

ПРОДОМЕН BDNF ТОРМОЗИТ КВАНТОВУЮ СЕКРЕЦИЮ МЕДИАТОРА В МОТОРНЫХ СИНАПСАХ МЫШИ ПРИ УЧАСТИИ СОРТИЛИНА И АДЕНОЗИНОВЫХ A₁-РЕЦЕПТОРОВ

© 2024 г. А. И. Молчанова¹, О. П. Балезина¹, А. Е. Гайдуков^{1,*}

¹Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

*E-mail: gaydukov@gmail.com

Поступила в редакцию 30.10.2023 г.

После доработки 29.11.2023 г.

Принята к публикации 05.12.2023 г.

Нейротрофин мозга (BDNF) синтезируется в результате протеолиза пронеиротрофина с образованием зрелого BDNF и продомена. Регуляторное влияние последнего на нервно-мышечную передачу только начинает изучаться. В моторных синапсах продомен BDNF оказывает тормозное действие, стимулируя за счет активации рецепторов р75 калиевые каналы GIRK. Целью данной работы стало продолжение исследования механизма тормозного действия продомена BDNF в зрелых моторных синапсах диафрагмы мыши. С помощью микроэлектродов регистрировали спонтанные (миниатюрные) и вызванные стимуляцией моторных аксонов многоквантовые потенциалы концевой пластинки – МПКП и ПКП соответственно. Используя селективные антагонисты, выявили, что тормозное действие продомена на синаптическую передачу требует участия сортилина, но не TrkB-рецепторов. Стимулирование GIRK, индуцированное продоменом, требует участия синаптических метаболитных рецепторов, обеспечивающих действие на GIRK βγ-субъединиц G_i-белков. При помощи селективных ингибиторов установили, что M2-холинорецепторы и P2Y₁₃-пуринорецепторы негативно регулируют пресинаптические кальциевые каналы L-типа, при этом оба типа рецепторов функционально не связаны с действием продомена BDNF. Оказалось, что для торможения квантовой секреции ацетилхолина в моторных синапсах под влиянием продомена BDNF необходима активность только аденозиновых A₁-рецепторов. Кроме того, в условиях фармакологического блокирования паннексина 1 пробеницидом продомен BDNF утрачивал свое тормозное действие на нервно-мышечную передачу. Таким образом, для осуществления торможения квантовой секреции медиатора под действием продомена BDNF в моторных синапсах мыши требуется участие сортилина и эндогенной активации аденозиновых A₁-рецепторов аденозина, для которой необходимо функционирование паннексина 1, обеспечивающих, вероятнее всего, дополнительный к везикулярному источник синаптической АТФ.

Ключевые слова: нервно-мышечный синапс, продомен BDNF, сортилин, аденозин, A₁-рецепторы, паннексин 1

DOI: 10.31857/S0869813924020045, **EDN:** DJQTRN

ВВЕДЕНИЕ

Нейротрофин мозга (brain-derived neurotrophic factor – BDNF) – один из самых изученных представителей семейства нейротрофинов с широким спектром долговре-

менных и кратковременных (острых) регуляторных функций. Показана его ключевая роль в ходе развития нервной системы, установления, созревания и поддержания синаптических контактов как в центральной нервной системе (ЦНС), так и периферической. Кроме того, BDNF хорошо известен как модулятор нейротрансмиссии в синапсах ЦНС [1]. В последние годы представления о спектре активности этого нейротрофина расширились, когда обнаружилась способность BDNF высвобождаться не только из пресинаптических нервных окончаний и перисинаптических шванновских клеток, но и из волокон скелетной мускулатуры, то есть выступать в роли миокина, ретроградно регулирующего квантовую секрецию ацетилхолина (АХ) в моторных синапсах [2, 3]. Присутствие зрелого BDNF и его рецепторов (TrkB и p75), способных запускать целый комплекс сигнальных путей, было выявлено во всех компонентах моторных синапсов млекопитающих [4]. При этом трактовка синаптических модуляторных воздействий эндогенного BDNF *in vivo* требует учета возможного одновременного действия побочного продукта его созревания из проBDNF – продомена BDNF. Его сигнальная функция только начала изучаться в моторных синапсах [5]. В ЦНС продомен BDNF может играть независимую регуляторную роль, влияя на проявления долговременной синаптической пластичности [6]. Недавно мы установили, что продомен BDNF в наномолярной концентрации оказывает на синаптическую передачу в нервно-мышечных синапсах действие, полностью противоположное эффектам зрелого нейротрофина – снижает частоту одноквантовых миниатюрных потенциалов концевой пластинки (МПКП) и уменьшает амплитуду постсинаптических потенциалов, как миниатюрных, так и многоквантовых ПКП, возникающих в результате быстрой синхронной секреции квантов АХ при приходе пресинаптического потенциала действия. Наряду со снижением амплитуд МПКП и ПКП действие продомена BDNF сопровождается уменьшением квантового состава ПКП [5]. Негативное влияние на частоту МПКП и квантовый состав ПКП, во-первых, свидетельствует о наличии пресинаптической компоненты у тормозного действия продомена BDNF на квантовую секрецию АХ, а, во-вторых, могло быть связано с уменьшением пресинаптического входа ионов Ca^{2+} за счет возрастания активности пресинаптических K^+ -каналов и снижения вероятности открывания потенциал-зависимых Ca^{2+} -каналов. Мы установили, что тормозное действие продомена BDNF на квантовую секрецию АХ реализуется посредством рецепторов p75 и запуска сигнального каскада, направленного на стимулирование G-белок-сцепленных калиевых каналов входящего выпрямления (GIRK) [5]. Рецепторы p75 могут образовывать рецепторные комплексы с сортилином или рецепторами TrkB, обеспечивая развитие сигналинга проBDNF [7, 8]. При этом ничего неизвестно, требуется ли образование таких функциональных комплексов при рецепторном действии продомена BDNF в моторных синапсах. Остается неизученным и другой вопрос – о характере регуляции GIRK в нервно-мышечных синапсах млекопитающих. Дело в том, что GIRK требуют дуальной активации. Во-первых, необходимо взаимодействие GIRK с мембранным фосфолипидом фосфоинозитол-(4,5)-бисфосфатом (PIP_2) – на увеличение его уровня, вероятно, направлен запускаемый продоменом BDNF сигнальный путь с участием ROCK. Во-вторых, с GIRK должны взаимодействовать $\beta\gamma$ -субъединицы G_i-белков [9]. В моторных синапсах млекопитающих наличествует целый ансамбль пресинаптических метаботропных рецепторов, сопряженных с G_i-белками. К числу наиболее вероятных кандидатов на роль регуляторов GIRK можно отнести мускариновые M2-холинорецепторы [10, 11], аденозиновые A₁-рецепторы и P2Y₁₃-пуринорецепторы [12–14]. Необходимо было установить, какие именно из этих метаботропных рецепторов могут быть вовлечены в GIRK-опосредованное тормозное действие продомена BDNF на нервно-мышечную синаптическую передачу. На решение вышеперечисленных вопросов и было направлено настоящее исследование.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объект исследования. Эксперименты были проведены на изолированных нервно-мышечных препаратах диафрагмы взрослых мышей (8–10 недель, масса тела 30–35 г) линии C57BL/6 обоих полов. Мыши были получены из вивария факультета биоинженерии и биоинформатики МГУ (Москва, Россия). Эвтаназия мышей обеспечивалась быстрой декапитацией. В исследовании было использовано 39 животных.

Электрофизиология. Все эксперименты проводили при температуре 20–22°C. Нервно-мышечный препарат левой половины диафрагмы с диафрагмальным нервом помещали в экспериментальную камеру объемом 3 мл и проводили перфузию оксигенированным (95% O₂, 5% CO₂) раствором Лайли (pH 7.2–7.4), содержащим (в mM): NaCl – 135, KCl – 4, NaH₂PO₄ – 0.9, CaCl₂ – 2, MgCl₂ – 1, NaHCO₃ – 16.3, глюкоза – 11 [15]. Регистрацию постсинаптических потенциалов осуществляли с использованием заполненных 2.5 M KCl стеклянных микроэлектродов, изготавливаемых с помощью пуллера MP-500 (RWD Life Sciences, Китай). Сопротивление кончиков микроэлектродов составляло 15–20 МОм. Сигналы регистрировали при помощи усилителя Neuroprobe Amplifier Model 1600 (A-M Systems, США) и записывали с частотой регистрации 10 кГц с использованием аналого-цифрового преобразователя E-154 (L-Card, Россия) с интерфейсом PowerGraph 3.3.8 (ДИСофт, Россия). Для предотвращения сокращения мышцы при стимуляции диафрагмального нерва проводили поперечное рассечение мышечных волокон для стабилизации их мембранного потенциала на сниженном по сравнению с нерассеченными волокнами уровне (менее -50 мВ). Сразу после рассечения препарат промывали в растворе Лайли (> 150 мл) не менее 1 ч, что позволяло предотвратить возможную блокаду проведения потенциалов действия нерва. Далее в одних и тех же нервно-мышечных синапсах осуществляли регистрацию одноквантовых МПКП и вызванных стимуляцией нерва многоквантовых ПКП. Сначала производили регистрацию МПКП в течение 80–100 с, далее стимулировали диафрагмальный нерв короткими залпами сверхпороговых импульсов (50 стимулов длительностью 0.08–0.1 мс с частотой 50 Гц) и в том же синапсе регистрировали ПКП. Среднее значение амплитуд МПКП, зарегистрированных до залпа ПКП, затем использовали для вычисления квантового состава ПКП. У значений амплитуд МПКП, зарегистрированных до ритмической стимуляции нерва и сразу после нее, отсутствуют статистически значимые различия [16, 17]. Это позволяет исключить возможное влияние десенситизации постсинаптических никотиновых холинорецепторов в развитие изменений амплитуд и квантового состава ПКП по ходу коротких ритмических залпов. Для предотвращения истощения запаса доступных для высвобождения квантов АХ в моторных синапсах стимуляцию диафрагмального нерва проводили с перерывами не менее 5–6 мин. Первичный анализ параметров постсинаптических потенциалов осуществляли с использованием программы MiniAnalysis (Synaptosoft, США). В контроле регистрировали потенциалы минимум от 5 синапсов, затем в перфузионный раствор добавляли исследуемые вещества в определенном порядке и регистрировали активность разных синапсов таким же образом, как и в контроле, в течение 45–60 мин. Критерием включения синапса в выборку для дальнейшего анализа данных служило устойчивое значение мембранного потенциала в течение регистрации – допускались изменения этого параметра менее чем на 5 мВ, в противном случае регистрацию прекращали, а запись не включали в выборку. Среднее время нарастания и полуспада МПКП во всех сериях экспериментов составляло не более 1 и 2.2 мс соответственно, а значения этих временных параметров для ПКП – не более 1.7 и 2.7 мс соответственно (во всех сравниваемых выборках не было статистически значимых различий параметров временного хода постсинаптических потенциалов). В каждой серии экспериментов использовали не менее трех нервно-мышечных препаратов.

Анализ данных и статистика. Оценивали амплитуду и временные характеристики МПКП и ПКП, квантовый состав ПКП. Амплитуду ПКП корректировали на нелинейную сумму [5, 18], именно изменения скорректированной амплитуды ПКП отображены на всех рисунках. Квантовый состав ПКП вычисляли как отношение скорректированной амплитуды ПКП к средней в данном синапсе амплитуде МПКП.

Статистическую значимость различий между сравниваемыми выборками оценивали с использованием GraphPad Prism 8.4.3. (GraphPad, США). Нормальность распределения параметров в выборках оценивали с использованием теста Д'Агостино-Пирсона. Далее при нормально распределенных величинах применяли *t*-критерий Стьюдента, а при распределении, отличном от нормального – критерий Манна – Уитни. Двухфакторный дисперсионный анализ с последующим применением апостериорного критерия Бонферрони использовали для анализа амплитуд и квантового состава ПКП в залпе. Различия параметров выборок считали статистически значимыми при $p < 0.05$, n – количество исследованных синапсов в выборке. В тексте и на рисунках данные представлены в виде среднего значения \pm стандартная ошибка среднего.

Реактивы. Все реактивы для приготовления физиологического раствора Лайли были поставлены Хеликон, Россия. В экспериментах были использованы: продомен BDNF (Alomone, Израиль); антагонист сортилина AF38469 (GlpBio, США); антагонист TrkB-рецепторов циклотраксин В, блокатор потенциалзависимых Ca^{2+} каналов L-типа нитрендипин, конкурентный антагонист P2Y13-рецепторов MRS 2211 (все – Tocris, Великобритания); антагонист мускариновых M2-холинорецепторов метоктрамин, антагонист аденозиновых A_1 -рецепторов DPSPX (Santa Cruz, США); блокатор паннексина 1 пробеницид (в виде водорастворимой натриевой соли) (AAT Bioquest, США). Для приготовления стоковых растворов всех веществ использовали деионизированную H_2O в качестве растворителя, кроме AF38469, нитрендипина и DPSPX, для которых растворителем служил диметилсульфоксид – DMSO (Хеликон, Россия). Концентрация DMSO в рабочих растворах не превышала 0.02% (v/v), данный растворитель в такой концентрации не оказывал статистически значимого самостоятельного действия на исследуемые параметры спонтанной и вызванной секреции АХ.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В первом блоке экспериментов мы решали вопрос о возможном участии функциональных комплексов рецепторов $p75$ с TrkB или сортилином в обеспечении GIRK-опосредованного негативного влияния продомена BDNF на квантовую секрецию АХ в диафрагмальных синапсах мышцы. У нас было несколько предпосылок для исследования возможного участия TrkB в реализации эффекта продомена BDNF. Во-первых, имеются многочисленные данные об образовании гетеродимеров TrkB и $p75$ на мембране нейронов [19]. Во-вторых, нельзя было исключить возможного ингибирования TrkB в составе возможного функционального рецепторного комплекса с $p75$, что, в свою очередь, могло прекращать описанное тормозное влияние со стороны TrkB на GIRK [20].

Для проверки вовлеченности TrkB в реализацию действия продомена BDNF использовали циклотраксин В – циклический пептидный аллостерический модулятор TrkB, препятствующий его активации [21].

Сам по себе циклотраксин В (100 нМ) не вызвал никаких изменений параметров квантовой секреции АХ в коротких ритмических залпах. МП рассеченных мышечных волокон составил -38.9 ± 1.6 мВ в контроле ($n = 16$) и -39.7 ± 1.6 мВ в присутствии циклотраксина В ($n = 17$, $p = 0.78$). Амплитуда и квантовый состав ПКП, амплитуда МПКП в присутствии антагониста TrkB не имели статистически значимых различий по сравнению с таковыми в контроле (рис. 1а). Продомен BDNF (1 нМ) в присутствии циклотраксина В полностью сохранил свою способность угнетать квантовую секре-

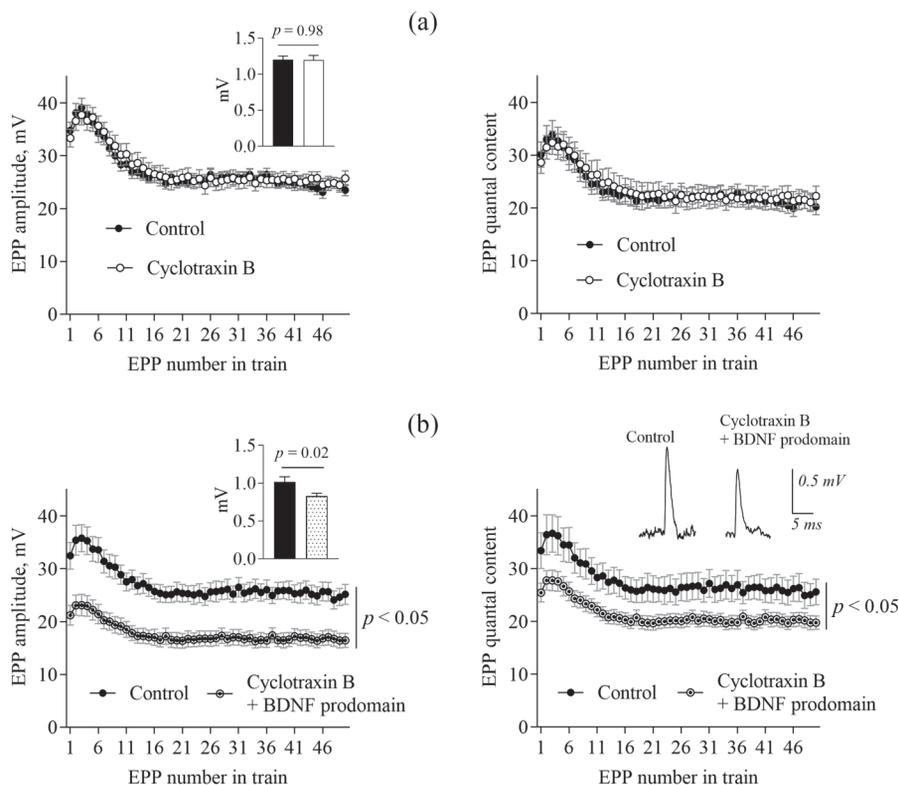


Рис. 1. Тормозное действие продомена BDNF (1 нМ) не зависит от активности TrkB-рецепторов в моторных синапсах диафрагмы мыши. (а) – Изменения амплитуды ПКП (слева) и квантового состава ПКП (справа) по ходу ритмического залпа (50 Гц, 1 с) в контроле ($n = 16$) и в присутствии антагониста TrkB-рецепторов циклотраксина В (100 нМ) ($n = 17$); (б) – изменения амплитуды ПКП (слева) и квантового состава ПКП (справа) по ходу ритмического залпа (50 Гц, 1 с) в контроле ($n = 15$) и под действием продомена BDNF (1 нМ) в присутствии циклотраксина В ($n = 18$). На врезках – амплитуда МПКП и типичные примеры записей МПКП.

цию АХ. В таких экспериментальных условиях сочетанно и равномерно уменьшались на 25–30% по сравнению с контролем как амплитуды МПКП и ПКП, так и единообразно снижался квантовый состав всех ПКП в коротких ритмических залпах (рис. 1б).

Далее проверяли, участвует ли сортилин в индуцированном продоменом BDNF торможении нервно-мышечной передачи. Для этого использовали селективный ингибитор сортилина AF38469 [22]. Сначала исследовали возможное самостоятельное действие этого ингибитора сортилина на синаптическую передачу в моторных синапсах, поскольку до настоящего момента синаптическое действие AF38469 не исследовалось. Оказалось, что, как и циклотраксин В, AF38469 (5 мкМ) не приводил к статистически значимым изменениям ни МП мышечных волокон: -41.8 ± 1.6 мВ в контроле ($n = 18$), -41.0 ± 1.3 мВ в присутствии AF38469 ($n = 21$, $p = 0.71$), ни параметров вызванной стимуляцией нерва секреции АХ. При ингибировании сортилина не наблюдали изменений как амплитуды МПКП и ПКП, так и квантового состава ПКП в залпах по сравнению с контролем (рис. 2а).

Однако в отличие от циклотраксина В, который оказался неспособен предотвратить тормозное влияние продомена BDNF на квантовую секрецию АХ, AF38469 полностью устранил негативное действие продомена BDNF на нервно-мышечную передачу (рис.

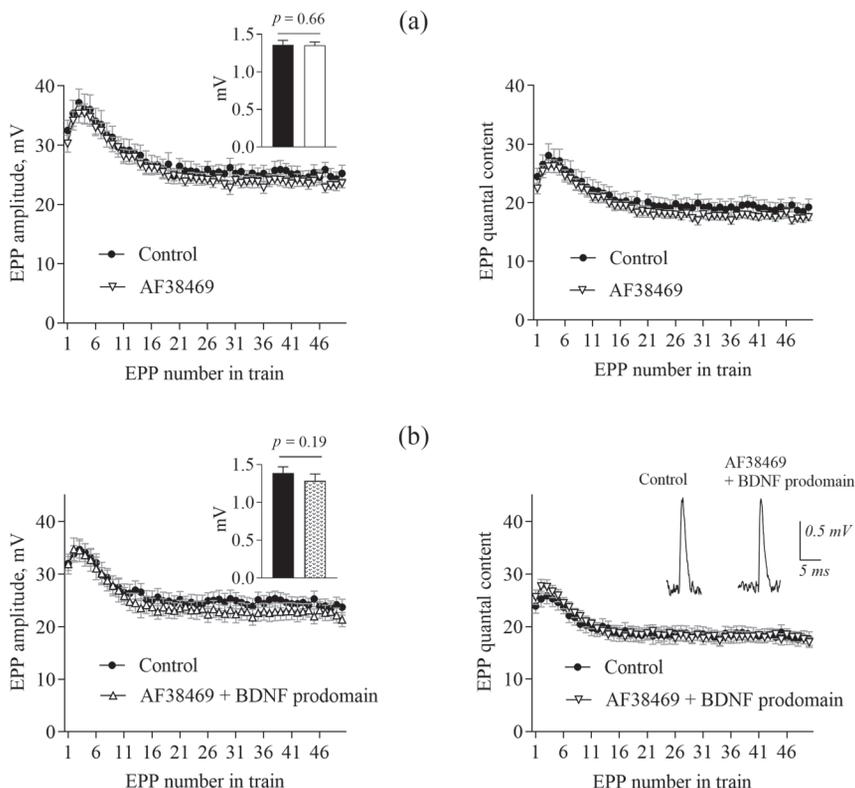


Рис. 2. Сортилин необходим для реализации тормозного влияния продомена BDNF (1 нМ) на синаптическую передачу в моторных синапсах диафрагмы мыши. (а) – Изменения амплитуды ПКП (слева) и квантового состава ПКП (справа) по ходу ритмического залпа (50 Гц, 1 с) в контроле ($n = 18$) и в присутствии антагониста сортилина AF38469 (5 мкМ) ($n = 21$); (б) – изменения амплитуды ПКП (слева) и квантового состава ПКП (справа) по ходу ритмического залпа (50 Гц, 1 с) в контроле ($n = 15$) и под действием продомена BDNF (1 нМ) в присутствии AF38469 ($n = 18$). На врезках – амплитуда МПКП и типичные примеры записей МПКП.

2б). В присутствии ингибитора сортилина воздействие на моторные синапсы диафрагмы продомена BDNF не вызвало статистически значимых изменений амплитуд МПКП и ПКП, а также квантового состава ПКП в залпах ($n = 18$) по сравнению с таковыми в контроле ($n = 15$, $p > 0.05$).

Таким образом, мы установили, что двунаправленное тормозное действие продомена BDNF (1 нМ): сочетанное снижение амплитуд МПКП и ПКП и одновременное уменьшение квантового состава всех ПКП в коротком залпе (рис. 1б) – требует присутствия и активности не TrkB, а сортилина в моторных синапсах.

Во втором блоке экспериментов мы сосредоточились на поиске синаптических метаботропных рецепторов, сцепленных с G_i -белками, которые могли бы соучаствовать в активации GIRK при действии продомена BDNF.

Сначала проверяли возможную роль активности тормозных мускариновых M2-холинорецепторов в качестве коактиватора GIRK. Известно, что ингибирование этих метаботропных ауторецепторов увеличивает квантовый состав одиночных ПКП, и считается, что активация именно M2-холинорецепторов эндогенным АХ может соучаствовать в регуляторных контурах аутоингибирования вызванной квантовой секреции АХ в моторных синапсах [23–26].

В наших экспериментах исследовали действие блокатора M2-холинорецепторов метоктрамина (1 мкМ) на параметры квантовой секреции АХ в условиях не одиночной, а кратковременной высокочастотной ритмической стимуляции (50 Гц, 1 с) синапсов. Средняя амплитуда МПКП, регистрируемых перед стимуляцией нерва, под действием метоктрамина статистически не отличалась от контроля. Метоктрамин вызывал равномерное увеличение амплитуд ПКП за счет увеличения квантового состава каждого ПКП в залпе (рис. 3а).

Далее мы установили, что такое потенцирование вызванной квантовой секреции АХ в виде равномерного увеличения амплитуд и квантового состава ПКП по всему ходу залпа происходит за счет растормаживания Ca^{2+} -каналов L-типа при ингибировании M2-холинорецепторов. Считается, что этот тип Ca^{2+} -каналов, хотя и присутствует на пресинаптической мембране моторных нервных окончаний, в условиях, типичных для функционирования зрелых моторных синапсов (вызванная кратковременная ритмическая активность), не принимает участия в регуляции квантовой секреции АХ [27–29], хотя в последнее время начинает рассматриваться альтернативная точка зрения о слабом участии L-типа Ca^{2+} -каналов в работе моторных синапсов [30]. При этом, будучи «демаскированными», Ca^{2+} -каналы L-типа способны увеличивать квантовый состав ПКП в моторных синапсах. Вовлечь этот тип Ca^{2+} -каналов в потенцирование быстрого синхронного выброса квантов АХ в моторных синапсах можно разными способами – блокируя ВК-каналы [16, 31] или аденозиновые A_1 -рецепторы [16], ингибируя кальцинейрин [32], стимулируя P2X7-рецепторы [33] или действуя на эндоканнабиноидные СВ1-рецепторы анандамидом [34].

Действительно, метоктрамин-индуцированное усиление вызванного выброса АХ полностью предотвращалось под действием блокатора L-типа Ca^{2+} -каналов нитрендипина (1 мкМ) (рис. 3б), который сам по себе не влияет на амплитуду и квантовый состав ПКП в коротких ритмических залпах [16, 32].

Учитывая, что метоктрамин-индуцированное и опосредованное активностью Ca^{2+} -каналов L-типа возрастание квантового состава ПКП в залпах могло замаскировать проявления негативного влияния на квантовую секрецию АХ продомена BDNF, в следующей серии экспериментов проводили одновременное двойное блокирование M2-холинорецепторов и Ca^{2+} -каналов L-типа. Оказалось, что в присутствии метоктрамина и нитрендипина продомен BDNF полностью сохранил способность угнетать квантовую секрецию АХ, снижая как амплитуду постсинаптических потенциалов, так и квантовый состав ПКП (рис. 3с).

Совокупность полученных данных свидетельствует, во-первых, о том, что мускариновые M2-холинорецепторы, наряду с участниками других регуляторных контуров, вовлечены в негативную регуляцию активности пресинаптических Ca^{2+} -каналов L-типа, обеспечивая их «молчащее» состояние в нормальных условиях работы моторных синапсов, а во-вторых, что эти ауторецепторы, несмотря на функционирование при кратковременной залповой активности синапсов, не участвуют в стимулировании GIRK под действием продомена BDNF.

Далее мы тестировали возможное соучастие в тормозных эффектах продомена BDNF G_i -белок-сцепленных P2Y13-пуринорецепторов, активируемых эндогенными АТФ и АДФ в моторных синапсах [12].

Ингибирование P2Y13-рецепторов MRS2211 (10 мкМ) оказывало на вызванную квантовую секрецию АХ в коротких ритмических залпах такой же эффект, как и ингибирование M2-холинорецепторов. Под действием MRS2211 происходило равномерное увеличение амплитуд ПКП по всему ходу коротких залпов за счет возрастания квантового состава ПКП (рис. 4а). Оказалось, что активность P2Y13-рецепторов, как и M2-холинорецепторов, направлена на предотвращение вовлечения в регуляцию квантовой секреции АХ Ca^{2+} -каналов L-типа – потенцирующее действие MRS2211 предотвращалось нитрендипином (рис. 4б). Однако, как и в случае с M2-холинорецепторами,

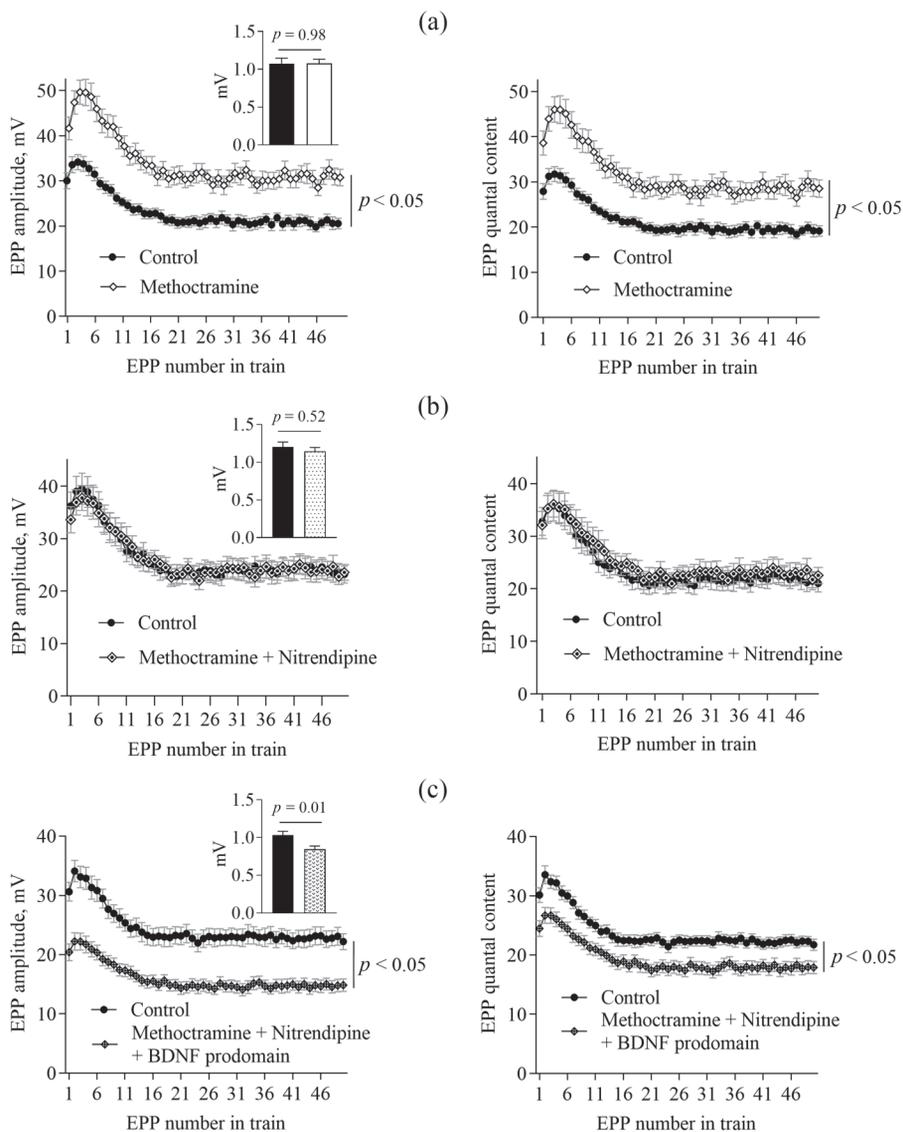


Рис. 3. Мускариновые M2-холинорецепторы тормозят вызванную квантовую секрецию АХ, препятствуя активации Ca^{2+} -каналов L-типа, но не вовлечены в механизм торможения продоменом BDNF синаптической передачи в моторных синапсах диафрагмы мыши. (а) – Изменения амплитуды ПКП (слева) и квантового состава ПКП (справа) по ходу ритмического залпа (50 Гц, 1 с) в контроле ($n = 15$) и в присутствии блокатора M2-холинорецепторов метоктрамина (1 мкМ) ($n = 17$); (б) – изменения амплитуды ПКП (слева) и квантового состава ПКП (справа) по ходу ритмического залпа (50 Гц, 1 с) в контроле ($n = 18$) и под действием метоктрамина в присутствии блокатора Ca^{2+} -каналов L-типа нитрендипина (1 мкМ) ($n = 18$); (с) – изменения амплитуды ПКП (слева) и квантового состава ПКП (справа) по ходу ритмического залпа (50 Гц, 1 с) в контроле ($n = 20$) и под действием продомена BDNF (1 нМ) в присутствии метоктрамина и нитрендипина ($n = 29$). На врезках – амплитуда МПКП.

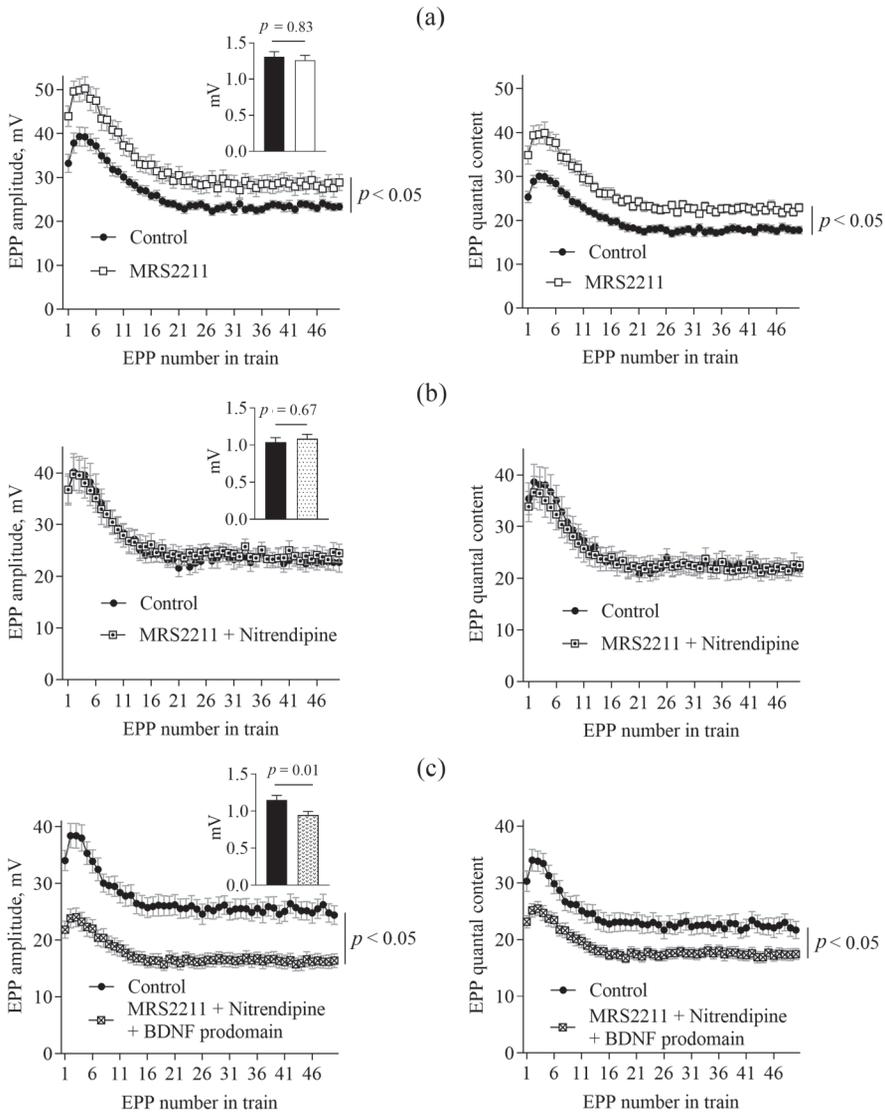


Рис. 4. P2Y13-пуринорецепторы тормозят активность Ca^{2+} -каналов L-типа и препятствуют потенцированию вызванной квантовой секреции АХ, но не участвуют в торможении продомоном BDNF синаптической передачи в моторных синапсах диафрагмы мыши. (а) – Изменения амплитуды ПКП (слева) и квантового состава ПКП (справа) по ходу ритмического залпа (50 Гц, 1 с) в контроле ($n = 22$) и в присутствии ингибитора P2Y13-рецепторов MRS2211 (10 мкМ) ($n = 22$); (б) – изменения амплитуды ПКП (слева) и квантового состава ПКП (справа) по ходу ритмического залпа (50 Гц, 1 с) в контроле ($n = 15$) и под действием MRS2211 в присутствии блокатора Ca^{2+} -каналов L-типа нитрендипина (1 мкМ) ($n = 15$); (с) – изменения амплитуды ПКП (слева) и квантового состава ПКП (справа) по ходу ритмического залпа (50 Гц, 1 с) в контроле ($n = 17$) и под действием продомена BDNF (1 нМ) в присутствии метоктрамина и нитрендипина ($n = 19$). На врезках – амплитуда мПКП.

продомен BDNF при ингибировании P2Y₁₃-рецепторов MRS2211 и заблокированных нитрендипином Ca²⁺-каналах L-типа эффективно проявлял свое тормозное влияние на квантовую секрецию АХ. В этих условиях происходило снижение как амплитуд постсинаптических потенциалов, так и квантового состава ПКП в залпах (рис. 4с). Полученные данные являются сильным аргументом в пользу того, что, несмотря на присутствие и активность P2Y₁₃-рецепторов в моторных синапсах мыши [12, 35], доказанную физиологическую значимость этих рецепторов как негативных регуляторов выброса АХ [13, 36], их модулирующая активность не сопряжена со специфическим комплексным торможением секреции АХ под влиянием продомена BDNF.

Последним претендентом на возможное соучастие в тормозных эффектах продомена BDNF в моторных синапсах были пресинаптические аденозиновые A₁-рецепторы, давно известные в качестве негативных регуляторов квантовой секреции АХ [37–40]. Установлено, что ингибитор аденозиновых A₁-рецепторов DPCPX вызывает увеличение амплитуд и квантового состава ПКП по всему ходу залпа [13, 38], то есть оказывает эффект, аналогичный наблюдаемому при ингибировании M2-холинорецепторов или P2Y₁₃-пуринорецепторов. Такое DPCPX-индуцированное потенцирование квантовой секреции АХ эффективно предотвращается при блокировании нитрендипином Ca²⁺-каналов L-типа [16].

Однако, в отличие от предыдущих экспериментов, где тормозное действие продомена BDNF сохранялось при ингибировании M2- или P2Y₁₃-рецепторов при заблокированных нитрендипином Ca²⁺-каналах L-типа, при блокировании DPCPX (100 нМ) A₁-рецепторов в присутствии нитрендипина (1 мкМ) негативное влияние продомена BDNF на параметры квантовой секреции АХ полностью предотвращалось. В этих условиях значения амплитуд МПКП и ПКП и квантового состава ПКП в коротких залпах, несмотря на присутствие продомена BDNF, статистически значимо не отличались от таковых в контроле (рис. 5а). Это означает, что выключение механизма торможения квантовой секреции АХ, обеспечиваемого A₁-рецепторами, одновременно препятствует и негативному действию продомена BDNF на нервно-мышечную передачу.

Ранее мы показали, что проявление тормозного действия A₁-рецепторов в моторных синапсах требует функционирования полуканалов, образованных паннексином 1 (паннексон) [13]. Паннексон – источник синаптического АТФ (и образующегося в результате гидролиза АТФ аденозина), в дополнение к везикулярному АТФ. Оказалось, что достаточно устранения «паннексинового» источника АТФ за счет генетического нокаута у мышей паннексина 1 [13], чтобы ограничить активность A₁-рецепторов и реализацию их торможения квантовой секреции АХ. Кроме того, в моторных синапсах мышей, нокаутных по гену паннексина 1, имеющих нормальные характеристики квантовой секреции АХ [13, 33], оказывается элиминированной не только активация A₁-рецепторов и их тормозные влияния на выброс нейротрансмиттера, но и тормозное действие продомена BDNF на параметры квантовой секреции АХ [5].

В данной работе мы использовали фармакологическое блокирование паннексина 1 с помощью пробенецида, устраняющего выход внутриклеточного АТФ по этим каналам во внеклеточную среду [41–45], и тестировали действие продомена BDNF в этих условиях. Недавно мы установили, что пробеницид (1 мМ) сам по себе не влияет на параметры МПКП и ПКП [15]. Однако в его присутствии продомен BDNF перестал уменьшать амплитуду постсинаптических потенциалов и квантовый состав ПКП в залпах (рис. 5б).

Эти данные говорят о том, что эндогенная активация именно пресинаптических аденозиновых A₁-рецепторов, тормозящих секрецию АХ в моторных синапсах млекопитающих, одновременно необходима и для реализации комплексного механизма угнетающего влияния продомена BDNF на секрецию АХ с участием GIRK. Для такого A₁-зависимого тормозного действия продомена BDNF на квантовую секрецию АХ в моторных синапсах необходимо адекватное функционирование «паннексинового источника» синаптических пуринов.

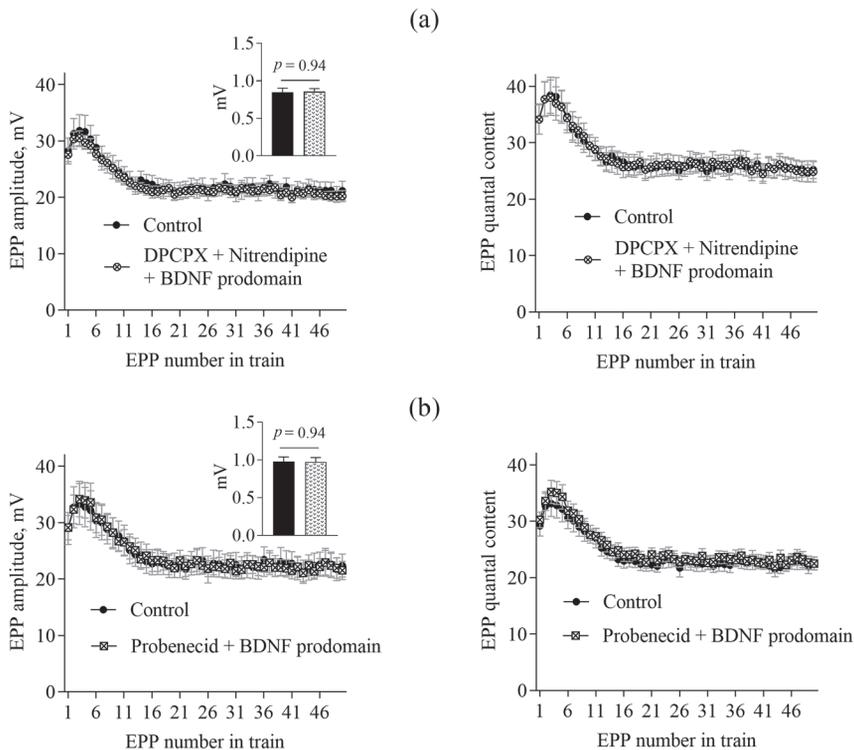


Рис. 5. Эндогенная активность A_1 -рецепторов аденозина, обусловленная функционированием полуканалов из паннексинов 1, необходима для развития торможения квантовой секреции АХ, индуцируемого продоменом BDNF в моторных синапсах диафрагмы мыши. (а) – Изменения амплитуды ПКП (слева) и квантового состава ПКП (справа) по ходу ритмического залпа (50 Гц, 1 с) в контроле ($n = 16$) и под действием продомена BDNF (1 нМ) в присутствии ингибитора A_1 -рецепторов DPCPX (100 нМ) и блокатора Ca^{2+} -каналов L-типа нитрендипина (1 мкМ) ($n = 22$); (б) – изменения амплитуды ПКП (слева) и квантового состава ПКП (справа) по ходу ритмического залпа (50 Гц, 1 с) в контроле ($n = 19$) и под действием продомена BDNF (1 нМ) в присутствии блокатора паннексина 1 пробенецида (1 мМ) ($n = 24$). На врезках – амплитуда МПКП.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В данной работе мы приводим новые данные, расширяющие представление о механизме тормозного действия продукта созревания нейротрофина мозга – продомена BDNF. Совсем недавно мы показали, что в зрелых моторных синапсах диафрагмы мыши продомен BDNF оказывает комплексное негативное влияние на параметры спонтанной и вызванной квантовой секреции АХ – снижает амплитуду и частоту МПКП, а также амплитуду и квантовый состав ПКП – равномерно по всему ходу короткого ритмического залпа. Это происходит за счет запуска под действием продомена BDNF р75-опосредованного сигнального пути, связанного с Rho-GDI, направленного на активацию калиевых каналов GIRK в моторных синапсах [5]. Уже выявленная нами роль р75 в качестве рецептора продомена BDNF в моторных синапсах созвучна данным, полученным на гиппокампальных нейронах, где продомен BDNF, действуя именно через р75 на постсинаптической мембране, усиливал долговременную депрессию [46]. Кроме того, в гиппокампе р75 необходим для осуществления структурных перестроек нейрональных отростков, индуцируемых продоменом BDNF [47]. В нашей работе мы сделали существенное дополнение полученным ранее данным о характере рецепции

продомена BDNF. Применяя ингибиторы TrkB и сортилина (циклотраксин В и AF38469 соответственно), мы установили, что вызываемый продоменом BDNF запуск каскада, активирующего в конечном итоге GIRK и вызывающего торможение квантовой секреции АХ в моторных синапсах, требует функционирования, помимо p75, и сортилина, но не TrkB. Если сведения о неучастии TrkB в реализации эффектов продомена BDNF в синапсах ЦНС можно встретить в литературе [45], то соучастие сортилина в регуляции синаптических эффектов продомена BDNF в моторных синапсах выявлено нами впервые и не описано в синапсах ЦНС. До сих пор роль сортилина в качестве рецептора рассматривалась для предшественника зрелого BDNF – проBDNF [7, 48–50]. Используемый нами ингибитор сортилина AF38469 конкурентно взаимодействует с сайтом связывания нейротензина [22]. Показано, что именно с этим сайтом связывается продоменная часть proBDNF [47], а то, что в присутствии AF38469 продомен утрачивал свою способность тормозить квантовую секрецию АХ, свидетельствует о специфичности использованного нами ингибитора, предотвращающего взаимодействие продомена с сортилином. Похожая ситуация наблюдается в гиппокампе, где рецепция продомена BDNF и проявление им физиологических функций требует участия не только p75, но и родственного сортилину рецептора SorCS2, который осуществляет связывание продомена BDNF с последующей активацией p75 по непонятному до сих пор механизму [47]. Вероятнее всего, в моторных синапсах мышцы рецепция продомена BDNF и запуск им сигнального пути, вовлекающего GIRK в негативную регуляцию квантовой секреции АХ, требует формирования сигнального комплекса сортилин/p75. Тонкий механизм такой рецепции с установлением четких ролей компонентов рецепторного комплекса требует дальнейших исследований.

Выявив ранее, что именно появляющаяся активность синаптических GIRK обеспечивает тормозное действие продомена BDNF на синаптическую передачу [5], во второй части работы мы сосредоточились на установлении конкретного метаболитного G_i-белок-сцепленного рецептора (или рецепторов), необходимого для активации GIRK [9].

В моторных синапсах млекопитающих такими возможными кандидатами являлись те метаболитные рецепторы, на которые способны воздействовать эндогенные лиганды в нормальных условиях работы моторных синапсов – АХ (мускариновые M2-рецепторы), АТФ, АДФ (P2Y₁₃) и аденозин (A₁). Для всех этих рецепторов при их активации уже показано выраженное тормозное действие на квантовую секрецию АХ [12, 13, 16, 26, 38, 39, 51].

Мы впервые показали, что M2- и P2Y₁₃-рецепторы при их эндогенной активации в условиях нормальной работы моторных синапсов мышцы обеспечивают торможение вызванной секреции АХ на пресинаптическом уровне за счет угнетения активности Ca²⁺-каналов L-типа. Таким образом, M2- и P2Y₁₃-рецепторы служат своеобразными «дублерами» аденозиновых A₁-рецепторов, для которых такой механизм тормозного влияния уже был ранее продемонстрирован [13, 16]. Мы предполагаем, что механизм угнетения активности Ca²⁺-каналов L-типа при эндогенной активации M2- и P2Y₁₃-рецепторов будет аналогичен показанному нами для A₁-рецепторов [16], хотя такое предположение, безусловно, требует экспериментальной проверки. Демаскирование L-типа Ca²⁺-каналов разными путями способно значительно увеличивать амплитуду многоквантовых ПКП за счет возрастания их квантового состава – как в ходе одиночной стимуляции [28, 52], так и в ходе коротких высокочастотных залпов. В случае ритмической стимуляции моторных синапсов растормаживание L-типа Ca²⁺-каналов оставляет неизменной выраженность и последовательность форм кратковременной синаптической пластичности (облегчение, депрессия, стабилизация выброса АХ), но значительно потенцирует секрецию АХ, равномерно увеличивая амплитуду и квантовый состав всех ПКП по всему ходу залпа [16, 31, 32]. Такое усиление секреции АХ мы продемонстрировали и в данной работе при действии селективных ингибиторов M2- и P2Y₁₃-рецепторов. Используя последовательную модель [53], мы уже проанализиро-

вали ранее, что равномерное усиление квантовой секреции АХ в залпах, обеспечиваемое за счет демаскирования L-типа Ca^{2+} -каналов, реализуется не за счет возрастания вероятности выброса, но благодаря увеличению размера пула синаптических везикул, непосредственно готовых к выбросу [33, 34]. Вероятнее всего, это происходит за счет вовлечения в секрецию АХ ранее «молчавших» активных зон.

Тот факт, что активность трех пресинаптических сопряженных с G_i -белками метаботропных ауторецепторов, стимулируемых каждый своим эндогенным лигандом (появляющихся в синаптической щели в разных концентрациях и функционирующих там различное время), в условиях вызванной активности моторных синапсов направлена на одну и ту же мишень (Ca^{2+} -каналы L-типа), говорит, на наш взгляд, о существовании в моторных терминалях регуляторных контуров отрицательной обратной связи. Эти контуры препятствуют вовлечению этого Ca^{2+} -входа в регуляцию квантовой секреции АХ в широком диапазоне режимов синаптической активности. При этом снижение функционирования любого из таких аутоингибиторных контуров, сопряженных с экзоцитозом синаптических везикул, обеспечивает растормаживание L-типа Ca^{2+} -каналов и характерное потенцирование секреции АХ [13]. Ослабление негативной регуляции L-типа Ca^{2+} -каналов со стороны метаботропных ауторецепторов может лежать в основе вовлечения этого Ca^{2+} -входа в поддержание быстрой синхронной многоквантовой секреции АХ в патологических условиях, когда она снижена. Такая ситуация, на наш взгляд, может возникать при развитии синдрома Ламберта-Итона в результате аутоиммунной атаки на триггерный Ca^{2+} -вход в активных зонах (Ca^{2+} -каналы P/Q-типа) [54]. Примеры подобной функциональной кооперации между синаптическими рецепторами в моторных синапсах уже показаны и обсуждаются [51].

Ключевым результатом наших исследований является то, что из трех пресинаптических метаботропных рецепторов (M_2 , P_2Y_{13} и A_1) исключительно A_1 -рецепторы оказались функционально сопряжены не только с торможением Ca^{2+} -каналов L-типа, но и с GIRK-опосредованным угнетением квантовой секреции АХ под действием продомена BDNF. Только при селективном ингибировании A_1 -рецепторов продомен BDNF полностью утрачивал свое негативное GIRK-опосредованное действие на квантовую секрецию АХ. Данная эксклюзивность оказалась несколько неожиданной, поскольку в синапсах в разных отделах ЦНС показано функциональное сопряжение между GIRK и мускариновыми M_2 -холинорецепторами [55, 56], P_2Y -рецепторами [57] и аденозиновыми A_1 -рецепторами [58–61]. Взаимодействие A_1 -рецепторов с GIRK в синапсах ЦНС преимущественно реализуется на постсинаптической мембране, где такая локализация обеспечивает контроль возбудимости постсинаптического нейрона в норме и в патологических условиях [60–63]. Вместе с тем имеются данные и о пресинаптическом расположении не только GIRK [64–66], но и об активации GIRK при стимуляции A_1 -рецепторов именно в нервных окончаниях [67].

Мы предполагаем, что в моторных синапсах функциональное сопряжение GIRK с A_1 -рецепторами и реализация тормозного влияния продомена BDNF на синаптическую передачу происходит именно на пресинаптическом уровне. У нас есть несколько аргументов в пользу такого умозаключения. Во-первых, GIRK-опосредованное торможение квантовой секреции АХ продоменом BDNF выражено в снижении квантового состава ПКП в залпе и частоты спонтанной секреции [5]. Изменения этих параметров происходят за счет исключительно пресинаптических процессов. Во-вторых, в нервно-мышечных синапсах мышцы A_1 -рецепторы локализованы на мембране моторной нервной терминали [51, 68, 69]. В-третьих, под действием продомена BDNF не было выявлено статистически значимых изменений МП (гиперполяризации) мышечных волокон в зрелых моторных синапсах диафрагмы [5], что можно было бы ожидать в случае активации постсинаптических GIRK в результате действия продомена BDNF. В недавней работе на нервно-мышечном синапсе лягушки была показана локализация GIRK именно на пресинаптической мембране, где они функционально сопряжены с M_2 -хо-

линорецепторами [70]. В совокупности все вышеперечисленные аргументы, результаты наших предыдущих исследований и данные, полученные в настоящей работе, свидетельствуют о дуальной регуляторной роли пресинаптических аденозиновых A_1 -рецепторов в моторных синапсах. Эти метаботропные рецепторы выступают, с одной стороны, как мощный негативный регулятор активности L-типа Ca^{2+} -каналов, тормозя активность протеинкиназы A, вероятнее всего благодаря ингибирующему влиянию $G_i\alpha$ -субъединицы на функционирование аденилатциклазы [16], и одновременно могут, продуцируя образование $G_i\beta\gamma$ -субъединиц, играть роль коактиватора GIRK, обеспечивая взаимодействие этих каналов с $G_i\beta\gamma$ -субъединицами, необходимое для реализации тормозных эффектов продомена BDNF в случае активации им пресинаптического рецепторного комплекса $r75$ /сортилин. При этом, несмотря на устойчивую «тоническую» активацию A_1 -рецепторов в работающих моторных синапсах [13, 16, 38], маловероятно, что в одиночку эти рецепторы способны обеспечить активацию пресинаптических GIRK в типичных условиях функционирования моторных синапсов. Данное предположение базируется на том, что ингибирование GIRK тертиапином в отсутствие активации продоменом BDNF рецепторов $r75$ при сохраняющейся активации и функционировании A_1 -рецепторов в синапсах никак не влияет на параметры квантовой секреции АХ [5].

Остается загадочным обнаруженный нами факт снижения не только квантового состава ПКП, но и сочетанного уменьшения амплитуд МПКП и ПКП под действием продомена BDNF и непосредственное участие GIRK в этом компоненте торможения квантовой секреции АХ [5]. Если учитывать пресинаптическую локализацию GIRK в нервно-мышечных синапсах млекопитающих (что и обеспечивает возможность их функционального взаимодействия с A_1 -рецепторами) и их явное негативное влияние на триггерный вход ионов кальция в моторную терминаль по кальциевым каналам P/Q-типа, благодаря чему снижается квантовый состав ПКП [5], остается рассматривать пресинаптические механизмы снижения амплитуды постсинаптических потенциалов. Одним из таких вероятных механизмов может являться переключение режимов экзоцитоза синаптических везикул с *full-collapse* на *kiss-and-run* и выброс меньшего количества АХ в составе отдельных квантов АХ. Возможность такого переключения и его регуляции недавно была показана для синапсов диафрагмы [71, 72]. Однако возможное участие активируемых под действием продомена BDNF GIRK в такой регуляции, безусловно, требует дальнейших экспериментов.

Наконец, в нашей работе впервые было апробировано действие пробенецида, ингибитора высокопроводящих каналов белка паннексина 1, обеспечивающего поступление эндогенных пуринов из околосоинаптических (мышечных и других) источников в синаптическую щель моторных синапсов для активации A_1 - и других пуринорецепторов [15]. Мы убедились в том, что для A_1 -зависимого GIRK-опосредованного тормозного действия продомена BDNF на квантовую секрецию АХ в моторных синапсах необходимо обязательное адекватное функционирование именно «паннексинового источника» синаптических пуринов (АТФ/аденозина) в моторных синапсах. Используя пробенецид, мы подтвердили собственные недавно полученные данные, что генетическое элиминирование паннексина 1, устранявшее «паннексиновый путь» поступления пуринов в моторных синапсах, препятствует не только эффективной активации пуринорецепторов (включая A_1 -рецепторы), но и развитию тормозного действия продомена BDNF [5]. В совокупности наши настоящие и предыдущие исследования впервые показали, что от одних и тех же специфических путей поступления и рецепторного действия эндогенных пуринов (АТФ/аденозина) в моторных синапсах мышцы зависит как механизм A_1 -опосредованного торможения Ca^{2+} -каналов L-типа [13], так и A_1 -зависимая активация GIRK и торможение секреции АХ под действием продомена BDNF.

БЛАГОДАРНОСТИ

Часть оборудования, использованного в экспериментах, предоставлена МГУ им. М.В. Ломоносова в рамках реализации федеральной Программы развития МГУ (договор 0504-44-2023).

ВКЛАДЫ АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента (А. Е. Г.), сбор данных (А. И. М., А. Е. Г.), обработка данных (А. И. М., А. Е. Г.), написание и редактирование манускрипта (А. И. М., О. П. Б., А. Е. Г.).

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Данная работа финансировалась за счет средств Российского научного фонда (проект 22-25-00111). Никаких дополнительных грантов на проведение или руководство данным конкретным исследованием получено не было.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Эксперименты с животными проводились в соответствии с международными рекомендациями по проведению биомедицинских исследований с лабораторными животными и были одобрены биоэтической комиссией Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова (протокол № 97-ж-3 от 11.11.2021 г.).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы данной работы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Castrén E, Antila H* (2017) Neuronal plasticity and neurotrophic factors in drug responses. *Mol Psychiatry* 22(8): 1085–1095.
<https://doi.org/10.1038/mp.2017.61.Neuronal>
2. *Hurtado E, Cilleros V, Nadal L, Simó A, Obis T, Garcia N, Santafé MM, Tomàs M, Halievski K, Jordan CL, Lanuza MA, Tomàs J* (2017) Muscle Contraction Regulates BDNF/TrkB Signaling to Modulate Synaptic Function through Presynaptic cPKC α and cPKC β I. *Front Mol Neurosci* 10: 1–22.
<https://doi.org/10.3389/fnmol.2017.00147>
3. *Gaydukov A, Bogacheva P, Tarasova E, Molchanova A, Miteva A, Pravdivceva E, Balezina O* (2019) Regulation of Acetylcholine Quantal Release by Coupled Thrombin/BDNF Signaling in Mouse Motor Synapses. *Cells* 8: 762.
<https://doi.org/10.3390/cells8070762>
4. *Garcia N, Tomàs M, Santafé MM, Lanuza MA, Besalduch N, Tomàs J* (2010) Localization of brain-derived neurotrophic factor, neurotrophin-4, tropomyosin-related kinase b receptor, and p75NTR receptor by high-resolution immunohistochemistry on the adult mouse neuromuscular junction. *J Peripher Nerv Syst* 15: 40–49.
<https://doi.org/10.1111/j.1529-8027.2010.00250.x>
5. *Bogacheva PO, Molchanova AI, Pravdivceva ES, Miteva AS, Balezina OP, Gaydukov AE* (2022) ProBDNF and Brain-Derived Neurotrophic Factor Prodomain Differently Modulate Acetylcholine Release in Regenerating and Mature Mouse Motor Synapses. *Front Cell Neurosci* 16: 1–17.
<https://doi.org/10.3389/fncel.2022.866802>
6. *Kojima M, Matsui K, Mizui T* (2019) BDNF pro-peptide: physiological mechanisms and implications for depression. *Cell Tissue Res* 377: 73–79.
<https://doi.org/10.1007/s00441-019-03034-6>
7. *Nykjaer A, Willnow TE* (2012) Sortilin: A receptor to regulate neuronal viability and function. *Trends Neurosci* 35: 261–270.
<https://doi.org/10.1016/j.tins.2012.01.003>
8. *Kraemer BR, Yoon SO, Carter BD* (2014) The Biological Functions and Signaling Mechanisms of the p75 Neurotrophin Receptor. In: *Neurodegenerative Diseases: Neurobiology, Pathogenesis and Therapeutics*. 121–164.

9. Luo H, Fernandez de Velasco EM, Wickman K (2022) Neuronal G protein-gated K⁺ channels. *Am J Physiol Cell Physiol* 323: C439–C460.
<https://doi.org/10.1152/ajpcell.00102.2022>
10. Santafé MM, Salon I, Garcia N, Lanuza MA, Uchitel OD, Tomàs J (2003) Modulation of ACh release by presynaptic muscarinic autoreceptors in the neuromuscular junction of the newborn and adult rat. *Eur J Neurosci* 17: 119–127.
<https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2003.02428.x>
11. Santafé MM, Lanuza MA, Garcia N, Tomàs J (2006) Muscarinic autoreceptors modulate transmitter release through protein kinase C and protein kinase A in the rat motor nerve terminal. *Eur J Neurosci* 23: 2048–2056.
<https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2006.04753.x>
12. Guarracino JF, Cinalli AR, Fernández V, Roquel LI, Losavio AS (2016) P2Y₁₃ receptors mediate presynaptic inhibition of acetylcholine release induced by adenine nucleotides at the mouse neuromuscular junction. *Neuroscience* 326: 31–44.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2016.03.066>
13. Miteva AS, Gaydukov AE, Shestopalov VI, Balezina OP (2017) The role of pannexin 1 in the purinergic regulation of synaptic transmission in mouse motor synapses. *Biochemistry (Mosc) Suppl Ser A Membr Cell Biol* 11: 311–320.
<https://doi.org/10.1134/S1990747817040067>
14. Sousa-Soares C, Noronha-Matos JB, Correia-de-Sá P (2023) Purinergic Tuning of the Tripartite Neuromuscular Synapse. *Mol Neurobiol* 60: 4084–4104.
<https://doi.org/10.1007/s12035-023-03317-8>
15. Miteva AS, Gaydukov AE, Balezina OP (2021) Acetylcholine Release in Mouse Motor Synapses. Changes of Purinergic Regulation under Conditions of Pharmacological Blockade of Pannexin 1 and Its Genetic Knockout. *Biochemistry (Mosc) Suppl Ser A Membr Cell Biol* 15: 378–386.
<https://doi.org/10.1134/S1990747821060088>
16. Tarasova EO, Miteva AS, Gaidukov AE, Balezina OP (2015) The role of adenosine receptors and L-type calcium channels in the regulation of the mediator secretion in mouse motor synapses. *Biochemistry (Mosc) Suppl Ser A Membr Cell Biol* 9: 318–328.
<https://doi.org/10.1134/s1990747815050141>
17. Gaydukov AE, Bogacheva PO, Balezina OP (2019) The Participation of Presynaptic Alpha7 Nicotinic Acetylcholine Receptors in the Inhibition of Acetylcholine Release during Long-Term Activity of Mouse Motor Synapses. *Neurochem J* 13: 20–27.
<https://doi.org/10.1134/S1819712419010082>
18. McLachlan EM, Martin AR (1981) Non-linear summation of end-plate potentials in the frog and mouse. *J Physiol* 311: 307–324.
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.1981.sp013586>
19. Eggert S, Kins S, Endres K, Brigadski T (2021) Brothers in arms: proBDNF/BDNF and sAPP α /A β -signaling and their common interplay with ADAM10, TrkB, p75NTR, sortilin, and sorLA in the progression of Alzheimer's disease. *Biol Chem* 403: 43–71.
<https://doi.org/10.1515/hsz-2021-0330>
20. Rogalski SL, Appleyard SM, Pattillo A, Terman GW, Chavkin C (2000) TrkB Activation by Brain-derived Neurotrophic Factor Inhibits the G Protein-gated Inward Rectifier Kir3 by Tyrosine Phosphorylation of the Channel. *J Biol Chem* 275: 25082–25088.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M000183200>
21. Cazorla M, Jouvenceau A, Rose C, Guilloux JP, Pilon C, Dranovsky A, Prémont J (2010) Cyclothiazin-B, the first highly potent and selective TrkB inhibitor, has anxiolytic properties in mice. *PLoS One* 5.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009777>
22. Schröder TJ, Christensen S, Lindberg S, Langgård M, David L, Maltas PJ, Eskildsen J, Jacobsen J, Tagmose L, Simonsen KB, Büllmann Rønn LC, De Jong IEM, Malik IJ, Karlsson JJ, Bundgaard C, Egebjerg J, Stavenhagen JB, Strandbygdgård D, Thirup S, Andersen JL, Uppalanchi S, Pervaram S, Kasturi SP, Eradi P, Sakumudi DR, Watson SP (2014) The identification of AF38469: An orally bioavailable inhibitor of the VPS10P family sorting receptor Sortilin. *Bioorg Med Chem Lett* 24: 177–180.
<https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2013.11.046>
23. Minic J, Molgó J, Karlsson E, Krejci E (2002) Regulation of acetylcholine release by muscarinic receptors at the mouse neuromuscular junction depends on the activity of acetylcholinesterase. *Eur J Neurosci* 15: 439–448.
<https://doi.org/10.1046/j.0953-816x.2001.01875.x>

24. *Santafé MM, Lanuza MA, Garcia N, Tomàs M, Tomàs J* (2007) Coupling of presynaptic muscarinic autoreceptors to serine kinases in low and high release conditions on the rat motor nerve terminal. *Neuroscience* 148: 432–440.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2007.06.017>
25. *Garcia N, Tomàs M, Santafé MM, Besalduch N, Lanuza MA, Tomàs J* (2010) The interaction between tropomyosin-related kinase B receptors and presynaptic muscarinic receptors modulates transmitter release in adult rodent motor nerve terminals. *J Neurosci* 30: 16514–16522.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2676-10.2010>
26. *Santafé MM, Priego M, Obis T, Garcia N, Tomàs M, Lanuza MA, Tomàs J* (2015) Adenosine receptors and muscarinic receptors cooperate in acetylcholine release modulation in the neuromuscular synapse. *Eur J Neurosci* 42: 1775–1787.
<https://doi.org/10.1111/ejn.12922>
27. *Urbano FJ, Depetris RS, Uchitel OD* (2001) Coupling of L-type calcium channels to neurotransmitter release at mouse motor nerve terminals. *Pflugers Arch* 441: 824–831.
<https://doi.org/10.1007/s004240000489>
28. *Flink MT, Atchison WD, Atchison B* (2003) Iberiotoxin-induced block of Ca²⁺-activated K⁺ channels induces dihydropyridine sensitivity of ACh release from mammalian motor nerve terminals. *J Pharmacol Exp Therap* 305: 646–652.
<https://doi.org/10.1124/jpet.102.046102>
29. *Pagani R, Song M, Mcenery M, Qin N, Tsien RW, Toro L, Stefani E, Uchitel OD* (2004) Differential expression of $\alpha 1$ and β subunits of voltage dependent Ca²⁺ channel at the neuromuscular junction of normal and P/Q Ca²⁺ channel knockout mouse. *Neuroscience* 123: 75–85.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2003.09.019>
30. *Zhilyakov N, Arkhipov A, Malomouzh A, Samigullin D* (2021) Activation of neuronal nicotinic receptors inhibits acetylcholine release in the neuromuscular junction by increasing Ca²⁺ flux through Cav1 channels. *Int J Mol Sci* 22.
<https://doi.org/10.3390/ijms22169031>
31. *Gaydukov AE, Melnikova SN, Balezina OP* (2009) Facilitation of acetylcholine secretion in mouse motor synapses caused by calcium release from depots upon activation of L-type calcium channels. *Bull Exp Biol Med* 148: 163–166.
<https://doi.org/10.1007/s10517-009-0678-9>
32. *Gaydukov AE, Tarasova EO, Balezina OP* (2013) Calcium-dependent phosphatase calcineurin downregulates evoked neurotransmitter release in neuromuscular junctions of mice. *Neurochem J* 7: 29–33.
<https://doi.org/10.1134/S1819712413010030>
33. *Miteva AS, Gaydukov AE, Shestopalov VI, Balezina OP* (2018) Mechanism of P2X7 receptor-dependent enhancement of neuromuscular transmission in pannexin 1 knockout mice. *Purinergic Signal* 14: 459–469.
<https://doi.org/10.1007/s11302-018-9630-7>
34. *Tarasova EO, Khotkina NA, Bogacheva PO, Chernyshev KA, Gaydukov AE, Balezina OP* (2021) Noncanonical Potentiation of Evoked Quantal Release of Acetylcholine by Cannabinoids Anandamide and 2-Arachidonoylglycerol in Mouse Motor Synapses. *Biochemistry (Mosc) Suppl Ser A Membr Cell Biol* 15: 395–405.
<https://doi.org/10.1134/S199074782106012X>
35. *Guarracino JF, Cinalli AR, Veggetti MI, Losavio AS* (2018) Endogenous purines modulate K⁺-evoked ACh secretion at the mouse neuromuscular junction. *J Neurosci Res* 96: 1066–1079.
<https://doi.org/10.1002/jnr.24223>
36. *González Sanabria J, Hurtado Paso M, Frontera T, Losavio A* (2022) Effect of endogenous purines on electrically evoked ACh release at the mouse neuromuscular junction. *J Neurosci Res* 100: 1933–1950.
<https://doi.org/10.1002/jnr.25107>
37. *Correia-de-Sá P, Sebastião AM, Ribeiro JA* (1991) Inhibitory and excitatory effects of adenosine receptor agonists on evoked transmitter release from phrenic nerve endings of the rat. *Br J Pharmacol* 103: 1614–1620.
<https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1991.tb09836.x>
38. *Perissinotti PP, Uchitel OD* (2010) Adenosine drives recycled vesicles to a slow-release pool at the mouse neuromuscular junction. *Eur J Neurosci* 32: 985–996.
<https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2010.07332.x>
39. *Searl TJ, Silinsky EM* (2012) Evidence for constitutively-active adenosine receptors at mammalian motor nerve endings. *Eur J Pharmacol* 685: 38–41.
<https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2012.04.008>

40. *Nascimento F, Sebastião AM, Ribeiro JA* (2015) Presymptomatic and symptomatic ALS SOD1(G93A) mice differ in adenosine A1 and A2A receptor-mediated tonic modulation of neuromuscular transmission. *Purinergic Signal* 11: 471–480.
<https://doi.org/10.1007/s11302-015-9465-4>
41. *Silverman W, Locovei S, Dahl G* (2008) Probenecid, a gout remedy, inhibits pannexin 1 channels. *Am J Physiol Cell Physiol* 295: 761–767.
<https://doi.org/10.1152/ajpcell.00227.2008>
42. *Xia J, Lim JC, Lu W, Beckel JM, Macarak EJ, Laties AM, Mitchell CH* (2012) Neurons respond directly to mechanical deformation with pannexin-mediated ATP release and autostimulation of P2X 7 receptors. *J Physiol* 590: 2285–2304.
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.2012.227983>
43. *Dahl G, Keane RW* (2012) Pannexin: From discovery to bedside in 11±4 years? *Brain Res* 1487: 150–159.
<https://doi.org/10.1016/j.brainres.2012.04.058>
44. *Lopatář J, Dale N, Frenguelli BG* (2015) Pannexin-1-mediated ATP release from area CA3 drives mGlu5-dependent neuronal oscillations. *Neuropharmacology* 93: 219–228.
<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2015.01.014>
45. *Zhang Z, Lei Y, Yan C, Mei X, Jiang T, Ma Z, Wang Q* (2019) Probenecid Relieves Cerebral Dysfunction of Sepsis by Inhibiting Pannexin 1-Dependent ATP Release. *Inflammation* 42: 1082–1092.
<https://doi.org/10.1007/s10753-019-00969-4>
46. *Mizui T, Ishikawa Y, Kumanogoh H, Kojima M* (2016) Neurobiological actions by three distinct subtypes of brain-derived neurotrophic factor: Multi-ligand model of growth factor signaling. *Pharmacol Res* 105: 93–98.
<https://doi.org/10.1016/j.phrs.2015.12.019>
47. *Anastasia A, Deinhardt K, Chao MV, Will NE, Irmady K, Lee FS, Hempstead BL, Bracken C* (2013) Val66Met polymorphism of BDNF alters prodomain structure to induce neuronal growth cone retraction. *Nat Commun* 4: 2490.
<https://doi.org/10.1038/ncomms3490>
48. *Teng HK* (2005) ProBDNF Induces Neuronal Apoptosis via Activation of a Receptor Complex of p75NTR and Sortilin. *J Neurosci* 25: 5455–5463.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5123-04.2005>
49. *Meeker RB, Williams KS* (2015) The p75 neurotrophin receptor: At the crossroad of neural repair and death. *Neural Regen Res* 10: 721–725.
<https://doi.org/10.4103/1673-5374.156967>
50. *Taylor AR, Gifondorwa DJ, Robinson MB, Strupe JL, Prevetie D, Johnson JE, Hempstead B, Oppenheim RW, Milligan CE* (2012) Motoneuron programmed cell death in response to proBDNF. *Dev Neurobiol* 72: 699–712.
<https://doi.org/10.1002/dneu.20964>
51. *Tomàs J, García N, Lanuza MA, Santafé MM, Tomàs M, Nadal L, Hurtado E, Simó-Ollé A, Cilleros-Mañé V, Just-Borrás L* (2018) Adenosine receptors in developing and adult mouse neuromuscular junctions and functional links with other metabotropic receptor pathways. *Front Pharmacol* 9: 1–10.
<https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00397>
52. *Atchison WD, O'Leary SM* (1987) Bay K 8644 increases release of acetylcholine at the murine neuromuscular junction. *Brain Res* 419: 315–319.
[https://doi.org/10.1016/0006-8993\(87\)90599-3](https://doi.org/10.1016/0006-8993(87)90599-3)
53. *Ruiz R, Cano R, Casañas JJ, Gaffield MA, Betz WJ, Tabares L* (2011) Active zones and the readily releasable pool of synaptic vesicles at the neuromuscular junction of the mouse. *J Neurosci* 31: 2000–2008.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4663-10.2011>
54. *Giovannini F, Sher E, Webster R, Boot J, Lang B* (2002) Calcium channel subtypes contributing to acetylcholine release from normal, 4-aminopyridine-treated and myasthenic syndrome auto-antibodies-affected neuromuscular junctions. *Br J Pharmacol* 136: 1135–1145.
<https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0704818>
55. *Naser PV, Kuner R* (2018) Molecular, Cellular and Circuit Basis of Cholinergic Modulation of Pain. *Neuroscience* 387: 135–148.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2017.08.049>
56. *Sugawara S, Nakaya Y, Matsumura S, Hirose K, Saito Y, Kaneko R, Kobayashi M* (2022) Neural Subtype-dependent Cholinergic Modulation of Neural Activities by Activation of Muscarinic 2 Receptors and G Protein-activated Inwardly Rectifying Potassium Channel in Rat Periaqueductal Gray Neurons. *Neuroscience* 506: 1–13.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2022.10.012>

57. *Guzman SJ, Gerevich Z* (2016) P2Y Receptors in Synaptic Transmission and Plasticity: Therapeutic Potential in Cognitive Dysfunction. *Neural Plast* 2016.
<https://doi.org/10.1155/2016/1207393>
58. *Wetherington JP, Lambert NA* (2002) Differential desensitization of responses mediated by presynaptic and postsynaptic A1 adenosine receptors. *J Neurosci* 22: 1248–1255.
<https://doi.org/10.1523/jneurosci.22-04-01248.2002>
59. *Clark BD, Kurth-Nelson ZL, Newman EA* (2009) Adenosine-evoked hyperpolarization of retinal ganglion cells is mediated by G-protein-coupled inwardly rectifying K⁺ and small conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel activation. *J Neurosci* 29: 11237–11245.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2836-09.2009>
60. *James SD, Hawkins VE, Falchetto B, Ruskin DN, Masino SA, Moreira TS, Olsen ML, Mulkey DK* (2018) Adenosine signaling through A1 receptors inhibits chemosensitive neurons in the retrotrapezoid nucleus. *eNeuro* 5: 1–11.
<https://doi.org/10.1523/ENEURO.0404-18.2018>
61. *Hill E, Hickman C, Diez R, Wall M* (2020) Role of A1 receptor-activated GIRK channels in the suppression of hippocampal seizure activity. *Neuropharmacology* 164: 107904.
<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2019.107904>
62. *Lüscher C, Jan LY, Stoffel M, Malenka RC, Nicoll RA* (1997) G Protein-Coupled Inwardly Rectifying K⁺ Channels (GIRKs) Mediate Postsynaptic but Not Presynaptic Transmitter Actions in Hippocampal Neurons. *Neuron* 19: 687–695.
[https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80381-5](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80381-5)
63. *Kim CS, Johnston D* (2015) A1 adenosine receptor-mediated GIRK channels contribute to the resting conductance of CA1 neurons in the dorsal hippocampus. *J Neurophysiol* 113: 2511–2523.
<https://doi.org/10.1152/jn.00951.2014>
64. *Ladera C, Del Carmen Godino M, Cabañero MJ, Torres M, Watanabe M, Luján R, Sánchez-Prieto J* (2008) Pre-synaptic GABAB receptors inhibit glutamate release through GIRK channels in rat cerebral cortex. *J Neurochem* 107: 1506–1517.
<https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2008.05712.x>
65. *Fernández-Alacid L, Watanabe M, Molnár E, Wickman K, Luján R* (2011) Developmental regulation of G protein-gated inwardly-rectifying K⁺ (GIRK/Kir3) channel subunits in the brain. *Eur J Neurosci* 34: 1724–1736.
<https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2011.07886.x>
66. *Luján R, Marron Fernandez de Velasco E, Aguado C, Wickman K* (2014) New insights into the therapeutic potential of Girk channels. *Trends Neurosci* 37: 20–29.
<https://doi.org/10.1016/j.tins.2013.10.006>
67. *Yum DS, Cho JH, Choi IS, Nakamura M, Lee JJ, Lee MG, Choi BJ, Choi JK, Jang IS* (2008) Adenosine A1 receptors inhibit GABAergic transmission in rat tuberomammillary nucleus neurons. *J Neurochem* 106: 361–371.
<https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2008.05400.x>
68. *Garcia N, Priego M, Obis T, Santafé MM, Tomàs M, Besalduch N, Lanuza Ma, Tomàs J* (2013) Adenosine A1 and A2A receptor-mediated modulation of acetylcholine release in the mice neuromuscular junction. *Eur J Neurosci* 38: 2229–2241.
<https://doi.org/10.1111/ejn.12220>
69. *Tomàs J, Santafé MM, Garcia N, Lanuza MA, Tomàs M, Besalduch N, Obis T, Priego M, Hurtado E* (2014) Presynaptic membrane receptors in acetylcholine release modulation in the neuromuscular synapse. *J Neurosci Res* 92: 543–554.
<https://doi.org/10.1002/jnr.23346>
70. *Tsentsevitsky AN, Khaziev EF, Kovyazina IV, Petrov AM* (2022) GIRK channel as a versatile regulator of neurotransmitter release via L-type Ca²⁺-channel-dependent mechanism in the neuromuscular junction. *Neuropharmacology* 209: 109021.
<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2022.109021>
71. *Petrov AM, Zakirjanova GF, Kovyazina IV, Tsentsevitsky AN, Bukharaeva EA* (2022) Adrenergic receptors control frequency-dependent switching of the exocytosis mode between “full-collapse” and “kiss-and-run” in murine motor nerve terminal. *Life Sci* 296: 120433.
<https://doi.org/10.1016/j.lfs.2022.120433>
72. *Tsentsevitsky AN, Gafurova CR, Mukhutdinova KA, Giniatullin AR, Fedorov NS, Malomouzh AI, Petrov AM* (2023) Sphingomyelinase modulates synaptic vesicle mobilization at the mice neuromuscular junctions. *Life Sci* 318.
<https://doi.org/10.1016/j.lfs.2023.121507>

Bdnf Prodomain Inhibits Neurotransmitter Quantal Release in Mouse Motor Synapses with the Necessary Participation of Sortilin and Adenosine A₁-receptors**A. I. Molchanova^a, O. P. Balezina^a, and A. E. Gaydukov^{a,*}***^aLomonosov Moscow State University, Moscow, Russia***e-mail: gaydukov@gmail.com*

Brain neurotrophin (BDNF) is synthesized by proteolysis of proneurotrophin to form mature BDNF and the prodomain, whose regulatory activity on neuromuscular transmission is just beginning to be studied. At motor synapses, the BDNF prodomain has an inhibitory effect, stimulating GIRK potassium channels via activation of p75 receptors. The aim of this work was to study the initiation and implementation of the mechanism of inhibitory action of the BDNF prodomain in mature motor synapses of the mouse diaphragm. Microelectrodes were used to record spontaneous (miniature) and multiquantal endplate potentials evoked by stimulation of motor axons (MEPP and EPP, respectively). Using selective antagonists, it was revealed that the inhibitory effect of the prodomain on synaptic transmission requires the participation of sortilin, but not TrkB receptors. Stimulation of GIRK induced by the prodomain requires the participation of synaptic metabotropic receptors, which ensure the action of $\beta\gamma$ -subunits of Gi proteins on GIRK. Using selective inhibitors, it was found that M2 cholinergic receptors and P2Y₁₃ purinoceptors negatively regulate presynaptic L-type calcium channels, but these metabotropic receptors are not functionally related to the action of the BDNF prodomain. It turned out that the inhibition of quantal release of acetylcholine in motor synapses caused by BDNF prodomain requires the activity of the adenosine A₁-receptors only. In addition, when pannexin 1 was pharmacologically blocked by probenecid, the BDNF prodomain lost its inhibitory effect on neuromuscular transmission. Thus, BDNF prodomain-induced inhibition of quantal neurotransmitter release in mouse motor synapses requires the participation of sortilin and endogenous activation of adenosine A₁-receptors, which requires the functioning of pannexins 1, which most likely provide an additional source of synaptic ATP to the vesicular one.

Keywords: neuromuscular synapse, BDNF prodomain, sortilin, adenosine A₁-receptors, pannexin 1