Министерство образования и науки Российской Федерации
Казанский (Приволжский) Федеральный университет.

ИНСТИТУТ ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ И БИОЛОГИИ

КАФЕДРА ФИЗИОЛОГИИ ЧЕЛОВЕКА И ЖИВОТНЫХ
Специальность: 012000 - физиология
Специализация: физиология человека и животных

ДИПЛОМНАЯ РАБОТА

Влияние жирных кислот на процессы эндо- и экзоцитоза синаптических везикул в нервном окончании мыши

Студентка 5 курса
Группы 01-914:
« » мая 2014 г. (Е.Н. Крендельщикова)

Научный руководитель:

к.б.н., старший преподаватель
« » мая 2014 г. (О.В. Яковлева)

Казань 2014 г.

Оглавление

	Список сокращений	4
	Введение	5
1	**Обзор литературы**	7
1.1	Жирные кислоты: структура и химические свойства	7
1.2	Освобождение жирных кислот из мембраны	9
1.2.1	Контроль за уровнем жирных кислот в клетке	
1.3	Биологическая роль жирных кислот	9
1.3.1	Влияние жирных кислот на синаптическую передачу	10
1.4	Механизмы действия жирных кислот	11
1.4.1	Влияние жирных кислот на физико-химические свойства мембраны	13
1.4.2	Влияние жирных кислот на процесыы экзо- и эндоцитоза	13
	Попробуй найти или выделить раздел про жирные кисло-иы и различные патологии	
1.5	Экзо- и эндоцитоз синаптических везикул	16
1.5.1	Процессы экзо- и эндоцитоза в нервном окончании	16
1.5.2	Синаптические везикулы	18
2	Объект и методы исследования	23
2.1	Объект исследования	23
2.2	Система перфузии и применяемые растворы	23
2.3	Флуоресцентные красители и их свойства	24
2.4	Регистрация свечения	26
2.5	Стимуляция двигательного нерва	27
2.6	Схема эксперимента	27
3	Результаты	29
3.1		29
	Заключение	32
	Выводы	33
	Список литературы	34

Список, используемых в тексте сокращений:

НО – нервное окончание

СВ – синаптические везикулы

АЗ – активная зона

АХ – ацетилхолин

АЦ – аденилатциклаза

ГЦ – гуанилатциклаза

ЖК - жирная кислота

цГМФ – циклический гуанозинмонофосфат

цАМФ – циклический аденозинмонофосфат

ФК – флуоресцентные красители

ФЛА2 – фосфолипаза 2

Введение

Актуальной задачей нейрофизиологии является изучение механизмов действия внутриклеточных посредников. Жирные кислоты участвуют как вторичные посредники в передаче клеточного сигнала, затрагивающего активацию протеинкиназы С, опосредуют эффекты нейромедиаторов и гормонов, играют важную роль в воспалительных процессах и нейродегенеративных заболеваниях [Katzuki et al., 1995, Крутецкая и др., 2003, Brash, 2001, Bazan, 2003, Strokin et al., 2003]. ЖК регулируют активность клеточных ферментов. Известно, что АЦ, ГЦ и протеинкиназы являются мишенями действия жирных кислот. Показано их участие в модуляции активности ионных каналов [Piomelli, 1999, Meves, 1994, Katzuki et al., 1995., Evans et al., 1999, Izumi et al., 2000, Liu et al., 2001, Chen et al., 2002]. ЖК могут оказывать прямое влияние на возбудимые клетки, включающее непосредственное взаимодействие с субъединицами ионных каналов, белками экзо- и эндоцитоза и изменять физико-химические свойства мембраны [Ordway et all., 1991, Fraser et al., 1997, Denson et al., 2000]. Тем не менее, до конца не выяснены механизмы действия жирных кислот в нервно-мышечном синапсе теплокровных.

Исследования последних лет свидетельствуют о ключевой роли эндогенных жирных кислот в процессах экзо- и эндоцитоза синаптических везикул [Rohrbough, Broadie, 2005 Zimmerberg, Chernomordik, 2005, Ong et al., 2006], однако, остается множество вопросов, связанных с выявлением механизмов их действия. Поэтому актуальным является анализ влияния эндогенных жирных кислот в процессах синаптической передачи.

Действия жирных кислот могут быть связаны с их способностью образовывать мицеллы. Много авторов акцентируют на этом внимание, так как мицеллы могут приводить к нарушению структуры мембраны (так называемый «детергентный эффект») и даже к образованию пор, для ионов Na^+ и Ca^{2+}.

Цель работы: выявление механизмов действия олеиновой кислоты на эндо- и экзоцитоз синаптических везикул в нервном окончании мыши.

Были поставлены следующие задачи:

выявить эффекты миристиновой, олеиновой и октаноивой кислот на эндоцитоз синаптических везикул в нервном окончании мыши;

выявить эффекты ионного детергента - диоксихолата на эндо- и экзоцитоз синаптических везикул в нервном окончании мыши;

выявить эффекты олеиновой и миристиновой кислот на экзоцитоз синаптических везикул в нервном окончании мыши.

1 Обзор литературы

1.1 Жирные кислоты: структура и химические свойства

ЖК – это длинноцепочечные органические кислоты, содержащие от 4 до 24 углеродных атома [Ristan, Drevon 2001, Huag et al 2004]. ЖК в своем составе имеют одну карбоксильную группу и длинный неполярный углеводородный хвост, из-за которого нерастворимы в воде [Мари и др., 1993]. В клетках и тканях ЖК находятся в ковалентно связанной форме в составе липидов различных классов [Ледниндже р, 1985, Piomelli, 1996].

ЖК могут быть насыщенными (не содержать двойных связей) и ненасыщенными (иметь 1 и более двойных связей). В мембранах животных клеток наиболее часто встречаются насыщенные ЖК с 14 (миристиновая), 16 (пальмитиновая) и 18 (стеариновая) углеродными атомами. Основную долю ненасыщенных ЖК в липидах мембран животных клеток составляют олеиновая (18:1), линолевая (18:2) и арахидоновая (20:4) кислоты.

Таблица 1 *Насыщенные жирные кислоты*

Миристиновая	CH3 (CH2)12 COOH
Пальмитиновая	CH3 (CH2)14 COOH
Стеариновая	CH3 (CH2)16 COOH
Арахиновая	CH3 (CH2)18 COOH

Ненасыщенные жирные кислоты

Олеиновая	CH3 (CH2)7 CH=CH(CH2)7 COOH
Линолевая	CH3 (CH2)4 CH=CH CH2CH=CH (CH2)7 COOH
Арахидоновая	CH3(CH2)4CH=CHCH2CH=CHCH2CH=CHCH2CH=(CH2)3COOH

Жирные кислоты с несколькими двойными связями обладают большей жесткостью, чем молекулы насыщенных жирных кислот; последние благода-

ря свободному вращению вокруг одинарных связей характеризуются большей гибкостью и большей длиной. [Васьковский, 1997].

Большое число связей С-С и С-Н в углеводородной цепи придает существенно неполярный характер всей молекуле в целом, хотя в ней имеется полярная группа – СООН. Любое химическое соединение, в состав которого входят один или несколько остатков ЖК, будет носить неполярный характер. Помимо того, что этот фактор является причиной нерастворимости липидов в воде, он обуславливает также сборку липидов в биологические мембраны [Васьковский, 1997, Katsuki, 1995, Ristan, Drevon, 2001].

Рисунок 1 - Пространственное строение жирных кислот

Непредельные жирные кислоты присутствуют во всех жирах, но более всего в растительных. Это главным образом полиненасыщенные линолевая, олеиновая, линоленовая кислоты, которые в организме не синтезируются [Riston, Drevon, 2001]. Они отличаются более активным участием в процессах жизнедеятельности, важны для нормализации жирового и холестеринового обменов [Фалер, Шилдс, 2004].

1.2 Освобождение жирных кислот из мембраны

Жирные кислоты, соединяясь с глицерином и остатками фосфороной кислоты, образуют фосфолипиды – основной строительный материал всех клеточных мембран. Мембранные фосфолипиды – важный источник для синтеза биологически активных посредников. Клеточные фосфолипазы гидролизуют фосфолипиды мембраны, освобождая ряд продуктов, ответственных за передачу различных сигналов: диацилглицерол, простагландины, лейкотриены, ЖК. Некоторые медиаторы и гормоны стимулируют реакцию деградации фосфолипидов, приводя при этом к освобождению ЖК.

Деградация фосфотидилглицеринов начинается с отщепления ацильных групп, которое катализируется липазами. Фосфолипазы А2 (ФЛА2) высвобождают ЖК из sn-2 позиции молекулы фосфолипида и это обуславливается участием в процессе слияния везикул во многих биологических процессах, такие как высвобождение нейромедиаторов, секреция инсулина, акросомный экзоцитоз и рост нейритов. ФЛА2-опосредованный фосфолипидный гидролиз генерирует свободные ненасыщенные ЖК и лизофосфолипиды (Darios, Connell, 2007).

ФЛА1 – другой ацильный остаток (sn-1 позиция). Фосфолипазы С и D ведут дальнейший гидролиз [Хухо, 1990]. ФЛ С высвобождает главную группу из мембранных фосфолипидов, в результате чего диацилглицерол закрепляется в мембране с помощью двух гидрофобных углеродных цепей. Присутствие диацилглицерола (ДАГ) необходимо для активации протеинкиназы С, которая является положительным регулятором слияния везикул. ДАГ может быть далее метаболизирован с помощью ДАГ-липаз, высвобождая арахидоновую кислоту из sn-2 позиции фосфолипидов и оставляя моноацилированный глицерин в липидном бислое (Darios, Connell, 2007). Интересно, что ДАГ-липазный ингибитор может блокировать как рост аксонов, так и выделение инсулина.

И, наконец, фосфолипаза D также принимает участие в индукции слияния везикул на поздней стадии экзоцитоза. ФЛ D гидролизует фосфатидилхолин на холин и фосфатидную кислоту, которая, в свою очередь, может гидролизована в ДАГ с помощью фосфогидролазы фосфатидной кислоты (Darios, Connell, 2007) . Замечено, что насыщенные ЖК (такие как стеариновая кислота) преимущественно находятся в sn-1 позиции, тогда как ненасыщенные – в sn-2 позиции [Baker, Thompson, 1972, Irvine, 1982].

1.2.1 Контроль за уровнем жирных кислот в клетке

Печень – основной источник жирных кислот, и через кровь в комплексе с альбуминами плазмы и липопротеинами они перераспределяются в организме [Piomelli, 1996]. Хотя жирные кислоты липидрастворимы и могут хорошо проникать через мембрану, прохождение ЖК через эндотелиальные клетки мозговых сосудов – медленный процесс.

Изучению переноса экзогенных жирных кислот через плазматические мембраны посвящено большое количество работ, однако до сих пор не существует единого взгляда на процессы их трансмембранного переноса.

Нейроны могут только депонировать ЖК, но не синтезировать, как это делают другие клетки через удлинение линолевой кислоты [Huang et al., 1996, Katsuki, 1995]. В центральной нервной системе есть два типа клеток, накапливающих линолат и использующих его для синтеза кислот: мозговой эндотелий и астроциты [Сергеева, 1998, Piomelli, 1993, Dhopeshwarkar, 1976, Katsuki et al., 1995]. Нейроны, получая кислоту, быстро этерофицируют её в мембранные фосфолипиды [De George et al, 1989, Piomelli, 1996]. Лишь небольшая часть свободных кислот может содержаться в глиальных клетках.

1.3 Биологическая роль жирных кислот

Дефицит жирных кислот приводит к нарушениям обмена веществ, как липидного, так и белкового, электролитного, фосфорно-кальциевого [Когтева, Безуглов, 1998].

Жирные кислоты являются обязательными компонентами многих клеточных структур, прежде всего мембран. Изменения в мембранных структурах могут сказываться на водном балансе, ионных потоках и на многих других процессах, протекающих внутри клетки. Таким образом, функциональная роль жирных кислот заключается в нормализации деятельности всех мембранных структур клеток и внутриклеточной передачи информации [Meves, 1994]. Пластичность мембран определяется, прежде всего, степенью ненасыщенности жирных кислот, входящих в состав липидов мембран [Фаллер, Шилдс, 2004]. Изменение профиля жирных кислот в липидах мембран может изменять включение, агрегацию, диффузионные перемещения мембранных компонентов, активность мембраносвязанных ферментов и экспрессию рецепторов, мембранную проницаемость и транспортные свойства [Mead et al., 1984]. Многие клеточные функции, например секреция, хемотаксис, чувствительность к микроорганизмам, также зависят от жидкостности мембраны [Gill et al., 1980, Heron et al., 1980].

Показано непосредственное участие жирных кислот во многих клеточных процессах: в регуляции деятельности различных ферментов, в передаче клеточного сигнала в качестве вторичных мессенджеров, в связывании стероидных гормонов с рецепторами, транскрипции генов [Clarke et al., 2002, Haourigui et al., 1994]. Было установлено, что насыщенные жирные кислоты индуцируют апоптоз с помощью потери потенциала митохондрий или синтеза церамидов [Ohta et al., 2003]. Полиненасыщенные ЖК в сочетании с калием, натрием, таурином помогают справиться с тяжелыми аритмиями [Danthi, 2005]. Концентрация жирных кислот в крови влияет на физические

свойства лейкоцитов, их адгезию с эндотелиальными клетками и таким образом влияют на формирование сердечно-сосудистых заболеваний [Levin et al., 2000]. ПНЖК – линолевая, линоленовая, арахидоновая – улучшают работу сердца, участвуют в восстановлении эластичности и прочности кровеносных сосудов и мышц, играют важную роль в воспалении. ПНЖК играют большую роль в обеспечении нормального углеводно-жирового обмена, а также в регулировании окислительно-восстановительных процессов (Мохова, Хайлова, 2005).

Два типа полиненасыщенных ЖК - омега-6 и омега-3, имеют важное значение для позвоночных, поскольку они не могут быть сформированы de novo и должны поступать в организм. Омега-6, арахидоновая, и омега-3, докозагексаеновая, кислоты являются основными строительными блоками клеточных мембран. Полиненасыщенные ЖК обладают такими биофизическими свойствами, как гибкость и растворимость, которые способствуют текучести мембраны. Кроме того, когда они высвобождаются под действием фосфолипаз, они непосредственно принимают участие в регуляции многих клеточных процессов, а также преобразуются в эйкозаноиды, в том числе и простагландины. Следует отметить, что некоторые из этих метаболитов – для активации слияния везикул, а другие ингибируют этот процесс. Значимость полиненасыщенных ЖК для функции нейронов хорошо известна. Мутации в ферментах, связанных с полиненасыщенными ЖК могут привести к умственной отсталости у людей. Кроме того, мутации в ферментах, вовлеченных в производство полиненасыщенных ЖК, приводит к повреждению нейронов модели организма C. elegans, которые могут быть восстановлены с помощью внешнего применения арахидоновой и докозагексаеновой кислоты (Darios, Connell, 2007).

1.3.1 Биологические эффекты миристиновой кислоты

Связующий механизм этой насыщенной ЖК к широкому спектру белков играет ключевую роль в таких процессах как локализация мембранных белков и биосинтез церамидов.

Тетрадекановая, или миристиновая кислота, представляет собой неразветвленную четырнадцать-углеродную жирную кислоту. Названная в честь мускатного ореха Myristica Fragrans, это самая распространенная ЖК в масле мускатного ореха, пальмовых масел, кокосовых масел и молочных жиров. Однако, миристиновая кислота присутствует в относительно низких концентрациях в тканях животных (обычно 0,5-1% от массы жирных кислот), по сравнению с пальмитиновой и стеариновой кислотами. Предполагается, что концентрация миристиновой кислоты жестко регулируется.

Миристоилация – явление, при котором миристиновая кислота ковалентно связана с белками, как правило, во время их трансляции – имеет решающее значение в биологической функции сотен белков. Реакция, происходящая между миристоил-КоА и N-концевым глициновым остатком белка, катализируется N-миристоилтрансферазой. В силу гидрофобности ацильной цепи миристиновой кислоты, значимость миристоилации: закрепить белок в липидный бислой на клеточной мембране. Миристоилация – также может участвовать в дифференциальном таргетировании к мембранным субдоменам, известным как липидные плотики. Кроме того, была показана их роль в белок-белковых взаимодействиях и субклеточной локализации белков. В настоящее время биохимики занимаются исследованием, посвященным миристоилации фермента липидной десатуразы. Но при этом, миристиновая кислота сама по себе является субстратом определенных десатураз. Всё большее число белков устанавливают путем миристоилации, и есть надежда, что более глубокое понимание роли миристиновой кислоты в апоптозе может найти способы лечение таких заболеваний, как рак (Burridge, 2011).

1.3.2 Влияние жирных кислот на синаптическую передачу

Слияние везикул является повсеместным биологическим процессом, вовлеченный в общий мембранный обмен и разнообразные специализированные процессы, такие как высвобождение нейромедиаторов и гормонов, восстановление плазматической мембраны и нейритов. Многие процессы слияния везикул давно известны как активация фосфолипаз и продуктов их деятельности, таких как полиненасыщенная арахидоновая кислота (Darios, Connell, 2007).

Показано участие жирных кислот в межклеточной сигнализации у беспозвоночных и позвоночных животных. Олеиновая, арахидоновая и некоторые другие жирные кислоты регулируют секрецию медиатора как в центральной, так и в периферической нервной системе.

Анализ ненасыщенных жирных кислот с разной длиной цепи и насыщенностью на изолированных нервных терминалях нейронов гиппокампа показал, что максимальным эффектом на секрецию медиатора обладали ненасыщенные жирные кислоты, тогда как молекулы без двойной связи не оказывали воздействия [Nishizaki et al., 1997].

Насыщенные и ненасыщенные жирные кислоты усиливали активность нейрональных никотиновых АХ-рецепторов через активацию ПКС, что приводило к увеличению высвобождения глутамата в гиппокампе [Nishizaki et al., 1999, Ohta et al., 2003].

Одним из факторов формирования долговременной потенциации считается текучесть мембраны. У взрослых крыс текучесть мембраны снижена и как результат снижается уровень из синаптосом гиппокампа [McGanon et al., 1999]. Анализ данных показал корреляцию между содержанием арахидоновой кислоты в мембранах синаптосом и уровнем освобождения медиатора во время долговременной потенциации [McGanon et al., 1999].

В нервно-мышечных синапсах жирные кислоты и их метаболиты проявляли ингибиторное действие на высвобождение медиатора [Madden,

Van der Kloot, 1985, Tsurusaki et al., 1987, Edwards et al., 1990]. В нервно-мышечном препарате диафрагмального нерва крысы in vitro арахидоновая кислота время- и дозозависимо уменьшала амплитуду сокращений при непрямой стимуляции. Сходным эффектом обладали линолевая и линоленовая жирные кислоты, тогда как стеариновая, олеиновая и арахиновая кислоты были неэффективны.

Показана роль жирных кислот в поддержании тонуса и сократимости гладких мышц. На изолированной продольной мышце морской свинки и сфинктере радужной оболочки быка показано, что арахидоновая кислота увеличивала сокращение, вызванное стимуляцией нерва и прямым действием ацетилхолина.

1.4 Механизмы действия жирных кислот

Эффекты жирных кислот можно поделить на прямые и опосредованные [Katsuki et al, 1995, Meves, 1994]. Прямые эффекты не зависят от метаболических изменений, и являются результатом прямого действия жирных кислот на ионные каналы, внутриклеточные сигнальные системы или на некоторые связанные с каналами сайты в плазматической мембране и через изменение физических свойств мембраны [Ordway et al, 1991, Katzuki et al., 1995]. Опосредованное влияние связано с синтезом метаболитов и можно обнаружить лишь у арахидоновой кислоты [Ordway et al, 1991].

1.4.1 Влияние жирных кислот на физические свойства мембраны

Учёные давно пытались объяснить некоторые эффекты ненасыщенных ЖК на ионные каналы в силу их способности нарушать порядок в билипидном слое мембран [Klausner и др,1980, Karnovsky и др, 1982, Anel и др, 1993],

эффект, часто описываемый как увеличение «текучести мембраны». Микромолярные концентрации АК или олеиновой кислоты заметно уменьшают флуоресцентное свечение, в то время как стеариновая кислота не имеет такого эффекта. Снижение свечение возможно связано с нарушением порядка липидов, которое, вероятно, влияет на белки, встроенные в липидную фазу. Другой пример, который иллюстрирует значимость ненасыщенных ЖК на физическое состояние мембраны – это эволюционно приспособленные синаптосомальные мембраны мозга рыбы к температуре окружающей среды [Cossins, Prosser,1978].

Эффекты жирных кислот могут быть также связаны с их способностью формировать мицеллы [Meves, 1994]. Мицеллы могут приводить к нарушению структуры мембраны и даже к образованию пор. Разные авторы подчеркивают, что мицеллы могут разрушать мембраны клеток и даже формировать поры в билипидном слое, через которые ионы Na и Ca способны проходить во внутриклеточное пространство. Критическая концентрация мицелл (ККМ) для различных ЖК обычно зависит от рассеяния света и строго зависит от концентрации Ca в растворе. Ранее было показано, что долговременное добавление в рацион полиненасыщенных жирных кислот ведет к положительным эффектам в сердечно-сосудистой системе: снижению артериального давления [Singer et al., 1986].

Неспецифический эффект детергента может быть исключением, если эффект, наблюдаемый с ненасыщенными ЖК не может быть такими же, как с насыщенными (пальмитиновая, стеариновая, каприловая кислоты) или ионными и неионными детергентами.

В электрофизиологических экспериментах мицеллы вызывают нарушения записи и увеличения тока утечки.

Прямое влияние АК и других ЖК на ионные каналы или окружающие их липиды было впервые описано в 1989 г: прямое блокирование щелевых контактов [Giaume и др 1989] и прямая активация К-каналов гладких мышц [Ordway и др, 1989]. Критерии, определяющие прямое действие: 1) Действие

АК не ингибируется липооксигеназным и циклооксигеназным путями и имитируется другими ЖК (линоленовой, миристиновой, лауриновой кислотами, ETYA), которые не являются субстратами для этих ферментов или даже ингибируют их. 2) Действие не находится под влиянием ингибиторов РКС и не стимулируется активаторами РКС (например, форболовым эфиром). В идеале, прямое действие должно исследоваться в специально выделенном элементе, т.е. в отсутствии цитозольных компонентов.

1.4.2 Влияние жирных кислот на ионные каналы

Многочисленные примеры показывают, что ЖК являются активными модуляторами концентрации свободных ионов (Clarke el al, 2002; Katsuki et al., 1995, Danthi 2005, Крутецкая 2003, Архипова 2005). ЖК способны активировать некоторые типы К каналов в нейронах и модулировать работу Na и Ca каналов, с чем связан нейрозащитный эффект этих агентов (Danthi 2005, Lauritzen, 2000). Механизм действия ЖК заключается в следующем: прямой эффект на белок канала, его липидное окружение, активацию РКС и ФЛС и увеличение цитоплазматического Ca. Рассмотрим влияние ЖК на различные типы ионных каналов.

1.4.3 Влияние жирных кислот на кальциевые каналы

ЖК способны модулировать активность Ca каналов, и участвовать в регуляции Ca гомеостаза. Показано, что цис-ненасыщенные ЖК в микромолярных концентрациях ингибируют нативные Ca-каналы Т-типа в ооцитах Xenopus, в то время как транс-ненасыщенные ЖК не эффективны (Danthi,2005, Leaf 2003).

Внеклеточная аппликация полиненасыщенных ЖК вызывает дозозависимую инактивацию потенциалзависимых Na и L-типа Ca токов на CA1 изолированных нейронов гиппокомпа. Мононенасыщенная олеиновая кслота и насыщенная палмитиновая были не эффективны (Когтева, Безуглов 1998). На миоцитах желудочка сердца морских свинок было показано, что длинноцепочечные ЖК (олеиновая, линолевая ,линоленовая, арахидоновая) в концентрации 3-30 мкМ вызывали усиление потенциалзависимого Ca-тока (Vreugdnhil 1996). Ни ингибиторы РКС или РКА, ни ингибиторы ферметов каскада АК не блокировали изменения Ca-тока, что дает основу для предположения о прямом действии ЖК либо на белковые субъединицы самих каналов, либо на липидные участки мембраны в близи каналов (Chow et al., 1989, Huang et al., 1992).

Кроме того, ЖК снижали спонтанное освобождение Ca из саркоплазматического ретикулума либо напрямую ингибируя рианодиновые рецепторы (Kang, Leaf 1996), либо снижая концентрацию Ca в клетке (Negretti et al., 2000).

1.4.4 Влияние жирных кислот на калиевые каналы

ЖК могут непосредственно действовать на различные типы калиевых каналов (Ordway et el., 1991, Katsuki et al., 1994, Meves, 1995, Casavant et al., 2000). Направленность действия зависит также как в случае Ca каналов от длины углеводной цепи и степени насыщенности молекулы (Крутецкая, 2003, Ordway et al., 1991). Наиболее эффективными модуляторами активности К каналов являются ПНЖК: арахидоновая, докозатриеновая и линолевая ЖК.

Установлено, что внеклеточные цис-мононенасыщенные (олеиновая C18:1), цис-полиненасыщенные (АК C 20:4, докозатриеновая C 22:3, линолевая C 18:2) и насыщенные (миристиновая C14:0) ЖК вызывают дозозависмое уменьшение пиковой амплитуды и ускорение кинетики активации и инакти-

вации потенциал-зависимых К токов тромбоцитов (крутецкая, 2003) и действует на К каналы в клетках аорты, легочной артерии и гладкой мускулатуры желудка (Ordway et al., 1991). С другой стороны, ненасыщенные и насыщенные ЖК с длиной цепи от 10 до 14 углеродных атомов ускоряли инактивацию потенциалзависимых К каналов в клетках нейробластомы (Rousaire-Dubois et al., 1991). Кроме того, в клетках нейробластомы ненасыщенные ЖК повышали чувствительность К каналов к блокирующему агненту 4-аминопиридину (Когтева, Безуглов, 1998).

Был выделен особый тип механочувствительных каналов – ЖК-активируемых К каналов, активация которых происходит без участия ионов Са и добавление свободных ПНЖК усиливает действие механичсеких стимулов (Lesage 2000; Casavant 2000). Авторы предположили, что ЖК, образуясь в результате действия фосфолипаз,активируемых механическими стимулами играют роль вторичных посредников при переносе сигнала к механически стимулируемым К и другим ионным каналам (Lesage 2000; Casavant 2000).

Таким образом, ЖК способны изменять активность различных типов К каналов как с внешней стороны, изменяя липидное окружение канала, так и с внутренней, выступая в роли вторичных посредников.

1.4.5 Влияние жирных кислот на натриевые каналы

ЖК способны влиять на работу Na каналов (Wieland, 1992, 1996, Leifert et al., 1999, Xiao et al 1995). Свободные ЖК модулируют потенциал-зависимые Na каналы в клетках скелетных мышц человека (Wieland,1992) и крысы (Leifert et al,. 1999). Установлено, что эффекты ЖК зависят от концентрации и места действия. Например, внутри клетки олеиновая кислота в концентрациях от 1 до 20 мкМ активировала Na, но не К ток, тогда как добавление извне ЖК (5-10 мкМ) обратимо ингибировало Na ток (Wieland et al, 1992). Внутриклеточное добавление олеиновой кислоты (18:1) приводило к блоки-

рованию Na и Ca токов в клетках нейробластомы мыши гораздо в большей степени, чем внеклеточное добавление (Linden, Routtenberg, Meves 1994).

На клетках сердечной мышцы было показано, что ненасыщенные ЖК обладали антиаритмическим действием, способны связываться с определенными участками потенциал-зависимых Na-каналов сердца, модулируя их действие (Xiao et al 1995, Wieland, et al., 1996, Vreugdnhil 1996). При этом мононенасыщенные и насыщенные ЖК были не эффективны (Xiao et al 1995).

И так, насыщенные и ненасыщенные ЖК действуют на Na каналы. Эффекты ЖК на Na каналы зависят не только от длины углеводной цепи и насыщенности, но и от концентрации и места действия.

1.4.6 Влияние жирных кислот на хлорные каналы

При исследовании на эпителиальных клетках трахеи зародышей человека было показано, что цис-ненасыщенные ЖК блокировали Cl-каналы дозозависимым способом, изменяя среднее время открытия канала, тогда как транс-ненасыщенные и насыщенные ЖК не оказывали тормозного действия (Hwang et al., 1990). Механизм действия ЖК на Cl-каналы многие исследователи связывают с активацией системы РКС без участия системы цАМФ (Patel et al., 1998; Shinomura et al 1991).

1.4.7 Влияние жирных кислот на ионотропные рецепторы

Было проведено много исследований, посвященных действию ЖК на рецепторный аппарат клетки и взаимосвязь с состоянием мембранных рецепторов, что может изменять свойства каналов клеток (Piomelli, 1996, Schmitt, Meves 1995, Katsuki et al., 1994).

Исследование никотиновых рецепторов эндосом у Torpedo показало, что обработка ФЛА2 ингибирует рецептор вызванное увеличение проницаемости для ионов (Andreasen, Mc Namee, 1979). Авторы предположили, что свободные ЖК играют важную роль в липид-белковом взаимодействии рецептора и ионных каналов (Andreasen, Mc Namee, 1979).

Известно, что АК выступает в качестве ретроградного модулятора нейрональных никотиновых АХ рецепторов (Klann et al., 1991). Например, АК приводила к увеличению активности никотиновых АХ рецепторов, взаимодействуя с РКС, в связи с этим увеличивалось освобождение глутамата из пресинаптических терминалей (Nishizaki et al., 1999). С другой стороны, АК и её метаболиты ингибируют активность АХ рецептора, действуя на рецептор с внутренней стороны мембраны клетки (Ikeuchi et al., 1996) или опосредованно через активацию РКС. Для ПГD2 показано положительное влияние на АЦ в различных клетках и увеличение концентрации внутриклеточного цАМФ, ведущее к активации АХ рецепторов. При этом, эффекты АК и ПГD2 не ингибировались блокаторами РКА (Nishizaki et al., 1999).

Другая ЖК – линолевая кислота (С18:2) также ингибировала АХ вызванные мембранные токи в ооцитах Xenopus, экспрессирующих АХ рецепторы Torpedo. Данные эффекты не наблюдались в присутствии линолеоламида, производного линолевой кислоты. Хроматографический анализ показал, что линолевая кислота способна активировать РКС q-типа. Кроме того, различные цис-ненасыщенные ЖК с 20 карбоновой цепочкой также изменяют работу канала АХ рецептора, через активацию РКС-q, но с различной степенью активности (Takahiro, Satoshi et al., 2004).

Цис-ненасыщенные ЖК (АК и докозагексаеновая кислота) действуют на НМДА рецепторы в нейронах и дозозависимо снижают токи, вызванные каинатом. Ингибирование НМДА рецептора не снималось индометацином (блокатор ЦОГ), NDGA (блокатор ЦОГ и ЛОГ) и ингибитором РКС, а насыщенные ЖК не оказывали эффекта на НМДА рецептор (Wilding et al 1998).

АК (4-6 мкМ) напрямую снижала активность АТФ-проводящих ионных каналов, зависимых от объема (VDACL) (Dutta et al 2002), влияя на специфический внутриклеточный сайт субъединицы канала. Данный эффект имитировался цис-ненасыщенными ЖК, которые не подвергаются окислению. В Зависимости от концентрации АК VDAKL каналы ингибировались по двум различным механизмам: закрытие канала (405 мкМ) и снижение единичной проводимости канала (13-14 мкМ) без изменения вероятности открытия канала (Dutta et al 2002).

Показано, что L-глутамат стимулированное освобождение АК вызывало возникновение ионного тока через мембрану и активацию ионотропного глутаматного рецептора в срезах гиппокампа. Ток был чувствителен к другим ЖК (палмитиловая, стеориновая, олеиновая и докозагексаеновая кислоты), метаболитам АК (12-, 5-HETE, ПГD2) и ингибировался антагонистами глутаматного рецептора и блокированием ФЛА2 (Satioh et al., 2004).

1.4.8. Влияние жирных кислот на сигнальные системы

Известен тот факт, что G-белки, АЦ, ГЦ, протеинкиназы являются мишенями ЖК. Многочисленные исследования показали, что цис-ненасыщенные ЖК активируют работу различных типов РКС как в возбудимых, так и в невозбудимых тканях (Камкин, Каменский 2004). В 1984 г. было показано, что АК и другие ненасыщенные ЖК активируют РКС, причем эффект не был опосредован их окисленными метаболитами (MePhail, et al, 1984). После этой публикации было высказано предположение, что АК, высвобождаемая из фосфолипидов, может играть роль вторичного мессенджера в передаче сигнала, затрагивающего активацию РКС (Nishizuka, et al 1992, Naor et al., 1991, Huang, et al 1993, Nakamura, et al 1994). ЖК значительно усиливали диацидглицерол-зависимую активацию РКС, в результате чего фермент проявлял практически максимальную активность на низком, близком к ба-

зальному, уровне Са в цитоплазме клетки (Nakanishi et al 1992, Sninomura, 1991). АК наравне с диацидглицеролом и другими ЖК способна активировать все типы РКС, но с разной чувствительностью (Ogita et al., 1992, Koide et al., 1992). Ненасыщенные ЖК вызывали время- и дозозависимую транслокацию РКС из цитозоля к плазматической мембране (Kent et el., 1996). Этот эффект не являлся детергентным, так как насыщенные и транс-ненасыщенные ЖК в тех же концентрациях не оказывали никакого влияния на активацию РКС (Kent et al., 1996). Цис-ненасыщенные ЖК напрямую влияли на активность РКС, соединяясь с С1 доменом РКС (Ohta et al., 2003). АК ингибировала АХ_вызванные токи через никотиновые рецепторы через РКС-зависимый или независимый пути (Nishizuka, et al 1998, Nishizuka, et al., 1999a).

Стеариновая кислота способна также модулировать активность РКС, соединяясь с определенным аллостерическим участком фермента. Высокие концентрации стеариновой кислоты (100 мкМ) вызывали депрессию активности АХ рецептора. Возможно, при высоких концентрациях стеариновая кислота имеет собственный ингибирующий эффект на нейрональные никотиновые АХ рецепторы, которые маскируют потенциацию. Подобное действие высоких концентраций наблюдается и у АК (Otha et al., 2003).

Одной из мишеней ЖК являются G-белки плазматической мембраны. Известно, что мобилизация АК в клетках может быть вызвана стимуляцией G-белков, причем высвобождение АК усиливается даже при неспецифической активации G-белков в присутствии ГТФ или его негидролизуемого аналога (DuBourdieu et al., 1990). В развивающемся нервно-мышечном синапсе G-белок активирует каскад АК в постсинаптической клетке. АК диффундирует через плазматическую мембрану и действует как ретрогральный посрдник на пресинаптическую мембрану, оказывая ГТФ подобное модулирующее действие на вызванное и спонтанное освобождение медиатора. Угнетение синтеза АК снимало действие эндогенной АК и ГТФ-гамма-S. Также на роль ретроградного мессенджера предлагают промежуточный продукт ЛОГ пути метаболизма АК-5-HPETE (Harish et al., 1992).

С другой стороны, предварительная выдержка клеток мозга мыши в АК снижала базальную активность и ГТФ, и форсколин-стимулированную активность АЦ. Интересно заметить, что эффект зависел от присутствия карбоксильных групп в углеродном скелете ЖК. Отсутствие АК-зависимого снижения активности G-белков в присутствии коклюшного токсина указывает на альтернативный механизм действия, не зависимый от ГТФ-связанных белков (Nakamura, 2001).

ЖК способны влиять на скорость синтеза цАМФ и цГМФ двумя способами: изменяя физические свойства мембраны, и напрямую через изменение конформации мембранных АЦ и ГЦ. Также установлено, что изменения активности АЦ и ГЦ как мембранносвязывающих ферментов коррелируют с изменениями в составе ЖК их липидного окружения и, соответственно, физических свойств мембраны (Delton-Vandenbroucke et al., 1996). С другой стороны, микромолярные концентрации экзогенных ЖК активируют как мембранные (Wallach et al., 1976), так и растворимые изоформы фермента (Waidman et al., 1987, Nakamura 2001). АК в концентрациях от 1 до 599 мкМ непосредственно стимулировала очищенную растворимую ГЦ из мозга крыс, а более высокие концентрации оказывали сильный ингибирующий эффект. Другие ненасыщенные ЖК, такие как олеиновая или линолевая, являлись гораздо более слабыми модуляторами этого фермента (Louis et al., 1991).

Производное АК – 12HETE также стимулирует продукцию ц АМФ в фибробластах человека, но ингибирует в клетках почек крысы и раковых клетках мыши (Nakamura, 2001).

В лейкоцитах АК активирует НАДФ-оксидазу либо фосфорилируя белок, либо активируя экспрессию гена НАДФ-оксидазы (Brash, 2001, Shiose, Sumimoto, 2000). Также показано, что АК способна стимулировать активность диацидглицерол-киназы в мозге крыс (Rao et al., 1994). Ак ингибирует активность Са/кальмодулин зависимой протеинкиназы II в синаптосомах переднего мозга крыс (Piomelli et al., 1989).

1.4.9 Влияние жирных кислот на процессы экзо- и эндоцитоза

Известно, что жирные кислоты оказывают влияние на работу экзо- и эндоцитозного аппарата клеток как возбудимых так и невозбудимых тканей. Возможные механизмы действия связывают с действием на белки экзоцитоза и на физико-химические свойства мембраны.

Экзоцитоз является клеточным процессом, где происходит слияние везикул с плазматической мембраной. Слияние везикул участвует в различных биологических процессах таких, как рост клеток, восстановление плазматической мембраны, рост аксонов, переработка транспортеров плазматической мембраны и высвобождение растворимых сигнальных молекул, таких как нейромедиаторы и гормоны в межклеточное пространство (Darios, Connell, 2007).

Было показано, что свободные жирные кислоты связаны с увеличением секреции из различных типов клеток [Nashio et al., 1996, Brown et al., 2003]. Исследование эффектов различных полиненасыщенных жирных кислот на экзоцитоз в нейроэндокринных клетках PC12 с помощью измерения емкости мембраны, показал, что экзогенная аппликация арахидоновой и эйкозапентановой кислот приводило к увеличению емкости мембраны, что свидетельствует о слиянии секреторных везикул с мембраной, тогда как докозагексановая , линолевая не оказывали значительного эффекта на емкость [Ong et al., 2006]. Увеличивалась секреция.

В исследованиях in vitro было показано, что конформационные изменения, вызванные присутствием кислоты важны для процесса слияния синаптических везикул с пресинаптической мембраной.

Еще одно подтверждение влияния жирных кислот на процесс экзоцитоза – эффекты токсинов, блокирующих синаптическую передачу.

В последние годы возрос интерес к роли липидов и жирных кислот в процессах слияния мембран во время экзо- и эндоцитоза. Слияние везикул включает значительное геометрическое ремоделирование и последующее слияние двух листков бислоя плазматической и везикулярной мембраны. Модель слияния (экзоцитоза) предполагает, что противолежащие цис листки (внешний везикулярный и цитозольный плазматический монослои) сливаются и формируют промежуточную структуру с сильно отрицательным изгибом. Слияние и изгиб транс-слоев (внутреннего везикулярного и внешнего плазматического) может привести к созданию поры с положительной кривизной [Rohrbough, Broadie, 2005]. Молекулярная форма липидов отражает соотношение размеров полярной головки и гидрофобной части молекулы. Липиды с большой полярной головкой и насыщенными жирно-кислотными хвостами (гликолипиды и лизофосфолипиды) имеют форму конуса, тогда как липиды с компактной головкой и гидрофильными хвостами (фосфатидная кислота, жирные кислоты, др) – обратного конуса. Соответственно, монослой, содержащий лизофосфолипиды, стремится стать выпуклым и обладает положительной спонтанной кривизной, тогда как монослой, содержащий фосфотидилхолин или арахидоновая кислота, стремится стать вогнутым и обладает спонтанной отрицательной кривизной. Поэтому молекулы-конусы способствуют образованию пор, а обратные конусы – возникновению состояния полуслияния [Чизмашев, 2001, Zimmerberg, Chernomordik, 2006]. Лизофосфолипиды и свободные жирные кислоты изменяют свойства пресинаптической мембраны, что влияет на ее способность формировать изгибы и сливаться с синаптическими везикулами. Ненасыщенные жирные кислоты, формирующие отрицательный изгиб, способствуют полуслиянию, а лизофосфолипиды ингибируют этот процесс. Напротив, открытие поры (пора должна контактировать с водной средой) из состояния полуслияния ингибируется жирными кислотами, но этому способствуют лизофосфолипиды [Zimmerberg, Chernomordik, 2006].

Таким образом, изменение липидного состава мембран является критическим для мембранной динамики, и будет опосредовать модуляцию процессов экзо- и эндоцитоза синаптических везикул.

1.5 Экзо- и эндоцитоз синаптических везикул *нервном окончании*

Процессы экзо- и эндоцитоза являются ключевыми этапами в рециклировании синаптических везикул в синапсах. А именно этот процесс является основой для осуществления пресинаптической функции [Engelman, MacDermott, 2004], которая заключается в секреции медиатора из нервного окончания в ответ на поступление потенциала действия. Проходя по мембране нервного окончания, потенциал действия открывает в пресинаптической мембране каналы для ионов кальция. Входя в клетку, кальций запускает слияние прикрепленных к мембране везикул, содержащих медиатор, с пресинаптической мембраной. Таким образом, медиатор освобождается из синаптических везикул нервного окончания в синаптическую щель. Он диффундирует через нее и связывается с рецепторами, расположенными на постсинаптической мембране, что приводит к передаче сигнала внутрь клетки. После экзоцитоза мембрана синаптических везикул перемещается к сайтам эндоцитоза, где захватывается внутрь нервного окончания. Вновь образовавшиеся везикулы транспортируются вглубь нервного окончания, где заполняется медиатором. И цикл повторяется заново.

Известно, что экзоцитоз синаптических везикул происходит в определенных участках нервного окончания, названных активными зонами [Зефиров, Черанов, 2000]. Эндоцитоз же происходит вне активных зон, однако, более точная локализация этого процесса не установлена. Это связано с отсутствием доступных способов для его обратимой блокады. Не решен также вопрос о взаимоотношениях активных зон (сайтов высвобождения) и сайтов эндоцитоза. Не смотря на большое количество работ, посвященных изучению

процессов экзо- и эндоцитоза пока не выделено главных факторов определяющих временной ход этих процессов.

На сегодняшний день процессы, происходящие в отдельной активной зоне, достаточно детально изучены. Но закономерности функционирования активных зон в "нестабильных" участках нервного окончания (участки, находящиеся в фазах роста, ретракции и ремоделирования), взаимоотношения между активными зонами нервного окончания остаются в тени современной научной мысли.

Сегодня предпринимаются попытки к созданию фармакологических препаратов избирательно действующих на процессы экзо- и эндоцитоза, которые в дальнейшем могут использоваться для профилактики и "мягкой" коррекции заболеваний нервной системы. Например, многие нейротропные вирусы и токсины захватываются эндоцитозом внутрь нервных окончаний, где проявляются их патогенные свойства. Таким образом, если заблокировать эндоцитоз и переключить механизм секреции медиатора с экзоцитоза на секрецию медиатора через пору слияния, то вирусы и токсины не смогут проникнуть внутрь клетки и, соответственно, нанести вред организму. Хотя при этом пресинаптическая функция не будет нарушена. Однако решение подобных задач затруднено тесным сцеплением процессов экзо- и эндоцитоза, поэтому часто сложно ответить на какой именно процесс влияет тот или иной фактор [Ryan, 2001]. Сегодня возникла потребность в создании способа, при помощи которого можно было бы разобщить на достаточно длительное время ключевые этапы в рециклировании синаптических везикул.

Развитие химии стерильных флуоресцентных красителей, которые маркируют рециклирующие синаптические везикулы, произвело революцию в исследованиях процессов, связанных с рециклированием везикул [Betz et al., 1996]. Один из таких красителей FM1-43 – это наиболее широко используемый нейробиологический аппликатор, который обратимо встраивается внутрь внешнего листка плазматической мембраны и перемещается в эндоцитирующую везикулу [Ryan, 2001].

1,4,10 или прямо в 1,4,9 Действие полиненасыщенных жирных кислот на синтаксин не выделяй

Было показано, что ПНЖК действуют на синтаксин, белок плазматической мембраны, непосредственно участвующий в слиянии везикул с плазматической мембраной. Синтаксин – компонент белкового комплекса SNARE, обеспечивающего слияние внутриклеточной мембраны по всей клетке. Прототипичный набор слившихся белков, участвующих в высвобождении нейромедиатора, состоит из синтаксина плазматической мембраны и вместе со SNAP-25 (синаптосомо-ассоциированный белок, 25 кД) и везикулярного белка синаптобревина. Три белка образуют слегка скрученный четырехспиральный узелок между двумя близкорасположенными мембранами, возможно инициирующий процесс слияния.

Бислой мембраны, в котором находятся белки SNARE, состоит из нескольких видов фосфолипидов, а также сфинголипидов и холестерина. Фосфолипиды часто содержат полиненасыщенные ЖК, такие как арахидоновая или докозагексаеновая в позиции sn-2, тогда как насыщенные ЖК занимают sn-1 позицию.

Продемонстрировано, что ФЛА2 - «главный» в механизме слияния на плазматической мембране, предполагая сверхрегуляцию SNARE или SNARE-ассоциированных молекул. Интересно, что это слияние везикул достигается за счет производства арахидоновой кислоты.

Увеличение арахидоновой кислоты в синаптических мебранах или мембранная обработка фосфолипазой А2 достаточны, чтобы усилить образование SNARE-комплекса. Следует отметить, что простагландины неэффективны в активация синтаксина, предполагается, что это полиненасыщенные ЖК, которые способствуют слиянию везикул. Анализ отдельных компонентов SNARE показал, что это синтаксин, который чувствителен к наличию двух основных ПНЖК - арахидоновой и докозагексаеновой кислоты. Силь-

ная корреляция наблюдалась при изменениях в структурных свойствах синтаксина и роста нейронов, обеспечивающих понимание механизма действия полиненасыщенных ЖК в развитии мозга. Хотя это было изучено на синтаксине, который выступает посредником слияния везикул во время роста нейронов, понятно что и синтаксин 1, основная изоформа в мозге, также чувствителен к арахидоновой кислоте, предполагая консервативное регулирование SNARE-механизма слияния (Darios, Connell, 2007).

ПНЖК обладают высокой специфичностью к повышенной регуляции синтаксина для вторжения в SNARE комплекс, с насыщенными ЖК это неэффективно. Так как насыщенные ЖК образуют мицеллы при более низких концентрациях, чем ненасыщенные ЖК, мицеллообразование как таковое, вероятно, не лежит в основе активации синтаксина.

Кроме того, способность полиненасыщенных ЖК образовывать мицеллы ингибируется в присутствии синтаксина. Полумаксимальная концентрация для активации арахидоновой кислоты синтаксина около 50 мМ. Высокий процент молекул фосфолипидов проводят этерефецированную полиненасыщенную ЖК, это значит, что внутри плотно упакованный липидный бислой.
Кроме того, высокое содержание арахидоновой кислоты было продемонстрировано на изолированных нервных окончаниях и нейронных конусах роста, которые обогащены ФЛ А2. Небольшой объем этих специализированных нейронных отсеков, содержащих SNARE-связывающий механизм, позволяет предположить, что синтаксин может временно столкнуться с высокой концентрацией ПНЖК, которая могла бы быть достаточной, чтобы стимулировать SNARE-взаимодействия.

1.5.1 Синаптические везикулы

В НО определены два основных типа везикул – это мелкие синаптические везикулы и секреторные гранулы. Секреторные гранулы, диаметром око-

ло 100 нм, неоднородны по размеру, заполнены нейропептидами и протеинами. СВ однородны по размерам, имеют диаметр около 50 нм и содержат классические медиаторы. Каждая СВ составлена приблизительно из 10 000 молекул фосфолипидов и 200 молекул белков. Белки СВ могут быть разделены на два функциональных класса: белки-транспортеры, которые опосредуют захват медиатора и других компонентов в синаптических везикулах, и транспортные белки, которые ответственны за перемещение СВ внутри клетки. Самый главный белок СВ - протонный насос. Он составлен, по крайней мере, из 13 субъединиц. Единственной копии протонного насоса в пузырьке достаточно, чтобы обеспечить энергией захват медиатора. В дополнение к протонному насосу и транспортеру медиатора, СВ содержат белки-транспортеры для ионов цинка, хлора и т.д.

Выделяют девять семейств транспортных белков синаптических везикул. СВ содержат периферические мембранные белки (синапсины и рабфилины), белки, которые прикреплены к мембране при помощи липидного якоря, и трансмембранные белки с одним (синаптотагмины, синаптобревины) трансмембранными регионами. Во многих случаях, эти белки или их более отдаленные родственники найдены также вне синапсов. Однако ни для одного из этих белков не продемонстрирована ненейрональная функция. Изоформы многих белков СВ экспрессируются в мозге с определенным паттерном, который не коррелирует ни с типом медиатора и ни с известными функциями различных областей мозга. Наконец, эволюционная история различных белков СВ, весьма, отлична. Некоторые белки – эволюционно высоко консервативные (синаптобревин, синаптотагмин). Для других белков (синапсины, синаптофизин) только отдаленные гомологи найдены у беспозвоночных, и некоторые белки (SV2) отсутствуют у беспозвоночных. Много других белков могут связываться с СВ (кальмодулин-Ca^{2+}-зависимая протеин киназа 2, актин, снапин, динеин). Единственная общая характеристика для всех белков СВ – то, что у них отсутствует отщепляющийся сигнальный пептид. Хотя большинство трансмембранных белков СВ включает внутренние сигнальные

пептиды. Трансмембранные области этих белков встраиваются в бислой липидов посттрансляционно. После прохождения сети транс-Гольджи, мембранные белки синаптических везикул следуют по обычным путям мембранного транспорта к плазматической мембране. Заключительное формирование зрелой СВ не может произойти до нескольких раундов экзо- и эндоцитоза непосредственно в синапсе или близко к нему. Относительная простота белковой композиции СВ предполагает, что многие их белки должны иметь многочисленные функции. Например, синаптотагмины 1 и 2 функционируют в запуске экзоцитоза и в нуклеации АР- 2 в эндоцитозе.

Существует два функционально различных пула синаптических везикул. Небольшой пул немедленно готовых к экзоцитозу везикул, и резервный пул, везикулы которого при необходимости за 5-12 секунд могут транспортироваться в немедленно готовый к экзоцитозу пул [Ryan et al., 1993].

Это контролируется внутриклеточной концентрацией Ca^{2+}. Везикулы первого пула находятся в непосредственном контакте с пресинаптической мембраной, их количество постоянно и определяет эффективность синапса в норме, а везикулы резервного пула образуют скопления на некотором удалении от плазматической мембраны.

1.5.2 Активная зона

На электронных микрофотографиях скоплениям синаптических везикул соответствуют пресинаптические "электронноплотные полоски", в состав которых входят белки, ответственные за экзоцитоз. Рядом располагаются потенциал-зависимые Ca^{2+}-каналы и Ca^{2+}-активируемые K^{+}-каналы, в соотношении 2:1 [Robitaille et al., 1993]. Совокупность всех вышеперечисленных элементов получила название активная зона (АЗ). АЗ, с одной стороны, обеспечивает увеличение вероятности секреции кванта медиатора, а с другой – ограничение повторного освобождения кванта в ответ на нервный импульс [Зефиров, Черанов, 2000]. АЗ нервного окончания (НО) лягушки состоит из

пресинаптической плотной полоски, расположенной поперек НО, около которой в два двойных ряда расположены Ca^{2+}-каналы, и в два одиночных ряда по 40-50 СВ. Активная зона имеет длину 1-3 мкм, ширину 0,1 мкм. Расстояние между ними 1-2 мкм [Ko, 1981].

В кожно-грудинной мышце лягушки, по сравнению с кожно-спинной мышцей, АЗ располагаются более часто, реже встречаются фрагментированные АЗ, а их общая длина на 100 мкм больше. АЗ в нервном окончании тонических мышц (камбаловидная мышца) располагаются не регулярно, имеют вид не полосок, а пятен различных размеров с расплывчатыми контурами и хаотичной ориентацией относительно продольной оси НО. Мембрана синаптических везикул подвергается циклическим перемещениям. Основу для которых составляют процессы экзо- и эндоцитоза. В АЗ и ее окрестности осуществляются пять основных процессов с участием СВ [Goda, 1997]:

1. Транспорт (мобилизация) СВ из резервного пула в пул, готовый к освобождению.

2. Стыковка (прикрепление, докирование) СВ с местом освобождения в АЗ.

3. Подготовка (предслияние, прайминг) везикулы к экзоцитозу.

4. Запуск экзоцитоза и собственно процесс экзоцитоза – слияние мембраны СВ с пресинаптической мембраной.

5. Восстановление везикулы посредством эндоцитоза, с последующим заполнением медиатором и включением ее в мобилизационный пул или пул, доступный к освобождению.

Вероятность освобождения кванта медиатора в ответ на нервный импульс сильно колеблется в различных активных зонах по ходу нервного окончания [Bennett, 1996]. Некоторые АЗ практически не участвуют в секреции медиатора. Кроме того, те, которые расположенны в проксимальной части НО, имеют более высокую вероятность освобождения, чем расположенные в дистальной области [Зефиров, 1983]. Эти различия могут иметь несколько причин. Во-первых это может быть связано с размерами АЗ (они

уменьшаются в дистальных отделах НО), либо это разная плотность Ca^{2+}-каналов в активных зонах. Так же разные участки НО имеют неодинаковую плотность элементов, обеспечивающих формирование и временной ход Ca^{2+}-макродомена при возбуждении, а также внутриклеточную концентрацию Ca^{2+} в покое.

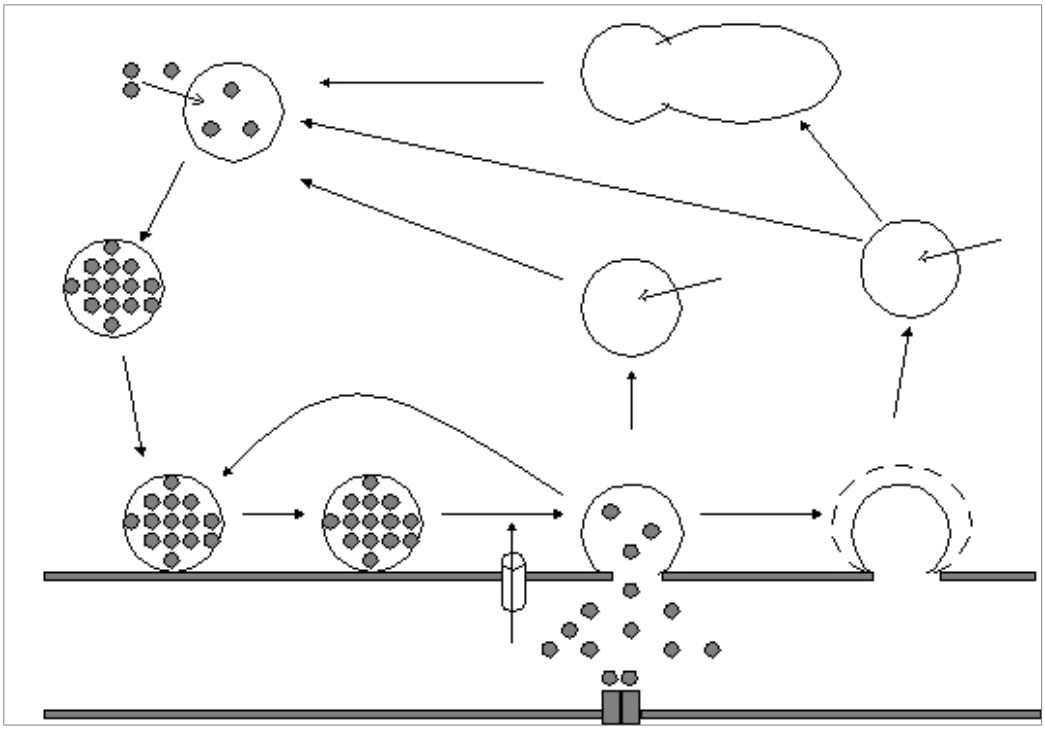


Рисунок 2 - Цикл синаптической везикулы [Gundelfinger et al., 2003].

Синаптические везикулы заполняются медиатором посредством активного транспорта , затем они перемещаются к АЗ, где прикрепляются к пресинаптической мембране. Везикулы проходят стадию предслияния, которая состоит из нескольких этапов. Приток Ca^{2+} через потенциал-зависимые каналы вызывает высвобождение медиатора в <0.1 мс. Опустошенные везикулы покрываются клатрином и сопутствующими белками до процесса эндоцитоза. Покрытая везикула почкуется от плазматической мембраны и затем теряет покрытие (рисунок 2). Пустые пузырьки закисляются при помощи протонного насоса и возвращаются в глубь терминали, где соединяются с ранними эндосомами. Синаптические везикулы, вероятно, могут обойти этапы в цикле в двух пунктах. Во-первых, покрытие слившихся везикул клатрином и клатрин-зависимый эндоцитоз могут быть заменены

быстрым процессом "эндоцитоза" с последующим отсоединением от пресинаптической мембраны и повторным заполнением медиатором (“kiss-and-run”, B), или может случиться так, что синаптическая везикула не покидает активной зоны и немедленно заполняется после закрытия поры слияния (“kiss-and-stay”). Во вторых, эндосомальный посредник, вероятно, не обязателен для рециклизации, и некоторые пузырьки происходят напрямую из эндоцитозных везикул.

Таким образом, подводя итог всего выше сказанного, отметим, что жирные кислоты оказывают влияние на работу экзо- и эндоцитозного аппарата клеток как в возбудимых так и невозбудимых тканях. Изменение липидного состава мембран является критическим для мембранной динамики, и будет опосредовать модуляцию процессов экзо- и эндоцитоза синаптических везикул. Предполагается, что процессы экзоцитоза усиливаются под влиянием ненасыщенных ЖК, соответственно, они же снижают процессы эндоцитоза. Насыщенные же, наоборот, усиливают процессы эндоцитоза.

2 ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

2.1 ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1,1 Объект исследования

Эксперименты проводили на изолированных нервно-мышечных препаратах диафрагмальной мышцы мыши. Для экспериментов отбирали преимущественно самцов. Перед экспериментом мышей усыпляли эфиром, после чего производили препаровку. Нервно-мышечный препарат выделяли и помещали в ванночку, заполненную стандартным раствором Кребса, на прозрачную стеклянную подложку. Препарат растягивали на 110-120% от первоначальной длины при помощи стальных крючков.

Ванночка, где размещался нервно-мышечный препарат, была изготовлена из органичсекого стекла и имела рвбочий объём 10 мл, и к ней была подсоединена перфузионная система. Эксперименты проводили при температуре 20С. Скорость перфузии во время отмывки была постоянной. Нерв всасывали в пластмассовую пипетку, укрепленную в стенке ванночки, где были расположены два серебряных раздражающих электрода.

2.1,2 Система перфузии и применяемые растворы

Ванночка, где размещался нервно-мышечный препарат, была выполнена из органического стекла и имела рабочий объем 18 мл. К ванночке были подсоединены поливиниловые трубки, по которым осуществлялись приток и откачка раствора. Все эксперименты выполнены в условиях наружной перфузии препарата со скоростями 4-5 мл/мин во время отмывки, только при «загрузке» препарата красителем перфузия останавливалась. Нерв всасывали в пластмассовую трубочку, укрепленную в стенке ванночки, где были расположены два серебряных электрода для раздражения нерва.

Для работы с теплокровными животными использовали стандартный раствор Кребса следующего состава (мМ) : NaCl – 137; KCl – 5; $CaCl_2$ –2,2; MgCl2 – 1; NaHCO3 – 11; NaH2PO4 – 1; Глюкоза – 11. FM1-43 (фирма Biotium, США) использовали в концентрации 4 мкМ. Этот раствор применялся только на время загрузки нервного окончания красителем. Все эксперименты проведены при температуре 20ᵒ -22ᵒ С, pH раствора поддерживали на уровне 7,2-7,4.

В экспериментах использовали: диоксихолат, олеиновую кислоту, миристиновую кислоту, октаноивую кислоту. Все вещества фирмы Sigma использовались в концентрации 50 мкМ. Все вещества предварительно растворялись в DMSO в таком объеме, чтобы конечная концентрация вещества в перфузионном растворе не превышала 0,1%.

2.1,3 Флуоресцентные красители и их свойства

Флуоресцентная микроскопия позволяет изучить процессы экзо-эндоцитоза синаптических везикул в живых нейронах. На сегодняшний день методика с применением флуоресцентного эндоцитозного маркера FM1-43 является наиболее простой и относительно недорогой в использовании. Данный краситель наименее токсичен по отношению к исследуемым биологическим объектам и позволяет получить данные на квантовом уровне. Эффективность флуоресцентных красителей для изучения активно зависимого эндосомального транспорта в живых клетках в основном зависит от скорости диффузии красителя в мембране и от силы связывания с ней.

Разработаны флуоресцентные красители, прочно и нековалентно связывающиеся с компонентами живого, узко специфичные и с широким диапазоном связывания. Их применяют для идентификации, количественного определения различных соединений, для визуализации некоторых биологических процессов. Существуют стерильные красители оригинально созданные как сенсоры мембранного потенциала [Grinvald et al., 1988]. Используются краси-

тели, которые селективно метаболизируются и маркируют специфические мембранные отсеки [Pagano et al., 1991].

Секреция медиатора, изгнание клеточных отходов посредством экзоцитоза, и его следствие эндоцитоз активно исследуются оптическими методами [Ryan et al., 2001. Флуоресцентные красители, особенно стерильные красители, которые обратимо окрашивают мембраны, используются для слежения за экзо- и эндоцитозом во многих типах клеток [Betz et al., 1996; Cochilla et al., 1999]. Окрашивание при помощи подобных ФК живых НО было впервые описано в нервно-мышечном препарате змеи [Lichtman et al., 1989]. По неизвестным причинам эти ФК не работали в препаратах не рептилий. Позднее был обнаружен стерильный ФК RH414, который был первым синтезирован как сенсор мембранного потенциала, окрашивающий нервные терминали и млекопитающих и амфибий активно-зависимым способом (т.е при участии эндоцитоза, попадает внутрь НО) [Betz, Bewick, 1992]. В дальнейшем были синтезированы и охарактеризованы новые стерильные ФК, лучшие из которых FM1-43 и FM4-64 [Betz et al., 1996].

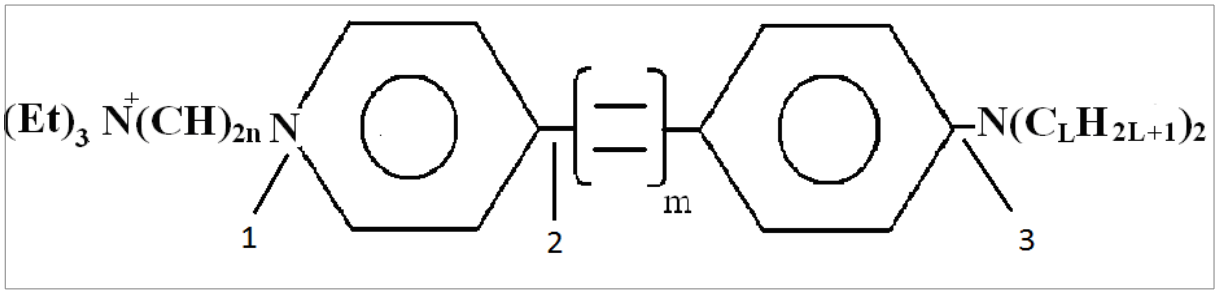


Рисунок 3 – Химическая структура флуоресцентных красителей ряда FM. Молекулы стерильных флуоресцентных красителей состоят из трех частей: 1 – голова, 2 – ядро, 3 – хвост. В зависимости от числа двойных связей (m) изменяются их спектральные характеристики. Чем больше у красителя значение m, тем более длинные λ возбуждения и испускания он имеет.

Эффективность ФК для изучения активно зависимого эндосомального транспорта в живых клетках в основном зависит от трех атрибутов. 1. От скорости диффузии красителя в мембране и от силы связывания с ней. 2. ФК не должен проникать через мембрану. 3. ФК должен предпочтительно флуоресцировать только тогда, когда растворен в мембране. Эти характеристики обуславливают разделение молекулы на 3 части: гидрофобный хвост (растворяется в мембране), голова (дикатионная и мешает проникновению через мембрану), тело или ядро (включает ароматические кольца и двойные связи, которые определяют спектральные свойства красителя) [Betz et al., 1996] (рисунок 3). Голова красителя важна в определении его проникающей способности через мембрану.

Химическая структура. Флуоресцентные FM красители – это амфифильные молекулы, у которых липофильный электрон-донорный хвост соединен с положительно заряженной электрон-акцепторной группой пиридина через двойную связь или цепью двойных связей.

Эффект полярного растворителя. FM1-43 в воде флуоресцирует слабо. Однако яркость его флуоресценции значительно увеличивается при растворении в мембране.

FM1-43 проявляет отличные спектральные свойства в мембранах разных типов клеток. Например, в мышце лягушки: свечение красителя может быть зеленым в миелине, желто-оранжевым в синаптических везикулах, и оранжево-красным в эндосомах шванновских клеток (Betz & Bewick, 1992). Данные ФК, встраиваясь в мембрану, изменяют ее свойства. Имеются данные, что в течение применения FM1-43 и других подобных красителей, наблюдается обратимое блокирование АХ-рецепторов в мышце лягушки [Bewick & Betz, 1994].

Однако длительное облучение красителя светом, возбуждающим флуоресценцию, может приводить к фотовыцветанию [Liu & Tsien, 1995], хотя стерильные красители считаются фотостабильными [Betz & Bewick, 1992].

2.1,4 Регистрация свечения

Для наблюдения люминесценции использовали универсальный микроскоп (Carl Zeiss) со 100 ватной ртутной лампой с теплозащитным, 10% нейтральным трансмиссионным фильтром и регулируемой диафрагмой. Использовали водоиммерсионный объектив (63х). Оптика для анализа свечения FM1-43 включала возбуждающий фильтр с полосой пропускания 450-480 нм, дихроическое стекло (область отражения ≥ 90% от 450 до 480нм; область пропускания ≥ 90% от 520 до 700 нм) и эмиссионный фильтр (515нм) (см. раздел «флуоресцентные красители и их свойства». Все наблюдения проводили только на поверхностно лежащих нервных окончаниях. Для регистрации картин люминесценции использовали быстродействующую черно-белую видеокамеру (Axio Cam /S/Mrm, Karl Zeiss, Германия), с выключенным шаттером, со световой чувствительностью 0,0003 люкса, совмещенной через плату видеозахвата и видеокарту с персональным компьютером. Размеры матрицы видеокамеры составляли 463 на 607 пикселей. Разрешающие размеры пикселя при наших условиях регистрации составили: по вертикали 0,078 мкм, по горизонтали 0,096 мкм. Регистрацию проводили в течение 1-2 с, со скоростью 30 кадров/с.

2.1,5 Стимуляция двигательного нерва

Раздражение двигательного нерва производили прямоугольными электрическими импульсами длительностью 0,2-0,3 мсек, сверхпороговой амплитуды с частотой 50 Гц, которые подавались на серебряные раздражающие электроды через разделительный трансформатор.

2.1,6 Схема эксперимента

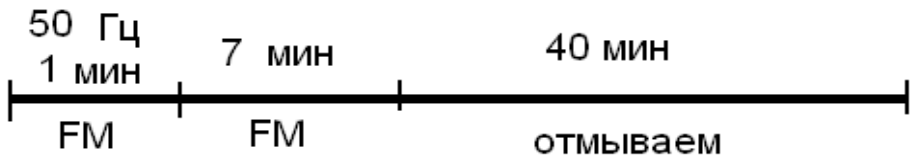
Для исследования процессов эндоцитоза синаптических везикул при высокочастотной активности, мы использовали различные варианты загрузки красителя в НО.

В случае «полной загрузки» FM 1-43 присутствовал в растворе, как во время стимуляции, так и течение 7 минут после ее окончания (Рис. 4 а). В таких условиях красителем загружаются практически все везикулы. Для выявления эффекта жирных кислот, препарат выдерживали в течение 20 мин в растворе, содержащем ЖК (50 мкМ) до начала раздражения.

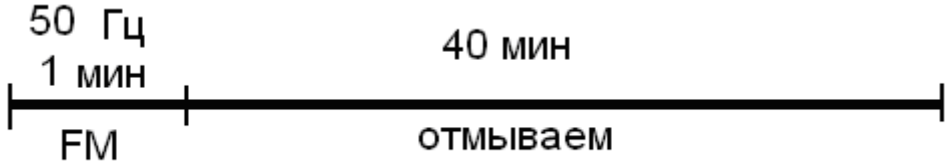
В случае загрузки «during» FM1-43 присутствовал в растворе только лишь во время стимуляции в течение 1 минуты (Рис. 4 б).

В случае «after» FM1-43 присутствовал в растворе в течение 7 минут после стимуляции (Рис. 4 в).

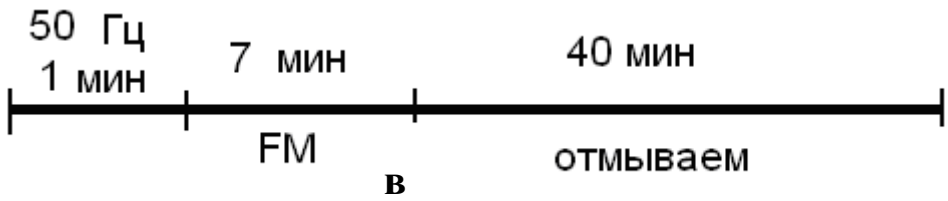
Для исследования процессов экзоцитоза синаптических везикул при высокочастотной активности, мы также использовали различные варианты загрузки красителя в НО. Загрузки проводили аналогичным образом, как и в предыдущих экспериментах. Для выявления эффекта жирных кислот, препарат отмывали в течение последних 20 мин отмывки (40 мин) в растворе, содержащем ЖК (50мкМ) после начала раздражения. Далее в течении 20 мин регистрации свечения препарат постоянно стимулировали при частоте (50 Гц).



а



б



в

Рисунок 4 – Схема эксперимента. а – полная загрузка, б – during, в - after

2.7 Анализ изображений

Сначала для устранения искажений при видеозаписи производили усреднение по двадцати наиболее удачным (сфокусированным примерно на один и тот же вид) кадрам. В получившихся изображениях определялось и затем отсекалось фоновое свечение. Изображения снимались видеокамерамой Axio Cam /S/Mrm, Karl Zeiss, Германия, соединенной с компьютером, содержащими программное обеспечение (Axio Vision, ImagePro) для обработки изображений под Windows *XP*. Интенсивность свечения оценивали в относительных единицах яркости пикселя (о.е.). Для характеристики свечения в сфокусированном участке НО (длинной 30-40 мкм) выделялись контуры пятен. Далее определялась средняя величина флуоресценции внутри каждого пятна и среди всех пятен НО. Значение фонового свечения определяли как среднюю интенсивность свечения в квадрате $50^{x}50$ пикселей в участке изображения терминали НО, лишенного светящихся пятен. Фоновое свечение в дальнейшем вычитали из средней величины свечения НО. Ширину (диаметр) нервных терминалей определяли как среднее расстояние между двумя противолежащими краями мембраны НО с помощью программы ImagePro.

2,2 Результаты исследований и их обсуждение

2,2.1 Влияние олеиновой кислоты на эндоцитоз синаптических везикул в нервном окончании мыши

Показано участие жирных кислот в межклеточной сигнализации у беспозвоночных и позвоночных животных. Олеиновая, арахидоновая и некоторые другие жирные кислоты регулируют секрецию медиатора как в центральной, так и в периферической нервной системе.

Для анализа интенсивности процессов эндоцитоза использовали протокол «загрузки» красителя– «full» (см. методику).

У нормальных животных при добавлении FM 1-43 на весь период во время стимуляции и после ее окончания («full») свечение нервных терминалей составило 88 о.е. ± 2 о.е. (n=86).

При выдерживании препарата в течение 20 минут в растворе с ненасыщенной олеиновой кислотой (18:1) концентрацией 50 мМ в соответствие с тем же протоколом интенсивность свечения нервных терминалей составила 73.5 о.е. ± 4.6 (n=62, $p<0,05$, рисунок 5).

В контроле при загрузке красителем «во время» стимуляции (Рисунок 5) свечение нервных терминалей составило 85 о.е ± 2 о.е (n=143).

При выдерживании препарата в течение 20 минут в растворе с ненасыщенной олеиновой кислотой (18:1) интенсивность свечения нервных терминалей была ниже контрольных значений и составила 71.3 о.е. ± 2.1 о.е (n=75, $p>0.05$).

В контроле при «загрузке» красителя «после» стимуляции свечение нервных терминалей составило 56 о.е. ± 2 о.е. (n=119).

При выдерживании препарата в течение 20 минут в растворе с ненасыщенной олеиновой кислотой (18:1) интенсивность свечения нервных терминалей не отличалась от контрольных значений и составила 53 о.е. ± 2 о.е. (n=55, $p<0,05$) (Рисунок 5).

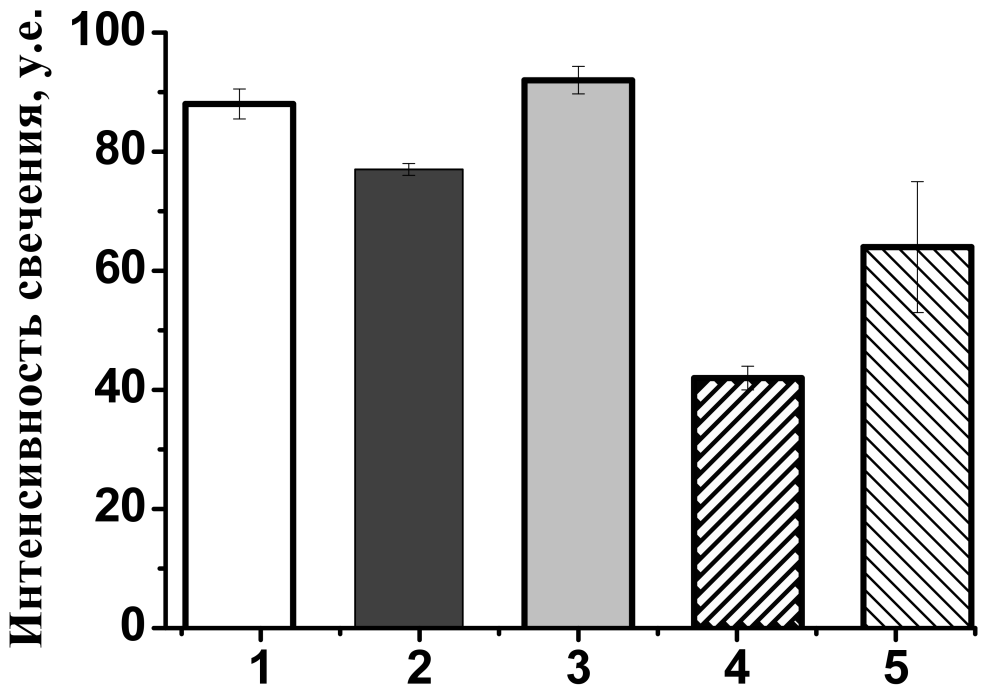


Рисунок 5 – Влияние олеиновой кислоты на процессы эндоцитоза.

*Свечение нервных терминалей диафрагмальной мышцы мыши в условиях «полной загрузки» - 1, «зарузки вовремя» стимуляции — 2, «после» стимуляции- 3. Контроль – белые столбы, олеиновая кислота (50 мкМ) – окрашенные столбы. * - p<0,05.*

Известно, что

3.2 Влияние олеиновой кислоты экзоцитоз синаптических везикул в нервном окончании мыши

Для анализа процессов экзоцитоза после предварительной «загрузки» красителя осуществляли его «выгрузку». Для этого нервно-мышечный препарат стимулировали с частотой 50Гц в течение 20 мин в растворе без FM1-43,

анализируя снижение интенсивности свечения, которое отражает потерю красителя при секреции медиатора из нервного окончания.

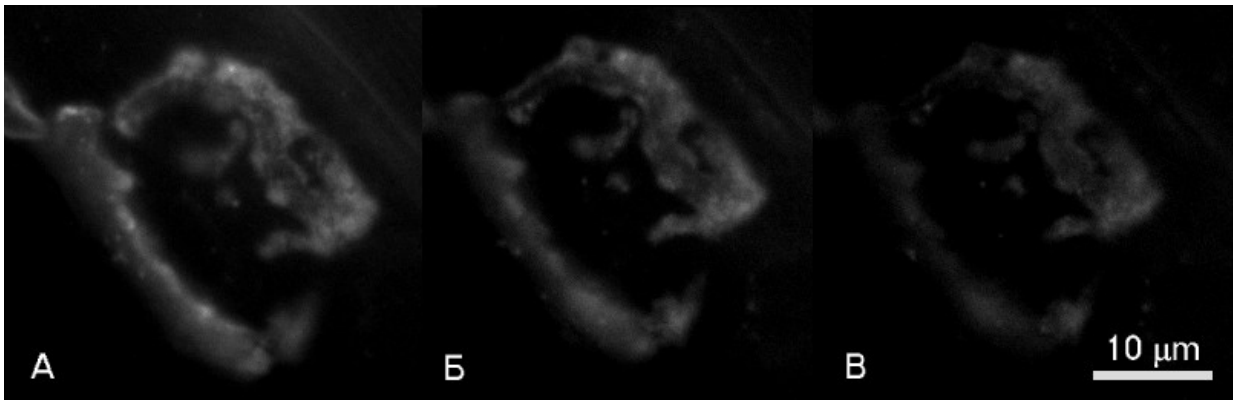


Рисунок – Изменение интенсивности свечения нервной терминали диафрагмальной мышцы мыши во время «выгрузки» красителя при длительной высокочастотной стимуляции (50 Гц).
А – до стимуляции; Б – через 10 мин стимуляции; В – через 20 мин стимуляции.

Динамика экзоцитоза (выгрузки маркера) представлена на рисунке . В норме в результате стимуляции диафрагмальной мышцы (50 Гц, 20 мин) происходит повторное высвобождение медиатора вместе с красителем, что приводит к быстрому обесцвечиванию терминалей относительно начальных значений (n=11): к 30 сек – до 79 ± 3%, к 1 мин – до 72 ± 3%, к 3 мин – до 57± 3%, к 6 мин – до 46 ± 4%, к 20 мин – до 30 ± 1% (рисунок).

В присутствии олеиновой кислоты в концентрации 50 мкМ в результате стимуляции диафрагмальной мышцы (50 Гц, 20 мин) происходит повторное высвобождение медиатора вместе с красителем, что приводит к быстрому обесцвечиванию терминалей относительно начальных значений (n=6): к 30 сек – до ± 3%, к 1 мин – до ± 3%, к 3 мин – до ± 3%, к 6 мин – до ± 4%, к 20 мин – до ± 1% (рисунок).

3.3 Влияние насыщенных жирных кислот на эндоцитоз синаптические везикулы в нервном окончании мыши

Действия ЖК могут быть также связаны с их способностью образовывать мицеллы, которые могут приводить к нарушению структуры мембраны (так называемый «детергентный эффект») и даже к образованию пор, для ионов Na^{+} и Ca^{2+}. Детергентный эффект ненасыщенных ЖК может быть исключен если влияние ненасыщенных ЖК не имитируется насыщенными ЖК, детергентом (Meves, 1994).

Насыщенные миристиновая (14:0) и октаноивая (8:0) кислота не имитировали эффектов ненасыщенной кислоты.

Интенсивность свечения терминалей в случае полной «загрузки» (рисунок 5) в присутствии миристиновй кислоты составило 92 о.е. ± 2 (n=78, p>0,05), в присутствии октаноивой кислоты интенсивность свечения терминалей составило 42 о.е. ± 2,01 (n=78, p>0,05).

Добавление ионного детергента - диоксихолата (50 мкМ) приводило к интенсивности свечения терминалей 64 о.е. ± 11 о.е (n=67).

Интенсивность свечения терминалей в случае «загрузки» во время в присутствии миристиновjй кислоты составило 77.2 у.е. ± 5.1 у.е. (n=98, p>0,05).

Октаноивая 48,3 +7,3

Добавление ионного детергента - диоксихолата (50 мкМ) приводило к интенсивности свечения терминалей 68 у.е. ±1 у.е. (n=73).

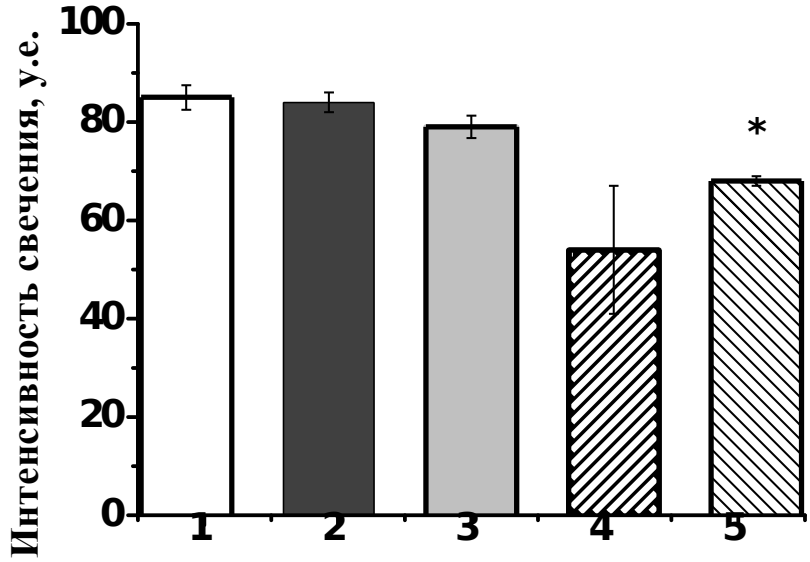


Рисунок 6 – Влияние жирных кислот на процессы эндоцитоза.

*Представлено свечение нервных терминалей диафрагмальной мышцы мыши в условиях «загрузки» «во время стимуляции». 1 — контроль, 2 — олеиновая кислота, 3— миристиновая кислота, 4 — октаиновая кислота, 5 - диоксихолат. Все вещества в концентрации 50 мкМ. * - p<0,05.*

Интенсивность свечения терминалей в случае «загрузки после стимуляции» в присутствии миристиновой кислоты составило 57 у.е. ± 2 у.е. (n=76, p>0,05)., в присутствии октаноивой кислоты интенсивность свечения терминалей составило 43 у.е. ± 2 у.е. (n=78, p>0,05).

Добавление ионного детергента - диоксихолата (50 мкМ) приводило к интенсивности свечения терминалей 47 у.е. ±1 у.е. (n=69).

Известно, что жирные кислоты оказывают влияние на работу экзо- и эндоцитозного аппарата клеток как в возбудимых так и невозбудимых тканях.

Возможные механизмы действия жирных кислот на секреторный аппарат связывают с действием на белки экзоцитоза и на физико-химические свойства мембраны [Brenner, 1974].

Известно, что жирные кислоты оказывают влияние на работу экзо- и эндоцитозного аппарата клеток как в возбудимых так и невозбудимых тканях. Возможные механизмы действия жирных кислот на секреторный аппарат связывают с действием на белки экзоцитоза и на физико-химические свойства мембраны [Brenner, 1974].

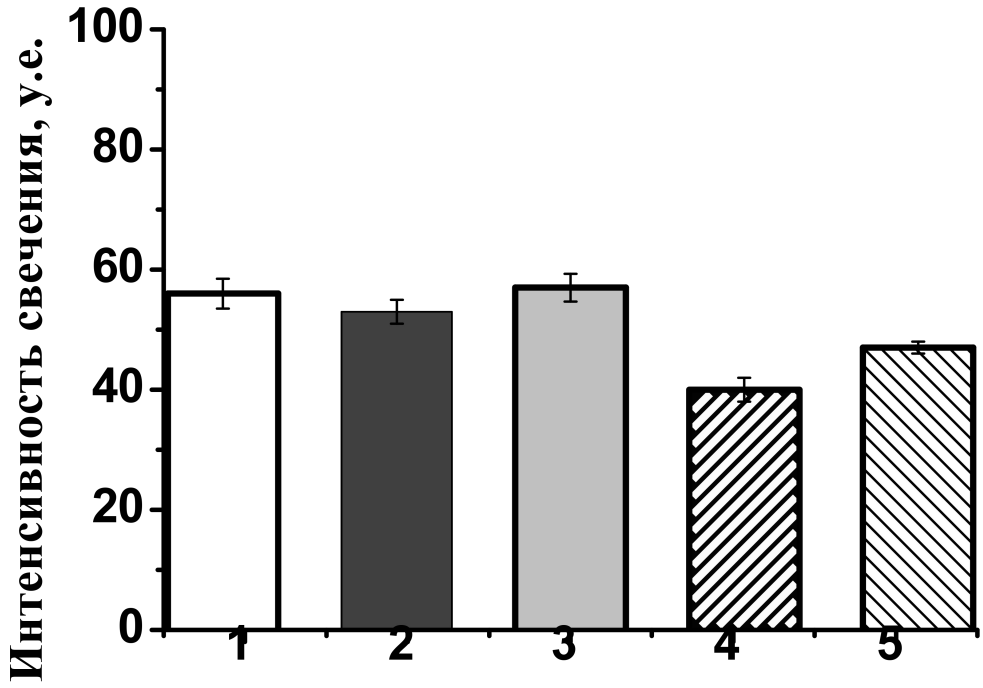


Рисунок 7 – Влияние жирных кислот на процессы эндоцитоза.

Представлено свечение нервных терминалей диафрагмальной мышцы мыши в условиях «загрузки» после стимуляции. 1 — контроль, 2 — олеиновая кислота, 3— миристиновая кислота, 4 — октаиновая кислота, 5 - диоксихолат.

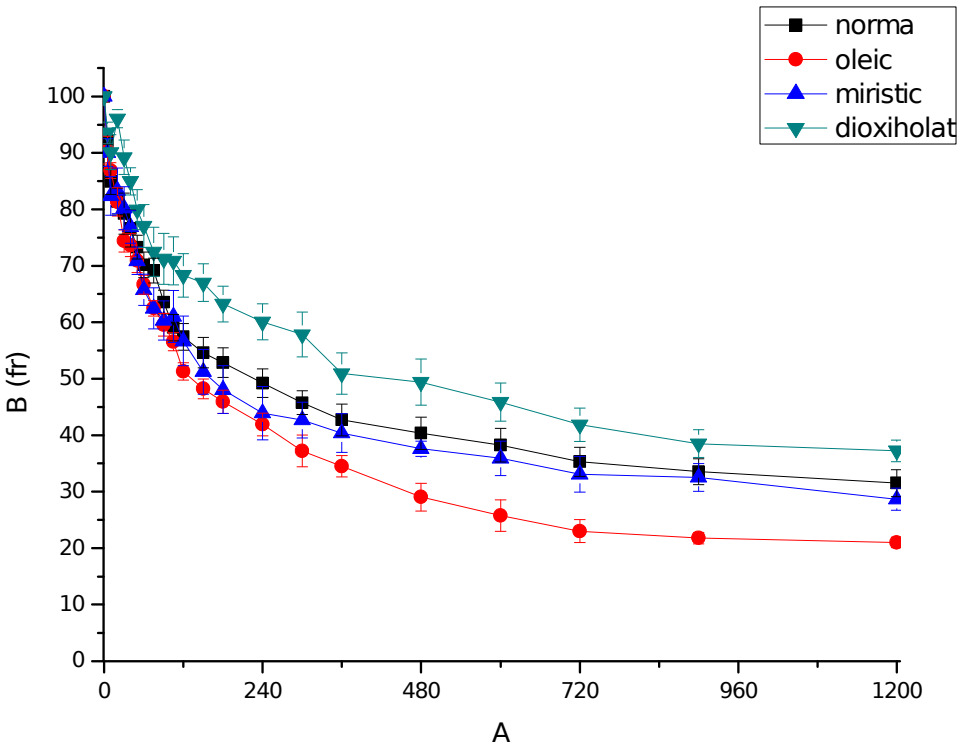
*Все вещества в концентрации 50 мкМ. * - p<0,05.*

Ненасыщенные жирные кислоты ингибируют процессы эндоцитоза в нервном окончании теплокровных, что было показано в наших исследованиях. Это может быть связано с изменением физико-химических свойств мембраны при встраивании в нее молекул жирных кислот, с их способностью образовывать мицеллы, которые могут приводить к нарушению структуры мембраны (так называемый «детергентный эффект») и даже к образованию пор, для ионов Na^{+} и Ca^{2+}. Детергентный ненасыщенных эффект ЖК может быть исключен если влияние ненасыщенных ЖК не имитируется насыщенными ЖК, детергентом (Meves, 1994).

Мы проанализировали эффекты насыщенной миристиновой кислоты и ионного детергента – диоксихолата, котроые не имитирукют действие олеиновой кислоты, что свидетельствует об отсутствии у нее детергентоного эффекта. Показано, что ненасыщенная олеиновая кислота, встраиваясь в мембрану образует отрицательный изгиб, что способствует полуслиянию мембраны с везикулой, усилению процессов экзоцитоза, соответственно замедляя эндоцитоз.

Возможно, действие октаноивой кислоты связано с ее большей химической активностью, чем у миристиновой и ее детергентным действием на мембрану клеток.

3.4 Влияние жирных кислот на процесс экзоцитоза синаптических везикул в нервном окончании мыши



При отмывке препарата в течении 20 мин в растворе в присутствии миристиновой кислоты значительных изменений не произошло (n=15): к 30 сек – 66% ( )2, к 60 сек – до 61% ( )4, к 3 мин – до 43% ( )5, к 6 мин – 36% ( ) 3, к 20 мин – до 23% ( )1.

При добавлении ионного детергента - диоксихолата (50 мкМ): к 30 сек – до 77% ( )3, к 60 сек – до 71% ( )4, к 3 мин – до 63% ( )3, к 6 мин – до 51% ( )3, к 20 мин – до 36% ( )2.

ВЫВОДЫ

1. Ненасыщенные жирные кислоты ингибируют процессы эндоцитоза в нервном окончании теплокровных.
2. Насыщенная миристиновая кислота и ионноый детергент не имитируют действия ненасыщенной олеиновой кислоты.
3. Насыщенная октаноивая кислота снижает процессы эндоцитоза синаптических везикул в нервном окончании мыши, что связано с ее детергентным действием на мембрану.
4.

Список литературы

1. Зефиров А.Л. Молекулярные механизмы квантовой секреции медиатора в синапсе / А.Л. Зефиров, С.Ю. Черанов // Успехи физиологических наукю – 2000. – Т. 31 - №3. – С. 22
2. Зефиров А.Л. Ионные токи нервного нервного окончания лягушки / А.Л. Зефиров, Н.А. Халилов // Нейрофизиология. – 1985. – Т. 17. № 6. – С. 771-779.
3. Когтева, Г.С. Ненасыщенные жирные кислоты / Г.С. Когтева, В.В. Безуглов // Биохимия. – 1998. – Т. 63. – Вып. 1. – С. 6 – 15.
4. Крутецкая, З.И. Механизмы внутриклеточной сигнализации / З.И. Крутецкая, О.Е. Лебедев, Л.С. Курилова // Монография – Спб. Изд-во СПбГУ. – 2003. – 208 с.
5. Мари, Р. Биохимия человека / Р. Мари, Д. Гренер // М.: Мир. – 1993 – 381 с.
6. Сергеева, М.Г. Простагландин Н-синтаза макрофогов мыши. /М.Г. Сергеева, М.В. Гончар // Биохимия. – 1997. – Т. 62. Вып. 3 – С. 316 – 322.
7. Фаллер, Д.М. Молекулярная биология клетки / Д.М. Фаллер, Д. Шилдс // Изд-во «Бином-пресс». – 2004. – 272 С.
8. Хухо, Ф. Нейрохимия. Основы и принципы / Ф. Хухо // Изд-во «Мир». – 1990 – 384 С.
9. Чумашев, Ю.А. Как сливаются биологические мембраны / Ю.А. Чумашев // Сорос. Образ. Жур. – 2001. Т. 7. - № 5 – С. 4-9
10. Bazan, N.G. Synaptic lipid signaling: significance of polyunsaturated fatty acids and platelet-activating factor/ N.G. Bazan // J/ Lipid Res. – 2003. – V. 44. – P. 2221-2233.
11. Betz, W.J. Optical analysis of synaptic vesicle recycling at the frog neuromuscular junction / W.J. Betz, G.S. Bewick // Science. – 1992. V. 255. – P. 200-203.

12. Betz, W.J. Imaging exocytosis and endocytosis / W.J. Betz, E. Mao, C.B. Smith // Curr. Opin. Neurobiol. – 1996. – V. 6 – P. 365-371.
13. Brash, A.R. Arahidonic acid as bioactive molecule / A.R. Brash // J. Clinical Investigation. – 2001. V. 107. - № 11. – P. 1339-1345.
14. Chen, C. Cyclooxygenase-2 regulates prostaglandin E2 signaling in hippocampal long-term plasticity / C. Chen, J.C. Magce, N.G. Bazan // J. Neurophysiol. 2002 – V. 87. – P. 2851-2857.
15. Clarke, A. Madulation of BK Ca channels activity by fatty acids / A. Clarke, S. Petrou, J.J. Singer // AM J. Physiol. – 2002. V. 283. – P. 1441 – 1453.
16. Danthi, S.J. Modulation of native T-type calcium channels by x-3 fatty acids / S.J. Danthi, J.J. Enyeart // Biochem. Biophys. Res. Comm. – 2005. – V. 327. – P. 485-493.
17. Dhopeshwarcar, G.A. Biosyntesis of polyunsatured fatty acids in the developing brain / G.A. Dhopeshwarcar, C. Subramanian // Lipids. – 1976. V. 11. – P. 67-71.
18. Engelman, H.S. Presynaptic ionotropic receptors and control transmitter release / H.S. Engelman, A.B MacDermot // Nature Rev. Neurosci. – 2004. – V. 5. – P. 135-145.
19. Evans, A.R. The cAMP transduction cascade mediates the PGE2-induced inhibition of potassium currents in rat sensory neurons / A.R. Evans, M.R. Vasko, G.P. Nicol // J. Physiol. – 1999. V. 516. – P. 163-178.
20. Gundelfinger, E.M. Temporal and spatial coordination of exocytosis and endocytosis / E.M. Gunderfinger, M.M. Kessels, B. Qualman. – 2003 – V. 4. – P. 127-139.
21. Heron, P.S. Lipid fluidity markedly modulates the binding of serotonin to mouse brain membranes / P.S. Heron, M. Shinitzky, et al // PNAS. – 1980. – V. 77. – P. 7463-7467.
22. Huag, Y-S. Enzymes for transgenic biosynthesis of long-chain polyunsatured fatty acids / Y-S. Huag, S.L. Pereira, A.F. Leonard // Biochem. – 2004. – 2004. V. 86. – P. 793-798.

23. Izumi, I. Arachidonic acid rescues hippocampal long-term potentiation blocked by group I metabotropic glutamate receptor antagonists / Y. Izumi, A.R. Zarrin, C.F. Zorumski // Neuroscience. – 2000. V. 100 (3). – P. 485-491.
24. Katsuki, H. Arahidonic acid as a neurotoxic and neurotrophic substance / H. Katsuki, S. Okuda // Prog. Neurobiol. – 1995. – V. 46. – P. 607-636.
25. Liu, L. Arahidonic acid both inhibis and enhances whole cell Ca 2+ currents in rat sympathetic neurons / L. Lui, C.F. Barrett // J. Neurophysiol. Cell Physiol. – 2001. – V. 280. – P. 1293-1305.
26. Madden, K.S. Indomethacin, prostaglandin E2 and transmission at the frog neuromolecular junction / K.S. Madden, Vander Kloot. // J. Pharmacol. Exp. Ther. – 1985 – V. 232 – P. 565-575.
27. Mead, J.F. The non-eicosanoid functions of the essential fatty acids / J.F. Mead // J. Lipid. Res. – 1984. – V. 25. – P. 1517-1521.
28. Meves, H. Modulation of ion channels by arahidonic acid / H. Meves // Prog. Neurobiol. – 1994. V. 43. P. 174-186.
29. Nishizaki, T. Arahidonic acid induced a long-lasting facilitation of hippocampal synaptic transmission / T. Nishizaki, T. Nomura // Mol. Brain Ras. – 1999 – V. 69. – P. 263-272.
30. Ong, W.L. Differential effects of polyunsatured fatty acids on membrane capacitance and exocytosis in rat pheochromocytoma 12 cells / W.L. Ong, B. Jiang, N. Tang, S.F. Ling // Neurochem. Res. – 2006. – V.31. P. 41-48.
31. Ordway, R.W. Direct regulation of ion channels by fatty acids / R.W. Ordway, J.J. Singer, J.V. Walsh // TINS. – 1991. – V. 14 (3). – P. 96-100.
32. Piomalli, D. Arahidonic acid in cell signaling // US and Canada Copyright. – 1999. – P. 200
33. Ristan, A. Fatty acids: structure and properties / A. Ristan, K. Drevon // Encyclopedia of life science Nature publishing group. – 2001. – P. 1-6.

34. Robitaille, R. Presynaptic calcium signal and transmitter release are modulated by calcium-activated potassium channels / R. Robitaile, M.P. Charlton // J. Neurosci. – 1992. – V. 12. – P. 297-305.
35. Rohrbrough, J. Lipid regulation of the synaptic vesicle cycle / J. Rohrbough, K. Broadie // Nat. Rev. Neurosci. – 2005. – V. 6. – P. 139-150.
36. Ryan, E.A. The Gradual Increase in Length and Complexity of Utterance / E.A. Ryan, Van Kirk // Sciense – 2001 – P. 114-121.
37. Springer, S. A. A primer on vesicle budding / S.A. Springer, A. Spang, R. Schekman // Cell. – 1999. – V. 97. – P. 145-148.
38. Zimmerberg, J. Synaptic membranes bend to the will of a neurotoxin / J. Zimmerberg, L.V. Chernomordik // Science. – 2005. – V. 310. – P. 1626-1627.