

УДК 612.816:612.822.2

АТР уменьшает вход ионов кальция в нервную терминаль, блокируя кальциевые каналы L-типа

Э. Ф. Хазиев^{1,2,3}, Д. В. Самигуллин^{1,2,3}, А. Н. Ценцевицкий^{1,2*}, Э. А. Бухараева^{1,2},
Е. Е. Никольский^{1,2}

¹Казанский институт биохимии и биофизики – обособленное структурное подразделение Федерального исследовательского центра «Казанский научный центр Российской академии наук», 420111, Казань, а/я 30

²Казанский (Приволжский) федеральный университет, 420008, Казань, ул. Кремлевская, 18

³Казанский национальный исследовательский технический университет им. А.Н. Туполева, 420111, Казань, ул. К. Маркса, 31/7

*E-mail: atsen@list.ru

Поступила в редакцию 16.10.2017

Принята к печати 09.04.2018

РЕФЕРАТ В нервно-мышечном соединении АТР, активируя пресинаптические P2Y-рецепторы, подавляет вызванную и спонтанную квантовую секрецию ацетилхолина, уменьшая входящий кальциевый ток. С использованием специфического кальций-чувствительного флуоресцентного красителя Oregon Green Bapta 1 на нервно-мышечном синапсе лягушки показано, что экзогенная АТР снижает амплитуду кальциевого транзиента, отражающую изменение входа кальция в ответ на нервный стимул. Этот эффект АТР на транзистент предотвращается блокадой P2-рецепторов сураминол. Специфический блокатор пресинаптических потенциал-зависимых кальциевых каналов L-типа нитрендипин, снижая *per se* амплитуду транзиента, значительно ослабляет эффект АТР на кальциевый сигнал. С другой стороны, предварительное воздействие АТР на нервно-мышечный препарат полностью устраняло угнетающее действие нитрендипина на кальциевый ответ. Полученные данные свидетельствуют о том, что в подавляющем действии АТР на амплитуду кальциевого транзиента в нервном окончании лягушки есть существенный компонент, обусловленный снижением входа кальция через потенциал-зависимые кальциевые каналы L-типа.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА АТР, кальциевый транзистент, кальциевые каналы, нервно-мышечное соединение.

ВВЕДЕНИЕ

В нервно-мышечном соединении АТР уменьшает амплитуду многоквантовых токов концевой пластинки (ТКП), активируя пресинаптические P2Y-рецепторы [1]. Угнетающее действие АТР на амплитуду постсинаптических токов является пресинаптическим эффектом и может быть обусловлено изменением активности кальциевых каналов, вход кальция (Ca^{2+}) через которые запускает процесс экзоцитоза синаптических везикул. Действительно, АТР обратимо снижала Ca^{2+} ток в перисинаптическом отделе аксона [2] и уменьшала амплитуду Ca^{2+} -транзистента, зарегистрированного в различных отделах нервной терминали лягушки [3]. Изменение амплитуды транзиента отражает изменение концентрации свободных ионов Ca^{2+} внутри терминали [4, 5], и ее снижение при действии АТР может свидетельствовать о влиянии этого пурина на активность пресинаптических кальциевых

каналов. На нервной терминали лягушки функционируют несколько типов потенциал-зависимых кальциевых каналов [4]. Активность каналов какого типа изменяется при действии АТР неизвестно. Данные о влиянии АТР на потенциал-зависимые кальциевые каналы L-типа достаточно противоречивы. На различных объектах показано, что АТР способна как усиливать вход ионов кальция через каналы L-типа [6], так и ингибировать эти каналы [7]. В настоящей работе, используя флуоресцентный метод регистрации Ca^{2+} -транзистента в нервной терминали лягушки, мы выясняли, участвуют ли пресинаптические потенциал-зависимые кальциевые каналы L-типа в подавлении амплитуды Ca^{2+} -транзистента АТР. Установлено, что снижение амплитуды транзиента при активации пуринорецепторов частично обусловлено уменьшением входа ионов Ca^{2+} через кальциевые каналы L-типа.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Исследование выполнено на изолированном нервно-мышечном препарате *m. cutaneus pectoris* лягушек *Rana ridibunda*. Относительное изменение уровня Ca^{2+} в нервной терминали (Ca^{2+} -транзистент) оценивали при помощи флуоресцентного красителя Oregon Green Bapta 1. Подробно методика загрузки красителя через культю нерва, протоколы регистрации и обработки флуоресцентных сигналов представлены в работе [8]. Использовали следующий протокол экспериментов. После загрузки флуоресцентного красителя в нервные терминали препарат помещали в ванночку объемом 3 мл, через которую со скоростью 3 мл/мин протекал перфузионный раствор. Для предотвращения сокращений мышечных волокон при стимуляции двигательного нерва использовали раствор Рингера с пониженным содержанием ионов Ca^{2+} и повышенным Mg^{2+} : NaCl – 113.0 мМ, KCl – 2.5 мМ, NaHCO_3 – 3.0 мМ, MgCl_2 – 6.0 мМ, CaCl_2 – 0.9 мМ (рН 7.2–7.3, температура $20.0 \pm 0.3^\circ\text{C}$). Эксперименты проводили в соответствии с этическими принципами и нормативными документами, рекомендованными Европейским научным фондом (ESF) и Декларацией о гуманном отношении к животным. В каждой серии экспериментов использовали 6–21 синапс от 3–5 животных.

Стимуляцию двигательного нерва прямоугольными импульсами длительностью 0.2 мс с частотой 0.5 имп/с осуществляли стимулятором (A-M Systems 2100) при помощи «всасывающего» suction электрода. Со всей длины выбранной нервной терминали в контрольных условиях регистрировали 60 последовательных флуоресцентных сигналов, после чего в перфузионный раствор добавляли исследуемое вещество. Регистрацию 60 сигналов с той же терминали, что и в контроле, начинали спустя 20–25 мин после аппликации вещества. При необходимости в перфузионный раствор в присутствии первого вещества подавали следующее исследуемое соединение, и сигналы все с той же нервной терминали вновь регистрировали через 20–25 мин. Предварительно были проведены эксперименты, результаты которых свидетельствуют о том, что амплитудно-временные параметры флуоресцентного сигнала в ответ на редкую стимуляцию двигательного нерва не претерпевают изменений в течение 3–4 ч.

Регистрацию флуоресцентных сигналов в ответ на нервный стимул осуществляли с помощью фотометрической установки на базе микроскопа Olympus BX-51 с водно-иммерсионным объективом $\times 60$ в программе Turbo-SM. В качестве источника освещения использовали монохроматор Polyhrom V (Till Photonics, Munich, Германия), настроенный на длину волны возбуждения красителя – 488 нм.

Флуоресцентный сигнал выделяли с использованием следующего набора фильтров: 505DCXT дихроическое зеркало, E520LP эмиссия (Chroma). Для уменьшения фонового свечения область освещения ограничивали при помощи диафрагмы. Данные анализировали с использованием программного обеспечения камеры Neuro CCD и ImageJ. В программе ImageJ выбирали области терминали и фона. Из всех значений свечения области терминали вычитали значение свечения фоновой области. Данные представляли как отношение: $(\Delta F / F_0 - 1) \times 100\%$, где ΔF – интенсивность флуоресценции в ответ на стимул, а F_0 – интенсивность флуоресценции в состоянии покоя. F_0 регистрировали перед каждой записью флуоресцентных сигналов в ответ на нервный стимул.

Статистическую значимость различий между выборками оценивали с использованием *t*-критерия Стьюдента и критерия Манна–Уитни. Различия между выборками считали статистически значимыми при $p < 0.05$ (n – количество исследованных синапсов).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Экзогенная АТР в концентрации 10 мкМ вызывала снижение амплитуды Ca^{2+} -транзистента в ответ на нервный стимул в среднем на $13.2 \pm 1.9\%$ ($p = 0.0003$, $n = 8$; рис. 1А,В). Увеличение концентрации АТР до 100 мкМ не повлияло на выраженность эффекта – Ca^{2+} -транзистент снижался на $13.6 \pm 1.4\%$ ($p = 0.000003$, $n = 21$) относительно контрольных значений (рис. 1В).

Сурамин – неселективный антагонист Р2-рецепторов – в дозе 300 мкМ увеличивал величину Ca^{2+} -транзистента в среднем на $20.5 \pm 9.0\%$ ($p = 0.037$, $n = 8$; рис. 1В) относительно значений в контрольных условиях. Добавление 100 мкМ АТР в среду, содержащую сурамин, не приводило к значимому изменению Ca^{2+} -транзистента, которое составило лишь $3.4 \pm 3.1\%$ ($p = 0.27$, $n = 5$; рис. 1Б,В). Таким образом, влияние АТР на амплитуду Ca^{2+} -транзистента связано с активацией Р2-рецепторов.

Специфический блокатор кальциевых каналов L-типа нитрендипин в концентрации 5 мкМ снижал амплитуду Ca^{2+} -транзистента на $12.4 \pm 3.6\%$ ($p = 0.0003$, $n = 12$; рис. 2), что свидетельствует о вкладе каналов L-типа в суммарный кальциевый ток, вызванный потенциалом действия (см. также [4]). Изменение амплитуды Ca^{2+} -транзистента под влиянием АТР в условиях блокады каналов L-типа составило всего $4.2 \pm 1.1\%$ ($p = 0.016$, $n = 7$; рис. 2), что значительно меньше собственного эффекта АТР (критерий Манна–Уитни, $p = 0.011$). Таким образом, блокада кальциевых каналов L-типа уменьшала сниже-

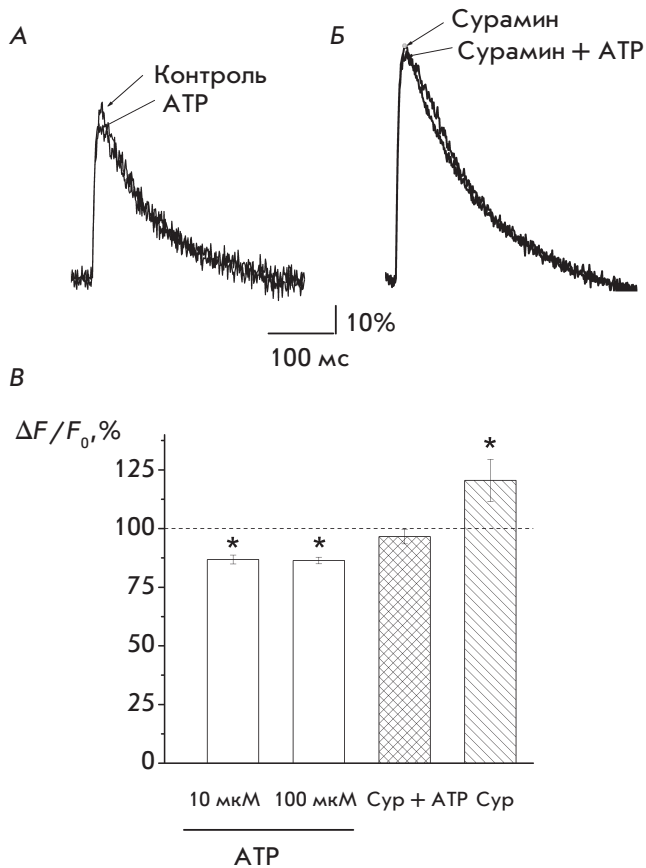


Рис. 1. АТР снижает амплитуду Ca²⁺-транзientа в результате активации P2-рецепторов. А – снижение амплитуды транзientа при действии 10 мкМ АТР. Б – отсутствие снижения амплитуды Ca²⁺-транзientа под влиянием АТР при наличии в среде сурамина. А, Б – усреднение 60 сигналов. В – влияние 10 и 100 мкМ АТР, сурамина (Сур) и АТР в присутствии сурамина на амплитуду Ca²⁺-транзientа. За 100% приняты значения амплитуды транзientа в контроле (для АТР и сурамина) и при блокировании P2-рецепторов сурамином (для Сур + АТР). * $p < 0.05$

ние амплитуды Ca²⁺-транзientа под действием АТР. Можно предположить, что активация пуринорецепторов АТР приводит к подавлению активности кальциевых каналов L-типа. Если это верно, то уменьшение амплитуды транзientа при действии нитрендипина должно быть менее выраженным в присутствии АТР. И действительно, нитрендипин не влиял на амплитуду Ca²⁺-транзientа после предварительной аппликации АТР – изменение амплитуды составило лишь $2.0 \pm 1.9\%$ ($n = 6$; рис. 2).

Ранее мы показали, что экзогенная АТР в концентрации 100 мкМ уменьшала амплитуду Ca²⁺-транзientа в равной степени в различных участ-

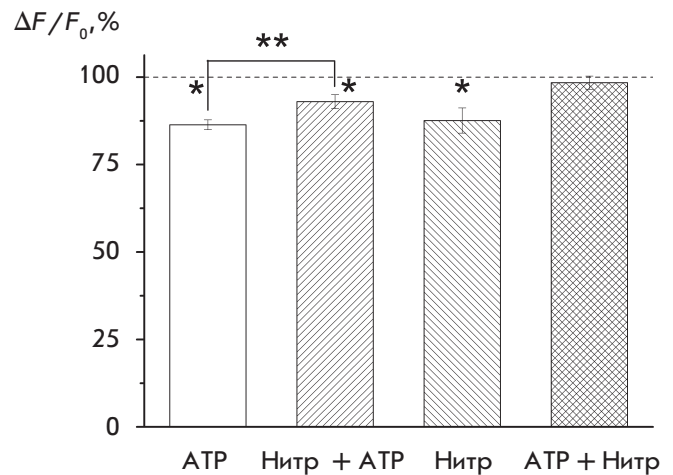


Рис. 2. АТР снижает амплитуду Ca²⁺-транзientа в результате блокирования каналов L-типа. АТР достоверно слабее уменьшает амплитуду транзientа после предварительной блокады каналов L-типа нитрендипином (Нитр + АТР). Нитрендипин *per se* снижает амплитуду транзientа (Нитр). * $p < 0.05$. Нитрендипин не влияет на амплитуду Ca²⁺-транзientа в условиях активации P2-рецепторов АТР (АТР + Нитр). ** $p < 0.05$ по критерию Манна–Уитни

ках протяженного нервного окончания лягушки [3]. Уменьшение транзientа при действии АТР соответствует снижению амплитуды вызванных ТКП при нормальном содержании кальция [1] и квантового состава ТКП в условиях сниженной концентрации ионов Ca²⁺ в растворе [9]. Данные об АТР-индуцированном уменьшении входа ионов Ca²⁺ внутрь терминали в ответ на нервный импульс согласуются с результатами работы [2], в которой показано обратимое снижение пресинаптического кальциевого тока под действием АТР.

Экзогенная АТР снижала амплитуду ТКП в результате активации пресинаптических P2Y-рецепторов, поскольку эффект предотвращался предварительной инкубацией препарата в сураминe [1]. В наших экспериментах снижение амплитуды Ca²⁺-транзientа при действии АТР также предотвращалось сурамином (рис. 1Б,В). При этом сам сурамин вызывал увеличение Ca²⁺-транзientа (рис. 1). Этот эффект может быть связан с возможностью увеличения концентрации ионов Ca²⁺ в цитоплазме в результате его выхода из саркоплазматического ретикулума [10]. Показано, что сурамин увеличивает не только вероятность открытого состояния, но и проводимость одиночных рианодин-чувствительных каналов [11]. Увеличение амплитуды Ca²⁺-транзientа под влиянием сурамина соответствует данным

об увеличении квантового состава ТКП при блокировании P2-рецепторов [12].

Данные о влиянии АТР на потенциал-зависимые кальциевые каналы L-типа достаточно противоречивы. АТР в микромолярных концентрациях способна обратимо дозо-зависимым образом подавлять ток через Ca²⁺-каналы L-типа в кардиомиоцитах [7]. В то же время активация пуринорецепторов способна усиливать вход ионов Ca²⁺ через каналы L-типа в перисинаптических глиальных клетках лягушки [6]. Полученные нами результаты показывают, что в снижение амплитуды Ca²⁺-транзientа при действии АТР вносит вклад подавление активности Ca²⁺-каналов L-типа. Об этом свидетельствует значительное снижение эффекта АТР на Ca²⁺-транзient в присутствии нитрендипина – специфического блокатора каналов L-типа (рис. 2). Дополнительным под-

тверждением того, что в эффекты АТР вносят вклад Ca²⁺-каналы L-типа, является отсутствие влияния их специфического блокатора нитрендипина на амплитуду транзientа после предварительного действия АТР (рис. 2). В этих условиях, когда активность Ca²⁺-каналов L-типа уже снижена под действием АТР, у нитрендипина не остается мишеней для воздействия.

Результаты нашей работы свидетельствуют, что в угнетающем действии АТР на вход Ca²⁺ в нервное окончание лягушки в ответ на нервный стимул существенную роль играет активность потенциал-зависимых кальциевых каналов L-типа. ●

*Работа частично поддержана грантом
РФФИ № 16-04-01051 А.*

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Sokolova E., Grishin S., Shakirzyanova A., Talantova M., Giniatullin R. // Eur. J. Neurosci. 2003. V. 18. P. 1254–1264.
2. Grishin S., Shakirzyanova A., Giniatullin A., Afzalov R., Giniatullin R. // Eur. J. Neurosci. 2005. V. 21. P. 1271–1279.
3. Khaziev E., Golovyahina A., Bukharaeva E., Nikolsky E., Samigullin D. // BioNanoSci. 2017. V. 7. P. 254–257.
4. 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. P. 179–194.
5. Khaziev E., Samigullin D., Zhilyakov N., Fatikhov N., Bukharaeva E., Verkhatsky A., Nikolsky E. // Front. Physiol. 2016. V. 7. P. 621. doi: 10.3389/fphys.2016.00621. eCollection 2016.
6. Robitaille R. // J. Neurosci. 1995. V. 15. P. 7121–7131.
7. Yamamoto T., Habuchi Y., Nishio M., Morikawa J., Tanaka H. // Cardiovascular Res. 1999. V. 41. P. 166–174.
8. Samigullin D.V., Khaziev E.F., Zhilyakov N.V., Bukharaeva E.A., Nikolsky E.E. // J. Vis. Exp. 2017. V. 125. P. 55122.
9. Tsentsevitsky A., Nikolsky E., Giniatullin R., Bukharaeva E. // Neuroscience. 2011. V. 189. P. 93–99.
10. Emmick J.T., Kwon S., Bidasee K.R., Besch K.T., Besch H.R. Jr // J. Pharmacol. Exp. Ther. 1994. V. 269. P. 717–724.
11. Hill A.P., Kingston O., Sitsapesan R. // Mol. Pharmacol. 2004. V. 65. № 5. P. 1258–1268.
12. Sugiura Y., Ko C.P. // Neuroreport. 2000. V. 11. № 13. P. 3017–3021.