

АХЭ, заякоренная на плазматической мембране может быть ко-локализована с комплексом НМДА рецепторы/NO-синтаза и, поэтому, более эффективно ингибироваться оксидом азота, чем АХЭ на базальной мембране.

В данном исследовании мы попытались ответить на вопрос, специфично ли действует глутамат-опосредованное ингибирование на конкретную молекулярную форму АХЭ или происходит ингибирование обеих молекулярных форм этого фермента? Для этого мы использовали мышей мутантных линий, у которых отсутствует АХЭ, заякоренная либо PRiMA, либо CoIQ.

Среднее значение амплитуды МПКП у мышей «дикого типа» составило $0,65 \pm 0,03$ мВ, а постоянной спада – $2,15 \pm 0,09$ мс ($n = 25$). Добавление глутамата в концентрации 100 мкмоль/л и глицина (700 мкмоль/л) [11,7], ко-агониста НМДА-рецепторов, приводило к возрастанию амплитуды МПКП на 40% по сравнению с контролем ($n = 20$). При этом амплитуда составила в среднем $0,92 \pm 0,06$ мВ. Значение постоянной времени спада составляло $2,17 \pm 0,05$ мс, что не отличалось достоверно от контрольных значений. Эффект глутамата появлялся через 30-40 минут инкубации в растворе (данные не показаны) и становился наиболее выраженным к 60 минуте инкубации.

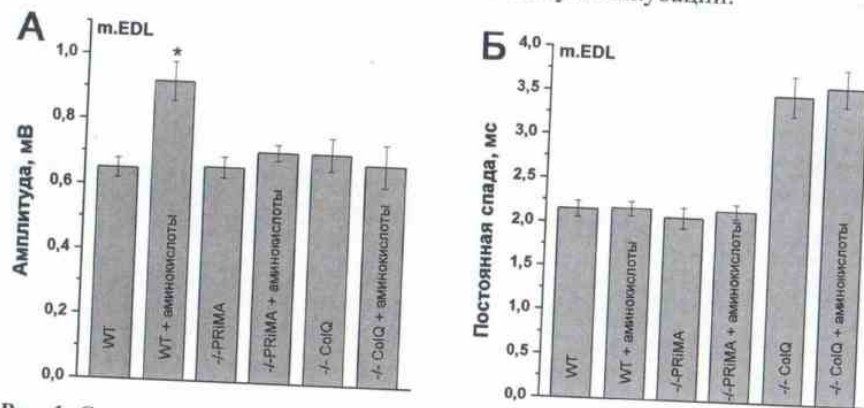


Рис. 1. Средние значения амплитуды (А) и постоянной времени спада (Б) МПКП, зарегистрированных в *m.EDL* в контроле и после аппликации аминокислот (глутамата и глицина) у мышей «дикого типа» (WT) и нокаутных по гену «якорных» субъединиц ацетилхолинэстеразы (PRiMA и CoIQ). $n = 15-20$ концевых пластинок.

Значение амплитуды МПКП в синапсах нокаутных по PRiMA-субъединице мышей составляло $0,66 \pm 0,03$ мВ, постоянной времени спада $2,08 \pm 0,12$ мс, что достоверно не отличалось от контрольных величин мышей дикого типа ($n = 20$). Однако, при добавлении глутамата у мутантных мышей увеличения амплитуды не

наблюдалось. Средняя амплитуда МПКП у мышей (-/-) PRiMA составила $0,71 \pm 0,03$ мВ ($n = 20$), что достоверно не отличалось от значений амплитуд МПКП у мутантных мышей в отсутствии аминокислот. Влияния аминокислот на постоянную времени спада также не наблюдалось. Постоянная спада в синапсах мышей (-/-) PRiMA после аппликации глутамата и глицина составила $2,15 \pm 0,08$ мс, что не отличается достоверно от контрольных значений.

Средняя амплитуда МПКП у мутантных мышей (-/-) CoIQ составила $0,71 \pm 0,05$ мВ ($n = 15$). Средняя постоянная спада составила $3,58 \pm 0,23$ мс. После аппликации аминокислот амплитуда и постоянная спада МПКП, как и в случае мышей (-/-) PRiMA достоверно не изменялись, среднее значения составило $0,68 \pm 0,07$ мВ и $3,61 \pm 0,21$ мс, соответственно.

Таким образом, можно сделать вывод о том, что после «удаления» посредством нокаута гена «якорной» субъединицы любой из двух молекулярных форм АХЭ, аппликация глутамата и глицина уже не вызывает достоверного увеличения амплитуды МПКП. Поскольку не наблюдалась ситуации в которой отсутствие одной из молекулярных форм АХЭ полностью устраняет эффект аминокислот на амплитуду МПКП, а отсутствие другой молекулярной формы не влияет на эффект аминокислот, то можно предположить, что эндогенный оксид азота не воздействует избирательно на конкретную молекулярную форму АХЭ.

Необходимо подчеркнуть, что полученные данные не противоречат самой идее существования эндогенных ингибиторов АХЭ, а увеличение амплитуды МПКП у мышей «дикого типа» подтверждает эту идею. Данная идея представляется важной с фундаментальной точки зрения, поскольку обычно в качестве механизмов обеспечения синаптической пластичности рассматривают только механизмы, связанные с изменением количества квантов выделяемого медиатора и механизмы, связанные с повышением (потенциацией) либо снижением (десенситизацией) чувствительности постсинаптических рецепторов к медиатору. Фактически ингибирование синаптической АХЭ эндогенными ингибиторами можно рассматривать как новый способ модуляции синаптической передачи за счет изменения временных параметров действия кванта ацетилхолина.

Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ: № 14-04-01788, № 13-00-40286-К.

ЛИТЕРАТУРА

- Кривой И.И., Кулешов В.И., Матюшин Д.Л. Нервно-мышечный синапс и антихолинэстеразные ве-ва. Л.: изд-во ЛГУ им. А.А. Жданова. 1987. 238 с.
- Udayabanu M., Kumaran D., Nair R.U. et al. // Brain Res. 2008. V. 1230. P. 138-49.

3. Jeffrey L., Cummings M.D. // Am. J. Psychiatry. 2000. V. 157. P. 4-15.
4. Mays T.A., Sanford J.L., Hanada T. // Muscle Nerve. 2009. V. 39. P. 343-9.
5. Bernard V., Girard E., Hrabovska A. et al. // Mol. Cell. Neurosci. 2011. V. 46. № 1. P. 272-81.
6. Malomouzh A.I., Nurullin L.F., Arkhipova S.S., Nikolsky E.E. // Muscle Nerve. 2011. V. 44. P. 987-9.
7. Petrov K.A., Malomouzh A.I., Kovyazina I.V. // Eur. J. Neurosci. 2013. V. 37. P. 181-9.
8. Perrier A.L., Massoulié J., Krejci E. // Neuron. 2002. V. 33. № 2. P. 275-85.
9. Massoulié J., Bon S., Perrier N., Falasca C. // Chem. Biol. Interact. 2005. V. 157-8. P. 3-14.
10. Massoulié J., Bon S. // J. Mol. Neurosci. 2006. V. 30. № 1-2. P. 233-6.
11. Malomouzh A.I., Mukhtarov M.R., Nikolsky E.E. et al. // J. Neurochem. 2003. V. 85. P. 206-13.

РОЛЬ ОКСИДА АЗОТА В МОДУЛЯЦИИ ФУНКЦИИ ИОНОТРОПНЫХ И МЕТАБОТРОПНЫХ ГЛУТАМАТНЫХ РЕЦЕПТОРОВ В ВЕСТИБУЛЯРНОМ ЭПИТЕЛИИ ЛЯГУШКИ: СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АСПЕКТ

Рыжова И.В., Ноздрачев А.Д., Тобиас Т.В., Орлов И.В.

Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, СПб, РФ

Вестибулярная система, состоящая из центрального и периферического отделов, отвечает за ориентацию организма в пространстве и контролирует равновесие и позу. Саккулос, утрикулос и полукружные каналы снабжены механочувствительным вестибулярным эпителием, преобразующим адекватные механические импульсы в электрическую активность афферентных волокон. Детальное изучение механизмов синаптической передачи в вестибулярном эпителии диктуется необходимостью исследования природы вестибулярных расстройств, и, в частности, нарушений синаптической передачи в вестибулярном эпителии.

Волосковые клетки саккулоса, утрикулоса и полукружных каналов являются вторично-чувствующими рецепторами, контактирующими с афферентными волокнами посредством глутаматергического синапса. Многочисленные данные литературы свидетельствуют о том, что функция аминокислотного синапса в вестибулярном эпителии может существенно изменяться под воздействием физиологически активных веществ, выделяющихся в процессе функционирования эфферентной системы [1-3], приносимых с

кровью [4] или синтезирующихся внутри самого вестибулярного эпителия в процессе функционирования. Одним из модуляторов синаптической передачи является оксид азота (NO) – газообразный медиатор-модулятор, быстро распространяющийся в водной и липидной среде по градиенту концентрации и легко проникающий через мембраны клеток. Роли NO в ЦНС посвящена обширная литература, представленная в многочисленных обзорах, при том, что влияние NO на функционирование вестибулярного эпителия исследовано недостаточно. Между тем доказано, что NO образуется в вестибулярном эпителии при активации эфферентной системы [5] и в волосковых клетках при воздействии глутамата [6,7]. В электрофизиологических экспериментах на вестибулярном аппарате земноводных показано, что доноры NO увеличивают уровень фоновой активности афферентных волокон и амплитуду ответа на адекватное раздражение, а ингибиторы NO-синтазы подавляют уровень фоновой активности афферентных волокон и уменьшают ответ на адекватную механическую стимуляцию [8,9].

В настоящее время принято считать, что наиболее вероятным медиатором в афферентном синапсе вестибулярного аппарата является глутамат. Функционирование аминокислотного синапса осуществляется посредством активации ионотропных (ИГР) и метаботропных глутаматных рецепторов (МГР), имеющих разную аффинность к глутамату, различное строение и активационный механизм. Исходя из того, что NO, синтезируясь в волосковых клетках, в эфферентных и афферентных волокнах, может диффундировать в синаптическую щель и воздействовать и на ИГР и на МГР, представлялось перспективным провести сравнительное изучение влияния NO на метаботропные и ионотропные глутаматные рецепторы.

Методика. Опыты проводились на изолированном вестибулярном аппарате лягушки в условиях перфузии синаптической области растворами глутамата, агонистов ИГР и МГР, донора NO SNAP и ингибитора NO-синтазы L-NAME. О влиянии NO на функцию глутаматергического синапса судили по изменению уровня фоновой активности афферентных волокон, иннервирующих задний полукружный канал, и по изменению амплитуды ответов агонистов и антагонистов ИГР и МГР в отсутствии и в присутствии NO. Отведение суммарной активности афферентных волокон проводилось при помощи засасывающего электрода. Импульсная активность регистрировалась на экране осциллографа, параллельно подавалась на формирователь прямоугольных импульсов и на протяжении всего эксперимента регистрировалась при помощи оригинальной программы на компьютере. Влияние NO на функцию ИГР и МГР оценивали как изменение отношения максимальной амплитуды ответа на аппликацию агониста к

ЛИТЕРАТУРА

1. Catterall W.A. // *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 2000. № 16. P. 521-55.
2. Catterall W.A. // *Cold Spring Harb Perspect. Biol.* 2011. № 3: a003947.
3. Frings S. // *Adv. Second Messenger Phosphoprotein Res.* 1997. № 31. P. 75-82.
4. Kennedy M.B., Manzerra P. // *PNAS USA.* 2001. № 98. P. 12323-4.
5. Keramidis A., Moorhouse A.J., Schofield P.R., Barry P.H. // *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 2004. № 86. P. 161-204.
6. Lester H.A., Dibas M.I., Dahan D.S. et al. // *Trends Neurosci.* 2004. № 27. P. 329-36.
7. Ramsey I.S., Delling M., Clapham D.E. // *Annu. Rev. Physiol.* 2006. № 68. P. 619-47.
8. Pitman R.M. // *J. Exp. Biol.* 1984. № 112. P. 199-224.
9. Nurullin L.F., Mukhitov A.R., Tsentsevitsky A.N. et al. // *Physiol Res.* 2011. № 60. P. 815-23.
10. Seagar M., Takahashi M. // *J. Bioenerg. Biomembr.* 1998. № 30. P. 347-56.
11. Long A.A., Kim E., Leung H.T. et al. // *J. Neurosci.* 2008. № 28. P. 3668-82.
12. McGurk J.S., Shim S., Kim J.Y. et al. // *J. Neurosci.* 2011. № 31. P. 14754-62.
13. Takamori M. // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2012. № 1274. P. 14-23.

ИССЛЕДОВАНИЕ СПЕЦИФИЧНОСТИ ИНГИБИРОВАНИЯ, ОПОСРЕДОВАННОГО ГЛУТАМАТОМ И ГЛИЦИНОМ, ДЛЯ РАЗЛИЧНЫХ МОЛЕКУЛЯРНЫХ ФОРМ АЦЕТИЛХОЛИНЭСТЕРАЗЫ В НЕРВНО-МЫШЕЧНЫХ СИНАПСАХ МЛЕКОПИТАЮЩИХ

Проскурина С.Е.^{1,2}, Петров К.А.^{1,2,3}, Харламова А.Д.^{2,3},
Креши Э.⁴, Никольский Е.Е.^{1,2,3,5}

¹Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, РФ

²Казанский институт биохимии и биофизики КазНЦ РАН, Казань, РФ

³Институт органической и физической химии им. А.Е. Арбузова
КазНЦ РАН, Казань, РФ

⁴Университет Декарта (Université Paris Descartes), Париж, Франция

⁵Казанский государственный медицинский университет, Казань, РФ

Синаптическая передача контролируется большим числом различных ферментов и факторов. Одним из ключевых участников этого процесса является ацетилхолинэстераза (АХЭ) – фермент, который расщепляет медиатор ацетилхолин в синаптической щели, тем самым препятствуя его повторному связыванию с постсинаптическим рецептором и обеспечивая нормальное функционирование синапса. Однако, при патологических состояниях, когда фактор надежности синаптической передачи снижен (при деменциях, сопровождающих болезнь Альцгеймера, Паркинсона, черепно-мозговых травмах,

сосудисто-мозговых патологиях, а также миастении Гравис и т.д.), частичное ингибирование активности данного фермента увеличивает амплитуду и длительность синаптических ответов [1], тем самым, увеличивая эффективность передачи сигнала. В связи с этим, ингибиторы АХЭ традиционно применяются в медицинской практике [2], однако широкому использованию этих препаратов препятствует один недостаток – это полное отсутствие избирательности по отношению к ферменту разных органов и тканей. Следовательно, воздействие антиАХЭ агентов сопровождается большим количеством побочных эффектов, возникающих в органах, не требующих коррекции.

Раскрытие механизмов, обуславливающих тканеспецифичность воздействия биологически активных веществ, в связи с этим, представляется весьма актуальной задачей. Однако, для более эффективной коррекции работы того или иного фермента извне, экзогенным способом, необходимо понять каким образом активность этого фермента регулируется самим организмом, эндогенно. До недавнего времени механизмы подобной эндогенной регуляции АХЭ были малоизучены.

Все известные способы регуляции активности АХЭ это длительные процессы, включающие изменение синтеза, секреции и заякоривания этого фермента, но мы предполагаем наличие и более быстрых путей, например, посредством эндогенных ингибиторов. Недавно были получены данные о том, оксида азота (NO) способен ингибировать активность АХЭ *in vitro* [3]. Взяв этот факт за точку отсчета, мы выдвинули гипотезу о возможности регуляции активности синаптической АХЭ этим газообразным мессенджером. Учитывая полученные ранее данные о том, что активация НМДА-рецепторов приводит к увеличению синтеза NO в нервно-мышечном синапсе [4-6], мы предположили наличие NO-опосредованного механизма ингибирования АХЭ, который запускается агонистом этих рецепторов, глутаматом. Действительно, как нами было показано, в области нервно-мышечного контакта существует популяция НМДА рецепторов, активация которых способна усиливать продукцию NO, а тот, в свою очередь, способен ингибировать активность синаптической АХЭ и увеличивать, тем самым, амплитуду синаптических ответов [7]. АХЭ в нервно-мышечных синапсах представлена двумя молекулярными формами. Отличаются они местом заякоривания фермента – на плазматической мембране через PRiMA-субъединицу (*Proline-Rich Membrane Anchor*) [8], либо на базальной мембране при помощи нитей белка ColQ (коллагена Q) [9,10].

Различия в расположении АХЭ (плазматическая vs базальная мембраны) могут быть функционально значимыми с точки зрения эндогенной регуляции её активности, поскольку молекулярная форма