УДК 612.816

НЕРВНО-МЫШЕЧНОЕ СОЕДИНЕНИЕ МОЖНО ВОЗБУДИТЬ БЫСТРЫМ СНИЖЕНИЕМ ТЕМПЕРАТУРЫ

Харакоз Д.П., Медведева А.А., Горелов А.В., Попова И.Ю., Климов А.А.

ИТЭБ РАН ФГБУН «Институт теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук», Пущино, e-mail: repa-pa@yandex.ru

Хорошо известно, что сокращение мышцы в нервно-мышечном препарате (НМП) можно вызвать такими неспецифическими факторами, как электрическая стимуляция, химические и механическое воздействия. Ранее была высказана гипотеза о том, что в быстрых синапсах необходимым этапом в осуществлении синаптического экзоцитоза является Ca^{2+}-индуцированный переход в липидной фракции мембраны из жидкого в твердое состояние – гипотеза фазово-переходного механизма. Целью данной работы было проверить может ли быстрое охлаждение системы инициировать экзоцитоз без участия Ca^{2+} при условии «подготовленного» состояния синапса. Для создания такого состояния синапса в НМП лягушки мы использовали высокочастотную (100 Гц) стимуляцию нерва в условиях инкубации препарата в растворе с пониженной концентрацией кальция. Нам удалось показать на НМП лягушки, что при определенных условиях быстрое снижение температуры тоже может служить неспецифическим фактором, вызывающим сокращение мышцы, и что это сокращение является результатом возбуждения нервно-мышечного соединения.

Ключевые слова: синаптический экзоцитоз, биологические мембраны, охлаждение

NEUROMUSCULAR CONNECTION COULD BE STIMULATED BY MEANS OF RAPID TEMPERATURE DECREASE

Kharakoz D.P., Medvedeva A.A., Gorelov A.V., Popova I.Y., Klimov A.A.

ITEB RAS Federal State Budgetary Institution of Science Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy of Sciences, Pushchino, e-mail: repa-pa@yandex.ru

It is well known that muscle contraction in the nerve-muscle preparation (NMP) could be caused by non-specific factors such as an electrical stimulation, chemical and mechanical effects. Earlier the hypothesis of phase-transitional mechanism was stated: in fast synapses a necessary stage of synoptic exocytosis is calcium-induced phase transition in the lipid component of membrane from liquid to solid condition. The purpose of this work was to investigate whether fast cooling could initiate exocytosis without participation of calcium under certain «prepared» condition of synapse. For creation of such synapse state in frog NRM we used a high-frequency (100 Hz) stimulation of a nerve during its incubation in solution with the lowered concentration of calcium. We managed to show using frog NRM that under certain conditions a rapid temperature decrease as a non-specific factor could cause muscle contraction, and this reduction was the result of excitation of the neuromuscular junction.

Keywords: synoptic exocytosis, biological membranes, cooling

Множество экспериментальных данных, полученных как на клеточном уровне, так и на уровне организма, указывают на то, что фазовый переход биологической мембраны из жидкого в твердое состояние играет важную роль в механизме возбудимости нервной ткани [7–10]. Была высказана гипотеза о том, что в быстрых синапсах *необходимым* этапом в осуществлении синаптического экзоцитоза является Ca^{2+}-индуцированный переход мембраны из жидкого в твердое состояние – гипотеза фазово-переходного механизма [9, 10]. В активных зонах пресинапса существуют как минимум два класса мишеней, с которыми связывается Ca^{2+} – «*мишень I*» и «*мишень II*», различающиеся по характеру функционального действия и по сродству к Ca^{2+} [2, 12]. В состоянии покоя внутриклеточная концентрация Ca^{2+} составляет около 0,1 мкМ [1]. При деполяризации она повышается до величин, соответствующих константам диссоциации сначала мишени *I*, затем мишени *II*. *Мишень I* с высоким сродством к кальцию – это центры связывания кальция на белках SNARE-комплекса, удерживающего везикулы на цитоплазматической мембране. Сродство этих центров к Ca^{2+} соответствует константам диссоциации в диапазоне 1–10 мкМ [5, 6]. С точки зрения фазово-переходного механизма *функциональное значение связывания Ca^{2+} состоит в том, чтобы в точке контакта везикулы с цитоплазматической мембраной сформировалось механически слабое место*, готовое порваться в ответ на механическое натяжение мембраны [9, 10]. *Мишень II*, представленная в синапсе, по-видимому, анионными липидами [6, 9], обладает на один-два порядка более низким сродством – это следует из того факта, что для инициации быстрого экзоцитоза в большинстве синапсов требуется локальная внутриклеточная концентрация Ca^{2+} превышающая 100 мкМ [1, 6, 11, 13]. *Функциональная роль связывания Ca^{2+} с мишенью II состоит в инициации перехода мембраны в твердое состояние* [9, 10]. Площадь поверхности мембраны при отвердевании сокращается, мембрана механически на-

прягается и рвется в слабом месте, подготовленном мишенью I; это и приводит к слиянию мембран и высвобождению нейромедиатора. Как показано ранее [4], энергия напряженного состояния и скорость фазового перехода достаточно велики для того, чтобы переход и экзоцитоз могли осуществиться за необходимое короткое время (< 0,1 мс). Однако до настоящего времени не было получено прямых доказательств фазово-переходного механизма.

Если действительно функция мишени II (экзоцитоз) осуществляется благодаря Ca^{2+}-индуцированному отвердеванию мембраны, то эту функцию можно было бы инициировать быстрым охлаждением системы без участия Ca^{2+}. Однако в такой простой постановке опыта осталась бы невыполненной важная подготовительная функция первой мишени – формирование механически слабого места под везикулой. И тогда вероятность экзоцитоза была бы крайне низка, так как вызванные отвердеванием разрывы мембраны происходили бы хаотично в любом месте. Следовательно, должны быть созданы такие условия, при которых кальций мог бы достичь уровня, достаточного для связывания с мишенью I, но не с мишенью II. Тогда слабое место под везикулой было бы подготовлено, и на этом фоне основное действие – отвердевание мембраны и акт экзоцитоза – можно было бы инициировать снижением температуры.

Цель данной работы – проверить, может ли быстрое охлаждение системы инициировать экзоцитоз без участия Ca^{2+} при условии «подготовленного» состояния синапса. Для создания такого состояния синапса в НМП лягушки мы использовали высокочастотную (100 Гц) стимуляцию нерва в условиях инкубации препарата в растворе с пониженной концентрацией кальция.

Материалы и методы исследования

Объектом исследования был выбран классический НМП икроножной мышцы лягушки *Rana temporaria*. Эксперименты проводили в августе, животные ($n = 7$) отлавливались в естественной среде обитания за один-три дня до опыта и содержались без подкормки во влажных условиях при температуре 17–18 °C. В экспериментах использовали стандартный физиологический раствор Рингера для холоднокровных (RCa) следующего состава (мМ): NaCl – 110, KCl – 1,8, $CaCl_2$ – 0,90, $NaHCO_3$ – 2,0; pH = 7,2. При приготовлении номинально бескальциевого раствора (RMg) $CaCl_2$ заменялся на молярно эквивалентное количество $MgCl_2$ (примесное содержание кальция в этом растворе не превышало 0,050 мМ по данным атомно-абсорбционной спектрометрии). Электрическая стимуляция нерва производилась серией прямоугольных импульсов (длительность 0,1 мс, частота 100 Гц). Для измерения силы сокращения мышцы был сконструирован датчик, основанный на изгибной деформации упругого стержня, измеряемой фотометрически; диапазон измеряемых сил от 0 до 500 мН, чувствительность 1 мН.

Эксперименты ($n = 21$) проводили по следующей схеме. Мышца помещалась в RCa при комнатной температуре (около 20 °C). Затем стандартный раствор заменялся на RMg, при этом мышца подвергалась «массажу» стеклянной палочкой для ускорения обмена солей между мышцей и раствором. В растворе RMg сила сокращения мышцы постепенно уменьшалась до полного исчезновения ответа. Исчезновение ответа рассматривалось как указание на то, что уровень Ca^{2+} в системе уже недостаточен для связывания с мишенью II. После этого экспериментальную камеру освобождали от PMg комнатной температуры, включали стимуляция нерва, и на ее фоне камеру заполняли ледяным PMg (0–3 °C). Температура раствора в камере сразу после заполнения поднималась до 10–13 °C из-за теплообмена со стенками. Смена раствора занимала менее 3 секунд. Предполагалось, что если экзоцитозная функция мишени II в синапсах действительно выполняется благодаря отвердеванию мембраны, то при понижении температуры раствора в мышце должна возникнуть серия сокращений, отражающих достижение холодовым фронтом синаптических окончаний внутри мышцы.

Для проверки, на какой элемент НМП действует охлаждение, проводились также контрольные эксперименты, описанные ниже.

Результаты исследования и их обсуждение

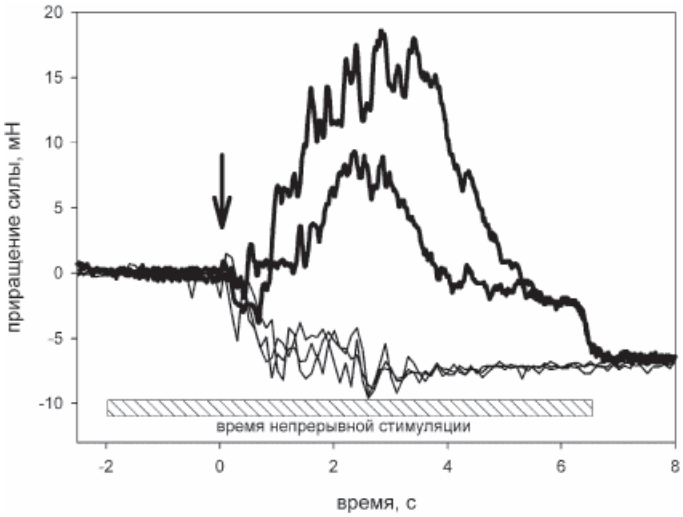
Мышечный ответ в стандартном растворе RCa значительно превышал 500 мН, будучи за пределами рабочего диапазона датчика силы. Полная потеря ответа мышцы на длительную стимуляцию нерва (длительностью 11–12 с) наступала через 60–120 мин после смены RCa на RMg. Отметим две важные особенности этого «декальцинированного» состояния. Во-первых, оно обратимо: при замене RMg на RCa ответ мышцы на раздражение нерва немедленно начинал восстанавливаться. Во-вторых, мышца сохраняла способность отвечать сокращением на непосредственную электрическую стимуляцию самой мышцы (сила ответа превышала 500 мН). Это значит, что декальцинирование блокирует синаптическую передачу, не нарушая сократительный аппарат мышцы.

После декальцинирования включали стимуляцию нерва и на ее фоне раствор RMg комнатной температуры заменяли на ледяной раствор. Было обнаружено, что с началом охлаждения мышцы в ней возникает серия спонтанных сокращений, длящаяся не менее 5 с (рисунок). При этом сила сокращения в пике составляла 10–20 мН. Эти результаты подтверждают предположение о том, что понижение температуры инкубационного раствора приводит к отвердеванию липидного бислоя мембраны и реализации экзоцитозной функции мишени II в синапсах.

В серии контрольных опытов, направленных на проверку, является ли охлаждение фактором, возбуждающим нервно-мышечное соединение, было показано, что:

1. В случае, когда мышца не декальцинирована и в ней развивается обычный тетанический ответ на электрическую стимуляцию, то охлаждение ледяным физиологическим раствором приводит к значительному падению силы ее сокращения (примерно в 1,5 раза). Следовательно, развитие силы в нашем основном опыте не вызвано действием на собственно сократительный аппарат мышцы.

2. Спонтанные сокращения мышцы не возникают, если замена теплого RMg на холодный проводится без включения фоновой высокочастотной стимуляции нерва (рисунок, тонкие линии). Следовательно, во-первых, еще раз подтверждается предыдущий вывод о том, что сокращение мышцы не является реакцией сократительного аппарата на холод, но связан с процессами в синаптическом контакте. Во-вторых, повышение внутриклеточной концентрации Ca^{2+} (с помощью фоновой стимуляции) является обязательным условием для инициации экзоцитоза путем резкого охлаждения – как и предполагалось при планировании эксперимента.



Жирными линиями показаны типичные кривые развития силы мышечного сокращения, инициированного вливанием ледяного физиологического раствора (стрелкой обозначено начало вливания) в камеру с мышцей на фоне непрерывной высокочастотной стимуляции нерва (продолжительность стимуляции показана горизонтальной штрихованной планкой внизу рисунка). Тонкими линиями показаны контрольные опыты, полученные в тех же условиях, но без стимуляции нерва. Систематическое снижение силы при заливке – результат действия архимедовой выталкивающей силы. Приращение силы на оси ординат – разность между текущей силой и начальной; начальное натяжение мышцы всегда устанавливалось в диапазоне 40–50 мН

3. Сокращение мышцы не происходит, если электрическая стимуляция нерва начинается после замены теплого RMg на холодный. Следовательно, снижение температуры не приводит к повышению сродства мишени II к ионам кальция и, значит, возбуждение холодом в нашем основном опыте вызвано процессом отвердевания синаптической мембраны в момент ее охлаждения.

Заключение

Из совокупности результатов следуют два основных вывода.

1. Обнаружено неизвестное ранее явление, заключающееся в том, что *быстрое охлаждение биологической ткани может служить неспецифическим фактором возбуждения* наряду с известными электрическими, химическими и механическими факторами. В исследованном нами объекте возбуждение возникает на уровне нервно-мышечного соединения, а не на уровне сократительного аппарата мышцы (иначе мышца и без стимуляции нерва сократилась бы под действием холода).

2. Способность нервно-мышечного препарата возбуждаться под действием снижения температуры является следствием фазово-переходного механизма синаптического экзоцитоза, и это следствие получило здесь экспериментальное подтверждение. Можно считать, что в *работе представлено убедительное, хотя и непрямое подтверждение гипотезы о фазово-переходном механизме экзоцитоза.*

Значение этого факта выходит за пределы узко поставленной задачи о молекулярных механизмах синаптической передачи, поскольку гипотеза о фазовопереходном механизме продемонстрировала свою перспективность в исследовании нерешенных проблем в разных областях физиологии и медицины, включая сомнологию, физиологию терморегуляции, анестезиологию, эволюцию теплокровности и другие [3, 8, 9, 10].

Мы благодарим И.Ю. Сергеева, С.М. Ляпкова и Г.С. Сурову за ценные консультации, В.Ю. Архипова, И.П. Амзаракову и К.Г. Тихонова за техническую помощь, а также выражаем признательность руководству Звенигородской биостанции МГУ за содействие в проведении работы на ее территории.

Список литературы

1. Зефиров А.Л., Петров А.М. Синаптическая везикула и механизм освобождения медиатора. – Казань: Арт-кафе, 2010. – С. 324.

2. Мухамедьяров М.А. Первая российская конференция по когнитивной науке. – Казань, 9–12 октября 2004. – URL: http://www.ksu.ru/ss/cogsci04/science/cogsci04/173.doc.

3. Харакоз Д.П. Сон и тревожность. – Ростов-на-Дону: ЮНЦ РАН, 2008. – С. 253–268.

4. Харакоз Д.П., Сизоненко Т.О., Галимова М.Х. // Биофизика. – 2011. – Т. 56. – № 5. – С. 813–820.

5. Bajjalieh S.M. // Curr. Opin. Neurobiol. – 1999. – Vol. 9. – P. 321–328.

6. Bajjalieh S.M., Scheller R.H. // J. Biol. Chem. – 1995. – Vol. 270. – P. 1971–1974.

7. Heimburg T., Jackson A.D. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2005. Vol. 102. P. 9790–9795.

8. Heimburg T., Jackson A.D. // Biophys. J. – 2007. – Vol. 92. – № 2. – P. 3159–3165.

9. Kharakoz D.P. // Biosci. Rep. – 2001. – Vol. 21. – № 6. – P. 801–830.

10. Kharakoz D.P. In.: Phase-transitions in Cell Biology. – B.: Springer, 2008. – P. 73–93.

11. Mennerick S., Matthews G. // Neuron. – 1996. – Vol. 17. – P. 1241–1249.

12. Mukhamedyarov M.A., Grishin S.N., Zefirov A.L., Palotás A. // Eur. J. Physiol. – 2009. – Vol. 458. – P. 563–570.

13. Südhof T.C. // Annu. Rev. Neurosci. – 2004. – Vol. 27. – P. 509–547.

References

1. Zefirov A.L., Petrov A.M. Synoptic vesicle and mechanism of mediator release. Kazan: Art-cafe, 2010. pp. 324.

2. Mukhamedyarov M.A., The first Russian Conference of Cognitive Science. Kazan, Oktober 9-12 2004; http://www.ksu.ru/ss/cogsci04/science/cogsci04/173.doc

3. Kharakoz D.P. In book: Dream and uneasiness. Rostov-on-Don: SSC RAS 2008. pp. 253–268.

4. Kharakoz D.P., Sizonenko T.O., Galimova M.H. // Biophysics. 2011. T. 56. no. 5. pp. 813–820.

5. Bajjalieh S.M. // Curr. Opin. Neurobiol. 1999. Vol. 9. pp. 321–328.

6. Bajjalieh S.M., Scheller R.H. // J. Biol. Chem. 1995. Vol. 270. pp. 1971–1974.

7. Heimburg T., Jackson A.D. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2005. Vol. 102. pp. 9790–9795.

8. Heimburg T., Jackson A.D. // Biophys. J. 2007. Vol. 92. no. 2. pp. 3159–3165.

9. Kharakoz D.P. // Biosci. Rep. 2001. Vol. 21. no. 6. pp. 801–830.

10. Kharakoz D.P. In.: Phase-transitions in Cell Biology. B.: Springer, 2008. pp. 73–93.

11. Mennerick S., Matthews G. // Neuron. 1996. Vol. 17. pp. 1241–1249.

12. Mukhamedyarov M.A., Grishin S.N., Zefirov A.L., Palotás A. // Eur. J. Physiol. 2009. Vol. 458. pp. 563–570.

13. Südhof T.C. // Annu. Rev. Neurosci. 2004. Vol. 27. pp. 509–547.

Рецензенты:

Кичигина В.Ф., д.б.н., зав. лабораторией системной организации нейронов ИТЭБ РАН ФГБУН «Институт теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук», г. Пущино;

Орлов Н.Я., д.б.н., зав. лабораторией функциональной биофизики белка ИТЭБ РАН ФГБУН «Институт теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук», г. Пущино.

Работа поступила в редакцию 28.12.2012.