

## ЛИТЕРАТУРА

1. *Cunha R., Burnstock G., Arnett T.R., Orriss I.R.* // *Purinergic Signal*. 2013. 9(4): 541-72.
2. *Cunha R.A.* // *J. Neurochem*. 2016. 139(6): 1019-55.
3. *Guarracino J.F., Cinalli A.R., Fernández V. et al.* // *Neurosci*. 2016. 326: 31-44.
4. *Miteva A.S., Gaydukov A.E., Shestopalov V.I., Balezina O.P.* // *Purinergic Signal*. 2018. 14(4): 459-69.
5. *Dahl G.* // *Philos. Trans. R. Soc. B: Biol. Sci*. 2015. 370(1672): 20140191.
6. *Riquelme M.A., Cea L.A., Vega J.L. et al.* // *Neuropharmacol*. 2013. 75: 594-603.
7. *Cea L.A., Riquelme M.A., Vargas A.A. et al.* // *Front. Physiol*. 2014. 5: 139.
8. *Wei Z.-Y., Qu H.-L., Dai Y.-J. et al.* // *Neural Regen. Res*. 2021. 16(5): 899-904.
9. *Miteva A.S., Gaydukov A.E., Shestopalov V.I., Balezina O.P.* // *Biochem. Moscow Suppl. Ser. A Membr. Cell Biol*. 2017. 11: 311-20.
10. *Miteva A.S., Gaydukov A.E., Balezina O.P.* // *Biochem. Moscow Suppl. Ser. A Membr. Cell Biol*. 2021. 15: 378-86.
11. *Hasuzawa N., Moriyama S., Moriyama Y., Nomura M.* // *Biochem. Biophys. Acta. Biomembr*. 2020. 1862(12): 183408.

## ОСОБЕННОСТИ МЕХАНИЗМА РЕГУЛЯЦИИ НЕРВНО-МЫШЕЧНОЙ ПЕРЕДАЧИ ПРОДОМЕНОМ BDNF В МОТОРНЫХ СИНАПСАХ МЫШИ

*Гайдуков А.Е., Молчанова А.И.*

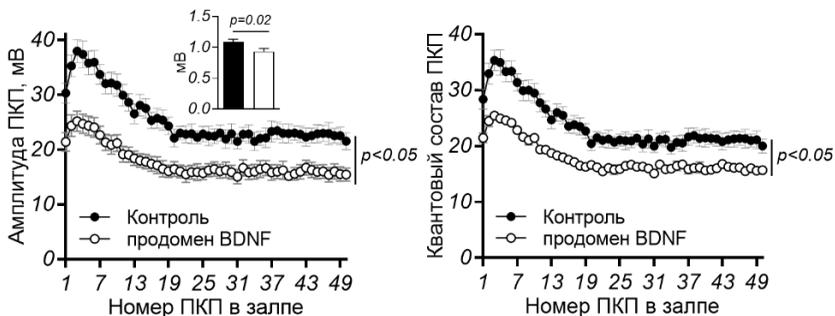
Московский Государственный Университет имени М.В. Ломоносова,  
биологический факультет, Москва, Россия

**Введение.** Нейротрофин мозга (BDNF) – хорошо известный регулятор нейрогенеза модулятор передачи сигнала в синапсах ЦНС. Наличие BDNF и рецепторов (TrkB и p75), на которые нейротрофин может принципиально действовать, было выявлено во всех компонентах моторных синапсов млекопитающих [1]. BDNF считается одним из главных миокинов, который способен высвобождаться из мышечных волокон как ретроградный мессенджер [2]. Синаптические эффекты BDNF не могут трактоваться однозначно без учета возможного одновременного действия побочного продукта его созревания из проBDNF – продомена BDNF, чья сигнальная роль которого практически не изучена в моторных синапсах. В ЦНС продомен BDNF может играть независимую регуляторную роль, влияя на проявления долговременной синаптической пластичности [3]. Мы установили, что продомен BDNF оказывает действие, полностью противоположное эффектам зрелого нейротрофина – снижает частоту и уменьшает амплитуду одноквантовых миниатюрных потенциалов концевой пластинки (МПКП), а также снижает амплитуду и квантовый состав многоквантовых ПКП в коротких ритмических залпах.

Тормозное действие продомена BDNF реализуется за счет  $\rho 75$ -опосредуемого запуска Rho-киназного сигнального каскада, направленного на стимулирование калиевых каналов GIRK [4]. Активация GIRK требует взаимодействия  $\beta\gamma$ -субъединиц  $G_i$ -белков с этими каналами. В моторных синапсах млекопитающих присутствует целый ансамбль пресинаптических метаботропных рецепторов, сопряженных с  $G_i$ -белками – мускариновых M2-рецепторов, аденозиновых  $A_1$ -рецепторов и P2Y<sub>13</sub>-пуринорецепторов. Необходимо было установить, какие именно из них вовлечены в реализацию тормозного действия продомена BDNF на нервно-мышечную передачу?

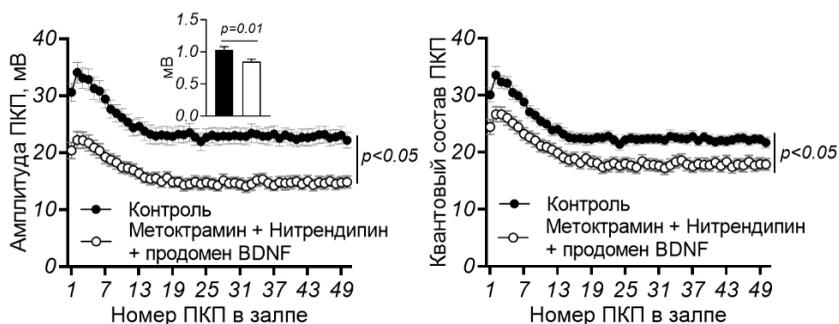
**Методика.** Объектом исследования были нервно-мышечные препараты (*m. diaphragma-n. phrenicus*) диафрагмы взрослых мышей линии C57/Bl6 обоих полов. Регистрацию спонтанной секреции квантов АХ (МПКП) и быстрой синхронной многоквантовой секреции АХ (ПКП) проводили с помощью внутриклеточных микроэлектродов. Перед регистрацией вызванной активности (при стимуляции нерва с частотой 50 Гц в течение 1 с стимулами длительностью 0.08-0.1 мс) для предотвращения сокращения мышечных волокон их частично рассекали. Синаптическую активность регистрировали с использованием усилителя Neuroprobe Amplifier Model 1600 (A-M Systems) и аналого-цифровой преобразователь E-154 (L-Card) с интерфейсом PowerGraph 6.0. Анализ данных проводили в программе MiniAnalysis (Synptosoft) с последующей статистической обработкой в программе GraphPad Prism 8. Не менее трех нервно-мышечных препаратов использовали в каждой серии экспериментов. В контроле регистрировали активность не менее 5 разных синапсов, после чего в перфузионный раствор добавляли определенные фармакологические агенты, и затем регистрировали активность разных синапсов на протяжении 40-60 мин. Анализировали изменения мембранного потенциала мышечных волокон, амплитудно-временные характеристики МПКП и ПКП. С использованием корректировки амплитуд ПКП на нелинейную сумму проводили расчёт квантового состава ПКП. Нормальность распределения значений параметров в выборках оценивали с использованием Д'Агостино-Пирсона. Применяли *t*-критерий Стьюдента при сравнении нормально распределенных величин МПКП и ПКП, в ином случае – критерий Манна-Уитни. Двухфакторный дисперсионный анализ с апостериорным критерием Тьюки применяли при сравнении изменений амплитуд и квантового состава ПКП в коротких залпах. Данные представлены в виде среднего  $\pm$  стандартная ошибка среднего, уровень значимости  $p = 0.05$ .

**Результаты.** В первой серии экспериментов мы подтвердили полученные нами ранее данные [4] о дуальном тормозном действии продомена BDNF (1 нМ) в отношении квантовой секреции АХ в зрелых моторных синапсах мыши – за счет снижения размера квантов АХ (что отражается в сочетанном снижении амплитуд МПКП и ПКП) и уменьшении квантового состава всех ПКП в коротком залпе (рис. 1).



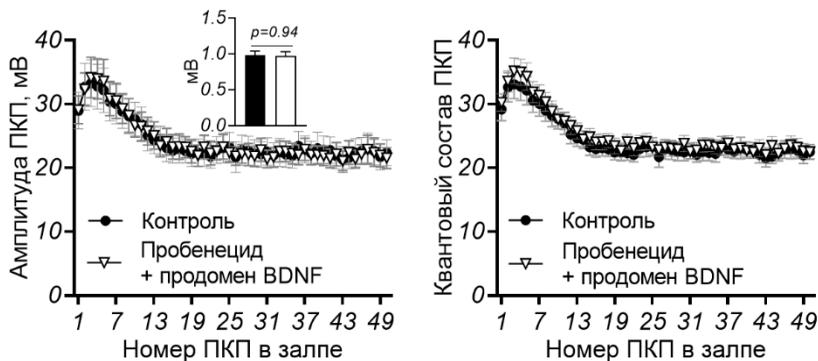
**Рис. 1.** Изменение амплитуд и квантового состава ПКП в контроле ( $n = 16$ ) и под действием продомена BDNF ( $n = 16$ ). На врезке – амплитуды МПКП.

Далее мы проверяли возможную роль активности мускариновых M2-рецепторов в качестве коактиватора GIRK при действии продомена BDNF. Сам по себе ингибитор M2-рецепторов метоктрамин (0.1 мкМ) вызывал равномерное увеличение амплитуд и квантового состава каждого ПКП в залпе, что могло свидетельствовать о вовлечении в регуляцию выброса квантов АХ  $Ca^{2+}$ -каналов L-типа [5]. Действительно, метоктрамин-индуцированное усиление вызванного выброса полностью предотвращалось под действием блокатора этого типа  $Ca^{2+}$ -каналов нитрендипина (1 мкМ), который сам по себе не влияет на амплитуду и квантовый состав ПКП в залпах. В присутствии метоктрамина и нитрендипина продомен BDNF полностью сохранил способность угнетать квантовую секрецию АХ (рис. 2).



**Рис. 2.** Изменение амплитуд и квантового состава ПКП в контроле ( $n = 20$ ) и под действием продомена BDNF в присутствии ингибитора M2-рецепторов метоктрамина (0.1 мкМ) и блокатора L-типа  $Ca^{2+}$ -каналов нитрендипина (1 мкМ) ( $n = 29$ ). На врезке – амплитуды МПКП.

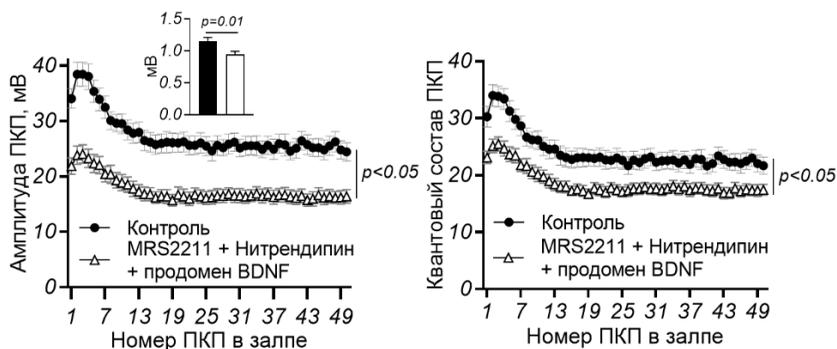
Совокупность полученных данных свидетельствует, во-первых, о том, что мускариновые M2-рецепторы вовлечены в негативную регуляцию активности пресинаптических  $Ca^{2+}$ -каналов L-типа, обеспечивая их «замаскированное» состояние в нормальных условиях работы моторных синапсов, а во-вторых, M2-рецепторы не вовлечены в стимулирование GIRK под действием продомена BDNF. Ранее мы показали, что тормозное влияние на вызванный выброс АХ пуринорецепторов ( $A_1$  и P2Y13) требует функционирования каналов, образованных паннексином 1 (паннексон), в качестве дополнительному к везикулярному источнику синаптической АТФ [6]. Кроме того, в моторных синапсах мышей, нокаутных по гену паннексина1, и имеющих нормальные характеристики квантовой секреции АХ [7], продомен BDNF утрачивал способность ее угнетать [4]. Недавно мы выявили, что фармакологическое блокирование паннексон пробенецидом (1 мМ) не приводит к изменениям вызванной секреции АХ в моторных синапсах мышей дикого типа [7]. Однако, как и в нервно-мышечных синапсах нокаутных по гену паннексина 1 мышей, при заблокированных пробенецидом паннексонах в моторных синапсах мышей дикого типа продомен BDNF перестал уменьшать амплитуды МПКП и ПКП и снижать квантовый состав ПКП в залпах (рис. 3).



**Рис. 3.** Изменение амплитуд и квантового состава ПКП в контроле ( $n = 19$ ) и под действием продомена BDNF в присутствии блокатора паннексина 1 пробенецида (1 мМ) ( $n = 24$ ,  $p > 0.05$ ). На врезке – амплитуды МПКП.

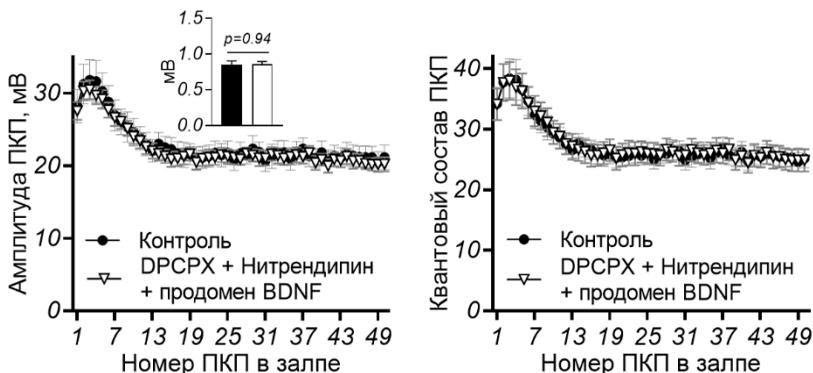
Эти данные говорят о том, что для вовлечения GIRK в регуляцию квантовой секреции АХ в моторных синапсах под действием продомена BDNF необходимо адекватное функционирование компонентов пуринергической модулирующей системы. Оставалось выяснить, эндогенная активация каких пуринорецепторов – P2Y13 или  $A_1$  – в условиях залповой активности моторных синапсов обеспечивает

реализацию тормозного действия продомена BDNF? Нами было установлено ранее, что ингибирование P2Y13-рецепторов MRS2211 (10 мкМ) приводит к равномерному увеличению амплитуд ПКП по всему ходу коротких залпов – за счет возрастания квантового состава ПКП [6]. В ходе настоящего исследования мы установили, что активность P2Y13-рецепторов, как и мускариновых M2-рецепторов, направлена на предотвращение вовлечения в регуляцию квантовой секреции АХ кальциевых каналов L-типа – потенцирующее действие MRS2211 предотвращалось нитрендипином. Однако продомен BDNF при ингибировании P2Y13-рецепторов MRS2211 и заблокированных нитрендипином кальциевых каналов L-типа эффективно проявлял свое тормозное влияние на квантовую секрецию АХ (рис. 4). Таким образом, мы убедились, что, несмотря на присутствие в моторных синапсах мыши P2Y13-рецепторов, их активность и физиологическую значимость как негативных регуляторов выброса АХ, они не сопряжены с активацией GIRK и комплексным торможением секреции АХ под влиянием продомена BDNF.



**Рис. 4.** Изменение амплитуд и квантового состава ПКП в контроле ( $n = 17$ ) и под действием продомена BDNF в присутствии ингибитора P2Y13-рецепторов MRS2211 (10 мкМ) и блокатора L-типа  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов нитрендипина (1 мкМ) ( $n = 19$ ). На врезке – амплитуды МПКП.

Известно, что  $A_1$ -рецепторы, благодаря их активации эндогенным аденозином, тормозят квантовую секрецию АХ и способствуют «маскированию» активности  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов L-типа [5,6]. В данной работе негативное действие продомена BDNF в отношении квантовой секреции АХ полностью предотвращалось при блокировании  $A_1$ -рецепторов DPCPX (100 нМ) в присутствии нитрендипина (1 мкМ) – значения амплитуд МПКП и ПКП и квантового состава ПКП в коротких залпах статистически значимо не отличались от таковых в контроле (рис. 5).



**Рис. 5.** Изменение амплитуд и квантового состава ПКП в контроле ( $n = 16$ ) и под действием продомена BDNF в присутствии ингибитора  $A_1$ -рецепторов DPCPX (100 нМ) и блокатора L-типа  $Ca^{2+}$ -каналов нитрендипина (1 мкМ) ( $n = 22$ ,  $p > 0.05$ ). На врезке – амплитуды МПКП.

**Закключение.** Проведенные нами исследования впервые показали, что эндогенная активация именно пресинаптических аденозиновых  $A_1$ -рецепторов, давно известных в качестве тормозящих секрецию АХ в моторных синапсах млекопитающих, необходима для реализации комплексного механизма торможения секреции АХ под действием продомена BDNF. Предотвращение активации только этих пуринорецепторов – за счет их прямого ингибирования или непрямого снижения их активности (за счет фармакологического или генетического «выключения» паннексинового источника синаптических пуринов) – устраняет негативное влияние продомена BDNF на параметры квантовой секреции АХ в моторных синапсах мыши.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФ в рамках научного проекта 22-25-00111.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Garcia N., Tomàs M., Santafe M.M. et al. // J. Peripher. Nerv. Syst. 2010. 15(1): 40-9.
2. Gaydukov A., Bogacheva P., Tarasova E. et al. // Cells. 201. 8: 762.
3. Kojima M., Matsui K., Mizui T. // Cell Tissue Res. 2019. 377(1): 73-9.
4. Bogacheva P.O., Molchanova A.I., Pravdivceva E.S. et al. // Front. Cell. Neurosci. 2022. 16: 866802.
5. Tarasova E., Miteva A., Gaidukov A., Balezina O. // Biochem. Moscow Suppl. Ser. A Membr. Cell Biol. 2015. 15: 318-28.
6. Miteva A.S., Gaydukov A.E., Shestopalov V.I., Balezina O.P. // Biochem. Moscow Suppl. Ser. A Membr. Cell Biol. 2017. 11: 311-20.
7. Miteva A.S., Gaydukov A.E., Balezina O.P. // Biochem. Moscow Suppl. Ser. A Membr. Cell Biol. 2021. 15: 378-86.