

## ВНУТРИКЛЕТОЧНЫЙ КАЛЬЦИЙ И МЕХАНИЗМЫ ЭНДОЦИТОЗА СИНАПТИЧЕСКИХ ВЕЗИКУЛ В ДВИГАТЕЛЬНОМ НЕРВНОМ ОКОНЧАНИИ ЛЯГУШКИ

© А. Л. Зефирова,<sup>1</sup> М. М. Абдрахманов, П. Н. Григорьев, А. М. Петров

Кафедра нормальной физиологии Государственного медицинского университета, Казань;

<sup>1</sup> электронный адрес: zefirov@kmu-mf.kcn.ru

В опытах на кожно-грудинной мышце лягушки при внеклеточном отведении синаптических сигналов показано, что увеличение внутриклеточной концентрации ионов Са в нервном окончании (повышение внеклеточной концентрации ионов К или добавление кофеина) вызывает увеличение частоты миниатюрных токов концевой пластинки, которое на фоне действия веществ сохраняется в течение длительного (десять минут) времени. Ритмическое раздражение двигательного нерва (20 или 100 имп/с) приводит к быстрому уменьшению амплитуды токов концевой пластинки. При флуоресцентной прижизненной микроскопии с использованием эндоцитозного маркера FM 1-43 показано, что при коротком (5 мин) времени экспозиции гиперкалиевого раствора (40 мМ) или кофеина (5 мМ) в нервном окончании появляются светящиеся пятна, что указывает на интенсивные процессы эндоцитоза синаптических везикул. При более длительном (30 мин) воздействии светящихся пятен не наблюдалось, а ширина нервного окончания увеличивалась, что свидетельствует о блоке эндоцитоза. При более низких концентрациях ионов калия и кофеина, а также при длительном ритмическом раздражении (20 или 100 имп/с) блока эндоцитоза выявлено не было. Сделано заключение о том, что высокие концентрации внутриклеточного кальция в двигательном нервном окончании лягушки приводят к обратимому блоку эндоцитоза при сохранении экзоцитоза синаптических везикул.

**Ключевые слова:** двигательное нервное окончание, FM 1-43, эндоцитоз, экзоцитоз, внутриклеточный кальций, гиперкалиевые растворы, кофеин.

**Принятые сокращения:** [Са]<sub>в</sub> — внутриклеточная концентрация ионов кальция, НО — нервное окончание, ПД — потенциал действия, МТКП — миниатюрные токи концевой пластинки, ТКП — токи концевой пластинки.

Освобождение медиатора в химическом синапсе связано с процессами экзоцитоза синаптических везикул в области активных зон пресинаптической мембраны при увеличении внутриклеточной концентрации ионов Са ([Са]<sub>в</sub>) (Van der Kloot, Molgo, 1994; Zefirov et al., 1995; Зефирова, Черанов, 2000; Stevens, 2003). Это увеличение в естественных условиях осуществляется за счет открытия потенциалзависимых Са-каналов и входа ионов Са в нервное окончание (НО) из внеклеточной среды при деполяризации во время потенциала действия (ПД) (Suzuki et al., 2000; Зефирова, Ситдикова, 2002). Массивный экзоцитоз можно вызвать также увеличением [Са]<sub>в</sub> при искусственной деполяризации НО гиперкалиевыми растворами (Angleton, Betz, 2001; Зефирова и др., 2003, 2004, 2005) или освобождением ионов Са в цитоплазму из эндоплазматического ретикула (например, при действии кофеина) (Martinez-Serrano, Satrustegui, 1989; Зефирова и др., 2005). В области активной зоны располагается несколько сотен синаптических везикул (Rizzoli, Betz, 2005), и они могут быть достаточно быстро израсходованы при активности синапса. Поэтому экзоцитоз сопровождается процессами эндоцитоза — образованием из пресинаптической мембраны новых везикул, которые заполняются медиатором и снова участвуют в экзоцитозе (Heuser, Re-

ese, 1973; Richards et al., 2000). Топография, временные характеристики и механизмы эндоцитоза точно неизвестны, хотя предполагается наличие тесной связи между экзо- и эндоцитозом, которая обеспечивает высокую скорость оборота синаптических везикул (Cousin, Robinson, 1999; Royle, Lagnado, 2003). Незначительное рассогласование экзо- и эндоцитоза (например, превышение интенсивности экзоцитоза над эндоцитозом) может привести к изменению размеров НО и количества синаптических везикул (Torri-Tarelli, 1990).

Если зависимость экзоцитоза от ионов Са в настоящее время никем не оспаривается (Sudnof, 1995), то роль кальция в процессах эндоцитоза не столь очевидна. Считают, что эндоцитоз гранул в хромаффинных клетках является Са-зависимым процессом (Neher, Zucker, 1993; Artalejo et al., 1996). Однако ситуация в синаптических образованиях более сложная. В нервных окончаниях дрозодилы процесс эндоцитоза зависит от внеклеточного кальция (Koenig, Ikeda, 1996), в то время как в гиппокампе — нет (Ryan, 1996). В нервно-мышечном синапсе лягушки при высокочастотной активности не выявлено корреляции между уровнем эндоцитоза и уровнем [Са]<sub>в</sub> (Wu, Betz, 1996). В биполярных клетках сетчатки золотой рыбки было показано, что кальций обладает ингиби-

торным эффектом на эндоцитоз (Van Gersdorff, Matthews, 1994).

В настоящей работе с использованием электрофизиологического и флуоресцентного методов исследована роль внутриклеточного кальция в механизмах экзо- и эндоцитоза синаптических везикул в двигательном нервном окончании лягушки.

### Материал и методика

Эксперименты проведены на изолированных нервно-мышечных препаратах кожно-грудинной мышцы лягушки *Rana ridibunda* в летне-осенний период (август—ноябрь). Мышцу растягивали и фиксировали в стеклянной ванночке, заполненной стандартным раствором Рингера для холоднокровных следующего состава (в мМ): 117 NaCl, 2.5 KCl, 1.8 CaCl<sub>2</sub> и 2.4—2.7 NaHCO<sub>3</sub>, pH 7.2—7.4; температура 20 °С. В некоторых экспериментах в раствор Рингера добавляли кофеин (2—6 мМ), также использовали модифицированный гиперкалиевый раствор (концентрация ионов К 10—40 мМ). Изоосмотичность растворов поддерживали соответствующими изменениями NaCl. В экспериментах с электрической стимуляцией нерва для блокирования сокращений и ПД мышечных волокон использовали тубокурарин в концентрации  $2 \cdot 10^{-5}$ — $5 \cdot 10^{-5}$  М. Все использованные вещества фирмы Sigma (США).

**Электрофизиология.** В электрофизиологических экспериментах проводили анализ частоты спонтанных, миниатюрных токов концевой пластинки (МТКП) или амплитуды токов концевой пластинки (ТКП), возникающих в ответ на раздражение нерва. Регистрацию сигналов осуществляли при помощи внеклеточных стеклянных микроэлектродов, заполненных 2 М раствором NaCl, с диаметром кончика около 1 мкм и сопротивлением 1—5 МОм. Электрод подводили к НО под визуальным контролем с использованием интерференционно-поляризационного микроскопа БИОЛАР (400×). Сигналы усиливали и с помощью платы L-CARD 1250 преобразовывали в цифровую форму. Частоту МТКП определяли по среднему интервалу времени между соседними сигналами (в имп/с). Использовали две схемы эксперимента. В первой микроэлектрод подводили к 3—5 участкам различных НО нервно-мышечного препарата, помещенного в стандартный раствор Рингера, при этом в каждом месте отведения регистрировали 100—200 МТКП. Далее раствор Рингера быстро меняли на исследуемый, после чего снова проводили регистрацию МТКП также в нескольких участках. Во второй эффект определенной концентрации вещества исследовали в одном месте отведения без изменения положения микроэлектрода. Достоверность различий средних значений определяли с использованием *t*-критерия Стьюдента. При анализе амплитуды ТКП раздражение нерва производили прямоугольными электрическими импульсами длительностью 0.1—0.2 мс сверхпороговой силы с частотой 20 или 100 имп/с.

**Флуоресцентная микроскопия.** В экспериментах использовали флуоресцентный маркер FM 1-43 (фирма Biotium, США) в концентрации 6 мкМ. Маркер обратимо связывается с пресинаптической мембраной и во время эндоцитоза оказывается внутри вновь образующихся синаптических везикул («загружается» в НО). Загрузку маркера осуществляли при усилении спонтанного

(гиперкалиевые растворы, кофеин) или вызванного экзоцитоза (электрическая стимуляция нерва) (Wu, Betz, 1996; Зефиоров и др., 2003). Схемы экспериментов представлены на соответствующих рисунках. Флуоресценцию наблюдали с помощью универсального микроскопа МИКМЕД-2 (ЛОМО, Санкт-Петербург). Оптика для анализа свечения FM 1-43 включала в себя дихроическое зеркало (область отражения  $\geq 90\%$  в интервале 450—500 нм, область пропускания  $\geq 90\%$  в интервале 520—700 нм). Использовали объектив М-ФЛЮАР 100 ×/1.20 Л.ВИ ∞/0.17. Все наблюдения проводили только на поверхностно лежащих НО. Для регистрации картин флуоресценции использовали быстродействующую черно-белую видеокамеру (WAT-902H, Wattec Co., Ltd, Япония), совмещенную через плату видеозахвата и видеокарту с персональным компьютером. Регистрацию проводили со скоростью 25 кадров/с. Интенсивность свечения оценивали в относительных единицах, принимая максимальное свечение пикселя равным 256 за 1. Для улучшения качества изображения производили усреднение по 20 наиболее удачным (сфокусированным) кадрам. Далее определяли значение фонового свечения как среднюю интенсивность свечения в квадрате  $50 \times 50$  пикселей в участке изображения без НО. Фоновое значение впоследствии вычитали из каждого пикселя полученного после усреднения изображения. Ширину каждой нервной терминали определяли с помощью программы ImageJ.

### Результаты

Изменения частоты МТКП при действии гиперкалиевых растворов и кофеина. При концентрации ионов Са 1.8 мМ в окружающем растворе увеличение внеклеточной концентрации ионов К приводило к быстрому увеличению спонтанной секреции медиатора (частоты МТКП). Так, если при нормальной концентрации ионов К (2.5 мМ) частота МТКП составляла  $0.23 \pm 0.03$  имп/с ( $n = 28$ ), то при концентрации ионов К 10 мМ —  $2.2 \pm 0.1$  имп/с ( $n = 28$ ), а при концентрации 40 мМ —  $7.25 \pm 0.90$  имп/с ( $n = 23$ ) (рис. 1, а). На фоне действия гиперкалиевого раствора увеличенная частота МТКП сохранялась в течение всего времени регистрации (30 мин) без признаков угнетения (рис. 1, в). К аналогичным изменениям приводило добавление в стандартный раствор кофеина (рис. 1, б, в). При концентрации кофеина 2 мМ частота МТКП быстро возрастала до  $1.8 \pm 0.1$  имп/с ( $n = 18$ ), а при концентрации 6 мМ — до  $12.3 \pm 1.8$  имп/с ( $n = 18$ ). При действии кофеина увеличенная частота МТКП сохранялась в течение 30 мин регистрации (рис. 1, в). Сопоставление зависимостей изменений частоты МТКП в гиперкалиевых растворах и при действии кофеина показало, что увеличение концентрации внеклеточного К до 20 или 40 мМ вызывает примерно одинаковое увеличение интенсивности спонтанной секреции, что и при действии кофеина в концентрации 2.5 или 5.0 мМ соответственно (рис. 1, а, б).

Динамика амплитуды ТКП в процессе высокочастотного ритмического раздражения. Эксперименты выполняли в стандартном растворе Рингера с добавлением тубокурарина. Длительное ритмическое раздражение с частотой 20 имп/с приводило к быстрому уменьшению вызванной секреции медиатора (амплитуды ТКП). На 1-й мин раздражения амплитуда

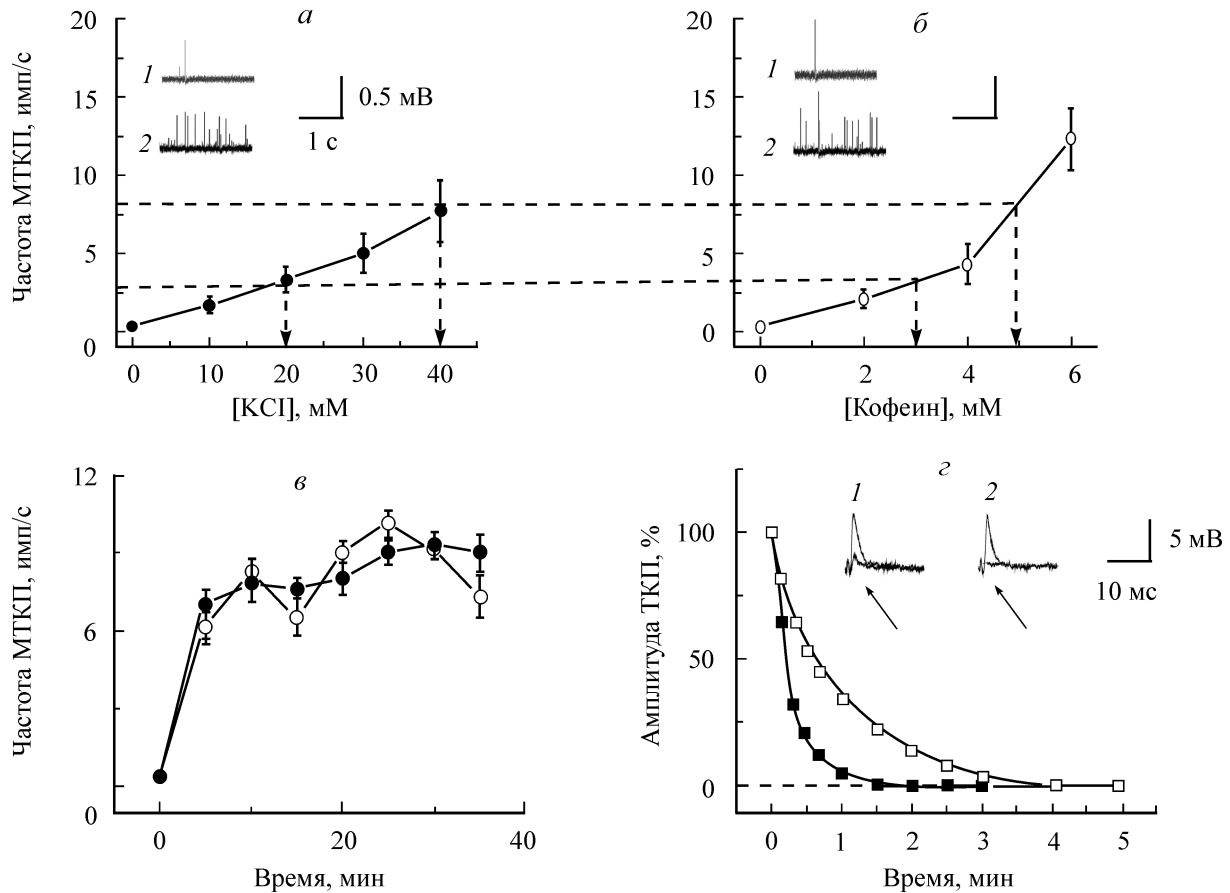


Рис. 1. Изменения секреции медиатора при различных способах ее стимуляции.

Эффект изменения внеклеточной концентрации KCl (*a*) или кофеина (*б*) на частоту МТКП. Штриховыми стрелками показаны концентрации, при которых частота МТКП примерно одинакова. *a1, б1* — МТКП в контроле; *a2, б2* — в гиперкалиевом растворе (40 мМ) и при действии кофеина (5 мМ) соответственно. *в* — динамика частоты МТКП при действии гиперкалиевого раствора (40 мМ, черные кружки) и кофеина (5 мМ, белые кружки). *г* — динамика амплитуды ТКП при стимуляции с частотами 20 (белые квадраты) и 100 (черные квадраты) имп/с. ТКП при стимуляции с частотами 20 (*1*) и 100 (*2*) имп/с; большой сигнал — первый ТКП, стрелками указаны ТКП через 1 мин раздражения. Представлены результаты отдельных экспериментов.

Fig. 1. Changes in transmitter release by different ways of its stimulation.

Effect of changes in extracellular concentrations of KCl (*a*) or caffeine (*б*) on the frequency of MEPCs. *Abscisse* — substance concentrations, mM; *ordinate* — frequency of MEPCs after a 10 min action of substances, imp/s. *Dot lines with arrows* — concentrations of substances causing similar enhance of MEPC frequency. *a1, б1* — MEPC in control; *a2, б2* — in high potassium solution (40 mM) and under caffeine (5 mM) action, accordingly. *в* — dynamics of MEPCs frequency in high potassium solution (40 mM) — black circles, and caffeine (5 mM) action — white circles; *ordinate* — time, min; *abscisse* — MEPCs frequency, imp/s. *г* — dynamics of EPSC amplitude during stimulation with frequencies of 20 (white squares) and 100 (black squares) imp/s. *Ordinate* — time of stimulation, min; *abscisse* — EPC amplitude, % of the original value. Changes in EPCs during stimulation with frequencies of 20 (*1*) and 100 (*2*) imp/s. Large signal is the first EPC in train; the next signal after a 1 min stimulation is indicated (arrow).

ТКП снижалась до 30—40 % от исходной, а через 3—4 мин вызванная секреция медиатора полностью прекращалась. Увеличение частоты раздражения до 100 имп/с вызывало еще более выраженную депрессию секреции медиатора. Амплитуда ТКП снижалась до нуля уже к концу 1-й мин раздражения (рис. 1, *г*).

Эндоцитоз синаптических везикул при стимуляции секреции медиатора гиперкалиевыми растворами. Нервно-мышечный препарат на 15—30 мин помещали в гиперкалиевый раствор, в котором присутствовал флуоресцентный маркер FM 1-43. Далее препарат перфузировали стандартным раствором Рингера для вымывания красителя из мембран и уменьшения неспецифического свечения с последующей регистрацией флуоресценции. Как 15-, так и 30-минутное выдерживание препарата в гиперкалиевом растворе (концентрация ионов K 20 мМ) с FM 1-43 приводила к появлению в НО ярких светящихся пятен, которые отра-

жают скопления везикул, прошедших процесс эндоцитоза и содержащих FM 1-43 (рис. 2, *a, б*). При концентрации ионов K 40 мМ 15-минутная экспозиция препарата с FM 1-43 также приводила к загрузке маркера в НО (рис. 2, *a, б*). Однако увеличение времени экспозиции до 30 мин не вызывало появления светящихся пятен (рис. 2, *a, б*). В этом случае происходило значительное увеличение диаметра терминалей (рис. 2, *в*). Полученные нами данные свидетельствуют о том, что длительное воздействие гиперкалиевых растворов при концентрации ионов K 40 мМ приводит к нарушению процессов загрузки флуоресцентного маркера в синаптические везикулы.

Для определения времени возникновения этих нарушений мы изменили схему экспериментов. В этом случае гиперкалиевый раствор (40 мМ) действовал в течение 15 мин. FM 1-43 апплицировали либо до действия раствора (контроль), либо в 1, 2 и 3-й 5-минутные отрез-

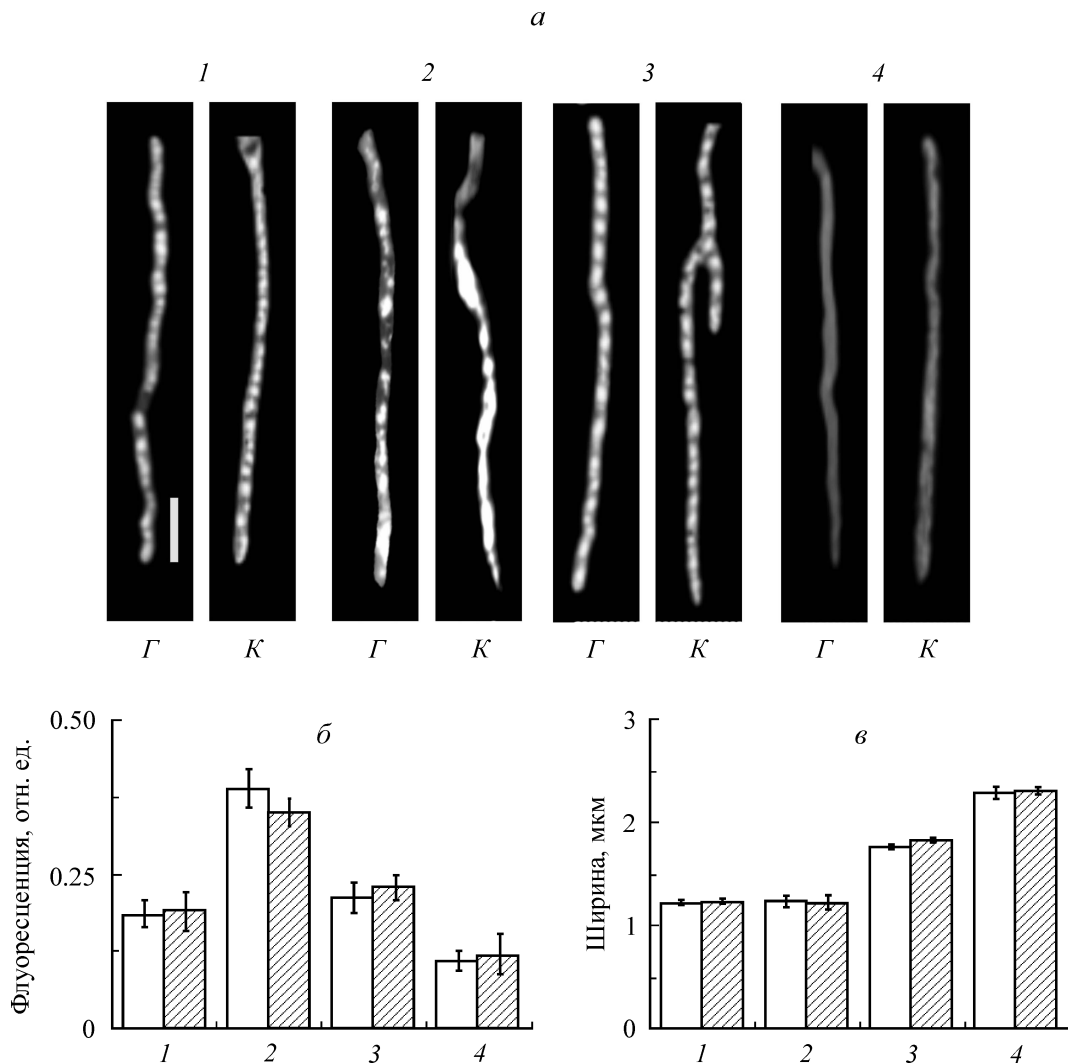


Рис. 2. Флуоресценция двигательного нервного окончания (эндоцитозный маркер FM 1-43) при действии гиперкалиевого раствора и кофеина.

а — картины флуоресценции отдельных нервных терминалей при действии гиперкалиевого раствора (Г) и кофеина (К). Экспозиции в гиперкалиевом растворе (20 мМ) или кофеине (2.5 мМ) с присутствием FM 1-43 в течение 15 (1) и 30 (2) мин. Экспозиция с FM 1-43 (KCl 40 мМ, кофеин 5 мМ) в течение 15 (3) и 30 (4) мин. Калибровка на а1 — 8 мкм. б, в — средние интенсивности свечения и ширины терминалей; светлые столбики — гиперкалиевые растворы, заштрихованные — кофеин. 1—4 — то же, что и на рис. 2, а, в — средние значения ширины терминалей, мкм. Каждый столбик — среднее для 8 экспериментов.

Fig. 2. Fluorescence of motor nerve ending (endocytotic marker FM 1-43) under high potassium solution and caffeine actions.

а — fluorescence of single nerve endings under high potassium solution (Г) and caffeine (К) actions. Expositions at high potassium solution (20 mM) or caffeine (2.5 mM) in the presence of FM 1-43 for 15 (1) and 30 (2) min. Exposition with FM 1-43 (KCl 40 mM, caffeine 5 mM) for 15 (3) and 30 (4) min. Calibration in a1 — 8 μm. Middle intensity of fluorescence (a) and width of terminals (в); light columns — high potassium solution, dotted columns — caffeine. Abscisse — 1—4, being the same as in a, ordinate axis; б — fluorescence intensity, rel. unit; в — middle significances of terminal width, μm. Every column represents average meaning (n = 8).

ки времени (рис. 3). Оказалось, что если добавление FM 1-43 осуществляли в первые 5 мин, то яркость свечения пятен была максимальной, а диаметр НО не менялся. При добавлении FM 1-43 через 5 мин от начала действия гиперкалиевого раствора свечение пятен резко уменьшалось (рис. 3). Если краситель апплицировался в последние 5 мин, то светящиеся пятна практически не выявлялись, а диаметр НО значительно увеличивался. Эти данные свидетельствуют о том, что примерно через 5 мин стимуляции экзоцитоза гиперкалиевыми растворами при концентрации 40 мМ начинается процесс блокирования эндоцитоза синаптических везикул. Если FM 1-43 добавляли на 5 мин после смены гиперкалиевого раствора

на стандартный раствор Рингера, то происходило уменьшение ширины НО и появление светящихся пятен (рис. 3).

Эндоцитоз синаптических везикул при стимуляции секреции медиатора кофеином. Похожие данные были получены при стимуляции секреции медиатора кофеином. Так же как и при использовании гиперкалиевых растворов, 15- и 30-минутная экспозиция препарата в растворе с 2.5 мМ кофеина с FM 1-43 приводила к загрузке маркера в НО и появлению светящихся пятен (рис. 2, а, б). При концентрации кофеина 5 мМ светящиеся пятна появлялись только при 15-минутной экспозиции, а при 30-минутной пятна отсутство-

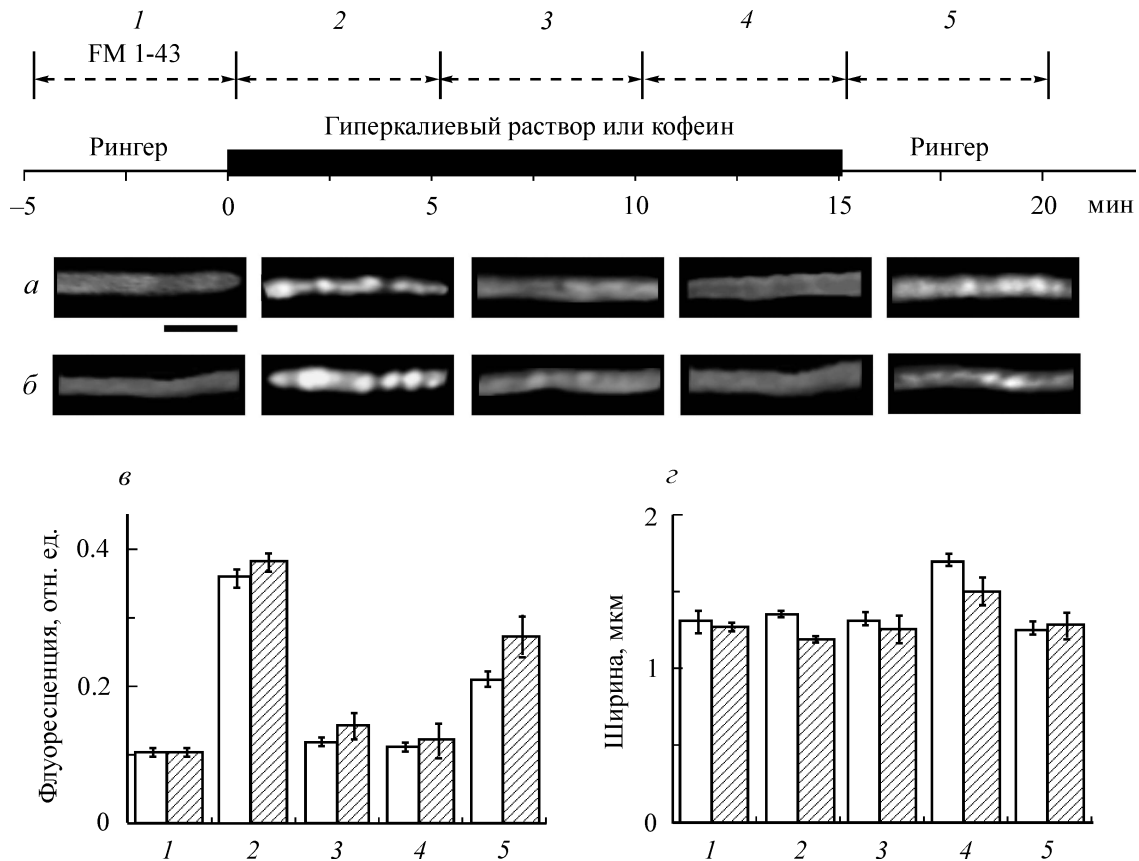


Рис. 3. Флуоресценция двигательного нервного окончания при действии гиперкалиевого раствора или кофеина при экспозиции эндоцитозного маркера FM 1-43 в различные временные промежутки.

Вверху — схема и временной ход экспериментов. Пунктирными стрелками (1—5) показаны временные промежутки экспозиции FM 1-43; черным прямоугольником — время действия гиперкалиевого раствора (40 мМ) или кофеина (5 мМ). Изображения участков НО: а — гиперкалиевый раствор, б — кофеин. Под а1 — калибровка 5 мкм. в, з — средняя интенсивность свечения участков НО и средняя ширина нервной терминали. 1—5 — варианты времени аппликации FM 1-43. Каждый столбик — среднее для 8 экспериментов.

Fig. 3. Fluorescence of motor nerve ending under high potassium sodium or caffeine action in presence of endocytotic marker FM 1-43 during different time intervals.

From the top — scheme and time course of experiments. The time intervals of exposition of FM 1-43 are shown by dotted arrows (1—5); black rectangle — time of action of high potassium solution (40 mM) of caffeine (5 mM). Axis — time, min. The images of parts of NE: а — high potassium solution, б — caffeine. Under а1 calibration — 5  $\mu$ m. The average meanings ( $n = 8$ ) of fluorescence intensity of NE parts (в) and width of nerve terminal (з). Abscisse — 1—5 — variants of time of FM 1-43 application; ordinate — in в — fluorescence intensity, conventional units; in з — width of terminals,  $\mu$ m.

вали (рис. 2, а, б). Дальнейшие исследования показали, что при 15-минутном действии кофеина в концентрации 5 мМ увеличение свечения НО наблюдается только при экспозиции FM 1-43 в первые 5 мин (рис. 3). При экспозиции FM 1-43 во 2-й и 3-й 5-минутные отрезки свечение было слабо выражено, а диаметр НО увеличивался (рис. 3). Если же после 15-минутной экспозиции препарата в растворе с кофеином FM 1-43 добавляли на 5 мин в стандартный раствор Рингера, то происходило уменьшение ширины НО и появление светящихся пятен (рис. 3).

Эндоцитоз синаптических везикул в процессе высокочастотного ритмического раздражения. Для оценки эндоцитоза при высокочастотной активности синапса двигательный нерв нервно-мышечного препарата раздражали в течение 5 мин с частотой 20 или 100 имп/с. Фоновое свечение оценивали вне стимуляции, при аппликации красителя в перфузируемый раствор на 1 мин. В процессе высокочастотного раздражения FM 1-43 также добавляли на 1 мин в 1, 3 и 5-ю мин раздражения (рис. 4). Оказалось, что во всех ва-

риантах аппликации FM 1-43 в процессе раздражения происходит эффективная загрузка маркера в НО без изменения ширины терминалей (рис. 4). Это свидетельствует об интенсивных процессах эндоцитоза в течение всего периода раздражения.

## Обсуждение

Для оценки роли ионов Са в процессах эндоцитоза мы использовали три воздействия, которые приводят к росту [Са]<sub>v</sub>.

1. Увеличение внеклеточной концентрации ионов К<sup>+</sup>. В этом случае возникающая деполяризация мембраны НО вызывает постоянное открытие потенциалзависимых Са-каналов и вход ионов Са из внеклеточной среды НО (Angleton, Betz, 2001).

2. Кофеин. При этом происходят активация рианодиновых рецепторов эндоплазматического ретикулума НО и выход ионов Са из него в цитоплазму (Martinez-Serrano, Satrustegui, 1989; Зефилов и др., 2005).

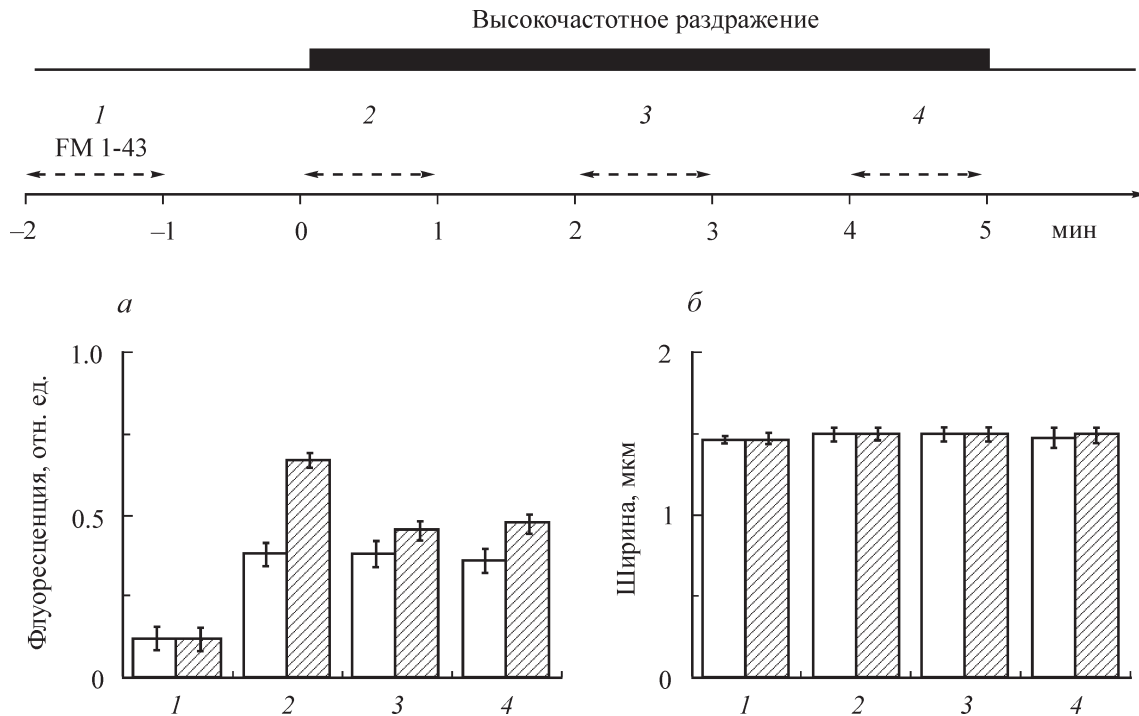


Рис. 4. Флуоресценция двигательного нервного окончания с использованием FM 1-43 при высокочастотной ритмической активности синапса.

Вверху — схема и временной ход экспериментов. Темный прямоугольник — время стимуляции двигательного нерва с частотой 20 или 100 имп/с. Пунктирные стрелки — время экспозиции красителя. а, б — средние значения интенсивности свечения участков нервного окончания и ширины терминалей соответственно; светлые столбики — 20 имп/с, заштрихованные — 100 имп/с. 1—4 — варианты времени аппликации FM 1-43.

Fig. 4. Fluorescence of motor nerve ending using FM 1-43 during high rhythmic activity of synapsis.

From the top — scheme and time course of experiments. Dark rectangle — time of motor nerve stimulation with frequencies of 2000 or 100 imp/s, resp. Dotted arrows — time of dye exposition. Axis — time, min. The average meanings of fluorescence intensity of NE parts (a) and with of terminals (b); light columns — 20 imp/s, dotted columns — 100 imp/s. Designations are the same, as in fig. 3, a, z.

3. Высокочастотное ритмическое раздражение. В отличие от эффектов гиперкалиевых растворов в этом случае Ca-каналы открываются кратковременно в ответ на каждый ПД, а ионы Ca, оставшиеся в цитоплазме от каждого предшествующего импульса, суммируются с новой порцией вновь входящих ионов Ca (Suzuki et al., 2000; Zucker, Regehr, 2002).

Проведенные нами электрофизиологические исследования показали, что первые два воздействия вызывают значительное увеличение спонтанной секреции медиатора (частоты МТКП) (рис. 1, а—в). Причем выраженность изменений секреции при увеличении внеклеточной концентрации ионов K до 20 и 40 мМ примерно соответствует действию кофеина в концентрациях 2.5 и 5.0 М (рис. 1, а, б). Следовательно, эти воздействия вызывают примерно одинаковое и долговременное увеличение [Ca]<sub>в</sub>, приводящее к усилению экзоцитоза синаптических везикул.

Увеличение [Ca]<sub>в</sub> и усиление экзоцитоза синаптических везикул при наших воздействиях несомненно приводят к активации процессов эндоцитоза. Об этом свидетельствуют опыты с загрузкой в НО флуоресцентного маркера FM 1-43. Действительно, выдерживание мышцы в течение 15 или 30 мин как в гиперкалиевых растворах (20 мМ KCl), так и при добавлении кофеина (2.5 М) с FM 1-43 приводило к появлению в НО светящихся пятен (рис. 2). При концентрациях KCl и кофеина 40 и 5 мМ соответственно загрузка маркера происходила только при экспозиции в течение 15 мин. Дальнейшие эксперименты с 5-минутными экспозициями FM 1-43 на фоне

15-минутного действия гиперкалиевого раствора или кофеина показали, что загрузка маркера в НО происходит только тогда, когда FM 1-43 апплицируется в 1-й 5-минутный отрезок времени (рис. 3). Нарушение загрузки маркера при его аппликации во 2-й и отсутствие при аппликации в 3-й 5-минутный отрезок (рис. 3) можно было объяснить снижением интенсивности экзоцитоза везикул во время действия гиперкалиевого раствора и кофеина. Однако электрофизиологические эксперименты показали, что увеличение частоты МТКП при этих воздействиях сохраняется в течение нескольких десятков минут (рис. 1). Можно было также предположить, что по мере действия гиперкалиевых растворов и кофеина происходит изменение механизма экзоцитоза — полный экзоцитоз с встраиванием мембраны везикулы в пресинаптическую мембрану заменяется механизмом kiss-and-run с формированием временной поры (Cousin, Robinson, 2000; Royle, Lagnado, 2003; Stevens, 2003; Зефилов и др., 2004), через которую FM 1-43 не может проникнуть. Но этому предположению противоречит обнаруженное нами увеличение ширины НО (рис. 2, 3). Отсюда мы сделали вывод о том, что примерно через 5—8 мин действия гиперкалиевого раствора (концентрация KCl 40 мМ) или кофеина (5 мМ) начинается блокирование процесса эндоцитоза синаптических везикул. Возникающее при этом рассогласование экзо- и эндоцитоза сопровождается увеличением диаметра нервных терминалей.

Несомненно, что причиной блока эндоцитоза является увеличение [Ca]<sub>в</sub>. Показано, что гиперкалиевые рас-

творы дозозависимо увеличивают внутриклеточную концентрацию ионов Са, которая при концентрации КС1 20 мМ достигает 3—5 мкМ (Angleton, Betz, 2001). Отсутствие нарушений эндоцитоза при таких концентрациях КС1 в течение 30 мин (рис. 1) позволяет считать, что блок наблюдается при [Са]<sub>в</sub> более 5 мкМ. При блокировании эндоцитоза высокая интенсивность экзоцитоза долгое время сохраняется. Именно поэтому мы не наблюдали светящихся пятен в НО при 30-минутном воздействии гиперкалиевого раствора (КС1 40 мМ) или кофеина (5 мМ) с FM 1-43 (рис. 1). В этом случае в течение 1-х мин происходит экзо- и эндоцитоз с загрузкой маркера в везикулы, а позднее на фоне блокирования эндоцитоза осуществляется экзоцитоз везикул с освобождением медиатора и FM 1-43 в синаптическую щель.

Блок эндоцитоза при увеличении [Са]<sub>в</sub> является обратимым. Во всяком случае, аппликация FM 1-43 после окончания 15-минутного действия гиперкалиевого раствора или кофеина приводит к возобновлению эндоцитоза, уменьшению диаметра нервных терминалей и загрузке маркера в НО (появлению светящихся пятен) (рис. 3). Мишень для ингибиторной роли Са в процессах эндоцитоза неизвестна. Одной из кандидатур мишени может являться динамин 1, так как микромолярные уровни [Са]<sub>в</sub> ингибируют его ГТФазную активность (Cousin, Robinson, 2000; De Camilli, 2001).

В естественных условиях передача возбуждения в синапсе происходит в результате экзоцитоза большого количества везикул и соответственно массивного освобождения квантов медиатора в ответ на пресинаптический ПД. При произвольных движениях частота ПД может достигать нескольких десятков имп/с, что естественно вызывает увеличение [Са]<sub>в</sub>. Наши электрофизиологические эксперименты показали, что высокочастотное ритмическое раздражение сопровождается выраженной депрессией (снижением амплитуды ТКП) (рис. 1, 2). Классические построения предполагают, что депрессия связана с быстрым расходом запаса готовых к экзоцитозу синаптических везикул (Zucker, Regehr, 2002). Однако на основе наших данных можно было предположить, что длительная ритмическая активность синапса вызывает увеличение [Са]<sub>в</sub>, блокирует эндоцитоз синаптических везикул и способствует развитию депрессии. Однако исследования динамики загрузки маркера в НО при длительном ритмическом раздражении не подтвердили этого предположения. Оказалось, что даже при 5-минутном раздражении с частотой 20 или 100 имп/с, когда вызванная секреция медиатора полностью прекращается, аппликация FM 1-43 в конце раздражения приводит к загрузке маркера (рис. 4). Вероятно, это связано с тем, что в условиях высокочастотной вызванной активности, при которой осуществляется кратковременный кальциевый вход на каждый ПД, [Са]<sub>в</sub> не достигает значительных величин. Использование внутриклеточных кальциевых индикаторов показало, что при таких параметрах стимуляции [Са]<sub>в</sub> не превышает 2—3 мкМ (Suzuki et al., 2000). В то же время эти исследования не позволяют оценить уровни [Са]<sub>в</sub> в участках НО с низкой и высокой плотностью Са-каналов. Поэтому не исключено, что при естественной высокочастотной активности синапса в области активных зон, где находятся скопления Са-каналов, может развиваться блок эндоцитоза при сохранении эндоцитоза между активными зонами.

Полученные нами данные свидетельствуют о том, что процессы экзо- и эндоцитоза в двигательном НО мо-

гут быть вызваны отдельно, но реагировать на один и тот же пусковой сигнал — увеличение [Са]<sub>в</sub> (Gad et al., 1998; Klingauf et al., 1998). Однако высокий уровень [Са]<sub>в</sub> разобщает эти процессы. По всей видимости, разобщение может произойти только при массивном поступлении ионов Са в цитоплазму НО. В обычных, физиологических, условиях экзо- и эндоцитоз в синапсе объединяются в единое целое, а экзоцитоз везикулы ведет автоматически к эндоцитозу.

Авторы выражают благодарность М. А. Мухамедьярову за помощь в подготовке рисунков.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 02-04-96252), гранта президента РФ (НШ-1383.2003.4) и АН Республики Татарстан (03-3.8.-122).

### Список литературы

- Зефирова А. Л., Абдрахманов М. М., Григорьев П. Н. 2004. «Kiss-and-run» механизм квантовой секреции медиатора в нервно-мышечном синапсе лягушки. Бюл. эксперим. биол. мед. 137 (2) : 124—128.
- Зефирова А. Л., Абдрахманов М. М., Григорьев П. Н. 2005. Эффекты гиперкалиевых растворов и кофеина на процессы экзо-эндоцитоза синаптических везикул в двигательном нервном окончании лягушки. Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова. 91 (6) : 973—984.
- Зефирова А. Л., Григорьев П. Н., Петров А. М., Минлебаев М. Г., Ситдикова Г. Ф. 2003. Прижизненное флуоресцентное исследование двигательного нервного окончания лягушки с использованием эндоцитозного маркера FM 1-43. Цитология. 45 (12) : 34—40.
- Зефирова А. Л., Ситдикова Г. Ф. 2002. Ионные каналы нервного окончания. Успехи физиол. наук. 33 (4) : 1—33.
- Зефирова А. Л., Черанов С. Ю. 2000. Молекулярные механизмы квантовой секреции медиатора в синапсе. Успехи физиол. наук. 31 (3) : 3—22.
- Angleton J. K., Betz W. J. 2001. Intraterminal Ca<sup>2+</sup> and spontaneous transmitter release at the frog neuromuscular junction. J. Neurophysiol. 1 : 287—294.
- Artalejo C. R., Elhamdani A., Palfrey H. C. 1996. Calmodulin is the divalent cation receptor for rapid endocytosis, but not exocytosis, in adrenal chromaffin cells. Neuron. 16 : 195—205.
- Cousin M. A., Robinson P. J. 1999. Mechanisms of synaptic vesicle recycling illuminated by fluorescent dyes. J. Neurochem. 73 : 2227—2239.
- Cousin M. A., Robinson P. J. 2000. Ca<sup>2+</sup> influx inhibits dynamin and arrests synaptic vesicle endocytosis at the active zone. J. Neurosci. 20 : 949—957.
- De Camilli P., Slepnev V. I., Shupliakov O., Brodin L. 2001. Synaptic vesicle endocytosis. In: Synapses. Baltimore: The Johns Hopkins Univ. Press. 217—274.
- Gad H., Low P., Zotova E., Brodin L., Shupliakov O. 1998. Dissociation between Ca<sup>2+</sup>-triggered synaptic vesicle exocytosis and clathrin-mediated endocytosis at a central synapse. Neuron. 21 : 607—616.
- Heuser J. E., Reese J. E. 1973. Evidence for recycling of synaptic vesicle membrane during transmitter release at the frog neuromuscular junction. J. Cell Biol. 57 : 315—344.
- Klingauf J., Kavalali E. T., Tsien R. W. 1998. Kinetics and regulation of fast endocytosis at hippocampal synapses. Nature. 394 : 581—585.
- Koenig J. H., Ikeda K. 1996. Synaptic vesicles have two distinct recycling pathways. J. Cell Biol. 135 : 767—808.
- Martines-Serrano A., Satrustegui J. 1989. Caffeine-sensitive calcium stores in presynaptic nerve endings: a physiological role. Biochem. Biophys. Res. Commun. 161 : 965—971.

- Neher E., Zucker R. S. 1993. Multiple calcium-dependent processes related to secretion in bovine chromaffin cells. *Neuron*. 10 : 21—30.
- Richards D. A., Guatimosim C., Betz W. J. 2000. Two endocytic recycling routes selectively fill two vesicle pools in frog motor nerve terminals. *Neuron*. 27 : 551—559.
- Rizzoli S. O., Betz W. J. 2005. Synaptic vesicle pools. *Nature*. 6 : 57—69.
- Royle S. J., Lagnado L. 2003. Endocytosis at the synaptic terminal. *J. Physiol.* 553 : 345—355.
- Ryan T. A. 1996. Endocytosis at nerve terminals: timing is everything. *Neuron*. 17 : 1035—1037.
- Stevens F. 2003. Neurotransmitter release at central synapses. *Neuron*. 40 : 381—388.
- Sudhof T. C. 1995. The synaptic vesicle cycle: a cascade of protein—protein interactions. *Nature*. 375 : 645—653.
- Suzuki S., Osanai M., Murase M., Suzuki N., Ito K., Shirasaki T., Narita K., Ohnuma K., Kuba K., Kijima H. 2000. Ca<sup>2+</sup> dynamics at the frog motor nerve terminal. *Eur. J. Physiol.* 440 : 351—365.
- Torri-Tarelli F., Villa A., Valtorta F., De Camilli P., Greengard P., Ceccarelli B. 1990. Redistribution of synaptophysin and synapsin I during alpha-latrotoxin-induced release of neurotransmitter at the neuromuscular junction. *J. Cell Biol.* 110 : 449—459.
- Van der Kloot W., Molgo J. 1994. Quantal acetylcholine release at the vertebrate neuromuscular junction. *Physiol. Rev.* 74 : 899—991.
- Van Gersdorff H., Matthews G. 1994. Inhibition of endocytosis by elevated internal calcium in a synaptic terminal. *Nature*. 370 : 652—655.
- Wu L. G., Betz W. J. 1996. Nerve activity but not intracellular calcium determines the time course of endocytosis at the frog neuromuscular junction. *Neuron*. 17 : 769—779.
- Zefirov A. L., Benish T., Fatkullin N., Tcheranov S., Khazipov R. 1995. Localization of active zones. *Nature*. 376 : 393—394.
- Zucker R. S., Regehr W. G. 2002. Short-term synaptic plasticity. *Annu. Rev. Physiol.* 64 : 355—340.

Поступила 4 V 2005

THE INTRACELLULAR CALCIUM AND MECHANISMS  
OF ENDOCYTOSIS OF SYNAPTIC VESICLES AT THE FROG NERVE ENDINGA. L. Zefirov,<sup>1</sup> M. M. Abdrakhmanov, P. N. Grigoryev, A. M. PetrovDepartment of Normal Physiology, Medical State University, Kazan<sup>1</sup>;<sup>1</sup> e-mail: zefirov@kmu-mf.kcn.ru

In the experiments on frog motor nerve endings of cutaneous pectoris muscle, made by extracellular recording of synaptic signals, it has been shown that the increase in intracellular calcium ion concentration in the nerve ending (by enhance of extracellular potassium ion concentration, or by addition of caffeine) leads to an increase in the miniature end-plate potential frequency, which is preserved over the whole period (about 10 min) of action of these substrates. The rhythmic stimulation of motor nerve (20 or 100 imp/s) quickly leads to a decrease in the end plate potentials amplitude. It has been shown by fluorescent microscopy with the use of endocytotic marker FM 1-43 that in the course of a short time exposition (5 min) in a high potassium solution (40 mM) or caffeine (5 mM), light spots appeared in the nerve ending. This shows that synaptic vesicles undergo intensive processes of endocytosis. During a longer exposition (30 min) no light spots were revealed, whereas the nerve ending width increased. This data allowed to propose that the process of endocytosis was blocked. In the presence of even lower concentrations of potassium ions and caffeine, and during a long rhythmic stimulation (20 or 100 imp/s) no blocking of endocytosis was revealed. It is concluded that high concentrations of intracellular calcium in the frog motor nerve ending leads to a reversible block of endocytosis, while exocytosis in synaptic vesicles is proceeding.

Key words: motor nerve ending, FM 1-43, endocytosis, exocytosis, intracellular calcium, high potassium solutions, caffeine.