

УДК 612.816

Закисление цитоплазмы угнетает мобилизацию синаптических везикул в двигательных нервных окончаниях

А. Л. Зефирова^{1,2}, Р. Д. Мухамедзянов¹, А. В. Захаров^{1,3}, К. А. Мухутдинова²,
Ю. Г. Одношвикина¹, А. М. Петров^{1,2,4*}

¹Казанский государственный медицинский университет, кафедра нормальной физиологии, Казань, 420012 Россия

²Институт нейронаук, Казанский государственный медицинский университет, Казань, 420012 Россия

³Казанский федеральный университет, Казань, 420008 Россия

⁴Казанский институт биохимии и биофизики ФИЦ «Казанский научный центр РАН», Казань, 420111 Россия

*E-mail: fysio@rambler.ru

Поступила в редакцию 18.06.2020

Принята к печати 07.09.2020

DOI: 10.32607/actanaturae.11054

РЕФЕРАТ Внутриклеточные протоны играют особую роль в регуляции пресинаптических процессов, поскольку функционирование синаптических везикул и эндосомных структур зависит от закисления их содержимого H^+ -помпой. Более того, при синаптической активности в нервных окончаниях происходит закисление цитоплазмы. С использованием микроэлектродной регистрации постсинаптических сигналов (показатель секреции нейромедиатора) и экзо-эндоцитозного маркера FM1-43 нами изучено влияние закисления цитоплазмы пропионатом на пресинаптические процессы, обеспечивающие освобождение нейромедиатора. Обнаружено, что в диафрагме мыши и кожно-грудинной мышце лягушки внутриклеточный ацидоз вызывает выраженное снижение секреции нейромедиатора в начальную минуту 20 Гц-стимуляции. Это сопровождается резким замедлением освобождения FM1-43 в ходе экзоцитоза синаптических везикул в ответ на стимуляцию. Эксперименты с оценкой захвата FM1-43 показали отсутствие нарушений эндоцитоза синаптических везикул. Закисление полностью предотвращало действие проникающего через мембраны агента (24-гидроксихолестерина), усиливающего мобилизацию синаптических везикул. Мы предполагаем, что повышение $[H^+]_{in}$ угнетает нейротрансмиттерную передачу за счет замедления доставки синаптических везикул в сайты экзоцитоза при интенсивной активности. Этот механизм может регулировать секрецию нейромедиатора по принципу отрицательной обратной связи.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА экзоцитоз, транспорт синаптических везикул, нейротрансмиттерная передача, ацидификация, нервно-мышечный синапс.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ АЗ – активная зона; НО – нервное окончание; СВ – синаптическая везикула; ПКП – потенциалы концевой пластинки.

ВВЕДЕНИЕ

Синаптическая передача базируется на освобождении нейромедиатора из синаптических везикул (СВ) путем экзоцитоза в ответ на прибытие потенциала действия из аксона в нервное окончание (НО). Этот механизм носит универсальный характер и зависит от поступления СВ (мобилизации) в сайты экзоцитоза – активные зоны (АЗ), где сконцентрированы белки экзоцитоза и потенциалзависимые Ca^{2+} -каналы [1]. В свою очередь, мобилизация определяется количеством доступных СВ, которые располагаются рядом с АЗ, и поступлением СВ, вновь сформирован-

ных посредством эндоцитоза сразу после экзоцитоза. В условиях постоянной ритмической или умеренно-частотной активности скорость мобилизации определяет уровень секреции нейромедиатора, а следовательно, надежность нейротрансмиттерной передачи [2, 3].

Фундаментальные механизмы, контролирующие мобилизацию СВ, до сих пор недостаточно изучены. Установлено важное значение цитоскелета, моторных белков и малых GTP-аз в контроле движения СВ [4]. Однако значимость такого важного фактора, как величина цитоплазматического рН, не выяснена. Хотя известно, что в процессе синаптической

активности внутри НО происходят изменения рН, связанные с работой протонной помпы и везикулярных транспортеров нейромедиатора, которые встраиваются в пресинаптическую мембрану после экзоцитоза СВ, сохраняя функциональную активность [5, 6]. Также обмен Ca^{2+} на протоны Ca^{2+} -АТФ-азой пресинаптической мембраны может участвовать в закислении цитоплазмы в ответ на повышение $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{in}}$ при деполяризации, в то время как Na^+/H^+ -обменник участвует в восстановлении рН внутри НО [7]. Показано, что интенсивная стимуляция вызывает снижение рН цитозоля НО в нервно-мышечных синапсах плодовой мушки, а также мыши и крысы [5–7]. Однако значение внутриклеточного ацидоза, вызванного синаптической активностью, для пресинаптических процессов не выяснено.

В ранних работах показано, что клатринзависимый эндоцитоз может ингибироваться при сильном падении рН в клетках [8]. Это может определяться нарушением сборки клатринового покрытия, функционирования адаптерных белков, снижением синтеза фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфатов [9, 10]. Однако транслировать это на синаптический аппарат нельзя, поскольку процессы эндоцитоза в синапсе высокоспециализированы и требуют участия специфического набора белков; также в синапсе сосуществуют несколько вариантов эндоцитоза, в том числе, не зависящие от клатрина [11]. Так, ингибитор карбоангидразы, снижая рН в цитозоле, переключает тип эндоцитоза в нервно-мышечном синапсе мыши на клатриннезависимый [12].

В целом, пока нет понимания того, как снижение цитоплазматического рН может влиять на секрецию нейромедиатора и мобилизацию СВ при продолжительной активности. В представленной работе, используя электрофизиологическую детекцию освобождения нейромедиатора и флуоресцентный метод для слежения за процессами экзо-эндоцитоза, впервые показано, что закисление цитоплазмы способно выразенно ингибировать мобилизацию СВ в нервно-мышечных синапсах холоднокровных и теплокровных животных. Мы предполагаем, что этот феномен может быть новым физиологическим механизмом регуляции транспорта СВ при синаптической активности.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Эксперименты проведены на изолированных нервно-мышечных препаратах диафрагмальной мышцы белых мышей и кожно-грудинной мышцы озерных лягушек (*Rana ridibunda*) в осенне-зимний период в соответствии со стандартами по использованию лабораторных животных. Экспериментальный протокол, соответствующий Директиве 2010/63/EU

по проведению экспериментов на животных, получил одобрение этического комитета Казанского медицинского университета.

Растворы и реактивы

Мышцу растягивали и фиксировали в ванночке объемом 5 мл при непрерывной перфузии. В экспериментах на мышце мыши использовали насыщенный кислородом раствор Кребса следующего состава (ммоль/л): NaCl – 144.0, KCl – 5.0, MgCl_2 – 0.1, CaCl_2 – 2.0, NaH_2PO_4 – 1.0, NaHCO_3 – 2.4, глюкоза – 11.0. В экспериментах на мышце лягушки использовали раствор Рингера (ммоль/л): NaCl – 115.0, KCl – 2.5, CaCl_2 – 1.8, NaHCO_3 – 2.4. рН растворов поддерживали на уровне 7.3–7.4 при температуре 20°C. Для блокирования сокращений мышечных волокон использовали *d*-тубокурарин (2–5 мкМ). Для индукции закисления цитоплазмы использовали модифицированные растворы Кребса и Рингера, в которых часть хлорида натрия (именно 72 ммоль/л) была замещена на пропионат натрия. В итоге концентрация пропионата натрия в модифицированных растворах составила 72 ммоль/л; рН и осмотичность при этом поддерживались на том же уровне, что и в нормальных физиологических растворах. Использовали реактивы фирмы Sigma-Aldrich (США). Эксперименты начинали после перфузии препаратов растворами с пропионатом в течение 45–50 мин. 24-Гидроксистерин (0.4 мкМ) апплицировали на 15 мин.

Электрофизиология

Потенциалы концевой пластинки (ПКП) регистрировали внутриклеточно стеклянными микроэлектродами (диаметр кончика менее 1 мкм, сопротивление 5–20 МОм), заполненными 3 М KCl . Для усиления и регистрации ПКП использовали автоматизированную систему, созданную на базе усилителя (модель 1600 А-М System) и АЦП (ЛА-2USB), под контролем оригинального программного обеспечения Elph [13]. Двигательный нерв раздражали прямоугольными импульсами длительностью 0.1–0.2 мс с частотой 20 Гц в течение 3 мин (стимулятор модель 2100 А-М). Затем частоту стимуляции снижали до 0.3 Гц и регистрировали восстановление амплитуды ПКП [14, 15].

Квантовый состав ПКП рассчитывали с использованием модифицированного метода вариаций, детально описанного нами ранее [3]. С этой целью определяли 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 (фаза «плато», обычно первые 10–30 с). По колебаниям площади ПКП в этом участке можно рассчитать квантовую величину, т.е. среднюю вели-

чину площади ПКП, производимую одним квантом медиатора (q): $q = \sigma^2 / \langle V \rangle$, где σ – стандартное отклонение площади ПКП, $\langle V \rangle$ – средняя площадь ПКП на данном участке. Далее можно определить квантовый состав каждого ПКП в серии: $m_i = V_i / q$, где m_i – квантовый состав i -го ПКП, V_i – площадь i -го ПКП.

Флуоресцентная микроскопия

Флуоресценцию наблюдали с помощью микроскопа Olympus BX-51WI. Использовали объективы Olympus UPLANSapo с увеличением 60 и LumPlanPF с увеличением 100. Изображения регистрировали видеокамерой DP71 (Olympus) под контролем программы CellSens (Olympus). Программа ImagePro (Media Cybernetics) была использована для анализа свечения.

Краситель FM1-43 (5 мкМ) использовали для оценки эндо-экзоцитоза СВ. FM1-43 обратимо связывается с пресинаптической мембраной и в ходе эндоцитоза оказывается внутри вновь образующихся СВ («загружается»). При загрузке красителя в НО появляются светящиеся пятна, отражающие скопления СВ в области АЗ [16, 17]. Для оценки эндоцитоза СВ FM1-43 присутствовал в течение стимуляции и 10 мин после ее завершения, чтобы процессы эндоцитоза, вызванные стимуляцией экзоцитоза, полностью завершились. После этого препарат отмывали в течение 40 мин в физиологическом растворе, содержащем реагент ADVASEP-7 (5 мкМ), способствующий диссоциации FM1-43 с поверхностных мембран [18]. Образованные в результате эндоцитоза СВ, захватившие FM1-43, начинают терять его при новом раунде экзоцитоза. Чтобы оценить динамику экзоцитоза, предварительно загруженные (с помощью стимуляции – 3 мин, 20 Гц) FM1-43-препараты повторно стимулировали (10–20 мин, частота 20 Гц), анализировали снижение интенсивности флуоресценции вследствие экзоцитоза красителя (выгрузка) [19]. Свойства маркера FM1-43 не зависят от рН в диапазоне 5–9 [20], 0,4 мкМ 24-ГХ также не влияет на флуоресценцию FM1-43 [21, 22].

Флуоресценцию FM1-43 детектировали с использованием возбуждающего светофильтра 480/10 нм, дихроического зеркала 505 нм и эмиссионного фильтра 535/40 нм. Свечение оценивали как среднюю яркость пикселей в регионе интереса после вычитания фонового свечения. При определении скорости потери красителя в ходе выгрузки начальное свечение НО до начала стимуляции принимали равным 1.0.

Радиометрический флуоресцентный индикатор BCECF AM (Molecular Probes) был использован как сенсор цитоплазматического рН. Мышцы инкубировали в течение 15 мин с 5 мкМ красителя, после чего перфузировали в течение 30 мин для сниже-

ния фоновой флуоресценции. Загруженные красителем синаптические контакты освещали попеременно вспышками света (1 с, 505/10 и 450/10 нм), флуоресценцию детектировали в синаптическом регионе, используя широкополосный эмиссионный фильтр 530 нм. Отношение флуоресценции I^{505} / I^{450} при возбуждении на двух длинах волн использовали для оценки величины внутриклеточного рН. Снижение отношения I^{505} / I^{450} указывает на уменьшение значений рН в цитоплазме. В конце каждого эксперимента мышцы перфузировали фосфатным буфером (ммоль/л: NaCl – 138, KCl – 2.7, Na_2HPO_4 – 10, KH_2PO_4 – 1.8) с 10 мкМ нигерицина для выравнивания вне- и внутриклеточного рН, затем отношение I^{505} / I^{450} оценивали при экспозиции препарата буфером с различными значениями рН (7.4–7.1) для калибровки [5].

Статистика

Результаты представлены как среднее \pm стандартная ошибка, n – количество независимых экспериментов на отдельных животных (указано в подписях к рисункам). Для сравнения двух независимых выборок использовали U-критерий Манна–Уитни; статистически значимыми считали отличия на уровне $P < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Мониторинг закисления внутриклеточной среды

Известно, что анионы слабых кислот закисляют внутреннюю среду клеток. При этом для моделирования внутриклеточного ацидоза широко используется пропионат [23]. Пропионовая кислота в недиссоциированной форме проникает в цитоплазму, где она диссоциирует, уменьшая рН. Действительно, слежение за цитоплазматическим рН с помощью BCECF показало, что аппликация пропионата вела к снижению отношения I^{505} / I^{450} , указывая на снижение рН в препаратах мышцы и лягушки (рис. 1А,Б). К 40 мин аппликации пропионата отношение I^{505} / I^{450} уменьшалось до стационарного уровня, ~60–65% по сравнению с исходным (на ~0.25 единицы рН). Это соизмеримо с ранее оцененным изменением рН под влиянием пропионата в синапсах крысы [5]. В контроле отношение I^{505} / I^{450} оставалось на одинаковом уровне в течение 40 мин (рис. 1А,Б), что указывает на стабильность рН_{in} в покое. Стимуляция (20 Гц) вела к временному снижению I^{505} / I^{450} в синаптическом регионе (рис. 1А,Б). Это согласуется с представлениями, что при синаптической активности происходит закисление внутриклеточной среды НО, а после завершения активности рН восстанавливается с медленной кинетикой [5–7].

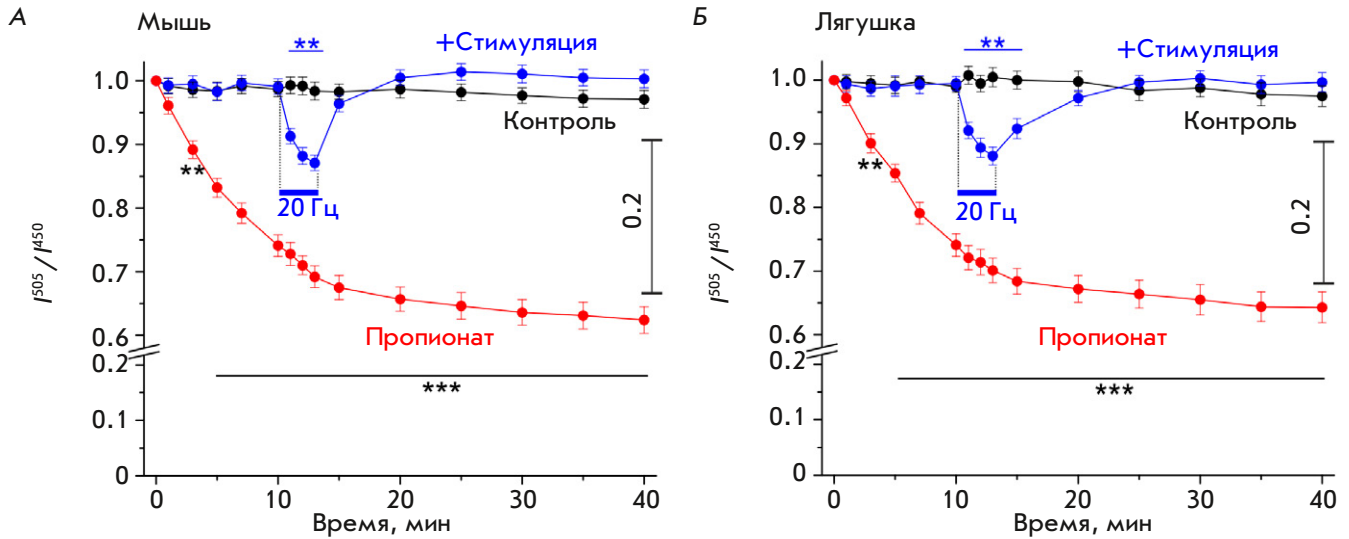


Рис. 1. Мониторинг цитоплазматического pH в синаптическом регионе. Отношение интенсивностей флуоресценции BCECF при возбуждении светом с длиной волны 505 и 450 нм (I^{505}/I^{450}) служит индикатором pH и снижается при его уменьшении. А, Б – измерения I^{505}/I^{450} в синаптических регионах мыши (А) и лягушки (Б) в покое (контроль), при стимуляции (3 мин, 20 Гц, показано синим сегментом) в присутствии пропионата (72 ммоль/л). Ось ординат: отношение I^{505}/I^{450} в начальный момент принято за 1.0. $n = 7$ для каждой кривой. Шкала справа иллюстрирует снижение соотношения I^{505}/I^{450} при уменьшении внутриклеточного pH на 0.2 единицы. Планки погрешностей – стандартные ошибки. $**P < 0.01$, $***P < 0.001$ – статистическая значимость различий между кривыми

Динамика секреции нейромедиатора. Влияние закисления внутриклеточной среды

Продолжительная синаптическая активность поддерживается за счет доставки СВ (мобилизации) из рециклирующего и резервного пулов в АЗ с последующим освобождением нейромедиатора [1, 3]. В контроле при раздражении диафрагмального нерва мыши электрическими импульсами (при частоте 20 Гц) квантовый состав ПКП быстро падал за первые 5–10 импульсов до 20–25% от исходного значения (155 ± 20 квантов). Затем квантовый состав стабилизировался и медленно снижался к 3 мин раздражения, составляя 10–15% от первоначального. После окончания раздражения быстро происходило восстановление квантового состава ПКП до 50% от исходного уровня (6 ± 2 с, рис. 2А). Подобная динамика ПКП в ответ на 20 Гц-стимуляцию и быстрое восстановление секреции согласуется с представлениями, согласно которым в двигательных НО мыши секреция нейромедиатора при 20 Гц-стимуляции обеспечивается вначале везикулами готового к освобождению пула и затем рециклирующего пула [2, 3]. СВ рециклирующего пула быстро восстанавливаются посредством эндоцитоза, повторно участвуя в освобождении нейромедиатора.

Аппликация пропионата не вызывала статистически значимого изменения квантового состава первого ПКП (128 ± 17 квантов, $P < 0.05$), однако заметно ускоряла депрессию ПКП в нервно-мышеч-

ных синапсах мыши (рис. 2А). В итоге к 3 мин 20 Гц-стимуляции квантовый состав снижался до 3–5% от исходного. Восстановление квантового состава после прекращения раздражения происходило медленнее, чем в контроле (до 50% от исходного значения за 13 ± 3 с). Для количественной оценки секреции медиатора строили кумулятивные кривые, суммируя квантовые составы каждого ПКП за 3 мин 20 Гц-раздражения, и определяли общее количество квантов, освободившихся из НО. Оказалось, что за 3 мин раздражения в контроле освобождалось $(90 \pm 3.9) \times 10^3$ квантов, эта величина была существенно меньше при действии пропионата ($P < 0.01$) – $(51 \pm 2.8) \times 10^3$ квантов (рис. 2Б). Следовательно, закисление цитоплазмы НО мыши заметно угнетает нейротрансдукцию при интенсивной синаптической активности за счет ослабления освобождения нейромедиатора СВ рециклирующего пула.

В кожно-грудинной мышце лягушки 20 Гц-стимуляция сопровождалась первоначальным (в течение 30–40 раздражений) падением квантового состава ПКП до примерно 80% от исходного уровня (272 ± 30 квантов). Затем квантовый состав стабилизировался на 3–5 с (плато) и далее постепенно уменьшался к 3 мин раздражения до 10–15% от исходного значения (рис. 2В). Восстановление квантового состава после прекращения 20 Гц-раздражения происходило за 18 ± 3 с до 50% от исходной величины. Подобная динамика указывает на то, что в секреции участвует

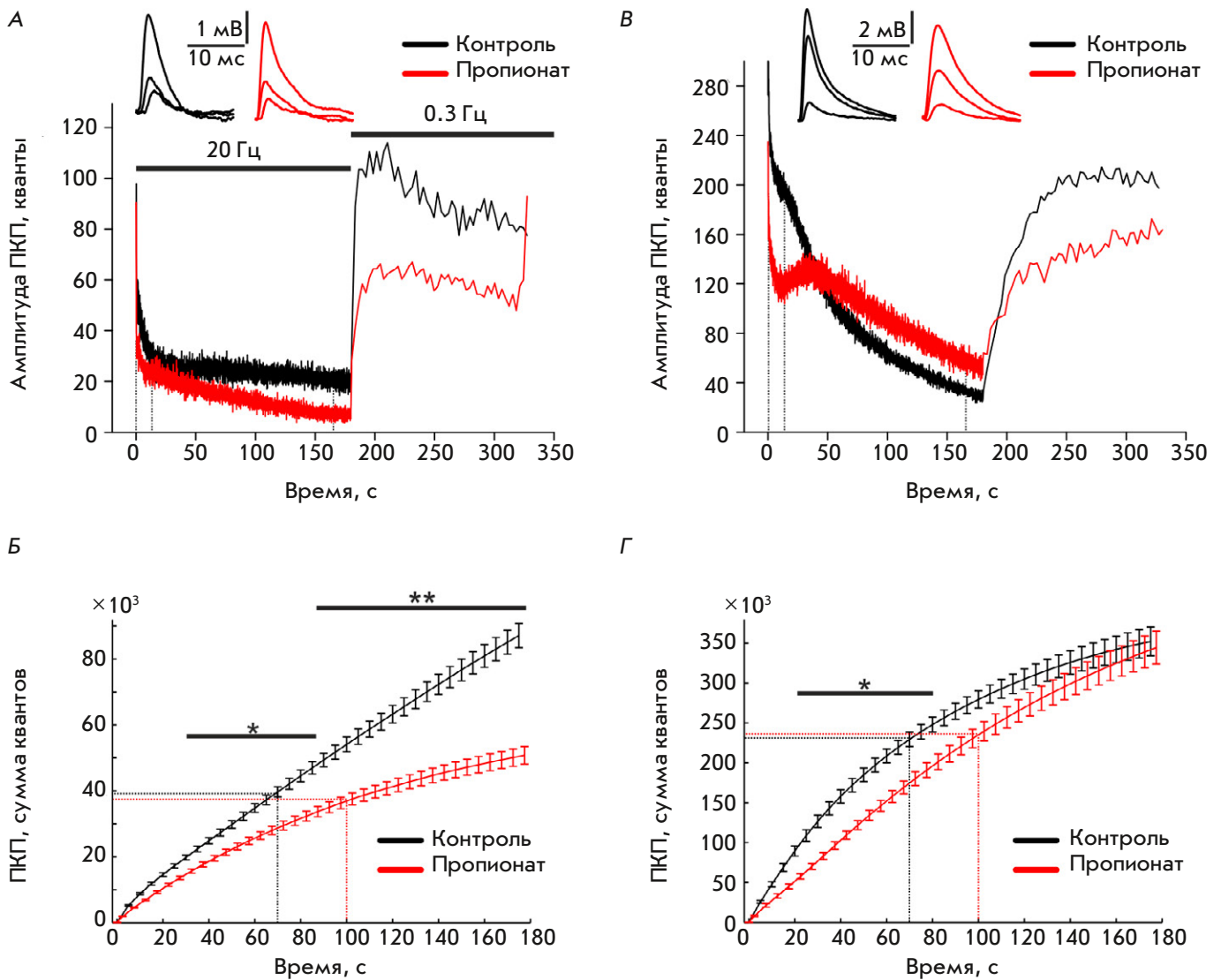


Рис. 2. Динамика секреции медиатора при раздражении с частотой 20 Гц. *A, B* – изменение квантового состава ПКП в двигательном НО мыши (*A*) и лягушки (*B*) при стимуляции в контроле и при закислении внутриклеточной среды пропионатом. Также показано восстановление квантового состава после 20 Гц-стимуляции. Сверху нативные ПКП в моменты стимуляции, отмеченные на графиках пунктирными линиями. Приведены усредненные кривые, $n = 5$. *Б, Г* – кумулятивные кривые квантовых составов ПКП при 20 Гц-раздражении в двигательном НО мыши (*Б*) и лягушки (*Г*). Планки погрешностей – стандартные ошибки. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ – статистическая значимость различий между кривыми; $n = 5$. Пунктирные линии указывают на времена (70 и 100 с), при которых в контроле и на фоне действия пропионата освобождается примерно одинаковое количество квантов

не только немедленно готовый к освобождению и рециклирующий пул, но и резервный пул [2, 3, 24].

В кожно-грудинной мышце лягушки на фоне действия пропионата квантовый состав первого ПКП не отличался значимо от контроля, составляя 227 ± 35 квантов, первоначальная депрессия ПКП была более выраженной, а фаза плато характеризовалась большей длительностью. Восстановление квантового состава после 20 Гц-стимуляции происходило медленнее по сравнению с контролем (до 50% за 21 ± 3 с)

(рис. 2B). Сравнение кумулятивных кривых квантовых составов ПКП указывает на снижение секреции под действием пропионата, выраженное в 1-ю минуту 20 Гц-стимуляции (рис. 2Г), затем к 3 мин стимуляции секреция достигала контрольных значений, составляя $(347 \pm 13) \times 10^3$ квантов (в контроле $(355 \pm 17) \times 10^3$ квантов). Таким образом, в НО лягушки закисление цитоплазмы угнетает освобождение нейромедиатора в период, когда секреция происходит за счет СВ рециклирующего пула.

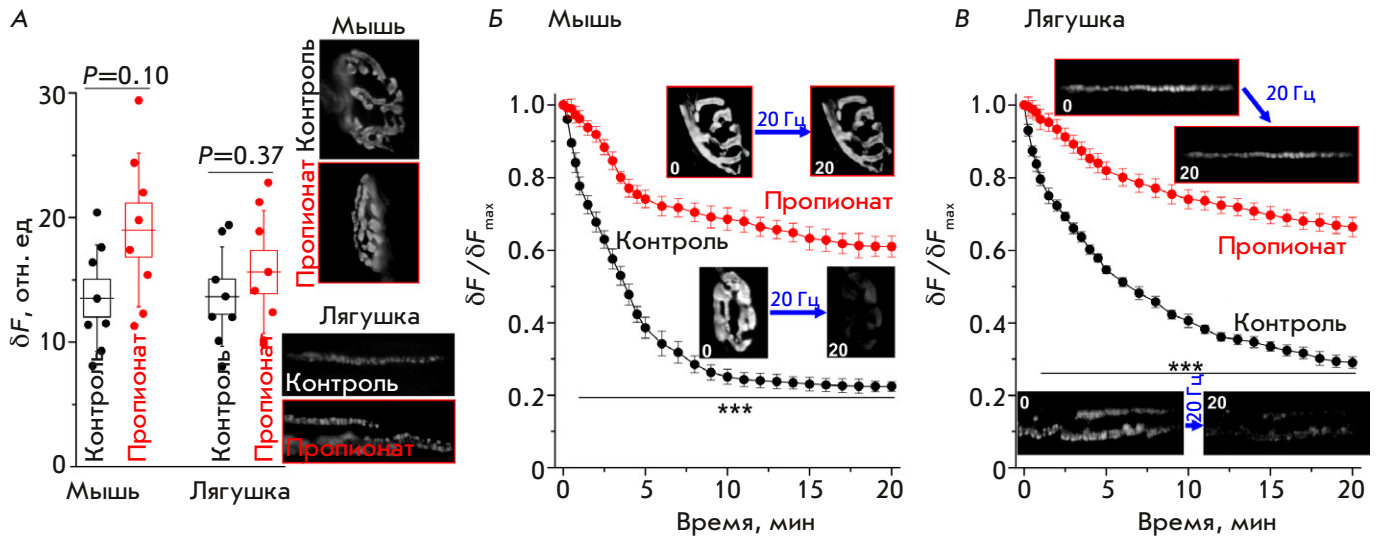


Рис. 3. Эндоцитоз и экзоцитоз в ответ на 20 Гц-стимуляцию. **А** – загрузка FM1-43 эндоцитозом в двигательные НО в контроле и на фоне действия пропионата. Показаны диаграммы размаха, границы рамки и планки – стандартная ошибка и отклонение соответственно. Справа – репрезентативные флуоресцентные изображения после вычитания фоновой флуоресценции. $n = 8$ для каждой группы. Ось ординат: флуоресценция в относительных единицах (отн. ед.) за вычетом фонового значения. **Б, В** – выгрузка экзоцитозом FM1-43 из НО мыши (**Б**) и лягушки (**В**) при 20 Гц-стимуляции в контроле и в присутствии пропионата. $n = 8$ для каждой кривой. Изображения иллюстрируют снижение флуоресценции НО после 20 мин стимуляции. Планки погрешностей – стандартные ошибки. *** $P < 0.001$ – различия между кривыми. Ось ординат: нормированная флуоресценция, где 1.0 – значение непосредственно до начала стимуляции

Эндо- и экзоцитоз на фоне внутриклеточного закисления

Эндоцитоз. Учитывая, что в НО закисление угнетало освобождение нейромедиатора, зависимое от рециклирующего пула, существует возможность нарушения эндоцитоза. Для проверки этой возможности оценили эндоцитозный захват в НО FM1-43. Эндоцитоз СВ следует за экзоцитозом и осуществляется в соотношении 1 : 1. Поэтому мы выбрали длительность 20 Гц-стимуляции, при которой в контрольной и опытной сериях наблюдается одинаковый уровень секреции и, следовательно, происходит экзоцитоз одинакового количества СВ. Анализ кумулятивных кривых секреции медиатора (рис. 2Б, Г) показал, что при раздражении в течение 70 с в контроле и 100 с в пропионате освобождается примерно одинаковое количество квантов медиатора. Если процессы эндоцитоза не нарушаются, то можно ожидать схожего уровня загрузки FM1-43 при выбранных условиях. Действительно, интенсивность свечения НО мыши и лягушки в присутствии пропионата натрия не отличалась статистически значимо от таковой в контроле (рис. 3А).

Кинетика экзоцитоза. Динамику экзоцитоза СВ при длительном 20 Гц-раздражении оценивали по выгрузке красителя FM1-43 из НО. В синапсах мыши в контроле флуоресценция постепенно снижа-

лась в течение 10 мин стимуляции до 25–30%, далее изменения были медленными (рис. 3Б). При закислении цитоплазмы выгрузка FM1-43 существенно замедлялась, и интенсивность свечения падала к 10 мин раздражения только до ~70% от начального уровня (рис. 3Б). Следовательно, пропионат угнетает участие в экзоцитозе СВ, обеспечивающих у мыши нейротрансдукцию при 20 Гц-стимуляции.

В контроле у лягушки снижение свечения происходило в две фазы – быстро, в течение первых 2 мин (до 70% от исходного уровня), а затем медленнее (рис. 3В). К 20 мин стимуляции флуоресценция падала до 25–30%. При закислении цитоплазмы выгрузка FM1-43 угнеталась; особенно ярко скорость снижения свечения падала в первые 2 мин стимуляции (флуоресценция уменьшалась только до ~95% от исходной). К 20 мин 20 Гц-стимуляции интенсивность свечения уменьшалась до ~70% от начальной (рис. 3В). Таким образом, в НО лягушки пропионат выражено подавляет вовлечение в экзоцитоз СВ рециклирующего пула, поддерживающих нейротрансдукцию в первые минуты 20 Гц-стимуляции двигательного нерва.

Закисление цитоплазмы и эффект 24-гидроксихолестерина на динамику экзоцитоза
Ранее мы показали, что 24-гидроксихолестерин может усиливать мобилизацию СВ при 20 Гц-

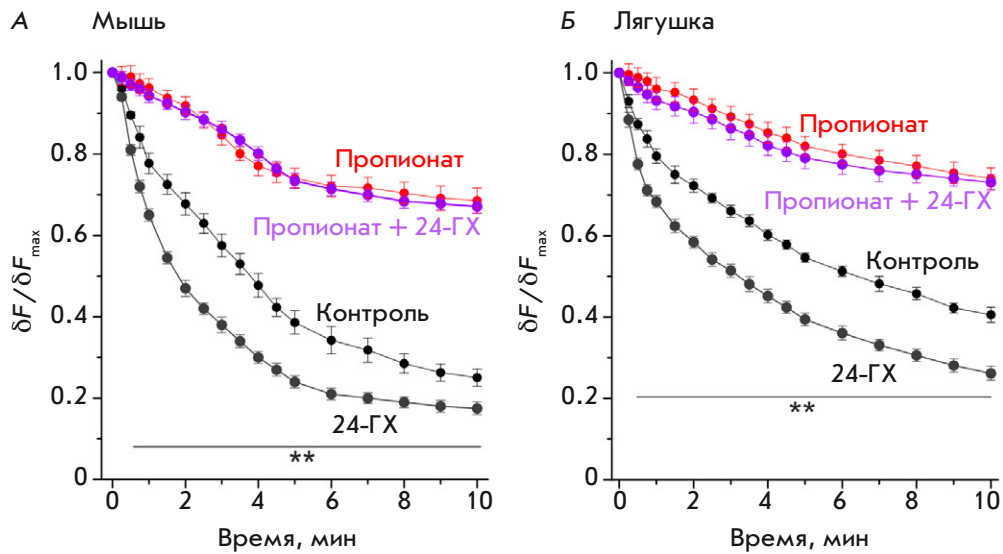


Рис 4. Влияние закисления цитоплазмы на эффект 24-гидроксихолестерина (24-ГХ) на экзоцитоз при 20 Гц-стимуляции. А, Б – динамика выгрузки красителя FM1-43 из двигательных НО мыши (А) и лягушки (Б) при аппликации 24-ГХ в контроле и на фоне действия пропионата. $n = 8$ для каждой кривой. Показаны также кривые в контроле и в присутствии пропионата (из рис. 3Б,В). Плоские погрешности – стандартные ошибки. $**P < 0.01$ – статистическая значимость различий между контролем и действием 24-ГХ. Ось ординат: нормированная флуоресценция, где 1.0 – значение непосредственно перед началом стимуляции

стимуляции в нервно-мышечных синапсах [21]. Обработка 24-гидроксихолестерином (0.4 мкМ) ускоряла выгрузку FM1-43 при 20 Гц-стимуляции (рис. 4А,Б). Эффект выражен в схожей степени в НО мыши и лягушки. На фоне действия пропионата 24-гидроксихолестерин полностью утрачивал способность ускорять темп выброса FM1-43 в ходе экзоцитоза (рис. 4А,Б). Следовательно, внутриклеточное закисление блокировало возможность ускорения мобилизации СВ при 20 Гц-активности.

ОБСУЖДЕНИЕ

Многочисленные регуляторные контуры, действующие на экзоцитоз, мобилизацию и эндоцитоз СВ, обеспечивают должный уровень освобождения нейромедиатора в ходе синаптической активности. В представленном исследовании впервые получены данные, указывающие на угнетение мобилизации СВ при закислении внутриклеточной среды. Причем этот феномен наблюдали в НО как мыши, так и лягушки, что указывает на общие механизмы действия внутриклеточного ацидоза.

Пропионат эффективно снижал внутриклеточный pH на ~0.25, что в 2 раза превосходит степень закисления, вызванного стимуляцией двигательного нерва импульсами при частоте 20 Гц. Анализ постсинаптических ответов показал, что пропионат не менял значимо квантовый состав в ответ на пер-

вый стимул, тогда как ускорял депрессию секреции нейромедиатора в ответ на 20 Гц-стимуляцию. В подобных условиях секреция зависит от доставки СВ в АЗ. В синапсах мыши эффект пропионата ярко проявлялся на всем протяжении стимуляции, а в синапсах лягушки – только в первую минуту стимуляции. Подобная специфика действия пропионата связана, вероятно, с особенностями вовлечения пулов СВ в нейротрансдукцию при 20 Гц-стимуляции. В частности, в двигательных НО мыши при 20 Гц-активности рециклирующий пул обеспечивает длительное освобождение нейромедиатора, тогда как в двигательном НО лягушки этот пул поддерживает секрецию главным образом в течение первой минуты стимуляции, после чего СВ резервного пула используются для нейротрансдукции. Таким образом, пропионат, по-видимому, угнетает вовлечение СВ рециклирующего пула в секрецию. Такая избирательность внутриклеточного ацидоза согласуется с представлениями о существовании независимых путей регуляции рециклирующего и резервного пулов [15, 19, 25–27]. Более того, темп депрессии секреции нейромедиатора в нервных окончаниях лягушки при воздействии пропионата замедлялся после 60 с, в итоге за 3 мин стимуляции количество освобожденных квантов медиатора не отличалось от количества в контроле. Подавление рекрутирования СВ рециклирующего пула способствует, воз-

можно, освобождению нейромедиатора СВ резервного пула.

Участие СВ рециклирующего пула определяется как их мобилизацией в сайты экзоцитоза, так и их образованием путем эндоцитоза. Оценка захвата FM1-43 показала, что пропионат не нарушает эндоцитоз, реформирующий СВ, после их экзоцитоза. Однако пропионат заметно снижает скорость выброса красителя FM1-43 из СВ в течение 20 Гц-стимуляции. Это непосредственно указывает на ослабление доставки СВ в АЗ. Примечательно, что особенно сильное замедление освобождения FM1-43 в НО лягушки наблюдалось в первую минуту 20 Гц-раздражения. Это согласуется с предположением о нарушении мобилизации СВ рециклирующего пула под влиянием внутриклеточного ацидоза.

Механизмы, регулирующие мобилизацию СВ, организованы иерархично и координированно. Холестерин, его содержание в мембранах и метаболиты действуют как мощные регуляторы транспорта СВ и в ЦНС, и в нервно-мышечных синапсах [22, 28–31]. Ранее мы обнаружили, что главный метаболит холестерина в мозге – 24-гидроксихолестерин, который производится преимущественно нейронами, в том числе в синаптических регионах, способен усиливать участие СВ рециклирующего пула в освобождении нейромедиатора в нервно-мышечных синапсах мышцы [21]. При этом эффект гидроксихолестерина зависит от протеинкиназы G, которая контролирует функционирование рециклирующего пула СВ в НО лягушки [19]. Оказалось, что 24-гидроксихолестерин ускоряет освобождение FM1-43 в ходе экзоцитоза в НО мышцы и лягушки, тогда как пропионат полностью предотвращает его действие. Следовательно, закисление цитоплазмы может быть доминирующим фактором, препятствующим усилению освобождения нейромедиатора в ответ на гуморальные влияния.

Связь внутриклеточного ацидоза с мобилизацией СВ имеет, возможно, физиологическое и (или) патологическое значение. Временное снижение рН в НО [5–7] может подавлять мобилизацию СВ для ограничения освобождения нейромедиатора при интенсивной активности. Таким образом может формироваться механизм отрицательной обратной связи, лимитирующий секрецию при интенсивной активности. Замедление доставки СВ в АЗ также способно предоставлять время для полного протекания эндоцитоза СВ и, следовательно, пополнения рециклирующего пула. Снижение внутриклеточного рН в нейронах происходит при широком спектре пато-

логических состояний (метаболические нарушения, ишемия, эпилептическая активность, нейродегенеративные заболевания) и старении [32–34]. В подобных условиях повышенное освобождение глутамата и ацетилхолина вызывает повреждение центральных и нервно-мышечных синапсов [35, 36], а олесоксим, способный увеличивать приток анионов хлора (следовательно, протонов) в НО и ограничивать освобождение нейромедиатора, обладает выраженными нейрорепротивными свойствами [31]. Схожим образом антиэпилептический препарат леветирацетам снижает рН в неокортикальных нейронах, что, вероятно, вносит вклад в антиконвульсантные свойства препарата [37]. Небольшая ацидификация цитоплазмы также может лежать в основе антиконвульсантного действия короткоцепочечных монокарбоксилатов и кетоновых тел [23]. Потенциально системный кетоацидоз может ограничивать двигательную производительность, угнетая нервно-мышечную передачу на уровне мобилизации СВ.

Молекулярный механизм действия внутриклеточного рН на транслокацию СВ в АЗ неизвестен. Он может быть связан с изменениями в работе митохондрий [38], Ca²⁺-сигнализации [39] и белок-белковых взаимодействий [40]. Высокая чувствительность этапа мобилизации СВ рециклирующего пула к изменению рН предполагает наличие рН-сенсора. Возможно, перемещение СВ с помощью моторных белков по актиновым филаментам в рециклирующий пул угнетается при снижении рН в НО. Так, локальные взаимодействия F-актина с миозином сильно зависят от величины рН [41].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Значение рН в цитоплазме пресинаптических НО снижается в ответ на увеличение синаптической активности в физиологических условиях; более выраженное падение рН может происходить при патологиях. В представленной работе впервые получены данные, указывающие на способность закисления цитоплазмы ограничивать нейротрансдукцию посредством угнетения мобилизации СВ в АЗ при интенсивной активности. Этот феномен может быть частью сложного механизма, регулирующего нейротрансдукцию на основе кислотно-основных процессов в нейроне. ●

Работа поддержана частично грантами РФФИ № 20-015-00507 и 20-04-00077, а также государственным заданием ФИЦ КазНЦ РАН.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Dittman J.S., Ryan T.A. // *Nat. Rev. Neurosci.* 2019. V. 20. № 3. P. 177–186.
2. Зефирова А.Л., Захаров А.В., Мухамедзянов Р.Д., Петров А.М. // *Журн. эволюц. биохимии и физиологии.* 2008. Т. 44. № 6. С. 603–612.
3. Zakharov A.V., Petrov A.M., Kotov N.V., Zefirov A.L. // *Biophysics.* 2012. V. 57. № 4. P. 508–518.
4. Rizzoli S.O. // *EMBO J.* 2014. V. 33. № 8. P. 788–822.
5. Petrov A.M., Naumenko N.V., Uzinskaya K.V., Giniatullin A.R., Urazaev A.K., Zefirov A.L. // *Neuroscience.* 2011. V. 186. P. 1–12.
6. Zhang Z., Nguyen K.T., Barrett E.F., David G. // *Neuron.* 2010. V. 68. № 6. P. 1097–1108.
7. Rossano A.J., Kato A., Minard K.I., Romero M.F., Macleod G.T. // *J. Physiol.* 2017. V. 595. № 3. P. 805–824.
8. Sandvig K., Olsnes S., Petersen O.W., van Deurs B. // *J. Cell Biochem.* 1988. V. 36. № 1. P. 73–81.
9. Brown C.M., Petersen N.O. // *Biochem. Cell Biol.* 1999. V. 77. № 5. P. 439–448.
10. Dejonghe W., Kuenen S., Mylle E., Vasileva M., Keech O., Viotti C., Swerts J., Fendrych M., Ortiz-Morea F.A., Mishev K., et al. // *Nat. Commun.* 2016. V. 7. P. 11710.
11. Watanabe S., Boucrot E. // *Curr. Opin. Cell Biol.* 2017. V. 47. P. 64–71.
12. Bertone N.I., Groisman A.I., Mazzone G.L., Cano R., Tabares L., Uchitel O.D. // *Synapse.* 2017. V. 71. № 12. P. e22009.
13. Захаров А.В. // *Учен. зап. Казан. ун-та. Сер. Естеств. науки.* 2019. Т. 161. № 2. С. 245–254.
14. Kasimov M.R., Giniatullin A.R., Zefirov A.L., Petrov A.M. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2015. V. 1851. № 5. P. 674–685.
15. Kasimov M.R., Zakyrganova G.F., Giniatullin A.R., Zefirov A.L., Petrov A.M. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2016. V. 1861. № 7. P. 606–616.
16. Зефирова А.Л., Григорьев П.Н., Петров А.М., Минлебаев М.Г., Ситдикова Г.Ф. // *Цитология.* 2003. Т. 45. № 12. С. 1163–1171.
17. Betz W.J., Bewick G.S. // *J. Physiol.* 1993. V. 460. № 1. P. 287–309.
18. Kay A.R., Alfonso A., Alford S., Cline H.T., Holgado A.M., Sakmann B., Snitsarev V.A., Stricker T.P., Takahashi M., Wu L.G. // *Neuron.* 1999. V. 24. № 4. P. 809–817.
19. Petrov A.M., Giniatullin A.R., Sitdikova G.F., Zefirov A.L. // *J. Neurosci.* 2008. V. 28. № 49. P. 13216–13222.
20. Betz W.J., Mao F., Smith C.B. // *Curr. Opin. Neurobiol.* 1996. V. 6. № 3. P. 365–371.
21. Kasimov M.R., Fatkhrahmanova M.R., Mukhutdinova K.A., Petrov A.M. // *Neuropharmacology.* 2017. V. 117. P. 61–73.
22. Mukhutdinova K.A., Kasimov M.R., Zakyrganova G.F., Gumerova M.R., Petrov A.M. // *Neuropharmacology.* 2019. V. 150. P. 70–79.
23. Bonnet U., Bingmann D., Speckmann E.J., Wiemann M. // *Life Sci.* 2018. V. 204. P. 65–70.
24. Mukhametshina A.R., Fedorenko S.V., Petrov A.M., Zakyrganova G.F., Petrov K.A., Nurullin L.F., Nizameev I.R., Mustafina A.R., Sinyashin O.G. // *ACS Appl. Mater. Interfaces.* 2018. V. 10. № 17. P. 14948–14955.
25. Petrov A.M., Giniatullin A.R., Zefirov A.L. // *Neurochem. J.* 2008. V. 2. № 3. P. 175–182.
26. Petrov A.M., Kasimov M.R., Giniatullin A.R., Zefirov A.L. // *Neuroscience and Behavioral Physiology.* 2014. V. 44. № 9. P. 1020–1030.
27. Marra V., Burden J.J., Thorpe J.R., Smith I.T., Smith S.L., Hausser M., Branco T., Staras K. // *Neuron.* 2012. V. 76. № 3. P. 579–589.
28. Teixeira G., Vieira L.B., Gomez M.V., Guatimosim C. // *Neurochem. Int.* 2012. V. 61. № 7. P. 1151–1159.
29. Wasser C.R., Ertunc M., Liu X., Kavalali E.T. // *J. Physiol.* 2007. V. 579. Pt 2. P. 413–429.
30. Krivoi I.L., Petrov A.M. // *Int. J. Mol. Sci.* 2019. V. 20. № 5. P. 1046.
31. Zakyrganova G.F., Gilmutdinov A.I., Tsentsevitsky A.N., Petrov A.M. // *Biochim. Biophys. Acta. Mol. Cell. Biol. Lipids.* 2020. V. 1865. № 9. P. 158739.
32. Xiong Z.Q., Saggau P., Stringer J.L. // *J. Neurosci.* 2000. V. 20. № 4. P. 1290–1296.
33. Bonnet U., Bingmann D., Speckmann E.J., Wiemann M. // *J. Neural. Transm. (Vienna).* 2018. V. 125. № 10. P. 1495–1501.
34. Majdi A., Mahmoudi J., Sadigh-Eteghad S., Golzari S.E., Sabermarouf B., Reyhani-Rad S. // *J. Neurosci. Res.* 2016. V. 94. № 10. P. 879–887.
35. Meldrum B.S. // *Neurology.* 1994. V. 44. № 11 Suppl 8. P. S14–23.
36. Sugita S., Fleming L.L., Wood C., Vaughan S.K., Gomes M.P., Camargo W., Naves L.A., Prado V.F., Prado M.A., Guatimosim C., Valdez G. // *Skelet. Muscle.* 2016. V. 6. P. 31.
37. Bonnet U., Bingmann D., Speckmann E.J., Wiemann M. // *Brain Res.* 2019. V. 1710. P. 146–156.
38. Pekun T.G., Lemeshchenko V.V., Lyskova T.I., Waseem T.V., Fedorovich S.V. // *J. Mol. Neurosci.* 2013. V. 49. № 1. P. 211–222.
39. Trudeau L.E., Parpura V., Haydon P.G. // *J. Neurophysiol.* 1999. V. 81. № 6. P. 2627–2635.
40. Sinning A., Hubner C.A. // *FEBS Lett.* 2013. V. 587. № 13. P. 1923–1928.
41. Kohler S., Schmoller K.M., Crevenna A.H., Bausch A.R. // *Cell Rep.* 2012. V. 2. № 3. P. 433–439.