно-мышечных контактов крысы (Ca<sub>v</sub>1.2 под-типа) и лягушки (Ca<sub>v</sub>1.3 и Ca<sub>v</sub>1.4) [8, 9].

Особенностью Ca<sup>2+</sup>-каналов L-типа является высокий порог активации, длительное время нахождения в открытом состоянии, Ca<sup>2+</sup>-зависимая инактивация и то, что они расположены на удалении от зон, где происходит освобождение синаптических везикул [2]. Пролонгированный вход Ca<sup>2+</sup> через эти каналы может обуславливать более позднее высвобождение квантов медиатора, проявляющееся в увеличении фракции постсинаптических ответов с большими синаптическими задержками [8, 9].

Известно, что некоторые подтипы K<sup>+</sup>- и Ca<sup>2+</sup>-каналов колокализированы в нервных окончаниях и их функционирование может быть взаимосвязано [10–15]. Увеличение длительности пресинаптического спайка, обусловленное инактивацией потенциал-зависимых K<sup>+</sup>-каналов, может активировать те Ca<sup>2+</sup>-каналы, которые до этого не были задействованы в нейросекреции. То есть, фармакологическая инактивация потенциал-зависимых K<sup>+</sup>-каналов является удобным инструментом для изучения вклада Ca<sup>2+</sup>-каналов в нейросекрецию [15–17]. В данном исследовании мы поставили задачу исследовать участие Ca<sup>2+</sup>-каналов L-типа в вызванной секреции ацетилхолина (АХ) из двигательных нервных окончаний при активных и инактивированных потенциал-зависимых K<sup>+</sup>-каналах. Для этого оценивали эффекты специфического блокатора Ca<sup>2+</sup>-каналов L-типа нитрендипина [18, 19] на интенсивность вызванной квантовой секреции АХ (квантовый состав ТКП) и временной ход нейросекреции в интактных препаратах и после предварительной блокады потенциал-активируемых K<sup>+</sup>-каналов 4-аминопиридином (4-АП) в условиях сниженного и физиологического уровня Ca<sup>2+</sup> в среде. Кроме того, флуоресцентным методом измеряли кальциевый транзиент, отражающий интегральный вход Ca<sup>2+</sup> в нервное окончание, и осуществили компьютерное моделирование процессов, лежащих в основе экзоцитоза при наличии двух типов Ca<sup>2+</sup>-каналов (N- и L-типов) и разной длительности потенциала действия нервного окончания.

Показано, что существуют особенности участия Ca<sup>2+</sup>-каналов L-типа в вызванной секреции АХ в синапсах лягушки. В этих синапсах каналы L-типа вносят вклад в процесс секреции АХ при активных K<sup>+</sup>-каналах, но только в условиях сниженного уровня Ca<sup>2+</sup> в среде; при инактивации потенциал-зависимых K<sup>+</sup>-каналов вклад каналов L-типа в секреторный процесс становится менее очевидным. При физиологическом уровне Ca<sup>2+</sup> вклад каналов L-типа в вызванную квантовую секрецию АХ проявляется лишь в условиях блокады потенциал-зависимых K<sup>+</sup>-каналов 4-АП, как и в синапсах мыши.

## МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование проводилось в соответствии с принципами Хельсинской декларации и рекомендациями комиссии по биоэтике Казанского государственного медицинского университета.

Исследования проводили на изолированных нервно-мышечных препаратах лягушки (*R. ridibunda*, m. cutaneous pectoris,) и мыши (линия BALB/c, m. diaphragm). Нервно-мышечные препараты помещали в ванночку объемом 5 мл, через которую протекал один из растворов следующего состава, в мМ: 1-й для холоднокровных — 113 NaCl; 2.5 KCl; 5.0 HEPES; 1.5 NaHCO<sub>3</sub>; 1.8 CaCl<sub>2</sub>; 2-й для теплокровных — 150 NaCl; 5 KCl; 5 HEPES; 11 глюкоза; 1.0 MgCl<sub>2</sub>; 2 CaCl<sub>2</sub>. При снижении концентрации Ca<sup>2+</sup>

до 0.3 мМ в раствор добавлялся 4.0 мМ MgCl<sub>2</sub>. рН раствора составлял 7.2–7.4, а температура поддерживалась на уровне 20.0 ± 0.3°С.

Регистрировали вызванные и спонтанные (миниатюрные) токи концевой пластинки (ТКП и МТКП) с последующим расчетом количества освобождаемых квантов (квантовый состав ТКП) и оценкой временного хода секреции нейромедиатора. Регистрация и анализ синаптических сигналов осуществлялся с помощью комплекса, включающего в себя микроэлектродный усилитель (с полосой пропускания от 0.03 до 10 кГц), стимулятор А-М Systems 2100, быстродействующий аналого-цифровой преобразователь (с частотой дискретизации 3 мкс) и компьютер. Данный комплекс позволял измерять синаптические сигналы и анализировать их амплитудно-временные параметры в реальном масштабе времени.

Нерв раздражали прямоугольными стимулами длительностью 100 мкс супрамаксимальной амплитуды с частотой 0.5 имп/с.

При регистрации ТКП методом фиксации потенциала мышечного волокна мембранный потенциал поддерживался на уровне –60 мВ. Для оценки интенсивности секреции (квантового состава ТКП) в условиях нормального уровня Ca<sup>2+</sup> в среде использовали соотношение амплитуд вызванных и миниатюрных ТКП. Сокращения нервно-мышечного препарата лягушки блокировали путем добавления в омывающий раствор  $\mu$ -конотоксина РША (Peptide Institute Inc., Япония). В условиях сниженного уровня Ca<sup>2+</sup> квантовый состав ТКП оценивался по методу “выпадения” [20].

Для блокады потенциал-зависимых K<sup>+</sup>- и Ca<sup>2+</sup>-каналов L-типа использовались специфические блокаторы – 4-аминопиридин (4-АП, 4-aminopyridine, Sigma-Aldrich, США) и нитрендипин (nitrendipine, Sigma-Aldrich, США).

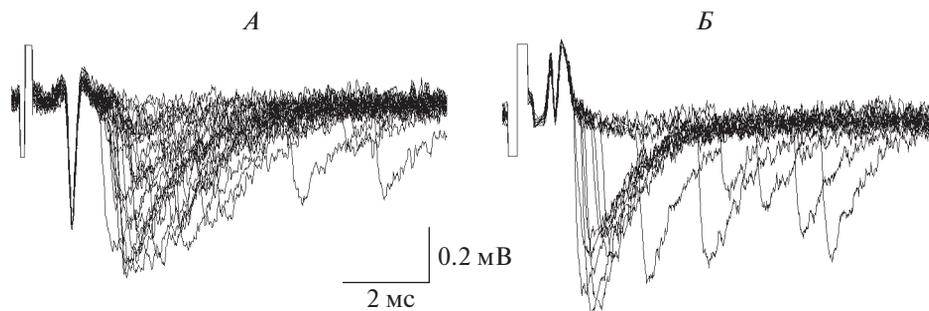
Кинетика секреции нейромедиатора в отдельных активных зонах в условиях пониженного содержания Ca<sup>2+</sup> во внеклеточной среде оценивалась путем анализа кумулятивных гистограмм истинных синаптических задержек одноквантовых ТКП [21] и вычисления параметра P<sub>90</sub>, характеризующего временной интервал, содержащий 90% всех синаптических задержек [4, 7].

Для регистрации относительного изменения уровня Ca<sup>2+</sup> в нервном окончании (Ca<sup>2+</sup>-транзист) использовалась фотометрическая система на базе микроскопа Olympus BX 51, оснащенная высокоскоростной чувствительной камерой Red Shirt Imaging Neuro CCD-smq camera (Red Shirt Imaging, США). Регистрация кальциевого транзиста осуществлялась с использованием специфического Ca<sup>2+</sup>-чувствительного флуоресцентного красителя Oregon Green 488 Bapta 1 (Molecular Probes, США) при нормальном уровне Ca<sup>2+</sup> в среде.

Для компьютерного моделирования процесса экзоцитоза была адаптирована стохастическая модель (метод Монте-Карло) нейросекреторного процесса, описанная подробно в ряде работ [22–25].

В каждом эксперименте регистрировали 200–300 синаптических ответов. Экспериментальные данные представлены как среднее значение ± ошибка среднего.

Для статистической обработки результатов электрофизиологических и оптических экспериментов использовали двухсторонний критерий Стьюдента (для параметрических данных) либо непараметрический критерий Манна–Уитни. Различия считали статистически значимыми на уровне 0.05.



**Рис. 1.** Суперпозиция токов действия нервного окончания и одноквантовых токов концевой пластинки (ТКП) в ответ на стимуляцию двигательного нерва с частотой 0.5 имп/с, зарегистрированных экстраклеточно в одном из типичных экспериментов на нервно-мышечном препарате лягушки (А) и мыши (Б) в условиях сниженной до 0.3 мМ концентрации  $\text{Ca}^{2+}$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

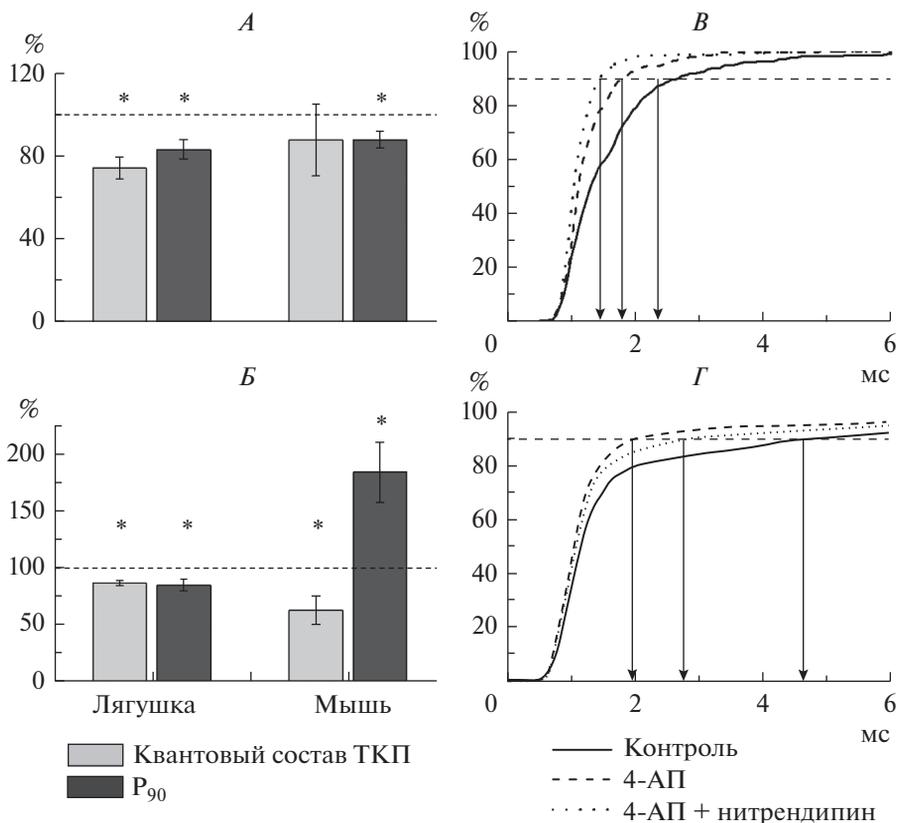
### *Влияние блокатора $\text{Ca}^{2+}$ -каналов L-типа нитрендипина на секрецию АХ в синапсах лягушки и мыши при сниженном уровне $\text{Ca}^{2+}$ в среде*

При сниженной до 0.3 мМ концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  средний квантовый состав ТКП составил  $0.49 \pm 0.07$  в синапсах лягушки ( $n = 12$ ) и  $0.11 \pm 0.02$  ( $n = 7$ ) в синапсах мыши. Длительность секреторного процесса (параметр  $P_{90}$ ) составила соответственно  $1.43 \pm 0.09$  и  $3.6 \pm 0.6$  мс. На рис. 1 представлены типичные токи нервного окончания и одноквантовые ТКП, зарегистрированные в синапсах лягушки и мыши в интактных препаратах.

Как и в предыдущих наших работах [4, 7, 8], блокада  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов L-типа нитрендипином (5 мкМ) в синапсах лягушки вызывала достоверное обратимое снижение интенсивности секреции АХ: на  $24.5 \pm 3.4\%$  ( $p < 0.05$ ,  $n = 12$ ) и синхронизировала секреторный процесс, о чем свидетельствует уменьшение параметра  $P_{90}$  до  $84.5 \pm 5.3\%$  ( $p < 0.05$ ,  $n = 12$ ) от контрольных значений. То есть вход  $\text{Ca}^{2+}$  через каналы L-типа способствует освобождению квантов АХ с длительными синаптическими задержками.

В синапсах мыши аппликация нитрендипина даже в большей концентрации (10 мкМ) не вызывала достоверных изменений квантового состава ТКП, но приводила к небольшой синхронизации секреции на  $12.1 \pm 4.0\%$  ( $p < 0.05$ ,  $n = 7$ , рис. 2А), что согласуется с ранее полученными данными [7]. Аналогичные результаты об отсутствии эффектов блокады каналов L-типа на квантовый состав постсинаптических ответов в интактных препаратах теплокровных были получены и другими исследователями [6, 14, 26].

Блокатор потенциал-активируемых  $\text{K}^+$ -каналов 4-АП (1 мкМ) в условиях сниженного уровня  $\text{Ca}^{2+}$  вызывал увеличение квантового состава ТКП в синапсах лягушки (на  $173 \pm 34\%$ ), а также синхронизировал секрецию АХ – параметр  $P_{90}$  снижался в среднем на  $24 \pm 9\%$  ( $n = 8$ ,  $p < 0.05$ , рис. 2В). Аналогичные результаты были получены и для синапсов мыши (4-АП, 5 мкМ): квантовый состав ТКП увеличился на  $238 \pm 66\%$ , а параметр  $P_{90}$  снижался в среднем на  $40 \pm 19\%$  ( $n = 7$ ,  $p < 0.05$ , рис. 2Г). Увеличение квантового освобождения АХ связано, по-видимому, с повышенной вероятностью активации  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов при продолжительной деполяризации нервного окончания в условиях блокады калиевых каналов [27]. Известно, что 4-АП может напрямую активировать высокопороговые  $\text{Ca}^{2+}$ -каналы [28], однако этот эффект проявляется явно лишь при высоких (0.1 мМ и выше) концентрациях



**Рис. 2.** А–Б. Относительное изменение квантового состава ТКП (светло-серые столбцы) и параметра  $P_{90}$  (темно-серые столбцы) под действием нитрендипина в препаратах с интактными  $K^+$ -каналами (А) и после их предварительной инактивации 4-АП (Б).  $n = 8-11$  для каждой экспериментальной серии. \*  $p < 0.05$ . За 100% приняты значения квантового состава ТКП и параметра  $P_{90}$  до аппликации нитрендипина. В–Г. Нормированные кумулятивные кривые истинных синаптических задержек ТКП, зарегистрированных в типичных экспериментах в синапсах лягушки (В) и мыши (Г). Показаны изменения распределений синаптических задержек в контроле (сплошные линии), в присутствии 4-АП (штриховые линии) и в присутствии 4-АП и нитрендипина (пунктирные линии).  $n = 200-300$  ТКП, зарегистрированных в одной концевой пластинке.

этого соединения. Изменение синхронности секреции АХ в присутствии 4-АП можно объяснить увеличением входа в нервное окончание  $Ca^{2+}$ , что, как было показано ранее [29], синхронизирует процесс секреции нейромедиатора.

Блокада  $Ca^{2+}$ -каналов L-типа нитрендипином в присутствии 4-АП приводила к различным изменениям параметров секреции АХ в синапсах лягушки и мыши. Так, в синапсах мыши под воздействием нитрендипина наблюдалось существенное снижение квантовой секреции ацетилхолина (на  $37 \pm 12\%$ ,  $n = 8$ ,  $p < 0.05$ ), которого не было в препаратах с активными  $K^+$ -каналами (рис. 2Б). То есть можно предположить, что в нервно-мышечных синапсах мыши увеличение квантового состава ТКП в присутствии 4-АП обусловлено в значительной степени вовлечением в секреторный процесс  $Ca^{2+}$ -каналов L-типа. Интересно отметить, что в нервно-мышечных контактах мыши аппликация нитрендипина после предварительной

блокады  $K^+$ -каналов приводила к десинхронизации секреции (увеличение параметра  $P_{90}$  на  $84 \pm 27\%$  по сравнению с уровнем в 4-АП,  $n = 8$ ,  $p < 0.05$ , рис. 2Г), вероятно обусловленную снижением входа  $Ca^{2+}$  в нервное окончание через  $Ca^{2+}$ -каналы L-типа.

В синапсах лягушки аппликация нитрендипина в условиях блокады потенциал-чувствительных  $K^+$ -каналов 4-АП также вызывала снижение квантового состава ТКП, однако это снижение было достоверно меньше, чем в препаратах с интактными  $K^+$ -каналами (на  $13.0 \pm 2.1\%$ ,  $p < 0.05$ , критерий Манна–Уитни,  $df = 17$ ). Изменение степени синхронности секреции АХ после блокады  $Ca^{2+}$ -каналов L-типа в синапсах лягушки было одинаковым при активных и инактивированных  $K^+$ -каналах.

*Влияние блокатора  $Ca^{2+}$ -каналов L-типа нитрендипина на секрецию АХ в синапсах лягушки при физиологическом уровне  $Ca^{2+}$  в среде*

Чтобы оценить вклад каналов L-типа в вызванную секрецию АХ в условиях физиологического уровня  $Ca^{2+}$  в синапсах лягушки, были проведены эксперименты по регистрации многоквантовых ТКП и МТКП методом фиксации мембранного потенциала мышечного волокна.

Эксперименты показали, что при физиологическом уровне  $Ca^{2+}$  нитрендипин (5 мкМ) не оказывал достоверного влияния на параметры ТКП и МТКП. Так, амплитуда ТКП в контроле составила  $354 \pm 81$  нА, а в присутствии нитрендипина –  $353 \pm 91$  нА ( $p > 0.05$ ,  $n = 6$ ). Временные параметры ТКП тоже достоверно не менялись: время роста составило  $265 \pm 15$  и  $287 \pm 31$  мкс соответственно, а постоянная времени спада  $1.29 \pm 0.19$  и  $1.34 \pm 0.18$  мс. Амплитуда миниатюрных ТКП также не претерпевала достоверных изменений в присутствии нитрендипина: амплитуда МТКП составила, соответственно,  $4.2 \pm 0.3$  и  $4.4 \pm 0.4$  нА ( $p > 0.05$ ,  $n = 6$ ).

Аппликация 4-АП (1 мкМ) вызывала достоверное увеличение амплитуды ТКП (на  $29 \pm 9\%$ ,  $p < 0.05$ ,  $n = 6$ ), что согласуется с данными других авторов [16, 30–32], не оказывая влияния на временные параметры многоквантовых ответов и амплитудно-временные характеристики МТКП. Однако после предварительной блокады потенциал-зависимых  $K^+$ -каналов 4-АП нитрендипин достоверно снижал квантовый состав ТКП (на  $20 \pm 4\%$ ,  $p < 0.05$ ,  $n = 5$ ). Временные параметры ТКП и амплитудно-временные характеристики МТКП при этом также достоверно не менялись.

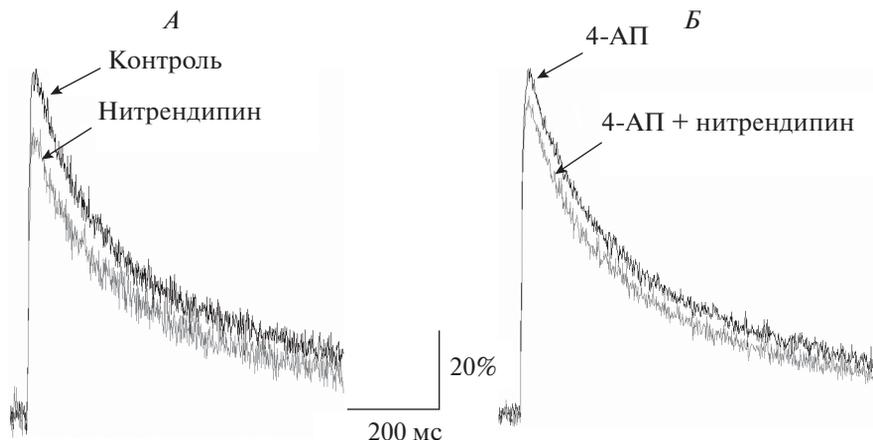
Таким образом, в условиях, близким к физиологическим, участие  $Ca^{2+}$ -каналов L-типа в вызванной секреции квантов АХ в нервно-мышечных контактах лягушки проявлялось только при инактивированных потенциал-зависимых  $K^+$ -каналах, как и в синапсах мышцы.

*Влияние блокады  $Ca^{2+}$ -каналов L-типа на амплитуду кальциевого транзientа в синапсах лягушки при активных и инактивированных потенциал-зависимых  $K^+$ -каналах.*

На рис. 3 представлены кальциевые сигналы, зарегистрированные флуоресцентным методом в одном из характерных экспериментов.

Измерение амплитуды кальциевого транзientа в нервном окончании лягушки в условиях нормального уровня  $Ca^{2+}$  и при низкой частоте стимуляции нерва (0.5 имп/с) показало, что инактивация потенциал-чувствительных  $K^+$ -каналов 4-АП (1 мкМ) приводит к увеличению величины кальциевого сигнала на  $43 \pm 15\%$  ( $n = 8$ ,  $p < 0.05$ ) по сравнению с интактными препаратами.

Блокада  $Ca^{2+}$ -каналов L-типа нитрендипином (5 мкМ) после предварительной инкубации препарата с 4-АП приводила к достоверному снижению амплитуды



**Рис. 3.** Нитрендипин снижает амплитуду кальциевого транзientа при интактных (А) и при инактивированных 4-АП (Б) потенциал-зависимых  $K^+$ -каналах. Представлено усреднение 40 сигналов, зарегистрированных в одном из типичных экспериментов на нервно-мышечном препарате лягушки. За 100% приняты значения амплитуды транзientа в контроле (А) и при блокировании  $K^+$ -каналов (Б).

кальциевого транзientа (на  $15 \pm 4\%$ ,  $p < 0.05$ ,  $n = 11$ , рис. 3Б), но различие в действии нитрендипина при активных и инактивированных  $K^+$ -каналах было недостоверным: при активных  $K^+$ -каналах кальциевый транзient также снижался на  $19 \pm 7\%$  ( $p < 0.05$ ,  $n = 12$ , рис. 3А), что согласуется с ранее полученными данными [33]. Следовательно, относительный вклад  $Ca^{2+}$ -каналов L-типа в общий кальциевый сигнал не зависит от активности потенциал-зависимых  $K^+$ -каналов.

Различие между результатами электрофизиологических экспериментов и опытов по оптической регистрации кальциевых сигналов можно объяснить тем, что кальциевый транзient отражает интегральное изменение уровня  $Ca^{2+}$  во всем объеме нервного окончания в течение длительного периода времени (500–700 мс после стимуляции нерва). То есть  $Ca^{2+}$ -каналы L-типа могут вносить вклад в кальциевый метаболизм нервного окончания и при активных потенциал-зависимых  $K^+$ -каналах, но их роль не ограничивается вкладом в вызванную квантовую секрецию, а может затрагивать и другие клеточные функции, такие как регуляция асинхронной и спонтанной секреции, выхода  $Ca^{2+}$  из эндоплазматического ретикулума, экспрессии генов и т.д. [34–36].

#### *Компьютерное моделирование процесса экзоцитоза в нервно-мышечном синапсе лягушки*

Особенностью  $Ca^{2+}$ -каналов L-типа является то, что они находятся в открытом состоянии существенно дольше, чем N- или P/Q-каналы, и расположены на удалении от активных зон, где происходит секреция квантов медиатора [37]. Для оценки возможного вклада такого типа каналов в вызванную секрецию медиатора в синапсе лягушки была адаптирована компьютерная модель по методу Монте-Карло, описанная ранее в ряде работ [22–25]. В модели рассматривается одна секреторная единица, состоящая из везикулы, готовой к освобождению медиатора, и двух  $Ca^{2+}$ -каналов, один из которых расположен в непосредственной близости от везикулы (20 нм, N-тип), а другой — на значительном удалении (200 нм), и к тому же, дольше остает-

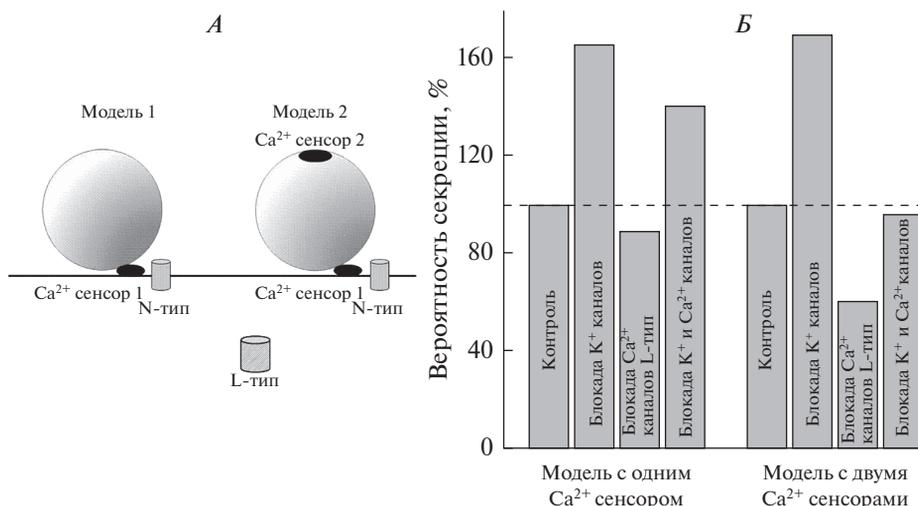
ся в открытом состоянии после активации (среднее время открытого состояния около 10 мс, L-тип). Потенциал нервного окончания симулировался в соответствии с модифицированной моделью Ходжкина–Хаксли [22]. Остальные параметры модели и геометрия активной зоны соответствуют используемым в работах [24, 25]. С помощью модели исследовали изменение концентрации ионов  $\text{Ca}^{2+}$ , поступающих в нервное окончание через оба  $\text{Ca}^{2+}$ -канала и их вклад в вероятность экзоцитоза при разной длительности деполяризации мембраны нервного окончания. В модели предусматривалось два варианта перехода везикулы к стадии экзоцитоза: (i) после связывания 4 ионов  $\text{Ca}^{2+}$  с сенсором (со свойствами белка синаптоагмина 1, 2); (ii) при связывании 2 ионов  $\text{Ca}^{2+}$  с дополнительным сенсором, расположенным на удалении (50 нм) от  $\text{Ca}^{2+}$ -канала N-типа. Наличие нескольких  $\text{Ca}^{2+}$ -сенсоров с разными характеристиками, предположительно, разных изоформ белка синаптоагмина с разным сродством к  $\text{Ca}^{2+}$ , опосредующих разные формы секреции – синхронную и асинхронную, активно обсуждается в последнее десятилетие [38, 39]. В частности, предполагается, что в качестве  $\text{Ca}^{2+}$ -сенсора для асинхронного освобождения может выступать синаптоагмин 7 (SYT7), обладающий повышенным сродством к  $\text{Ca}^{2+}$ . Модель с двумя  $\text{Ca}^{2+}$ -сенсорами с разным количеством сайтов связывания  $\text{Ca}^{2+}$  (соответственно, 5 и 2), описанная в работе [40], хорошо воспроизводила скорость освобождения медиатора в центральных синапсах при варьировании концентрации  $\text{Ca}^{2+}$ .

В наших модельных экспериментах было показано, что при наличии только одного кальциевого сенсора, расположенного около канала N-типа, добавление еще одного  $\text{Ca}^{2+}$ -канала (L-типа) увеличивает вероятность секреции в одинаковой степени, независимо от длительности потенциала действия (на 12.7% и 14.8%, соответственно для активных и неактивных  $\text{K}^+$ -каналов).

Симуляция процесса экзоцитоза с учетом дополнительного сенсора (рис. 4А, Б) более точно воспроизводит экспериментально полученные данные на синапсах лягушки в условиях сниженного уровня  $\text{Ca}^{2+}$ . Так, относительное изменение вероятности секреции при увеличении длительности пресинаптического спайка (симуляция блокады  $\text{K}^+$ -каналов 4-АП) при отсутствии в модели  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов L-типа оказалось меньше, чем при их учете в модели (на 56% по сравнению с 69%, рис. 4Б). То есть, наличие второго сенсора для  $\text{Ca}^{2+}$ , расположенного на удалении от основного  $\text{Ca}^{2+}$ -канала, наиболее значимо для секреторного процесса при наличии дополнительного источника  $\text{Ca}^{2+}$  (например, вход ионов через  $\text{Ca}^{2+}$ -канал L-типа либо выход  $\text{Ca}^{2+}$  из внутриклеточного кальциевого депо) и увеличении длительности деполяризации мембраны (то есть, при увеличении вероятности открывания  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов).

Можно предположить, что в условиях сниженного уровня  $\text{Ca}^{2+}$  экзоцитоз в синапсах лягушки может осуществляться с участием нескольких кальциевых сенсоров, расположенных на разных расстояниях от основного  $\text{Ca}^{2+}$ -канала (N-типа) и обладающих различной кальциевой чувствительностью.

Таким образом, результаты исследования свидетельствуют о том, что пресинаптические потенциал-зависимые  $\text{Ca}^{2+}$ -каналы L-типа могут регулировать освобождение АХ из двигательных нервных окончаний лягушки и мышцы, однако существуют особенности их вклада в вызванную нейросекрецию в разных экспериментальных условиях. Так в синапсах мышцы участие  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов L-типа в регуляции вызванной секреции АХ из двигательных нервных окончаний очевидно лишь в специфических условиях, например, при снижении концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  в среде до 0.2 мМ, при использовании быстрых кальциевых буферов, блокаде ВК-каналов [5, 7, 14, 15]



**Рис. 4.** Компьютерное моделирование процесса экзоцитоза в нервно-мышечном синапсе лягушки по методу Монте-Карло. *А* – Схематическое изображение взаимного расположения везикулы, Ca<sup>2+</sup>-каналов разных типов (“N” и “L”) и кальциевых сенсоров (1 и 2) для двух использованных моделей. *Б* – Относительное изменение вероятности экзоцитоза при симуляции блокады K<sup>+</sup>- и Ca<sup>2+</sup>-каналов L-типа. За 100% принята вероятность экзоцитоза для контрольного набора параметров.

или, как показано в данном исследовании, при блокаде потенциал-зависимых K<sup>+</sup>-каналов с помощью 4-АП. При этом если квантовый состав ТКП в присутствии нитрендипина снижался, то степень синхронности освобождения квантов АХ либо увеличивалась, либо уменьшалась, в зависимости от активности K<sup>+</sup>-каналов.

Интересно отметить, что ранее для синапсов мышцы было показано прямое взаимодействие каналов L-типа с другими K<sup>+</sup>-каналами – Ca<sup>2+</sup>-зависимыми K<sup>+</sup>-каналами большой проводимости [5, 15]. Инактивация этого типа K<sup>+</sup>-каналов ибериотоксином растормаживала каналы L-типа, что проявлялось как увеличение квантового состава ПКП. Существует ли подобное взаимодействие с другими типами K<sup>+</sup>-каналов, еще предстоит выяснить.

В синапсах лягушки Ca<sup>2+</sup>-каналы L-типа вносят вклад в вызванную секрецию АХ в условиях сниженного уровня Ca<sup>2+</sup> в среде, но при физиологическом уровне Ca<sup>2+</sup> их участие в нейросекреции при низкой частоте раздражения нерва было очевидным лишь при инактивации потенциал-зависимых K<sup>+</sup>-каналов. Возможное объяснение более выраженного эффекта блокады этих каналов в условиях сниженного уровня Ca<sup>2+</sup> в среде может быть связано с тем, что в этих условиях даже небольшие вариации концентрации Ca<sup>2+</sup> в области активной зоны могут приводить к значительному изменению вероятности освобождения везикул. Интересно отметить, что наблюдаемое в присутствии нитрендипина уменьшение дисперсии истинных синаптических задержек, то есть синхронизация секреторного процесса [7], в полной мере сохранялась и при инактивации потенциал-зависимых K<sup>+</sup>-каналов.

В физиологических условиях, вход Ca<sup>2+</sup> в нервное окончание через каналы L-типа также имеет место, что подтверждается результатами экспериментов по оптической регистрации интегрального кальциевого сигнала в нервном окончании (кальциевого транзientа). Но, по-видимому, наибольшее изменение внутриклеточного

Ca<sup>2+</sup> при открывании каналов L-типа происходит уже после завершения синхронной фазы нейросекреции, определяющей параметры многоквантовых постсинаптических ответов.

Возможное различие в эффектах блокады Ca<sup>2+</sup>-каналов L-типа в синапсах лягушки и мыши может отчасти быть связано и с разным субъединичным составом каналов L-типа в синапсах животных разных классов (Ca<sub>v</sub>1.2, Ca<sub>v</sub>1.3 или Ca<sub>v</sub>1.4), например, с разной выраженностью их кальциевой инактивации [41].

В наших экспериментах при сниженном уровне Ca<sup>2+</sup> в синапсах лягушки, блокада Ca<sup>2+</sup>-каналов L-типа приводила к достоверному снижению квантового состава ТКП и при активных K<sup>+</sup>-каналах, а при их инактивации эффект нитрендипина был, наоборот, менее выражен. Компьютерное моделирование процесса экзоцитоза для одной секреторной единицы показало возможность такого эффекта при увеличении длительности пресинаптического спайка при наличии на везикуле двух кальциевых сенсоров с разной удаленностью от Ca<sup>2+</sup>-каналов и различным количеством мест связывания Ca<sup>2+</sup>. Известно, что длительность потенциала действия аксона зависит от ряда эндогенных факторов – паттерна активности нейрона, аккумуляции нейромедиаторов в околосинаптической области и т.д. [42, 43]. Можно предположить, что участие Ca<sup>2+</sup>-каналов L-типа в секреторном процессе, не столь очевидное при низкочастотном раздражении нерва, будет усиливаться в случае повышенной синаптической активности.

#### ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 17-04-00690.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Hong S.J., Chang C.C.* Inhibition of acetylcholine release from mouse motor nerve by a P-type calcium channel blocker, omega-agatoxin IVA. *J. Physiol.* 482: 283–290. 1995.
2. *Meir A., Ginsburg S., Butkevich A., Kachalsky S.G., Kaiserman I., Ahdut R., Demingoren S., Rahamimoff R.* Ion channels in presynaptic nerve terminals and control of transmitter release. *Physiol. Rev.* 79(3): 1019–1088. 1999.
3. *Balezina O.P., Bogacheva P.O., Orlova T.Y.* Effect of L-type calcium channel blockers on activity of newly formed synapses in mice. *Bull. Exp. Biol. Med.* 143(2): 171–174. 2007.
4. *Tsentsevitsky A.N., Vasin A.L., Bukharaeva E.A., Nikolsky E.E.* Participation of different types of voltage-dependent calcium channels in evoked quantal transmitter release in frog neuromuscular junction. *Dokl. Biol. Sci.* 423: 389–391. 2008.
5. *Gaydukov A.E., Melnikova S.N., Balezina O.P.* Facilitation of acetylcholine secretion in mouse motor synapses caused by calcium release from depots upon activation of L-type calcium channels. *Bull. Exp. Biol. Med.* 148(2): 163–166. 2009.
6. *Tarasova E.O., Miteva A.S., Gaydukov A.E., Balezina O.P.* The role of adenosine receptors and L-type calcium channels in the regulation of the mediator secretion in mouse motor synapses. *Biochemistry. Suppl. Series A.* 9(4): 318–328. 2015.
7. *Tsentsevitsky A.N., Khuzakmetova V.F., Vasin A.L., Samigullin D.V., Bukharaeva E.A.* Calcium modulation of the kinetics of evoked quantum secretion in neuromuscular synapses of cold- and warm-blooded animals. *Biochemistry (Moscow) Supplement Series A: Membrane and Cell Biology.* 9(4): 270–277. 2015.
8. *Tsentsevitsky A.N., Samigullin D.V., Nurullin L.F., Khaziev E.F., Nikolsky E.E., Bukharaeva E.A.* Frogs: genetic diversity, neural development and ecological implications. Ed. *Lambert H.* New York: NOVA Publ. 2014.
9. *Khuzakmetova V.F., Nurullin L.F., Bukharaeva E.A., Nikolsky E.E.* Involvement of dihydropyridine-sensitive calcium channels in high asynchrony of transmitter release in neuromuscular synapses of newborn rats. *Dokl. Biol. Sci.* 470(1): 220–223. 2016.
10. *Roberts W.M., Jacobs R.A., Hudspeth A.J.* Colocalization of ion channels involved in frequency selectivity and synaptic transmission at presynaptic active zones of hair cells. *J. Neurosci.* 10(11): 3664–3684. 1990.
11. *Robitaille R., Garcia M.L., Kaczorowski G.J., Charlton M.P.* Functional colocalization of calcium and calcium-gated potassium channels in control of transmitter release. *Neuron.* 11(4): 645–655. 1993.

12. Yazejian B., DiGregorio D.A., Vergara J.L., Poage R.E., Meriney S.D., Grinnell A.D. Direct measurements of presynaptic calcium and calcium-activated potassium currents regulating neurotransmitter release at cultured *Xenopus* nerve-muscle synapses. *J. Neurosci.* 17(9): 2990–3001. 1997.
13. Robitaille R., Charlton M.P. Presynaptic calcium signals and transmitter release are modulated by calcium-activated potassium channels. *J. Neurosci.* 12: 297–305. 1992.
14. Urbano F.J., Depetris R.S., Uchitel O.D. Coupling of L-type calcium channels to neurotransmitter release at mouse motor nerve terminals. *Pflugers Arch.* 441(6): 824–831. 2001.
15. Flink M.T., Atchison W.D. Iberitoxin-induced block of  $Ca^{2+}$ -activated  $K^+$  channels induces dihydropyridine sensitivity of ACh release from mammalian motor nerve terminals. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 305(2): 646–652. 2003.
16. Giovannini F., Sher E., Webster R., Boot J., Lang B. Calcium channel subtypes contributing to acetylcholine release from normal, 4-aminopyridine-treated and myasthenic syndrome autoantibodies-affected neuromuscular junctions. *Br. J. Pharmacol.* 136(8): 1135–1145. 2002.
17. Allana T.N., Lin J.-W. Effects of increasing  $Ca^{2+}$  channel-vesicle separation on facilitation at the crayfish inhibitory neuromuscular junction. *Neuroscience.* 154(4): 1242–1254. 2008.
18. Hockerman G.H., Peterson B.Z., Johnson B.D., Catterall W.A. Molecular determinants of drug binding and action on L-type calcium channels. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 37: 361–396. 1997.
19. Furukawa T., Yamakawa T., Midera T., Sagawa T., Mori Y., Nukada T. Selectivities of dihydropyridine derivatives in blocking  $Ca^{2+}$  channel subtypes expressed in *Xenopus* oocytes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 291: 464–473. 1999.
20. Del Castillo J., Katz B. Quantal components of the end-plate potential. *J. Physiol.* 124: 560–573. 1954.
21. Katz B., Miledi R. The measurement of synaptic delay, and the time course of acetylcholine release at the neuromuscular junction. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 161: 483–495. 1965.
22. Bennett M.R., Gibson W.G., Robinson J. Probabilistic secretion of quanta and the synaptosome hypothesis: Evoked release at active zones of varicosities, boutons, and endplates. *Biophys. J.* 73(4): 1815–1829. 1997.
23. Bennett M.R., Farnell L., Gibson W.G. The probability of quantal secretion near a single calcium channel of an active zone. *Biophys. J.* 78(5): 2201–2221. 2000.
24. Shahrezaei V., Delaney K.R. Brevity of the  $Ca^{2+}$  microdomain and active zone geometry prevent  $Ca^{2+}$ -sensor saturation for neurotransmitter release. *J. Neurophysiol.* 94(3): 1912–1919. 2005.
25. Shahrezaei V., Cao A., Delaney K.R.  $Ca^{2+}$  from one or two channels controls fusion of a single vesicle at the frog neuromuscular junction. *J. Neurosci.* 26(51): 13240–13249. 2006.
26. Rosato Siri M.D., Uchitel O.D. Calcium channels coupled to neurotransmitter release at neonatal rat neuromuscular junctions. *J. Physiol.* 514(2): 533–540. 1999.
27. Muller D. Potentiation by 4-aminopyridine of quantal acetylcholine release at the Torpedo nerve-electroplaque junction. *J. Physiol.* 379: 479–493. 1986.
28. Li L., Li D.P., Chen S.R., Chen J., Hu H., Pan H.L. Potentiation of high voltage-activated calcium channels by 4-aminopyridine depends on subunit composition. *Mol. Pharmacol.* 86(6): 760–772. 2014.
29. Bukharaeva E.A., Samigullin D., Nikolsky E.E., Magazanik L.G. Modulation of the kinetics of evoked quantal release at mouse neuromuscular junctions by calcium and strontium. *J. Neurochem.* 100(4): 939–949. 2007.
30. Giniatullin R.A., Khazipov R.N. End plate currents with a physiological level of quantal secretion and after potentiation of the mediator release by 4-aminopyridine. *Neurofiziologii.* 23(1): 48–56. 1991.
31. Provan S.D., Miyamoto M.D. Effect of the putative cognitive enhancer, linopirdine (DuP 996), on quantal parameters of acetylcholine release at the frog neuromuscular junction. *Br. J. Pharmacol.* 111(4): 1103–1110. 1994.
32. Ng F., Lee D.C., Schrumpf L.A., Mazurek M.E., Lee Lo V., Gill S.K., Maselli R.A. Effect of 3,4-diaminopyridine at the murine neuromuscular junction. *Muscle Nerve.* 55(2): 223–231. 2017.
33. Khaziev E.F., Samigullin D.V., Tsentsevitsky A.N., Bukharaeva E.A., Nikolsky E.E. ATP reduces the entry of calcium ions into the nerve ending by blocking L-type calcium channels. *Acta Naturae.* 10(2): 93–96. 2018.
34. Lozavio A., Muchnik S. Spontaneous acetylcholine release in mammalian neuromuscular junctions. *Am. J. Physiol.* 273(6): 1835–1841. 1997.
35. Zuccotti A.I., Clementi S., Reinbothe T., Torrente A., Vandael D.H., Pirone A. Structural and functional differences between L-type calcium channels: Crucial issues for future selective targeting. *Trends Pharmacol. Sci.* 32(6): 366–375. 2011.
36. Furukawa T. Types of voltage-gated calcium channels: Molecular and electrophysiological views. *Curr. Hypertens. Rev.* 9(3): 170–181. 2013.
37. Zamponi G.W., Striessnig J., Koschak A., Dolphin A.C. The physiology, pathology, and pharmacology of voltage-gated calcium channels and their future therapeutic potential. *Pharmacol. Rev.* 67(4): 821–870. 2015.
38. Luo F., Südhof T.C. Synaptotagmin-7-mediated asynchronous release boosts high-fidelity synchronous transmission at a central synapse. *Neuron.* 94(4): 826–839. 2017.
39. Rozov A., Bolshakov A.P., Valiullina-Rakhmatullina F. The ever-growing puzzle of asynchronous release. *Front. Cell. Neurosci.* 13: 28. 2019.

40. Sun J., Pang Z., Qin D., Fahim A.T., Adachi R., Südhof T.C. A two  $\text{Ca}^{2+}$ -sensor model for neurotransmitter release in a central synapse. *Nature*. 450(7170): 676–682. 2007.
41. Pagani R., Song M., McEnery M., Qin N., Tsien R.W., Toro L., Stefani E., Uchitel O.D. Differential expression of alpha 1 and beta subunits of voltage dependent  $\text{Ca}^{2+}$  channel at the neuromuscular junction of normal and P/Q  $\text{Ca}^{2+}$  channel knockout mouse. *Neuroscience*. 123(1): 75–85. 2004.
42. Kirkpatrick K., Bourque C.W. Dual role for calcium in the control of spike duration in rat supra-optic neuroendocrine cells. *Neurosci. Lett.* 133(2): 271–274. 1991.
43. Sabatini B.L., Regehr W.G. Control of neurotransmitter release by presynaptic waveform at the granule cell to Purkinje cell synapse. *J. Neurosci.* 17(10): 3425–3435. 1997.

### **The Contribution of L-Type Calcium Channels to the Evoked Acetylcholine Secretion in the Frog and Mouse Neuromuscular Synapse at Active and Inactivated Potential-Dependent Potassium Channels**

**A. N. Tsentsevitsky<sup>a, b</sup>, V. F. Khuzakhmetova<sup>a, b</sup>, E. F. Khaziev<sup>a, b</sup>, I. V. Kovyazina<sup>a, b, c, \*</sup>**

<sup>a</sup>*Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics, FRC Kazan Scientific Center of RAS, Kazan, Russia*

<sup>b</sup>*Kazan Federal University, Kazan, Russia*

<sup>c</sup>*Kazan State Medical University, Kazan, Russia*

<sup>\*</sup>*e-mail: irina.kovyazina@list.ru*

In this work, the contribution of L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels to the evoked secretion of acetylcholine from the frog and mouse motor nerve endings with active and inactivated potential-dependent  $\text{K}^{+}$  channels was studied. The effects of the specific  $\text{Ca}^{2+}$  blocker of the L-type channels nitrendipine on the quantal content of endplate currents and the timing of acetylcholine quanta secretion in intact preparations and after the preliminary blockade of potential-activated  $\text{K}^{+}$  channels with 4-aminopyridine (4-AP) were evaluated under conditions of a decreased and physiological level of ambient  $\text{Ca}^{2+}$ . Fluorescent measurement of calcium transient reflecting the integral input of  $\text{Ca}^{2+}$  into the nerve ending was performed as well as the computer simulation of the processes underlying exocytosis assuming the presence of two types of  $\text{Ca}^{2+}$  channels (N- and L-types) and varying duration of the nerve action potential. It was shown that in the frog synapses, L-type calcium channels contribute to the evoked secretion of acetylcholine at active  $\text{K}^{+}$  channels only under conditions of decreased  $\text{Ca}^{2+}$  level; after inactivation of potential-dependent  $\text{K}^{+}$  channels, the contribution of L-type channels to the secretory process becomes less significant. At the physiological level of ambient  $\text{Ca}^{2+}$ , the involvement of L-type channels in the evoked acetylcholine secretion, as in mice synapses, is manifested only under conditions of inactivated potential-dependent  $\text{K}^{+}$  channels.

*Keywords:* neuromuscular junction, potassium channel, calcium channel, acetylcholine

#### ЦИТИРОВАТЬ:

Ценцевицкий А.Н., Хузахметова В.Ф., Хазиев Э.Ф., Ковязина И.В. Вклад кальциевых каналов L-типа в секрецию ацетилхолина в нервно-мышечных соединениях лягушки и мыши при активных и инактивированных потенциал-зависимых калиевых каналах. *Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова*. 105(10): 1271–1282.

DOI: 10.1134/S0869813919100108

#### TO CITE THIS ARTICLE:

Tsentsevitsky A.N., Khuzakhmetova V.F., Khaziev E.F., Kovyazina I.V. The Participation of L-Type Calcium Channels to the Evoked Acetylcholine Secretion in the Frog and Mouse Neuromuscular Synapse at Active and Inactivated Potential-Dependent Potassium Channels. *Russian Journal of Physiology*. 105(10): 1271–1282.

DOI: 10.1134/S0869813919100108