

УДК 612.816:612.822.2

Влияние активации NMDA-рецепторов на мембранный потенциал покоя мышечной клетки в нервно-мышечном синапсе в условиях наличия или отсутствия ионов магния

С. Е. Проскурина^{2*}, К. А. Петров^{1,2,3}, Е. Е. Никольский^{1,2,3,4}¹Казанский институт биохимии и биофизики РАН, 420111, Казань, ул. Лобачевского, 2/31²Казанский (Приволжский) федеральный университет, 420008, Казань, ул. Кремлевская, 18³Институт органической и физической химии им. академика А.Е. Арбузова РАН, 420029, Казань, ул. Академика Арбузова, 8⁴Казанский государственный медицинский университет, 420012, Казань, ул. Бутлерова, 49

*E-mail: svetlana-proskurina@mail.ru

Поступило в редакцию 23.06.2017

Принято к печати 26.06.2018

РЕФЕРАТ Нарушение работы или недостаточный уровень экспрессии глутаматных N-метил-D-аспаратных рецепторов лежат в основе многих патологий работы головного мозга. Поскольку функционирование рецепторов глутамата данного типа в ЦНС влияет на процессы нейронального возбуждения, синаптической пластичности, эксайтотоксичности при нейродегенеративных расстройствах, а также может приводить к развитию эпилепсии и судорог, эти рецепторы активно рассматриваются в качестве мишени для многих нейроактивных фармакологических препаратов. Однако функция периферических NMDA-рецепторов, в отличие от центральных, остается актуальным вопросом для исследования. В данной работе показано, что активация NMDA-рецепторов в нервно-мышечном синапсе взрослых млекопитающих приводит к изменению величины мембранного потенциала покоя постсинаптической клетки вследствие входящего тока катионов через ионный канал, ассоциированный с NMDA-рецептором.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА глицин, глутамат, нервно-мышечный синапс, NMDA-рецептор, электрофизиология.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ АХ – ацетилхолин; ГАМК – гамма-аминомасляная кислота; NMDAR – N-метил-D-аспаратный рецептор; МПП – мембранный потенциал покоя; ЦНС – центральная нервная система; 5,7-ДСКА – 5,7-дихлоркинуреновая кислота; AP5 – DL-2-амино-5-фосфоновалериановая кислота.

ВВЕДЕНИЕ

Преобразование команд центральной нервной системы в мышечные сокращения невозможно без процесса нервно-мышечной передачи. Нервно-мышечный синапс состоит из трех функциональных частей: пресинаптической терминали мотонейрона, синаптической щели и постсинаптической области на мембране мышечного волокна. Нервно-мышечное соединение – это синапс химического типа, в котором передача сигнала происходит с помощью химического трансмиттера – ацетилхолина (АХ), однако в этом преимущественно холинергическом синапсе присутствуют и другие нейромедиаторы (глутамат, АТР, ГАМК) [1–3]. Наличие механизмов синтеза, транспорта и выделения глутамата в нервно-мышечном синапсе также предполагает возможность модуляции процессов синаптической

передачи этой аминокислотой [4]. Показано, что выделение глутамата играет важную роль в незрелых периферических синапсах млекопитающих, в частности, на различных этапах развития и созревания нервно-мышечного соединения [5], а также в усилении секреции АХ в эмбриональных синапсах [6]. Не так давно транспортеры АХ и глутамата были обнаружены в мембране одних и тех же синаптических везикул в центральных нейронах [7], что указывает на возможность выделения этих медиаторов одной и той же пресинаптической клеткой. Также известно, что в области нервно-мышечного синапса концентрация глутамата в момент нейрональной активности довольно высока и может достигать миллимолярных значений [1]. Глутамат может влиять на активность синаптической ацетилхолинэстеразы [8], модулиро-

вать квантовое высвобождение медиатора [9], а также снижать некантовую секрецию АХ в нервно-мышечном синапсе [10]. Несмотря на то что существует немало исследований, показывающих наличие NMDAR в нервно-мышечном синапсе, а также эффекты их активации, например посредством флуоресцентных методов, электрофизиологических доказательств функционирования постсинаптических NMDAR у взрослых млекопитающих до сих пор недостаточно.

NMDAR представляют собой ионотропные лиганд-активируемые рецепторы, для активации которых необходимы два условия: наличие агонистов – глутамата и глицина, а также устранение иона магния, который в покое блокирует пору канала [11]. Показано, что магниевую блокаду можно снять с помощью деполяризации в естественных условиях либо применением безмагниевого раствора Рингера.

В исследовании Malomouzh и соавт. [12] показано, что облигатная субъединица NMDAR NR1 локализована на постсинаптической мембране нервно-мышечного синапса. Такое расположение предполагает, что при воздействии агонистов этих рецепторов возбудимость мембраны (а именно, мембранный потенциал покоя) может измениться вследствие развития деполяризации.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Эксперименты проводили на изолированных нервно-мышечных препаратах (m. EDL – extensor digitorum longus) крыс породы Wistar обоих полов весом 250–300 г. Изолированную мышцу с подходящим к ней нервом помещали в экспериментальную ванночку, через которую протекал азрированный карбагеном (O₂ 95%, CO₂ 5%) раствор Рингера–Кребса для тепловых следующего состава (ммоль/л): NaCl – 120.0, KCl – 5.0, CaCl₂ – 2.0, MgCl₂ – 1.0, NaHCO₃ – 11.0, NaH₂PO₄ – 1.0, глюкоза – 11.0; в экспериментах с безмагниевым раствором (ммоль/л): NaCl – 121.0, KCl – 5.0, CaCl₂ – 2.0, MgCl₂ – 0.0, NaHCO₃ – 11.0, NaH₂PO₄ – 1.0, глюкоза – 11.0; pH раствора поддерживали на уровне 7.2–7.4 при температуре 20 ± 2°C (скорость перфузии 2–3 мл/мин). Все эксперименты проводили в соответствии с директивой European Communities Council Directive от 24 ноября 1986 года (86/609/ЕЕС).

Изменения мембранного потенциала концевой пластинки регистрировали с помощью стандартной микроэлектродной техники с использованием микроэлектродов с сопротивлением 5–10 МОм из стекла Pyrex, заполненных раствором KCl (3 моль/л).

Реактивы

Глутамат, глицин, AP5 и 5,7-ДСКА предоставлены Sigma-Aldrich (St Louis, MO США), μ-конотоксин

предоставлен Alamone Lab (Израиль). Все препараты вводили через систему перфузии.

Статистическую значимость результатов оценивали с использованием непарного теста Стьюдента, различие между двумя совокупностями считали значимым при $p < 0.05$, ошибки представлены в виде стандартных отклонений (SD).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Так как NMDA-рецептор представляет собой ионный канал, проницаемый для катионов, можно предположить, что активация функциональных NMDA-рецепторов, представленных на постсинаптической мембране, вызовет входящий ток катионов, следовательно, приведет к деполяризации мембраны клетки. Выраженность этой деполяризации будет зависеть от количества активированных рецепторов и от концентрации ионов в среде. Однако при мембранном потенциале покоя показано наличие магниевого блока NMDA-рецепторов, который снимается деполяризацией мембраны или, в экспериментальных условиях, использованием безмагниевого раствора.

В безмагниевом растворе добавление глутамата в концентрации 100 мкмоль/л и коагониста NMDAR глицина в концентрации 700 мкмоль/л приводило к статистически значимому падению мембранного потенциала на 6.5% (рисунок), при этом контрольное значение составило 79.37 ± 0.24 мВ ($n = 270$), а после аппликации аминокислот мембранный потенциал составил 74.18 ± 0.32 мВ ($n = 140$, рисунок). Эффект глутамата и глицина был обратимым, поскольку полностью исчезал после отмывки препарата. Изменение МПП во внесинаптической области не наблюдалось при аппликации аминокислот в указанных выше концентрациях (78.9 ± 0.3 мВ, $n = 110$ против 79.4 ± 0.2 мВ в контроле, $n = 270$, данные не представлены).

Чтобы выяснить, действительно ли данный эффект связан с активацией NMDA-рецепторов, проведена серия экспериментов с использованием селективного обратимого блокатора NMDA-рецепторов AP5. Добавление только AP5 в концентрации 500 мкмоль/л не влияло статистически значимо на мембранный потенциал покоя клетки. Однако последующая аппликация глутамата и глицина вызывала значимо меньшую деполяризацию в присутствии блокатора, которая составила лишь 1.5% (78.15 ± 0.39 мВ против 79.37 ± 0.24 мВ в контроле), однако была статистически значимой ($n = 127$).

Отсутствие полного блокирующего эффекта AP5 может объясняться тем, что действие данного блокатора обратимо, он конкурентно связывается с участком связывания глутамата, и степень его сродства к NMDA-рецептору сходна с аффинностью глутамата

та, вследствие чего аминокислота может вытеснять блокатор [13]. Чтобы добиться полного устранения эффекта аминокислот, мы использовали блокатор глицинового сайта NMDAR 5,7-ДСКА (натриевая соль) в концентрации 100 мкмоль/л. Добавление 5,7-ДСКА не приводило к статистически значимому изменению мембранного потенциала ($n = 79$). При совместной аппликации AP5 и 5,7-ДСКА также не возникало деполяризации постсинаптической мембраны ($n = 79$). При этом на фоне этих двух блокаторов аминокислоты не вызывали достоверного падения мембранного потенциала (78.8 ± 0.22 мВ против 79.37 ± 0.24 мВ в контроле; $n = 85$, рисунок).

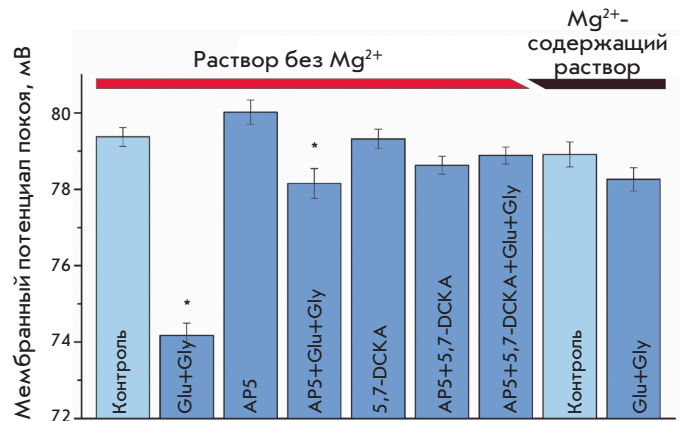
Альтернативный, физиологический способ блокады NMDA-рецепторов – это магниевый блок. Если наблюдаемый эффект на мембранный потенциал обусловлен работой этих рецепторов, то присутствие магния в растворе должно блокировать развитие деполяризации при аппликации агонистов. И действительно, в присутствии Mg^{2+} аминокислоты не влияли на мембранный потенциал покоя мышечного волокна, в магнийсодержащем растворе в контроле он составил 78.91 ± 0.32 мВ, после добавления глицина и глутамата – 78.26 ± 0.31 мВ ($n = 105$, рисунок).

Из полученных результатов можно сделать вывод, что на постсинаптической мембране имеются функциональные NMDAR, активация которых вызывает статистически значимые сдвиги мембранного потенциала покоя постсинаптической клетки в положительную сторону. Такая деполяризация обеспечивается входящим током катионов через канал рецептора, блокируется селективными блокаторами глутаматного и глицинового сайта связывания и не наблюдается в условиях сохранения магниевых блока.

Данное исследование является электрофизиологическим доказательством потенциальной модуляторной роли NMDAR постсинаптической мембраны в нервно-мышечных синапсах взрослых млекопитающих.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, на постсинаптической мембране мышечного волокна млекопитающего присутствует популяция функционально активных NMDA-рецепторов, активация которой может изменять мембранный потенциал покоя мышечного волокна в отсутствие магниевых блока рецепторов.



Влияние активации NMDA-рецепторов на мембранный потенциал покоя постсинаптической клетки. При аппликации глутамата (100 мкмоль/л) и глицина (700 мкмоль/л) в безмагниевого раствора наблюдается падение мембранного потенциала покоя клетки. Добавление блокаторов NMDA-рецепторов – AP5 (500 мкмоль/л) и 5,7-ДСКА (100 мкмоль/л), а также их совместное применение не оказывали эффекта на МПП. Добавление глутамата и глицина на фоне AP5 незначительно снижало МПП, однако этот эффект полностью блокировался при аппликации двух блокаторов – и AP5, и 5,7-ДСКА. В растворе, содержащем ионы магния, аппликация глутамата и глицина не влияла на МПП постсинаптической клетки. * Значимое отличие от контроля ($p < 0.05$)

Электрофизиологические методы, имеющие высокую чувствительность, позволяют регистрировать даже небольшие флуктуации мембранного потенциала под воздействием входящего тока через NMDAR и локализовать наблюдаемые эффекты именно на постсинаптической мембране.

Вполне вероятно, что влияние активации NMDAR на возбудимость постсинаптической мембраны не так велико для здоровой мышцы, однако в условиях недостаточности синаптической передачи снижен, вклад возбуждающего тока, опосредованного NMDAR может стать намного более значимым. Учитывая множество процессов, опосредуемых активацией NMDAR, многие из которых обусловлены высокой проницаемостью этих рецепторов для кальция, дальнейшее изучение их роли в нервно-мышечном синапсе представляется актуальным. ●

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Waerhaug O., Ottersen O.P. // Anatomy and Embryology (Berlin). 1993. V. 188. № 5. P. 501–513.
2. Silinsky E.M., Redman R.S. // J. Physiol. 1996. V. 492 (Pt 3). P. 815–822.

3. Malomuzh A.I., Nurullin L.F., Nikolsky E.E. // Dokl. Biochem. Biophys. 2015. V. 463. P. 236–238. doi: 10.1134/S1607672915040092.
4. Berger U.V., Carter R.E., Coyle J.T. // Neuroscience. 1995. V. 64. № 4. P. 847–850.

5. Personius K.E., Slusher B.S., Udin S.B. // *J. Neurosci.* 2016. V. 36. № 34. P. 8783–8789.
6. Fu W.M., Liou J.C., Lee Y.H., Liou H.C. // *J. Physiol.* 1995. V. 489 (Pt 3). P. 813–823.
7. Frahm S., Antolin-Fontes B., Görlich A., Zander J.F., Ahnert-Hilger G., Ibañez-Tallon I. // *Elife.* 2015. V. 4. P. 1–31.
8. Petrov K.A., Malomouzh A.I., Kovyazina I.V., Krejci E., Nikitashina A.D., Proskurina S.E., Zobov V.V., Nikolsky E.E. // *Eur. J. Neurosci.* 2013. V. 37. № 2. P. 181–189.
9. Pinard A., Lévesque S., Vallée J., Robitaille R. // *Eur. J. Neurosci.* 2003. V. 18. № 12. P. 3241–3250.
10. Malomouzh A.I., Mukhtarov M.R., Nikolsky E.E., Vyskocil F., Lieberman E.M., Urazaev A.K. // *J. Neurochem.* 2003. V. 85. № 1. P. 206–213.
11. Evans R.H., Francis A.A., Watkins J.C. // *Experientia.* 1977. V. 33. № 4. P. 489–491.
12. Malomouzh A.I., Nurullin L.F., Arkhipova S.S., Nikolsky E.E. // *Muscle Nerve.* 2011. V. 44. № 6. P. 987–989.
13. Lowe G. // *J. Neurophysiol.* 2003. V. 90. № 3. P. 1737–1746.