

Рис. 4. А – Гистограммы амплитудного распределения МПКП в контроле и под действием 0,1 мкМ рианодина. Б – Изменение амплитуды МПКП по сравнению с контролем (1) при действии: 0,1 мкМ рианодина (2); рианодина на фоне 0,5 мкМ rCGRP₈₋₃₇ (3). * – $p < 0,05$ по сравнению с контролем.

амплитуды МПКП за счет увеличения размера кванта АХ. Тем самым CGRP пополнил весьма ограниченный на сегодня список известных эффективных регуляторов размера кванта АХ и усилителей холинергической передачи в моторных синапсах млекопитающих [8,9]. Нам также впервые удалось показать, что не только экзогенный, но и эндогенный CGRP, высвобождаясь из моторных нервных терминалей при выбросе депонированного кальция, способен вызывать аналогичные потенцирующие передачу пресинаптические эффекты в виде увеличения амплитуды МПКП, за счет увеличения размера кванта АХ в моторных синапсах мышцы. Эти данные существенно дополняют имеющиеся представления об ауторегуляторных возможностях моторных синапсов по поддержанию эффективной синаптической передачи.

Работа поддержана грантом РФФИ № 13-04-00413а.

ЛИТЕРАТУРА

1. Russell F.A., King R., Smillie S.J. et al. // *Physiol. Rev.* 2014. V. 94. № 4. P. 1099-142.
2. Csillik B., Tajti L., Kovács T. // *J. Histochem. Cytochem.* 1993. V. 41. № 10. P. 1547-55.
3. Buffelli M., Pasino E., Cangiano A. // *Neuroscience.* 2001. V. 104. P. 561-7.
4. Rossi S.G., Dickerson I.M., Rotundo R.L. // *J. Biol. Chem.* 2003. V. 278. № 27. P. 24994-25000.
5. Gaydukov A.E., Tarasova E.O., Balezina O.P. // *Neurochem. J.* 2013. V. 7. P. 29-33.
6. Correia-de-Sá P., Ribeiro J.A. // *Br. J. Pharmacol.* 1994. V. 111. № 2. P. 582-8.
7. Skiteva O.I., Lapteva V.I., Balezina O.P. // *Bull. Exp. Biol. Med.* 2012. V. 152. № 4. P. 392-6.
8. Van der Kloot W. // *Prog. Neurobiol.* 2003. V. 71. № 4. P. 269-303.
9. Fong S.W., McLennan I.S., McIntyre A. et al. // *PNAS USA.* 2010. V. 107. № 30. P. 13515-9.

СПОНТАННОЕ ВЫДЕЛЕНИЕ АЦЕТИЛХОЛИНА В НЕРВНО-МЫШЕЧНОМ СИНАПСЕ МЫШИ В ПРИСУТСТВИИ ИНГИБИТОРА ДИНАМИНА ДИНАСОРА

Маломуж А.И.^{1,2}, Проскурина С.Е.², Мухитов А.Р.¹, Никольский Е.Е.^{1,2}

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Казанский институт биохимии и биофизики Казанского научного центра РАН, Казань, РФ

²Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Казанский (Приволжский) федеральный университет», Казань, РФ

Введение. К настоящему моменту выявлено два принципиально разных способа выделения медиатора из окончаний нейронов: квантовое и неквантовое. Под квантом медиатора понимают относительно стабильную порцию сигнальных молекул, содержащихся в синаптической везикуле, и способных одновременно выделиться при экзоцитозе в экстраклеточное пространство самопроизвольно (спонтанная квантовая секреция) или при деполяризации нервного окончания потенциалом действия (вызванная квантовая секреция). Благодаря многочисленным работам, проведенным на препаратах нервно-мышечного синапса, где роль медиатора играет ацетилхолин (АХ), процессы квантовой нейросекреции изучены достаточно подробно [1-4], чего нельзя сказать о неквантовом выделении [5,6]. Несмотря на то, что процесс неквантовой секреции АХ из двигательного нервного окончания электрофизиологически впервые был зарегистрирован еще в 1977 г. [7,8], тем не менее, до настоящего времени все еще нет однозначного ответа на вопрос: каким же белком опосредуется данный вид выделения медиатора? Доказано, что этот процесс не является пассивной утечкой, регулируется различными синаптически активными молекулами [5] и блокируется повышением концентрации Mg^{2+} [9], ингибитором системы захвата холина высокого сродства (гемихолинем-3) [10], а также блокатором везикулярного транспорта АХ (везамиколом) [11,12]. Именно факт подавления неквантовой секреции АХ везамиколом и позволил сформулировать гипотезу о том, что цитоплазматический медиатор может выкачиваться в синаптическую щель с помощью везикулярных транспортеров, которые в ходе экзоцитоза оказываются встроенными в пресинаптическую мембрану. Следовательно, должна наблюдаться определенная корреляция в процессах квантовой и неквантовой секреции АХ и интенсивность последней должна повышаться при блокаде эндоцитоза, поскольку при этом время нахождения и количество везикулярных транспортеров в пресинаптической мембране увеличивается.

Проверка данного предположения и легла в основу настоящего исследования, целью которого стало изучение процессов спонтанного квантового и неквантового выделения АХ из двигательных нервных окончаний в условиях блокады эндоцитоза.

Материалы и методы. Эксперименты проводили с помощью методов электрофизиологии и флуоресцентной микроскопии на нервно-мышечном препарате диафрагмы лабораторных мышей, декапитированных под эфирным наркозом. В качестве блокатора эндоцитоза использовали проникающий через мембрану высокоселективный ингибитор белка динамина динасор. Это соединение полностью блокирует эндоцитоз синаптических везикул в культуре нейронов гиппокампа в концентрации 80 мкМ ($IC_{50} \approx 30$ мкМ) [13].

Интенсивность спонтанной квантовой секреции АХ оценивали по средней частоте миниатюрных потенциалов концевой пластинки (МПКП).

Интенсивность неквантовой секреции АХ оценивали по величине Н-эффекта – степени гиперполяризации постсинаптической мембраны после блокирования холинорецепторов концевой пластинки d-тубокурарином в условиях необратимого ингибирования ацетилхолинэстеразы [5]. Величина Н-эффекта зависит не только от интенсивности неквантовой секреции АХ, но и от чувствительности к нему постсинаптической мембраны.

Изменения в чувствительности постсинаптических рецепторов к АХ оценивали по амплитудно-временным параметрам МПКП: времени нарастания сигнала (от 20 до 80% амплитуды), амплитуде и постоянной времени спада сигнала.

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 [14,15]. Для активации эндоцитоза диафрагмальный нерв в присутствии FM 1-43 (3 мкМ) стимулировали согласно протоколу, предложенному Ribchester с соав. [14]. 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 минут 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.

Результаты и их обсуждение. Контрольное значение частоты МПКП, отражающее интенсивность спонтанной квантовой секреции АХ, составляло $0,65 \pm 0,07$ имп/с. В присутствии 80 мкМ динасора частота МПКП увеличивалась более, чем в 10 раз (рис. 1). При использовании блокатора динамина в низкой концентрации (в нашем случае 40 мкМ) подобного потенцирующего эффекта на спонтанный экзоцитоз синаптических везикул не наблюдалось.

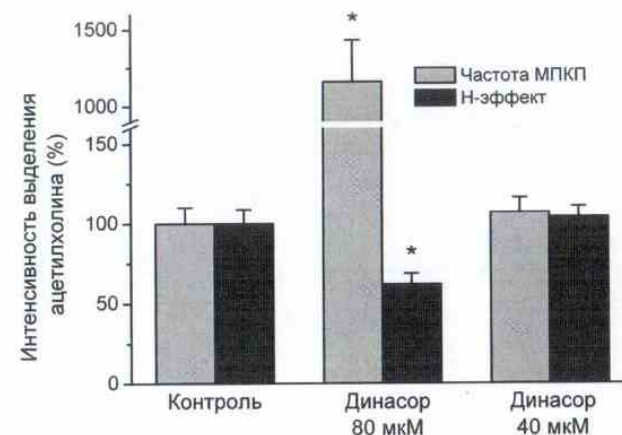


Рис. 1. Влияние динасора на интенсивность спонтанной квантовой секреции (оцениваемой по частоте МПКП) и неквантовой секреции АХ (оцениваемой по величине Н-эффекта) в концентрации 80 мкМ и отсутствие какого-либо действия этого соединения при использовании низкой концентрации (40 мкМ). * – $p < 0,05$.

Контрольная величина Н-эффекта, отражающая интенсивность неквантового выделения АХ, составляла $4,5 \pm 0,4$ мВ. В растворе с добавлением 80 мкМ динасора Н-эффект снижался до $2,8 \pm 0,3$ мВ (на 38%; рис. 1), тогда как в присутствии 40 мкМ блокатора динамина регистрируемый параметр не отличался от значения, полученного в контроле. Снижение величины Н-эффекта могло быть вызвано изменением чувствительности постсинаптической мембраны к АХ. Однако, как показали эксперименты, все регистрируемые нами амплитудно-временные параметры МПКП оставались без изменений как в присутствии 40 мкМ динасора, так и при добавлении 80 мкМ блокатора динамина (табл. 1). Следовательно, уменьшение Н-эффекта при аппликации высокой концентрации динасора действительно можно трактовать как снижение интенсивности неквантового выделения АХ.

Таким образом, можно заключить, что динасор, в концентрации, полностью блокирующей эндоцитоз в нейронах гиппокампа [13], способен оказывать потенцирующий эффект на спонтанную квантовую

секрецию АХ и угнетающий эффект на интенсивность его неквантового выделения из двигательных нервных окончаний. Однако, в концентрации 40 мкМ (близкой к той, при которой в культивируемых нейронах эндоцитоз блокируется наполовину) никакого эффекта блокатора динамина на процессы спонтанной секреции медиатора обнаружено не было. В связи с этим, далее необходимо было проверить: остается ли блокирующее эндоцитоз действие у динасора в концентрации 40 мкМ в мотонейронах, и если да, то насколько оно выражено?

Таблица 1. Неизменность амплитудно-временных параметров МПКП в контроле и через 20 минут действия динасора в концентрациях 40 и 80 мкМ, зарегистрированные в нервно-мышечном препарате диафрагмы мыши (n = 33).

	Амплитуда МПКП (мВ)	Время нарастания МПКП (мс)	Постоянная времени спада МПКП (мс)
Контроль	0,92 ± 0,04	0,39 ± 0,02	1,61 ± 0,07
Динасор (40 мкМ)	0,86 ± 0,02	0,35 ± 0,01	1,47 ± 0,05
Контроль	0,85 ± 0,03	0,37 ± 0,01	1,71 ± 0,05
Динасор (80 мкМ)	0,85 ± 0,03	0,39 ± 0,01	1,61 ± 0,04

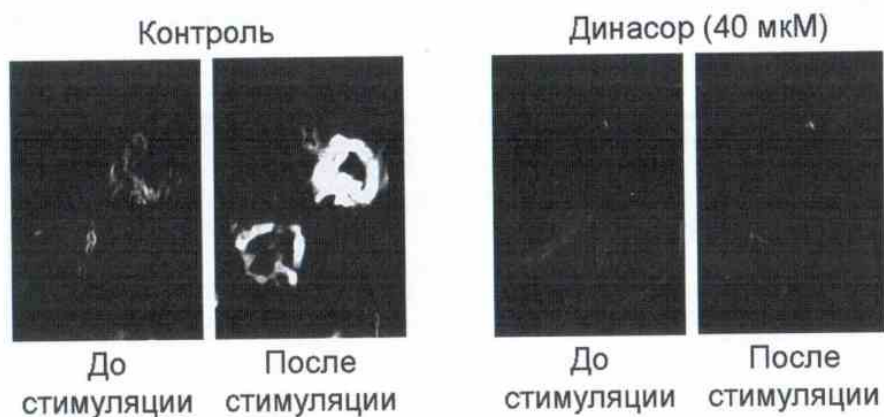


Рис. 2. Флуоресцентные изображения двух рядом расположенных двигательных нервных окончаний до и после стимуляции в контроле и в присутствии 40 мкМ динасора.

Для получения ответа на поставленный вопрос нами были проведены эксперименты со стимуляцией нерва в присутствии флуоресцентного маркера FM 1-43, широко используемого агента для изучения процессов эндо- и экзоцитоза [15]. В контрольных экспериментах через 5 минут по окончании протокола стимуляции среднее значение интенсивности флуоресценции концевых пластинок

увеличивалось на $236 \pm 23\%$ по отношению к значению, зарегистрированному до стимуляции. Однако, если нервно-мышечный препарат предварительно инкубировали с 40 мкМ динасора, то флуоресценция повышалась лишь на $71 \pm 14\%$ (рис. 2). Следовательно, нервные окончания хоть и загружались красителем, однако это было в 3 раза менее интенсивно, чем в контроле, что позволяет сделать вывод о значительном ингибирующем эндоцитоз действия динасора.

Подытоживая полученные результаты можно сделать следующие выводы: (i) динасор не влияет на чувствительность постсинаптической мембраны к АХ; (ii) помимо блокирующего действия на эндоцитоз, динасор обладает потенцирующим действием на спонтанную квантовую секрецию АХ; (iii) при частичной блокаде эндоцитоза динасором интенсивность как спонтанной квантовой, так и неквантовой секреции АХ остается без изменений, что предполагает независимость механизмов действия динасора на процесс эндоцитоза и процессы выделения нейромедиатора; (iv) механизм неквантового выделения АХ не связан напрямую с процессом его везикулярного освобождения и более того, интенсивность неквантовой секреции находится в некоторой степени антагонизма с интенсивностью процесса квантового выделения АХ.

Работа поддержана грантами РФФИ (№ 14-04-01788) и Президента РФ (НШ-5584.2014.4).

ЛИТЕРАТУРА

- Schwarz T.L. // *Int. Rev. Neurobiol.* 2006. № 75. P. 105-44.
- Nishimune H. // *Mol. Neurobiol.* 2012. № 1. P. 1-16.
- Gundelfinger E.D., Kessels M.M., Qualmann B. // *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 2003. № 2. P. 127-39.
- Jahn R., Fasshauer D. // *Nature.* 2012. № 7419. P. 201-7.
- Vyskocil F., Malomouzh A.I., Nikolsky E.E. // *Physiol Res.* 2009. № 6. P. 763-84.
- Маломуж А.И., Никольский Е.Е. // *Усп. физиол. наук.* 2010. № 2. С. 27-43.
- Katz B., Miledi R. // *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 1977. № 1122. P. 59-72.
- Vyskocil F., Illés P. // *Pflugers Arch.* 1977. № 3. P. 295-7.
- Маломуж А.И., Никольский Е.Е. // *ДАН.* 2010. № 2. С. 277-80.
- Nikolsky E.E., Voronin V.A., Oranska T.I., Vyskocil F. // *Pflugers Arch.* 1991. № 1-2. P. 74-8.
- Edwards C., Dolezal V., Tucek S. et al. // *PNAS USA.* 1985. № 10. P. 3514-8.
- Petrov A.M., Naumenko N.V., Uzinskaya K.V. et al. // *Neuroscience.* 2011. № 186. P. 1-12.
- Newton A.J., Kirchhausen T., Murthy V.N. // *PNAS USA.* 2006. № 47. P. 17955-60.
- Ribchester R.R., Mao F., Betz W.J. // *Proc. Biol. Sci.* 1994. № 1342. P. 61-6.
- Cochilla A.J., Angleson J.K., Betz W.J. // *Annu. Rev. Neurosci.* 1999. V. 22. P. 1-10.