

DOI: 10.7868/S0869813918060047

**ИЗМЕНЕНИЯ УРОВНЯ КАЛЬЦИЯ В МОТОРНОМ НЕРВНОМ
ОКОНЧАНИИ МЫШИ ПРИ АКТИВАЦИИ МЕТАБОТРОПНЫХ
ХОЛИНОРЕЦЕПТОРОВ И РЕЦЕПТОРОВ ГАМК**

© Н. В. Жилияков,^{1, 2} Э. Ф. Хазиев,^{1–3} А. Р. Латфуллин,^{1, 3} А. И. Маломуж,^{1, 2}
Э. А. Бухараева,^{1, 2} Е. Е. Никольский,^{1, 2} Д. В. Самигуллин^{1–3}

¹ Казанский институт биохимии и биофизики, Федеральный исследовательский
центр «Казанский научный центр РАН», Казань, Россия
E-mail: kiosak71@gmail.com

² Казанский федеральный (Приволжский) университет, Казань, Россия

³ Казанский национальный исследовательский технический университет
им. А. Н. Туполева, Казань, Россия

Ранее в нервно-мышечном синапсе млекопитающих были обнаружены метаботропные холинорецепторы (мХР) и рецепторы к гамма-аминомасляной кислоте (ГАМК). Активация обоих типов рецепторов приводит к изменению интенсивности кальций-зависимого квантового выделения ацетилхолина (АХ). В данной работе с помощью метода регистрации кальциевых сигналов (Ca^{2+} транзientа) оценивали изменения уровня кальция в двигательных нервных окончаниях при аппликации лигандов данных рецепторов. Было показано, что мускарин (агонист мХР) снижает амплитуду кальциевого транзientа, тогда как атропин (блокатор мХР), наоборот, приводит к увеличению сигнала. При этом аппликация ГАМК никоим образом не влияет на параметры транзientа. Следовательно, механизм регуляции нейросекреции АХ, запускаемый мХР, может опосредоваться за счет изменения уровня кальция в нервной терминали, тогда как влияние ГАМК на процесс нейросекреции АХ реализуется через молекулярные механизмы, не связанные напрямую с метаболизмом кальция в моторном окончании.

Ключевые слова: нервно-мышечный синапс, мускариновые холинорецепторы, кальциевый транзient, ГАМК.

Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова. Т. 104. № 6. С. 640—646. 2018

N. V. Zhilyakov,^{1, 2} E. F. Khaziev,^{1–3} A. R. Latfullin,^{1, 3} A. I. Malomouzh,^{1, 2} E. A. Bukharaeva,^{1, 2} E. E. Nikolsky,^{1, 2} D. V. Samigullin.^{1–3} CHANGES OF CALCIUM LEVEL IN MOUSE MOTOR NERVE ENDING DURING ACTIVATING METABOTROPIC CHOLINORECEPTORS AND GABA RECEPTORS. ¹ Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics, Federal Research Center «Kazan Scientific Center of the RAS», Kazan, Russia, e-mail: kiosak71@gmail.com; ² Kazan Federal University, Kazan, Russia; ³ Kazan National Research Technical University named after A. N. Tupolev, Kazan, Russia.

Earlier, metabotropic cholinergic receptors (mAChRs) and gamma-aminobutyric acid (GABA) receptors were detected in the mammalian neuromuscular junction. Activation of both receptor types leads to change in the intensity of calcium-induced acetylcholine (ACh) quantal release. In this study, we estimated the changes in the calcium level in the motor nerve endings

during the ligands of these receptors application using the method of recording calcium signals (transient). It was shown that muscarine (agonist of mAChR) reduces the amplitude of the calcium transient, whereas atropine (mAChR blocker), on the contrary, leads to increasing the signal. In this case, the GABA application does not affect the parameters of the transient. Consequently, the mechanism of ACh release regulation, triggered by mAChR, can be mediated by change in the calcium level in the nerve ending, whereas the effect of GABA on the ACh neurotransmission is realized by molecular mechanisms not directly related to calcium metabolism in the motor nerve ending.

Key words: neuromuscular junction, muscarinic cholinergic receptors, calcium transient, GABA.

RUSSIAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY. V. 104. N 6. P. 640—646. 2018

Уже к середине 70-х гг. XX в. были получены первые данные о том, что блокаторы метаботропных мускариновых холинорецепторов изменяют амплитудно-временные параметры токов концевой пластинки [4, 8]. И хотя прошло уже более 40 лет, тем не менее вопрос об участии рецепторов в функционировании нервно-мышечного контакта все еще актуален и продолжает интенсивно изучаться в настоящее время [10, 15, 22]. Как оказалось, трудности в данных исследованиях были обусловлены наличием нескольких популяций мускариновых холинорецепторов, различающихся как по механизмам трансдукции сигнала, так и по их локализации в пределах одного и того же нервно-мышечного соединения. Так, у позвоночных в нервно-мышечном синапсе обнаруживаются как минимум две группы метаботропных холинорецепторов: это M_1 - и M_2 -подтипы. Однако появляются данные и о наличии других подтипов [20, 22, 23]. Установлено, что эффекты активации M_1 - и M_2 -рецепторов в нервно-мышечном синапсе в большинстве своем являются противоположными и отражаются, в частности, на процессах выделения медиатора [7, 17, 20, 21]. Так, если активация M_1 -холинорецепторов приводит к облегчению, то активация M_2 -холинорецепторов — к угнетению секреции квантов ацетилхолина [17, 20, 21].

Сравнительно недавно нами были обнаружены в нервно-мышечном синапсе метаботропные рецепторы к гамма-аминомасляной кислоте (ГАМК) [3], которая, судя по всему, способна играть определенную сигнальную роль в данном периферическом межклеточном контакте [16]. Оказалось, что активация метаботропных ГАМК-рецепторов, как и в случае с активацией M_2 -холинорецепторов, приводит к снижению интенсивности вызванной квантовой секреции ацетилхолина [14].

Анализ данных литературы позволяет предположить, что при активации метаботропных как холинорецепторов, так и ГАМК-рецепторов может иметь место один и тот же молекулярный механизм, основанный на модуляции активности кальциевых каналов мембраны нервного окончания [5, 6]. Возможно, именно снижение входа кальция в нервное окончание при активации метаботропных рецепторов и является причиной снижения интенсивности вызванной квантовой секреции ацетилхолина. Проверка данного предположения и легла в основу настоящего исследования, целью которого стала оценка изменений уровня кальция в нервном окончании при активации метаботропных холинорецепторов и метаботропных ГАМК-рецепторов.

МЕТОДИКА

Для оценки изменения внутриклеточного содержания ионов кальция в нервных окончаниях теплокровных животных при воздействии на пресинаптические рецепторы применяли методику регистрации кальциевого транзиента — оптический метод регистрации кальциевого тока, основанный на использовании специальных кальций-чувствительных флуоресцентных красителей.

Эксперименты выполняли на изолированном нервно-мышечном препарате *m. Levator auris longus* мыши в растворе Рингера следующего состава (мМ): NaCl — 135, KCl — 5, MgCl₂ — 1, NaH₂PO₄ — 1, NaHCO₃ — 12, глюкоза — 11, CaCl₂ — 2; pH раствора поддерживали на уровне 7.2—7.4. Загрузку кальциевого красителя в двигательные моторные окончания Oregon Green 488 BAPTA-1 Hexapotassium Salt в концентрации 5 мМ осуществляли через культуру нерва [1, 19].

Регистрацию флуоресцентного сигнала осуществляли с помощью фотометрической установки на базе микроскопа Olympus BX-51 с водно-иммерсионным объективом × 60 и высокоскоростной камеры Neuro CCD (Redshirt Imaging). В качестве источника освещения использовали монохроматор Polychrom V (Till Photonics, Munich, Германия), который был настроен на длину волны возбуждения красителя 488 нм. Для выделения флуоресцентного сигнала использовали следующий набор фильтров: 505DCXT дихроическое зеркало, E520LP эмиссия (Chroma). Для уменьшения фонового свечения область освещения ограничивали при помощи диафрагмы.

Стимуляцию двигательного нерва осуществляли прямоугольными импульсами длительностью 0.2 мс супрамаксимальной величины с частотой 0.5 имп/с при помощи «всасывающего» электрода [2].

Эксперименты осуществляли по следующему протоколу: блокировали мышечные сокращения с помощью μ -конотоксина GPHB (10 мкМ), записывали контрольные сигналы, после чего апплицировали вещество с помощью системы общей перфузии в течение 20 мин и регистрировали сигнал под действием вещества. Применяли следующие вещества: мускарин (10 мкМ), атропин (1 мкМ, 10 мкМ) и ГАМК (1 мкМ, 1 мМ).

Регистрировали сигнал от кальциевого красителя с частотой 500—1000 кадров/с. Для анализа данных использовали программное обеспечение камеры Neuro CCD и ImageJ. В программном обеспечении камеры Neuro CCD усредняли 20 повторов, сделанных для каждой записи кальциевого сигнала, а затем экспортировали результат в файл с расширением *.fit, поддерживаемый программой ImageJ. В ImageJ вычитали усредненное значение свечения фоновой области и представляли данные как отношение: $(\Delta F/F_0 - 1) \cdot 100\%$, где ΔF — интенсивность флуоресценции во время стимуляции, а F_0 — интенсивность флуоресценции в состоянии покоя. Статистическую обработку результатов проводили с помощью *t*-критерия Стьюдента для связанных выборок. Достоверными считали различия при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

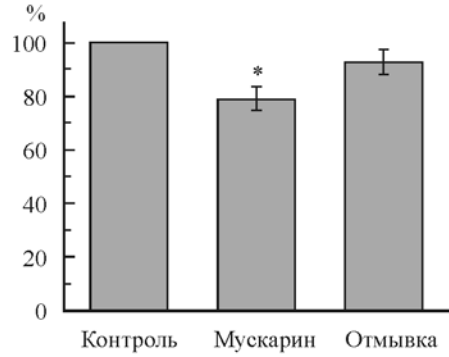
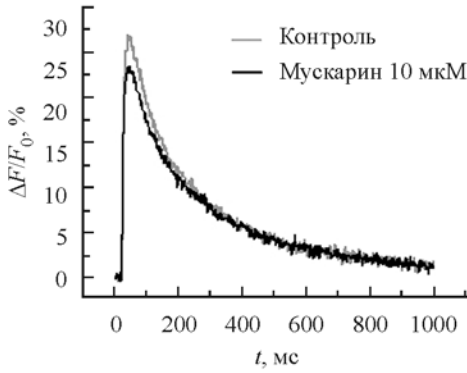
В ходе контрольных экспериментов было установлено, что амплитудно-временные параметры регистрируемых кальциевых сигналов не претерпевают достоверных изменений на протяжении как минимум 90 мин.

Аппликация «классического» агониста метаботропных холинорецепторов мускарина в концентрации 10 мкМ приводила к снижению амплитуды кальциевого транзientа на $21 \pm 4.5\%$ ($n = 8$, $p < 0.05$; см. рисунок, А) и данный эффект был обратимым. Так, за 40 мин. времени отмывки препарата (обработки раствором Рингера) кальциевый транзient восстановился до $92.7 \pm 4.4\%$ от уровня контроля ($n = 5$, $p > 0.05$; см. рисунок).

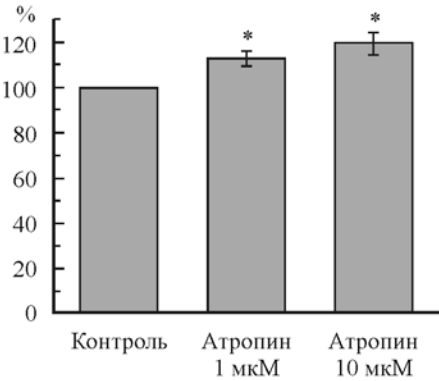
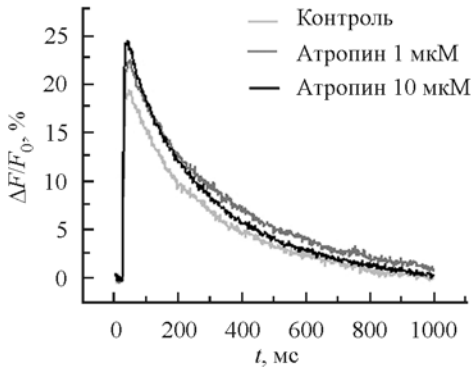
Добавление в раствор блокатора мускариновых рецепторов атропина в концентрациях 1 и 10 мкМ приводило к увеличению транзientа на 12.7 ± 3 и $19.6 \pm 4.6\%$ соответственно (в обеих сериях $n = 8$, $p < 0.05$; см. рисунок, Б).

Аппликация ГАМК в концентрации 1 мкМ не оказывала достоверного действия на амплитуду кальциевого транзientа, которая составила $96.2 \pm 7.3\%$ ($n = 7$, $p > 0.05$; см. рисунок, В). Более того, увеличение концентрации аминокислоты

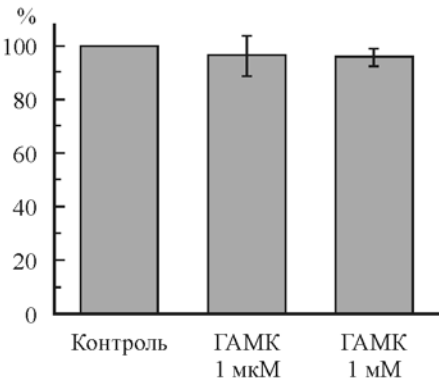
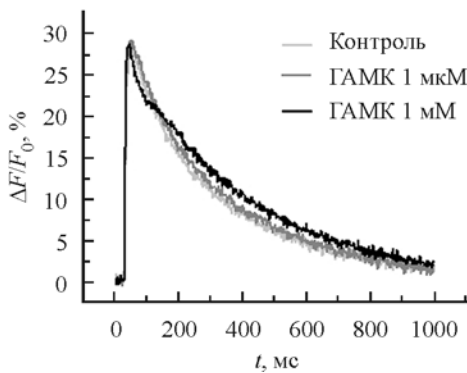
A



B



B



Изменения кальциевого транзientа в двигательных нервных окончаниях *m. Levator auris longus* мыши при аппликации агониста (мускарин, 10 мкМ; панель A) и блокатора (атропин, 1 и 10 мкМ; панель B) мускариновых метаболотропных рецепторов, а также отсутствие изменений в кальциевом транзientе при добавлении агониста ГАМК-рецепторов (ГАМК, 1 мкМ и 1 мМ; панель B).

В левой части панелей представлены нативные записи (средние по 20 сигналам) в одном эксперименте; в правой части панелей проиллюстрированы средние значения и ошибки, выраженные в процентах от контрольного значения амплитуды транзientа (по всем экспериментам в серии). * $p < 0.05$ по сравнению с контролем.

до 1 мМ также не повлияло на регистрируемые кальциевые ответы. Амплитуда транзientа в данном случае составила $95.65 \pm 3.1 \%$ ($n = 7, p > 0.05$; см. рисунок, В).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Разработанная нами технология избирательной загрузки красителя в нервную терминаль, а также использование высокоскоростной регистрации интенсивности флуоресценции, позволили получить данные об изменениях уровня кальция именно в пресинаптической области нервно-мышечного контакта при аппликации фармакологических агентов. В данном случае это особенно важно, поскольку показано, что мускариновые холинорецепторы могут локализоваться не только на нервном окончании, но и на мембране пресинаптических Шванновских клеток [9], а также на мембране скелетного мышечного волокна [12, 18]. Метаботропные рецепторы к ГАМК также могут быть локализованы как на моторном нервном окончании [3, 14], так и на Шванновских клетках периферической нервной системы [11].

Полученные данные однозначно свидетельствуют о том, что при активации пресинаптических мускариновых холинорецепторов уменьшается поступление ионов кальция в нервную терминаль. Вероятнее всего, это происходит вследствие взаимодействия метаботропных холинорецепторов с кальциевыми каналами плазматической мембраны [6]. Особого внимания заслуживают данные, полученные в экспериментах с атропином, которые доказывают, что мускариновые холинорецепторы активируются тонически эндогенно выделяемым ацетилхолином. Причем это может быть ацетилхолин, не только оставшийся в синаптической щели после предыдущего вызванного квантового ответа, но и медиатор, выделяющийся спонтанно как в квантовой, так и в неквантовой форме [13].

Изменение регистрируемого кальциевого сигнала на 10—20 % при активации мускариновых рецепторов в действительности способно приводить к значительным изменениям в количестве выделяемых квантов медиатора. Так, ранее нами в экспериментах на нервно-мышечном синапсе лягушки было показано, что уменьшение концентрации кальция во внеклеточном растворе от 0.6 до 0.3 мМ/л приводило к падению амплитуды Ca^{2+} транзientа на 23 %, тогда как количество выделившихся квантов ацетилхолина при этом уменьшалось более чем на 80 %, что соответствует высокой степени нелинейности зависимости квантового состава от концентрации Ca^{2+} [10].

Отсутствие какого-либо эффекта ГАМК (даже при использовании аминокислоты в достаточно высокой концентрации 1 мМ) позволяет утверждать, что активация метаботропных ГАМК-рецепторов никак не сказывается на активности кальциевых каналов. Следовательно, обнаруженный нами ранее угнетающий эффект ГАМК на интенсивность вызванной квантовой секреции (падение квантового состава вызванных ответов более чем на 30 % при аппликации 10 мкМ ГАМК [14]) реализуется каким-то другим кальций-независимым молекулярным механизмом.

Таким образом, обобщая полученные данные, можно заключить, что в моторных синапсах млекопитающих сигнальные пути, регулирующие вызванное квантовое выделение ацетилхолина посредством активации метаботропных рецепторов, могут реализоваться как влияя на процесс входа ионов кальция в нервное окончание посредством изменения активности мускариновых холинорецепторов, так и не изменяя его интенсивности при участии метаботропных ГАМК-рецепторов.

Работа поддержана грантом РФ (17-15-01279).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- [1] *Жиляков Н. В., Хазиев, Э. Ф., Судаков И. А., Казаков А. Г., Александров М. В., Самигуллин Д. В.* Загрузка кальциевого красителя в двигательные нервные окончания теплокровных через культу нерва. *Международ. н.-и. журн.* 3(45) : 13—15. 2016.
- [2] *Казаков А., Александров М., Жиляков Н. В., Хазиев Э. Ф., Самигуллин Д. В.* Простой всасывающий электрод для электрической стимуляции биологических объектов. *Международ. н.-и. журн.* 9(40) : 13—16. 2015.
- [3] *Маломуж А. И., Нуруллин Л. Ф., Никольский Е. Е.* Иммуногистохимическое доказательство наличия метаботропных рецепторов к гамма-аминомасляной кислоте в нервно-мышечных синапсах крысы. *Доклады АН.* 463(4) : 483—486. 2015.
- [4] *Adler M., Albuquerque E. X.* An analysis of the action of atropine and scopolamine on the end-plate current of frog sartorius muscle. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 196(2) : 360—372. 1976.
- [5] *Bettler B., Kaufmann K., Mosbacher J., Gassmann M.* Molecular structure and physiological functions of GABA(B) receptors. *Physiol. Rev.* 84(3) : 835—867. 2004.
- [6] *Brown D. A.* Regulation of neural ion channels by muscarinic receptors. *Neuropharmacology.* doi: 10.1016/j.neuropharm.2017.11.024. 2017.
- [7] *Dudel J.* The time course of transmitter release in mouse motor nerve terminals is differentially affected by activation of muscarinic M1 or M2 receptors. *Eur. J. Neurosci.* 26(8) : 2160—2168. 2007.
- [8] *Feltz A., Large W. A.* Effect of atropine on the decay of miniature end-plate currents at the frog neuromuscular junction. *Br. J. Pharmacol.* 56(1) : 111—113. 1976.
- [9] *Georgiou J., Robitaille R., Charlton M. P.* Muscarinic control of cytoskeleton in perisynaptic glia. *J. Neurosci.* 19(10) : 3836—3846. 1999.
- [10] *Khaziev E., Samigullin D., Zhilyakov N., Fatikhov N., Bukharaeva E., Verkhatsky A., Nikolsky E.* Acetylcholine-induced inhibition of presynaptic calcium signals and transmitter release in the frog neuromuscular junction. *Front. Physiol.* 7:621. doi: 10.3389/fphys.2016.00621. 2016.
- [11] *Magnaghi V., Ballabio M., Consoli A., Lambert J. J., Roglio I., Melcangi R. C.* GABA receptor-mediated effects in the peripheral nervous system: a cross-interaction with neuroactive steroids. *J. Mol. Neurosci.* 28 : 89—102. 2006.
- [12] *Malomouzh A. I., Arkhipova S. S., Nikolsky E. E., Vyskočil F.* Immunocytochemical demonstration of M1 muscarinic acetylcholine receptors at the presynaptic and postsynaptic membranes of rat diaphragm endplates. *Physiol. Res.* 60 : 185—188. 2011.
- [13] *Malomouzh A. I., Mukhtarov M. R., Nikolsky E. E., Vyskočil F.* Muscarinic M1 acetylcholine receptors regulate the non-quantal release of acetylcholine in the rat neuromuscular junction via NO-dependent mechanism. *J. Neurochem.* 102(6) : 2110—2117. 2007.
- [14] *Malomouzh A. I., Petrov K. A., Nurullin L. F., Nikolsky E. E.* Metabotropic GABAB receptors mediate GABA inhibition of acetylcholine release in the rat neuromuscular junction. *J. Neurochem.* 135(6) : 1149—1160. 2015.
- [15] *Nadal L., Garcia N., Hurtado E., Simó A., Tomàs M., Lanuza M. A., Cilleros V., Tomàs J.* Presynaptic muscarinic acetylcholine receptors and TrkB receptor cooperate in the elimination of redundant motor nerve terminals during development. *Front. Aging Neurosci.* 9: 24. doi: 10.3389/fnagi.2017.00024. 2017.
- [16] *Nurullin L. F., Nikolsky E. E., Malomouzh A. I.* Elements of molecular machinery of GABAergic signaling in the vertebrate cholinergic neuromuscular junction. *Acta Histochem.* 120(3) : 298—301. 2018.
- [17] *Oliveira L., Timoteo M. A., Correia-de-Sa P.* Modulation by adenosine of both muscarinic M1-facilitation and M2-inhibition of [3H]-acetylcholine release from the rat motor nerve terminals. *Eur. J. Neurosci.* 15(11) : 1728—1736. 2002.
- [18] *Reyes R., Jaimovich E.* Functional muscarinic receptors in cultured skeletal muscle. *Arch. Biochem. Biophys.* 331(1) : 41—47. 1996.
- [19] *Samigullin D., Khaziev E., Zhilyakov N., Bukharaeva E., Nikolsky E.* Loading a calcium dye into frog nerve endings through the nerve stump: calcium transient registration in the frog neuromuscular junction. *J. Vis. Exp.* 125. 2017.
- [20] *Santafe M. M., Salon I., Garcia N., Lanuza M. A., Uchitel O. D., Tomas J.* Modulation of ACh release by presynaptic muscarinic autoreceptors in the neuromuscular junction of the newborn and adult rat. *Eur. J. Neurosci.* 17(1) : 119—127. 2003.

[21] *Slutsky I., Parnas H., Parnas I.* Presynaptic effects of muscarine on ACh release at the frog neuromuscular junction. *J. Physiol.* 514(3) : 769—782. 1999.

[22] *Tsentsevitsky A. N., Kovyazina I. V., Nurullin L. F., Nikolsky E. E.* Muscarinic cholinoreceptors (M1-, M2-, M3- and M4-type) modulate the acetylcholine secretion in the frog neuromuscular junction. *Neurosci. Lett.* 649 : 62—69. 2017.

[23] *Wright M. C., Potluri S., Wang X., Dentcheva E., Gautam D., Tessler A., Wess J., Rich M. M., Son Y. J.* Distinct muscarinic acetylcholine receptor subtypes contribute to stability and growth, but not compensatory plasticity, of neuromuscular synapses. *J. Neurosci.* 29(47) : 14 942—14 955. 2009.

Поступила 23 IV 2018