

*На правах рукописи*



**Проскурина Светлана Евгеньевна**

**ВЛИЯНИЕ ОКСИДА АЗОТА (NO) НА АКТИВНОСТЬ ФЕРМЕНТА  
АЦЕТИЛХОЛИНЭСТЕРАЗЫ В НЕРВНО-МЫШЕЧНОМ  
СИНАПСЕ КРЫСЫ**

03.01.02 – биофизика

03.03.01 – физиология

Автореферат  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Казань — 2016



## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### *Актуальность исследования*

Одним из ключевых ферментов, обеспечивающих синаптическую передачу возбуждения в холинэргических синапсах, является ацетилхолинэстераза (АХЭ), которая ограничивает время воздействия медиатора ацетилхолина (АХ) на рецепторы постсинаптической мембраны, гидролизуя его до холина и ацетата. Поскольку АХЭ определяет продолжительность действия АХ на ацетилхолиновые рецепторы (АХР), и соответственно, амплитуду и длительность постсинаптических ответов, поиск способов модуляции активности этого фермента является предметом многих исследований. Частичное ингибирование АХЭ экзогенными ингибиторами широко применяется в медицине для компенсации уменьшения количества секретируемого ацетилхолина и снижения чувствительности постсинаптической мембраны к этому медиатору (при болезни Альцгеймера, миастении гравис, синдроме Ламберта-Итона, врожденных миастенических синдромах и т.д.). Причем применение ингибиторов АХЭ часто единственный способ восстановления синаптической передачи при данных заболеваниях. Учитывая, что частичное ингибирование АХЭ действительно крайне эффективный способ увеличения фактора надежности синаптической передачи, легко представить, что модуляция активности АХЭ веществами эндогенной природы также может иметь место, например, как один из механизмов кратковременной синаптической пластичности. Однако, поскольку о существовании эндогенных ингибиторов АХЭ не было известно, то данный способ модуляции амплитудно-временных параметров синаптических ответов ранее не обсуждался. Количество АХЭ в синаптической щели не является постоянной величиной и регулируется в ответ на изменение условий функционирования синапса. Известно, что уровень синтеза АХЭ и, соответственно, её количество контролируется паттерном активности синапса (Lomo et al., 1985). Увеличение частоты стимуляции усиливает синтез АХЭ и, наоборот, уменьшение синаптической активности снижает синтез АХЭ (Rotundo et al., 2003; 2008). Однако, описанные механизмы регуляции активности этого фермента относительно длительные процессы, занимающие несколько часов и включающие синтез АХЭ, её секрецию и закоривание в синаптической щели. Поскольку изменения физиологической активности происходят значительно быстрее, то логично предположить существование и других, более быстрых путей регуляции активности АХЭ. И действительно, показано, что *in vitro* фосфорилирование АХЭ способно увеличивать скорость гидролиза субстрата в десять раз (Grifman et al., 1997), но неизвестно существуют ли *in vivo* популяции фермента, фосфорилированные в разной степени. Поэтому вопрос о существовании этого типа регуляции *in vivo* остается открытым.

Существуют исследования, свидетельствующие, что молекулы оксида азота способны оказывать ингибирующий эффект на активность АХЭ. Не так давно были получены данные о том, что Spermine NONOate – донор оксида азота (NO) *in vitro* способен ингибировать активность кортикальной АХЭ (Udayabanu et al., 2008). Оксид азота – газообразный мессенджер, играющий роль модулятора разнообразных функций организма, включая синаптические процессы, связанные с реализацией синаптической пластичности и секреции нейротрансмиттеров. Мишенью для NO могут быть самые различные синаптические белки. В настоящее время наиболее изученной мишенью для NO является растворимая гуанилатциклаза (sGC), которая может не только активироваться молекулами NO, но и обратимо десенситизироваться в присутствии оксида азота (Sayed et al., 2007). Показано, что десенситизация sGC реализуется путем S-нитрозилирования остатков цистеина. Кроме того, показано, что NO способен ингибировать проводимость Na<sup>+</sup>-каналов в нейронах спинного мозга (Renganathan et al., 2002), активировать рианодин-чувствительные кальциевые каналы (Schuman, Madison, 1994; Stamler, Meissner 2001), увеличивать скорость образования комплекса VAMP/SNAP-25/синтаксин (Pan et al., 1996; Wildemann, Bicker, 1999).

В связи с этим возник вопрос – действительно ли молекулы оксида азота способны регулировать активность АХЭ в синаптической щели?

Если это так, то данный механизм регуляции активности гидролизующего ацетилхолин фермента может играть значительную роль в нервно-мышечной передаче, поскольку широко известно, что, во-первых, мышечные волокна достаточно хорошо экспрессируют NO-синтазу, и, во-вторых, значительная часть этого фермента локализуется именно в области синаптического контакта (Stamler, Meissner, 2001). Эти факты позволили нам выдвинуть гипотезу о возможности регуляции активности синаптической АХЭ этим газообразным мессенджером.

### ***Цель и задачи исследования***

Целью данной работы стало исследовать возможность модуляции активности ацетилхолинэстеразы в нервно-мышечном синапсе теплокровных оксидом азота (NO) экзогенного и эндогенного происхождения.

Для достижения этой цели были поставлены следующие задачи.

1. Изучить влияние донора оксида азота SNAP на активность ацетилхолинэстеразы гомогенатов мышцы длинный разгибатель пальцев (*m. extensor digitorum longus*) крысы.

2. Исследовать эффекты SNAP на амплитудно-временные характеристики миниатюрных токов концевой пластинки в синапсах с интактной и ингибированной ацетилхолинэстеразой в условиях *ex vivo*.
3. Выяснить роль глутаматных NMDA рецепторов в обеспечении усиления синтеза эндогенного NO и изменения амплитуды и длительности миниатюрных токов концевой пластинки в синапсах с интактной и ингибированной ацетилхолинэстеразой.
4. Исследовать влияние эндогенного глутамата, выделяемого в синаптическую щель при ритмической стимуляции двигательного нерва, на амплитудно-временные параметры миниатюрных токов концевой пластинки.

#### ***Положения, выносимые на защиту***

1. Увеличение содержания оксида азота в нервно-мышечном соединении вызывает угнетение активности синаптической ацетилхолинэстеразы.
2. Активация комплекса «NMDA-рецептор – NO-синтаза», приводящая к усилению продукции эндогенного оксида азота, способна снижать активность ацетилхолинэстеразы нервно-мышечных синапсов.

#### ***Научная новизна работы***

В данной работе впервые было показано, что оксид азота как экзогенного, так и эндогенного происхождения способен ингибировать активность ацетилхолинэстеразы в нервно-мышечном синапсе крысы. Эффект эндогенного NO опосредуется активацией NMDA-рецепторов и последующим увеличением активности NO-синтазы — фермента, продуцирующего оксид азота. Впервые получены данные о возможности быстрого модулирования активности синаптической ацетилхолинэстеразы эндогенными ингибиторами.

#### ***Научно-практическая значимость работы***

Так как оксид азота действительно способен угнетать активность ацетилхолинэстеразы в нервно-мышечном синапсе, необходимо учитывать этот антихолинэстеразный эффект доноров NO при использовании их в медицинской практике. Результаты данной работы проливают свет на механизм эндогенной модуляции активности одного из ключевых в холинэргической нейротрансмиссии ферментов, таким образом, внося вклад в развитие синаптологии и открывая перспективы для дальнейших исследований эндогенной регуляции активности синаптических белков. Экспериментальные данные, изложенные в работе, могут быть использованы в клинической практике, в научных учреждениях, занимающихся изучением эндогенных модуляторов синаптических процессов и исследованием влияния оксида азота, а также в учебном процессе при чтении курсов лекций по физиологии человека и животных, нейробиологии и биофизики в ВУЗах.

***Связь работы с научными программами и собственный вклад автора в исследования***

Работа выполнена при поддержке грантами РФФИ № 11-04-01188 «Механизмы модуляции активности ацетилхолинэстеразы и изучение действия монооксида азота как возможного эндогенного ингибитора этого фермента», 12-04-32056 «Новые ингибиторы ацетилхолинэстеразы для лечения миастении Гравис и врожденных миастенических синдромов», 12-04-33296 «Физиологическая роль фермента бутирилхолинэстеразы в процессе передачи возбуждения в холинергическом нервно-мышечном синапсе», РФФИ – КОМФИ № 13-04-40289-Н «Создание органоспецифических ингибиторов фермента ацетилхолинэстеразы для лечения миастенических синдромов», «Ведущая научная школа» НШ-2669.2012.7 «Новые принципы терапии заболеваний нервно-мышечной системы, обусловленных дефектами в системе «мотонейрон-двигательный нерв-скелетная мышца», НШ-5584.2014.4 «Молекулярные механизмы регуляции процессов квантовой и неквантовой секреции медиатора». Научные положения диссертации и выводы базируются на результатах собственных исследований автора, либо полученных при его непосредственном участии совместно с сотрудниками КИББ КазНЦ РАН с.н.с., к.б.н. Ковязиной И. В (эксперименты по исследованию влияния эндогенного глутамата), сотрудником ИОФХ им. А. Е. Арбузова КазНЦ РАН м.н.с., к.б.н. Харламовой А. Д. (эксперименты по определению активности АХЭ *in vitro*).

***Достоверность полученных данных***

Достоверность полученных данных основана на большом объеме результатов экспериментальных исследований с использованием адекватных методических подходов и статистической обработки полученных результатов.

***Апробация работы***

Результаты исследования докладывались на 4-ой международной научно-практической конференции «Постгеномные методы анализа в биологии, лабораторной и клинической медицине» (Казань, 2014), на 11-м Международном Конгрессе, посвященном холинэстеразам (11th International Meeting on Cholinesterases, Казань, 2012), на Международном симпозиуме «Molecular Mechanisms of Synaptic Transmission Regulation» (Киев, 2012), на IV Всероссийском с международным участием Конгрессе молодых ученых-биологов Симбиоз-Россия 2013, (Иркутск, 2013), на Международном симпозиуме «Газомедиаторы: физиология и патофизиология», (Казань, 2014), на Международной научно-технической конференции молодых ученых, аспирантов и студентов «Прикладная электродинамика, фотоника и живые системы», (Казань, 2015), на Международной конференции «Рецепторы и внутриклеточная сигнализация» (Пушино, 2015г).

### **Реализация результатов исследования**

По теме диссертации опубликовано 12 научных работ, из которых 3 статьи в рецензируемых журналах, включенных в список ВАК и реферативную базу SCOPUS.

### **Структура и объём диссертации**

Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов, их обсуждения, выводов и списка цитированной литературы. Работа изложена на 134 страницах машинописного текста, включает 12 рисунков. Список цитируемой литературы содержит 353 источника, из них 351 иностранных авторов.

## **ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

**Объекты.** Эксперименты проводили на изолированных нервно-мышечных препаратах (*m. EDL* — *m. extensor digitorum longus*) крыс породы Wistar обоих полов весом 250-300 гр, анестезированных при помощи эфира. Изолированную мышцу с подходящим к ней нервом помещали в экспериментальную ванночку, через которую протекал аэрированный карбагеном (O<sub>2</sub> 95%, CO<sub>2</sub> 5%) раствор Рингера-Кребса для теплокровных следующего состава (ммоль/л): NaCl – 120.0, KCl – 5.0, CaCl<sub>2</sub> – 2.0, MgCl<sub>2</sub> – 1.0, NaHCO<sub>3</sub> – 11.0, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 1.0, глюкоза – 11.0, pH раствора поддерживали на уровне 7.2-7.4 при температуре 20±2 С° (скорость перфузии 2-3 мл/мин). Все эксперименты проводились в соответствии с директивой European Communities Council Directive от 24 ноября 1986 года (86/609/ЕЕС).

### **Определение активности ацетилхолинэстеразы *in vitro***

Для определения активности АХЭ в гомогенатах мышц свежеприготовленный клеточный экстракт получали из мышц в гомогенизаторе Поттера в растворе, содержащем 0.05 М трис-НСl, 1% Tween 20, 1 М NaCl, 2 ммоль/л EDTA; pH 7.0 (Bon et al., 1979). Также добавляли 50 мкмоль/л тетра-изопропил-пирофосфорида (iso-ОМРА) (Koelle et al., 1974) для ингибирования бутирилхолинэстеразы. Экстрагировали 5 минут при +4°С, после чего центрифугировали при 13,5 тыс.об./мин в центрифуге Eppendorf 5430 R (ротор FA-45-30-11) и отбирали супернатант. Концентрацию белка определяли по методу Брэдфорда (Bradford, 1976). Параметры эстеразной реакции определяли по методу Элмана (Ellman et al., 1961), используя ацетилтиохолин (АТХ) в качестве субстрата. Скорость реакции гидролиза АТХ регистрировали при помощи спектрофотометра Perkin-Elmer λ25 (USA) при длине волны 412 нм. Активность АХЭ подсчитывалась как изменение оптической плотности во времени.

**Регистрация миниатюрных токов концевой пластинки (МТКП)** производилась с помощью стандартной микроэлектродной техники с использованием микроэлектродов из

стекла Pirax, заполненных раствором KCl (3 моль/л) с сопротивлением 5-10 МОм. Мембранный потенциал поддерживался на уровне -60 мВ (если не указано иное). В каждом препарате регистрировали от 150 до 200 МТКП в каждом мышечном волокне. После предварительного усиления сигналы записывали на жесткий диск компьютера и анализировали с помощью оригинальной компьютерной программы. Анализировали следующие параметры МТКП – амплитуду, время роста от 20 до 80% амплитуды, постоянную времени спада ( $\tau$ ). За постоянную времени спада принимался интервал времени между 0,8 и 0,367 амплитуды МТКП. Зарегистрированные амплитудно-временные параметры МТКП каждой концевой пластинки усреднялись, каждая группа экспериментальных данных состояла из усредненных значений от 20-30 концевых пластинок. Для предотвращения спонтанных мышечных сокращений, вызванных ингибированием АХЭ параоксоном и SNAP, в омывающий мышцу раствор добавляли блокатор  $\text{Na}^+$ -каналов тетродотоксин (0,1 мкмоль/л).

***Регистрация миниатюрных токов концевой пластинки в межстимульные интервалы при стимуляции нерва***

В экспериментах со стимуляцией нерва препарат инкубировали в течение 20 минут с раствором блокатора  $\text{Na}^+$ -каналов  $\mu$ -конотоксина GПВ в концентрации 2 мкмоль/л для предотвращения сокращений мышечных волокон. Стимуляцию нерва осуществляли через платиновые электроды прямоугольными электрическими импульсами длительностью 0.1 мс супрамаксимальной величины с частотой 10 Гц.

***Используемые реактивы***

Параоксон ( $1 \times 10^{-6}$  моль/л), тетродотоксин ( $1 \times 10^{-7}$  моль/л), глутамат ( $100 \times 10^{-6}$  моль/л), глицин ( $700 \times 10^{-6}$  моль/л), DL-2-амино-5-фосфонопентаноиковая кислота (AP-5) ( $500 \times 10^{-6}$  моль/л), 5,7-дихлорокинуреновая кислота ( $100 \times 10^{-6}$  моль/л), NG-нитро-L-аргинин метил эстер (L-NAME) ( $100 \times 10^{-6}$  моль/л), S-нитрозо-N-ацетил-DL-пеницилламин (SNAP) (различные концентрации), циклогексимид ( $350 \times 10^{-6}$  моль/л), окадаиковая кислота ( $1 \times 10^{-6}$  моль/л), тетра-изопропил-пирофосфорамид (iso-OMPA) ( $50 \times 10^{-6}$  моль/л), ацетилхолин, ацетилтиохолин, гемоглобин ( $30 \times 10^{-6}$  моль/л), эритроцитарная ацетилхолинэстераза человека, 5,5'-дитиобис (2-нитробензоиковая кислота) (реактивы для реакции Элмана). Реактивы были получены от Sigma-Aldrich, St. Louis, MO.  $\mu$ -конотоксин ( $2 \times 10^{-6}$  моль/л) был приобретен в Alamone Labs (Израиль).

***Статистическая обработка результатов*** проводилась с использованием программы Microcal Origin 7.5. Использовали стандартные методы определения средних величин, стандартных ошибок, а также параметрический t-критерий Стьюдента для попарно связанных вариантов (Бронштейн, Семендяев, 1986; Гланц, 1999) на уровне значимости 0.05. Во всех сериях экспериментов данные представлены как средние значения  $\pm$ SEM, при этом n

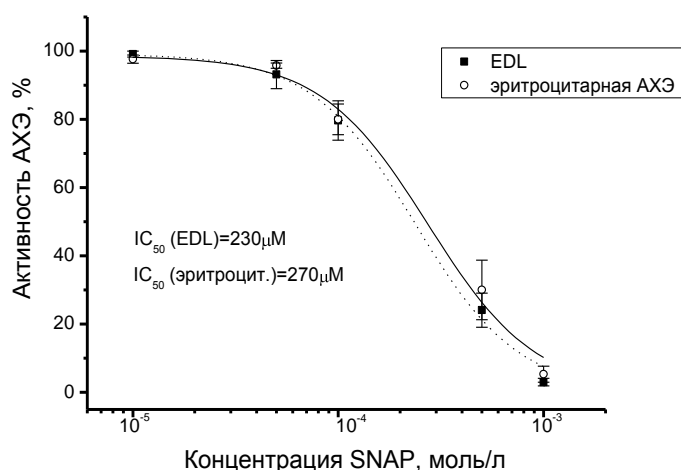


– обозначает количество исследуемых концевых пластинок (если не указано иного). На рисунках указаны средние значения исследуемых параметров и их средние квадратичные отклонения.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

### 1. Влияние донора NO на активность АХЭ\*

Для определения того, способны ли молекулы NO ингибировать АХЭ в нервно-мышечном синапсе, были проведены биохимические эксперименты по оценке активности очищенной АХЭ эритроцитов человека в присутствии различных концентраций донора NO – SNAP. Было установлено, что в присутствии SNAP действительно имеет место снижение активности АХЭ вплоть до полного ингибирования фермента (рис. 1).



**Рисунок 1** - Ингибирование активности ацетилхолинэстеразы (АХЭ) гомогенатов мышцы EDL (n=17) и эритроцитов человека (n=10) в присутствии донора молекул NO SNAP; IC<sub>50</sub> - концентрация ингибитора, при которой наблюдается снижение активности фермента на 50% от контрольного значения.

Так, если в концентрации 10 и 50 мкмоль/л SNAP активность АХЭ почти не снижается, то при концентрации донора в 100 мкмоль/л активность снижается на 16,5 % по сравнению с контролем (рис. 1).

Дальнейшее увеличение концентрации приводит к более выраженному угнетающему действию донора, и полное ингибирование фермента наступает при использовании SNAP в концентрации 1 ммоль/л. Таким образом, IC<sub>50</sub> (концентрация ингибитора, при которой наблюдается снижение активности фермента на 50% от контрольного) составила 270 мкмоль/л. SNAP – неэквивмолярный донор оксида азота. Используя NO-селективный электрод, Негманн и Егхлебен (2001) показали, что 1 ммоль/л SNAP выделяет приблизительно 8 мкмоль/л NO. Таким образом, IC<sub>50</sub>, равная 230 мкмоль/л соответствует 1,8 мкмоль/л NO в растворе. Дальнейшие серии экспериментов проводились по аналогичному протоколу, но с АХЭ гомогенатов мышцы крысы *m. EDL*.

\*Эксперименты проводились совместно с м.н.с. ИОФХ им. А. Е. Арбузова, к.б.н. Харламовой А. Д.

Показали, что активность АХЭ мышцы также ингибируется при использовании SNAP, причем в том же диапазоне концентраций и с аналогичной степенью подавления активности (рис. 1). В концентрации 10 и 50 мкмоль/л донора активность мышечной АХЭ остается без изменений, а при концентрации 100 мкмоль/л активность падает на 20% относительно контрольных значений. При этом  $IC_{50}$  составила 230 мкмоль/л.

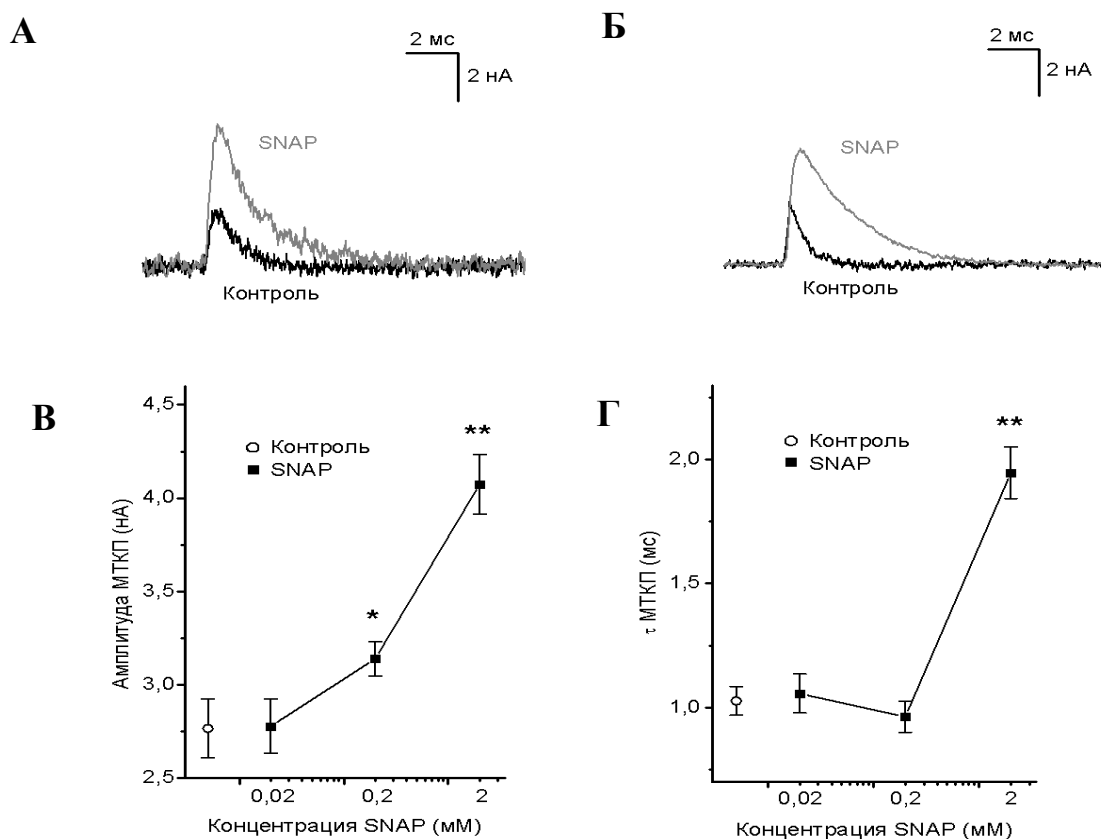
Таким образом, можно утверждать, что молекулы NO действительно способны ингибировать фермент АХЭ мышцы *in vitro*.

### ***Влияние донора оксида азота на амплитудно-временные параметры МТКП в нервно-мышечном синапсе***

Широко известно, что ингибирование АХЭ в холинэргическом синапсе приводит к увеличению амплитуды и длительности постсинаптических сигналов (Katz, Miledi, 1973). При этом показано, что с увеличением концентрации ингибитора амплитуда сигналов растет линейно, а длительность – экспоненциально (Anglister et al., 1994). В связи с этим, встает вопрос: если интактная АХЭ концевой пластинки ингибируется NO, то будут ли наблюдаться в нервно-мышечном соединении изменения, характерные для действия ингибиторов АХЭ? Ранее было показано (Mukhtarov et al., 2000), что в диафрагмальной мышце крысы донор оксида азота SNAP (100 мкмоль/л), снижает некантовую секрецию ацетилхолина, не оказывая влияния на миниатюрные потенциалы концевой пластинки. Мы предположили, что ингибирование синаптической АХЭ требует более высоких концентраций NO, чем это необходимо для влияния на некантовую секрецию ацетилхолина. В связи с этим, в данной работе мы последовательно увеличивали концентрацию донора NO SNAP вплоть до 2 ммоль/л. Основываясь на характере ингибирования АХЭ оксидом азота *in vitro*, для электрофизиологических экспериментов мы использовали концентрации SNAP от 20 мкмоль/л до 2 ммоль/л.

Средние значения амплитуды и постоянной времени спада МТКП, зарегистрированных в нервно-мышечных синапсах *m. EDL* с помощью метода двухэлектродной фиксации потенциала (потенциал при этом поддерживался на уровне -60 мВ) в контроле составили  $2.77 \pm 0.16$  нА и  $1.03 \pm 0.06$  мс, соответственно (n=41). В присутствии SNAP в концентрации 20 мкмоль/л амплитуда МТКП достоверно не изменялась (n=30), тогда как при десятикратном повышении концентрации донора NO, а именно, при концентрации SNAP в 200 мкмоль/л, регистрируемый параметр сигнала увеличивался на 12% и составил  $3.14 \pm 0.09$  нА (n=30) (рис. 2). Кроме этого, в данных экспериментах (SNAP 200 мкмоль/л) была отмечена и тенденция к увеличению постоянной времени спада МТКП, которая достигла значения 1.4 мс, что составило 10 % по сравнению с контрольным значением. Однако это изменение было недостоверным для уровня значимости —  $p=0.05$ .

Необходимо отметить, что эффекты донора NO, как на амплитуду, так и на длительность МТКП обратимы, так как они полностью исчезали после отмывки препарата. Время инкубации препарата в SNAP перед началом измерений составляло – 20 минут.



**Рисунок 2** - SNAP повышает амплитуду и постоянную времени спада ( $\tau$ ) МТКП доза-зависимым образом. (А) Пример отдельного МТКП в контроле (черная линия) и в присутствии 2 ммоль/л SNAP (серая линия). (Б) В среднем 100 отдельных сигналов, записанных в одной и той же концевой пластинке. (В) В присутствии SNAP в концентрации 200 мкмоль/л наблюдалось умеренное увеличение амплитуды МТКП. Применение 2 ммоль/л SNAP приводило к значительному росту амплитуды МТКП ( $n = 20-40$  на каждую концентрацию и на контроль). (Г) Постоянная времени спада ( $\tau$ ) значительно возрастала при концентрации SNAP в 2 ммоль/л. Более низкие концентрации донора NO не оказывали эффекта ( $n = 20-40$  на каждую концентрацию и контроль).\* - достоверное отличие от контроля ( $p < 0.05$ ); \*\* - достоверное отличие от контроля ( $p < 0.001$ )

Использование SNAP в концентрации 2 ммоль/л привело к значительному увеличению амплитуды МТКП на 47% ( $p < 0.001$ ), что составило увеличение на 1.3 нА, по сравнению с контрольным значением в 2.77 нА, и постоянной времени спада на 89% ( $n = 27$ ;  $p < 0.001$ ; рис. 2), что на 0.9 мс больше по сравнению с контролем. При этом амплитуда достигла значения  $4.08 \pm 0.16$  нА, а постоянная времени спада –  $1.95 \pm 0.10$  мс.

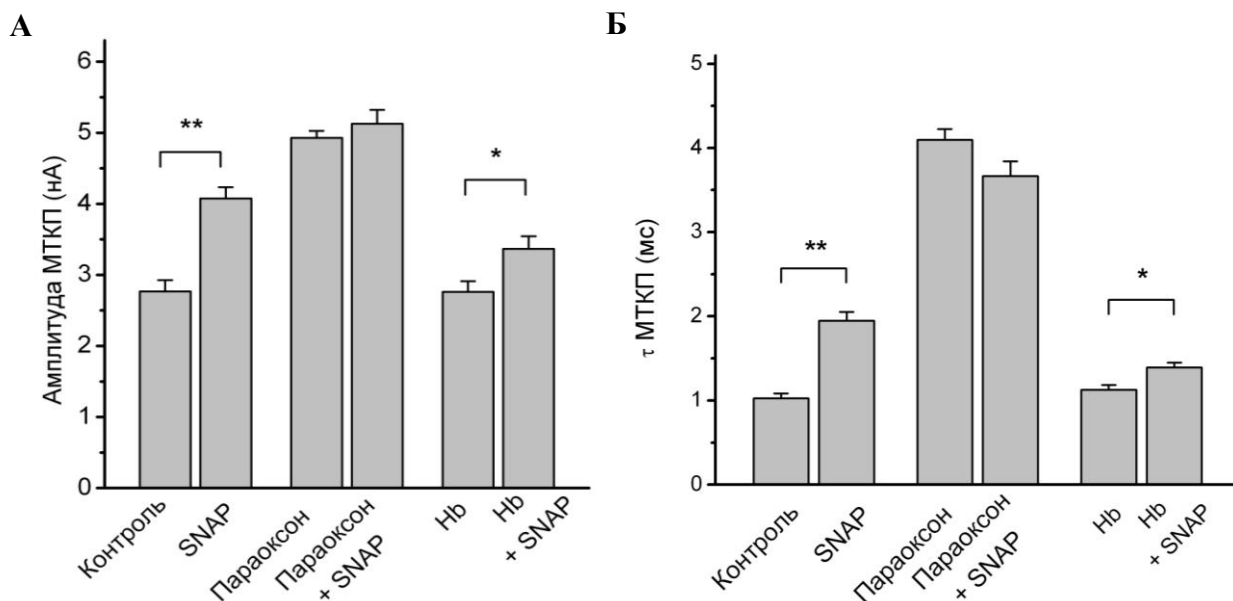
Действительно ли изменение параметров постсинаптических ответов под действием донора оксида азота соответствует изменениям, характерным для действия ингибитора АХЭ

в нервно-мышечном синапсе и не связано ли оно с влиянием на другие пре- и/или постсинаптические молекулярные мишени, способные тем или иным образом увеличивать амплитуду и постоянную времени спада постсинаптических сигналов? Для ответа на этот вопрос были проведены следующие серии экспериментов с использованием классического ингибитора АХЭ параоксона.

В присутствие параоксона в концентрации 10 мкмоль/л, при которой ингибируется практически вся АХЭ, амплитуда и постоянная времени спада МТКП выросли относительно контроля на 44% и на 298% соответственно, и составили  $4.93 \pm 0.10$  нА и  $4.10 \pm 0.13$  мс. Амплитуда в контроле была 2.77 нА, а длительность – 1.03 мс ( $n=19$ ;  $p<0.001$ ; рис. 3). Эти результаты сопоставимы с данными, полученными при использовании SNAP в концентрации 2 ммоль/л (рис. 3), при которой, согласно вышеприведенным биохимическим данным (*in vitro* максимальная концентрация составляла 1 ммоль/л), наблюдается полное подавление активности АХЭ гомогенатов *m. EDL* крысы и эритроцитов человека (рис. 1).

Для подтверждения того факта, что именно подавление активности АХЭ в нервно-мышечном синапсе и есть причина наблюдаемых изменений амплитудно-временных параметров МТКП под действием молекул NO, были проведены эксперименты по следующему протоколу: SNAP добавляли в раствор после полного развития эффекта параоксона (через 30 минут). И в данном случае не наблюдалось какого-либо достоверного дополнительного увеличения амплитуды сигнала и постоянной времени спада. Амплитуда МТКП при совместном применении параоксона и SNAP составила  $5.13 \pm 0.20$  нА, (по сравнению с  $4.93 \pm 0.10$  нА только в параоксоне,  $p = 0.31$ ), а постоянная времени спада сигналов  $3.67 \pm 0.10$  мс (*vs.*  $4.10 \pm 0.13$  мс в параоксоне,  $p = 0.105$ ; рис. 3).

Таким образом, наличие характерных для ингибирования АХЭ эффектов донора NO на амплитуду и длительность МТКП, полное соответствие выраженности действия и диапазона концентраций в биохимических и электрофизиологических экспериментах, а также отсутствие обнаруженных эффектов SNAP на постсинаптические ответы после предварительного ингибирования АХЭ позволяет утверждать, что молекулы NO способны эффективно угнетать активность АХЭ в нервно-мышечном соединении млекопитающего.



**Рисунок 3** - Отсутствие влияния донора NO SNAP (2 ммоль/л) на амплитуду (нА; панель А) и длительность (постоянная времени спада –  $\tau$ , мс; панель Б) МТКП, увеличенных в условиях полного ингибирования ацетилхолинэстеразы параоксоном (10 мкмоль/л). Инкубация с ингибитором АХЭ, параоксоном (10 мкмоль/л) значительно повышала как амплитуду МТКП (А), так и  $\tau$  спада (Б). Применение SNAP (2 ммоль/л) после предварительной инкубации мышцы параоксоном, не оказывало влияния на амплитудно-временные параметры МТКП. Акцептор NO, гемоглобин (Нб - 30 мкмоль/л), сам по себе не оказывал эффекта на амплитуду и длительность МТКП, однако значительно снижал действие SNAP. Данные представлены как усредненные значения  $\pm$  SEM, полученные от 4-5 животных (19-24 конечных пластинок). \* - достоверное отличие ( $p < 0.05$ ); \*\* - достоверное отличие ( $p < 0.001$ )

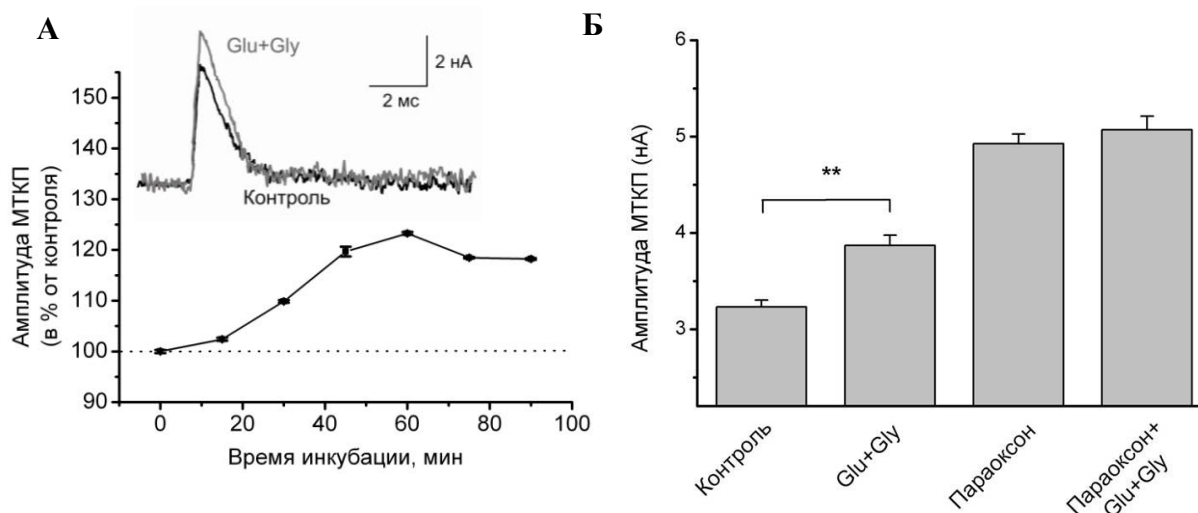
Возникает вопрос, является ли увеличение амплитуды и постоянной времени спада МТКП, характерные для ингибирования АХЭ, результатом действия именно молекул оксида азота или мы наблюдаем угнетение активности АХЭ, опосредованное молекулами SNAP? Чтобы найти ответ на этот вопрос, мы добавили SNAP в концентрации 2 ммоль/л и NO-акцептор гемоглобин в концентрации 30 мкмоль/л (Mukhtarov et al., 2000; Thomas, Robitaille, 2001). Гемоглобин сам по себе не оказывал влияния на амплитуду и длительность МТКП, при применении этого акцептора амплитуда МТКП составила  $2.76 \pm 0.15$  нА, а длительность  $1.13 \pm 0.06$  мс (рис. 3). Однако, в присутствии гемоглобина, эффекты SNAP на амплитудно-временные параметры МТКП были менее выражены. Так, амплитуда МТКП возросла лишь на 22 % и составила  $3.37 \pm 0.18$  нА при совместном применении донора и гемоглобина, ( $p = 0.011$ , рис. 3А), а постоянная времени спада увеличилась только на 24 % (гемоглобин + SNAP,  $1.39 \pm 0.06$  мс;  $p = 0.003$ , рис. 3Б).

Таким образом, эффекты донора NO на амплитуду и длительность МТКП соответствуют классической картине ингибирования АХЭ. Более того, отсутствие этих эффектов после предварительного ингибирования АХЭ параоксоном и значительное их уменьшение в присутствии акцептора NO – гемоглобина, поддерживают гипотезу о том, что экзогенные молекулы оксида азота способны угнетать активность АХЭ в нервно-мышечном синапсе млекопитающих.

Полученные данные поднимают вопрос: физиологична ли такая модуляция активности АХЭ в норме и, если да, то чем может запускаться этот механизм? Согласно литературным данным, NO-синтаза в нервно-мышечном синапсе млекопитающих сконцентрирована в области постсинаптической мембраны и тесно ассоциирована с глутаматными NMDA-рецепторами (NMDAR) (Grozdanovic, Gossrau, 1998; Lück et al., 2000), активация которых сопровождается входом ионов кальция, необходимого для ферментативного синтеза NO. Ранее была показана точная постсинаптическая локализация NMDAR в *m. extensor digitorum longus*, *m. soleus* и диафрагме (Malomouzh et al., 2011). Более того, было показано, что ряд эффектов NO в синапсах диафрагмы крысы инициируется именно активацией NMDA-рецепторов (Urazaev et al., 1995; Malomouzh et al., 2003, 2005), что позволило нам высказать предположение о том, что активация NMDAR и связанное с этим усиление эндогенного синтеза NO, помимо прочих возможных эффектов, будет сопровождаться снижением активности АХЭ в нервно-мышечном синапсе.

### ***3. Эффект глутамат-опосредованной активации эндогенного синтеза NO на параметры МТКП***

Добавление глутамата в концентрации 100 мкмоль/л (Malomouzh et al., 2003) приводило к возрастанию амплитуды МТКП на 9% (рис. 4;  $p=0,02$ ;  $n=30$ ), которая составила  $3.53 \pm 0.10$  нА (vs.  $3.23 \pm 0.07$  нА в контроле), однако этот эффект наблюдался только через 30-40 минут после добавления аминокислоты. При добавлении ко-агониста NMDAR глицина в низкой концентрации (100 мкмоль/л), изменений в эффекте глутамата не наблюдалось. Однако повышение концентрации глицина до 700 мкмоль/л значительно усилило влияние глутамата и привело к росту амплитуды МТКП на 19% по сравнению с контролем, при этом значения амплитуды достигли  $3.87 \pm 0.11$  (vs.  $3.23 \pm 0.07$  нА в контроле;  $n=25$ ;  $p<0.0003$ ; рис. 4). Длительность сигналов в обоих случаях значительных изменений не претерпевала вне зависимости от состава используемого раствора. Дальнейшее увеличение концентрации глутамата (до 500 мкмоль/л в присутствии 700 мкмоль/л глицина) не усиливало влияние на амплитуду МТКП. Применение 700 мкмоль/л глицина отдельно не оказывало эффект ни на длительность МТКП, ни на амплитуду сигналов (рис.4).



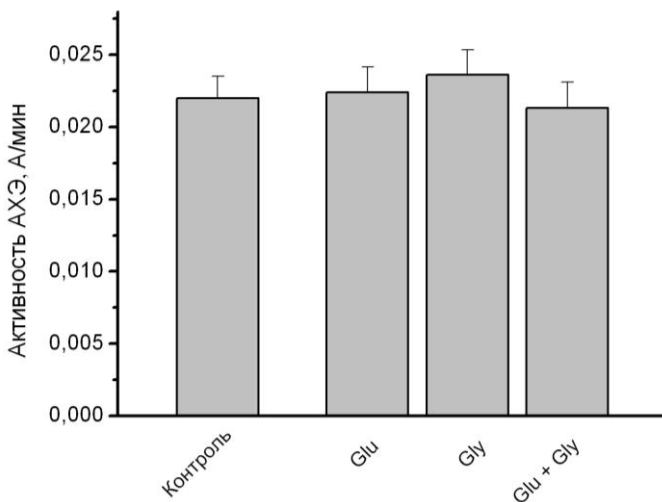
**Рисунок 4** – (А) Развитие эффекта глутамата на амплитуду МТКП во времени. Влияние глутамата и глицина на амплитуду МТКП связано с ингибированием синаптической АХЭ.; (Б) Влияние глутамата (Glu, 100 мкмоль/л) и глицина (Gly, 700 мкмоль/л) на амплитуду МТКП и отсутствие этого действия аминокислот при ингибировании ацетилхолинэстеразы параоксоном (10 мкмоль/л) (А) Данный пример иллюстрирует увеличение амплитуды МТКП во времени при совместном применении глутамата и глицина в одном из типовых экспериментов (каждая точка представляет собой усредненную амплитуду от 100 МТКП). На вставке показан усредненный МТКП из 100 МТКП, записанных в одной и той же концевой пластинке в контроле (черная линия) и после инкубации в течение часа раствором глутамата (100 мкмоль/л) и глицина (700 мкмоль/л) (серая линия). (Б) Совместное применение глутамата (100 мкмоль/л) и глицина (700 мкмоль/л) привело к значительному росту амплитуды МТКП (на 19 %). Применение аминокислот на фоне ингибитора АХЭ, параоксона (10 мкмоль/л), не оказывало влияния на амплитуду сигналов. Данные представлены в виде усредненных значений  $\pm$  SEM, полученных от 4-7 животных (21-40 концевых пластинок). \*\* - достоверное отличие от контроля ( $p < 0.001$ )

Наглядный пример изменений амплитуды МТКП при совместном применении глутамата и глицина представлен на рис. 4А. Эффект глутамата появлялся через 30-40 минут инкубации в растворе и становился наиболее выраженным к 60 минуте инкубации. Для проверки того, что изменение амплитуды МТКП под действием глутамата и глицина есть следствие снижения активности АХЭ, были проведены эксперименты с добавлением аминокислот на фоне ингибирования ацетилхолинэстеразы. Амплитуда сигнала, увеличенная под действием параоксона (10 мкмоль/л) с контрольного значения  $3.23 \pm 0.07$  нА ( $n=25$ ) до  $4.93 \pm 0.1$  нА ( $n=24$ ), не изменялась при аппликации глутамата и глицина и составляла  $5.07 \pm 0.14$  нА ( $n=30$ ,  $p=0.4$ ; рис. 4).

Это позволяет утверждать, что увеличение амплитуды МТКП в присутствии аминокислот происходит не из-за изменений в чувствительности АХР или размера кванта, а из-за ингибирования АХЭ.

#### 4. Исследования влияния аминокислот на активность АХЭ *in vitro*\*

Далее, необходимо было получить прямые доказательства отсутствия у используемых аминокислот собственного ингибирующего действия на активность АХЭ. Для этого были проведены биохимические эксперименты по оценке активности ацетилхолинэстеразы из гомогенатов *m. EDL* в присутствии тех же концентраций глутамата (100 мкмоль/л) и глицина (700 мкмоль/л), что и в электрофизиологических экспериментах. Оказалось, что в присутствии каждой из этих аминокислот, а также при их совместном действии, активность АХЭ не претерпевала никаких достоверных изменений (рис. 5; n=20).



**Рисунок 5** - Активность ацетилхолинэстеразы гомогенатов *m. EDL* крысы (А/мин – изменение поглощения света с длиной волны 412 нм, отражающее гидролиз субстрата холинэстеразой, в минуту) в контроле, в присутствии глутамата (Glu, 100 мкмоль/л), глицина (Gly, 700 мкмоль/л) и при совместном добавлении аминокислот.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что изменение амплитуды МТКП в нервно-мышечном синапсе под действием глутамата и глицина есть следствие ингибирования АХЭ, вызванного не прямым действием этих аминокислот на фермент, а опосредованным, неустановленным до настоящего времени, молекулярным механизмом.

#### 5. Исследование влияния глутамата и глицина на амплитудно-временные параметры МТКП в присутствии блокатора NMDA-рецепторов и ингибитора NO-синтазы

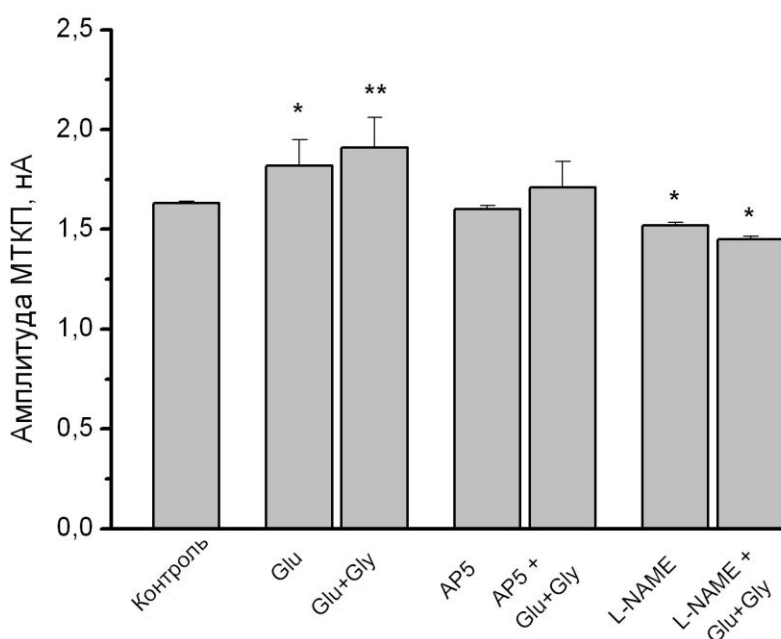
Наиболее вероятным кандидатом на роль белка, воспринимающего сигнал от глутамата и запускающего этот молекулярный механизм регуляции, являются NMDA-рецепторы. В частности, это подтверждается и обнаруженным нами более выраженным эффектом глутамата на амплитуду МТКП в присутствии глицина.

\*Эксперименты проводились совместно с м.н.с. ИОФХ им. А. Е. Арбузова, к.б.н. Харламовой А. Д.



Действительно ли эти рецепторы опосредуют эффект глутамата на амплитуду МТКП? И реализуется ли эффект аминокислот через образование молекул NO в нервно-мышечном синапсе? Получению ответов на эти вопросы и были посвящены следующие серии электрофизиологических экспериментов с использованием классического конкурентного антагониста NMDA-рецепторов DL-2-амино-5-фосфонопентаноиксовая кислота (AP5) и конкурентного ингибитора NO-синтазы NG-нитро-L-аргинин-метил эстера (L-NAME).

Добавление в раствор только AP5 (500 мкмоль/л) не повлияло на амплитуду МТКП (AP-5,  $2.86 \pm 0.11$  нА; контроль,  $3.09 \pm 0.10$  нА;  $p = 0.12$ ; рис. 6). Последующая аппликация глутамата в концентрации 100 мкмоль/л и глицина в концентрации 700 мкмоль/л на фоне блокатора NMDA-рецепторов не приводила к достоверному изменению в амплитуде МТКП, при совместном применении агонистов NMDAR и блокатора AP-5 амплитуда МТКП составила  $2.82 \pm 0.10$  нА (*vs.* AP-5,  $2.86 \pm 0.11$  нА;  $p = 0.82$ ; рис. 6), что подтверждает роль NMDA-рецепторов в реализации эффекта аминокислот на амплитуду МТКП.



**Рисунок 6** - Влияние глутамата (Glu, 100 мкмоль/л) и глицина (Gly, 700 мкмоль/л) на амплитуду МТКП в норме, а также при блокаде NMDA-рецепторов DL-2-амино-2-фосфоновалериановой кислотой (AP5, 500 мкмоль/л) или ингибировании фермента NO-синтазы N-нитро-L-аргинин-метил эстером (L-NAME, 100 мкмоль/л). \* - достоверное отличие от контроля ( $p < 0.05$ ); \*\* - достоверное отличие от контроля ( $p < 0.001$ )

Добавление ингибитора NO-синтазы L-NAME в концентрации 100 мкмоль/л приводило к небольшому, но статистически достоверному снижению амплитуды МТКП на 8%, которая составила  $2.96 \pm 0.08$  нА (*vs.*  $3.23 \pm 0.07$  нА в контроле,  $p = 0.014$ ; Рис. 6).

Аппликация аминокислот после инкубации с L-NAME не приводила к росту амплитуды МТКП (Glu+Gly+L-NAME:  $2.79 \pm 0.08$  нА; L-NAME:  $2.96 \pm 0.08$  нА;  $p = 0.14$ , Рис. 6)

В дополнительной серии экспериментов мы попытались ослабить эффект аминокислот на амплитуду МТКП, используя мембранно-непроницаемый акцептор NO гемоглобин (30 мкмоль/л). И действительно, после совместного применения гемоглобина и аминокислот значительного увеличения амплитуды МТКП не наблюдалось, при этом амплитуда сигналов при аппликации гемоглобина составила  $2.79 \pm 0.11$  нА, а при инкубации в растворе с глутаматом (100 мкмоль/л), глицином (700 мкмоль/л) и гемоглобином –  $2.99 \pm 0.18$  нА ( $p=0.31$ ).

Полученные результаты свидетельствуют о том, что эффект аминокислот на амплитуду МТКП опосредуется NMDA-рецепторами и реализуется исключительно при активации NO-синтазы, кроме того, имеет место определенный уровень эндогенной конститутивной активности NO-синтазы в мышечных волокнах, что согласуется с данными литературы (Stamler, Meissner, 2001).

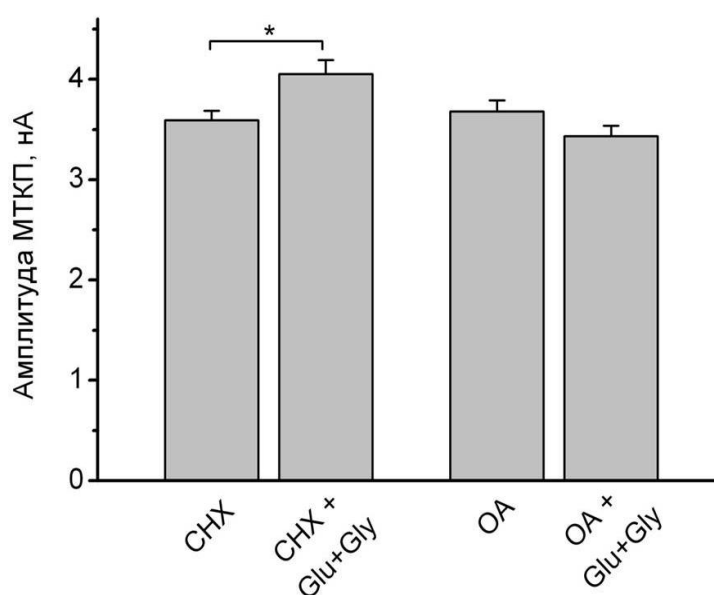
Данные результаты показывают, что активация NMDAR запускает долговременный механизм, который приводит к увеличению продукции NO и частичному ингибированию активности АХЭ.

#### **6. Увеличение амплитуды МТКП через активацию NMDA-рецепторов связано с фосфатазной активностью, а не с синтезом белка *de novo***

Анализ литературы показал, что существует два наиболее подходящих механизма, объясняющих отложенный во времени эффект глутамата и глицина на амплитудно-временные параметры МТКП: 1) активация NMDA-рецепторов усиливает синтез белка *de novo* (Skinner et al., 2008), и, возможно, непосредственно синтез NO-синтазы; 2) вход ионов  $Ca^{2+}$  через NMDAR инициирует  $Ca^{2+}$ -зависимый путь регуляции NO-синтазы при помощи изменения степени ее фосфорилирования (Rameau et al., 2004). Чтобы проверить первую гипотезу, мы применили селективный ингибитор синтеза белка циклогексимид. Инкубация в течение 180 минут с раствором циклогексимида в концентрации 350 мкмоль/л привели к росту амплитуды МТКП (циклогексимид,  $3.59 \pm 0.09$  нА; контроль,  $3.23 \pm 0.07$  нА,  $p=0.002$ ). Однако, после инкубации препарата в растворе циклогексимида, эффект глутамата и глицина на амплитуду МТКП сохранялся, амплитуда при этом достоверно увеличилась на 11 % до  $4.05 \pm 0.14$  нА (*vs.*  $3.59 \pm 0.09$  нА в циклогексимиде,  $p=0.007$ , рис. 7). Таким образом, можно заключить, что синтез белка *de novo* не влияет на усиление продукции NO, вызванное глутаматом.

Согласно Rameau с соавторами (2004), задержанное усиление продукции NO во времени (на 40-60 мин) после активации NMDAR, может быть опосредовано дефосфорилированием NO синтазы серин-треонин-протеин фосфатазами типа PP1 и PP2A.

Используя ооадаиковую кислоту (OA, 1 мкмоль/л) - ингибитор этих фосфатаз, мы проверили возможное участие этих ферментов в действии глутамата на амплитуду МТКП. После применения ооадаиковой кислоты, средняя амплитуда МТКП повысилась на 14% по сравнению с контрольными значениями ( $3.68 \pm 0.11$  нА,  $p=0.0006$ ). При этом, OA полностью предотвращала действие глутамата и глицина на амплитуду МТКП (OA,  $3.68 \pm 0.11$  нА; OA + глутамат + глицин,  $3.43 \pm 0.10$  нА;  $p=0.104$ , рис. 7).



**Рисунок 7** - Ингибирование фосфатаз PP1 и PP2A ооадаиковой кислотой (OA, 1 мкмоль/л), без угнетения белкового синтеза, препятствовало росту амплитуды МТКП, индуцированному глутаматом и глицином. Предварительная инкубация с ингибитором синтеза белка, циклогексимидом (CHX, 350 мкмоль/л), не препятствовала росту амплитуды МТКП в присутствии глутамата (Glu, 100 мкмоль/л) и глицина (Gly, 700 мкмоль/л). Данные представлены в виде усредненных значений  $\pm$  SEM, полученных от 4-7 животных (21-40 концевых пластинок). \* - достоверное отличие от контроля ( $p<0.05$ ).

Таким образом, можно сделать заключение, что активация NMDA-рецепторов экзогенным глутаматом запускает ингибирование активности АХЭ через метаболический путь, включающий дефосфорилирование NO-синтазы

**7. Активация NMDA рецепторов эндогенным глутаматом приводит к увеличению амплитуды МТКП, регистрируемых в межстимульные интервалы, при высокочастотной стимуляции\***

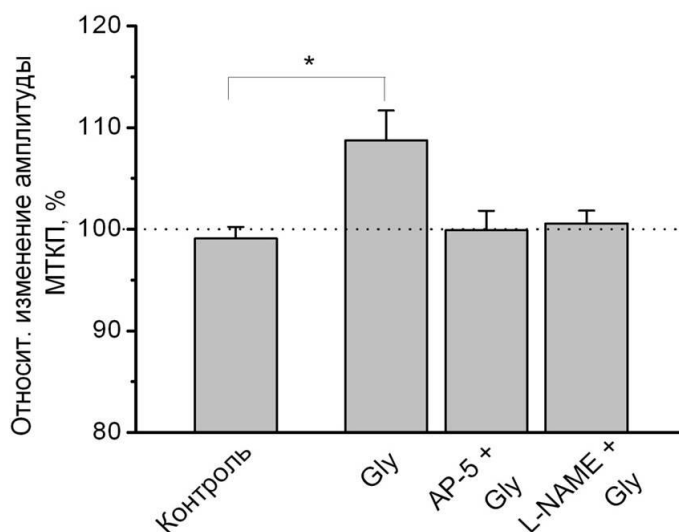
Основываясь на проделанных экспериментах, мы предположили возможность регуляции активности синаптической АХЭ посредством эндогенного глутамата. Эта аминокислота известна как ко-медиатор ацетилхолина в холинэргических синапсах (Vyas, Bradford, 1987; Meister et al., 1993; Waerhaug, Ottersen, 1993; Nishimaru et al., 2005). Усиление синаптической активности (такое, как ритмическая высокочастотная стимуляция) может

\*Эксперименты проводились совместно с с.н.с. КИББ КазНЦ РАН, к.б.н. Ковязиной И. В.

привести к накоплению глутамата в синаптической щели, где он может оказывать депрессорный эффект на активность синаптической АХЭ, а также модулировать квантовую (Pinard et al., 2003) и неквантовую секрецию ацетилхолина (Malomouzh et al., 2003).

Следующие серии электрофизиологических экспериментов были направлены на исследование ингибирования АХЭ при помощи NO, выделяющегося в процессе ритмической высокочастотной стимуляции двигательного нерва. Поскольку NO способен модулировать интенсивность вызванной квантовой секреции (Thomas, Robitaille, 2001), мы использовали для анализа амплитудно-временные параметры спонтанных ответов (МТКП), записанных в межстимульные интервалы, как показатель активности синаптической АХЭ. Нерв стимулировался с частотой 10 Гц – это частота позволяет зарегистрировать достаточное количество МТКП в межстимульных интервалах. В нормальных физиологических условиях, глицин, необходимый для активации NMDAR, обычно присутствует в межклеточном пространстве (Edmonds et al., 1995). Вследствие этого, мы провели эксперименты как в растворе, не содержащем глицин, чтобы выявить возможные эффекты высокочастотной активности, как таковой, на МТКП, так и в присутствии глицина в концентрации 700 мкмоль/л для усиления действия эндогенного глутамата. Было зарегистрировано 100-200 МТКП каждой концевой пластинки в покое, затем в течение 5 минут при частоте стимуляции 10 Гц в межстимульных интервалах и после окончания стимуляции. Вследствие значительной вариабельности параметров миниатюрных токов различных концевых пластинок, мы сравнивали параметры МТКП, записанных в одних и тех же клетках в покое и во время высокочастотной стимуляции. В растворе, не содержащем глицин, стимуляция частотой 10 Гц не изменяла амплитуду и длительность МТКП, записанных в межстимульные интервалы по сравнению с сигналами, полученными в покое, до стимуляции, при этом в контроле амплитуда МТКП составила  $2.86 \pm 0.16$  нА, а во время стимуляции без глицина -  $2.84 \pm 0.18$  нА ( $p = 0.72$ , рис. 8).

Эти результаты согласуются с ранее полученными данными об инвариантности МТКП, зарегистрированных в нервно-мышечном соединении лягушки в процессе 10ти и 50ти герцовой стимуляции (Kovyazina et al., 2010). Однако, в присутствии глицина (700 мкмоль/л), стимуляция частотой в 10 Гц привела к росту амплитуды МТКП межстимульных интервалов до  $108.7 \pm 2.9\%$  относительно значений, полученных до стимуляции (амплитуда МТКП до стимуляции по сравнению со значениями во время стимуляции,  $p = 0.03$ , рис. 8). Длительность МТКП, однако, не изменялась. В отличие от медленно развивающихся эффектов экзогенных аминокислот, действие эндогенного глутамата проявлялось сразу же после сессии высокочастотной (10 Гц) стимуляции нерва.



**Рисунок 8** - Высокочастотная (10 Гц) стимуляция нерва повышает амплитуду МТКП в присутствии глицина, что обусловлено активацией NMDAR, запускаемой эндогенным глутаматом с последующим усилением продукции NO. В контрольных концевых пластинках амплитуда МТКП не изменялась в течении 5 минут стимуляции с частотой 10 Гц. Добавление глицина (700 мкмоль/л) в омывающий раствор привело к достоверному росту амплитуды МТКП (на  $8,7\% \pm 2,9\%$  vs. контроль), записанных в межстимульные интервалы. Предварительная инкубация с блокаторм NMDA-рецепторов, AP-5 (25 мкмоль/л), или с ингибитором NO-синтазы, L-NAME (100 мкмоль/л), предотвращала все эффекты, связанные с добавлением глицина. Контрольные значения записывались до стимуляции. Данные представлены в % от контрольных значений, как усредненные показатели  $\pm$  SEM, в одних и тех же 16-20 концевых пластинках (от 4 животных). \* - достоверное отличие от контроля ( $p < 0.05$ ).

Когда нервно-мышечный препарат был инкубирован либо с раствором AP-5 (25 мкмоль/л), либо L-NAME (100 мкмоль/л), никаких изменений в амплитуде МТКП в процессе высокочастотной стимуляции не наблюдалось как в растворе с глицином, так и без глицина.

Таким образом, можно сделать заключение, что в процессе нормального функционирования синапса, увеличение амплитуды синаптических ответов происходит благодаря частичному ингибированию АХЭ молекулами NO, которое запускается активацией NMDAR при помощи глутамата и глицина.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенное исследование посвящено изучению оксида азота в качестве возможного ингибитора синаптической ацетилхолинэстеразы. Традиционно, механизмы, лежащие в основе синаптической пластичности, включают в себя факторы, изменяющие число квантов медиатора, синхронность их секреции или чувствительность постсинаптических рецепторов к агонистам (Van der Kloot, Molgo, 1994; Glavinovic, 1995; Atwood, Karunanithi, 2002; Lin, Faber, 2002; Nikolsky et al., 2004; Taschenberger et al., 2005). Это исследование доказывает существование другого способа модуляции синаптической передачи через регуляцию продолжительности действия ацетилхолина в синаптической щели. Так как частичное ингибирование активности АХЭ действительно очень эффективный способ увеличения амплитуды синаптических ответов, возможно, что тонкая регуляция активности АХЭ осуществляется эндогенными агентами для компенсации снижения квантового состава (например, при синаптическом утомлении) или при пониженной чувствительности постсинаптической мембраны (в условиях патологии).

Таким образом, в области нервно-мышечного контакта существует популяция NMDAR ко-локализованных с NO-синтазой, активация которой способна опосредованно ингибировать активность синаптической АХЭ. Насколько нам известно – это первое свидетельство о возможности модуляции активности синаптической АХЭ эндогенными ингибиторами и одно из немногих свидетельств, проливающих свет на возможные функции NMDA-рецепторов в нервно-мышечном синапсе.

Подводя итог, можно заключить, что молекулы оксида азота действительно способны ингибировать активность синаптической ацетилхолинэстеразы вне зависимости от их происхождения – экзогенного (при применении доноров) или эндогенного. Одним из механизмов ингибирования синаптической АХЭ эндогенными молекулами NO является активация комплекса «NMDA-рецептор – NO-синтаза», которая приводит либо к непосредственному усилению синтеза NO входящими ионами кальция, либо к отложенной во времени модуляции активности NO-синтазы посредством дефосфорилирования ее серин-треонин-протеин фосфатазами.

## ВЫВОДЫ

- 1. Донор оксида азота SNAP ингибирует активность ацетилхолинэстеразы гомогенатов мышцы длинный разгибатель пальцев (*m. extensor digitorum longus*) крысы.
- 2. SNAP доза-зависимым образом увеличивает амплитуду и постоянную времени спада миниатюрных токов концевой пластинки в синапсах мышцы *extensor digitorum longus* крысы. Данный эффект не связан с изменением размера кванта медиатора или чувствительности рецепторов постсинаптической мембраны к ацетилхолину, поскольку не наблюдается на фоне предварительного ингибирования ацетилхолинэстеразы параоксоном.
- 3. Акцептор оксида азота гемоглобин значительно снижает эффекты SNAP на амплитуду и длительность синаптических ответов, что свидетельствует об ингибировании синаптической ацетилхолинэстеразы молекулами NO, а не его донора.
- 4. Активация NMDA рецепторов экзогенными глутаматом и глицином приводит к изменениям амплитудно-временных параметров миниатюрных токов концевой пластинки, характерным для ингибирования синаптической ацетилхолинэстеразы. Данный эффект не развивается на фоне предварительного ингибирования ацетилхолинэстеразы и при ингибировании синтазы оксида азота.
- 5. В гомогенатах мышц, где нарушена связь NMDA-рецепторов и NO-синтазы, глутамат и глицин не оказывают влияния на активность ацетилхолинэстеразы.
- 6. Эффект активации NMDA-рецепторов экзогенными глутаматом и глицином, приводящий к ингибированию синаптической ацетилхолинэстеразы, начинает проявляться спустя 20 минут после аппликации агонистов и достигает максимума к 60 минуте.
- 7. Ингибирование фосфатаз типа PP1 и PP2A ортофосфорной кислотой блокирует эффект активации NMDA-рецепторов на амплитудно-временные характеристики миниатюрных токов концевой пластинки. Это свидетельствует об опосредовании задержанной активации NO-синтазы ее дефосфорилированием данными фосфатазами.
- 8. Эндогенный глутамат, выделяющийся при ритмической стимуляции двигательного нерва, способен снижать активность синаптической ацетилхолинэстеразы посредством активации комплекса «NMDA-рецептор – NO-синтаза».

## СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО МАТЕРИАЛАМ ДИССЕРТАЦИИ

### *Статьи, опубликованные в журналах, рекомендованных ВАК*

1. **Проскурина, С. Е.** Влияние агонистов НМДА рецепторов на амплитуду миниатюрных потенциалов концевой пластинки у мышей, нокаутированных по отдельным молекулярным формам ацетилхолинэстеразы / **С. Е. Проскурина**, К. А. Петров, А. Д. Харламова, Э. Креши, Е. Е. Никольский // Гены & Клетки. – 2015. - Т. X, №15. – С.: 60-62
2. Маломуж, А. И. Влияние блокатора динаминзависимого эндоцитоза динасора на процессы спонтанной квантовой и неквантовой секреции ацетилхолина в нервно-мышечном синапсе мыши. / А. И. Маломуж, А. Р. Мухитов, **С. Е. Проскурина**, Ф. Выскочил, Е. Е. Никольский. // Доклады Академии Наук.- 2014. Т. 459, № 4, С. 512-515.
3. Petrov, K. A. Regulation of acetylcholinesterase activity by nitric oxide in rat neuromuscular junction via N-methyl-D-aspartate receptor activation / K. A. Petrov, A. I. Malomouzh, I. V. Kovyazina, E. Krejci, A. D. Nikitashina, **S. E. Proskurina**, V. V. Zobov, E. E. Nikolsky // European Journal of Neuroscience. - 2013. - Vol. 37, P. 181–189

### *Работы, опубликованные в материалах конференций и других научных изданиях*

4. Маломуж, А. И. Спонтанное выделение ацетилхолина в нервно-мышечном синапсе мыши в присутствии ингибитора динамина динасора / А. И. Маломуж, **С. Е. Проскурина**, А. Р. Мухитов, Е. Е. Никольский // Сборник статей международной конференции "Рецепторы и внутриклеточная сигнализация" — Пущино, 2015. - Т2. - С. 393-397.
5. **Проскурина, С. Е.**, Петров К.А., Маломуж А.И., Никольский Е.Е. Деполяризующий эффект активации NMDA-рецепторов постсинаптической мембраны скелетных мышечных волокон млекопитающего / **С. Е. Проскурина**, К. А. Петров, А. И. Маломуж, Е. Е. Никольский // Тезисы докладов и сообщений II Всероссийской конференции: «Внутриклеточная сигнализация, транспорт, цитоскелет» - Санкт-Петербург, 2015 - Журнал «Цитология», Т. 57. - №9. - С. 649
6. **Проскурина, С. Е.**, Петров К. А., Харламова А. Д., Креши Э., Никольский Е. Е. Исследование специфичности ингибирования, опосредованного глутаматом и глицином для различных молекулярных форм ацетилхолинэстеразы в нервно-мышечных синапсах млекопитающих / **С. Е. Проскурина**, К. А. Петров, А. Д. Харламова, Э. Креши, Е. Е. Никольский // Сборник статей международной конференции "Рецепторы и внутриклеточная сигнализация" — Пущино, 2015. - Т2. - С. 400-404.
7. **Проскурина, С.Е.** Роль НМДА-рецепторов и NO-синтазы в осуществлении процессов синаптической пластичности в нервно-мышечном синапсе крысы / **С. Е. Проскурина**, К. А. Петров, А. Д. Харламова, А. И. Маломуж, Е. Е. Никольский // Материалы международной научно-технической конференции молодых ученых, аспирантов и студентов



«ПРИКЛАДНАЯ ЭЛЕКТРОДИНАМИКА, ФОТНИКА И ЖИВЫЕ СИСТЕМЫ» - Казань, 2015. - С. 218-219

8. **Проскурина, С. Е.** Влияние агонистов НМДА рецепторов на амплитуду миниатюрных потенциалов концевой пластинки у мышей нокаутных по отдельным молекулярным формам ацетилхолинэстеразы. / Проскурина С. Е., Петров К. А., Креши Э., Никиташина А. Д. и академик РАН Никольский Е. Е. // Тезисы докладов IV международной научно-практической конференции Постгеномные методы анализа в биологии, лабораторной и клинической медицине «ПОСТГЕНОМ 2014» - Казань, 2014. - С. 277

9. Petrov, K. A. Nitric oxide regulates an acetylcholinesterase activity in the mammalian neuromuscular junction / K. A. Petrov, A. I. Malomuzh, I. V. Kovyazina, E. Krejci, A. D. Nikitashina, **S. E. Proskurina**, V. V. Zobov, E. E. Nikolsky // Материалы докладов Международного симпозиума «Gasotransmitters: Physiology and Pathophysiology» - Казань, 2014. – С. 53-54

10. **Проскурина, С.Е.** Оксид азота как регулятор активности фермента ацетилхолинэстеразы / **С. Е. Проскурина**, К. А. Петров, А. И. Маломуж, И. В. Ковязина, А. Д. Никиташина, Е. Е. Никольский // IV Всероссийский с международным участием Конгресс молодых ученых-биологов «Симбиоз-Россия 2013». - Иркутск, 2013. - С. 363-365

11. Petrov, K. Endogeneous regulation of acetylcholinesterase activity in mammalian neuromuscular junction by nitric oxide / K. Petrov, A. Malomuzh, I. Kovyazina, E. Krejci, A. Nikitashina, **S. Proskurina**, E. Nikolsky // Symposium «Molecular Mechanisms of Synaptic Transmission Regulation». - Kiev, 2012. - С. 25.

12. Petrov, K. Nitric oxide is an endogeneous regulator of acetylcholinesterase activity in mammalian neuromuscular junction / K. Petrov, A. Malomuzh, I. Kovyazina, E. Krejci, A. Nikitashina, **S. Proskurina**, E. Nikolsky // The 11th International Meeting on Cholinesterases. - Kazan, 2012. - С. 127.