

УДК 612.816:577.175.822; 591.145.3; 577.25

УГНЕТЕНИЕ ВЫЗВАННОЙ СЕКРЕЦИИ АЦЕТИЛХОЛИНА В НЕРВНО-МЫШЕЧНОМ СИНАПСЕ ЛЯГУШКИ ФОСФОЛИПАЗАМИ A2 ИЗ ЯДА СТЕПНОЙ ГАДЮКИ *VIPERA URSINII RENARDI*

© 2018 г. И. В. Ковязина^{1,2*}, Н. В. Копылова³, Ю. Н. Уткин⁴, Э. А. Бухараева^{1,2},
Е. Е. Никольский^{1,2,5}, Е. А. Вульфийус⁶

¹Казанский институт биохимии и биофизики Казанского научного центра РАН,
420111, Казань, ул. Лобачевского, 2/31

²Казанский (Приволжский) федеральный университет, 420008, Казань, ул. Кремлевская, 18

³Московский педагогический государственный университет, 119991, Москва, ул. Малая Пироговская, 1

⁴Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

⁵Казанский государственный медицинский университет, 420012, Казань, ул. Бутлерова, 49

⁶Институт биофизики клетки РАН, 142290, Московская обл., Пущино, ул. Институтская, 3

*e-mail: irina.kovuzina@list.ru

Поступила в редакцию 28.03.2017

Принята к печати 07.05.2017

Изучено влияние фосфолипазы A2 вуртоксина и ее гомолога, лишённого ферментативной активности (Vur-S49), выделенных из яда степной гадюки *Vipera ursinii renardi*, на параметры спонтанных и вызванных токов концевой пластинки (ТКП) в нервно-мышечном соединении лягушки *Rana ridibunda*. Показано, что и вуртоксин, и Vur-S49 уменьшали квантовый состав ТКП. При этом амплитудно-временные параметры спонтанных (одноквантовых) сигналов не изменялись, что указывает на отсутствие взаимодействия данных белков с никотиновыми холинорецепторами (нХР) постсинаптической мембраны. Наличие угнетающего эффекта у Vur-S49 свидетельствует в пользу того, что снижение квантового состава ТКП в присутствии этих белков обусловлено не только фосфолиполитической активностью, которую может проявлять вуртоксин. На основании полученных ранее данных мы предположили взаимодействие вуртоксина и Vur-S49 с пресинаптическими нХР типа $\alpha 7$. Избирательный антагонист $\alpha 7$ никотиновых рецепторов метилликаконитин (MLA) также снижал квантовый состав ТКП. Угнетающее действие MLA на квантовый состав ТКП свидетельствует об участии пресинаптических холинорецепторов типа $\alpha 7$ в регуляции вызванной квантовой секреции в нервно-мышечном синапсе лягушки. Однако в присутствии MLA влияние вуртоксина и Vur-S49 на квантовый состав ТКП сохранялось. Полученные данные позволяют предположить, что пресинаптическое действие исследованных белков направлено не на $\alpha 7$ нХР, а реализуется через другие пресинаптические мишени.

Ключевые слова: нервно-мышечный синапс, никотиновый холинорецептор, ток концевой пластинки, фосфолипаза, яды змей

DOI: 10.7868/S0233475518010085

ВВЕДЕНИЕ

Основной механизм нейротоксического действия полипептидов, выделенных из яда змей, обусловлен либо блокадой постсинаптических никотиновых холинорецепторов (нХР), либо угнетением освобождения ацетилхолина (АХ) из пресинаптических нервных окончаний. Постсинаптическим эффектом обладают α -нейротоксины из яда змей семейств Elapidae и Hydrophiidae [1–3], а также некоторые полипептиды, полученные

из яда змей семейства Viperidae [4–6]. К нейротоксинам пресинаптического действия относятся фосфолипазы A2 (ФЛА2) [7], которыми особенно богаты яды гадюковых змей [8]. Множество данных указывает на то, что эффекты ФЛА2 обусловлены гидролизом фосфолипидов пресинаптической мембраны, приводящим к нарушению ее структуры и проницаемости, подавлению освобождения АХ и обратного захвата АХ и холина [9–11]. Однако есть основания считать, что действие ФЛА2 не ограничивается ферментативной

активностью [10, 12]. Так, установлено, что некоторые ФЛА2, выделенные из яда змей, способны блокировать $\alpha 7$ -подобные нХР в нейронах прудовика *Lymnaea stagnalis* в условиях бескальциевой среды, исключающих возможность ферментативного фосфолиполиза, и конкурировать с меченым α -бунгаротоксином за связывание с нХР электрического органа *Torpedo californica*, а также $\alpha 7$ нХР человека, экспрессированными в клетках линии GH4C1 [13].

В настоящей работе мы оценивали влияние ФЛА2 вуртоксина и ее гомолога Vur-S49, выделенных из яда *Vipera ursinii renardi*, на амплитудно-временные параметры токов концевой пластинки (ТКП) в нервно-мышечном синапсе лягушки и сравнивали эти эффекты с действием высокоселективного блокатора нХР типа $\alpha 7$ метилликаконитина (MLA). Принципиальным различием исследуемых белков является то, что вуртоксин представляет собой высокоактивную Ca^{2+} -зависимую ФЛА2 [13], а Vur-S49 не обладает ферментативной активностью в результате того, что остаток аспартата в положении 49 в его активном центре заменен на серин [14].

Оба белка вызывали снижение квантового состава ТКП, но не влияли на амплитуду миниатюрных ТКП (мТКП), что указывает на пресинаптическую мишень их действия. Наличие пресинаптического эффекта у Vur-S49 свидетельствует в пользу того, что фосфолипазная активность не является причиной снижения квантового состава ТКП в присутствии этого белка. В присутствии MLA эффекты вуртоксина и Vur-S49 сохранялись. Таким образом, действие исследованных белков на квантовый состав ТКП не связано с их взаимодействием с нХР типа $\alpha 7$, а направлено на другую/другие пресинаптические мишени.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперименты проводили на изолированных нервно-мышечных препаратах (*m. sartorius*) лягушек *Rana ridibunda*. Изолированную мышцу с фрагментом нерва помещали в экспериментальную камеру объемом 3 мл, через которую протекал раствор Рингера следующего состава (мМ): NaCl, 113.0; KCl, 2.5; HEPES, 5; NaHCO_3 , 1.5; CaCl_2 , 1.8. pH 7.3–7.4. Двигательный нерв стимулировали прямоугольными импульсами супрамаксимальной величины и длительностью 100 мкс с частотой 0.5 и 100 имп/с. Мышечные сокращения при стимуляции нерва блокировали методом поперечного рассечения мышечных волокон.

В одной из серий экспериментов для снижения фосфолипазной активности вуртоксина

использовали раствор Рингера со сниженной до 0.9 мМ концентрацией CaCl_2 .

ТКП регистрировали с использованием стандартного метода двухэлектродной фиксации мембранного потенциала мышечного волокна [15]. Мембранный потенциал мышечного волокна в области синапса фиксировали на уровне -60 мВ. Регистрирующий комплекс включал в себя микроэлектродный усилитель AxoClamp 900A (Axon Instruments), импульсный стимулятор (A-M Systems, модель 2100), осциллограф Instek GOS620, быстродействующий аналого-цифровой преобразователь L-1250 (L-Card, Россия) и компьютерную станцию с оригинальным программным обеспечением, что позволяло с высокой точностью измерять синаптические сигналы (частота дискретизации 10–20 мкс) и анализировать их амплитудно-временные параметры.

В каждом мышечном волокне регистрировали 100–200 вызванных ТКП и мТКП. Оценивали амплитуду, время нарастания от 20 до 80% амплитуды и постоянную времени спада τ (время, необходимое для снижения амплитуды ТКП в e раз) ТКП и мТКП. Величину квантового состава ТКП оценивали как отношение усредненных амплитуд вызванных многоквантовых ТКП и мТКП.

При анализе параметров ТКП, зарегистрированных в режиме высокочастотных пачек (100 имп/с в течение 1 с), характеристики последовательных ТКП в пачке выражали в процентах по отношению к первому ТКП, а затем усредняли (20–30 пачек).

Вуртоксин и Vur-S49 получали из яда *V. ursinii renardi* с помощью метода гель-фильтрации и последующей обращенно-фазовой хроматографии. Способы выделения, очистки и проверки соответствия полученных фракций указанным белкам по аминокислотной последовательности описаны ранее [13]. Растворы MLA (10 нМ), вуртоксина и Vur-S49 (3 мкМ) подавали в систему циркулирующего протока через экспериментальную камеру.

При статистической обработке результатов использовали парный критерий Стьюдента. Для сравнения непараметрических данных использовали критерий Манна–Уитни. Различия считали статистически значимыми при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Влияние вуртоксина и Vur-S49 на вызванные и спонтанные ТКП. В экспериментах при частоте стимуляции двигательного нерва 0.5 имп/с регистрировали спонтанные и вызванные постсинаптические ответы. В таблице приведены амплитудно-временные характеристики ТКП и мТКП,

зарегистрированных при этой частоте стимуляции двигательного нерва. Как видно из таблицы, вуртоксин и Vur-S49 в концентрации 3 мкМ вызывали снижение амплитуды ТКП, при этом время роста и τ времени спада ТКП достоверно не менялись. Ни вуртоксин, ни Vur-S49 не оказывали влияния на амплитудно-временные параметры мТКП (рис. 1, таблица). Этот факт указывает на отсутствие действия вуртоксина и Vur-S49 в использованных концентрациях на постсинаптические нХР мышечного волокна лягушки в отличие от выраженного эффекта на нХР мышечного типа *Torpedo*, обнаруженного ранее [13]. Неизменность величины мТКП свидетельствует в пользу того, что снижение амплитуды ТКП обусловлено снижением их квантового состава. Под действием вуртоксина квантовый состав снижался на $25 \pm 7.2\%$, а в присутствии Vur-S49 – на $14.2 \pm 3.1\%$ ($p < 0.05$, парный тест Стьюдента, $n = 9$ и 5 соответственно; рис. 2).

В экспериментах с пониженной до 0.9 мМ концентрацией Ca^{2+} в наружном растворе вуртоксин

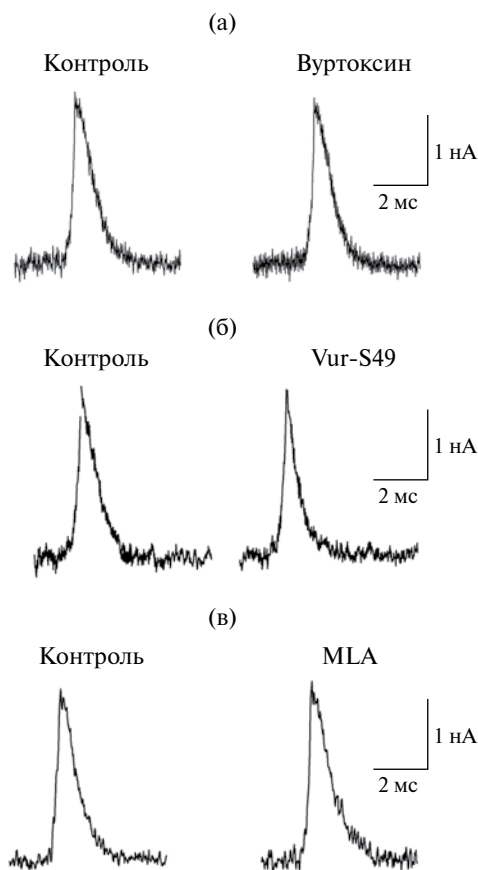


Рис. 1. Миниатюрные токи концевой пластинки в присутствии вуртоксина (а), Vur-S49 (б) и MLA (в). Представлены усредненные сигналы ($n = 70-100$), зарегистрированные в одних и тех же концевых пластинках в контроле и после аппликации исследуемых веществ.

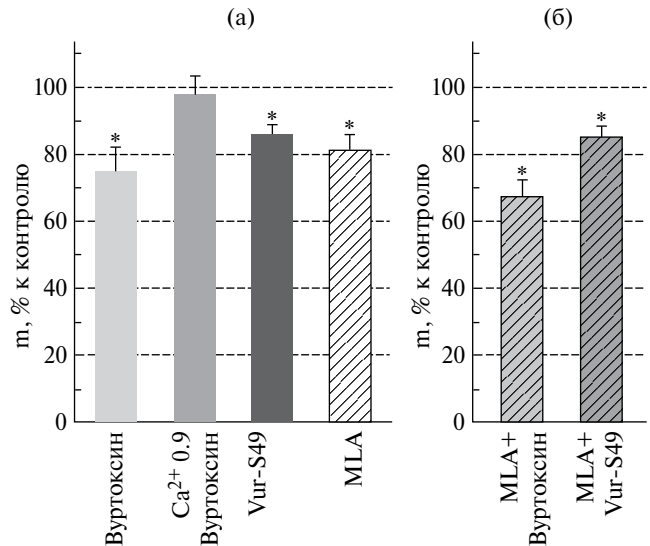


Рис. 2. Относительное изменение квантового состава ТКП при стимуляции нерва с частотой 0.5 имп/с в присутствии MLA, вуртоксина (при нормальной и сниженной до 0.9 мМ концентрации Ca^{2+} в растворе) и Vur-S49 (а). За 100% принята величина квантового состава ТКП в контроле в каждой экспериментальной серии. В сериях с вуртоксином и Vur-S49 в присутствии MLA (б) за контроль принят квантовый состав ТКП после 20-минутной обработки препарата MLA.

не влиял на амплитуду ТКП, сохраняя неизменным их квантовый состав (рис. 2). Отсутствие эффекта вуртоксина при пониженной концентрации Ca^{2+} может быть связано со сниженной фосфолипидной активностью этого белка, поскольку он является Ca^{2+} -зависимой фосфолипазой [13]. В то же время эти данные позволяют предположить вероятность вклада фосфолипидного повреждения мембраны нервного окончания в ингибирующее действие вуртоксина в условиях стандартной концентрации Ca^{2+} .

Высокочастотная стимуляция двигательного нерва (100 имп/с) в контрольных условиях вызывает синаптическую депрессию, т.е. снижение амплитуды последовательных ТКП в пачке импульсов. Оба исследованных белка оказывали выраженное влияние на динамику амплитуд ТКП при высокочастотной стимуляции нерва. Из рис. 3 отчетливо видно, что в присутствии вуртоксина и Vur-S49 синаптическая депрессия была более выражена по сравнению с контролем.

Поскольку и вуртоксин, обладающий фосфолипидной активностью, и лишенный ферментативной активности Vur-S49 оказывали сходное действие на квантовый состав ТКП, можно предположить, что этот эффект может быть обусловлен не ферментативной, а иной активностью, например, взаимодействием с нейрональными

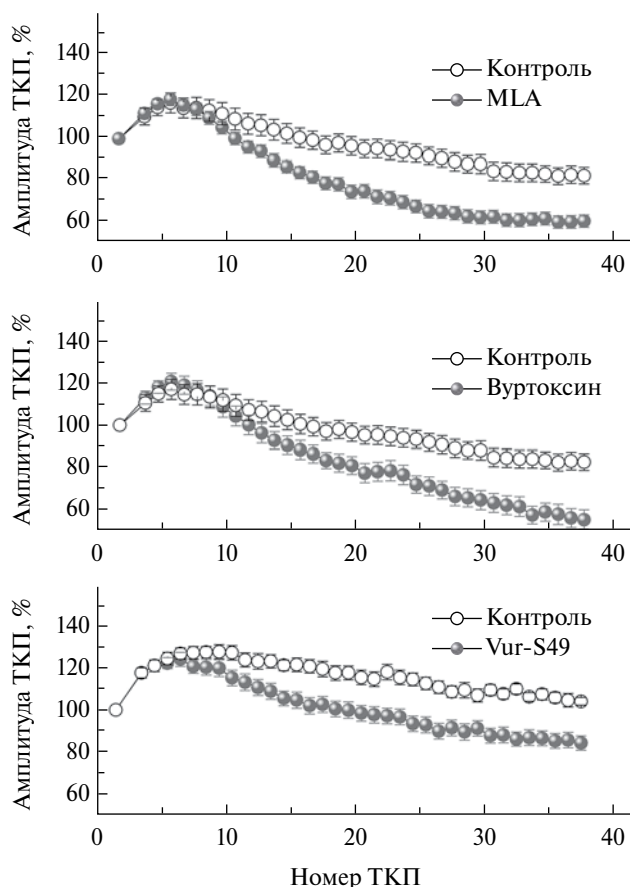


Рис. 3. Относительное изменение амплитуды ТКП в ходе пачки импульсов при стимуляции нерва с частотой 100 имп/с в контроле и в присутствии MLA, вуртоксина и Vur-S49. По оси абсцисс порядковый номер ТКП в пачке. За 100% принята амплитуда первого ТКП в пачке.

холинорецепторами. Так как ранее нами было установлено, что эти белки способны блокировать $\alpha 7$ -подобные нХР в нейронах прудовика и $\alpha 7$ нХР человека, экспрессированные в клетках линии GH4C1 [13], мы предположили, что наблюдаемое нами изменение квантового состава ТКП может быть связано с инактивацией этого типа нХР. Для проверки этого предположения мы провели серию экспериментов с селективным антагонистом $\alpha 7$ нХР позвоночных MLA.

Влияние MLA, а также вуртоксина и Vur-S49 в присутствии MLA на вызванные и спонтанные ТКП. Ранее нами было показано, что нХР типа $\alpha 7$ присутствуют в нервно-мышечных синапсах амфибий и могут контролировать время проведения потенциала действия по протяженным нервным окончаниям, а также модулировать величину кальциевого транзientа [16, 17]. Однако до сих пор ничего не было известно об участии этого типа нХР в регуляции интенсивности нейросекреции, в частности, квантового состава ТКП в нервно-мышечных синапсах лягушки.

В наших экспериментах селективный блокатор нХР типа $\alpha 7$ MLA (10 нМ) вызывал достоверное снижение амплитуды ТКП, не изменяя амплитуду мТКП (таблица, рис. 1). Таким образом, снижение амплитуды ТКП в присутствии MLA обусловлено уменьшением квантового состава ТКП на $18.8 \pm 4.7\%$ (рис. 2), что близко к снижению квантового состава при действии вуртоксина или Vur-S49. Частота мТКП и временные параметры ТКП и мТКП (время роста, постоянная времени спада) достоверно не изменялись (таблица).

При высокочастотной стимуляции двигательного нерва (100 имп/с) MLA, аналогично вуртоксину и Vur-S49, усиливал синаптическую депрессию (рис. 3).

Таким образом, все три исследованных в данной работе вещества (MLA, вуртоксин и Vur-S49) действовали однонаправленно. Чтобы установить, не связано ли угнетение квантового выброса АХ в присутствии вуртоксина и Vur-S49 с блокадой пресинаптических нХР типа $\alpha 7$, мы оценивали действие этих белков на параметры ТКП в присутствии MLA. В этих условиях вуртоксин и Vur-S49 по-прежнему снижали амплитуду ТКП (таблица) и, соответственно, квантовый состав ТКП на $33 \pm 5.4\%$ и $14.9 \pm 3.3\%$ (рис. 2). Изменения квантового состава ТКП в этих условиях не отличались достоверно от эффектов вуртоксина и Vur-S49, полученных в экспериментах без предварительной инкубации с MLA. Эти данные свидетельствуют в пользу того, что действие исследованных белков в нервно-мышечном синапсе лягушки не связано с их влиянием на пресинаптические $\alpha 7$ нХР.

ОБСУЖДЕНИЕ

Одним из основных белковых компонентов яда гадюковых змей являются ФЛА2, представленные различными изоформами [8], в том числе, проявляющие пресинаптическую нейротоксичность. Опубликованы данные, указывающие на то, что нейротоксические эффекты ФЛА2 обусловлены гидролизом фосфолипидов мембран нервных окончаний, что приводит к нарушению их структуры и проницаемости, и, как следствие, к снижению интенсивности нейросекреции [9–11]. Однако предполагается также возможность существования механизмов эффекта ФЛА2, отличных от ферментативного [10, 12]. Так, ранее установили способность ФЛА2 из яда змей взаимодействовать с некоторыми типами нХР, например, $\alpha 7$ -подобными нХР в нейронах прудовика *L. stagnalis*, нХР электрического органа *T. californica* и $\alpha 7$ нХР человека, экспрессированными в клетках линии GH4C1 [13].

Амплитудно-временные параметры ТКП и мТКП в контроле, в присутствии вуртоксина и Vur-S49, а также селективного антагониста $\alpha 7$ нХР MLA

| Условия | ТКП | | | мТКП | | |
|-----------------|--|------------------|-------------------------------|-----------------------------|------------------|-------------------------------|
| | Амплитуда, нА | Время роста, мкс | Постоянная времени спада, мкс | Амплитуда, нА | Время роста, мкс | Постоянная времени спада, мкс |
| Контроль | 266 ± 57 | 352 ± 19 | 1128 ± 124 | 2.51 ± 0.13 | 219 ± 35 | 991 ± 168 |
| Вуртоксин | 193 ± 45 <i>p</i> < 0.05 <i>n</i> = 9 | 380 ± 26 | 1250 ± 192 | 2.46 ± 0.15 | 242 ± 18 | 1126 ± 67 |
| Контроль | 264 ± 45 | 350 ± 29 | 966 ± 124 | 2.56 ± 0.30 | 266 ± 18 | 837 ± 106 |
| Vur-S49 | 227 ± 40 <i>p</i> < 0.05 <i>n</i> = 5 | 391 ± 51 | 1011 ± 161 | 2.54 ± 0.28 | 264 ± 24 | 970 ± 54 |
| Контроль | 376 ± 59 | 364 ± 27 | 1017 ± 88 | 2.78 ± 0.21 | 290 ± 38 | 963 ± 116 |
| MLA | 292 ± 40 <i>p</i> < 0.01 <i>n</i> = 15 | 366 ± 30 | 1047 ± 82 | 2.74 ± 0.19 | 271 ± 34 | 961 ± 114 |
| MLA | 396 ± 91 | 359 ± 35 | 1005 ± 105 | 2.83 ± 0.37 | 262 ± 48 | 1326 ± 380 |
| Вуртоксин + MLA | 266 ± 82 <i>p</i> < 0.05 <i>n</i> = 6 | 388 ± 32 | 987 ± 103 | 2.62 ± 0.39 <i>n</i> = 4 | 211 ± 49 | 899 ± 200 |
| MLA | 260 ± 64 | 277 ± 20 | 1093 ± 91 | 2.75 ± 0.12 | 218 ± 14 | 1050 ± 115 |
| Vur-S49 + MLA | 218 ± 51 <i>p</i> < 0.05 <i>n</i> = 8 | 279 ± 23 | 1260 ± 140 | 2.78 ± 0.08 | 207 ± 17 | 1202 ± 104 |

В данной работе мы изучали влияние ФЛА2 вуртоксина и ее гомолога Vur-S49, выделенных из яда степной гадюки *V. ursinii renardi*, на параметры синаптической передачи в нервно-мышечных соединениях лягушки. Оба белка не изменяли амплитудно-временные параметры мТКП, следовательно, они не взаимодействуют с постсинаптическими нХР в отличие от описанного действия ФЛА2 на нХР мышечного типа *Torpedo* [13]. Таким образом, мы пришли к выводу, что снижение амплитуд вызванных ТКП является результатом их пресинаптического действия. Следует отметить, что при высокочастотной стимуляции нерва нельзя точно отследить возможные изменения одноквантовых ответов, и теоретически их амплитуда может уменьшаться в ходе пачки импульсов в результате зависимо от частоты использования блокирования открытого канала или усиления десенситизации. Однако вход молекул вуртоксина и Vur-S49 в открытый ионный канал нХР маловероятен из-за высокой молекулярной массы (около 14 кДа), а изменений кинетики тока через канал нХР в нейронах мы не обнаружили [13].

Как уже указывалось, вуртоксин является ферментативно активной Ca^{2+} -зависимой ФЛА2 [13], поэтому вероятным механизмом действия вуртоксина может быть нарушение структуры

пресинаптической мембраны в результате фосфолиполиза. В пользу такого объяснения говорит неизменность квантового состава ТКП под действием вуртоксина в опытах с пониженной до 0.9 мМ концентрацией Ca^{2+} в наружном растворе, когда активность ФЛА2 должна быть снижена (рис. 2). Другой исследуемый белок Vur-S49 ферментативно не активен из-за мутации аспартата-49 в активном центре [14]. Хотя при действии вуртоксина, обладающего фосфолипазной активностью, квантовый состав падал на $25 \pm 7.2\%$, а лишенный ее Vur-S49 вызывал снижение квантового состава лишь на $14.2 \pm 3.1\%$, статистически эти различия оказались недостоверными (тест Манна–Уитни).

Таким образом, действие исследованных белков на квантовый состав ТКП, по-видимому, связано не только с их фосфолипазной активностью (механизм, возможный для вуртоксина), а направлено на другие мишени. Поскольку ранее было показано, что некоторые ФЛА2, выделенные из яда змей, способны блокировать $\alpha 7$ -подобные нХР в нейронах прудовика *L. stagnalis* и $\alpha 7$ нХР человека, экспрессированные в клетках линии GN4C1 [13], то можно было бы предположить, что пресинаптический эффект обоих белков связан с блокированием $\alpha 7$ нХР в нервном окончании.

Наличие и функционирование нХР типа $\alpha 7$ в нервно-мышечных синапсах позвоночных показано ранее [16–20]. Однако в синапсах теплокровных влияние активации $\alpha 7$ рецепторов на квантовый выброс АХ было очевидно лишь в условиях, способствующих накоплению эндогенного нейромедиатора в околосинаптическом пространстве (высокочастотная стимуляция, ингибирование бутирилхолинэстеразы) [18, 20] или в присутствии экзогенных холиномиметиков – никотина и холина [19]. Показано, что в синапсах теплокровных блокирование $\alpha 7$ рецепторов MLA предотвращало возникновение осцилляций Ca^{2+} в шванновских клетках, возникающих при высокочастотной стимуляции нерва [20]. Таким образом, холинорецепторы типа $\alpha 7$ в нервно-мышечных контактах теплокровных могут быть локализованы за пределами синаптической щели.

В наших экспериментах, выполненных на нервно-мышечных препаратах лягушки, MLA, высокоизбирательный ингибитор нейрональных $\alpha 7$ нХР, угнетал вызванную секрецию АХ в нервно-мышечном синапсе даже при редкой частоте стимуляции двигательного нерва (0.5 имп/с). Эти данные, а также влияние MLA на кальциевый сигнал, измеренный непосредственно в нервных окончаниях [16], свидетельствуют в пользу того, что в синапсах амфибий $\alpha 7$ нХР локализируются, по всей видимости, вблизи активных зон секреции АХ, а их активация ведет к облегчению секреции нейромедиатора. Облегчающее действие эндогенного АХ или экзогенных агонистов, опосредованное через активацию нейрональных нХР, обычно связывают с повышением концентрации Ca^{2+} внутри терминали за счет входа Ca^{2+} через канал самого нХР, который особенно интенсивен (но кратковременен из-за исключительно быстрой десенситизации) при активации нХР типа $\alpha 7$ [21, 22], входа Ca^{2+} через потенциал-активируемые Ca^{2+} каналы в результате деполяризации, вызванной АХ, и освобождения Ca^{2+} из внутриклеточных депо через рианодиновые и IP3-рецепторы [23–25].

Вместе с тем эффективность антагонистов нХР с разной селективностью к различным типам рецепторов ($\alpha 7$, $\alpha 3\beta 4$, $\alpha 3\beta 2$) в отношении скорости проведения возбуждения по нервным окончаниям [16] и величины кальциевого транзиента [17] позволяет предположить функционирование нескольких типов нХР в нервных окончаниях амфибий. В наших экспериментах после предварительной инактивации $\alpha 7$ нХР MLA действие вуртоксина и Vur-S49 на квантовый выброс ТКП сохранялось, что свидетельствует о разных мишенях действия MLA и исследованных белков. Зависимость эффекта вуртоксина от концентрации Ca^{2+} в наружной среде позволяет предположить

классический для ФЛА2 из яда змей фосфолипидный путь подавления секреции АХ, однако для окончательного вывода требуются дополнительные опыты. Такое объяснение не годится для Vur-S49, лишённого ферментативной активности независимо от концентрации Ca^{2+} . С другой стороны, не исключено, что вуртоксин и Vur-S49 взаимодействуют с другими типами нХР в нервном окончании. Способность ФЛА2 блокировать другие типы нХР, кроме $\alpha 7$ и мышечных, пока не исследована.

Таким образом, нами показано влияние белков вуртоксина и Vur-S49 на квантовый состав ТКП без одновременного изменения амплитудно-временных параметров спонтанных (одноквантовых) сигналов, что свидетельствует об отсутствии их постсинаптического действия. При этом установлено, что обнаруженный эффект не опосредован нХР типа $\alpha 7$. Механизм действия ФЛА2 яда змей и их гомологов на нервно-мышечную передачу требует дальнейшего изучения.

Работа выполнена за счет средств субсидии, выделенной в рамках государственной поддержки Казанского (Приволжского) федерального университета в целях повышения его конкурентоспособности среди ведущих мировых научно-образовательных центров, а также грантов РФФИ № 15-04-01843 и № 17-04-00690.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Tsetlin V.I., Hucho F. 2004. Snake and snail toxins acting on nicotinic acetylcholine receptors: fundamental aspects and medical applications. *FEBS Lett.* **557**, 9–13.
2. Kasheverov I.E., Utkin, Y.N., Tsetlin, V.I. 2009. Naturally occurring and synthetic peptides acting on nicotinic acetylcholine receptors. *Curr. Pharm. Des.* **15**, 2430–2452.
3. Tsetlin V.I. 2015. Three-finger snake neurotoxins and Ly6 proteins targeting nicotinic acetylcholine receptors: pharmacological tools and endogenous modulators. *Trends Pharmacol. Sci.* **36**, 109–123.
4. McArde J.J., Lentz T.L., Witzemann V., Schwarz H., Weinstein S.A., Schmidt J.J. 1999. Waglerin-1 selectively blocks the epsilon form of the muscle nicotinic acetylcholine receptor. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **289**, 543–550.
5. Utkin Y.N., Weise C., Kasheverov I.E., Andreeva T.V., Kryukova E.V., Zhmak M.N., Starkov V.G., Anh H.N., Bertrand D., Ramerstorfer J., Sieghart W., Thompson A.J., Lummis S.C.R., Tsetlin V.I. 2012. Azemiopsin from *Azemiops feae* viper venom, a novel polypeptide ligand of nicotinic acetylcholine receptor. *J. Biol. Chem.* **287**, 27079–27086.

6. Вульфийус Е.А., Старков В.Г., Андреева Т.В., Цетлин В.И., Уткин Ю.Н. 2015. Новые антагонисты никотиновых холинорецепторов – белки из ядов змей семейства Viperidae. *ДАН*. **461**, 604–607.
7. Montecucco C., Rossetto O., Caccin P., Rigoni M., Carli L., Morbiato L., Muraro L., Paoli M. 2009. Different mechanisms of inhibition of nerve terminals by botulinum toxin and snake presynaptic neurotoxins. *Toxicon*. **54**, 561–564.
8. Warrell D.A. 1989. Snake venoms in science and clinical medicine. 1. Russell's viper: biology, venom and treatment of bites. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* **3**, 732–740.
9. Rossetto O., Morbiato L., Caccin P., Rigoni M., Montecucco C. 2006. Presynaptic enzymatic neurotoxins. *J. Neurochem*. **97**, 1534–1545.
10. Pungertar J., Križaj I. 2007. Understanding the molecular mechanism underlying the presynaptic toxicity of secreted phospholipases A2. *Toxicon*. **50**, 871–892.
11. Vardjan N., Mattiazzi M., Rowan E.G., Križaj I., Petrovič U., Petan T. 2013. Neurotoxic phospholipase A2 toxicity model: An insight from mammalian cells. *Commun. Integr. Biol.* doi: 10.4161/cib.23600.
12. Kini R.M., Evans H.J. 1989. A model to explain the pharmacological effects of snake venom phospholipases A2. *Toxicon*. **27**, 613–635.
13. Vulfius C.A., Kasheverov I.E., Starkov V.G., Osipov A.V., Andreeva T.V., Filkin S. Yu., Gorbacheva E.V., Astashev M.E., Tsetlin V.I., Utkin Y.N. 2014. Inhibition of nicotinic acetylcholine receptors, a novel facet in the pleiotropic activities of snake venom phospholipases A2. *PLoS One*. doi: 10.1371/journal.pone.0115428.
14. Rufini S., Cesaroni P., Desideri A., Farias R., Gubensek F., Gutiérrez J.M., Luly P., Massoud R., Morero R., Pedersen J.Z. 1992. Calcium ion independent membrane leakage induced by phospholipase-like myotoxins. *Biochemistry*. **31**, 12424–12430.
15. Smith T.G., Barker J.L., Smith B.M. & Colburn T.R. 1980. Voltage clamping with microelectrodes. *J. Neurosci. Methods*. **3**, 105–128.
16. Ковязина И.В., Ценцевицкий А.Н., Никольский Е.Е. 2016. Пресинаптические никотиновые холинорецепторы модулируют скорость проведения возбуждения по двигательным нервным окончаниям при высокочастотной активности синапса. *ДАН*. **468**, 586–588.
17. Khaziev E., Samigullin D., Zhilyakov N., Fatikhov N., Bukharaeva E., Verkhatsky A., Nikolsky E. 2016. Acetylcholine-induced inhibition of presynaptic calcium signals and transmitter release in the frog neuromuscular junction. *Front. Physiol.* **7**:621. doi: 10.3389/fphys.2016.00621.
18. Федорин В.В., Балежина О.П. 2008. Участие Н-холинорецепторов нейронального типа в регуляции выброса медиатора в нервно-мышечных синапсах мышцы. *Нейрохимия*. **25**, 99–104.
19. Гайдуков А.Е., Богачева П.О., Тарасова Е.О., Балежина О.П. 2014. Механизм подавления холином выброса ацетилхолина в моторных синапсах мышцы. *Acta naturae*. **6** (4), 117–122.
20. Petrov K.A., Girard E., Nikitashina A.D., Colasante C., Bernard V., Nurullin L., Leroy J., Samigullin D., Colak O., Nikolsky E., Plaud B., Krejci E. 2014. Schwann cells sense and control acetylcholine spillover at the neuromuscular junction by $\alpha 7$ nicotinic receptors and butyrylcholinesterase. *J. Neurosci*. **34**, 11870–11883.
21. Séguéla P., Wadiche J., Dineley-Miller K., Dani J.A., Patrick J.W. 1993. Molecular cloning, functional properties, and distribution of rat brain $\alpha 7$: A nicotinic cationic channel highly permeable to calcium. *J. Neurosci*. **13**, 596–604.
22. Castro N.G., Albuquerque E.X. 1995. The α -bungarotoxin-sensitive hippocampal nicotinic acetylcholine receptor has a high calcium permeability. *Biophys. J.* **68**, 516–524.
23. Tsuneki H., Klink R., Léna C., Korn H., Changeux J.P. 2000. Calcium mobilization elicited by two types of nicotinic acetylcholine receptors in mouse substantia nigra pars compacta. *Eur. J. Neurosci*. **12**, 2475–2485.
24. Rogers M., Sargent P.B. 2003. Rapid activation of presynaptic nicotinic acetylcholine receptors by nerve-released transmitter. *Eur. J. Neurosci*. **18**, 2946–2956.
25. Shen J.X., Yakel J.L. 2009. Nicotinic acetylcholine receptor-mediated calcium signaling in the nervous system. *Acta Pharmacol. Sin.* **30**, 673–680.

Depression of the Evoked Quantal Acetylcholine Secretion in Frog Neuromuscular Junction by Phospholipases A2 from the Venom of Steppe Viper *Vipera ursinii renardi*

I. V. Kovyazina^{1,2,*}, N. V. Kopylova³, Yu. N. Utkin⁴, E. A. Bukharaeva^{1,2},
E. E. Nikolsky^{1,2,5}, C. A. Vulfius⁶

¹Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics, Russian Academy of Sciences, ul. Lobachevskogo 2/31, Kazan, 420111 Russia

²Kazan Federal University, ul. Kremlevskaya 18, Kazan, 420008 Russia

³Moscow State Pedagogical University, ul. M. Pirogovskaya 1/1, Moscow, 119991 Russia

⁴Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, ul. Miklukho-Maklaya 16/10,
Moscow GSP-7, 117997 Russia

⁵Kazan State Medical University, ul. Butlerova 49, Kazan, 420012 Russia

⁶Institute of Cell Biophysics, Russian Academy of Sciences, ul. Institutskaya 3, Pushchino, Moscow oblast, 142290 Russia

*e-mail: irina.kovyazina@list.ru

In this work we studied the influence of phospholipase A2 vurtoxin and its homologue lacking enzymatic activity Vur-S49 isolated from the venom of steppe viper *Vipera ursinii renardi* on the amplitude-temporal parameters of spontaneous and evoked endplate currents (EPCs) in the neuromuscular junction of frog *Rana ridibunda*. The experiments performed showed that both vurtoxin and Vur-S49 reduce the EPC quantal content. The amplitude and time course of spontaneous (one-quantal) signals remained unchanged, suggesting that these proteins do not block nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs) on the postsynaptic membrane. Depressing effect in the presence of enzymatically inactive Vur-S49 suggested that the decrease in the EPC quantal content under the action of these proteins could not be explained exclusively by phospholipolytic activity manifested by vurtoxin. Relying on our previous data we suggested interaction of the proteins studied with presynaptic $\alpha 7$ nAChRs. Selective antagonist of $\alpha 7$ nicotinic receptors methyllycaconitine (MLA) reduced the EPC quantal content as well. Depressing action of MLA on the evoked secretion of acetylcholine indicates the involvement of $\alpha 7$ nAChRs in regulation of the evoked quantal secretion in the frog neuromuscular junction. However, the effects of vurtoxin and Vur-S49 on the EPC quantal content were unchanged after preliminary incubation of the nerve-muscle preparation with MLA. The data obtained suggest that presynaptic actions of the proteins studied are not directed to $\alpha 7$ nAChRs but could be mediated by interaction with some other synaptic targets.

Keywords: neuromuscular junction, nicotinic acetylcholine receptor, endplate current, phospholipase, viper venom