

УДК 612.816.7

ВЛИЯНИЕ СЕРОВОДОРОДА НА ПРОЦЕССЫ ЭКЗО- И ЭНДОЦИТОЗА СИНАПТИЧЕСКИХ ВЕЗИКУЛ В ДВИГАТЕЛЬНОМ НЕРВНОМ ОКОНЧАНИИ МЫШИ

© 2012 г. О. Б. Митрухина, А. В. Яковлев, Г. Ф. Ситдикова*

Казанский (Приволжский) федеральный университет, 420008, Казань, ул. Кремлевская, 18;

*электронная почта: Guzel.Sitdikova@ksu.ru

Поступила в редакцию 24.06.2011 г.

С помощью электрофизиологического и флуоресцентного метода исследовали влияние донора сероводорода (H_2S) – гидросульфида натрия ($NaHS$) на процессы экзо- и эндоцитоза синаптических везикул в двигательном нервном окончании в диафрагмальной мышце мыши. Показано, что $NaHS$ вызывает увеличение частоты миниатюрных потенциалов концевой пластинки без изменения их амплитудно-временных параметров и амплитуды постсинаптических ответов в условиях одиночной стимуляции (0.3 Гц), что свидетельствует об усилении процессов экзоцитоза синаптических везикул. В условиях высокочастотной стимуляции (50 Гц) на фоне действия $NaHS$ наблюдалась более существенное снижение секреции медиатора, что может быть связано с замедлением процессов мобилизации синаптических везикул из рециклирующего пула к зонам экзоцитоза. Также $NaHS$ приводил к снижению захвата эндоцитозного флуоресцентного маркера FM 1-43, что указывает на замедление процессов эндоцитоза синаптических везикул. Таким образом, донор H_2S усиливает экзоцитоз и замедляет процессы эндоцитоза и мобилизации синаптических везикул в двигательном нервном окончании мыши.

Ключевые слова: сероводород, двигательное нервное окончание, освобождение медиатора, экзо- и эндоцитоз.

Сероводород (H_2S) относится к новому классу посредников, которые наряду с монооксидом углерода и оксидом азота образуют группу газомедиаторов [1–4]. Эндогенно H_2S образуется из *L*-цистеина, ферментами цистатионин- γ -лиазой, цистатионин- β -синтазой и меркаптосульфотрансферазой, которые специфично экспрессируются в различных тканях [2, 3]. В гиппокампе H_2S облегчает индукцию долговременной потенциации в ответ на слабую тетаническую стимуляцию [5], а в периферической нервной системе усиливает освобождение медиатора из двигательных нервных окончаний лягушки и мыши [6, 7]. Мишенями H_2S в различных тканях служат АТР-зависимые и кальций-активируемые калиевые каналы, потенциал-активируемые кальциевые каналы *L*- и *T*-типа [8, 9], аденилатциклазная система [10, 11].

В синаптических структурах ключевыми этапами секреции нейромедиатора являются экзо- и эндоцитоз синаптических везикул [12, 13]. Процессы от экзоцитоза везикулы до приобретения ею повторной способности к экзоцитозу получили название рециклирования, а постоянный кругооборот везикул в нервном окончании называется везикулярным циклом [13]. Данные о влиянии H_2S на процессы рециклирования синаптических

везикул в условиях высокочастотной активности синапса отсутствуют. Целью настоящей работы было исследование влияния донора H_2S – $NaHS$ на динамику секреции медиатора и процессы экзо- и эндоцитоза синаптических везикул в двигательном нервном окончании мыши при длительной высокочастотной стимуляции, выполненное с использованием электрофизиологических и оптических (флуоресцентных) методов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперименты проводили на изолированных нервно-мышечных препаратах диафрагмальной мышцы мыши. Нервно-мышечный препарат выделяли и помещали в ванночку, заполненную стандартным раствором Кребса следующего состава (мМ): $NaCl$ – 137; KCl – 5; $CaCl_2$ – 2.2; $MgCl_2$ – 1; $NaHCO_3$ – 11; NaH_2PO_4 – 1; глюкоза – 11. Перед экспериментом раствор насыщали карбогеном (95% O_2 , 5% CO_2). (20°C, pH 7.2–7.4). Для блокирования сокращений и потенциалов действия мышечных волокон использовали d-тубукурарин в концентрации 2–5 мкМ. В экспериментах использовали гидросульфид натрия ($NaHS$) – донор H_2S , в концентрации 200 мкМ

(Sigma, США), который в водных растворах образует H_2S [5].

Для внутриклеточной регистрации спонтанных и вызванных потенциалов концевой пластинки (ПКП) использовали стеклянные микроэлектроды, заполненные раствором KCl (2.5 M). Для усиления сигналов применяли усилитель с коэффициентом усиления 400 и полосой пропускания фильтра 0–10 кГц, а регистрацию производили с помощью автоматизированной системы, состоящей из АЦП L-CARD 1250 и компьютера Pentium 4. Двигательный нерв раздражали прямоугольными импульсами сверхпороговой амплитуды с частотой 0.3 Гц (одиночная стимуляция) и 50 Гц (высокочастотная стимуляция). Для анализа эффектов NaHS на ПКП или миниатюрные ПКП (МПКП) регистрировали сигналы в контроле (в течение 10–15 мин), затем в перфузируемый раствор апплицировали вещество в течение 20 мин, после чего отмывали стандартным раствором Кребса. В случае высокочастотной стимуляции NaHS присутствовал в растворе в течение 10–15 мин до начала раздражения.

В экспериментах использовали флуоресцентный краситель FM 1-43 (Biotium, США) в концентрации 2 мкМ. Краситель обратимо связывается с пресинаптической мембраной и во время эндоцитоза оказывается внутри вновь образующихся синаптических везикул (“загружается”). При загрузке красителя появляется свечение нервного окончания, отражающее скопления везикул, захвативших краситель [13, 14]. Для исследования процессов эндоцитоза использовали два протокола. В первом FM 1-43 присутствовал в растворе в течение 1 мин во время стимуляции двигательного нерва с частотой 50 Гц, а также в течение 7 мин после ее окончания (полная загрузка); второй протокол подразумевал присутствие красителя в окружающем растворе только в процессе раздражения нерва с частотой 50 Гц в течение 1 мин (загрузка во время стимуляции). После загрузки красителем препарат отмывали в течение 40–60 мин раствором Кребса и затем регистрировали свечение нервных окончаний. Для изучения эффектов H_2S на процессы эндоцитоза синаптических везикул нервно-мышечный препарат инкубировали в присутствии донора NaHS в течение 10 мин до начала протоколов стимуляции.

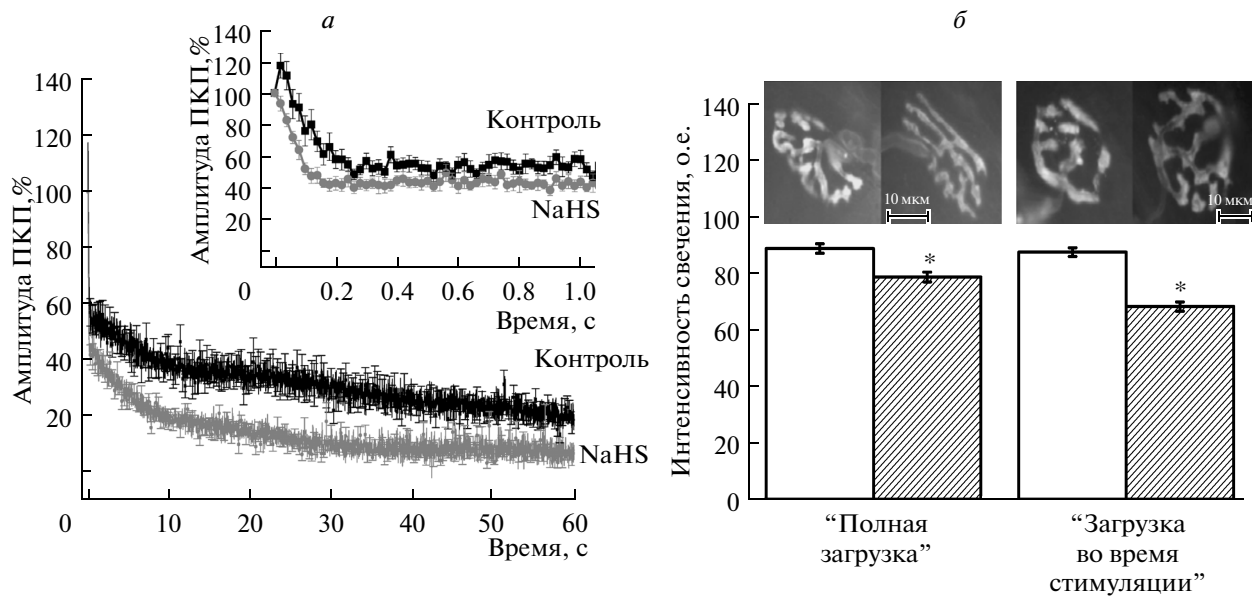
Свечение нервных окончаний наблюдали с помощью микроскопов МИКМЕД-2 (ЛОМО, Санкт-Петербург) или AxioScope A1 (Carl Zeiss, Германия) через водноиммерсионные объективы LUMPLFL 60×/0.9-NA (Olympus, США) и/или Plan-Neofluar 63×/0.9 (Carl Zeiss, Германия). Все наблюдения проводили только на поверхностно лежащих нервных окончаниях. Для регистрации картин флуоресценции использовали быстродействующие черно-белые видеокамеры AxioCam

MRm (Carl Zeiss, Германия). Среднюю интенсивность свечения оценивали в относительных единицах (о.е.) на участке нервного окончания длиной 10–20 мкм, принимая максимальное свечение пикселя, равное 256, за 1. Далее определяли значение фонового свечения как среднюю интенсивность свечения в квадрате 50×50 пикселей в участке изображения без нервного окончания. Фоновое значение впоследствии вычитали из каждого пикселя, полученного после усреднения изображения. Все данные обработаны методами вариационной статистики. Количественные результаты представлены в виде – среднее значение \pm стандартное отклонение, n – число независимых опытов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Аппликация NaHS (200 мкМ) приводила к повышению амплитуды ПКП до $146 \pm 7\%$ ($n = 7$; $p < 0.05$) в условиях одиночной стимуляции и увеличению частоты МПКП до $200 \pm 42\%$ ($n = 4$; $p < 0.05$) к 6–10 мин аппликации. При этом амплитудно-временные параметры МПКП не изменялись. Амплитуда МПКП составила 0.48 ± 0.09 мВ ($n = 4$) в контроле и 0.44 ± 0.09 мВ ($n = 4$, $p > 0.05$) при аппликации NaHS. Время нарастания изменялось незначительно: 0.69 ± 0.04 мс ($n = 4$) в контроле и 0.81 ± 0.08 мс ($n = 4$, $p > 0.05$) при действии донора H_2S ; время спада составило 2.57 ± 0.11 мс и 2.34 ± 0.13 мс ($n = 4$, $p > 0.05$) соответственно. Полученные данные согласуются с результатами исследований, проведенных ранее на нервно-мышечном синапсе мыши, и свидетельствуют о том, что NaHS действует на пресинаптическом уровне, вызывая усиление освобождения ацетилхолина из нервного окончания [7].

Для исследования динамики секреции медиатора в условиях высокочастотного раздражения использовали стимуляцию с частотой 50 Гц в течение 1 мин. В контроле высокочастотное раздражение двигательного нерва диафрагмальной мышцы сопровождалось характерными изменениями амплитуды ПКП. Первоначальное резкое снижение амплитуды ПКП развивалось в течение первых 10–15 импульсов, которое к концу 1 с стимуляции достигало $48 \pm 3\%$ ($n = 10$, $p < 0.05$) относительно первого сигнала (рисунок а, вкладка). Затем наблюдался период плато на уровне $32 \pm 5\%$ ($n = 10$, $p < 0.05$) в течение 25 с стимуляции, после чего амплитуда ПКП медленно снижалась и к концу стимуляции составила $19 \pm 3\%$ ($n = 10$, $p < 0.05$) (рисунок а). В условиях предварительной аппликации NaHS в концентрации 200 мкМ к 1 с стимуляции амплитуда ПКП составила $43 \pm 6\%$ ($n = 9$, $p > 0.05$), что не отличалось от контрольных значений (рисунок а, вкладка). Однако затем наблюдали более выраженное снижение ПКП и к 25 с амплитуда ПКП составила $16 \pm 2\%$ ($n = 9$, $p < 0.05$),



Влияние NaHS на процессы экзо- и эндоцитоза синаптических везикул в двигательном нервном окончании. *a* – Изменение амплитуды ПКП в условиях высокочастотного раздражения (50 Гц, 1 мин) в контроле (черный цвет) и при действии NaHS (200 мкМ) (серый цвет). На вкладке представлена динамика амплитуды ПКП в первую секунду стимуляции. *б* – Интенсивность свечения нервных окончаний в контроле (белые столбики) и при действии NaHS (200 мкМ) (заштрихованные столбики) при загрузке нервного окончания красителем FM 1-43 по двум протоколам – “полная загрузка” и “загрузка во время стимуляции” (см. Материалы и методы). Над столбиками показаны примеры черно-белых изображений загруженных красителем нервных окончаний. * $p < 0.05$

а к 60 с высокочастотной стимуляции – $10 \pm 2\%$ ($n = 9, p < 0.05$) по отношению к контролю (рисунок *a*).

Согласно опубликованным данным в двигательном нервном окончании мышцы работают три везикулярных пула, различающихся по величине, локализации и физиологической роли: немедленно готовый к освобождению; мобилизационный и резервный [14, 15]. Пул везикул, готовых к освобождению, быстро расходуется в процессе высокочастотного раздражения и пополняется из мобилизационного пула. По всей видимости, оба этих пула восполняются преимущественно за счет быстрого рециклирования и обеспечивают процессы экзоцитоза во время высокочастотного раздражения. Везикулы резервного пула, по-видимому, вообще не принимают участие в секреции медиатора [14]. Первоначальный быстрый спад амплитуды ПКП при высокочастотном раздражении связан с расходом и уменьшением пула везикул, готовых к освобождению. Затем происходит стабилизация амплитуды ПКП, которая отражает процесс восполнения пула, готового к освобождению, когда скорости его расходования и пополнения равны, что может обеспечиваться передвижением везикул из мобилизационного пула в область активной зоны, интенсивными процессами рециклирования и повторного использования синаптических везикул. Вторичный, более медленный, спад амплитуды ПКП от-

ражает дальнейшее уменьшение пула готового к освобождению при недостаточности его восполнения [14]. Усиление снижения амплитуд ПКП при действии H_2S может быть связано как с усилением процессов экзоцитоза, так и с замедлением процессов мобилизации синаптических везикул к сайтам освобождения.

Кроме того, не исключена возможность замедления процессов эндоцитоза и рециклирования при действии NaHS. Это подтверждают и эксперименты с загрузкой эндоцитозного маркера в нервное окончание во время высокочастотной стимуляции [16]. Средняя интенсивность свечения нервного окончания во время полной загрузки красителя (см. Материалы и методы) после 10-минутной инкубации в растворе с NaHS (200 мкМ) составила 78 ± 2 о.е. ($n = 3, p < 0.05$), что на 11% ниже, чем в контроле (89 ± 2 о.е., $n = 4$) (рисунок *б*). При загрузке во время стимуляции, отображающей только эндоцитоз, который проходил параллельно с вызванным экзоцитозом, интенсивность свечения нервных окончаний при действии H_2S составила 67 ± 1 о.е. ($n = 3; p < 0.05$), что также ниже контрольных значений (87 ± 2 о.е., $n = 3$) (рисунок *б*). Таким образом, предварительное выдерживание нервно-мышечного препарата в растворе с NaHS приводило к достоверному снижению интенсивности свечения нервного окончания как при полной загрузке нервного окончания флуоресцентным маркером, так и при

загрузке только во время стимуляции, что свидетельствует о замедлении процессов эндоцитоза синаптических везикул при действии газа.

Каковы возможные механизмы действия H_2S ? Усиление освобождения медиатора в ответ на одиночные раздражения при действии H_2S может быть связано с увеличением внутриклеточной концентрации ионов кальция. В астроцитах и нейрональных клетках H_2S увеличивал внутриклеточную концентрацию кальция за счет усиления Ca -входа через потенциал-зависимые Ca -каналы L- и T-типа или освобождения Ca из внутриклеточных депо [8, 17]. Кроме того, усиление секреции медиатора может быть связано с повышением внутриклеточной концентрации cAMP [10], что ведет к активации протеинкиназы A и усилению секреции медиатора, вследствие фосфорилирования белков экзо- и эндоцитоза, субъединиц потенциал-зависимых Ca -каналов, K-каналов, риадиноновых рецепторов [18]. Повышение уровня кальция или фосфорилирование белков при действии H_2S также может лежать в основе изменения процессов мобилизации и/или эндоцитоза синаптических везикул [19–21]. Кроме того, H_2S может непосредственно вмешиваться в механизмы экзо- и эндоцитоза синаптических везикул посредством трансформации белков SNARE-комплекса, о чем свидетельствует увеличение частоты МПКП. Известно, что в водных растворах H_2S обладает свойствами восстановителя, он способен восстанавливать дисульфидные связи и модифицировать тиоловые группы в белковых молекулах [3]. Так, например, белки комплекса SNARE, осуществляющего слияние мембран везикулы и нервного окончания, чувствительный к N-этилмалеимиду фактор, осуществляющий разборку комплекса SNARE и участвующий в эндоцитозе, обогащены остатками цистеина и являются потенциальными сайтами для такой модификации [22, 23].

В области нервно-мышечного синапса диафрагмальной мышцы выявлена экспрессия ферментов синтеза H_2S . При этом субстрат синтеза H_2S , L-цистеин, усиливал освобождение медиатора, тогда как блокирование фермента синтеза H_2S приводило к эффектам, противоположным эффекту NaHS, что предполагает возможность эндогенного синтеза газа [7]. Известно, что синтез H_2S регулируется как на уровне экспрессии цистатионин- γ -лиазы и цистатионин- β -синтазы в тканях, так и путем изменения их активности [24, 25]. Так, например, в гладкомышечных клетках оксид азота может регулировать уровень H_2S путем увеличения активности цистатионин- γ -лиазы через нитрозилирование остатков цистеина в молекуле белка [25]. Кроме того, показана Ca -кальмодулин зависимая регуляция ферментов синтеза H_2S , что может происходить при высокочастотной стимуляции и накоплении

кальция в нервном окончании или мышечных волокнах [24].

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что экзогенный, а возможно, и эндогенный H_2S увеличивает освобождение медиатора при одиночной стимуляции и вызывает усиление депрессии ПКП во время высокочастотной активности. В основе эффекта H_2S лежит угнетение процессов транспорта и эндоцитоза синаптических везикул, что в результате приводит к замедлению процессов рециклирования.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (№ 4670.2012.4) и программы поддержки Ведущих научных школ (№ НШ-4670.2012.4.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ситдикова Г.Ф., Зефирова А.Л. 2006. Газообразные посредники в нервной системе. *Росс. физиол. журн. им. И.М. Сеченова*. **92** (7), 872–882.
2. Ситдикова Г.Ф., Зефирова А.Л. 2010. Сероводород: от канализации Парижа к сигнальной молекуле. *Природа*. **9**, 29–37.
3. Gadalla M.M., Snyder S.H. 2010. Hydrogen sulfide as a gasotransmitter. *J. Neurochem.* **113**, 14–26.
4. Hermann A., Sitdikova G.F., Weiger T. 2010. Gase als zelluläre Signalstoffe. Gasotransmitter. *Biol. Unserer Zeit*. **40** (3), 185–193.
5. Abe K., Kimura H. 1996. The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous neuromodulator. *J. Neurosci.* **16**, 1066–1071.
6. Герасимова Е.В., Ситдикова Г.Ф., Зефирова А.Л. 2008. Сероводород как эндогенный модулятор освобождения медиатора в нервно-мышечном синапсе лягушки. *Нейрохимия*. **25** (1–2), 138–145.
7. Герасимова Е.В., Вологин С.Г., Мухачева Ю.А., Ситдикова Г.Ф. 2010. Влияние сероводорода на освобождение медиатора и выявление экспрессии цистатионин-гамма-лиазы в диафрагмальной мышце мыши. *Ученые записки КГУ*. **152** (2), 41–50.
8. Nagai, Y., Tsugane M., Oka J., Kimura H. 2004. Hydrogen sulfide induces calcium waves in astrocytes. *FASEB J.* **18**, 557–559.
9. Sitdikova G.F., Weiger T.M., Hermann A. 2010. Hydrogen sulfide increases calcium-activated potassium (BK) channel activity of rat pituitary tumor cells. *Pflügers Arch – Eur. J. Physiol.* **459**, 389–397.
10. Kimura H. 2000. Hydrogen sulfide induces cyclic AMP and modulates the NMDA receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **267**, 129–133.
11. Ситдикова Г.Ф., Герасимова Е.В., Хаертдинов Н.Н., Зефирова А.Л. 2009. Роль циклических нуклеотидов в эффектах сероводорода на освобождение медиатора в нервно-мышечном синапсе лягушки. *Нейрохимия*. **26** (4), 1–7.
12. Sudhof T.C. 2004. The synaptic vesicle cycle. *Annu. Rev. Neurosci.* **27**, 509–547.
13. Зефирова А.Л., Петров А.М. 2010. *Синаптическая везикула и механизм освобождения медиатора (экзо-*

- эндоцитозный везикулярный цикл). Казань: Арт-кафе. 324с.
14. Зефилов А.Л., Захаров А.М., Мухаметзянов Р.Д., Петров А.М. 2008. Везикулярный цикл в двигательных нервных окончаниях диафрагмы мыши. *Журн. эволюционной физиол. и биохимии им. И.М. Сеченова*. **44** (6), 603–612.
 15. Rizzoli S.O., Betz W.J. 2005. Synaptic vesicle pools. *Neurosci*. **6**, 57–69.
 16. Betz W.J., Bewick G.S. 1992. Optical analysis of synaptic vesicle recycling at the frog neuromuscular junction. *Science*. **255**, 200–203.
 17. Garcia-Bereguian M.A., Samhan-Arias A.K., Martin-Romero F.J., Gutierrez-Merino C. 2008. Hydrogen sulfide raises cytosolic calcium in neurons through activation of L-type Ca^{2+} channels. *Antiox. Redox Signal*. **10**, 31–41.
 18. Seino S., Shibasaki T. 2005. PKA-dependent and PKA-independent pathways for cAMP-regulated exocytosis. *Physiol. Rev*. **85**, 1303–1342.
 19. Зефилов А.Л., Абдрахманов М.М., Григорьев П.Н., Петров А.М. 2006. Внутриклеточный кальций и механизмы эндоцитоза синаптических везикул в двигательном нервном окончании лягушки. *Цитология*. **48** (1), 3441.
 20. Петров А.М., Гиниатуллин А.Р., Зефилов А.Л. 2008. Роль сигнального каскада цАМФ в кругообороте синаптических везикул двигательного нервного окончания. *Нейрохимия*. **25** (3), 202–210.
 21. Petrov A.M., Giniatullin A.R., Sitdikova G.F., Zefirov A.L. 2008. The role of cGMP-dependent signaling pathway in synaptic vesicle cycle at the frog motor nerve terminals. *J. Neurosci*. **28** (49), 13216–13222.
 22. Duman J.G., Forte J.G. 2003. What is the role of SNARE proteins in membrane fusion? *Am. J. Physiol. Cell Physiol*. **285**, C237–C249.
 23. LoPachin R.M., Barber D.S. 2006. Synaptic cysteine sulfhydryl groups as targets of electrophilic neurotoxins. *Toxicol. Sci*. **94** (2), 240–255.
 24. Eto K., Ogasawara M., Umemura K., Nagai Y., Kimura H. 2002. Hydrogen sulfide is produced in response to neuronal excitation. *J. Neurosci*. **22**, 3386–3391.
 25. Fiorucci S., Distrutti E., Cirino G., Wallace J.L. 2006. The emerging roles of hydrogen sulfide in the gastrointestinal tract and liver. *Gastroenterology*. **131**, 259–271.

Effects of Hydrogen Sulfide on the Processes of Exo- And Endocytosis of Synaptic Vesicles in Mouse Motor Nerve Endings

O. B. Mitrukina, A. V. Yakovlev, G. F. Sitdikova*

Kazan (Privolzhie) Federal University, 420008 Kazan, Kremlevskaya str., 18.

e-mail: Guzel.Sitdikova@ksu.ru

The effects of sodium hydrosulfide (NaHS), the donor of hydrogen sulfide (H_2S), on the exo-endocytosis cycle of the synaptic vesicles in the motor nerve ending of mouse diaphragm were explored using intracellular microelectrode technique and fluorescent microscopy. NaHS increased the frequency of miniature end-plate potentials (MEPPs) without changing its amplitude-time parameters and the amplitude of the postsynaptic responses under single stimulus condition (0.3 Hz), giving evidence on enhancing synaptic vesicle exocytosis. During high-frequency stimulation (50 Hz) NaHS induced more significant decline of neurotransmitter secretion, which can be due to the lower rate of synaptic vesicle mobilization from the recycling pool to the exocytic sites. NaHS also decreased the uptake of the fluorescent endocytic dye FM 1-43, which indicates the reduced endocytosis of the synaptic vesicles. Thus, the donor of H_2S increased exocytosis and decreased the processes of the synaptic vesicles' endocytosis and mobilization in the mouse motor nerve ending.