

На правах рукописи

Федорин Василий Васильевич

**Участие н-холинорецепторов нейронального
типа в регуляции секреции медиатора в
нервно-мышечных синапсах мышцы**

03.00.13 – физиология

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2008

Работа выполнена на кафедре физиологии человека и животных биологического факультета Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова (заведующий – доктор биологических наук, профессор А. А. Каменский)

НАУЧНЫЙ РУКОВОДИТЕЛЬ:

доктор биологических наук, профессор кафедры физиологии человека и животных биологического факультета МГУ им. М. В. Ломоносова

О. П. Балежина

ОФИЦИАЛЬНЫЕ ОППОНЕНТЫ:

доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник кафедры высшей нервной деятельности биологического факультета МГУ им. М. В. Ломоносова

А. С. Пивоваров

доктор биологических наук, заведующий кафедрой нормальной физиологии медицинского факультета РУДН им. Патриса Лумумбы

В. И. Торшин

ВЕДУЩАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ:

Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, г. Пущино

Защита диссертации состоится 6 октября 2008 года в 15³⁰ на заседании диссертационного ученого совета Д 501.001.93 биологического факультета Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова по адресу: 119991, Москва, Ленинские горы, д. 1, корп. 12, биологический факультет, аудитория М-1

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке биологического факультета МГУ им. М. В. Ломоносова

Автореферат разослан 5 сентября 2008 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
доктор биологических наук

Б. А. Умарова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы. Класс никотиновых холинорецепторов (нХР) впервые описан в составе постсинаптической мембраны нервно-мышечных синапсов скелетных мышц (Katz, Miledi, 1973). Хорошо известна избирательная активация мышечных нХР никотином наряду с ацетилхолином (АХ), а также конкурентная блокада d-тубокурарином и α -бунгаротоксином (Cohen, Changeux 1975). Способность кураре и бунгаротоксина связываться не только с пост-, но и пресинаптической мембраной моторного синапса (Tsuneki et al., 1995) означала возможное присутствие пресинаптических нХР на моторных терминалах. Их поиски дали противоречивые результаты – в пользу участия нХР как в облегчении, так и торможении секреции АХ по принципу обратной связи (Гиниатуллин 1986; Kimura et al., 1991; Никольский 1990; Wilson, Thomsen, 1991; Domet et al., 1995; Prior et al., 1995). Эти противоречия, как оказалось, во многом были отражением неоднородности пула пресинаптических нХР в моторных синапсах (Tian et al., 1994, 1997; Prior, Sigh, 2000, Faria et al., 2003). В 90-ые годы в ЦНС было обнаружено суперсемейство нХР, получивших название нХР нейронального типа (Sargent, 1993).

Нейрональный тип нХР – так же, как и мышечный – это ионотропные холинорецепторы, активируемые АХ и никотином, отличающиеся от мышечных нХР составом субъединиц, входящих в пентамер (например, $\alpha 4/\beta 2$), спектром избирательных агонистов и антагонистов, функциональными свойствами (Role, Berg, 1996; Wonnacott, 1997). Особый интерес представляет пул $\alpha 7$ -нХР. Белок нХР $\alpha 7$ -типа – гомопентамер, состоящий из пяти $\alpha 7$ -субъединиц. Его избирательными агонистами являются холин, никотин в наномолярной концентрации и АХ, а антагонистами – метилликаконитин и α -бунгаротоксин в наномолярных концентрациях (не блокирующих мышечный тип нХР). Ионный канал $\alpha 7$ -нХР имеет высокую относительную проницаемость к ионам кальция (Alkondon et al., 1996).

$\alpha 7$ -нХР в ЦНС локализованы преимущественно на пресинаптической или претерминальной областях синапсов разного химизма (глутамат- ГАМК-, дофаминэргических и других) и участвуют в облегчении секреции медиаторов. Установлено, что при поступлении в ЦНС никотина или экзогенного АХ, активация претерминальных $\alpha 7$ -нХР в разных типах синапсов сопровождается входом в терминали Ca^{2+} , активацией рианодиновых рецепторов (РиР) и выбросом депонированного кальция, который усиливает секрецию различных медиаторов ЦНС (Wonnacott, 1997). Возможность существования подобного механизма, направленного на регуляцию секреции медиатора на периферии – в холинергических моторных синапсах, с участием $\alpha 7$ -нХР, до сих пор не исследована. Между тем, здесь обнаружены пресинаптические РиР (Narita et al., 2000; Балезина и др., 2000), эффекты избирательных агонистов и антагонистов нейрональных нХР (Faria et al., 2003). Недавно показана также возможность экспрессии мотонейронами различных субъединиц нейрональных нХР, в том числе и $\alpha 7$ -типа (Dehcordi et al., 2004, 2005). Это делает весьма актуальным

поиск $\alpha 7$ -нХР в составе синапсов моторных терминалей и изучение их возможного вклада в эффекты экзогенных и эндогенных агонистов – никотина, АХ и холина.

Цели и задачи исследования. Целью данной работы было исследование механизмов регуляции секреции АХ с участием пресинаптических $\alpha 7$ -нХР, выявление режимов работы моторного синапса, при которых происходит активация $\alpha 7$ -нХР эндогенными агонистами – АХ и/или холином.

В связи с поставленной целью в работе решались следующие конкретные задачи:

1. На нервно-мышечных синапсах мыши сопоставить пресинаптические эффекты избирательных агонистов (никотина, холина) и антагонистов $\alpha 7$ -нХР – метилликаконитина (20 нМ) и α -кобратоксина (2 нМ) в отношении спонтанной секреции АХ (путем регистрации миниатюрных потенциалов концевой пластинки (МПКП)), и в отношении вызванной секреции АХ, путем регистрации одиночных вызванных потенциалов концевой пластинки (ПКП), коротких и продолжительных ритмических залпов ПКП.
2. Исследовать пресинаптические эффекты агонистов $\alpha 7$ -нХР на фоне блокады пресинаптических РиР.
3. Исследовать роль Ca^{2+} -зависимых K^{+} -каналов в реализации тормозных эффектов избирательных агонистов $\alpha 7$ -нХР.
4. Выявить режимы активности моторных синапсов мыши, при которых происходит активация $\alpha 7$ -нХР эндогенными агонистами (холином и/или АХ).

Новизна полученных результатов. В работе впервые показано возможное присутствие на нервных терминалах моторных синапсов мыши пресинаптических нХР $\alpha 7$ -типа, при активации которых избирательными агонистами (холином или никотином) развивается односторонний эффект – торможение вызванной секреции, которое может быть предотвращено действием избирательных блокаторов $\alpha 7$ -нХР – α -кобратоксином (2 нМ) и метилликаконитином (20 нМ).

Впервые исследованы возможные механизмы тормозного действия избирательных холинергических агонистов $\alpha 7$ -нХР на вызванную секрецию АХ в нервно-мышечном синапсе. Установлен ранее неизвестный факт Ca^{2+} -зависимости тормозного действия никотина на квантовый состав ПКП по ходу коротких залпов ПКП. Выявлена ранее не известная функциональная связь между активацией $\alpha 7$ -нХР, последующей Ca^{2+} -зависимой активацией рианодиновых рецепторов и выбросом депонированного кальция. Впервые показано, что эта цепь событий может завершаться активацией низкопроводящих апамин-чувствительных Ca^{2+} -зависимых K^{+} -каналов терминали.

В работе выявлены ранее не известные эффекты блокаторов $\alpha 7$ -нХР при разных режимах активности синапсов. Впервые показано, что активация $\alpha 7$ -нХР эндогенным холином или АХ происходит лишь при продолжительной (от 2000 сигналов) высокочастотной залповой активности синапсов. Избирательная блокада $\alpha 7$ -нХР в этом случае может почти полностью предотвратить более чем двукратное снижение уровня выброса медиатора к концу залпа. Аналогичный протекторный эффект дает предварительная блокада апамином Ca^{2+} -зависимых K^{+} -каналов терминали.

Положения, выносимые на защиту.

1. В нервно-мышечных синапсах диафрагмы мыши при тоническом действии избирательных эндогенных и экзогенных никотиновых агонистов – холина (100 μM) и никотина (2 нМ) – возможна активация пресинаптических $\alpha 7$ -нХР. Это приводит к подавлению вызванной секреции АХ, которое можно предотвратить блокадой $\alpha 7$ -нХР метилликаонитином и α -кобратоксином.
2. В реализацию тормозного действия экзогенных агонистов $\alpha 7$ -нХР на вызванный выброс АХ вовлечены риадиновые рецепторы, выброс депонированного Ca^{2+} с последующей активацией Ca^{2+} -зависимых K^{+} -каналов терминалей.
3. При продолжительных высокочастотных залпах ПКП (от 2000 сигналов) снижение квантового состава ПКП к концу залпа, в среднем, на 55%, обусловлено действием отрицательной обратной связи с участием эндогенных холина и/или АХ, действующих на пресинаптические $\alpha 7$ -нХР, что приводит к активации апамин-чувствительных Ca -зависимых K -каналов и торможению секреции.

Научно-практическая ценность работы. Полученные в работе новые данные представляют интерес как с общенаучной, так и прикладной точки зрения. Для фундаментальной синаптологии ценным является ранее не известное описание того, при каких условиях, с помощью каких пресинаптических нХР и какого механизма осуществляется ауторегуляция работы холинергического нервно-мышечного синапса по принципу отрицательной обратной связи. Возможность такой регуляции давно обсуждалась в литературе (Никольский, Гиниатуллин, 1979; Никольский 1990, Гиниатуллин 1992; Van der Kloot 1993; Domet et al., 1995), но оставляла открытыми важнейшие вопросы – о типе нХР и внутриклеточных механизмах такой регуляции в синапсах, а главное – о режимах работы синапса, при котором аутоингибирование секреции АХ осуществляется эндогенными агонистами - АХ и/или холином. В данной работе удалось существенно прояснить эти вопросы, показав участие $\alpha 7$ -нХР в аутоингибировании секреции с помощью эндогенных АХ/холина при длительной высокочастотной работе синапсов.

Обнаруженный в работе необычный факт участия пресинаптических $\alpha 7$ -нХР в торможении секреции АХ представляет самостоятельный научный интерес, поскольку в центральных синапсах (в том числе – и холинергических) этот же тип претерминальных нХР, сопряженный с активацией риадиновых рецепторов и выбросом депонированного Ca^{2+} , служит противоположной задаче – усилению секреции медиатора. По-видимому, это связано с разной ролью и характером действия АХ в ЦНС и на периферии.

Использование в работе тонического действия никотина в низких наномолярных дозах, аналогичных имеющимся в крови курильщика, впервые позволило описать весь спектр неоднозначных эффектов никотина на уровне периферической нервно-мышечной передачи. Стойкое снижение уровня выброса АХ на 12-15%, в коротких залпах при тоническом действии никотина, по-видимому, несущественно для здорового синапса, но может оказаться критичным при уже имеющихся нарушениях нервно-мышечной передачи. Для поиска средств коррекции депрессии передачи в условиях продолжительной интенсивной работы синапсов, представляет интерес обнаруженная способность апамина (5 μM) и кобратоксина (2 нМ) предотвращать депрессию и падение амплитуды ПКП в длинных залпах.

Апробация работы. Результаты исследований были доложены и обсуждены на международных конференциях: Ломоносов-2006 (Москва, 2006), Neuro-2007 (Йокогама, Япония, 2007), XX съезде физиологического общества им. И. П. Павлова (Москва, 2007), Physiology 2008 (Кембридж, Великобритания, 2008).

Публикации. По материалам диссертации опубликованы 5 печатных работ, в том числе 2 статьи в рецензируемых журналах из списка ВАК.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, литературного обзора о роли пресинаптических н-холинорецепторов в регуляции синаптической секреции медиатора, описания методов исследований, изложения и обсуждения полученных результатов, заключения, выводов и списка литературы (165 ссылок, из них 152 – зарубежные работы). Диссертация содержит 110 страниц машинописного текста, в том числе 35 рисунков.

ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследования проведены на взрослых самцах беспородных лабораторных мышей весом 25-40 г. В качестве объекта исследования спонтанной и вызванной синаптической активности была выбрана диафрагмальная мышца мыши (*m. diaphragma*), которая иннервируется диафрагмальным нервом (*n. phrenicus*).

Изготовление изолированного диафрагмального препарата. Наркотизированное животное декапитировали, извлекали левую половину диафрагмы с диафрагмальным нервом *n. phrenicus*.

В работе использовали т.н. "рассеченный" препарат, по классической методике, впервые предложенной Barstad и Lilleheil (1968). Препарат тщательно промывали физиологическим раствором во время и после препаровки, и далее оставляли на 15-25 минут адаптироваться в большом объеме раствора Лайли (135 mM NaCl, 4 mM KCl, 0,9 mM NaH₂PO₄, 1 mM MgCl₂, 2 mM CaCl₂, 16,3 mM NaHCO₃, 11 mM глюкозы) перед началом работы.

Внутриклеточная регистрация спонтанных и вызванных потенциалов. Для регистрации спонтанных миниатюрных потенциалов концевой пластинки (МПКП) и вызванных потенциалов концевой пластинки (ПКП) использовали хлорсеребряные отводящий и индифферентный электроды, представляющие собой серебряную проволочку соответствующего внутреннему диаметру стеклянного капилляра диаметра, покрытую хлоридом серебра, и стеклянные микроэлектроды (изготовленные из капилляров с филаментом) с толщиной кончика менее 1 μM и сопротивлением кончика порядка 10-30 МОм. Микроэлектрод заполняли раствором 2,5 M KCl. Для стимуляции нерва использовали раздражающие хлор-серебряные электроды.

Изолированный френико-диафрагмальный препарат помещали в камеру объемом порядка 1 мл, заполненный проточным физиологическим раствором Лайли (для теплокровных), который предварительно аэрировали карбогеном (95% CO₂ + 5% O₂). Опыты проводили при комнатной температуре.

Введение микроэлектрода в область синаптических контактов проводили под контролем бинокулярной лупы. Критерием удачного введения микроэлектрода в волокно служил достаточно высокий уровень мембранного потенциала (у рассеченных волокон он составлял порядка -40 мВ). Критерием попадания микроэлектрода в постсинаптическую зону волокна служило наличие спонтанной активности в виде МПКП. Для регистрации и дальнейшего анализа выбирали точки, где наблюдались МПКП с относительно небольшим временем нарастания (около 1 мс), что свидетельствует о близости синаптической зоны. В каждом синапсе регистрировали не менее 100 сигналов МПКП и 50 сигналов ПКП. Как правило, до введения никотина или другого реактива исследовали не менее трех синапсов в данной мышце.

Для стимуляции нерва использовали надпороговую силу стимулов (4-30 В; 0,1 мс). Для записи одиночных ПКП проводили раздражение нерва с частотой 0,3 Гц. При изучении ритмической активности синапсов использовали частоты раздражения диафрагмального нерва 4, 7 и 50 Гц. В каждом синапсе записывали три залпа ПКП с определенной частотой и интервалом между залпами 1-2 минуты (впоследствии эти три записи в каждом синапсе усредняли для анализа картины изменений ПКП по ходу залпа). Кроме того, проводили регистрацию МПКП до и по окончании трех залпов ПКП.

Короткий залп из 50 ПКП обладает характерными фазами: частотозависимым начальным облегчением передачи, выражающемся в кратковременном приросте амплитуды и квантового состава ПКП; короткой фазой спада амплитуды ПКП и т.н. фазой плато (включающей последние 20 ПКП по ходу залпа из 50-ти ПКП,

когда ПКП устанавливаются на постоянном, сниженном по сравнению с первым ПКП уровне). Фаза плато в залпе является наиболее продолжительной и функционально значимой характеристикой залпа. В связи с этим, мы проводили анализ амплитуды и квантового состава ПКП на уровне плато, по сравнению с первым ПКП залпа.

Длительная стимуляция препарата. Ввиду высокой функциональной нагрузки на препарат, часто сопровождавшейся блоком приведения по аксону либо падением МП мышечного волокна, при регистрации длинных залпов ПКП (от 2000 сигналов) в каждом синапсе проводили регистрацию только одного длительного залпа. Регистрацию длинных залпов проводили с частотой 50 Гц. В длинном залпе ПКП оценивалась усредненная амплитуда 50 ПКП, отсчитанных от контрольной точки – 10, 20, 30 и 40 секунд от начала залпа. В качестве начальной амплитуды ПКП использовали усредненную амплитуду ПКП, с 25-го по 75-й (первые 25 ПКП не брались в усреднение из-за выраженного на 50 Гц начального облегчения, преувеличивающего амплитуду ПКП).

Средняя частота и амплитуда МПКП рассчитывалась в каждом синапсе. Расчет КС одиночных ПКП проводили путем деления средней амплитуды одиночных ПКП на среднюю амплитуду МПКП в данном синапсе.

Использованные вещества. В работе были использованы следующие препараты: никотин, апамин, мекаминамин, метилликаконитин, холин и рианодин, приобретенные в Sigma-Aldrich, и α-кобратоксин, любезно предоставленный нам профессором В. И. Цетлиным (заведующий лабораторией рецепции нейропептидов Института биорганической химии РАН).

Обработка результатов. Записи МПКП и залпов ПКП обрабатывались с помощью оригинальных компьютерных программ Axotape и MiniAnalysis (программа предоставлена доктором J. Lee, США). Сопутствующие расчеты производились в Microsoft Excel. Сравнение выборок производилось по t-критерию Стьюдента (для амплитуды МПКП и ПКП) и критерию Манна-Уитни (во всех прочих случаях).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

1. Дозозависимость влияния никотина на параметры спонтанной активности моторных синапсов мыши

Исходя из целей работы, первой задачей, которую предстояло решить, была демонстрация принципиального наличия пресинаптических нХР нейронального типа в составе нервно-мышечного синапса. Для этого было решено использовать агонист нХР широкого спектра действия, никотин, хорошо подходящий для этих целей ввиду известного факта более низкой чувствительности к нему рецепторов мышечного типа относительно нейрональных (Luetje, Patrick, 1991). Это давало возможность, при правильно выбранной концентрации, избирательно активировать только нейрональные нХР, не вызвав активацию мышечных.

В первой серии работы была поставлена задача выявить диапазон концентраций никотина, в котором он не оказывает значимого воздействия на

постсинаптические нХР мышечного типа, но при этом сохраняет способность активировать пресинаптические нХР нейронального типа. Для решения этой задачи была проведена регистрация МПКП моторных синапсов диафрагмы мыши на фоне аппликации никотина в диапазоне концентраций 10^{-5} - 10^{-11} М. Никотин вводили в экспериментальную камеру путем быстрой замены в ней нормального физиологического раствора Лайли на раствор, содержащий исследуемую концентрацию никотина.

В высоких концентрациях, никотин приводил к быстрому падению амплитуды МПКП до нуля, по всей видимости вследствие десенситизации постсинаптических нХР. При этом уровень постсинаптической мембраны на фоне действия никотина (30-50 минут) не претерпевал существенных изменений ($-39,3 \pm 1,4$ мВ) относительно контрольных значений ($-39,0 \pm 1,5$ мВ). Начиная с

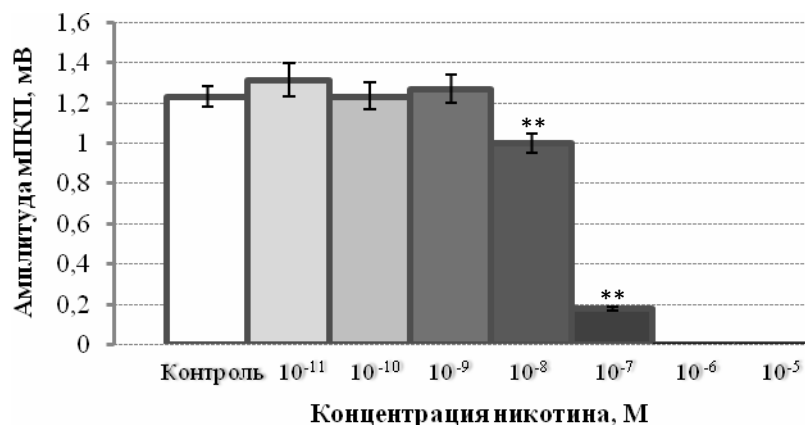


Рисунок 1. Дозозависимое влияние никотина ($10 \mu\text{M}$ – 10 пкМ) на среднюю амплитуду МПКП (через 10 минут после нанесения), в сравнении с контролем (** - $p < 0,01$).

концентрации в 100 нМ и ниже, никотин приводил лишь к частичному падению амплитуды МПКП, что оставляло возможность их регистрации, а при концентрациях в 1 нМ и ниже, не оказывал никакого влияния на амплитуду и частоту МПКП (рис. 1). Для дальнейшего использования нами была выбрана концентрация в 10 нМ – с одной стороны, достоверный прирост частоты МПКП ($24,5\%$ - от $0,39 \pm 0,03$ Гц в контроле до $0,51 \pm 0,04$ Гц) указывает на наличие у данной концентрации пресинаптического действия, с другой – падение амплитуды МПКП и вызванных ПКП было достаточно небольшим (в контроле $1,2 \pm 0,1$ мВ, в присутствии никотина $n=20$, до $1,03 \pm 0,07$ мВ, $n=7$) для сохранения возможности регистрации спонтанной и вызванной активности.

2. Влияние никотина (10^{-8} М) на параметры вызванной активности синапсов при генерации одиночных ПКП и залпов ПКП.

Мы установили, что под действием никотина в концентрации 10 нМ амплитуда ПКП (равно как и МПКП) снижалась на 15-25% в течение первых 10

минут и сохранялась далее неизменной на протяжении 30ти-50ти минутной аппликации никотина (от $16,3 \pm 0,7$ мВ в контроле, $n=14$, до 13 ± 2 мВ в присутствии никотина, $n=17$, $p \leq 0,01$). По-видимому, это – постсинаптический эффект никотина связанный с незначительной десенситизацией мышечных нХР. При этом никотин не вызывал достоверных изменений квантового состава (КС) одиночных вызванных ПКП.

В то же время, при регистрации залповой активности синапсов, никотин приводил к ускорению спада ПКП в начале залпа и стойкому, достоверному падению амплитуды и КС ПКП последних 20ти ПКП в залпе, т.е. на фазе «плато». Анализ средней амплитуды МПКП в каждом синапсе до и после коротких залпов не обнаружил достоверных различий и в контроле, и в присутствии никотина, но падение составляло 12-15% от первого ПКП в залпе по сравнению с контрольными залпами. КС ПКП на фазе плато в залпе (выраженный в процентном отношении от первого ПКП залпа) достоверно снизился от $79,6 \pm 2,2\%$ до $70,1 \pm 2,1\%$ при 4 Гц ($p < 0,01$; $n=16$), от $82,8 \pm 2,9\%$ до $75,7 \pm 2,7\%$ при 7 Гц ($p < 0,01$; $n=14$) и от $88,6 \pm 2,1\%$ до $79,9 \pm 4,0\%$ при 50 Гц ($p < 0,01$; $n=15$). Таким образом, тормозный эффект был однонаправленным при всех частотах и, очевидно, его выраженность не зависела от частоты стимуляции (рис. 2).

Величина КС ПКП на фазе плато в залпе является одной из основных характеристик активности синапса, т.к. мотонейроны диафрагмальной мышцы млекопитающих разряжаются обычно не одиночными ПД, а пачками, состоящими из 50-100 импульсов с частотой 34-76 Гц (Kong, Berger, 1986). Никотин оказался способным эффективно подавлять именно этот функционально значимый параметр залповой активности.

Таким образом, при залповой активности нами было продемонстрировано наличие выраженного пресинаптического регуляторного влияния, оказываемого никотином, выражающегося в подавлении вызванной секреции АХ по ходу залпа. Способность никотина, АХ и других агонистов (цитизина, карбахолина) вызывать торможение секреции АХ в моторных синапсах была показана ранее в ряде работ на диафрагме мыши (Бухараева и соавт., 1986; Nikolsky et al., 1991; Tian et al., 1994; Tian et al., 1997; Singh, Prior, 1997; Prior, Singh, 2000; Giniatullin et al., 2002; Nikolsky et al., 2004). Авторы склоняются к выводу о том, что тормозный эффект никотина и других агонистов обусловлен активацией пресинаптических нХР нейронального типа.

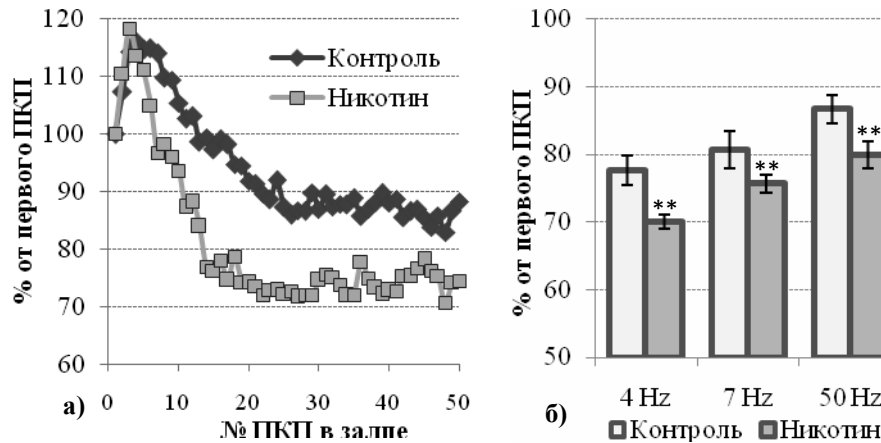


Рисунок 2. Влияние никотина на ход залпа из 50 ПКП с частотой 50 Гц (а) и на уровень плато в залпах при частотах стимуляции в 4, 7 и 50 Гц (б) (** - $p < 0,01$).

Принято считать, что продолжительное действие агониста на нХР должно приводить к их десенситизации и выключению из активности (Katz, Thesleff, 1957). Если бы подавление секреции АХ под действием никотина было связано с десенситизацией и инактивацией пресинаптических нХР, то другой способ выключения из активности нХР – с помощью избирательных блокаторов нХР – должен был бы вызвать аналогичный тормозный эффект. Однако мы убедились, что ни метилликаконитин, ни α -кобратоксин не меняют характер вызванной активности по ходу ритмических залпов (см. следующую главу и рис. 3), поэтому мы предположили, что наблюдаемый эффект – следствие слабой тонической активации пресинаптических нХР никотином. Действительно, в современной литературе имеются данные о возможном существовании в составе нервно-мышечных синапсов и других типов холинергических синапсов недесенситизирующихся или не полностью десенситизирующихся нХР (см., например, Severance et al., 2004). Более того, высказываются предположения, что состояние десенситизации нХР не является синонимом выключения их из активности и может сопровождаться определенной тонической активностью (Giniatullin et al., 2005). Исходя из литературных и собственных данных, мы предположили, что на фоне тонического действия наномолярных доз никотина может (хотя бы частично) сохраняться активность пресинаптических $\alpha 7$ -нХР.

3. Воздействие α -кобратоксина (5 нМ) и метилликаконитина (20 нМ) на реализацию эффектов никотина при залповой синаптической активности.

Для проверки возможного вовлечения нейрональных нХР в подавление никотином КС ПКП во время фазы плато в залпах ПКП мы применили два селективных блокатора $\alpha 7$ -нХР, компонент змеиного яда α -кобратоксин (α -СТх) и алкалоид дельфиниума, метилликаконитин.

Сами по себе оба эти токсина не оказали достоверного влияния ни на КС одиночных ПКП, ни на рисунок залпа, в том числе уровень фазы плато залпов ПКП ($n_{\text{контр}}=16$, $n_{\text{опыт}}=22$ и $n_{\text{опыт}}=15$ для α -кобратоксина и метилликаконитина, соответственно, $p > 0,05$ в обоих случаях). Кроме того, они не повлияли и на падение амплитуды МПКП и одиночных ПКП под действием никотина, которое, как мы считаем, обусловлено постсинаптической десенситизацией мышечных нХР ($n_{\text{контр}}=15$, $n=10$ и $n=5$ для α -кобратоксина и метилликаконитина, соответственно, $p < 0,05$ в обоих случаях) (табл. 1).

Таблица 1. Значения КС и уровня плато в залпах для метилликаконитина и α -кобратоксина самостоятельно и совместно с никотином (** - $p < 0,01$ отн. контроля).

	КС одиночных ПКП	Уровень плато залпа 4 Гц, % от ПКП ₁	Уровень плато залпа 7 Гц, % от ПКП ₁	Уровень плато залпа 50 Гц, % от ПКП ₁
Контроль	18,56±2,77	77,5±2,2	80,6±2,7	86,6±2,1
α -кобратоксин	18,11±1,03	77,2±2,1	78,1±1,3	84,5±2,8
Метилликаконитин	18,66±2,82	78,1±1,9	79,4±1,1	85,4±2,4
Никотин	18,31±4,38	70,1±1,1**	75,7±1,3**	79,9±2,0**
Никотин+ α -кобратоксин	18,52±3,12	76,5±0,8	79,7±0,4	85,4±2,1
Никотин+метилликаконитин	17,71±0,83	75,1±2,3	80,9±1,4	87,1±1,3

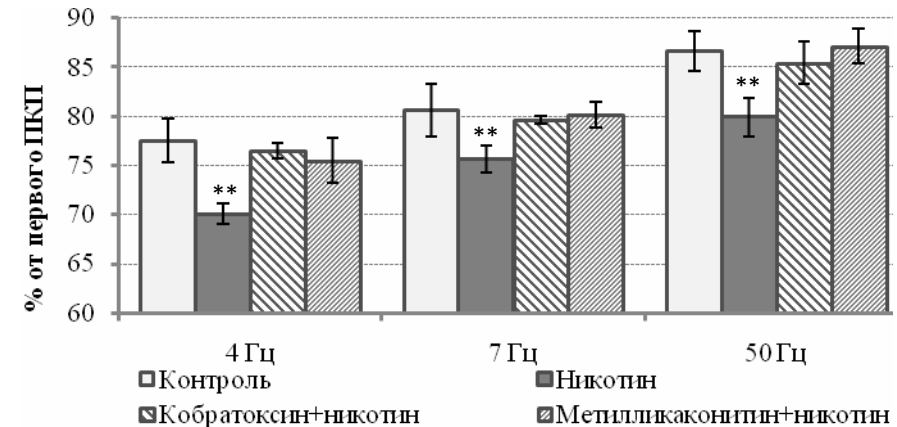


Рисунок 3. Уровень плато в залпах из 50 ПКП при частотах стимуляции в 4, 7 и 50 Гц в контроле, в присутствии никотина, и при совместной аппликации никотина с α -кобратоксином и метилликаконитином (** - $p < 0,01$).

Однако оба блокатора $\alpha 7$ -нХР смогли полностью предотвратить вызванное никотином падение КС ПКП в залпах (на фазе плато) (рис. 3 и табл. 1). В присутствии как α -СТх, так и метилликаконитина, никотин оказался неспособен снизить уровень плато в залпах на всех исследованных частотах: 4, 7 и 50 Гц. Эти результаты свидетельствуют в пользу того, что при длительной аппликации на мышцу никотин (10 нМ) взаимодействуя с пресинаптическими

нейрональными $\alpha 7$ -нХР приводит к подавлению залповой активности синапсов в виде снижения уровня секреции АХ на 12-15%.

Ввиду того, что $\alpha 7$ -нХР обладают высокой проницаемостью для ионов кальция, мы решили проверить, влияет ли концентрация кальция во внешней среде на выраженность тормозного действия никотина, т.е. связано ли действие никотина с входящим по каналам $\alpha 7$ -нХР кальциевым током.

4. Кальцийзависимость пресинаптических эффектов никотина.

Повышенная концентрация кальция в рабочем растворе не привела к значительному и достоверному увеличению МП, средней амплитуды МПКП и одиночных ПКП, и не вызвала изменений КС одиночных вызванных ПКП. Мы установили также, что повышенная внеклеточная концентрация кальция никак не сказалась на рисунках залпов для всех рассмотренных частот, в том числе и на такие параметры, как относительный уровень плато в залпе и его частотозависимость.

Никотин в концентрации 10^{-8} М на фоне двукратно повышенного содержания кальция в среде – так же, как и в контроле, в нормокальциевом растворе – приводил к падению амплитуды одиночных ПКП и не вызывал достоверных изменений КС (рис. 4).

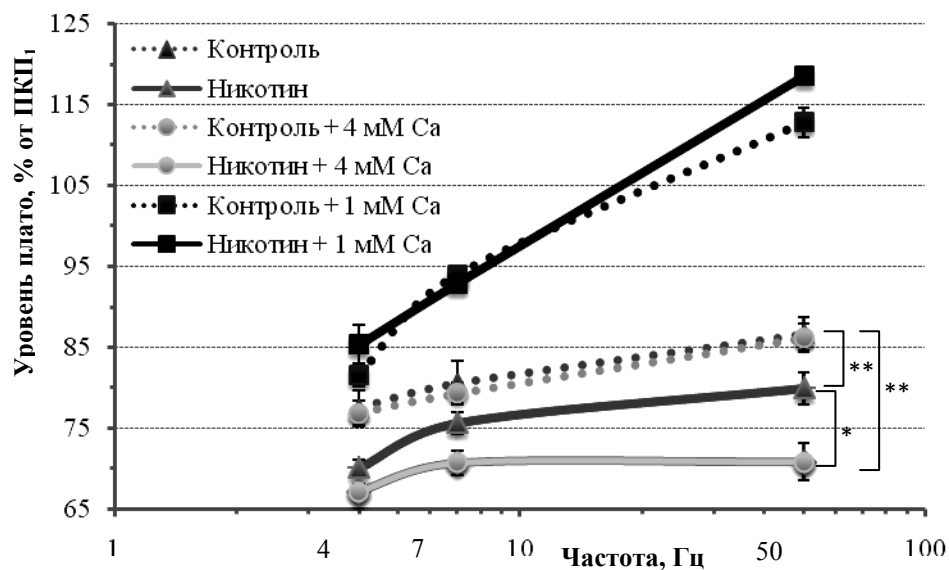


Рисунок 4. Влияние сниженной (1 мМ) и повышенной (4 мМ) внеклеточной концентрации кальция на уровень плато в залпах из 50 ПКП при частотах стимуляции в 4, 7 и 50 Гц (* - $p<0,05$; ** - $p<0,01$).

В присутствии 4 мМ кальция, никотин оказывал на рисунки залпов ПКП действие, качественно сходное с таковым в нормокальциевом растворе, но более выраженное (рис.4). Способность никотина вызывать снижение КС ПКП на уровне плато в залпе на фоне 4 мМ $[Ca^{2+}]_{нар}$ стала более выраженной. Падение уровня плато, вызванное никотином, составило при 4, 7 и 50 Гц соответственно на 13% до $67,1 \pm 0,9\%$ ($n=12$, $p<0,05$), на 11% до $70,7 \pm 1,5\%$ ($n=11$, $p<0,05$) и на 18% до $71,8 \pm 2,3\%$ ($n=12$, $p<0,05$), что превышает (для 7 и 50 Гц более чем в два раза) соответствующий процент снижения уровня плато, выявленный в нормокальциевом растворе.

В отличие от повышения $[Ca^{2+}]_{нар}$ до 4 мМ, ее снижение до 1 мМ само по себе привело к проявлению ярко выраженных и статистически достоверных изменений. Так, снижение $[Ca^{2+}]_{нар}$ в два раза привело к резкому падению амплитуды как МПКП ($0,5 \pm 0,1$ мВ при $0,9 \pm 0,1$ мВ в контроле¹; $p < 0,01$), так и одиночных вызванных ПКП ($5,4 \pm 0,8$ мВ при $16,3 \pm 0,7$ мВ в контроле; $p < 0,01$). Более того, относительно более выраженное по сравнению с МПКП падение амплитуды вызванных ПКП указывает нам и на падение КС ПКП. При вычислении прямым методом, КС оказался равен $9,1 \pm 1,6$ при $18,6 \pm 2,8$ в контроле. МП остался неизменным, составив $-39,4 \pm 1,3$ мВ, при $-39,0 \pm 1,5$ мВ в контроле ($n=25$, $p > 0,05$) (рис.4).

В растворе со сниженной концентрацией наружного кальция (1 мМ) никотин (10 нМ) достоверно не изменял амплитуду ни МПКП ($0,6 \pm 0,1$ мВ) ни вызванных ПКП ($5,9 \pm 1,0$ мВ) а также КС ПКП на фазе плато в запле по сравнению с контролем при всех исследованных частотах: уровень ПКП на плато составил $85,3 \pm 2,5\%$ для 4 Гц ($n=4$), $93,0 \pm 2,0\%$ для 7 Гц ($n=5$) и $112,5 \pm 1,8\%$ для 50 Гц ($n=5$).

Эти данные подтверждают выдвинутую нами версию о том, что подавление никотином уровня плато в залпе – процесс Ca^{2+} -зависимый, т.к. опосредован входом ионов Ca^{2+} через $\alpha 7$ -нХР, активируемые никотином. Отсюда понятно, что тормозный эффект никотина усиливается при увеличении потока наружного кальция в терминаль. При этом остается открытым вопрос о механизме Ca^{2+} -зависимого падения уровня плато под действием никотина.

Для проверки возможных механизмов кальцийзависимого снижения уровня плато в залпах, целью нашей следующей серии было выяснение возможного вовлечения рианодиновых рецепторов Ca^{2+} -депо терминалей, а также - кальций-активируемых калиевых каналов в реализацию наблюдаемых нами явлений, связанных с активацией пресинаптических nXP. Для этого использовали рианодин - блокатор выхода кальция из Ca^{2+} -депо (цистерн ЭПР) -, а также апамин, селективный блокатор низкопроводящих Ca^{2+} -активируемых K^{+} -каналов (SK-каналов).

¹ Для расщепленного препарата; данные, приведенные в разделе 1 относятся к интактному препарату, амплитуда МПКП которого при прочих равных условиях выше, чем у расщепленного.

5. Воздействие рианодина (2 μM) и апамина (1 μM) на реализацию эффектов никотина при залповой синаптической активности.

Рианодин, использованный в дозах, приводящих к блоку рианодиновых рецепторов (РиР) (2 μM), не вызывал изменений амплитуды одиночных ПКП или параметров МПКП. Амплитуда МПКП и ПКП составила в контроле $0,52 \pm 0,10$ и $8,33 \pm 0,36$ мВ, а в присутствии рианодина $0,50 \pm 0,06$ и $8,26 \pm 0,09$ мВ, соответственно ($n=5$, $p>0,05$). При этом, рианодин в концентрации 2 μM оказывал существенное влияние на рисунок залповой активности синапсов: не отражаясь на уровне КС ПКП фазы плато, он практически полностью предотвращал развитие начального облегчения передачи при ритмической активности синапсов в виде коротких залпов (рис.5).

Мы установили, что в присутствии рианодина, никотин утратил свою способность понижать уровень плато ПКП в залпе, как и ранее в присутствии блокаторов $\alpha 7$ -нХР (рис. 5).

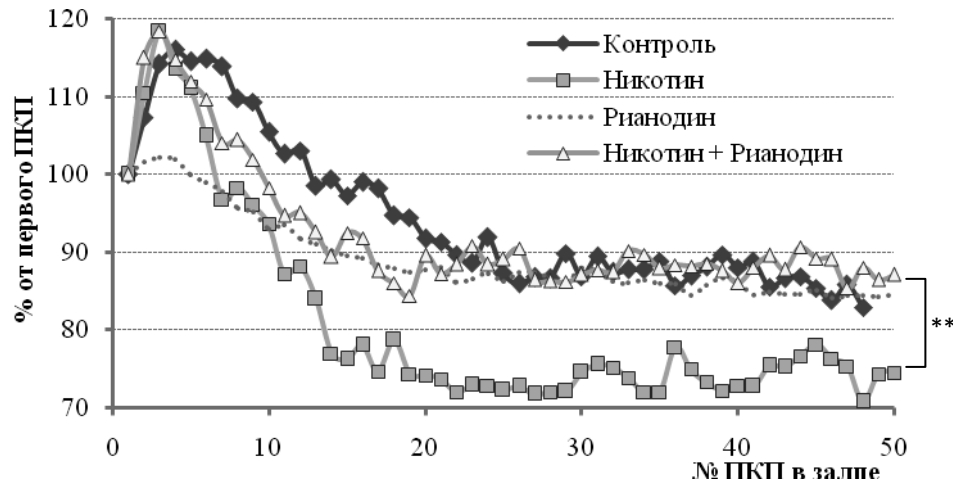


Рисунок 5. Влияние рианодина на ход залпа из 50 ПКП с частотой 50 Гц в норме и в присутствии никотина (** - $p<0,01$).

Из ранее полученных данных (Балезина и соавт., 2006) нам было известно, что апамин не оказывает самостоятельного влияния на амплитуду и частоту МПКП, а также на параметры одиночных вызванных ПКП. Анализ эффектов апамина по данным 4 опытов ($n=30$) показал, что апамин также не оказывает самостоятельного достоверного влияния на картину залповой активности и амплитуду ПКП в залпов с частотой 4 и 50 Гц.

Однако, аппликация никотина (10^{-8} М) на фоне апамина (10^{-6} М) привела к тому, что никотин потерял способность подавлять амплитуду и КС ПКП на фазе плато в ритмических залпах ($n=12$). Другими словами, апамин полностью «снял»

депрессорные эффекты никотина в отношении уровня плато в залпе. Это позволяет предполагать, что на фоне тонического действия никотина происходит активация $\alpha 7$ -нХР и далее — Ca^{2+} -зависимых SK-каналов, гиперполяризующих терминаль и опосредующих тормозные эффекты никотина, проявляющиеся по ходу ритмической активности (рис. 6).

Совокупность полученных результатов позволяет предположить следующую последовательность событий. Никотин активирует пресинаптические $\alpha 7$ -нХР, опосредующий вход в терминаль кальция, который, суммируясь с кальцием поступающим в терминаль во время залпов ПКП активирует РиР и выброс кальция из цистерн ЭПР, что, в свою очередь направлено на активацию SK-каналов терминали. Выходящий по SK-каналам калиевый ток гиперполяризует терминаль, тормозит работу потенциалзависимых кальциевых каналов активной зоны, и, тем самым, снижает вероятность секреции квантов медиатора.

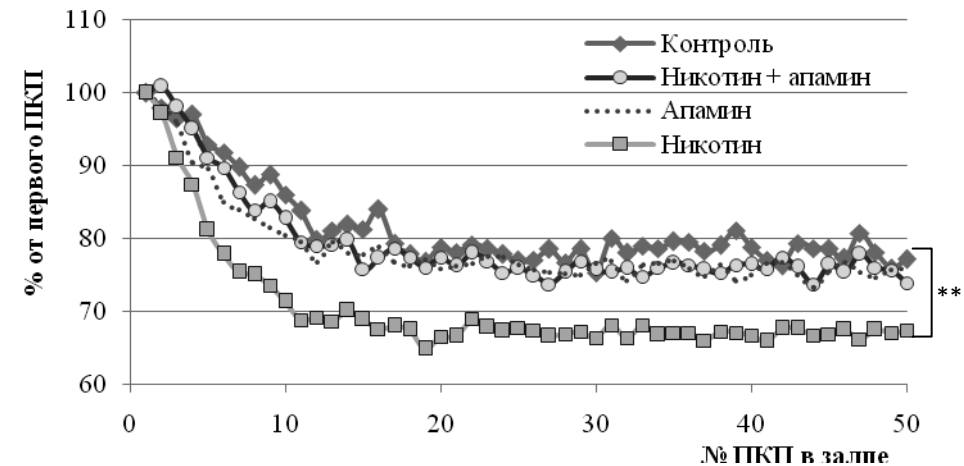


Рисунок 6. Влияние апамина на ход залпа из 50 ПКП с частотой 4 Гц в норме и в присутствии никотина (** - $p<0,01$).

Подводя итог проведенным сериям экспериментов, можно сказать следующее. Использование никотина в наномолярных концентрациях как экзогенного агониста нейрональных нХР и селективных блокаторов нХР, а также блокаторов РиР и SK-каналов пресинаптической терминали (апамина, рианодина) позволило нам впервые выявить наличие пресинаптических $\alpha 7$ -нХР и оценить возможные механизмы их работы. Следует подчеркнуть, что, избирательные блокаторы $\alpha 7$ -нХР хотя и полностью предотвращали действие никотина, сами по себе не оказывали какого-либо воздействия на КС одиночных ПКП или рисунок залповой активности (см. таблицу, рис.9). Это означало, что в условиях короткого залпа из 50 ПКП в норме — без сторонних агонистов — активации пресинаптических нХР $\alpha 7$ -типа не происходит. Таким образом, логичной целью следующей серии опытов стал поиск возможности активации

цепи отрицательной обратной связи с участием пресинаптических $\alpha 7$ -нХР в синапсах при помощи эндогенных агонистов, воспроизводящих его работу в естественных условиях.

6. Анализ длительной залповой активности синапсов

Результаты предыдущих серий экспериментов показали, что при режимах кратковременной залповой активности синапсов (50 стимулов, 4-50 Гц) исследуемый пул пресинаптических $\alpha 7$ -нХР, по-видимому, неспособен активироваться эндогенными агонистами. Мы предположили, что кратковременная активность синапса была недостаточна для того, чтобы происходило накопление медиатора АХ (или продукта его распада холина) в щели, необходимое для активации пресинаптических $\alpha 7$ -нХР. Известно, например, что в центральных синапсах $\alpha 7$ -нХР часто располагаются в претерминальных зонах аксона, и для их активации необходимо накопление и выход медиатора из щели в околосинаптическое пространство (Kalamida et al., 2007).

Имея это в виду, мы модифицировали схему эксперимента: вместо 50 стимулов, предполагалась стимуляция рассеянного диафрагмального препарата по возможности значительно более долгое время, регистрируя тысячи последовательных стимулов.

При стимуляции с частотой в 50 Гц, в общем случае, амплитуда и КС ПКП демонстрировали последовательное снижение, с быстрым падением до $76,0 \pm 4,5\%$ от первоначальной на отрезке с трехсотого по пятисотый ПКП (шестая-десятая секунды стимуляции; «первая фаза» спада), и последующим более медленным снижением («вторая фаза» спада), с возможным выходом на «уровень плато» около отметки в 50 секунд стимуляции на уровне порядка 50% от первоначального. Обе фазы спада имели динамику, близкую к линейной, но обладали различными скоростями.

Во всех случаях, амплитуда МПКП оставалась неизменной на протяжении всего времени стимуляции, из чего можно сделать вывод, что наблюдаемые изменения амплитуды вызванных ПКП являлись изменениями КС: сравнение амплитуды МПКП до начала залпа ($0,56 \pm 0,05$ мВ) и после 40 секунд стимуляции ($0,53 \pm 0,05$ мВ) не выявило достоверного снижения амплитуды МПКП ($n=8$, $p>0,05$). МП также оставался неизменным, составив $-39,0 \pm 1,6$ мВ изначально и $-39,2 \pm 2,2$ мВ через 40 секунд стимуляции ($n=12$, $p>0,05$).

Количественному учету подлежала средняя амплитуда ПКП и их КС (вычисленный напрямую, посредством регистрации МПКП; так как амплитуда МПКП в ходе длинного залпа не менялась, амплитуда ПКП строго коррелировала с КС) на временных отрезках в 0, 10, 20, 30 и 40 секунд. В каждой временной точке проводилось усреднение по 25 последовательным ПКП, начиная от наиболее близкого к соответствующей временной отметке. Для получения первоначальных амплитуды и квантового состава использовались не первые 25 ПКП, а последующие 50 (начиная с 26-го), для исключения влияния

начального облегчения, хорошо выраженного при частоте стимуляции в 50 Гц, на усредненное значение.

Как α -кобратоксин, так и метилликаконитин оказались способными существенно и равноэффективно предотвращать падение КС ПКП в длинных залпах (рис.7). Более того, на рис.7 видно, что на фоне блокаторов $\alpha 7$ -нХР происходит замедление скорости снижения КС ПКП при длительной активности синапса, вплоть до полного предотвращения падения остановки падения на фиксированном уровне. В присутствии обоих токсинов первая фаза спада оставалась практически неизменной (к 10-й секунде КС ПКП также падал относительно изначального, хотя и несколько менее значительно – до $81,2 \pm 1,9\%$ и $79,2 \pm 5,2\%$ для α -кобратоксина и метилликаконитина соответственно), в то время как вторая фаза полностью исчезала – КС ПКП на 10-й и на 40-й секундах достоверно не отличались друг от друга ($n=9$ и $n=8$ для α -кобратоксина и метилликаконитина соответственно). К сороковой секунде регистрации, разница в КС с контролем составила около 20%.

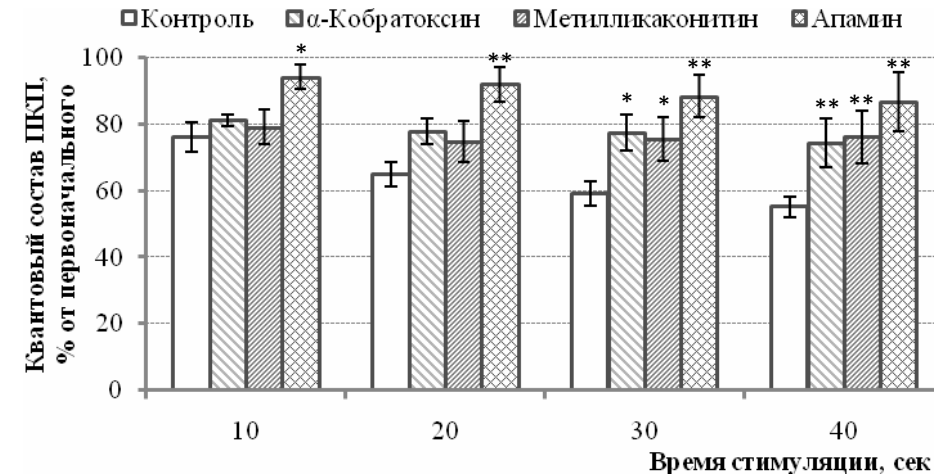


Рисунок 7. Квантовый состав вызванных ПКП при длительной стимуляции препарата с частотой 50 Гц (* - $p<0,05$; ** - $p<0,01$).

Способность блокаторов $\alpha 7$ -нХР предотвращать падение КС ПКП указывает на то, что при длительной высокочастотной ритмической работе синапсов происходит активация пресинаптических $\alpha 7$ -нХР (с помощью эндогенных агонистов), вызывающая к 30-40-ой секунде активности подавление выброса медиатора на 40-45% по сравнению с первыми ПКП залпа.

Таким образом, нами обнаружен режим стимуляции, воспроизводящий естественные условия, при котором происходит активация $\alpha 7$ -нХР посредством эндогенных никотиновых агонистов – АХ либо холина. Кроме того, нами была показана принципиальная возможность практически полного предотвращения падения КС ПКП на второй длительной фазе длительной ритмической

активности синапсов. Это указывает на то, что данное падение уровня выброса медиатора носит регуляторный характер: если бы оно было обусловлено истощением доступных запасов медиатора, либо десенситизацией нХР, блокаторы $\alpha 7$ -нХР не смогли бы на него повлиять.

Наряду с блокаторами $\alpha 7$ -нХР, апамин также оказался способным предотвращать падение КС ПКП в длинном залпе ПКП, причем более эффективно, чем метилликаонитин и α -кобратоксин ($n=5$). На рис. 7 видно, что апамин предотвратил падение ПКП не только на второй медленной фазе падения ПКП в залпе, но и на более ранней быстрой фазе падения ПКП в длинном залпе. Это означает, что активация SK-каналов может происходить еще до активации $\alpha 7$ -нХР. Возможно, что SK-каналы воспринимают сигнал, исходящий не только от околосоинаптических $\alpha 7$ -нХР, но и от рецепторов другого типа, возможно вообще не относящихся к семейству нХР (рис. 7).

Таким образом, в нашей работе показано, что низкопроводящие SK-каналы оказываются вовлеченными в работу терминали при длинных залпах. В современной литературе имеются сведения о наличии этого типа каналов не только на соматических нейронах, но и на периферии, в частности – в моторных нервных терминалах (Morita, Barrett, 1990; Urbano et al., 2001), однако их функциональная роль и режимы синаптической активности, при которых они вовлекаются в работу, остались не ясными, равно как и источники кальция, которые могут их активировать.

В свете данных, полученных при долговременной ритмической активации синапсов, оставался открытым вопрос о том, какой агент – сам медиатор или продукт его расщепления – холин активирует пресинаптические $\alpha 7$ -нХР, запуская работу петли отрицательной обратной связи в синапсе. Известно, что в холинэргических синапсах ЦНС АХ способен в значительных количествах выходить за пределы синаптической щели (Descarries, 1998), т.к. синапсы ЦНС имеют относительно низкий уровень АХЭ либо могут быть вовсе лишены АХЭ (Kawaja et al., 1990). В нервно-мышечном синапсе млекопитающих наблюдается иная ситуация – здесь холинэстеразная активность в синаптической щели крайне высока (Nguyen-Huu et al., 2005), и АХ не должен накапливаться в ней даже при достаточно интенсивной работе синапса, зато очевидно происходит преимущественное накопление холина. Примечательно, что продукт расщепления АХ, холин, известен как избирательный агонист $\alpha 7$ -нХР (Papke et al., 1996). В связи с этим, в следующей, и заключительной, серии опытов мы исследовали потенциальную роль холина как возможного агониста пресинаптических $\alpha 7$ -нХР в нервно-мышечном синапсе мыши.

7. Влияние холина на параметры активности моторных синапсов мыши

Для проверки действия холина нами была выбрана концентрация холина в 100 мМ, близкая к физиологической, имеющейся в синаптической щели (Papke et al., 1996). Согласно выдвинутой в работе Palma et al. (1996) модели десенситизации $\alpha 7$ -нХР, подкрепленной результатами ряда исследований на

нейрональных нХР (Papke et al., 2000; Sokolova et al., 2005), низкие (не превышающие или незначительно превышающие EC_{50}) концентрации агониста приводят к пролонгированному открытию каналов холинорецепторов с незначительным развитием десенситизации, что позволяет рецепторам сохранять частичную активность в хроническом присутствии агониста.

Взятый в концентрации 100 мМ, холин не вызвал изменений амплитуды МПКП и МП постсинаптической мембраны синапсов, но привел к достоверному и выраженному (почти двукратному) падению частоты МПКП, от $0,59 \pm 0,09$ Гц в контроле до $0,37 \pm 0,04$ ($p \leq 0,01$; $n=16$). Отсутствие влияния на амплитуду МПКП и уровень МП было вполне ожидаемо, так как холин не должен, даже в высоких концентрациях, взаимодействовать с постсинаптическими нХР мышечного типа и вызывать их десенситизацию. Падение частоты МПКП также соответствует сформулированным нами выше представлениям об отрицательной обратной связи, опосредованной пресинаптическими $\alpha 7$ -нХР.

Холин (в отличие от никотина), привел к падению квантового состава одиночных ПКП. Это падение было незначительным, но достоверным ($p \leq 0,05$; $n=16$), и полностью предотвращалось в присутствии α -СТх ($p \leq 0,05$; $n=7$).

В коротких залпах, холин действовал на уровень плато в залпе сходным с никотином образом: проявлял тормозное действие, приводя к снижению уровня ПКП в той же степени, что и никотин; его действие (так же как и действие никотина) предотвращалось антагонистами $\alpha 7$ -нХР (для совместной аппликации с α -кобратоксином $p \leq 0,01$; $n=5$) (рис. 8).

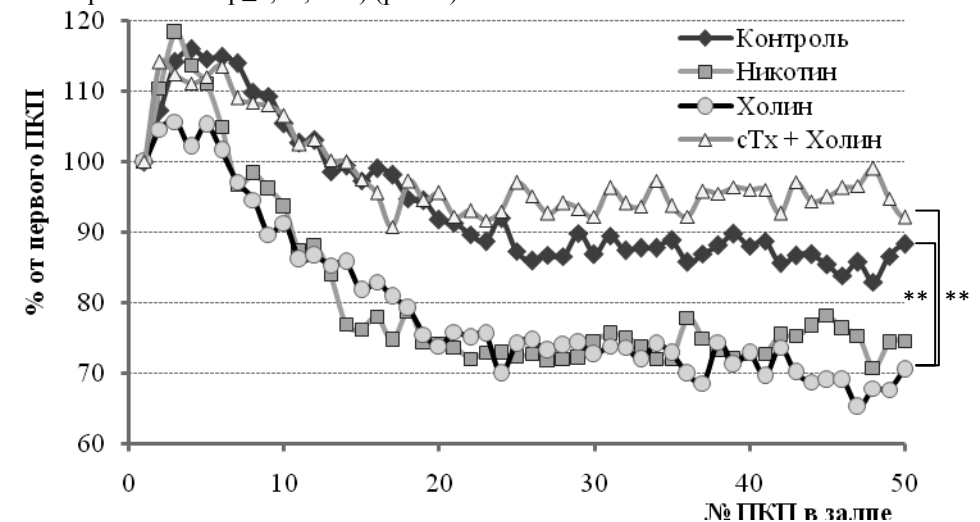


Рисунок 8. Влияние холина на ход залпа из 50 ПКП с частотой 50 Гц и исчезновение этого влияния в присутствии α -кобратоксина; для сравнения приведен ход залпа в присутствии никотина (** - $p < 0,01$).

Исходя из полученных результатов, схема реализации обратной связи в синапсе с участием $\alpha 7$ -нХР может выглядеть так. Ацетилхолин, выделяющийся в синаптическую щель при работе синапса, расщепляется до холина ацетилхолинэстеразой. Постепенно, накапливающийся холин выходит из синаптической щели и активирует околосинаптические $\alpha 7$ -нХР. Кальциевый сигнал через $\alpha 7$ -нХР дополнительно усиливается при активации РиР и выходе кальция из внутритерминальных депо. Этот кальций запускает работу SK-каналов, гиперполяризующих терминаль, что приводит к снижению выброса медиатора.

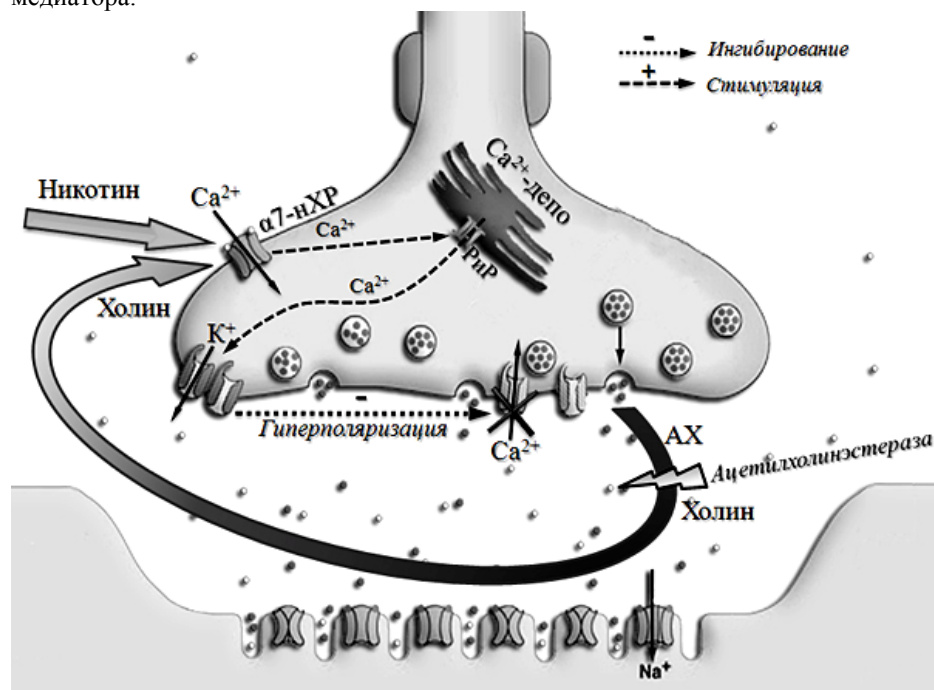


Рисунок 9. Схема возможного действия холина и никотина на пресинаптические $\alpha 7$ -нХР с последующей активацией рианодиновых рецепторов (РиР) кальциевых депо и Ca^{2+} -зависимых K^+ -каналов SK-типа, которые гиперполяризуют терминаль, приводя к закрытию потенциалзависимых Ca^{2+} -каналов, запускающих секрецию АХ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В нашей работе исследована роль пресинаптических нХР т.н. $\alpha 7$ -типа в регуляции секреции АХ в нервно-мышечных синапсах и возможные механизмы, опосредующие эту роль.

Мы впервые установили, что никотин в низкой концентрации 10 нМ незначительно, но достоверно подавляет выброс медиатора АХ во время

залповой активности синапсов. Тот факт, что это подавление предотвращалось селективными блокаторами $\alpha 7$ -нХР – α -кобратоксином и метилликаконитином – указывает на то, что действие никотина реализуется через активацию, а не десенситизацию пресинаптических нХР. В пользу вовлечения $\alpha 7$ -нХР в опосредованное никотином торможение секреции АХ при залповой активности говорит и положительная зависимость выраженности тормозных эффектов никотина от внеклеточной концентрации кальция (имея в виду способность $\alpha 7$ -нХР проводить входящий в терминаль кальциевый ток).

Способность тонически присутствующего в среде никотинового агониста активировать, но не десенситизировать нХР нейронального типа, показанная нами, была постулирована ранее в работах Е. Е. Никольского и сотрудников (2000), а также экспериментально продемонстрирована и другими авторами (Papke et al., 2000; Sokolova et al., 2005) и отражена в кинетической модели десенситизации для $\alpha 7$ -нХР, предложенной Palma и коллегами (1996). Следует подчеркнуть, что падение квантового состава ПКП в ритмическом залпе ПКП на фоне тонического действия никотина показывает возможность малых доз никотина, сопоставимых с получаемыми при курении, (незначительно затрагивающих мышечные нХР), оказывать, тем не менее, пресинаптическое тормозное влияние на нервно-мышечное проведение – возможность, ранее не описанную другими исследователями.

Впервые обнаруженная в нашей работе способность рианодина (блокатора рианодиновых рецепторов, РиР) и апамины (блокатора кальцийзависимых K^+ -каналов SK-типа) предотвращать тормозные эффекты никотина позволила выявить связь активации $\alpha 7$ -нХР с выбросом кальция из рианодин-чувствительных кальциевых депо и работой SK-типа кальцийзависимых K^+ -каналов терминали. Мы предполагаем, что при действии никотина, входящий по каналам $\alpha 7$ -нХР Ca^{2+} -ток может активировать РиР и выброс депонированного кальция, направленный на активацию SK-каналов. Это приводит к гиперполяризации терминали, снижению потенциалзависимого входа кальция и подавлению секреции (см. рис 9).

Способность нХР активировать выброс депонированного кальция описана во многих центральных синапсах, где она приводит к усилению секреции медиатора (Sharma, Vijayaraghavan, 2003; Sharma et al., 2008). Однако в периферических синапсах, как мы показали, аналогичное взаимодействие приводит к торможению секреции АХ вследствие активации SK-каналов. Ранее в работах Балезиной и соавторов была показана возможность активации SK-каналов за счет выброса депонированного кальция, приводящая к подавлению спонтанной секреции медиатора (Балезина и соавт., 2005). В нашей работе впервые показано функциональное взаимодействие в триаде $\alpha 7$ -нХР - РиР - SK-каналы, направленное на торможение вызванной секреции АХ по механизму отрицательной обратной связи.

Анализ действия другого избирательного агониста $\alpha 7$ -нХР, холина, выявил аналогичное никотину по механизму, но более выраженное тормозное действие

на секрецию. В 70-е и 80-е годы в ряде работ (Полетаев и соавт., 1978; Гиниатуллин, 1981; Glavinović, 1988; Никольский 1990), была продемонстрирована способность экзогенного холина угнетать нервно-мышечную передачу. Однако отсутствие современных представлений о подтипах нейрональных нХР не позволило тогда выявить вклад именно $\alpha 7$ -нХР, а также участие РнР и SK-каналов в тормозных эффектах экзогенного холина.

Полученные нами факты, а также данные литературы о высокой активности синаптической АХЭ в синапсах млекопитающих позволяют предполагать, что именно эндогенный холин способен обеспечить регуляцию секреции АХ по механизму отрицательной обратной связи. Однако такое действие, как мы показали, проявляется лишь при длительном (не менее 0,5 минуты) и залповом (50 Гц) режиме работы синапсов. Такой режим, как известно, сопровождается значительным падением амплитуды ПКП, достигавшим в наших опытах 50-55% от исходной амплитуды. Ранее в работах Moyer и van Lunteren (1999) отмечалось, что такое значительное снижение амплитуды ПКП в синапсах диафрагмы не связано с десенситизацией постсинаптических нХР или истощением запаса медиатора, а является регуляторным эффектом. Нами впервые установлено, что почти двукратное подавление амплитуды и КС ПКП при продолжительной (0,5-1 минуты) высокочастотной (50 Гц) работе синапсов может быть на 80-90% предотвращено избирательной блокадой SK-каналов или $\alpha 7$ -нХР.

Совокупность полученных данных позволяет заключить, что нервные терминалы моторных синапсов диафрагмы мышцы располагают пулом $\alpha 7$ -нХР, которые могут вовлекаться в активность при действии экзогенных и эндогенных избирательных агонистов, что приводит к торможению вызванной залповой секреции медиатора. В естественных условиях активация $\alpha 7$ -нХР возникает лишь при продолжительной работе синапсов. По-видимому, именно при таком режиме происходит достаточное накопление в синаптической щели и ее окружении эндогенных агонистов – холина (или АХ) – способных активировать пул пре- или околосоинаптических $\alpha 7$ -нХР и приводить к подавлению выброса медиатора по механизму отрицательной обратной связи. Возможные механизмы этого торможения, как мы показали, предполагают участие рианодиновых кальциевых депо и активацию SK-каналов (см. рис 9). Принимая во внимание высокий уровень надежности проведения в нервно-мышечных синапсах млекопитающих (избыточность секреции медиатора здесь оценивается исследователями в 180-500% (Gertler, Robbins, 1978; Wood, Slater, 1997)), снижение квантового состава ПКП при действии петли обратной связи не должно приводить к нарушению проведения сигнала (за исключением патологий, когда фактор надежности снижен, например, при миастенических синдромах), и в то же время пресинаптическое холинэргическое аутоингибирование секреции АХ может обеспечить предотвращение расхода значительных количеств медиатора.

ВЫВОДЫ

1. В нервно-мышечных синапсах мышцы тоническое действие никотина (10 нМ) способно приводить к устойчивому снижению квантового состава ПКП на 15-20% при ритмической стимуляции синапса (4-50 Гц).
2. Действие никотина зависит от внеклеточной концентрации ионов кальция и предотвращается селективным блокатором $\alpha 7$ -нХР, α -кобратоксином (5 нМ), что указывает на вовлечение пресинаптических $\alpha 7$ -нХР в эффекты никотина.
3. Подавление выброса медиатора под действием никотина при залповой активности синапса предотвращается рианодином (2 μ М), блокатором выхода кальция из внутриклеточных Ca^{2+} -депо терминалей, а также апамином (1 μ М), антагонистом низкопроводящих Ca^{2+} -зависимых K^{+} -каналов SK-типа.
4. Холин (100 μ М), избирательный агонист $\alpha 7$ -нХР, воспроизводит тормозные эффекты никотина в залпах, подавляя уровень ПКП в залпе на 15-20%; его действие предотвращается α -кобратоксином. Избирательные блокаторы $\alpha 7$ -нХР сами по себе не оказывают влияния на амплитуду МПКП, квантовый состав ПКП и падение амплитуды и квантового состава ПКП по ходу коротких высокочастотных залпов (4-50 Гц). Падение амплитуды и квантового состава ПКП, развивающееся при долговременной активации синапса (2000-3000 стимулов, 50 Гц), удается предотвратить на 80-90% предварительным введением избирательных блокаторов $\alpha 7$ -нХР - α -кобратоксина, метилликаконитина (20 нМ), а также блокатора SK-каналов апамина.
5. В нервно-мышечном синапсе мышцы обнаружена регуляция секреции медиатора по принципу отрицательной обратной связи с участием пресинаптических $\alpha 7$ -нХР. Аутоингибирование развивается лишь на фоне продолжительной высокочастотной активности синапса и накоплении эндогенных агонистов (АХ/холина) активирующих пресинаптические $\alpha 7$ -нХР. Их срабатывание приводит к активации SK-каналов, что сопровождается снижением выброса медиатора.

Список работ, опубликованных по теме диссертации:

1. Balezina O. P., **Fedorin V. V.**, Gaydukov A. E. Effect of nicotine on neuromuscular transmission in mouse motor synapses // Bulletin of Experimental Biology and Medicine, Springer US, 2006, vol. 142, no. 1, pp. 17-21.
2. **Федорин В. В.** Исследование роли пресинаптических н-холинорецепторов в регуляции активности нервно-мышечного синапса мыши // Тезисы докладов XIII международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2006», М., 2006, с.232-233.
3. **Fedorin V. V.**, Balezina O. P. Low concentration of nicotine triggers a novel regulatory pathway in neuromuscular synapses // Abstr. Neuro 2007, Yokohama, Japan, 2007, P1-a02.
4. Балезина О. П., **Федорин В. В.** Роль н-ХР нейронального типа в регуляции секреции медиатора в нервно-мышечных синапсах мыши // Тезисы докладов, XX съезд физиологического общества им. И. П. Павлова, М., 2007, с. 136.
5. **Федорин В. В.**, Балезина О. П. Участие н-холинорецепторов нейронального типа в регуляции выброса медиатора в нервно-мышечных синапсах мыши // Нейрохимия, М., 2008, том 25, № 1-2, с. 99-104.