

К ВОПРОСУ О РОЛИ ЭКТОНУКЛЕОТИДАЗ В СИНАПТИЧЕСКОЙ ПЕРЕДАЧЕ. ТЕРМОЛАБИЛЬНОСТЬ МЕТАБОЛИЗМА АТФ

© 2023 г. А.Е. Хайруллин*, **, #, Д.В. Ефимова*, Д.В. Иванова*, С.Н. Гришин*, А.У. Зиганшин*

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

**Казанский федеральный университет, ул. Кремлевская, 18, Казань, 420008, Россия

#E-mail: khajrulli@yandex.ru

Поступила в редакцию 10.05.2023 г.

После доработки 23.05.2023 г.

Принята к публикации 21.06.2023 г.

АТФ как посредник в нервно-мышечном синапсе может высвобождаться путем квантовой и не-квантовой секреции из мотонейронов центральной и периферической нервной системы вместе с основным нейромедиатором — ацетилхолином. Последовательное гидролитическое дефосфорилирование АТФ до аденозина в синаптической щели — это каскад реакций, катализируемый эктонуклеотидазами. Большой интерес представляет изучение вклада этих ферментов в сложный сигнальный каскад, так как известно об их двойной функции — лимитирование действия АТФ как нейромедиатора и участие в образовании других нейромодуляторов (АДФ, АМФ и аденозина), причем известно, что АТФ и ее метаболиты могут вызывать совершенно различные физиологические эффекты. В работе определена активность эктонуклеотидаз в различных типах скелетных мышц, показано, что она варьирует в пределах 5–7 МЕ. Понижение температуры до 22°C приводит к многократному снижению энзиматического метаболизма АТФ в тканях скелетных мышц. Предполагается, что энзиматическое лимитирование АТФ и продукции ее метаболитов обеспечивает стабилизацию эффективной холинергической нервно-мышечной передачи в норме и патологии.

Ключевые слова: нервно-мышечный синапс, эктонуклеотидазы, метаболизм АТФ, синаптическая сигнализация.

DOI: 10.31857/S0006302923040105, EDN: KLIGJV

Известно, что наиболее эффективным из нативных модуляторов синаптической передачи является котрансмиттер ацетилхолина — АТФ [1]. Выделяясь вместе с основным медиатором, АТФ ингибирует дальнейший экзоцитоз ацетилхолина из терминали мотонейрона по принципу отрицательной обратной связи, формируемой при участии пресинаптических P2-рецепторов. Метаболиты АТФ, в первую очередь аденозин (посредством аденозиновых рецепторов), действуют по такому же принципу [2].

Концентрация пуринов вне клетки зависит от баланса между их высвобождением из клеток, поглощением и внеклеточным метаболизмом [3]. После выхода АТФ во внеклеточное пространство происходит дефосфорилирование данной молекулы различными сывороточными и мембранными ферментами, например, эктонуклеотидазами [4].

Активность этих ферментов обнаружена у всех исследованных живых организмов: растений, бактерий, животных и человека [5]. Все известные эктоферменты, контролирующие концен-

трацию нуклеотидов, принадлежат к нескольким семействам, различающимся по происхождению и механизму действия. Существует четыре семейства нуклеотидаз: NTPDases (нуклеозидтрифосфатдифосфогидролазы), NPPases (пирофосфогидролазы/фосфодиэстеразы), фосфатазы и экто-5'-нуклеотидазы [6, 7].

Основными нуклеотидазами, участвующими в процессе гидролиза пуринов, являются CD39 и CD73. Первый метаболизирует АТФ до АДФ, пирофосфата и АМФ. Последний, в свою очередь, расщепляется до аденозина и фосфата с помощью поверхностного фермента CD73 [4]. Таким образом, активность эктонуклеотидаз CD39 и CD73 обеспечивает баланс АТФ и аденозина. Эти молекулы экскретируются из клеток многих тканей и органов: сердца, плаценты, легких, печени, кишечника, мозга, почек и др. [4, 8].

Максимальная каталитическая активность этих ферментов достигается при условии содержания во внеклеточной среде двухвалентных катионов, таких как кальций или магний, и щелочного значения pH. Кроме того, они имеют вы-

сокую чувствительность к изменениям температурных показателей: являясь по природе белками, имеют склонность к денатурации и потере активности при повышении температуры выше 70°C. Скорость катализируемой ими реакции также напрямую зависит от температуры: при повышении ее на 10°C реакция ускоряется в два-три раза, а при приближении к 0°C — замедляется до минимума. Таким образом, температурная среда влияет на следующие основные составляющие ферментативной реакции: на белковую часть фермента, на скорость образования фермент-субстратного комплекса и на все этапы преобразования субстрата [9, 10].

Поддержание температуры тела в определенных значениях обеспечивает теплокровным животным способность передвигаться, совершать двигательную активность при широком диапазоне температурных различий окружающей среды [11].

Известно, что при отсутствии значительных колебаний температуры внутренних органов млекопитающих, периферические отделы их тела могут испытывать большие изменения в температуре, в частности, снижение на 15°C у человека [12]. Таким образом, периферические скелетные мышцы теплокровных сохраняют способность к сократительной активности даже при значительном снижении их температуры [13].

По современным представлениям сила, скорость сокращения и расслабления скелетных мышц теплокровных, как правило, увеличиваются с повышением температуры [14]. Это наблюдалось, например, во время физических упражнений, когда температура скелетных мышц на периферии тела человека увеличивалась на несколько градусов по Цельсию [15, 16].

Вместе с тем в указанных работах не придавалось особого значения типам исследованных скелетных мышц. Не подлежит сомнению, что они, различающиеся по самой своей функции — обеспечивающие поддержание позы («медленные» мышцы) и выполняющие «тонкие» движения («быстрые» мышцы) — призваны по-разному реагировать на изменения температуры, что и наблюдается на практике [17].

Определенную сложность в исследовании вносит тот факт, что в физиологических условиях влияние АТФ и ее метаболитов в нервно-мышечном синапсе минимально, но становится более выраженным в некоторых патофизиологических ситуациях, таких как стресс, гипогравитация, травмы, ишемия или гипотермия [18, 19]. Кроме того, существуют данные, демонстрирующие разнонаправленность действия АТФ в нервно-мышечном синапсе разных типах двигательных единиц [20–22].

Исходя из современных представлений о вкладе пуринергической модуляции в процессы синтаптической сигнализации большой интерес вызывает вклад эктонуклеотидаз в пластичность этой сложной, многомодальной системы. В связи с этим целью настоящего исследования явилась оценка уровня ферментативного гидролиза АТФ в нервно-мышечных препаратах крыс при нормальной и пониженной температуре.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Подготовительные процедуры. Исследования проводились на 15 лабораторных крысах линии Wistar, самцах и самках массой 130–190 г, которых содержали в группах по 5 особей, с водой и кормом *ad libitum*.

Животных перед началом манипуляций наркотизировали при помощи ингаляционной анестезии раствором эфира. После наступления наркотического сна проводили декапитацию при помощи гильотины, обескровливание и последовательное выделение мышц, используемых при проведении исследований (m. diaphragma, m. soleus, m. EDL).

Активность фермента эктонуклеотидазы определяется посредством инкубирования кусочков мышечной ткани (m. soleus, m. EDL, m. diaphragma) крыс с АТФ (субстрат реакции) в течение определенного времени с дальнейшей оценкой содержания субстрата и продуктов реакции (АДФ, АМФ) в инкубате методом высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Перед получением материала готовили буферный раствор следующего состава (в мМ) — HEPES — 10, NaCl — 135, KCl — 5, CaCl₂ — 2, MgCl₂ — 2, глюкоза — 10, pH 7.4. Материал укладывали в подготовленную емкость, далее иссекали все остальные ткани, оставляя фрагмент мышечной ткани с культей нерва массой 2–4 мг. Полученные кусочки ткани помещали в ячеистую пластину, заполненную 300 мкл буфера, нагретого до 37°C или 22°C. Встряхивали в течение 10 мин для удаления поврежденных клеток и следов нуклеотидов, далее удаляли буфер, оставляя фрагменты ткани в лунках. После этого в 1-ую и 3-ю вертикали добавляли по 300 мкл буфера, содержащего АТФ (300 мкМ). Как только 1-ая и 3-я вертикали заполнялись, начинали добавлять буферную жидкость во 2-ю вертикаль. По заполнении всех 9 лунок встряхивали пластину в течение 10 мин при 37°C или 22°C. Далее для остановки реакции добавляли по 300 мкл 3%-й хлорной кислоты. По завершении реакции инкубационную жидкость центрифугировали при 3000 об/мин в течение 5 мин, после этого надосадочную жидкость замораживали для последующего количественного определения АТФ мето-

дом высокоэффективной жидкостной хроматографии. После того, как инкубат помещали в центрифугу, фрагменты ткани взвешивали.

Эксперименты проводили на хроматографе производства Shimadzu (Япония), состоящем из спектрофотометрического детектора SPD-20A, дегазатора DGU-20A3, насоса LC-20AD и термостата CTO-20A, с использованием программного обеспечения LC Solution. Для разделения нуклеотидов использовали колонку Supelco с длиной 15 см и внутренним диаметром 4.6 мм. Мобильная фаза состояла из 0.2 М KH_2PO_4 и 3%-го метанола (pH 6.0), скорость тока 1.5 мл/мин, длина волны 210 нм и объем образца 20 мкл.

При данных условиях нуклеотиды появлялись в следующем порядке: АТФ, АДФ и АМФ. Полное разделение нуклеотидов происходило в течение 5 мин.

Определяли концентрацию АТФ путем сравнения уровня напряжения самой высокой точки с соответствующим уровнем напряжения у контрольного образца. Для нахождения активности эктонуклеотидаз использовали формулу:

$$A = \frac{(v_{\text{АТФконтроль}} - v_{\text{АТФопыт}})}{t * N},$$

где A — активность фермента в МЕ, $v_{\text{АТФконтроль}}$ — количество АТФ в контроле, $v_{\text{АТФопыт}}$ — количество АТФ в опыте, t — время эксперимента в мин., N — масса ткани в мг.

Расчет температурного коэффициента Q_{10} . Из уравнения Вант-Гоффа температурный коэффициент универсально для любого диапазона температур вычисляется по формуле:

$$Q_{10} = \left(\frac{R_2}{R_1} \right)^{\left(\frac{10}{T_2 - T_1} \right)},$$

где R_n — сила сокращения при температуре T_n .

Мы в своих экспериментах для расчета Q_{10} использовали отношение активности эктонуклеотидаз при температурах 22°C и 37°C.

Статистическую обработку данных проводили с помощью программы SPSS Statistics. Проверку соответствия полученных данных нормальному распределению проводили с помощью критерия Колмогорова. Рассчитывали средние арифметические анализируемых параметров и стандартную ошибку. Статистическую значимость наблюдаемых изменений оценивали с помощью критерия Стьюдента для независимых и попарно сопряженных выборок. Различия рассматривали как значимые при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В норме активность эктонуклеотидаз в различных типах скелетных мышц примерно равна, варьируется в пределах 5–7 МЕ, что говорит о гомогенном энзиматическом метаболизме внеклеточной АТФ в исследуемых тканях. При понижении температуры до 22°C наблюдается многократное, неравномерное снижение энзиматического метаболизма АТФ в различных тканях (табл. 1).

Оценка температурной зависимости Р2-опосредованных эффектов и эктонуклеотидазной активности. В данном случае температурный коэффициент Q_{10} — это величина, равная отношению эффективности биохимических реакций, сопряженных с механической активностью мышц при повышенной на 10°C температурой окружающей среды к первоначальному значению эффективности.

Температурный коэффициент Q_{10} для эктонуклеотидаз для камбаловидной мышцы составил 3.774 ± 0.490 , для длинного разгибателя пальцев — 4.014 ± 0.521 , для диафрагмы — 2.246 ± 0.291 .

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Ранее нами было описано температурозависимое действие АТФ на функциональное состояние скелетной мышцы [20–22]. Так сопоставляя данные коэффициентов термолабильности энзиматических систем и показателей термочувствительности нервно-мышечных соединений, следу-

Таблица 1. Активность эктонуклеотидаз (в МЕ)

	37°C	22°C
m. diaphragma	6.001 ± 1.140 ($n = 12$)	$1.793 \pm 0.340^*$ ($n = 11$)
m. soleus	6.578 ± 1.249 ($n = 10$)	$0.906 \pm 0.172^*$ ($n = 10$)
m. EDL	5.318 ± 1.010 ($n = 12$)	$0.668 \pm 0.126^*$ ($n = 12$)

Примечание. * — Достоверное отличие от контроля при 37°C, $p < 0.05$.

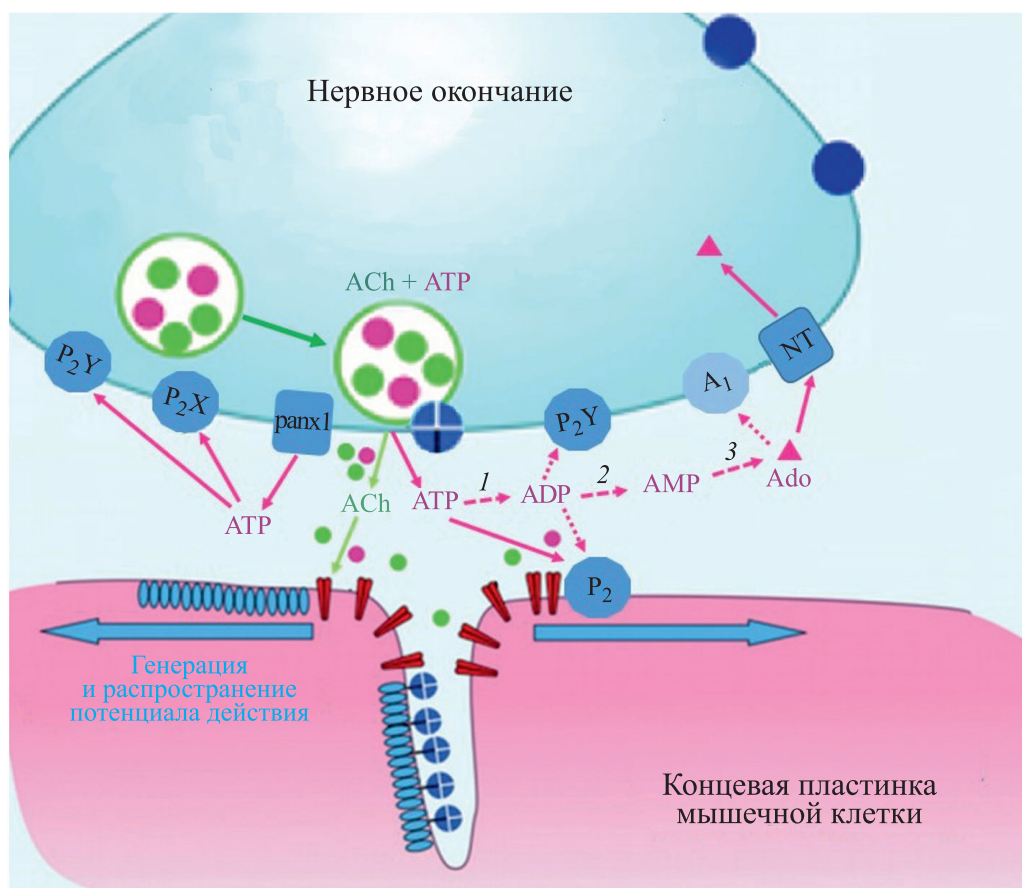


Рис. 1. Нервно-мышечный синапс: A₁ — аденозиновый рецептор, P₂ — пуриновый рецептор, АТФ — аденозинтрифосфат, АДФ — аденозиндифосфат, АМФ — аденозинмонофосфат, Ado — аденозин, ACh — ацетилхолин, 1 — экто-АТФазы (CD39) и экто-аденилаткиназа (ADK), 2 — экто-АТФазы (CD39), 3 — экто-5'-нуклеотидаза (CD73).

ет отметить разнонаправленность в их динамике. Вероятно, снижение активности эктонуклеотидаз в синаптической щели приводит к снижению метаболизма внеклеточной АТФ и, соответственно, к повышению ее количества. Учитывая зависимость физиологических эффектов АТФ от ее концентрации [23], можно было бы предположить их равноэффективное усиление в условиях понижения температуры, однако мы наблюдаем смешанную картину. «Быстрая» (m. EDL) и «медленная» (m. soleus) мышцы, имея разнонаправленный вектор изменений, одинаково демонстрируют прирост эффективности в соответствующем векторе, в противовес им дыхательная мышца стабилизируется и в меньшей степени реагирует на температурные изменения в присутствии АТФ. Значения температурного коэффициента Q_{10} менее единицы, обычно характерные для интенсивных физиологических процессов, протекающих с участием ферментативных и ка-

нальных систем, свидетельствуют о том, что либо указанные системы вовсе не принимают участия в механизме передачи синаптического сигнала, либо могут принимать, но при условии компенсации обычной температурной зависимостью сопряженных с ними процессов, т.е. таких процессов, интенсивность которых с ростом температуры уменьшается и, наоборот, с уменьшением температуры возрастает. Причем обратная температурная зависимость этих процессов должна полностью компенсировать обычную температурную зависимость и перекомпенсировать ее при изменении температуры. Таким образом, можно считать, что и медленная, и быстрая мышцы одинаково чувствительны к изменению температуры окружающей среды, но реакция на такие изменения у них разнонаправленная, в отличие от диафрагмы, имеющей наименьшее значение коэффициента термоллабильности.

Вероятнее всего ключевую роль в адаптации к изменению температуры играют не только эктонуклеотидазы, но и другие участники пуринергической сигнальной цепи — АДФ, АМФ и аденозин.

Путем регуляции уровня АТФ и его производных в межклеточном пространстве эктонуклеотидазы контролируют активность различных подтипов пуринорецепторов и тем самым участвуют в регуляции сократимости мышц (рис. 1).

В некоторых тканях метаболизм внеклеточных нуклеотидов регулирует рецепторную функцию, а в других может преимущественно служить в качестве «спасения» пуринов или даже — как в кишечнике — обеспечивать функцию питания и всасывания микроэлементов. Также имеются и растворимые виды эктонуклеотидаз, что позволяет им диффундировать в ткани и клетки и переноситься жидкостями организма.

Данные ферменты в первую очередь важны для клеток, секретирующих АТФ такие как пуринергические нейроны, тромбоциты и эндотелиальные клетки или клетки, которые активируются АТФ, например, гладкомышечные клетки [8]. Однако нельзя недооценивать и их вклад в регуляцию функции скелетных мышц. Исходя из результатов настоящего исследования, именно активность нуклеотидаз обслуживает особенности функционирования различных типов двигательных единиц млекопитающих.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Мы предполагаем, что роль энзиматического лимитирования АТФ и продукция ее метаболитов, обеспечивает стабилизацию эффективной холинергической нервно-мышечной передачи в норме и патологии. Так, представленные в данной статье результаты экспериментов показали, что известные изменения синаптической эффективности опосредуются в том числе подстройкой функционирования эктонуклеотидаз синаптической щели.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Казанского государственного медицинского университета Минздрава России на проведение научных исследований в рамках Программы развития Университета (грант 2/22-5), а также в рамках программы «Стратегическое академическое лидерство Казанского федерального университета» (ПРИОРИТЕТ-2030).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Проведенные эксперименты полностью соответствуют действующим национальным и международным нормам в области этики.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. A. U. Ziganshin, A. E. Khairullin, C. H. V. Hoyle, and S. N. Grishin, *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, 1 (2020).
2. R. A. Giniatullin and E. M. Sokolova, *Br. J. Pharmacol.*, **124** (4), 839 (1998).
3. S. R. Nelson, A. Li, S. Beck-Previs, et al., *Biophys. J.*, **119**, 1050 (2020).
4. A. S. Golovkin, M. K. Serebryakova, E. V. Zhiduleva, et al., *Translat. Medicine*, **4**, 46 (2017).
5. K. Losenkova, M. Paul, H. Irjala, et al., *Methods Mol. Biol.*, **2041**, 107 (2020).
6. N. Zimmermann, P. R. Naeck, J. Neumann, et al., *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **35** (6), 881 (2000).
7. M. Minor, K. P. Alcedo, R. A. Battaglia, and N. T. Snider, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **317** (6), 1079 (2019).
8. G. Burnstock, *Drug Dev. Res.*, **28**, 195 (1993).
9. C. Held and G. Sadowski, *Annu. Rev. Chem. Biomol. Eng.*, **7**, 395 (2016).
10. D. J. Taylor, N. P. O. Green, and G. W. Stout, *Biological Science* (Cambridge University Press, 1997).
11. R. S. James, *J. Comp. Physiol. B*, **183** (6), 723 (2013).
12. K. W. Ranatunga, *Exp. Physiol.*, **83** (3), 371 (1998).
13. A. E. Khairullin, A. U. Ziganshin, and S. N. Grishin, *Biochemistry (Moscow) Suppl. Ser. A: Membrane and Cell Biology*, **11** (1), 1 (2017).
14. J. A. Rall and R. C. Woledge, *Am. J. Physiol.*, **259** (2), 197 (1990).
15. G. P. Kenny, F. D. Reardon, W. Zaleski, et al., *J. Appl. Physiol.*, **94** (6), 2350 (2003).
16. P. Yaicharoen, K. Wallman, A. Morton, and D. Bishop, *J. Sci. Med. Sport*, **15** (5), 451 (2012).
17. S. Racinais and J. Oksa, *Scand J. Med. Sci. Sports*, **20** (3), 1 (2010).
18. A. Ziganshin, R. Kamaliev, A. Gabdrakhmanov, et al., *Int. J. Pharmacol.*, **14** (8), 1198 (2018).
19. A. E. Khairullin, A. Y. Teplov, S. N. Grishin, et al., *Biophysics*, **64** (5), 812 (2019).
20. A. U. Ziganshin, A. E. Khairullin, B. A. Ziganshin, et al., *Muscle and Nerve*, **55**, 417 (2017).
21. A. U. Ziganshin, A. E. Khairullin, A. Y. Teplov, et al., *Muscle and Nerve*, **59** (4), 509 (2019).
22. A. E. Khairullin, A. U. Ziganshin, and S. N. Grishin, *Biophysics*, **65** (5), 858 (2020).
23. W. M. Fu and M. M. Poo, *Neuron*, **6** (5), 837 (1991).

Revisiting the Role of Ectonucleotidases in Synaptic Transmission. Thermal Sensitivities of ATP-Producing Metabolic Pathways

A.E. Khairullin*, **, D.V. Efimova*, D.V. Ivanova*, S.N. Grishin*, and A.U. Ziganshin*

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

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

The release of ATP as an intermediate at the neuromuscular junction, and acetylcholine, the chief neurotransmitter, may take place by mechanisms responsible for quantal and non-quantal secretion from the motor neurons of the central and peripheral nervous system. The dephosphorylation pathway of ATP that is completed by the hydrolysis of AMP to adenosine in the synaptic cleft is a cascade of reactions catalyzed by ectonucleotidases. These enzymes are of enormous interest, the research in this field is necessary to clarify their role in a complex signaling cascade, since it is known that they have dual functions: ectonucleotidases limit the action of ATP as a neurotransmitter and participate in the formation of other neuromodulators (ADP, AMP and adenosine). In addition, ATP and its metabolites can cause completely different physiological effects. The activity of ectonucleotidases in different types of skeletal muscles was determined, it varies within 5–7 IU. A decrease in temperature to 22°C leads to a multiple decrease in the enzymatic regeneration of ATP in skeletal muscle tissues. It is assumed that enzymatic limitation of ATP and the production of its metabolites ensures stabilization of effective cholinergic neuromuscular transmission in norm and pathology.

Keywords: neuromuscular junction, ectonucleotidase, ATP-producing metabolic pathways, synaptic signaling