

УДК 612.816

В синхронной и асинхронной секреции медиатора принимают участие одни и те же синаптические везикулы

П. Н. Григорьев, А. Л. Зефилов*

Казанский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения РФ, 420012, Казань, ул. Бутлерова, 49

*E-mail: zefiroval@rambler.ru

Поступила в редакцию 16.02.2015

РЕФЕРАТ В опытах на двигательных нервных окончаниях кожно-грудинной мышцы лягушки с использованием внутриклеточного микроэлектродного отведения постсинаптических сигналов и флуоресцентной конфокальной микроскопии изучали процессы вызванной секреции медиатора и экзо- и эндоцитоза синаптических везикул при высокочастотном раздражении (20 имп/с) в присутствии во внеклеточном растворе различных двухвалентных катионов (Ca^{2+} , Sr^{2+} или Ba^{2+}). В электрофизиологических экспериментах в Ca -растворе регистрировалась практически только синхронная секреция медиатора, в Sr -растворах – высокая интенсивность как синхронной, так и асинхронной секреции, а в Ba -растворе наблюдалось практически только асинхронное выделение медиатора. В опытах с флуоресцентным красителем FM 1-43 показано, что везикулы, прошедшие цикл экзоцитоза–эндоцитоза при синхронной секреции медиатора (Ca -растворы), способны вовлекаться в асинхронный экзоцитоз в Ba -растворах. И, наоборот, везикулы, которые первоначально участвовали в асинхронной секреции (Ba -растворы), способны в последующем участвовать в синхронной секреции (Ca -растворы). В экспериментах с изолированной загрузкой красителем везикул рециклирующего и резервного пулов показано, что оба пула везикул принимают участие как в синхронной, так и в асинхронной секреции медиатора. Сделано заключение, что источником для обоих видов вызванной секреции медиатора служат одни и те же синаптические везикулы.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА везикулярные пулы, вызванная синхронная и асинхронная секреция медиатора, двигательное нервное окончание, ионы Ca^{2+} , Sr^{2+} , Ba^{2+} , экзоцитоз и эндоцитоз синаптических везикул.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ПКП – потенциал концевой пластинки.

ВВЕДЕНИЕ

Секреция медиатора в химическом синапсе осуществляется порциями (квантами) посредством слияния мембраны синаптической везикулы с пресинаптической мембраной. Процесс слияния может происходить в покое (спонтанная секреция), а также в ответ на пресинаптический потенциал действия и вход ионов Ca^{2+} в нервное окончание через потенциал-зависимые Ca -каналы (вызванная секреция). В вызванной секреции медиатора выделяют два компонента – синхронный, при котором высвобождение квантов медиатора осуществляется в течение нескольких миллисекунд после потенциала действия, и асинхронный, который продолжается десятки и сотни миллисекунд [1–3]. В большинстве синапсов основным компонентом является синхронная секреция медиатора, посредством которой при низкочастотном раздражении может освобождаться более 90% квантов [4, 5]. Однако при увеличении частоты раздражения отмечается рост доли асинхронной секреции

медиатора [6]. Один из экспериментальных подходов к изменению соотношения синхронной и асинхронной секреции – использование растворов, содержащих ионы различных щелочноземельных металлов. Так увеличение доли асинхронной секреции происходит при замене ионов Ca^{2+} на Sr^{2+} и Ba^{2+} [2, 7, 8]. Считают, что синхронность освобождения квантов медиатора реализуется благодаря нескольким пресинаптическим механизмам, таким, как быстрое кратковременное открытие Ca -каналов в ответ на деполаризацию мембраны, свойства белковой «машины» секреции, запускающей выделение квантов медиатора только при высокой внутриклеточной концентрации кальция, а также малое расстояние между Ca -каналом и Ca -сенсором экзоцитоза [9]. Механизмы асинхронной секреции медиатора остаются недостаточно изученными. Предполагают, что Ca^{2+} -сенсор асинхронной секреции располагается на большем расстоянии от Ca -канала и характеризуется другой динамикой связывания ионов Ca^{2+} [10–13].

В то же время можно предположить, что везикулы, участвующие в синхронной и асинхронной секреции медиатора, различны и могут представлять самостоятельные популяции. Такое предположение не лишено оснований. Во-первых, изучение процессов экзо- и эндоцитоза синаптических везикул в двигательных нервных окончаниях позволило выделить два функционально различных пула (рециклирующий и резервный). Рециклирующий пул представлен докированными в области активных зон везикулами, он быстро истощается при высокочастотной активности и восполняется за счет мобилизации везикул и быстрого эндоцитоза. Резервный, более крупный, пул везикул участвует в восстановлении рециклирующего пула при высокочастотном раздражении, включается в процесс секреции позднее и восполняется посредством медленного эндоцитоза [14, 15]. Во-вторых, получены данные, позволяющие предположить существование обособленных популяций везикул, обеспечивающих спонтанную [16, 17] и асинхронную секрецию медиатора [18, 19], но не участвующих в вызванной, синхронной секреции. В настоящей работе с использованием электрофизиологического подхода и флуоресцентной конфокальной микроскопии делается попытка оценить идентичность пулов везикул, принимающих участие в синхронной и асинхронной секреции, в двигательном нервном окончании.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Объект исследования, растворы

Эксперименты проведены на изолированных нервно-мышечных препаратах кожно-грудинной мышцы травяных лягушек (*Rana temporaria*) в зимний (декабрь–февраль) период. Работа проведена в соответствии с международными правилами работ с использованием экспериментальных животных. Использовали стандартный раствор Рингера следующего состава (в мМ): 115.0 NaCl, 2.5 KCl, 1.8 CaCl₂, 2.4 NaHCO₃; pH поддерживали на уровне 7.2–7.4; температура 20°C. Все исследования проводили только на поверхностно расположенных синапсах. Наряду со стандартным раствором (Ca-раствор) использовали растворы, в которых CaCl₂ был заменен на SrCl₂ или BaCl₂ в концентрации 1.8 мМ (Sr-, Ba-растворы). Вызванную секрецию медиатора и экзоцитоза везикул инициировали длительным высокочастотным (20 имп/с) раздражением двигательного нерва прямоугольными электрическими импульсами длительностью 0.1–0.2 мс сверхпороговой силы, подаваемыми с помощью стимулятора DS3 (Digitimer Ltd., Великобритания). Сокращения препарата блокировали поперечным рассечением мышечных волокон. Использовали реактивы фирмы Sigma (США).

Электрофизиология

Многоквантовые потенциалы концевой пластинки (ПКП) и одноквантовые асинхронные сигналы регистрировали с помощью стеклянных микроэлектродов с диаметром кончика менее 1 мкм и сопротивлением 2–10 МОм, заполненных 3 М раствором KCl. Микроэлектрод вводили в мышечное волокно в области нервных окончаний под визуальным контролем. Уровень мембранного потенциала покоя контролировали при помощи милливольтметра. Эксперименты, в которых происходило уменьшение мембранного потенциала покоя, не учитывались. Оцифровывание сигналов производили с помощью платы АЦП Ла-2USB. Для регистрации и анализа сигналов применяли оригинальную компьютерную программу Elph (разработчик А.В. Захаров).

Количественная оценка синхронной секреции медиатора

Для количественного расчета квантового состава ПКП использовали модифицированный метод вариаций, детально описанный нами ранее [20]. Для этого рассчитывали площадь каждого ПКП в серии. Далее на графике динамики снижения площади ПКП при высокочастотном раздражении находили участок, в котором средняя площадь ПКП практически не менялась (обычно 10–30 с раздражения). По колебаниям площади ПКП в этом участке можно рассчитать квантовую величину, т.е. среднюю величину площади ПКП, производимую одним квантом медиатора (q):

$$q = \sigma^2 / \langle V \rangle, \quad (1)$$

где σ – дисперсия площади ПКП, $\langle V \rangle$ – средняя площадь ПКП на данном участке.

Далее можно определить квантовый состав каждого ПКП в серии:

$$m_i = V_i / q, \quad (2)$$

где m_i – квантовый состав i-го ПКП, V_i – площадь i-го ПКП.

Количественная оценка асинхронной секреции медиатора в Ca- и Sr-растворах

Асинхронную секрецию медиатора оценивали путем подсчета количества одноквантовых сигналов, возникающих после ПКП, в период между раздражениями (50 мс), рассчитывая их частоту (количество квантов в секунду). Одноквантовые сигналы подсчитывали как автоматически, так и при визуальном просмотре регистраций.

Количественная оценка асинхронной секреции медиатора в Ва-растворах

Раздражение в Ва-растворах вызывает квантовую секрецию большого количества медиатора, приводящую к развитию устойчивой деполяризации концевой пластинки, что подтверждено биохимическими методами [21]. Высокочастотное раздражение в Ва-растворах приводит к появлению огромного количества асинхронно возникающих одноквантовых сигналов, которые накладываются друг на друга и не поддаются подсчету [7, 22]. Поэтому секрецию медиатора (частота одноквантовых асинхронных потенциалов) оценивали по производимому асинхронными сигналами деполяризационному изменению мембранного потенциала с коррекцией на нелинейность их суммации с использованием формулы [22]:

$$n = \frac{V}{1 - V / (E - \varepsilon)} \cdot \frac{1}{a \cdot \tau}, \quad (3)$$

где V – деполяризация постсинаптической мембраны, мВ, E – мембранный потенциал покоя, мВ, a – средняя амплитуда асинхронных одноквантовых сигналов, мВ, τ – временная постоянная асинхронных одноквантовых сигналов, мс, ε – равновесный ацетилхолиновый потенциал (≈ -15 мВ).

Флуоресцентная микроскопия

Процессы экзо- и эндоцитоза синаптических везикул изучали с использованием флуоресцентного красителя FM 1-43 (SynaptoGreen C4, фирма Sigma, США) в концентрации 6 мкМ. Краситель обратимо связывается с пресинаптической мембраной и во время эндоцитоза (после стимуляции экзоцитоза) оказывается внутри образующихся синаптических везикул («загружается» в нервные окончания) [23]. Поскольку процессы эндоцитоза продолжаются и некоторое время после окончания экзоцитоза, в наших экспериментах краситель присутствовал в растворе как во время раздражения (20 имп/с), так и в течение 5 мин после его окончания. Далее препарат отмывали в растворе без красителя в течение 20 мин для устранения связанного с поверхностной мембраной красителя. В этом случае в нервном окончании наблюдались ярко светящиеся пятна, отражающие скопления синаптических везикул, содержащих краситель в области активных зон. Стимуляция экзоцитоза предварительно загруженных везикул вызывает освобождение («выгрузку») красителя из нервных окончаний [23]. Флуоресценцию наблюдали с помощью моторизованного микроскопа BX51W1 (Olympus, Германия), оснащенного конфокальным сканирующим диском DSU и CCD-камерой OrcaR2 (Hamamatsu, Япония), совмещенной с персон-

альным компьютером через специализированный софт Olympus Cell^P. Оптика для анализа свечения FM 1-43 включала набор светофильтров Olympus U-MNB2 и водно-иммерсионный объектив Olympus LUMPLFL 60xw (1.0 NA). Свечение анализировали в центральном участке нервного окончания протяженностью 20 мкм. Интенсивность свечения оценивали, используя программу ImagePro, в относительных единицах (о.е.) свечения пикселя за вычетом фоновой флуоресценции. Фоновое значение флуоресценции определяли как среднюю интенсивность свечения в квадрате 50×50 пикселей в участке изображения без нервных окончаний [12, 24, 25]. Профиль свечения в нервной терминали рассчитывали как среднюю интенсивность свечения рядов пикселей, расположенных перпендикулярно продольной оси терминали с шагом в 1 пиксель.

Статистический анализ проводили с использованием программы Origin Pro. Количественные результаты исследования представлены в форме среднее значение \pm стандартная ошибка, n – число независимых опытов. Статистическую значимость определяли с помощью критерия Стьюдента и ANOVA.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Секреция медиатора при высокочастотном раздражении в Са-, Sr- и Ва-растворах

При высокочастотном раздражении в Са-растворе регистрировались многоквантовые ПКП (синхронная секреция медиатора), сопровождавшиеся редкими одноквантовыми асинхронными сигналами (рис. 1А). Квантовый состав первого многоквантового ПКП в серии составлял 321 ± 120 квантов ($n = 6$). В процессе высокочастотного раздражения наблюдалось снижение квантового состава, который к концу 3-й минуты раздражения составлял $44.3 \pm 9.0\%$ ($n = 6$) от исходного уровня (рис. 1Б). Асинхронная секреция в течение первой секунды высокочастотного раздражения была незначительной (5.9 ± 1.4 кванта с^{-1} , $n = 7$), но к концу 3-й минуты раздражения возрастала до $40.0 \pm 9.7 \text{ с}^{-1}$ ($n = 7$) (рис. 1Б). После окончания раздражения одноквантовые асинхронные сигналы исчезали в течение 1 с. Произведенные расчеты показали, что за 3 мин раздражения в Са-растворе посредством синхронной секреции высвобождается 880251 ± 275892 квантов ($n = 6$), а асинхронной – 6751 ± 1476 квантов ($n = 7$).

В Sr-растворе при высокочастотном раздражении также регистрировались многоквантовые ПКП, за которыми следовали одноквантовые асинхронные сигналы (рис. 1А). Исходный квантовый состав оказался значительно ниже, чем в Са-растворе – 4.7 ± 0.8 кванта ($n = 4$). К окончанию первой мину-

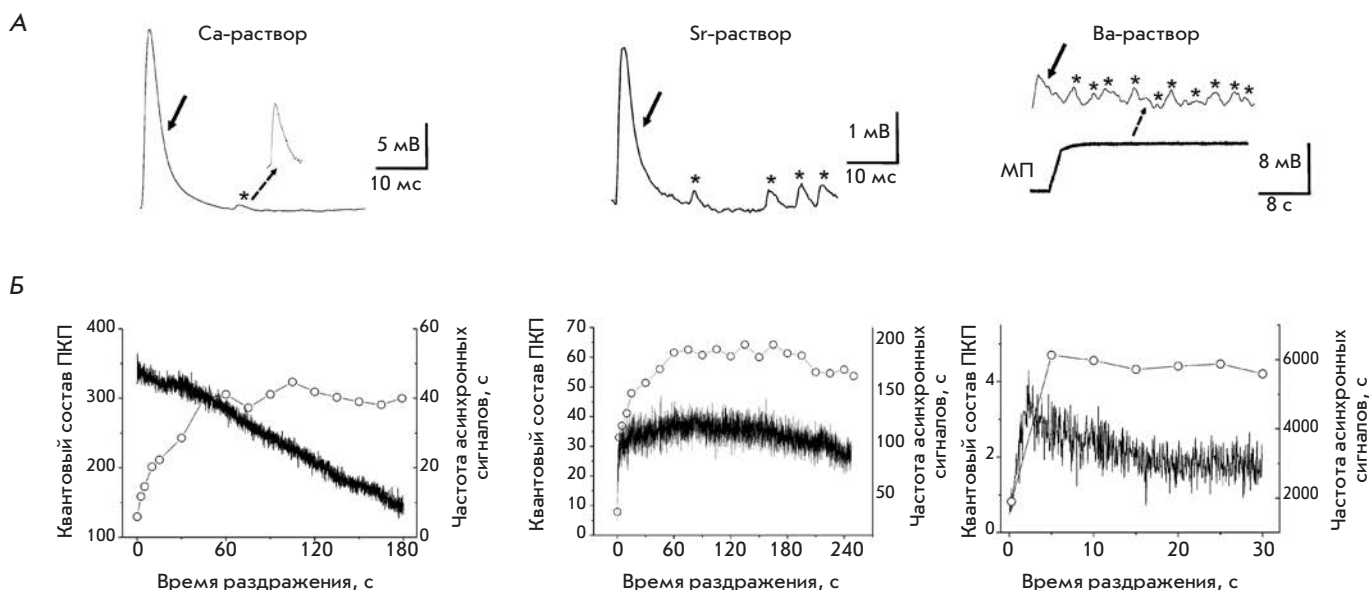


Рис. 1. Синхронная и асинхронная вызванная секреция медиатора при высокочастотном раздражении в Ca-, Sr-, Ba-растворах. А – примеры регистрации потенциалов концевой пластинки (ПКП) и асинхронных одноквантовых сигналов при высокочастотном (20 имп/с) раздражении в Ca-, Sr-, Ba-растворах (1.8 мМ). Стрелками указаны ПКП, звездочками – асинхронные одноквантовые сигналы. Заметно, что в Ba-растворах при раздражении развивается стойкая деполяризация мембраны мышечного волокна (МП). Б – динамика усредненного (по всем экспериментам) квантового состава ПКП (темные линии, оси ординат – слева) и усредненной частоты одноквантовых асинхронных сигналов (светлые кружки, оси ординат – справа) в процессе высокочастотного раздражения

ты раздражения квантовый состав ПКП возрастал до 34.3 ± 9.1 ($n = 4$) и поддерживался на относительно стабильном уровне до окончания стимуляции (рис. 1Б). В Sr-растворе асинхронная секреция оказалась более значимой, чем в Ca-растворе. В первую секунду раздражения частота одноквантовых сигналов составляла 32.6 ± 5.8 , а к концу 3-й минуты – 185.2 ± 10.7 квантов/с ($n = 5$) (рис. 1Б). После окончания раздражения одноквантовые асинхронные сигналы исчезали в течение 1 с. Оказалось, что за 3 мин раздражения в Sr-растворе количество выделенных синхронной и асинхронной секрецией квантов медиатора составляет 126359 ± 29687 ($n = 4$) и 31633 ± 1912 ($n = 5$) соответственно. Возникающая в Ca- и Sr-растворах асинхронная секреция медиатора не приводила к изменению мембранного потенциала покоя.

Высокочастотное раздражение двигательного нерва в Ba-растворе вызывало появление одно-трехквантовых ПКП и огромного количества асинхронных одноквантовых сигналов. Квантовый состав ПКП быстро возрастал к 2–3 с и последовательно снижался к окончанию раздражения до 1.85 ± 0.47 ($n = 7$) (рис. 1Б). Продолжительное раздражение

в течение первых нескольких секунд приводило к деполяризации мышечных волокон с уровня покоя -45 ± 2.9 мВ до -37 ± 3.1 мВ ($n = 7$), сохранявшейся все время раздражения. После окончания раздражения мембранный потенциал в течение 3–7 с возвращался к исходному уровню. Расчет по формуле 3 (см. раздел «Экспериментальная часть») позволил заключить, что такая деполяризация может вызываться асинхронными одноквантовыми сигналами с частотой 6131 ± 455 с⁻¹ ($n = 7$). Дальнейшие расчеты показали, что 30-секундное раздражение в Ba-растворе приводит к освобождению синхронной секрецией 1224 ± 180 квантов ($n = 7$), а асинхронной – 189648 ± 41712 квантов ($n = 7$).

Представленные данные свидетельствуют о том, что при высокочастотном раздражении в Ca-растворах практически все кванты медиатора освобождаются синхронно (примерно 99.2%), а доля асинхронной секреции незначительна. Применение Sr-растворов приводит к уменьшению доли синхронно освобождающихся квантов до 80% и увеличению асинхронно освобождающихся до 20%. В Ba-растворах обнаружено практически только асинхронное выделение квантов (примерно 99.4%).

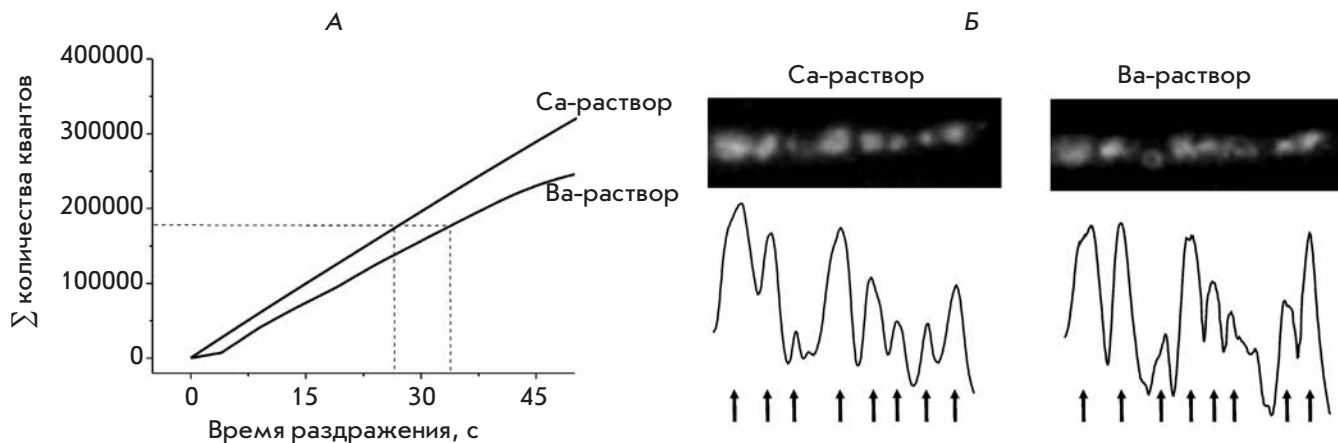


Рис. 2. Эндоцитоз синаптических везикул в Са- и Ва-растворах. А – кумулятивные кривые количества освобожденных синхронных и асинхронных квантов медиатора в Са- и Ва-растворах в процессе высокочастотного раздражения (построены, исходя из данных, представленных на рис. 1Б). Заметно, что 180000 квантов медиатора (штриховая линия) освобождаются при раздражении в Са- и Ва-растворах примерно за 30 с. Б – примеры регистрации флуоресценции одного и того же участка нервного окончания, последовательно загруженного красителем FM 1-43 при высокочастотном раздражении продолжительностью 30 с в Са- и Ва-растворах (подробнее в тексте). Снизу показаны профили свечения нервного окончания. Заметно, что расположение пятен совпадает (указаны стрелками)

В дальнейшем для изучения процессов экзо- и эндоцитоза синаптических везикул при синхронной и асинхронной секреции медиатора мы применяли Са- и Ва-растворы.

Экзо- и эндоцитоз синаптических везикул при синхронной и асинхронной секреции медиатора

Эффективность эндоцитоза синаптических везикул оценивали по загрузке красителя FM 1-43 при длительном высокочастотном раздражении в Са- и Ва-растворах. Известно, что эффективность захвата красителя FM 1-43 определяется интенсивностью процессов экзоцитоза синаптических везикул и секреции медиатора. Поэтому для загрузки красителя в Са- и Ва-растворах необходимо, чтобы за время раздражения освобождалось одинаковое количество квантов медиатора. Анализ кумулятивных кривых (сумма квантов, освободившихся синхронно и асинхронно, рис. 2А) показал, что 180000 квантов медиатора в Са- и Ва-растворах освобождаются примерно за 30 с раздражения. Именно такую продолжительность раздражения использовали для загрузки красителя в наших опытах. В этих условиях в Са- и Ва-растворах наблюдались ярко светящиеся пятна (интенсивность свечения нервных терминалей – 0.114 ± 0.008 ($n = 23$) и 0.119 ± 0.011 о.е. ($n = 20$) соответственно) (рис. 2Б, 3В). Полученные данные свидетельствуют о том, что как при синхронном,

так и асинхронном экзоцитозе везикул идут эффективные процессы рециклизации с образованием новых синаптических везикул посредством эндоцитоза.

Следующие эксперименты были направлены на оценку способности везикул, участвующих в асинхронной секреции медиатора, подвергаться синхронному экзоцитозу.

Для этого нервные окончания предварительно загружали FM 1-43 в Ва- или Са-растворе (стимуляции асинхронного или синхронного экзоцитоза соответственно), а затем сравнивали динамику выгрузки красителя при высокочастотном раздражении в Са-растворе (стимуляция синхронного экзоцитоза). Показано (рис. 3Б), что в этих условиях динамика выгрузки красителя была одинаковой. Через 1 мин раздражения предварительно загруженных нервных окончаний в Ва- и Са-растворах интенсивность свечения снижалась до 80.1 ± 1.2 ($n = 7$) и $76.0 \pm 1.2\%$ ($n = 7$) соответственно, а через 15 мин – до 55.9 ± 2.2 ($n = 7$) и $55.3 \pm 5.4\%$ ($n = 7$) соответственно, а флуоресцирующие пятна исчезали (рис. 2В). Таким образом, синаптические везикулы, участвовавшие в асинхронном экзоцитозе и секреции медиатора, были способны подвергаться синхронному экзоцитозу.

В нескольких экспериментах проводили детальный анализ светящихся пятен в нервных окончаниях одного и того же препарата, возникающих при стимуляции синхронной и асинхронной секреции. Для этого

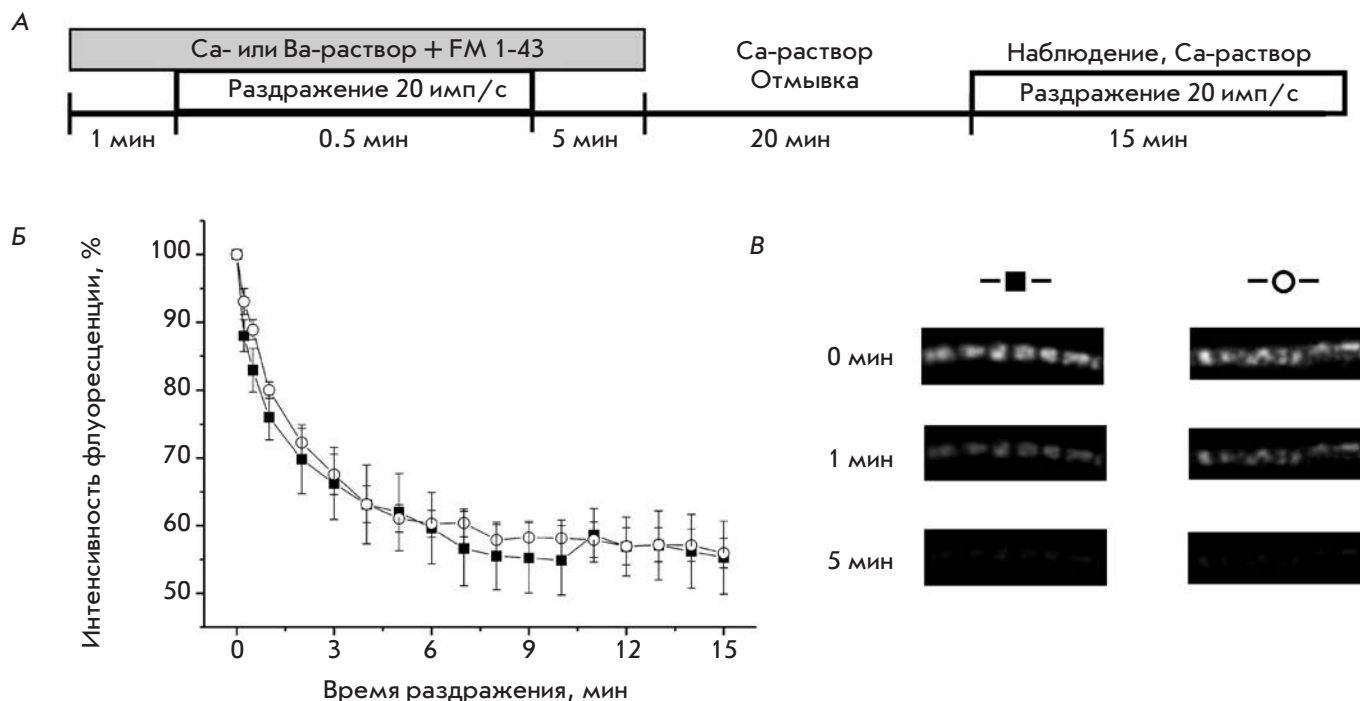


Рис. 3. Экзоцитоз синаптических везикул, загруженных красителем в Са- и Ва-растворах. **А** – схема эксперимента. Нервные окончания загружались красителем в Са- или Ва-растворе, а затем выгружались в Са-растворе. **Б** – динамика спада интенсивности флуоресценции (выгрузка красителя) нервных окончаний, предварительно загруженных в Са- (черные квадратики) и Ва- (белые кружочки) растворах, в % от первоначальной величины. **В** – примеры регистрации флуоресценции из **Б**

сначала анализировали пятна, возникающие при загрузке красителя в Са-растворе. Затем краситель выгружали (раздражение в течение 15 мин) и нервные окончания повторно загружали красителем в Ва-растворе с анализом пятен. Пространственный анализ светящихся пятен одного и того же нервного окончания в Са- и Ва-растворах выявил их идентичность (рис. 2Б). Полученные данные свидетельствуют о том, что как при синхронном, так и асинхронном экзоцитозе везикул процессы рециклизации происходят в одних и тех же участках нервного окончания, прилегающих к активным зонам.

Оценка участия везикул рециклирующего и резервного пула в асинхронной секреции медиатора

В данной части работы производили изолированную загрузку везикул либо рециклирующего, либо резервного пулов красителем FM 1-43 в Са-растворе с последующей оценкой способности их участия в асинхронной секреции медиатора. Для загрузки везикул рециклирующего пула использовали кратковременное (12 с) высокочастотное (20 имп/с) раздражение [26]. При этом в нервном окончании

появлялись слабосветящиеся пятна, отражающие скопления везикул рециклирующего пула в области активных зон. В последующем анализировали динамику выгрузки красителя при стимуляции синхронной (Са-раствор) и асинхронной (Ва-раствор) секреции медиатора. Различий в динамике снижения свечения не выявлено. Так, через 1 мин стимуляции в Са- и Ва-растворах интенсивность свечения нервных терминалей падала до 74.2 ± 4.3 ($n = 4$) и $72.2 \pm 3.4\%$ ($n = 5$) соответственно, а через 5 мин – до 60.8 ± 4.3 ($n = 4$) и $61.4 \pm 4.3\%$ ($n = 5$) соответственно (рис. 4Б,В).

Для загрузки резервного пула использовали модификацию протокола [26]. Первоначально проводили высокочастотное раздражение препарата в Са-растворе с FM 1-43 продолжительностью 3 мин. Данный протокол приводит к окрашиванию везикул рециклирующего и резервного пулов. После отмывки препарата снова производили высокочастотное раздражение, но в течение 25 с, что приводило к выбросу красителя везикулами рециклирующего пула. В результате оставшиеся в нервном окончании окрашенные синаптические везикулы принадлежали преимущественно резервному пулу [26].

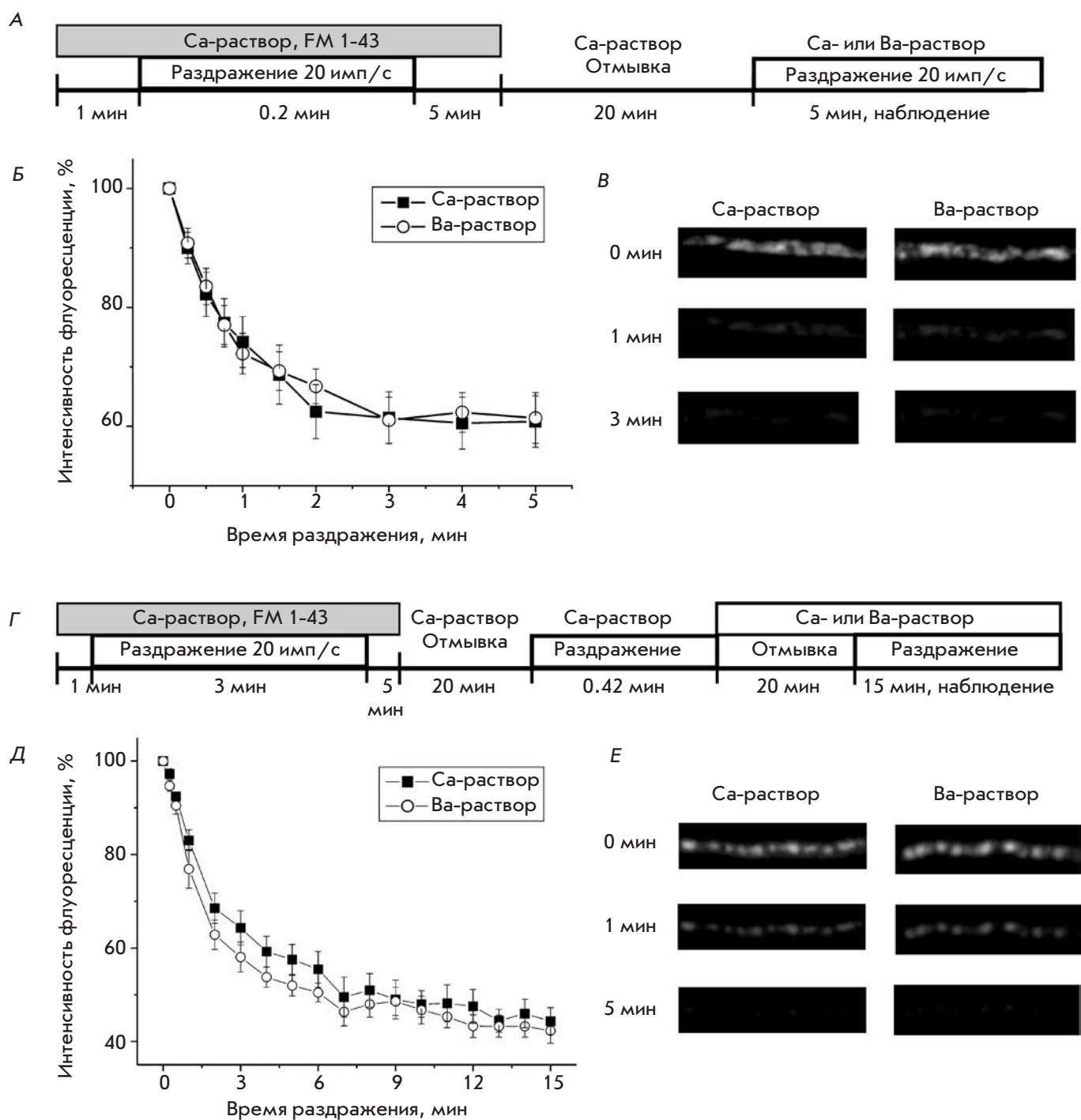


Рис. 4. Экзоцитоз синаптических везикул рециклирующего и резервного пулов в Са- и Ва-растворах. **А** – схема эксперимента по избирательной окраске и изучению экзоцитоза везикул рециклирующего пула. **Б** – динамика спада интенсивности флуоресценции нервных терминалей с предварительно окрашенным рециклирующим пулом при высокочастотном раздражении в Са- (черные квадратики) и Ва-растворах (белые кружочки). **В** – примеры регистрации флуоресценции нервных терминалей из **Б**. **Г** – схема опыта по избирательной окраске и изучению экзоцитоза везикул резервного пула. **Д** – динамика спада интенсивности флуоресценции нервных терминалей с предварительно окрашенным резервным пулом при высокочастотном раздражении в Са- (черные квадратики) и Ва-растворах (белые кружочки). **Е** – примеры регистрации флуоресценции нервных терминалей из **Д**.

Последующее высокочастотное раздражение окрашенных препаратов в Са-растворе (стимуляция синхронной секреции медиатора) и Ва-растворе (стимуляция асинхронной секреции медиатора) приводило к идентичному падению свечения нервных окончаний (рис. 4Д). Через 1 мин стимуляции в Са- и Ва-растворах интенсивность свечения нервных терминалей снижалась до 83.1 ± 2.2 ($n = 7$) и $76.9 \pm 4.1\%$ ($n = 6$) соответственно, а через 15 мин – до 44.3 ± 2.9 ($n = 7$) и $42.3 \pm 2.7\%$ ($n = 6$) соответственно (рис. 4Д,Е). Представленные данные свидетельствуют о том, что везикулы как рециклирующего, так и резервного пулов способны наряду с синхронной секрецией участвовать и в асинхронной секреции медиатора.

ОБСУЖДЕНИЕ

Недавно появились экспериментальные данные, указывающие на различия в механизмах синхронной и асинхронной секреции медиатора. Предположили, что запуск обоих видов вызванной секреции медиатора может осуществляться в области различных пресинаптических Са-каналов [9, 19, 27] с использованием различных белковых молекул, обеспечивающих процессы докирования и слияния синаптических везикул. Наиболее вероятными кандидатами на роль Са-сенсора синхронной секреции являются Са-связывающие белки синаптотагмины 1, 2, 9, а асинхронной секреции – синаптотагмин 7 и Doc2 [9]. В процессах регуляции синхронной секреции принимают участие белки комплексинсы и синаптотобревин 2, а асинхронной – VAMP4 и синапсин 2 [28–30]. Эти данные поднимают вопрос об идентичности пулов везикул, принимающих участие в синхронной и асинхронной секреции.

Полученные нами данные свидетельствуют о том, что одни и те же синаптические везикулы способны участвовать как в синхронной, так и в асинхронной секреции медиатора с одинаковыми процессами рециклизации. На это указывает способность везикул, прошедших цикл экзоцитоз–эндоцитоз, при синхронной секреции медиатора (Са-растворы) вовлекаться в асинхронный экзоцитоз в Ва-растворах (рис. 4). И наоборот, везикулы, которые первоначально участвовали в асинхронной секреции (Ва-растворы), способны в последующем участвовать в синхронной секреции (Са-растворы) (рис. 3Б,В). Эффективный захват красителя при стимуляции секреции в Ва-растворах (рис. 2Б, 3Б) свидетель-

ствует о том, что асинхронный выброс медиатора, так же как и синхронный, осуществляется посредством полного экзоцитоза везикул с последующим образованием новых везикул за счет эндоцитоза. Синхронный и асинхронный экзоцитоз происходит в одних и тех же участках нервного окончания в области активных зон, о чем свидетельствует полная идентичность расположения и конфигурации светящихся пятен при стимуляции секреции в Са- и Ва-растворах (рис. 2Б).

Способность везикул, относящихся к различным функциональным пулам нервного окончания, участвовать в асинхронной секреции медиатора была проверена в опытах с изолированной загрузкой красителем везикул рециклирующего и резервного пулов. Показано, что динамика выгрузки красителя из везикул как рециклирующего, так и резервного пулов при синхронной и асинхронной секреции медиатора абсолютно идентична, а интенсивность свечения снижалась до одинакового уровня (рис. 4Б,Д). Следовательно, оба пула везикул в одинаковой степени принимают участие как в синхронной, так и в асинхронной секреции медиатора. Наши исследования не подтвердили предположение некоторых авторов, что в нервном окончании может существовать обособленная популяция везикул, обеспечивающая асинхронную секрецию медиатора [18, 19], но не участвующая в вызванной, синхронной секреции.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, полученные нами данные позволяют считать, что источником для обоих видов вызванной секреции медиатора в нервно-мышечном синапсе служат одни и те же синаптические везикулы. Можно предполагать, что синаптическая везикула содержит набор белков, необходимый как для синхронной, так и для асинхронной секреции, а выбор вида вызванной секреции, в котором будет принимать участие синаптическая везикула, определяется динамикой ионов Ca^{2+} около везикулы, а также расположением везикулы по отношению к кальциевому каналу и свойствами Са-сенсоров экзоцитоза. ●

Авторы выражают благодарность А.В. Захарову за помощь в анализе экспериментальных данных.

Работа поддержана РФФИ (грант № 14-04-01232-а) и РНФ (№ 14-15-00847).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Katz B., Miledi R. // Proc. R. Soc. Lond. B. 1965. V. 161. P. 483–495.
2. van der Kloot W., Molgó J. // Physiol. Rev. 1994. V. 74. № 4. P. 899–991.
3. Khuzakhmetova V., Samigullin D., Nurullin L., Vyskočil F., Nikolsky E., Bukharaeva E. // Int. J. Dev. Neurosci. 2014. V. 34. P. 9–18.
4. Rahamimoff R., Yaari Y. // J. Physiol. 1973. V. 228. P. 241–257.
5. Atluri P., Regehr W. // J. Neurosci. 1998. V. 18. P. 8214–8227.

6. Зефилов А.Л., Мухамедьяров М.А. // Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 2004. Т. 90. № 8. С. 1041–1059.
7. Зефилов А.Л., Григорьев П.Н. // Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 2009. Т. 95. № 3. С. 262–272.
8. Bukharaeva E.A., Samigullin D., Nikolsky E.E., Magazanik L.G. // *J. Neurochem.* 2007. V. 100. № 4. P. 939–949.
9. Kaeser P.S., Regehr W.G. // *Annu. Rev. Physiol.* 2014. V. 76. P. 333–363.
10. Cummings D.D., Wilcox K.S., Dichter M.A. // *J. Neurosci.* 1996. V. 16. № 17. P. 5312–5323.
11. Sun J., Pang Z.P., Qin D., Fahim A.T., Adachi R., Sudhof T.C. // *Nature.* 2007. V. 450. P. 676–682.
12. Зефилов А.Л., Григорьев П.Н. // Бюл. эксп. биологии и медицины. 2008. Т. 146. № 12. С. 608–612.
13. Burgalossi A., Jung S., Meyer G., Jockusch W.J., Jahn O., Taschenberger H., O'Connor V.M., Nishiki T., Takahashi M., Brose N., Rhee J.S. // *Neuron.* 2010. V. 68. № 3. P. 473–487.
14. Rizzoli S.O., Betz W.J. // *Nat. Rev. Neurosci.* 2005. V. 6. № 1. P. 57–69.
15. Захаров А.В., Петров А.М., Котов Н.В., Зефилов А.Л. // Биофизика. 2012. Т. 57. № 4. С. 42–50.
16. Ramirez D.M., Kavalali E.T. // *Curr. Opin. Neurobiol.* 2011. V. 21. № 2. P. 275–282.
17. Sara Y., Virmani T., Deák F., Liu X., Kavalali E.T. // *Neuron.* 2005. V. 45. № 4. P. 563–573.
18. Otsu Y., Shahrezaei V., Li B., Raymond L.A., Delaney K.R., Murphy T.H. // *J. Neurosci.* 2004. V. 24. № 2. P. 420–433.
19. Peters J.H., McDougall S.J., Fawley J.A., Smith S.M., Andreassen M.C. // *Neuron.* 2010. V. 65. № 5. P. 657–669.
20. Зефилов А.Л., Захаров А.В., Мухаметзянов Р.Д., Петров А.М., Ситдикова Г.Ф. // Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 2008. Т. 94. № 2. С. 129–141.
21. Silinsky E.M. // *Pharmacol. Rev.* 1985. V. 37. P. 81–131.
22. Silinsky E.M. // *J. Physiol.* 1978. V. 274. P. 157–171.
23. Betz W.J., Bewick G.S., Ridge R.M. // *Neuron.* 1992. V. 9. № 5. P. 805–813.
24. Zefirov A.L., Abdrakhmanov M.M., Mukhamedyarov M.A., Grigoryev P.N. // *Neuroscience.* 2006. V. 143. № 4. P. 905–910.
25. Зефилов А.Л., Григорьев П.Н., Петров А.М., Минлебаев М.Г., Ситдикова Г.Ф. // Цитология. 2003. Т. 45. № 12. С. 34–41.
26. Gaffield M.A., Rizzoli S.O., Betz W.J. // *Neuron.* 2006. V. 51. № 3. P. 317–325.
27. Wen H., Linhoff M.W., Hubbard J.M., Nelson N.R., Stensland D., Dallman J., Mandel G., Brehm P. // *J. Neurosci.* 2013. V. 33. № 17. P. 7384–7392.
28. Raingo J., Khvotchev M., Liu P., Darios F., Li Y.C., Ramirez D.M., Adachi M., Lemieux P., Toth K., Davletov B., Kavalali E.T. // *Nat. Neurosci.* 2012. V. 15. P. 738–745.
29. Sudhof T.C., Rothman J.E. // *Science.* 2009. V. 323. P. 474–477.
30. Medrihan L., Cesca F., Raimondi A., Lignani G., Baldelli P., Benfenati F. // *Nat. Commun.* 2013. V. 4. № 1512. P. 1–13.