

10

Министерство образования и науки РФ
Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования
«КАЗАНСКИЙ (ПРИВОЛЖСКИЙ) ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

ИНСТИТУТ ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ И БИОЛОГИИ

КАФЕДРА ФИЗИОЛОГИИ ЧЕЛОВЕКА И ЖИВОТНЫХ

Направление: 06.04.01 Биология

Программа «Нейробиология»

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА

Магистерская диссертация

ЭФФЕКТЫ МОДУЛЯТОРОВ ХЛОРНЫХ КАНАЛОВ НА ЭКЗОЦИТОЗ
СИНАПТИЧЕСКИХ ВЕЗИКУЛ В НЕРВНЫХ ОКОНЧАНИЯХ АКСОНОВ
МОТОНЕЙРОНОВ ДИАФРАГМЫ МЫШИ

Работа завершена:

"25" мая 2018 г. А.И. Гильмутдинов (А.И. Гильмутдинов)

Работа допущена к защите:

Научный руководитель

д.б.н., доцент кафедры нормальной физиологии КГМУ

"25" мая 2018 г. А.М. Петров (А.М. Петров)

Заведующий кафедрой

д.б.н., профессор

"25" 06 2018 г. Г.Ф. Ситдикова (Г.Ф. Ситдикова)

СОДЕРЖАНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	Ошибка! Закладка не определена.
ВВЕДЕНИЕ	4
1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	Ошибка! Закладка не определена.
1.1 Синапс	Ошибка! Закладка не определена.
1.2 Экзо- и эндоцитоз.....	Ошибка! Закладка не определена.
1.2.1 Экзоцитоз синаптических везикул и его виды.....	Ошибка! Закладка не определена.
1.2.2 Эндоцитоз и виды пресинаптического эндоцитоза ...	Ошибка! Закладка не определена.
1.2.3 Везикулярные синаптические пулы	Ошибка! Закладка не определена.
1.2.4 Везикулярный цикл.....	Ошибка! Закладка не определена.
1.3 Хлорные каналы в синапсе и их модуляторы	Ошибка! Закладка не определена.
1.3.1 Виды и роль хлорных каналов в синапсе	Ошибка! Закладка не определена.
1.3.2. Участие VDAC в синаптической передаче.....	Ошибка! Закладка не определена.
1.3.3 DIDS, S18 и олесоксим как фармакологические инструменты для манипуляции функцией хлорных каналов. ..	Ошибка! Закладка не определена.
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	Ошибка! Закладка не определена.
2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	Ошибка! Закладка не определена.
2.1 Объект исследования и применяемые растворы	Ошибка! Закладка не определена.
2.2 Использованные химические вещества и схемы экспериментов	Ошибка! Закладка не определена.
2.2.1 Наблюдение за процессами эндо- и экзоцитозного цикла синаптических везикул.....	Ошибка! Закладка не определена.

2.2.2 Модуляция активности потенциал-зависимых анионных каналов	Ошибка!
Закладка не определена.	
2.2.3 Метод флуоресцентной микроскопии..	Ошибка! Закладка не определена.
2.2.4 Метод электрофизиологии	Ошибка! Закладка не определена.
2.3 Статистическая обработка данных.....	Ошибка! Закладка не определена.
3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ.....	Ошибка! Закладка не определена.
3.1 Сравнение изменение динамики в отдельном скоплении активных зон и во всем пресинаптическом окончании.....	Ошибка! Закладка не определена.
3.2 Влияние модулирующих веществ на скорость протекания экзоцитоза	Ошибка! Закладка не определена.
3.3 Электрофизиология.....	Ошибка! Закладка не определена.
3.4 Влияние повышенной концентрации ионов хлора и модуляторов VDAC на скорость выгрузки синаптических везикул..	Ошибка! Закладка не определена.
3.5 Влияние олесоксима на динамику процесса экзоцитоза при низкочастотной стимуляции.	Ошибка! Закладка не определена.
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	Ошибка! Закладка не определена.
ВЫВОДЫ.....	7
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ.....	Ошибка! Закладка не определена.

ВВЕДЕНИЕ

Исследование протекающих молекулярных механизмов во время осуществления экзо-эндоцитозного цикла синаптических везикул занимает особое место в биологии. Фактически, эти процессы являются отправной точкой фундаментальных и самых сложно устроенных феноменов нервной системы [Zefirov, 2009].

В окончаниях нейронов содержится от нескольких сот до нескольких сотен тысяч синаптических окаймленных пузырьков (везикул), заполненных нейромедиатором, а его выделение связано с объединением этих везикул с цитоплазматической мембраной пресинаптического участка (экзоцитоз). В ходе синаптической активности, потеря синаптических везикул, чреватая прекращением взаимодействия между нервными клетками, предотвращается за счет эндоцитоза, который «собирает» из плазмалеммы новые окаймленные образования. Они заполняются нейромедиатором и могут повторно вовлекаться в экзоцитоз. При этом вновь образовавшиеся везикулы составляют основу синаптических пулов, отличающихся между собой количеством этих окаймленных пузырьков, а также их степенью участия в эндоцитозе и экзоцитозе. Тем самым в межнейронном окончании постоянно

воплощается везикулярный синаптический экзо-эндоцитозный цикл [Zefirov, 2008].

Успешное протекание вышеуказанных процессов возможно только при слаженной работе разнообразных каналов, расположенных на пресинаптической мембране. Пристальное внимание ученых привлекли к себе потенциал-зависимые хлорные каналы (от англ. voltage dependent anion channels; VDAC), расположенные на синаптосомах и синаптических везикулах и представляющие собой трансмембранный бета-слой, состоящий из 19 субъединиц и соединенный с альфа-спиралью белка. Изначально они были обнаружены на внешней митохондриальной мембране, где VDAC выступают в качестве транспортеров нутриентов, солей и ионов, участвуют в защите клетки. В то же время, потенциал-зависимые хлорные каналы занимают основополагающее значение в развитии апоптотических и некоторых паталогических реакций. К примеру, была показана их роль в формировании болезни Альцгеймера путем изменения конформации белка и формировании особой митохондриальной поры повышенной проницаемости. Более того, в опухолевых клетках наблюдалась аномальная экспрессия потенциал-зависимых анионных каналов, что говорит об огромной роли этих белков в продукции энергии. Однако, несмотря на достаточно большое количество гипотез, изменяющая в результате смены состояния белка ионная проницаемость и механические аспекты изменения структуры канала до сих пор остаются малоизученными и являются предметом дискуссий в научном сообществе [Hodge *et al.*, 1997; Mertins *et al.*, 2014].

В связи с тем, что потенциал-зависимые анионные каналы осуществляют разнообразные функции, они способны взаимодействовать с множеством модулирующих веществ, некоторые из которых являются: олесоксим, обладающий нейропротекторными и нейрорегенеративными свойствами; неселективный блокатор хлорных каналов - 4,4'-диизотиоцианостильбен-2,2'-дисульфоновая кислота (DIDS) и

олигонуклеотидная последовательность S18 (S-18 phosphorothioate random oligonucleotide), избирательно связывающаяся с VDAC и приводя их в закрытое состояние.

Таким образом, используя арсенал из вышеуказанных соединений, предоставляется возможным оценка значения потенциал-зависимых хлорных каналов в интенсивности экзо- и эндоцитоза.

Цель: Исследовать эффекты модуляторов хлорных каналов на экзоцитоз синаптических везикул в нервных окончаниях аксонов мотонейронов диафрагмы мыши.

Задачи:

1. Выявить влияние блокаторов потенциал-зависимых анионных каналов: 4,4'-диизотиоцианостильбен-2,2'-дисульфоновой кислоты (DIDS) и S18 на динамику экзоцитоза.

2. Определить эффект олесоксима - холестерол-подобного соединения, связывающегося с VDAC, на интенсивность синаптической активности во время высокочастотной стимуляции.

3. Оценить последствия совместного действия блокаторов потенциал-зависимых анионных каналов и олесоксима на интенсивность экзоцитоза синаптических везикул при ритмическом раздражении диафрагмального нерва.

4. Изучить зависимость эффекта олесоксима от внеклеточной концентрации хлора.

ВЫВОДЫ

1. 4,4'-диизотиоцианостильбен-2,2'-дисульфоновая кислота и S18 не влияют на динамику экзоцитоза.
2. Кратковременная аппликация олесоксима усиливает рециклирование синаптических везикул при стимуляции.
3. Применение 4,4'-диизотиоцианостильбен-2,2'-дисульфоновой кислоты устраняет стимулирующий эффект олесоксима на интенсивность экзоцитоза.
4. Эффект олесоксима зависит от градиента ионов хлора в пресинаптическом нервном окончании.

