

ВЛИЯНИЕ БРОМИСТОГО ЭТИДИЯ НА ПУРИНЕРГИЧЕСКУЮ МОДУЛЯЦИЮ МИОНЕВРАЛЬНОЙ ПЕРЕДАЧИ И СОКРАЩЕНИЯ СКЕЛЕТНОЙ МЫШЦЫ

© 2024 г. А.Н. Горшунова*, А.Ю. Теплов**, С.Н. Гришин**,
Р.Д. Мухамедзянов**, А.Е. Хайруллин**, ***, #

*Казанский юридический институт МВД России, Магистральная ул., 35/1, Казань, 420108, Россия

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

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

#E-mail: khajrulli@ya.ru

Поступила в редакцию 12.08.2024 г.

После доработки 12.08.2024 г.

Принята к публикации 28.08.2024 г.

Исследована проблема изменений мионевральной передачи в присутствии интеркалирующего агента — бромистого этидия, обладающего известным угнетающим действием на нервно-мышечную передачу, природа которого остается до конца невыясненной. Для решения вопроса о возможном участии в этом процессе известных модуляторов синаптической передачи — пуринов (АТФ и аденозина) — нами проведена оценка их эффектов в присутствии данного агента. После выдерживания нервно-мышечного препарата лягушки в перфузирующем растворе, содержащем бромистый этидий, амплитуда постсинаптических ответов и сила сокращения мышцы снижались. В данных условиях оба пурина дополнительно оказывали свое обычное подавляющее действие как на амплитуду постсинаптических ответов, так и на силу сокращения скелетной мышцы. Таким образом, угнетающий эффект бромистого этидия на нервно-мышечную передачу не связан с усилением им ингибирующего действия эндогенных пуринов, вызванного квантовым выходом нейротрансмиттера.

Ключевые слова: бромистый этидий, АТФ, аденозин, нервно-мышечный синапс, вызванная квантовая секреция, мышечное сокращение.

DOI: 10.31857/S0006302924060151, EDN: NKKNPG

Как известно, бромистый этидий (3,8-диамино-5-этил-6-фенилфенантридиум бромид) — органическое соединение, флуоресцентный краситель с химической формулой $C_{21}H_{20}BrN_3$ — применяется как интеркалирующий агент для выявления нуклеиновых кислот, в частности, в случае электрофореза ДНК в агарозном геле [1]. Под названием гомидиум он широко используется с 1950-х годов в ветеринарии для лечения трипаносомоза у крупного рогатого скота [2]. Кроме всего прочего, бромистый этидий активно используется в ряде исследований для оценки активности гемиканалов [3, 4], как специфический ингибитор синтеза митохондриальных белков [5], является демиелизирующим агентом [6].

Было обнаружено, что агенты, действующие на ключевые звенья пуринергической модуляции нервно-мышечной передачи, в частности калие-

вые каналы, остаются эффективными в своем влиянии на синаптическую трансдукцию и контрактильность скелетной мышцы и при введении демиелизирующих доз бромистого этидия [6]. Однако в литературе еще нет данных, позволяющих непосредственно оценить взаимовлияние пуринов и бромистого этидия в изолированном нервно-мышечном препарате.

В настоящее время, в связи с широким внедрением в исследовательскую практику бромистого этидия, повышенное внимание уделяется всем его разнообразным эффектам. Исходя из вышесказанного, было решено провести исследование по изучению перекрестных эффектов пуринов и бромистого этидия в мионевральных синапсах.

МЕТОДИКА

Регистрация постсинаптических ответов. Эксперименты по регистрации токов концевой пла-

Сокращение: ТКП — ток концевой пластинки.

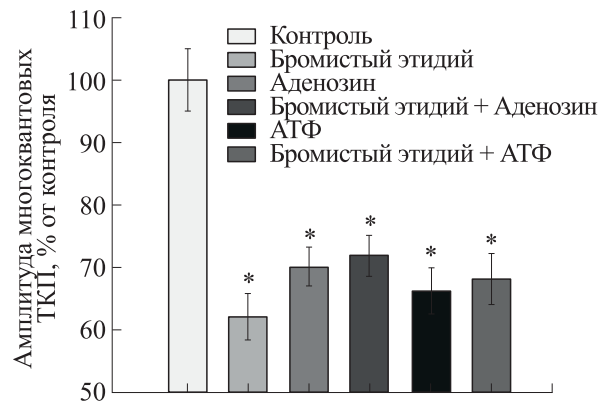


Рис. 1. Влияние бромистого этидия и агонистов пуриновых рецепторов на амплитуду многоквантовых ТКП мионеврального препарата *m. sartorius* озерной лягушки. Результаты представлены в виде $M \pm m$ в % от исходных величин, принятых за 100%; * — $p < 0.05$ по сравнению с контролем.

стинки (ТКП) проводили *in vitro* на препарате: *n. ichiaticus* — *m. sartorius Rana Ridibunda*. Декаптацию осуществляли под эфирным наркозом. Сухожилие дистального конца мышцы брали на лигатуру, мышцу отсекали до места вхождения в нее нерва. После вскрытия брюшной полости седалищный нерв брали на лигатуру у места вхождения в спинной мозг и выделяли до места вхождения в мышцу. Для предотвращения сокращений мышцы ее волокна поперечно рассекали.

Непрямое раздражение нерва проводили через серебряные электроды в отдельной герметической увлажненной камере, изолированной от ванночки, в которой помещался мышечный препарат. Герметизацию отсека с нервом осуществляли тонкой пластиной, покрытой слоем вазелина. Электростимуляцию нерва для регистрации ТКП осуществляли прямоугольными импульсами сверхпороговой амплитуды длительностью 0.2–0.4 мс с частотой 0.03 Гц.

Вызванную квантовую секрецию оценивали по амплитудно-временным параметрам вызванных ТКП, которые отводились потенциальным и токовым микроэлектродами в области концевой пластинки мышечного волокна. Оценку результатов — накопления и усреднения ТКП — осуществляли с помощью персонального компьютера с периодом опроса 5–20 мкс на точку. Расчет параметров спада токов концевой пластинки проводили при помощи программного обеспечения Origin (OriginLab Corp., США). Мышечный препарат перфузировали раствором Рингера со скоростью 2 мл/мин, куда апплицировали растворы бромистого этидия, АТФ, аденозина (Sigma, США).

Статистическую обработку данных проводили с помощью программы SPSS Statistics (SPSS: An IBM Company, США). 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 $p < 0.05$.

Регистрация мышечных сокращений. Мышцы фиксировали вертикально, присоединяя один конец к датчику механической активности, и погружали в ванночки объемом 10 мл, заполненные раствором Рингера. Мышцы были натянуты начальной нагрузкой в 1 г, далее оставались в покое на 30 мин для привыкания к среде.

Электростимуляцию проводили следующим образом: кутя нерва помещалась в сакшн-электрод оригинальной конструкции. Сокращения мышц вызывали стимуляцией прямоугольными импульсами частотой 1 Гц, длиной 0.5 мс, амплитудой 10 В. Силу сокращений регистрировали изометрическим датчиком механической активности. Среднюю величину всех сокращений обрабатывали как один результат. Сократительные ответы рассчитывали в % относительно исходных результатов, полученных в начале эксперимента.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Регистрация постсинаптических ответов. При фиксации потенциала на уровне -40 мВ средняя амплитуда многоквантовых токов концевой пластинки составила 137.1 ± 23.8 нА ($n = 30$). Через 20 мин после добавления бромистого этидия в эффективной концентрации 5 мкМ [7] амплитуда ТКП снизилась до $62.1 \pm 3.8\%$ ($n = 12$, $p < 0.05$, рис. 1).

Аденозин в микромолярной концентрации снижает амплитуды ТКП. Так, при использовании аденозина в концентрации 100 мкМ наблю-

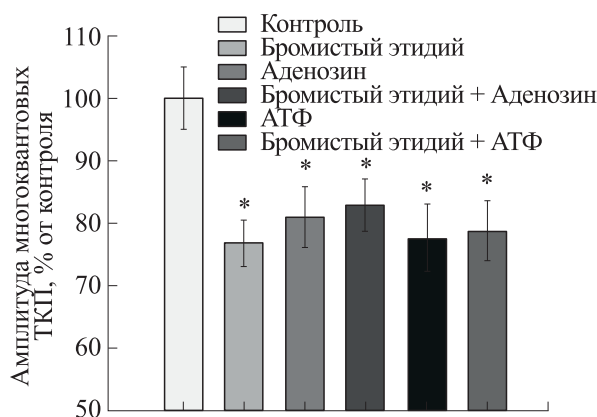


Рис. 2. Влияние бромистого этидия и агонистов пуриновых рецепторов на силу сокращения *m. sartorius* озерной лягушки. Результаты представлены в виде $M \pm m$ в % от исходных величин, принятых за 100%; * — $p < 0.05$ по сравнению с контролем.

дали снижение до $70.2 \pm 3.1\%$ ($n = 30$, $p < 0.001$, рис. 1). На фоне 5 мкМ бромистого этидия базовый эффект аденозина не изменяется (снижение до $71.9 \pm 3.3\%$ ($n = 12$, $p < 0.05$) от контроля).

Добавление АТФ также обеспечивает снижение амплитуды многоквантовых ТКП. К 15-й минуте своего действия АТФ в концентрации 100 мкМ угнетала амплитуду вызванных постсинаптических ответов до $66.3 \pm 3.7\%$ от контрольного значения ($n = 30$, $p < 0.001$, рис. 1). В присутствии 5 мкМ бромистого этидия АТФ равноэффективно снижала амплитуду ТКП (до $68.2 \pm 4.1\%$ ($n = 12$, $p < 0.05$) от контроля).

Как для АТФ, так и для аденозина падение амплитуды было обратимым после отмывки препарата при помощи физиологического раствора.

Регистрация мышечных сокращений. В следующих сериях экспериментов проводили механомиографическое исследование сокращений портняжной мышцы озерной лягушки. При стимуляции с частотой 1 Гц наблюдались стабильные одиночные сокращения на протяжении всего времени эксперимента силой 2.3 ± 0.29 г.

Бромистый этидий модулировал и силу сокращений портняжной мышцы. По итогу его 20-минутного присутствия в концентрации 5 мкМ в перфузирующем растворе сила сокращения упала до $76.9 \pm 3.7\%$ от значения до его аппликации ($n = 11$, $p < 0.05$).

Аденозин в концентрации 100 мкМ угнетал сокращения до $81.1 \pm 4.9\%$ от контроля ($n = 22$; $p < 0.05$). В присутствии бромистого этидия этот эффект сохранялся ($83.0 \pm 4.2\%$ ($n = 10$, $p < 0.05$)).

При аппликации 100 мкМ АТФ сила сокращения портняжной мышцы достигала $77.8 \pm 5.4\%$ ($n = 12$) по отношению к контролю, принятому за 100%. На фоне бромистого этидия эффект АТФ сохранялся — сила сокращения снижалась до $78.9 \pm 4.8\%$ ($n = 10$, $p < 0.05$).

При отмывке от аденозина и АТФ сила сокращения портняжной мышцы лягушки восстанавливалась.

ОБСУЖДЕНИЕ

Из имеющихся в литературе данных можно сделать вывод о том, что эффекты бромистого этидия на ионофоретические токи концевой пластинки аналогичны другим известным блокирующим каналы препаратам [8, 9]. Однако низкие концентрации этидия не блокируют рецептор в закрытой конформации канала до того, как канал сможет открыться. Аналогично, отсутствие эффекта при низких концентрациях ацетилхолина подразумевает, что при этих концентрациях этидия не ингибирует холинэстеразу [10].

В ряде исследований было показано, что проводимость некоторых демиелинизированных периферических аксонов можно восстановить, пролив потенциал действия с помощью яда скорпиона [11]. Эта группа позже показала, что аналогичный эффект может быть достигнут путем применения 4-аминопиридина — агента, блокирующего калиевые каналы, — непосредственно к экспериментально демиелинизированным аксонам в открытых дорсальных корешках крыс [12, 13], позднее это открытие было распространено на седалищный нерв крыс [14, 15].

Рассеянный склероз — хроническое аутоиммунное заболевание, характеризующееся многоочаговостью поражения белого вещества центральной нервной системы вследствие поражения миелиновой оболочки нервных волокон головного и спинного мозга, с вариабельностью неврологических симптомов. Для изучения демиелинизирующих расстройств производят экспериментальную интраспинальную инъекцию бромистого этидия, что имитирует изменения головного и спинного мозга при подобных заболе-

ваниях. Имеются эксперименты по оценке действия 4-аминопиридина при демиелинизирующих расстройствах, при которых препарат вводили в клинических дозах как *in vivo*, так и *in vitro* в аксоны задних столбов спинного мозга. Проведенные после этого исследования как параметров мионевральной передачи, так и силы сокращения продемонстрировали, что блокатор калиевых каналов А-типа 4-аминопиридин облегчает симптоматику у некоторых пациентов с рассеянным склерозом [6] и травмами спинного мозга [16, 17]. К тому же в более ранних экспериментах было продемонстрировано восстановление проводимости в демиелинизированных аксонах.

4-Аминопиридин не оказывает последовательного эффекта в восстановлении проводимости в демиелинизированных аксонах. Однако он имеет выраженные эффекты на периферии, включая потенцирование синаптической передачи и увеличение силы сокращения скелетных мышц. 4-аминопиридин существенно снижает синаптическое ингибиторное действие АТФ и полностью устраняет сонаправленный эффект аденозина [17], что позволяет прийти к решению о полном опосредовании данного эффекта блокируемыми 4-аминопиридином калиевыми каналами А-типа.

Итак, налицо набор наблюдений, что эффекты бромистого этидия в первую очередь затрагивают непосредственно нейроглиососудистые ансамбли при рассеянном склерозе [6], проведении боли [3], нейровоспалении и когнитивных нарушениях [4].

Как известно, скелетная мышца лишена щелевых контактов, образуемых коннексинами, на которые мог бы быть нацелен бромистый этидий. Однако щелевые контакты встречаются в сосудах, питающих мышцы. Известно, под воздействием стресса, провоспалительных медиаторов, при изменении концентрации ионов, температуры кожи закрытые гемиканалы стимулируются, чтобы открыться, высвобождая при этом АТФ из клеток с последующим пуринергическим сигнальным каскадом [18]. По мнению авторов работы [19], такие события влияют на сигнальные пути, которые очень важны для пролиферации и дифференцировки клеток.

В нервно-мышечном синапсе холоднокровных АТФ, выделяясь вместе с основным медиатором, ацетилхолином, ингибирует следующий выброс содержимого синаптических везикул по принципу отрицательной обратной связи [20]. Известно влияние, которое оказывает бромистый этидий на сайт связывания ацетилхолина в везикулярном транспорте ацетилхолина [21]. Но исходя из полученной совокупной информации, место приложения наблюдаемых эффектов бро-

мистого этидия следует искать не на пресинаптическом полюсе.

В ходе проведенных экспериментов по оценке электрофизиологических эффектов бромистого этидия на постсинаптической мембране концевой пластинки *m. cutaneous pectoris* лягушки *Rana esculenta* [7] было выявлено эффективное снижение амплитуды вызванных постсинаптических ответов. Результаты, полученные в ходе наших экспериментов, в целом подтвердили такой характер действия бромистого этидия уже на препарате седалищного нерва портняжной мышцы озерной лягушки, но при этом была выявлена и коррелирующая степень депрессии конечного результата электромеханического сопряжения — силы сокращения мышцы. Также было замечено, что при низких концентрациях бромистый этидий блокирует открытый ионный канал никотинового ацетилхолинового рецептора [7].

На нервно-мышечном синапсе холоднокровных наблюдается только пресинаптическое действие основных модуляторов мионевральной передачи — пуринов. Следует признать, что в синапсах фазных мышц лягушки не происходит взаимодействия угнетающих эффектов бромистого этидия и пуринов. Открытым остается вопрос о подобном в мионевральных синапсах теплокровных, где показано постсинаптическое действие АТФ, опосредованное ацетилхолиновым рецептором [22].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Нами выявлено эффективное снижение амплитуды вызванных постсинаптических токов концевой пластинки под действием бромистого этидия с коррелирующей степенью его же депрессии на контрактильный ответ мышцы. Данное действие схоже по результату с подобным при использовании основных модуляторов мионевральной передачи — пуринов. Однако нами не выявлено кросс-взаимодействия угнетающих эффектов бромистого этидия и пуринов в мионевральном синапсе амфибий. Остается открытым вопрос по данной ситуации в синапсах теплокровных.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках программы «Стратегическое академическое лидерство Казанского федерального университета» (ПРИОРИТЕТ-2030).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все исследования проводились в соответствии с принципами биомедицинской этики, изложенными в Хельсинкской декларации 1964 г. и последующих поправках к ней. Протокол исследования на животных был одобрен локальным этическим комитетом Казанского Государственного Медицинского Университета (номер протокола 116/2 от 10 октября 2023 г.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Sigmon J. and Larcom L. L. The effect of ethidium bromide on mobility of DNA fragments in agarose gel electrophoresis. *Electrophoresis*, **17** (10), 1524–1527 (1996). DOI: 10.1002/elps.1150171003
2. Перечень химических и биологических веществ, прошедших государственную регистрацию. *Токсикологич. вестн.*, **1** (142), 48 (2007).
3. Liu J., Li X., and Ke A. High-mobility group box-1 induces mechanical pain hypersensitivity through astrocytic connexin 43 via the toll-like receptor-4/JNK signaling pathway. *Synapse*, **75** (2), e22184 (2020). DOI: 10.1002/syn.22184
4. Dong R., Han Y., Jiang L., Liu S., Zhang F., Peng L., Wang Z., Ma Z., Xia T., and Gu X. Connexin 43 gap junction-mediated astrocytic network reconstruction attenuates isoflurane-induced cognitive dysfunction in mice. *J. Neuroinflammation*, **19** (1), 64 (2022). DOI: 10.1186/s12974-022-02424-y
5. Komatsu K., Uchida K., and Satoh S. Neurotrophic influences are not affected by miniature end-plate potentials. *Exp. Neurol.*, **83** (1), 33–41 (1984). DOI: 10.1016/0014-4886(84)90043-8
6. Smith K. J., Felts P. A., and John G. R. Effects of 4-aminopyridine on demyelinated axons, synapses and muscle tension. *Brain*, **123** (1), 171–184 (2000). DOI: 10.1093/brain/123.1.171
7. Sterz R., Hermes M., Peper K., and Bradley R. J. Effects of ethidium bromide on the nicotinic acetylcholine receptor. *Eur. J. Pharmacol.*, **80** (4), 393–399 (1982). DOI: 10.1016/0014-2999(82)90085-1
8. Dreyer F., Peper K., Sterz R., Bradley R. J., and Müller K. D. Drug-receptor interaction at the frog neuromuscular junction. *Prog. Brain Res.*, **49**, 213–223 (1979). DOI: 10.1016/S0079-6123(08)64635-X
9. Peper K., Bradley R. J., and Dreyer F. The acetylcholine receptor at the neuromuscular junction. *Physiol. Rev.*, **62** (4), 1271–1340 (1982). DOI: 10.1152/physrev.1982.62.4.1271
10. Dreyer F., Peper K., and Sterz R. Determination of dose-response curves by quantitative ionophoresis at the frog neuromuscular junction. *J. Physiol.*, **281**, 395–419 (1978). DOI: 10.1113/jphysiol.1978.sp012430
11. Bostock H., Sherratt R. M., and Sears T. A. Overcoming conduction failure in demyelinated nerve fibres by prolonging action potentials. *Nature*, **274** (5669), 385–387 (1978). DOI: 10.1038/274385a0
12. Sherratt R., Bostock H., and Sears T. Effects of 4-aminopyridine on normal and demyelinated mammalian nerve fibres. *Nature*, **283**, 570–572 (1980). DOI: 10.1038/283570a0
13. Bostock H., Sears T. A., and Sherratt R. M. The effects of 4-aminopyridine and tetraethylammonium ions on normal and demyelinated mammalian nerve fibres. *J. Physiol.*, **313**, 301–315 (1981). DOI: 10.1113/jphysiol.1981.sp013666
14. Hansebout R. R., Blight A. R., Fawcett S., and Reddy K. 4-Aminopyridine in chronic spinal cord injury: a controlled, double-blind, crossover study in eight patients. *J. Neurotrauma*, **10** (1), 1–18 (1993). DOI: 10.1089/neu.1993.10.1
15. Hayes K. C., Blight A. R., Potter P. J., Allatt R. D., Hsieh J. T., Wolfe D. L., Lam S., and Hamilton J. T. Pre-clinical trial of 4-aminopyridine in patients with chronic spinal cord injury. *Paraplegia*, **31** (4), 216–224 (1993). DOI: 10.1038/sc.1993.40
16. Hansebout R. R., Blight A. R., Fawcett S., and Reddy K. 4-Aminopyridine in chronic spinal cord injury: a controlled, double-blind, crossover study in eight patients. *J. Neurotrauma*, **10** (1), 1–18 (1993). DOI: 10.1089/neu.1993.10.1
17. Grishin S., Shakirzyanova A., Giniatullin A., Afzalov R., and Giniatullin R. Mechanisms of ATP action on motor nerve terminals at the frog neuromuscular junction. *Eur. J. Neurosci.*, **21** (5), 1271–1279 (2005). DOI: 10.1111/j.1460-9568.2005.03976.x
18. Burnstock G., Knight G. E., and Greig A. V. Purinergic signaling in healthy and diseased skin. *J. Invest. Dermatol.*, **132** (3), 526–546 (2012). DOI: 10.1038/jid.2011.344
19. Burnstock G. Purines and sensory nerves. *Handb. Exp. Pharmacol.*, **194**, 333–392 (2009). DOI: 10.1007/978-3-540-79090-7_10
20. Khairullin A. E., Grishin S. N., and Ziganshin A. U. Pre-synaptic purinergic modulation of the rat neuro-muscular transmission. *Curr. Issu. Mol. Biol.*, **45**, 8492–8501 (2023). DOI: 10.3390/cimb45100535
21. Bravo D. T., Kolmakova N. G., and Parsons S. M. New transport assay demonstrates vesicular acetylcholine transporter has many alternative substrates. *Neurochem. Int.*, **47** (4), 243–247 (2005). DOI: 10.1016/j.neuint.2005.05.002
22. Khairullin A. E., Teplov A. Y., Grishin S. N., and Ziganshin A. U. ATP causes contraction of denervated skeletal muscles. *Biochemistry (Moscow) – Suppl. Ser. A: Membr. Cell. Biol.*, **17** (1), 73–77 (2023). DOI: 10.1134/s1990747823060065

The Effect of Ethidium Bromide on Purinergic Modulation of Myoneural Transmission and Skeletal Muscle Contraction

A.N. Gorshunova*, A.Yu. Teplov**, S.N. Grishin**,
R.D. Mukhamedzyanov**, and A.E. Khairullin**, ***

*Kazan Law Institute of the Ministry of Internal Affairs of Russia, Magistralnaya ul. 35, Kazan, 420108 Russia

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

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

The problem of changes in myoneural transmission in the presence of an intercalating agent, ethidium bromide, which has a known inhibitory effect on neuromuscular transmission, has been investigated, but the nature of such an effect remains unclear. To solve the question of the possible participation in this process of known modulators of synaptic transmission – purines (ATP and adenosine), we evaluated their effects in the presence of this agent. After holding the neuromuscular frog preparation in a perfusing solution containing ethidium bromide, the amplitude of postsynaptic responses and muscle contraction forces decreased. Under these conditions, both purines additionally exerted their usual suppressive effect on both the amplitude of postsynaptic responses and the strength of skeletal muscle contraction. Thus, the inhibitory effect of ethidium bromide on neuromuscular transmission is not associated with an increase in the inhibitory effect of endogenous purines caused by the quantum release of the neurotransmitter.

Keywords: ethidium bromide, ATP, adenosine, neuromuscular synapse, induced quantum secretion, muscle contraction