

На правах рукописи

Гиниатуллин Артур Рауфович

**РОЛЬ ПЕРЕКИСИ ВОДОРОДА В ПРОЦЕССЕ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ
НЕРВНО-МЫШЕЧНОГО СИНАПСА**

03.00.13 - физиология

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук



КАЗАНЬ 2005

Работа выполнена в ГОУ ВПО "Казанский государственный медицинский университет" федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию.

Научный руководитель: заслуженный деятель науки РФ, чл.-корр. РАМН, доктор медицинских наук, профессор Зефиров Андрей Львович

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор
Гайнутдинов Халил Латыпович,
доктор биологических наук,
Бухараева Эля Ахметовна

Ведущая организация – Московский государственный университет,
г. Москва.

Защита состоится "27" января 2006г. в 11 часов

На заседании диссертационного совета Д 208.034.01

при ГОУ ВПО "Казанский государственный медицинский университет" по адресу
420012, г. Казань, ул. Бутлерова, д.49.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке
ГОУ ВПО "Казанский государственный медицинский университет"

Автореферат разослан "23" января 2005г.

Ученый секретарь
диссертационного Совета
доктор биологических наук,
профессор



Нigmatullina P.P.

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования.

Присутствие свободных радикалов в биологических системах было показано около пятидесяти лет назад [Commoner B. et al., 1954]. В 1956 году Denham Harman предположил, что свободные радикалы, содержащие кислород и названные активными формами кислорода (АФК), могут быть побочными продуктами ферментативных реакций протекающих в клетке *in vivo* [Harman D 1956, 1981]. На сегодняшний день известно, что АФК, такие как анион супероксида ($O_2^{\cdot-}$), гидроксил радикал (OH^{\cdot}) и перекись водорода (H_2O_2), постоянно образуются в живой клетке, и наибольший вклад при этом вносит дыхательная цепь митохондрий. Важна роль и системы цитохрома Р-450, локализованной в эндоплазматической сети. АФК часто образуются не только спонтанно, но и ферментативно (мембранно-связанная НАДФН-оксидаза) [Vignais, 2002].

АФК могут обуславливать развитие процессов, связанных с окислительной модификацией (ОМ) таких макромолекул клетки, как ДНК, белки, липиды [Beckman KB.&Ames B.N., 1998], что является главной причиной ряда нейродегенеративных патологий включая синдром Дауна и др. [Busciglio J&Yankner BA, 1995; Lovell MA et al., 1997; Montene KS et al., 1997]. Высокий уровень АФК в клетке может являться фактором, опосредующим повреждение ее структур и развитие серьезных осложнений, наблюдаемых при пересадке органов, инфаркте миокарда, инсульте и патологии органов дыхания [Gersh BJ 1998; Schulz R et al., 2000]. В 70-ые годы Mittal и Murard опубликовывают первое сообщение о положительных биологических эффектах АФК. Оказалось что в таких физиологических процессах, как реакции иммунной системы организма, регуляция тонуса сосудов, и др., АФК играют важную роль [Wulf D, 2002].

Из всех АФК особое внимание привлекает H_2O_2 , так как 1) она является наиболее стабильной во вне- и внутриклеточной среде [Kress et al., 1995; Li&Jackson, 2002]; 2) аппликация H_2O_2 в течение тридцати минутного интервала времени, не приводит к развитию неспецифического эффекта в виде ОМ макромолекул клетки [Tretter&Adam-Vizi, 1996]; и 3) H_2O_2 свободно проходит через клеточные мембраны [Waldron&Rozengurt, 2000]. При этом механизм действия H_2O_2 на клеточные мишени на сегодняшний день мало известен. Например, есть данные о том, что H_2O_2 способна модифицировать цистеиновые, метиониновые [Knapp&Klapp, 2000] и тирозиновые группы белков [Konishi et al., 1997], не исключена вероятность и изменения работы внутриклеточных ферментов.

В последнее время появились данные о специфическом влиянии H_2O_2 на работу возбудимых тканей. Например, в центральной нервной системе H_2O_2 может играть роль модулятора процесса передачи возбуждения [Servija et al., 2000; Szybkawa et al., 2000;

Goldstein et al., 2003]. Так же было показано, что H_2O_2 принадлежит к группе агентов, которые блокируют развитие долговременной потенциации [Pellmar et al., 1991], посредством эффекта на киназы и фосфолипазы, вовлеченные в развитие данного вида нейрональной пластичности.

Показано, что H_2O_2 оказывает серьезное влияние на работу скелетной мышцы. Ряд исследователей [Hasegawa et al., 1997; Kolbeck et al., 1997] обнаружили, что H_2O_2 влияет на время развития мышечного утомления. Crosland в 1995 году показал, что экзогенная H_2O_2 снижает силу мышечного сокращения, вызванного не прямой стимуляцией, не влияя на этот параметр при прямой стимуляции мышцы, что позволяет предполагать наличие чувствительности процесса передачи возбуждения в нервно-мышечном синапсе к H_2O_2 . Так как из литературы известно, что в ходе сократительной активности волокна скелетной мышцы способны образовывать и секретировать $O_2^{\cdot-}$ и H_2O_2 , [Hasegawa et al., 1997; Supinski et al., 1999], то возникает вопрос о возможной роли H_2O_2 в процессе передачи возбуждения в нервно-мышечном синапсе. И если она существует, то какие механизмы лежат в ее основе? Эти вопросы остаются открытыми.

Так же не ясно, какие процессы в системе нервно мышечного синапса приводят к образованию эндогенных АФК, в частности H_2O_2 . Есть данные о том, что аденозинтрифосфорная кислота (АТФ) стимулирует образование АФК через активацию пуринергических рецепторов клеток глиомы [Sauer et al., 2003] и астроцитов [Murakami et al., 2003]. В работе на культуре нейронов было показано, что стимуляция ионотропных рецепторов P_2X_7 подтипа приводит к гибели клеток за счет усиления образования $O_2^{\cdot-}$ и H_2O_2 глияльной НАДФН оксидазой [Parvathenani et al., 2003]. Швановские глияльные клетки, окружающие нервную терминаль, способны "отвечать" на эндогенную АТФ, путем синтеза множества диффундируемых посредников [Auld&Robitaille, 1995]. Ранее было показано, что АТФ ингибирует квантовое высвобождение ацетилхолина из двигательной нервной терминали через активацию метаболотропных P_2Y рецепторов [Sokolova et al., 2003].

Отсутствие данных о влиянии H_2O_2 на процесс передачи возбуждения с мотонейрона на скелетную мышцу, делает данную работу актуальной.

Цель и задачи исследования. Целью данного исследования явилось выяснение механизмов действия H_2O_2 на передачу возбуждения в нервно-мышечном синапсе лягушки и изучение возможности и механизмов синтеза H_2O_2 в области нервно-мышечного соединения.

В соответствии с этой целью были поставлены следующие задачи:

1). Изучить эффекты разных концентраций H_2O_2 на амплитудно-временные параметры токов концевой пластинки (ТКП) и миниатюрных токов концевой пластинки (МТКП).

- 2). Исследовать влияние H_2O_2 на проведение ритмических серий импульсов через нервно-мышечный синапс.
- 3). Проанализировать влияние H_2O_2 на периневральные Ca^{2+} токи.
- 4). Исследовать зависимость действия H_2O_2 от внеклеточной концентрации ионов кальция.
- 5). Провести анализ возможного участия протеинкиназы С в реализации действия H_2O_2 на секрецию медиатора.
- 6). Оценить роль внеклеточной АТФ в процессах образования H_2O_2 в нервно-мышечном синапсе.
- 7). При помощи оптических методов исследования выявить возможные места образования H_2O_2 в области нервно-мышечного синапса.

Положения, выносимые на защиту:

1. H_2O_2 является пресинаптическим модулятором передачи возбуждения в нервно-мышечном синапсе лягушки. В низких концентрациях (единицы мкМоль/л) H_2O_2 способна повышать, а в высоких (сотни мкМоль/л) понижать уровень секреции медиатора из двигательного нервного окончания.
2. Пресинаптические эффекты H_2O_2 реализуются преимущественно через систему протеинкиназы С.
3. H_2O_2 образуется в области нервно-мышечного синапса и этот процесс модулируется АТФ посредством активации P2Y пуриноцепторов.

Научная новизна. В данном исследовании впервые показано, что H_2O_2 является пресинаптическим модулятором передачи возбуждения в нервно-мышечном синапсе лягушки. Нами было обнаружено, что низкие (3 мкМоль/л) концентрации H_2O_2 приводят к облегчению, в то время как высокие (300 мкМоль/л) концентрации опосредуют угнетение холинергической передачи. Полученные нами результаты, являются прямыми доказательствами действия H_2O_2 на пресинаптическую терминаль двигательного нерва. Так как изменения амплитудно-временных параметров синаптических токов наблюдались нами при использовании сравнительно низких концентраций H_2O_2 можно думать, что процесс модуляции нервно-мышечной передачи H_2O_2 может иметь место при физиологических состояниях *in vivo*. Приоритетными являются данные о ключевой роли протеинкиназы С в реализации эффектов H_2O_2 . Впервые показано, что система пуринергического контроля секреции медиатора контролирует процесс образования эндогенной H_2O_2 в области нервно-мышечного синапса. Основываясь на полученных данных, можно говорить о том, что в нервно мышечном синапсе эндогенная H_2O_2 может играть роль модулятора процесса

квантового высвобождения ацетилхолина из окончания двигательного нерва по ретроградному типу. Процесс образования эндогенной H_2O_2 контролируется внеклеточной АТФ высвобождающейся из двигательного нервного окончания вместе с ацетилхолином, через активацию P_2U рецепторов, предположительно $P_2U_{12,13}$ их подтипа.

Научно-практическая ценность. Данная работа носит фундаментальный характер. Полученные данные позволяют открыть новую точку приложения АФК, в частности H_2O_2 , в модуляции процесса секреции медиатора в нервно-мышечном синапсе, и открывают новое направление в исследовании влияния АФК на функции нервной системы. Данная работа помогает приблизиться к пониманию внутриклеточных механизмов модуляции квантовой секреции медиатора и расширить представления о функционировании периферического синапса позвоночных, где существует несколько путей регуляции секреции медиатора, обеспечивающих высокую пластичность синаптического аппарата *in vivo*. Обнаруженное нами постоянное тоническое угнетение секреции медиатора эндогенной H_2O_2 , является основой для новых принципов нейромодуляции, базирующихся на угнетении или усилении этого влияния. Результаты исследования могут быть полезны для поиска новых фармакологических подходов в лечении ряда патологий (нейродегенеративные заболевания), ключевую роль в развитии которых играют АФК. Результаты работы включены в курс лекций по нормальной физиологии для студентов Казанского Государственного Медицинского Университета и Казанского Государственного Университета.

Апробация работы. Результаты исследований, выполненных по теме диссертации, доложены на Пироговской студенческой научной конференции (Москва, 2003); 7-ой Пушкинской школе-конференции молодых ученых (Пушино, 2003); международной конференции “Фундаментальные и клинические аспекты интегративной деятельности мозга” (Москва, 2003); международной конференции “Рецепция и внутриклеточная сигнализация” (Пушино, 2003, 2005); международном симпозиуме “Neuron Differentiation and Plasticity Regulation by Intercellular Signals” (Москва, 2003); международном симпозиуме “Biological motility” (Пушино, 2004); III съезде биофизиков России (Воронеж, 2004); Нейробиологической конференции “The world of the synapse: molecular basis pathologies and drug discovery” (Франция, 2004); конференции “Нейрохимия: фундаментальные и прикладные аспекты” (Москва, 2005); -5-ом съезде физиологов Сибири (Томск, 2005); на заседании кафедры нормальной физиологии Казанского государственного медицинского университета (2005).

Публикации. По материалам диссертации опубликована 21 научная работа, в том числе 3 статьи в зарубежных изданиях.

Структура и объем диссертации. Диссертация объемом 122 страницы состоит из введения, обзора литературы, описания методики исследования, результатов исследования и их обсуждения, заключения, выводов и списка цитируемой литературы. Список цитируемой литературы включает 424 источника, из них 416 - иностранных авторов. Диссертация содержит 15 рисунков, 1 таблицу и 1 схему.

ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектом исследования был нервно-мышечный препарат (портняжная и кожно-грудинная мышцы) лягушки *Rana Ridibunda*. Для предотвращения мышечных сокращений во время регистрации сигналов и сохранения высокого уровня квантового освобождения медиатора, производили поперечное рассечение мышечных волокон [Волкова и др., 1975], или использовали тубокурарин (3-5мкМоль/л). Ванночка, в которой размещался нервно-мышечный препарат, имела рабочий объем 4 мл. В течение эксперимента через ванночку непрерывно протекал раствор Рингера, содержащий (в мМоль/л): NaCl - 115,0; KCl - 2,5; CaCl₂ - 1,8; NaHCO₃ - 11,0. pH раствора поддерживали на уровне 7,2 - 7,4. Для исследования кальций-зависимости эффектов H₂O₂, рассечение мышцы не проводили, а использовали измененный раствор Рингера содержащий (в мМоль/л): CaCl₂ - 0,9; MgCl₂ - 6. При периневральном отведении Ca²⁺ токов использовался раствор Рингера следующего состава: CaCl₂ - 1,8мМоль/л; тубокурарин - 50мкМоль/л; 4-аминопиридин - 100мкМоль/л; тетрозилламмоний - 1мМоль/л [Redman&Silinsky, 1995]. В экспериментах применяли следующие фармакологические препараты: H₂O₂, антиоксиданты N-ацетилцистеин, пировиноградная кислота, каталаза, прооксидант - Fe₂SO₄, коклюшный токсин (PTX), агонисты пуриноцепторов АТФ, УТФ, АДФ, 2-месАДФ, антагонист пуриноцепторов MRS 2179, ингибиторы протеинкиназы С стауроспорин, хелеритрин хлорид. Эксперименты проводили при температуре 20±2°С. Токи концевой пластинки (ТКП) и миниатюрные токи (МТКП) отводили в условиях двухэлектродной фиксации потенциала. Регистрацию пресинаптических кальциевых токов проводили по методу описанному Redman и Silinsky (1995). Накопление и усреднение синаптических сигналов производили при помощи персонального компьютера с частотой дискретизации 5 мкс. Расчет параметров и характера спада МТКП и многоквантовых ТКП производили при помощи оригинальных компьютерных программ. Квантовый состав оценивался с применением "прямого" метода при делении средней амплитуды ТКП на среднюю амплитуду МТКП [Del Castillo, Katz,

1954] Анализ временного хода секреции медиатора, асинхронности этого процесса, был проведен при помощи метода деконволюции [Van der Kloot, 1988] с использованием усредненных ТКП и МТКП [как описано Bukharaeva et al., 1999, Rich et al., 2002] Для определения количества H_2O_2 использовали спектрофотометрический метод, основанный на процессе образования комплекса между ионами трехвалентного железа (окисленного при взаимодействии с H_2O_2) с ксиленовым оранжевым (FOX-анализ) [Jiang et al., 1992, Wolff 1994]. При этом образуется фиолетовый комплекс с максимумом поглощения в интервале 540 и 580 нм). Измерение оптической плотности полученного раствора проводили на спектрофотометре Jena ("Carl Zeiss", Германия). Визуализация мест образования АФК проводилась при помощи флуоресцентной микроскопии на микроскопе (МИКМЕД-2, фирма ЛОМО) с использованием АФК чувствительного флуоресцентного зонда 5-(и 6)-карбоксит-2',7'-дихлороди гидрофлуоресцин диацетата (DCF). Количественную оценку интенсивности флуоресценции проводили при помощи специализированного программного обеспечения Image-Pro Plus (Япония) и Mathcad Professional (США) и высчитывали по формуле $(\Delta F/F_0 \times 100\%)$, где ΔF – разница между интенсивностью свечения до (F_0) и после (F_1) аппликации агентов. Достоверность различий оценивали по параметрическому критерию Стьюдента (t-тест) и непараметрическому тесту Манна-Уитни.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Эффекты экзогенной H_2O_2 на амплитудно-временные параметры ТКП и МТКП.

В первой серии экспериментов, используя рассеченный препарат портняжной мышцы, мы исследовали действие H_2O_2 на амплитудно-временные параметры многоквантовых токов концевой пластинки (ТКП) и миниатюрных ТКП (МТКП). В контроле при потенциале фиксации -40 мВ и частоте стимуляции двигательного нерва $0,03$ Гц амплитуда ТКП составляла 123 ± 7 нА ($n=20$ синапсов). H_2O_2 в концентрации 3 мкМоль/л увеличивала амплитуду ТКП до 153 ± 11 нА ($P < 0,05$; $n=6$; Рис 1Аа,б). Этот эффект стабилизировался к $15-20$ мин с начала аппликации H_2O_2 . Изменение параметров ТКП не сопровождалось изменениями амплитудно-временных параметров МТКП (Рис 1Аб) Частота МТКП при этом так же не изменялась ($P < 0,05$; $n=12$).

Оценка квантового состава (QC) ТКП (см. Объект и методы исследования), выявила увеличение количества высвобождаемых квантов медиатора в присутствии H_2O_2 (3 мкМоль/л) (Рис. 1Аб). Так квантовый состав увеличился с 110 ± 12 квантов в контроле, до 139 ± 10 после аппликации H_2O_2 ($n=6$; $P < 0,05$).

Такое же изменение амплитуды ТКП под влиянием низких (3 мкМоль/л) концентраций H_2O_2 (увеличение на $17 \pm 5\%$; $P < 0,05$; $n=5$;) без изменений временных параметров сигналов наблюдалось и в кураризированном препарате, что говорило о независимости наблюдаемого эффекта H_2O_2 , от используемой экспериментальной модели блокирования потенциала действия мышечных волокон.

Таким образом, низкие (физиологические) концентрации H_2O_2 , приводили к увеличению амплитуды ТКП, что было связано с увеличением количества высвобождаемого медиатора из двигательного нервного окончания

Высокие концентрации H_2O_2 (300 мкМоль/л) приводили к противоположному эффекту – уменьшению амплитуды ТКП (Рис. 1Б). Так H_2O_2 снижала амплитуду ТКП с 173 ± 9 до 130 ± 11 нА ($P < 0,01$; $n=10$) не меняя амплитудно-временных параметров МТКП (Рис 1ББ).

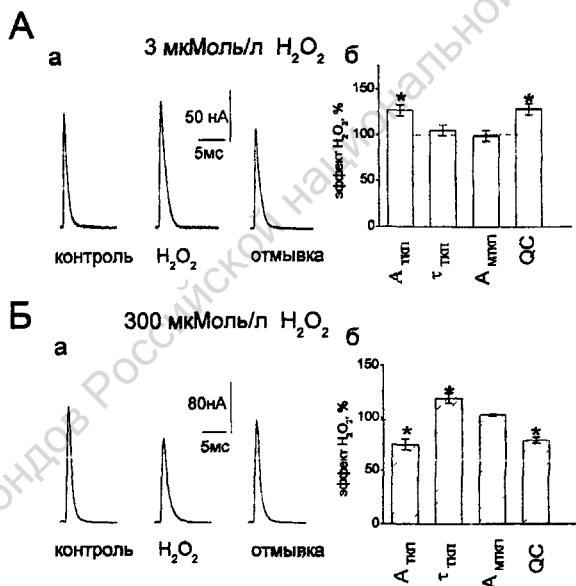


Рис. 1. Эффекты H_2O_2 на многоквантовые токи концевой пластинки (ТКП).

А - эффект H_2O_2 (3 мкМоль/л) на многоквантовые ТКП. Аа, примеры ТКП в контроле, в присутствии H_2O_2 (3 мкМоль/л) и после отмывки. Аб - гистограммы, демонстрирующие эффекты H_2O_2 (3 мкМоль/л) на амплитуду ТКП (A_{TQP}), постоянную времени спада ТКП (τ_{TQP}), амплитуду МТКП (A_{MTQP}) и изменения квантового состава (QC) оцениваемого как отношение амплитуд ТКП и МТКП ($*P < 0,05$; $n=6$). Данные на этой и последующих гистограммах представлены как средняя \pm СЕ М. (n =число синапсов). Б - эффект H_2O_2 (300 мкМоль/л) на многоквантовые ТКП. Ба - ТКП в контроле, в присутствии H_2O_2 (300 мкМоль/л) и после отмывки. Бб - гистограммы, демонстрируют эффекты H_2O_2 (300 мкМоль/л) на те же самые параметры ТКП и МТКП, что и на Аб ($*P < 0,05$; $n=6$).

Квантовый состав при этом достоверно снижался на $20 \pm 5\%$ ($P < 0,05$; $n=6$; Рис. 1Б) После аппликации H_2O_2 наблюдалось увеличение длительность ТКП с $1,11 \pm 0,04$ мс в контроле, до $1,33 \pm 0,06$ мс ($P < 0,05$; $n=6$) В отличие от низких концентраций, высокие концентрации сильно и обратимо снижали частоту МТКП на $69 \pm 5\%$ ($P < 0,05$, $n=6$) Угнетающий эффект высоких концентраций H_2O_2 на амплитуду ТКП ($18 \pm 6\%$, $n=5$, $P < 0,05$) был обнаружен так же и в кураризированном препарате.

Таким образом, высокие концентрации H_2O_2 , приводили к снижению амплитуды ТКП увеличению его длительности, что могло объясняться снижением квантового состава и/или изменением временного хода секреция медиатора из двигательной нервного окончания

Концентрационная зависимость эффекта H_2O_2

Результаты более детального исследования влияния различных концентраций H_2O_2 ($0,3$ мкМоль/л – 3 мкМоль/л) на синаптические токи показаны на Рис. 2. H_2O_2 в концентрациях $0,3$ – 1 мкМоль/л не меняла амплитуду ТКП. При использовании концентрации 30 мкМоль/л эффекты H_2O_2 были переменны, в то время как концентрации H_2O_2 превышающие 30 мкМоль/л, вызывали угнетение вызванных синаптических токов При использовании высоких концентраций H_2O_2 наблюдалось различной степени выраженности увеличение длительности ТКП (Рис 2А)

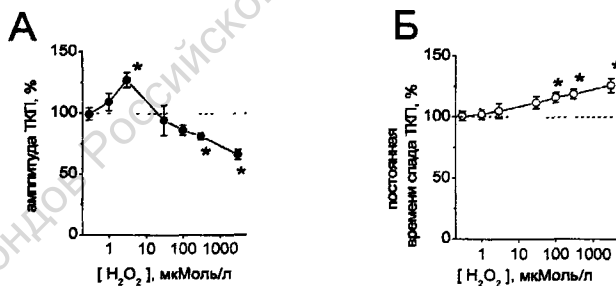


Рис. 2. Концентрационная зависимость эффектов H_2O_2 на параметры ТКП
А - эффект H_2O_2 на амплитуду ТКП. Б - эффект H_2O_2 на постоянную времени спада ТКП (* $P < 0,05$, $n=4-8$ синапсов).

Таким образом, H_2O_2 , в зависимости от концентрации, оказывает разнонаправленное действие на амплитуду ТКП, в то время как эффект на длительность ТКП однонаправлено увеличивается с увеличением концентрации H_2O_2 (Рис. 2Б). Основываясь на данных по изменению длительности ТПК можно предположить, что H_2O_2 в высоких концентрациях

помимо снижения квантового состава, так же влияет на временной ход секреции медиатора [Van der Kloot 1988; Zefirov A.L.&Abaidoullin R. K, 2001; Giniatullin et al , 1995]

Эффект H_2O_2 на амплитуду ТКП при высокочастотной стимуляции.

Для того чтобы исследовать действие H_2O_2 на процессы кратковременной пресинаптической пластичности, в следующей серии экспериментов, нами была использована высокочастотная стимуляция двигательного нерва. [Зефилов А.Л. и Мухамедьяров М.А., 2004; Zucker&Regehr, 2002].

В контрольных условиях, стимуляционный паттерн, состоящий из двадцати стимулов (следующих с частотой 60Гц) вызывал первоначальное небольшое увеличение амплитуды ТКП, с последующим ее снижением. H_2O_2 , как в низкой (3 мкМоль/л), так и в высокой концентрации (300 мкМоль/л) приводила к значительной выраженности эффекта увеличения амплитуд ТКП в ритмическом ряду.

Эффект наблюдаемый при аппликации низких концентраций H_2O_2 в течение высокочастотной серии импульсов, может объясняться увеличением восполнения немедленно готового к высвобождению пула медиатора [Зефилов А.Л. и Мухамедьяров М.А , 2004; Stevens&Sullivan, 1998; Zucker&Regehr, 2002], тогда как в случае высоких концентраций это может быть связано с угнетением секреции медиатора под действием H_2O_2 .

Эффекты H_2O_2 на временной ход секреции медиатора

Так как высокие концентрации H_2O_2 приводили к удлинению фазы спада многоквантовых ТКП, в дальнейшем мы попытались ответить на вопрос, не связан ли этот эффект с изменением временного хода секреции медиатора из двигательного нервного окончания. Временной ход секреции медиатора оценивали при помощи метода деконволюции, используя усредненные ТКП и МТКП (см. Объект и методы исследования).

Наш анализ позволил обнаружить, что временной ход секреции медиатора в случае многоквантового ТКП в контроле представлен двумя экспоненциальными компонентами [Bukharaeva et al., 1999], постоянные времени спада, которых равны $0,18 \pm 0,04$ и $1,02 \pm 0,11$ мс, соответственно ($n=6$). Отношение амплитуд этих двух компонентов (A_1/A_2) составило в контроле 1.27 ± 0.25 ($n=6$). В низких концентрациях H_2O_2 (3 мкМоль/л), не влияла на временной ход секреции медиатора, что согласовалось с отсутствием эффекта H_2O_2 на длительность ТКП, показанным выше. Аппликация высоких (300 мкМоль/л) концентраций H_2O_2 не приводила к изменению быстрой компоненты постоянной времени спада ТКП ($0,18 \pm 0,05$ мс; $P > 0,05$; $n=6$) и отношения амплитуд этих двух компонентов A_1/A_2 . Тсм не

менее, медленная компонента постоянной времени спада ТКП была значительно затянута ($1,34 \pm 0,13$ мс; $P < 0,05$; $n=6$), что могло объяснять замедление временного хода секреции медиатора в случае многоквантового ТКП при действии высоких концентраций H_2O_2 .

Таким образом, можно предположить, что высокие концентрации H_2O_2 влияют на временной ход процесса секреции медиатора вероятней всего, увеличивая степень его асинхронности.

Эффект H_2O_2 на пресинаптические Ca^{2+} токи *

Регистрацию периневральных кальциевых (Ca^{2+}) токов проводили по методике описанной [Redman&Silinsky, 1995]. При использовании этого метода регистрируется двухфазный ответ, где отрицательная фаза представляет Na^+ ток потенциала действия, а положительная фаза - Ca^{2+} -компонент. В контроле Ca^{2+} компонент, характеризовался постоянной времени спада равной $1,33 \pm 17$ мс ($n=7$). H_2O_2 в концентрации 3 мкМоль/л никак не влияла на параметры Na^+ и Ca^{2+} фазы регистрируемого ответа. В высоких концентрациях (300 мкМоль/л) H_2O_2 так же не приводила к изменению амплитудно-временных параметров Na^+ фазы. Но при этом наблюдалось увеличение длительности Ca^{2+} тока на $37 \pm 7\%$ ($P < 0,05$; $n=6$).

Отсутствие эффекта низких концентрации H_2O_2 на Ca^{2+} компонент регистрируемого ответа говорит о том, что увеличение амплитуды ТКП, под действием H_2O_2 обуславливалось процессами протекающими на этапе последующем за входом ионов кальция в нервную терминаль [Hilfiker&Augustine, 1999]. В случае высоких концентраций H_2O_2 , увеличение времени входа ионов Ca^{2+} в терминаль двигательного нерва, может приводить к росту асинхронности процесса секреции медиатора, что в свою очередь приведет к изменению временных параметров ТКП показанному выше.

Эффект H_2O_2 при уменьшении внеклеточной концентрации Ca^{2+}

На многих экспериментальных моделях было показано, что эффекты H_2O_2 являются зависимыми от концентрации ионов Ca^{2+} [Lee et al, 2000; Oh et al, 2000]. Для понимания роли Ca^{2+} в модулирующих эффектах H_2O_2 на параметры синаптических токов, мы провели эксперименты с использованием модифицированного раствора Рингера с уменьшенной концентрацией ионов Ca^{2+} и содержащим ионы Mg^{2+} (см. Объект и методы исследования). H_2O_2 , как в низкой (3 мкМоль/л), так и высокой (300 мкМоль/л) концентрации, не приводила к соответствующим изменениям амплитуды ТКП наблюдаемым ранее в условиях высокой концентрации ионов Ca^{2+} .

* Данная часть работы выполнена совместно со старшим преподавателем кафедры нормальной физиологии КГМУ Гришиным С.Н.

Таким образом, эффект H_2O_2 та параметры ТКП, является зависимым от внеклеточной концентрации ионов кальция.

Влияние Fe^{2+} на эффект H_2O_2

Во многих случаях эффекты H_2O_2 в биологических системах связаны с образованием $\text{OH}\cdot$ [Winterbourn, 1995]. Известно, что в присутствии ионов двухвалентного железа (Fe^{2+}), H_2O_2 легко преобразуется до этой высоко реактивной АФК [Kress et al., 2002]. Для ответа на вопрос, не опосредуются ли обнаруженные эффекты H_2O_2 образованием $\text{OH}\cdot$, мы провели эксперименты с FeSO_4 .

Апликация FeSO_4 (100 мкМоль/л) приводила к понижению амплитуды ТКП на $25\pm 5\%$ ($P < 0,05$; $n=10$). На фоне действия Fe^{2+} H_2O_2 в концентрации 3 мкМоль/л приводила к обратимому увеличению амплитуды ТКП ($26\pm 5\%$; $P < 0,05$; $n=5$) что и в контроле. Однако эффект высоких концентраций H_2O_2 (300 мкМоль/л) на параметры ТКП, в присутствии Fe^{2+} , был выражен гораздо сильнее. Наблюдалось сильное снижение амплитуды ТКП на $71\pm 4\%$ ($P < 0,001$; $n=6$) по сравнению с $25\pm 4\%$ в контроле ($P < 0,01$)

Полученные данные говорят о том, что эффект повышения амплитуды ТКП при действии низких концентраций H_2O_2 , по видимому, основан на непосредственном участии H_2O_2 как таковой, тогда как потенцирующее действие ионов Fe^{2+} на пероксид-вызванное угнетение ТКП связано с $\text{OH}\cdot$ образуемым в ходе Fenton реакции [Winterbourn, 1995]

Влияние антиоксидантов на эффект H_2O_2

Далее нами было исследовано действие H_2O_2 в присутствии ряда неспецифических и специфических антиоксидантов. N-ацетилцистеин (НАС) - неспецифический антиоксидант [Reid et al., 1994] в концентрации 100 мкМоль/л приводил к увеличению амплитуды ТКП на $40\pm 6\%$ ($P < 0,05$; $n=10$). Оказалось что на фоне действия НАС H_2O_2 , как в низкой (3 мкМоль/л), так и в высокой (300 мкМоль/л) концентрации, не приводила к изменению параметров ТКП наблюдаемым в контроле.

Пировиноградная кислота является более специфическим антиоксидантом, который непосредственно связывает H_2O_2 [Gyulkhandanyan et al., 2003; Mallet&Sun, 2003]. Пировиноградная кислота (100 мкМоль/л) увеличивала амплитуду ТКП до $155\pm 6\%$ ($P < 0,05$, $n=5$). Исследование эффектов, как низкой (3 мкМоль/л), так и высокой (300 мкМоль/л) концентраций H_2O_2 на фоне действия пировиноградной кислоты, показало, что никаких достоверных изменений параметров ТКП наблюдаемых в контроле не происходит.

Каталаза – природный фермент, который специфически разрушает H_2O_2 [Muttant&Reid, 2001], в концентрации 1200 Ед·мл⁻¹ приводила к увеличению амплитуды

ТКП до $141 \pm 6\%$ ($P < 0,05$; $n=6$). Последующая ко-апликация H_2O_2 , как в низкой (3 мкМоль/л), так и в высокой (300 мкМоль/л) концентрации, не приводила к достоверному изменению параметров ТКП наблюдаемому в контроле, что согласовалось с селективной активностью данного фермента по отношению к H_2O_2 .

Полученные данные говорят о специфическом участии H_2O_2 и/или $OH\cdot$ в эффектах как низкой, так и высокой концентраций H_2O_2 на синаптическую передачу.

Роль протеникиназы С в механизме действия H_2O_2

Известно, что во многих типах клеток, эффекты H_2O_2 реализуются через протеинкиназу С (ПКС) [Konishi et al., 1997; Servitja et al., 2000]. Для исследования механизма действия H_2O_2 на процесс синаптического проведения возбуждения, мы протестировали возможное участие этого фермента в реализации эффекта H_2O_2 на параметры ТКП.

Оказалось, что H_2O_2 , как в низкой (3 мкМоль/л), так и высокой (300 мкМоль/л) концентрации на фоне действия, как неспецифического ингибитора протеинкиназ клетки - стауроспорина (500 нМоль/л) [Khigou et al., 1998], так и специфического ингибитора ПКС - хеллеритрин хлорида (10 мкМоль/л) [Samanta S, et al., 1998], не влияла на амплитудно-временные параметры ТКП (Рис. 3 А,Б).

Таким образом эффекты, как низких, так и высоких концентраций H_2O_2 , связаны с протеинкиназой С.

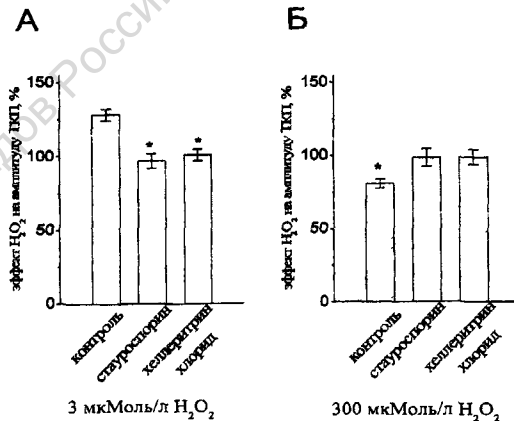


Рис. 3. Исследование роли ПКС в эффектах H_2O_2 .

А - гистограммы, демонстрируют эффект H_2O_2 (3 мкМоль/л) на амплитуду ТКП в контроле (* $P < 0,05$; $n=5$), в присутствии стауроспорина (500 нМоль/л) ($P > 0,05$; $n=5$), хеллеритрин хлорида (10 мкМоль/л) ($P > 0,05$; $n=5$). Б - те же самые данные для H_2O_2 (300 мкМоль/л) ($n=4-7$)

Влияние антиоксидантов на эффект экзогенной АТФ

Известно, что АТФ может стимулировать образование АФК в глиальных клетках [Auld&Robitaille, 1995]. Поэтому, в следующей серии экспериментов, мы исследовали действие экзогенной АТФ в присутствии антиоксидантов, которые эффективно устраняют эффекты H_2O_2 . В контрольных экспериментах АТФ в концентрации 100 мкМоль/л снижала амплитуду ТКП до $66 \pm 1\%$ ($P < 0,01$, $n=11$). В первую очередь мы проверили эффект АТФ в присутствии NAC. Оказалось, что в присутствии NAC (1 мМоль/л) АТФ снижала амплитуду ТКП лишь до $90 \pm 2\%$ ($P < 0,05$; $n=7$), что было значительно ниже эффекта пурина в контроле. Эффект АТФ в присутствии пировиноградной кислоты был так же ослаблен, по сравнению с контролем ($85 \pm 3\%$, $P < 0,05$; $n=4$). Аналогично действию NAC и пировиноградной кислоты, каталаза существенно подавляла эффект внеклеточной АТФ. Амплитуда ТКП, после аппликации АТФ на фоне каталазы, составляла $82 \pm 4\%$ от контрольных значений ($P=0,02$; $n=7$).

Исходя из того, что все используемые антиоксиданты только частично ослабляют действие АТФ и полностью предотвращают эффекты H_2O_2 , полученные данные говорят о том, что действие АТФ может реализоваться, как по H_2O_2 – зависимому, так и по H_2O_2 - независимому механизмам. При этом речь идет об эндогенной H_2O_2 , образуемой в исследуемом препарате. Так как каталаза не способна проникать через мембрану клетки, основываясь на полученных результатах, можно предположить, что место образования эндогенной H_2O_2 расположено вблизи терминали двигательного нерва.

Определение подтипа рецепторов АТФ вовлеченных в процесс образование H_2O_2

Другой важный вопрос заключается в том, какой подтип рецепторов к АТФ отвечает за активацию процессов образования H_2O_2 при действии АТФ? Ранее было показано, что пресинаптическое действие АТФ устраняется антагонистом P2 рецепторов широкого спектра сурамином [Giniatullin&Sokolova, 1998], но не антагонистом ионотропных (P2X) рецепторов PPADS [Соколова, 1999]. Так же известно, что аденозиндифосфорная кислота (АДФ) и уридинтрифосфорная кислота (УТФ), агонисты метаботропных P2Y_{1,12,13} и P2Y_{2,4,6} рецепторов соответственно, повторяют действие АТФ, снижая амплитуду ТКП (Sokolova et al., 2003).

Для дальнейшего определения подтипа рецептора, мы провели эксперименты с более специфическим агонистом P2Y₁, P2Y₁₂ и P2Y₁₃ рецепторов 2-(метилтио) аденозин 5-дифосфатом (2-месАДФ) [Ralevic&Burnstock, 1998; Zhang et al., 2002]. 2-месАДФ в концентрации 10 мкМоль/л снижал амплитуду ТКП до $50 \pm 7\%$ ($P < 0,05$; $n=6$), что говорило о присутствии P2Y₁, P2Y₁₂ или P2Y₁₃ рецепторов в нервно-мышечном синапсе [Cheung et al.,

2003]. Для проверки участия P2Y₁ рецепторов, мы исследовали действие АТФ в присутствии MRS-2179, специфического антагониста этого подтипа рецепторов [Zhang et al., 2002]. Однако, MRS-2179 (10 мкМоль/л) не влиял на эффект АТФ, свидетельствуя о том, что P2Y₁ рецепторы, которые связаны с коклюш токсин (РТХ) - нечувствительными G_q белками [Ralevic&Burnstock, 1998], не вовлечены в негативный пресинаптический эффект АТФ. Проведенные эксперименты указывали на то, что эффект АТФ может опосредоваться как P2Y₁₂, так и P2Y₁₃ подтипом рецепторов связанных с РТХ-чувствительными G_{i/o} белками [Wirkner et al., 2004].

Исследование процессов образования эндогенной H₂O₂

Роль пуриновых рецепторов в процессе образования H₂O₂ и количественной оценкой этого процесса в мышечной ткани, была исследована при помощи спектрофотометрического метода (см. Объект и методы исследования). Было показано, что АТФ (100 мкМоль/л) приводит к увеличению количества H₂O₂ в исследуемом препарате примерно в четыре раза (P<0,001; n=12) (Рис. 4Б). Причем этот эффект устранялся - сурамином (100 мкМоль/л) (P>0,05; n=4; Рис. 4Б). Количество эндогенно образуемой H₂O₂, зависело от используемой концентрации АТФ. Данная зависимость показана на Рис. 4А. Значение коэффициента ЕС₅₀ (28 мкМоль/л) для этого эффекта, было близко к величине коэффициента, полученного из концентрационной зависимости эффекта АТФ на ТКП [56 мкМоль/л, Sokolova et al., 2003]. Эффект увеличения количества эндогенной H₂O₂, так же наблюдался при использовании 2-месАДФ (10 мкМоль/л) (P<0,01; n=4; Рис. 4Б). Ранее было показано, что РТХ - блокатор G_{i/o} белков связанных с некоторыми типами P2Y рецепторов, устраняет эффект АТФ на секрецию медиатора [Sokolova et al., 2003]. Предварительная выдержка мышцы в растворе Рингера, содержащем этот токсин, приводила к выраженному снижению образования H₂O₂ при действии АТФ (P>0,05; n=4; Рис. 4Б).

Для визуализации мест образования H₂O₂ в области нервно-мышечного синапса нами был использован метод флуоресцентной микроскопии с применением чувствительного к эндогенным АФК красителя 5-(и 6)-карбоксит-2',7'-дихлородигидрофлуоресцина диацетата (DCF) (см. Объект и методы исследования). После аппликации АТФ (100 мкМоль/л) наблюдалось гомогенное увеличение (42±4%, P<0,05; n=7) интенсивности флуоресценции мышечных волокон (Рис. 4 В,Г). При использовании УТФ (100 мкМоль/л) (P>0,05; n=4; Рис. 4Г) этот эффект не наблюдался, но проявлялся при использовании АДФ (100 мкМоль/л) (P<0,05; n=4; Рис. 4Г), что согласовалось с данными, полученными ранее. Используемый ранее антагонист P2Y₁ рецепторов MRS-2179 (10 мкМоль/л) не влиял на эффект АДФ (P>0,05; n=4; Рис. 4Г).

Полученный результат, как и данные полученные ранее, свидетельствовал о том, что образование эндогенных АФК (H_2O_2) связано с активацией P2Y рецепторов предположительно P2Y₁₂ и/или P2Y₁₃ подтипов связанных с RTX-чувствительными G_υ белками.

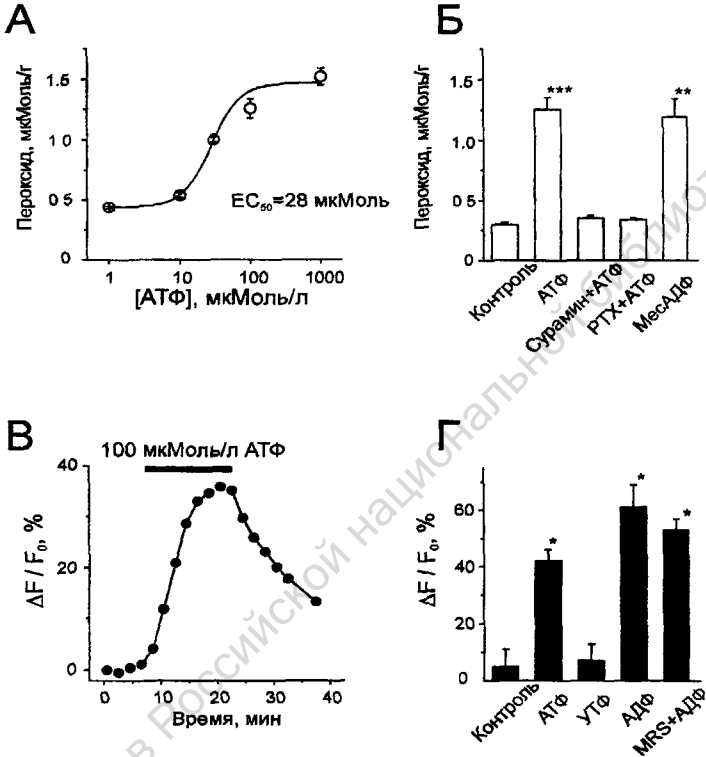


Рис.4. АТФ вызывает увеличение образования перекиси водорода в нервно-мышечном препарате А - кривая дозо-зависимости эффекта АТФ на процесс образования H_2O_2 полученная при помощи FOX метода ($n=4-8$ мышечных препаратов). Б - уровень H_2O_2 в контрольных мышечных препаратах (контроль; $n=8$) и в препаратах выдержанных в растворе Рингера содержащим АТФ (100 мкМоль/л) (15 мин; $n=12$), АТФ (100 мкМоль/л) в присутствии сурамина (100 мкМоль/л) ($n=4$), АТФ (100 мкМоль/л) после инкубации нервно-мышечных препаратов в $1 \text{ мкг} \cdot \text{мл}^{-1}$ РТХ (18 ч; $n=4$), 2-месАДФ (10 мкМоль/л) ($n=4$). В - временной ход действия АТФ на интенсивность АФК-чувствительного флуоресцентного зонда DCF в мышечных волокнах. Г - усредненные данные по изменению интенсивности флуоресценции мышечных волокон в контроле (15 мин без АТФ, $n=4$) и в присутствии АТФ (100 мкМоль/л) ($n=7$), УТФ (100 мкМоль/л) ($n=4$), АДФ (100 мкМоль/л) ($n=4$), АДФ (100 мкМоль/л) после инкубации нервно-мышечных препаратов с MRS-2179 (10 мкМоль/л) ($n=4$) Данные представлены как $\Delta F / F_0 \times 100\%$ (см Объект и методы исследования)

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Нами показано, что H_2O_2 может играть роль пресинаптического модулятора процесса секреции медиатора в нервно-мышечном соединении по ретроградному типу [Giniatullin & Giniatullin, 2003]. Эффекты H_2O_2 , преимущественно реализуются через систему протеинкиназы С и являются кальций-зависимыми.

H_2O_2 образуется в области нервно-мышечного синапса (преимущественно в мышечных волокнах) и этот процесс контролируется внеклеточной АТФ, высвобождаемой вместе с ацетилхолином из двигательного нервного окончания, посредством активации P2Y рецепторов, предположительно P2Y_{12,13} подтипами связанных с РТХ-чувствительными G_{1/0} белками.

Так как изменения амплитудно-временных параметров синаптических токов наблюдались нами при использовании сравнительно низких концентраций H_2O_2 , то можно говорить о том, что процесс модуляции нервно-мышечной передачи H_2O_2 может иметь место при физиологических состояниях *in vivo*.

ВЫВОДЫ

1. При нормальной внеклеточной концентрации ионов Ca^{2+} (1,8 мМоль/л) H_2O_2 в низких (3 мкМоль/л) концентрациях вызывает увеличение амплитуды тока концевой пластинки (ТКП). Тогда как при высоких (300 мкМоль/л) концентрациях H_2O_2 вызывает снижение амплитуды и увеличение длительности ТКП. Изменение амплитуды ТКП на фоне H_2O_2 связано с изменением квантового состава секреции медиатора.
2. H_2O_2 не влияет на амплитудно-временные параметры миниатюрных токов концевой пластинки (МТКП). Это говорит о том, что H_2O_2 действует на пресинаптическую терминаль двигательного нерва и ее эффекты связаны с изменением уровня секреции медиатора из нервного окончания.
3. В экспериментах с применением высокочастотной стимуляции двигательного нерва (двадцать стимулов, генерируемых с частотой 60 Гц) H_2O_2 , как в низкой, так и в высокой концентрации, приводит к увеличению выраженности облегчения и снижению выраженности депрессии амплитуды ТКП.
4. H_2O_2 в низкой концентрации не влияет на амплитудно-временные параметры двухфазного периневрально отведенного сигнала. В высокой концентрации H_2O_2 увеличивает длительность третьей фазы (Ca^{2+} -опосредованный компонент), что свидетельствует об увеличении длительности Ca^{2+} тока.

5. При уменьшении внеклеточной концентрации ионов Ca^{2+} (0,9 мМоль/л) H_2O_2 , как в низкой, так и в высокой концентрации, не влияет на амплитудно-временные параметры ТКП. Это свидетельствует о том, что эффект H_2O_2 в нервно-мышечном синапсе является кальций зависимым.

6. На фоне действия антиоксидантов (N-ацетилцистеин – 100мкМоль/л и 1мМоль/л; пировиноградная кислота – 100мкМоль/л; каталаза – 1200Ед*мл⁻¹), наблюдается устранение эффекта как низкой, так и высокой концентрации H_2O_2 .

7. Предварительная аппликация прооксиданта (Fe_2SO_4 – 100мкМоль/л) приводит к усилению эффекта высокой концентрации H_2O_2 . Это можно объяснить тем, что взаимодействие ионов двухвалентного железа с H_2O_2 приводит к образованию гидроксил радикала, которым частично может определяться эффект высокой концентрации H_2O_2 в нервно-мышечном синапсе.

8. На фоне аппликации не специфического (стауроспорин – 500пМоль/л) и специфического (хеллеритрин хлорид – 10мкМоль/л) ингибитора протеинкиназы С наблюдается устранение эффектов как низких, так и высоких концентраций H_2O_2 . Это говорит о том, что эффекты H_2O_2 преимущественно связаны с системой протеинкиназы С.

9. Экзогенная АТФ (100мкМоль/л) оказывает угнетающее влияние на нервно-мышечную передачу, снижая амплитуду ТКП. На фоне действия антиоксидантов (N-ацетилцистеин – 100мкМоль/л и 1мМоль/л; пировиноградная кислота – 100мкМоль/л, каталаза – 1200Ед*мл⁻¹), эффект внеклеточной АТФ ослабевает, а на фоне действия прооксиданта (Fe_2SO_4 – 100мкМоль/л) усиливается, свидетельствуя о том, что эффект внеклеточной АТФ частично связан с образованием АФК (H_2O_2).

10. Экзогенная АТФ (100мкМоль/л) приводит к увеличению концентрации H_2O_2 в мышечном препарате (FOX-метод).

11. Экзогенная АТФ (100мкМоль/л) вызывает резкое усиление свечения мышечных волокон (специфический АФК - чувствительный флуоресцентный зонд DCF (10мкМоль/л)). Это говорит об активирующем влиянии АТФ на процессы образования АФК в области нервно-мышечного синапса.

12. Процесс образования АФК связан с P2Y рецепторами предположительно P2Y_{12,13} подтипами, связанными с РГХ-чувствительными G_v белками. Об этом свидетельствует то, что: а) АДФ (100мкМоль/л) и 2-месАДФ (10мкМоль/л) - агонисты метаботропных P2Y_{1,12,13} рецепторов повторяют эффект АТФ на уровень АФК в исследуемой мышечной ткани, тогда как УТФ (100мкМоль/л) - агонист метаботропных P2Y_{2,4,6} рецепторов на это не влияет; б) MRS-2179 (10мкМоль/л) - специфический антагонист P2Y₁ подтипа рецепторов не устраняет

эффект АДФ (100мкМоль/л); в) коклюшный токсин (РТХ) ($1 \text{ мкг} \cdot \text{мл}^{-1}$) устраняет этот эффект.

13. Таким образом, перекись водорода является пресинаптическим модулятором нервно-мышечной передачи возбуждения, осуществляющим постоянный контроль уровня секреции медиатора из двигательного нервного окончания. Образование эндогенной перекиси водорода в области нервно-мышечного синапса может модулироваться внеклеточной АТФ, высвобождаемой в месте с ацетилхолином из двигательного нервного окончания, посредством активации P2Y рецепторов.

Список опубликованных работ по теме диссертации

- Giniatullin A.R. Dual action of hydrogen peroxide on synaptic transmission at the frog neuromuscular junction / Giniatullin R A // *J Physiol*, 552.1, 2003 - P.283-293.
- Гиниатуллин А.Р. Изменение кинетики кальций – активируемых калиевых и кальциевых каналов как механизм модуляции асинхронности секреции медиатора при действии H_2O_2 / Ситдикова Г.Ф., Гиниатуллин Р.А., Зефирова А.Л. // *Российский Физиологический Журнал им. И.М. Сеченова Russian Journal of Physiology (formerly I.M. Sechenov Physiological Journal)*, Т 90, № 8, 2004 - С 148
- S Grishin, A.R. Mechanisms of ATP action on motor nerve terminals at the frog neuromuscular junction / Shakirzyanova, A.V. Giniatullin, A.R., Afzalov R.M. and Giniatullin R.A. // *Eur J of Neuroscience* 21, 2005 - P.1271-1279.
- Giniatullin A.R. Reactive oxygen species contribute to the presynaptic action of extracellular ATP at the frog neuromuscular junction / Grishin S.N., Sharifullina E.R., Petrov A.M., Zefirov A.L. and Giniatullin R.A. // *J Physiol* 565.1, 2005. - P.229-242.
- Гиниатуллин А.Р. Влияние перекиси водорода на процесс высвобождения медиатора в нервно-мышечном синапсе холоднокровных / Анучин А.А. // *Журнал Российского Государственного Медицинского Университета (Материалы Пироговской студенческой научной конференции)*, №2(28), 2003 - С.156.
- Анучин А.А. Перекись водорода влияет на асинхронность высвобождения медиатора в нервно-мышечном синапсе холоднокровных / Гиниатуллин А.Р. // *Материалы 7-ой Пушкинской школы-конференции молодых ученых*, Пушкино, 2003. - С.8.
- Гиниатуллин А.Р. Модулирующие эффекты перекиси водорода на функционирование нервно-мышечного синапса / Гиниатуллин Р.А. // *Материалы 7-ой Пушкинской школы-конференции молодых ученых*, Пушкино, 2003. - С.15
- Гиниатуллин А.Р. Перекись водорода – модулятор процесс секреции нейротрансмиттера Периферический синапс / Анучин А.А., Ситдикова Г.Ф., Гиниатуллин Р.А., Зефирова А.Л. // *Фундаментальные и клинические аспекты интегративной деятельности мозга Материалы Международных чтений, посвященных 100-летию со дня рождения члена-корреспондента АН СССР, академика АН АрмССР Эзраса Астратовича Асратяна*, Москва, 2003. - С.67-69
- Гиниатуллин А.Р. Функционирование нервно-мышечного синапса: перекись водорода как модулятор синаптического проведения возбуждения / Анучин А.А., Ситдикова Г.Ф., Гиниатуллин Р.А., Зефирова А.Л. // *Материалы международной конференции "Рецепция и внутриклеточная сигнализация"* Пушкино, 2003 - С.149-151.

- 10 Гиниатуллин А Р Перекись водорода: модулятор процесса секреции нейротрансмиттера Периферический синапс / Ситдикова Г.Ф., Гиниатуллин Р А, Зефирова А.Л // Тезисы докладов VIII научно-практической конференции молодых ученых, Казань, 2003. - С 21.
- 11 Giniatullin A R Long-lasting action of hydrogen peroxide on the functional properties of motoneuron endings / Sitdikova G F, Giniatullin R A, Zefirov A L // International symposium "Neuron Differentiation and Plasticity Regulation by Intercellular Signals", Moscow, 2003 - P.63-64
- 12 Гиниатуллин А Р Перекись водорода: модулятор процесс секреции нейротрансмиттера в периферическом синапсе / Анучин А.А., Зефирова А.Л // Сборник тезисов докладов всероссийской конференции посвященной 100-летию со дня рождения О.Д. Курмаева "Нейрогуморальные механизмы регуляции сердца", Казань, 2004 - С.39-40
- 13 Гиниатуллин А Р Изменение кинетики кальциевых и кальций – активируемых каналов как механизм модуляции асинхронности секреции медиатора при действии H₂O₂ // IX всероссийская научно-практическая конференция "Молодые ученые в медицине" тезисы докладов, Казань, 2004 - С.123
- 14 Архипова О В Роль метаболитов арахидоновой кислоты в эффектах перекиси водорода на вызванную секрецию медиатора в нервно-мышечном синапсе лягушки / Гиниатуллин А Р // Материалы VII Всероссийского симпозиума и школы молодых ученых, учителей (Растущий организм адаптация к учебной и физической нагрузке) Набережные Челны, 2004. - С 16-17.
- 15 Giniatullin A R Dual action of hydrogen peroxide on synaptic transmission at the frog neuromuscular junction / Sitdikova G F, Giniatullin R A, Zefirov A L // International symposium "Biological motility", Pushchino, 2004. - P.29-31
- 16 Гиниатуллин А Р. Эффект перекиси водорода на асинхронность процесса секреции медиатора в нервно-мышечном синапсе холоднокровных / Ситдикова Г.Ф., Гиниатуллин Р.А., Зефирова А.Л // Материалы III съезда биофизиков России Воронеж, 2004 - С 201-202
- 17 Giniatullin A R. Long-lasting action of hydrogen peroxide on the functional properties of motoneuron endings / Sitdikova G F., Zefirov A L, Giniatullin R.A // International workshop in cell physiology "Transport mechanisms across cell membrane channels and pumps", St. Petersburg, 2004. - P 31.
- 18 Giniatullin R.A Two-component action of ATP on transmitter release from the motor nerve endings at the neuromuscular junction / Grishin S.N, Giniatullin A R. // Conferences en Neurobiologie Ladislav Tauc "The world of the synapse: molecular basis pathologies and drug discovery", France, 2004 - P 46
- 19 Гиниатуллин А.Р. Пуринергическая система контроля секреции медиатора из двигательного нервного окончания и образование активных форм кислорода (АФК) в системе нервно-мышечного синапса лягушки / Петров А.М., Гиниатуллин Р.А., Зефирова А.Л // Тезисы докладов и стендовых сообщений научной конференции "Нейрохимия: фундаментальные и прикладные аспекты", Москва, 2005 - С 51
- 20 Гиниатуллин А Р Участие активных форм кислорода в пуринергической системе контроля секреции медиатора из двигательного нервного окончания лягушки / Петров А М, Гиниатуллин Р А, Зефирова А Л // Материалы международной конференции "Рецепция и внутриклеточная сигнализация", Пущино. 2005 - С.173-175.
- 21 Гиниатуллин А Р Активные формы кислорода (АФК) и пуринергический контроль секреции медиатора из двигательного нервного окончания лягушки / Петров А.М., Гиниатуллин Р.А., Зефирова А.Л // Бюллетень Сибирской медицины, Том 4, приложение 1, Томск, 2005. - С 26.

Из фондов Российской национальной библиотеки

Из фондов Российской национальной библиотеки

Отпечатано в ООО «Печатный двор».
г. Казань, ул. Журналистов, 1/16, оф.207
Тел: 272-74-59, 541-76-41, 541-76-51.
Лицензия ПД №7-0215 от 01.11.2001 г.
Выдана Поволжским межрегиональным
территориальным управлением МПТР РФ.
Подписано в печать 21.12.2005 г. Усл. п.л 1,19.
Заказ № К-3871. Тираж 100 экз. Формат 60x84 1/16.
Бумага офсетная. Печать - ризография.

2006A

1248

№ - 1248

Из фондов Российской национальной библиотеки