

УДК 612.816:577.175.822

ВЛИЯНИЕ БЛОКАТОРА ДИНАМИНЗАВИСИМОГО ЭНДОЦИТОЗА ДИНАСОРА НА ПРОЦЕССЫ СПОНТАННОЙ КВАНТОВОЙ И НЕКВАНТОВОЙ СЕКРЕЦИИ АЦЕТИЛХОЛИНА В НЕРВНО-МЫШЕЧНОМ СИНАПСЕ МЫШИ

© 2014 г. А. И. Маломуж, А. Р. Мухитов, С. Е. Проскурина, Ф. Выскочил, академик Е. Е. Никольский

Поступило 27.06.2014 г.

DOI: 10.7868/S0869565214340295

Выделение нейромедиатора – один из ключевых этапов процесса передачи информации от нейрона к иннервируемой клетке. Эксперименты, выполненные на холинергическом нервно-мышечном синапсе теплокровных, продемонстрировали наличие трех способов выделения ацетилхолина (АХ): 1. *Спонтанная квантовая секреция* – не связанное с электрической активностью нерва самопроизвольное выделение в синаптическую щель многомолекулярных порций (квантов) медиатора из синаптических везикул; 2. *Вызванное квантовое высвобождение* – относительно синхронное выделение от нескольких единиц до нескольких сотен квантов медиатора в ответ на деполяризацию нервного окончания потенциалом действия; 3. *Неквантовое высвобождение* – выделение из нервного окончания цитоплазматического АХ в виде отдельных молекул [1–3].

К настоящему моменту механизм вызванного и спонтанного квантового высвобождения АХ изучен достаточно полно [1, 3, 4]. Что касается неквантового выделения, то, несмотря на почти 40-летнюю историю открытия этой формы нейросекреции [5, 6], механизм ее остается недостаточно выясненным. Совокупность имеющихся данных дает основания полагать, что данный процесс не связан с “утечкой” молекул АХ через пресинаптическую мембрану, как это было первоначально предположено Katz и Miledi [5], а является активным процессом, реализуемым при участии молекул-переносчиков. На роль такого переносчика была предложена система “закачки”

цитоплазматического медиатора в синаптические везикулы [7]. Суть этой гипотезы состоит в том, что цитоплазматический медиатор выделяется в синаптическую щель посредством везикулярных транспортеров, первоочередной задачей которых является заполнение синтезированным в цитоплазме медиатором синаптических везикул. Будучи встроенными в пресинаптическую мембрану в ходе экзоцитоза, эти переносчики продолжают “качать” АХ, но уже не в везикулы, а в синаптическую щель. Экспериментальным обоснованием этой гипотезы явились данные о том, что блокада этой системы везамиколом (блокатор везикулярного транспорта АХ) подавляет неквантовый выход АХ [7, 8]. В случае справедливости этой гипотезы следовало ожидать наличие положительной корреляции между интенсивностью экзоцитоза везикул (увеличение в пресинаптической мембране числа встроенных транспортеров АХ) и интенсивностью неквантового освобождения. Вместе с тем многочисленные эксперименты с изменением концентрации основных потенциалобразующих ионов, ионов кальция, температуры, рН и ряда физиологически активных соединений не обнаружили наличия такой связи. Более того, нередко выявлялись антагонистические взаимоотношения между этими двумя видами секреторного процесса [2, 9–11]. Одна из причин, благодаря которой увеличение спонтанной квантовой секреции сопровождается угнетением неквантового выхода медиатора, могла состоять в том, что по мере роста интенсивности экзоцитоза растет скорость эндоцитоза везикул, приводящая в итоге к ограничению числа встроенных в пресинаптическую мембрану переносчиков АХ [4]. Проверке справедливости этой гипотезы и посвящено настоящее исследование.

Идея работы состояла в изучении интенсивности процессов спонтанного квантового и неквантового освобождения АХ после обработки нерв-

*Казанский институт биохимии и биофизики
Казанского научного центра Российской Академии наук
Казанский (Приволжский) федеральный университет
Institute of Physiology, Academy of Sciences
of the Czech Republic, Prague
Казанский государственный медицинский университет*

но-мышечного синапса ингибитором эндоцитоза динасором. Динасор является высокоспецифичным эффективным блокатором ($IC_{50} \approx 30$ мкмоль/л; полное ингибирование – при 80 мкмоль/л) [12] белка динамина – одного из ключевых белков “машины” эндоцитоза синаптических везикул. Если гипотеза о ведущей роли везамиколчувствительной транспортной системы в реализации не-квантового освобождения верна, то торможение эндоцитоза должно приводить к росту интенсивности данного процесса.

Эксперименты проводили на диафрагмальных нервно-мышечных препаратах беспородных мышей, декапитированных под эфирным наркозом. Выделенную диафрагмальную мышцу с подходящим к ней нервом фиксировали на дне экспериментальной ванночки, через которую на протяжении всего эксперимента протекал предварительно аэрированный карбогеном (95% кислорода и 5% углекислого газа) раствор Рингера–Кребса стандартного состава [11]. Эксперименты проводили при температуре $20.0 \pm 0.3^\circ\text{C}$.

Потенциалы мышечного волокна отводили с помощью стандартной микроэлектродной техники, используя стеклянные микроэлектроды с сопротивлением 6–12 МОм, заполненные раствором КС1 (2.5 моль/л).

Интенсивность спонтанной квантовой секреции определяли по средней частоте миниатюрных потенциалов концевой пластинки (МПКП). Интенсивность неквантовой секреции оценивали по величине Н-эффекта – степени гиперполяризации постсинаптической мембраны после блокирования холинорецепторов концевой пластинки d-тубокурарином в условиях необратимого ингибирования ацетилхолинэстеразы фосфорорганическим соединением армин [2, 11]. Для этого нервно-мышечный препарат предварительно инкубировали в течение 30 мин в растворе Рингера–Кребса, содержащем армин (10 мкмоль/л). Затем ингибитор отмывали, и препарат помещали в ванночку, где проводили измерения потенциала покоя 25 мышечных волокон в синаптической зоне до и после блокирования холинорецепторов d-тубокурарином (10 мкмоль/л). Затем эти значения усредняли и по их разнице определяли величину Н-эффекта.

Эффективность блокирующего действия динасора на эндоцитоз оценивали, используя флуоресцентный маркер FM 1-43, способный обратимо связываться с пресинаптической мембраной и во время эндоцитоза оказываться внутри вновь образующихся синаптических везикул, что проявляется увеличением интенсивности флуоресценции нервной терминали [13]. Для активации эндоцитоза (и соответственно “загрузки” маркера) диафрагмальный нерв в присутствии FM 1-43 (3 мкмоль/л) и d-тубокурарина (10 мкмоль/л) стимулировали согласно протоколу, предложен-

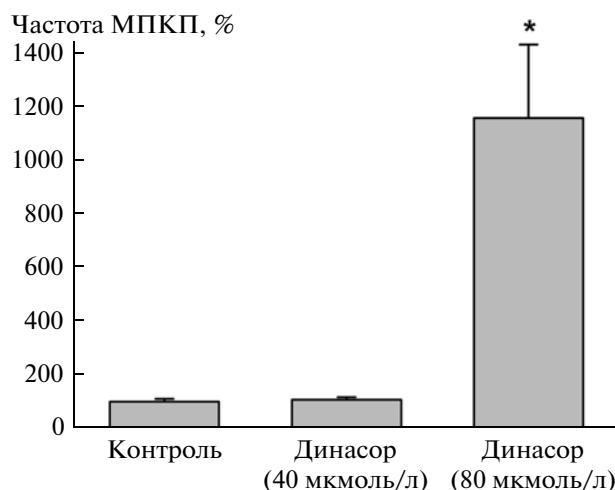


Рис. 1. Влияние динасора на процесс спонтанного квантового выделения АХ (зарегистрированного по частоте МПКП) в нервно-мышечном синапсе к мышце. Данные ($M \pm m$) представлены в процентах к контролю; * – $p < 0.001$ по сравнению с контролем.

ному Ribchester с соавт. [13]. С помощью конфокального микроскопа Leica TCS SP5 MP (Leica Microsystems CMS GmbH, Германия) регистрировали флуоресценцию одних и тех же поверхностно расположенных нервных терминалей до начала стимуляции и через 5 мин после ее окончания. Интенсивность флуоресценции нервных терминалей анализировали по средней величине свечения пикселей в области интереса за вычетом значения фонового свечения. В каждом синапсе среднюю интенсивность флуоресценции до начала стимуляции принимали за 100%. Анализ полученных изображений осуществляли с помощью программы ImageJ 1.42.

Для статистической обработки экспериментальных данных использовали *t*-критерий Стьюдента. Различие между двумя совокупностями считали достоверным, если $p < 0.05$.

Контрольное значение частоты МПКП составило 0.65 ± 0.07 имп/с ($n = 66$). Динасор (80 мкмоль/л) вызывал рост частоты МПКП более чем в 10 раз ($n = 33$, $p < 0.001$, рис. 1). Подобный эффект динасора недавно был выявлен и в нервно-мышечном синапсе лягушки [14]. В концентрации 40 мкмоль/л динасор не изменял частоту МПКП ($n = 33$, $p > 0.05$, рис. 1). Поскольку известно, что динасор в концентрации 80 мкмоль/л полностью блокирует эндоцитоз [12], то в нашем случае необходимо было оценить эффективность влияния этого блокатора динамина в концентрации 40 мкмоль/л.

В экспериментах с FM 1-43 было установлено, что через 5 мин по завершении протокола “загрузки” среднее значение интенсивности флуоресценции концевых пластинок увеличивалось на $236 \pm 23\%$ ($n = 15$, $p < 0.05$, рис. 2). В препаратах, об-

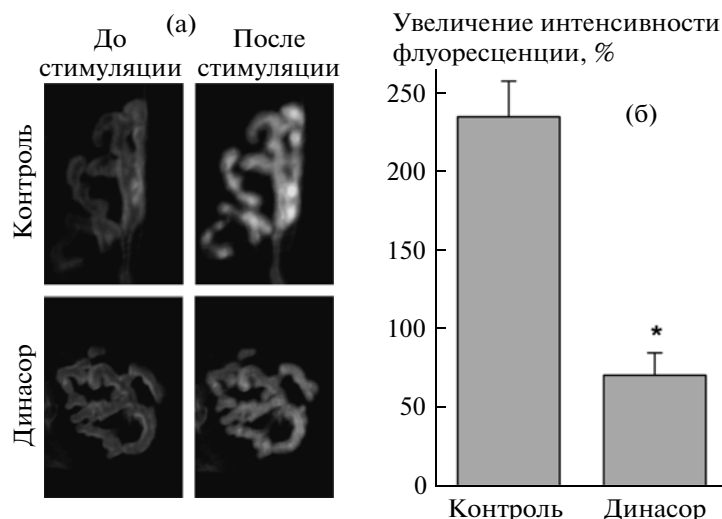


Рис. 2. Флуоресценция (FM 1-43) двигательных нервных окончаний мышцы в контроле и в присутствии динасора до и через 5 мин после проведения протокола электрической стимуляции диафрагмального нерва. (а) — флуоресцентные изображения нервных терминалей до и после стимуляции в контроле и в присутствии динасора. (б) — графическое представление повышения средней интенсивности флуоресценции нервных терминалей после проведения протокола загрузки (в % от величины интенсивности до загрузки, принятой за 100%) в контроле и в присутствии динасора; здесь и на рис. 3 * — $p < 0.05$ по сравнению с контролем.

работанных блокатором динамина (40 мкмоль/л), интенсивность флуоресценции увеличивалась значительно меньше (лишь на $71 \pm 14\%$, $n = 17$, $p < 0.05$, рис. 2). Таким образом, и в концентрации 40 мкмоль/л динасор проявлял себя как эффективный ингибитор эндоцитоза.

Получение этих данных позволило подойти к изучению основного вопроса настоящего исследования: выявлению взаимосвязи между процессами некантового выделения АХ и процессами экзо- и эндоцитоза.

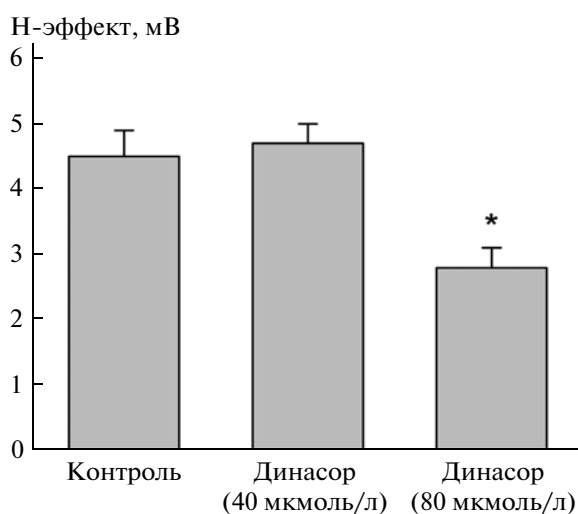


Рис. 3. Величина Н-эффекта (мВ) в контроле и через 20 мин после действия динасора в концентрации 40 и 80 мкмоль/л ($M \pm m$).

Контрольная величина Н-эффекта, характеризующая интенсивность некантового выделения АХ, составляла 4.5 ± 0.4 мВ ($n = 80$, рис. 3). Динасор в концентрации 40 мкмоль/л не изменял величины Н-эффекта (4.7 ± 0.3 мВ, $n = 100$, $p > 0.05$, рис. 3). Применение блокатора динамина в более высокой концентрации (80 мкмоль/л), при которой зарегистрировано значительное повышение частоты МПКП, приводило к снижению Н-эффекта до 2.8 ± 0.3 мВ ($n = 100$, $p < 0.05$, рис. 3).

Из полученных данных особый интерес представляют результаты экспериментов с использованием динасора в концентрации 40 мкмоль/л, при которой нарушается эндоцитоз, но не изменяется экзоцитоз. Эти результаты свидетельствуют о том, что при увеличении количества везикулярных транспортеров и их времени нахождения в пресинаптической мембране интенсивность некантовой секреции АХ не увеличивается.

К сожалению, ценность экспериментов с использованием динасора в высокой концентрации для решения поставленной задачи существенно снижается, поскольку при этом значительно увеличивается интенсивность спонтанной квантовой секреции в результате увеличения внутриаксональной концентрации кальция [14], которое, как показано нами ранее [9], само по себе может приводить к угнетению некантовой секреции АХ.

Таким образом, полученные данные не подтверждают справедливость гипотезы о том, что везикулярные транспортеры АХ играют ключевую роль в реализации механизма некантового выделения медиатора.

Работа выполнена за счет средств субсидии, выданной Казанскому федеральному университету в целях повышения его конкурентоспособности, поддержана грантами РФФИ (14-04-01788, 13-04-01595) и Президента РФ (НШ-5584.2014.4).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Schwarz T.L.* // *Int. Rev. Neurobiol.* 2006. V. 75. P. 105–144.
2. *Vyskocil F., Malomouzh A.I., Nikolsky E.E.* // *Physiol. Res.* 2009. V. 58. P. 763–784.
3. *Jahn R., Fasshauer D.* // *Nature.* 2012. V. 490. P. 201–207.
4. *Gundelfinger E.D., Kessels M.M., Qualmann B.* // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2003. V. 4. P. 127–139.
5. *Katz B., Miledi R.* // *Proc. Roy. Soc. London. B. Biol. Sci.* 1977. V. 196. P. 59–72.
6. *Vyskocil F., Illes P.* // *Pflugers Arch.* 1977. V. 370. P. 295–297.
7. *Edwards C., Dolezal V., Tucek S., et al.* // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 1985. V. 82. P. 3514–3518.
8. *Petrov A.M., Naumenko N.V., Uzinskaya K.V., et al.* // *Neuroscience.* 2011. V. 186. P. 1–12.
9. *Vyskocil F., Nikolsky E., Edwards C.* // *Neuroscience.* 1983. V. 9. P. 429–435.
10. *Маломуж А.И., Никольский Е.Е.* // *ДАН.* 2010. Т. 430. № 2. С. 277–280.
11. *Malomouzh A.I., Nikolsky E.E., Vyskocil F.* // *Neurosci. Res.* 2011. V. 71. P. 219–225.
12. *Newton A.J., Kirchhausen T., Murthy V.N.* // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 2006. V. 103. P. 17955–17960.
13. *Ribchester R.R., Mao F., Betz W.J.* // *Proc. Biol. Sci.* 1994. V. 255. P. 61–66.
14. *Douthitt H.L., Luo F., McCann S.D., Meriney S.D.* // *Neuroscience.* 2011. V. 172. P. 187–195.