

Шувалова М. Л., Носов Г. А., Белоусов В. В. РОЛЬ РЕДОКС-ЗАВИСИМОГО РЕМОДЕЛИРОВАНИЯ ЦИТОСКЕЛЕТА ЭНДОТЕЛИОЦИТОВ В НАРУШЕНИИ ПРОНИЦАЕМОСТИ ГЕМАТОЭНЦЕФАЛИЧЕСКОГО БАРЬЕРА.....	148
Пурик А. А., Калининченко А. Л., Мухаметшина Л. Ф., Круть В. Г., Мальцев Д. И., Подгорный О. В., Белоусов В. В. ДОСТАВКА КАНАЛА TRPV1 ЧЕЛОВЕКА В ТОРМОЗНЫЕ НЕЙРОНЫ ДЛЯ ТЕРМОГЕНЕТИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ ЭПИЛЕПСИИ.....	159
Жирнов С. В., Каршиева С. Ш., Тунеков Т. А., Илясов А. Р. ПОЛУЧЕНИЕ И СВОЙСТВА ПРОТОТИПА БИОГИБРИДНОГО НЕЙРОИНТЕРФЕЙСА НА ОСНОВЕ КОМПОЗИЦИОННОГО ПОЛИМЕРА И КЛЕТОЧНЫХ СФЕРОИДОВ	164
Джэппи Д., Калининченко А. Л., Солюс Г. М., Мальцев Д. И., Богданова Ю. А., Мухаметшина Л. Ф., Петрухова Е. О., Соколов Р. А., Мощенко А. А., Шайдуров В. А., Розов А. В., Подгорный О. В., Белоусов В. В. ХЕМОГЕНЕТИЧЕСКИ ВЫЗВАННЫЙ ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ СТРЕСС ВЛИЯЕТ НА СИНАПТИЧЕСКУЮ ПЛАСТИЧНОСТЬ В ПИРАМИДАЛЬНЫХ КЛЕТКАХ CA1.....	168
Молодцова А. А., Носов Г. А. ИНДУЦИРОВАННЫЙ СИНАПТОГЕНЕЗ В ГЕТЕРОЛОГИЧЕСКОЙ СИСТЕМЕ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СИНАПТИЧЕСКИХ АДГЕЗИВНЫХ БЕЛКОВ	172
Дунаев А. В. БИОФОТОНИКА В РЕШЕНИИ ЗАДАЧ НЕВРОЛОГИИ	175
Кордюкова М. Ю., Мещерякова В. И., Пешкова Е. С., Абакумова Т. О., Белоусов В. В. ПОВЫШЕННАЯ АКТИВНОСТЬ ТИОРЕДОКСИНРЕДУКТАЗНОЙ АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ КАК ФАКТОР УСТОЙЧИВОСТИ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ГЛИОБЛАСТОМЫ К ХИМИОТЕРАПИИ	180
Ледяева В. С., Сулягин В. К., Корженевский Д. А., Кудряшова О. М., Шохина А. Г. МУЛЬТИОМИКСНЫЙ ПОДХОД К ИЗУЧЕНИЮ МОЛЕКУЛЯРНЫХ ОСОБЕННОСТЕЙ ФЕРРОПТОЗА	184

УДК 612.816.7

СОПРЯЖЕНИЕ ПРЕСИНАПТИЧЕСКИХ МЕТАБОТРОПНЫХ РЕЦЕПТОРОВ И КАЛИЕВЫХ КАНАЛОВ GIRK ПРИ РЕГУЛЯЦИИ КВАНТОВОЙ СЕКРЕЦИИ НЕЙРОТРАНСМИТТЕРА ПРОДОМЕНОМ BDNF В МОТОРНЫХ СИНАПСАХ МЫШИ

DOI 10.24412/CL-37124-2023-9-15

Гайдуков А. Е.¹, Молчанова А. И.¹

¹ Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова
gaydukovae@my.msu.ru

Аннотация. Эндогенная активация пресинаптических аденозиновых A1-рецепторов, но не P2Y13-рецепторов или M2-холинорецепторов, необходима для стимуляции каналов GIRK под действием продомена BDNF в моторных синапсах, приводя к комплексному торможению квантовой секреции ацетилхолина.

Ключевые слова: нервно-мышечный синапс, продомен BDNF, GIRK, паннексин, аденозин.

Нейротрофин мозга (BDNF) — хорошо известный регулятор нейрогенеза модулятор передачи сигнала в синапсах ЦНС. Присутствие зрелого BDNF и мембранных рецепторов (TrkB и p75), действуя на которые, нейротрофин может запускать комплекс сигнальных путей, было выявлено во всех компонентах моторных синапсов млекопитающих — нервном окончании, постсинаптической мембране мышечных волокон и перисинаптических Шванновских клетках [1]. В настоящее время BDNF рассматривается как один из представителей разнообразного по составу семейства миокинов, который способен высвобождаться из мышечных волокон и функционировать как ретроградный мессенджер [2]. При этом трактовка синаптических модуляторных воздействий BDNF in vivo требует учета возможного одновременного действия побочного продукта его созревания из проBDNF — продомена BDNF, чья сигнальная роль которого только начала изучаться в моторных синапсах. В ЦНС продомен BDNF может играть независимую регуляторную

роль, влияя на проявления долговременной синаптической пластичности [3]. Недавно мы установили, что продомен BDNF оказывает на синаптическую передачу в моторных 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 ацетилхолина при приходе пресинаптического ПД. Снижение амплитуды многоквантовых ПКП под действием продомена BDNF реализуется не только за счет уменьшения амплитуд отдельных квантов в составе вызванных ПКП, но и за счет понижения их квантового состава [4]. Негативное влияние на частоту МПКП и квантовый состав ПКП, во-первых, свидетельствует о наличии пресинаптической компоненты у тормозного действия продомена BDNF на квантовую секрецию ацетилхолина, а, во-вторых, могло быть связано с уменьшением пресинаптического входа ионов Ca^{2+} за счет возрастания активности пресинаптических K^{+} -каналов. Мы установили, что тормозное действие продомена BDNF в наномолярной концентрации реализуется за счет активации им рецепторного комплекса $\rho 75$ /сортилин и запуска Rho-киназного сигнального каскада, направленного на стимулирование (за счет активности риаодиновых рецепторов пресинаптических Ca^{2+} -депо) Ca^{2+} -активируемых K^{+} -каналов низкой проводимости (SK) и G-белок сцепленных калиевых каналов входящего выпрямления (GIRK) [4]. GIRK требуют дуальной активации — за счет их взаимодействия с мембранным фосфолипидом PIP2 (на увеличение его уровня, вероятно, направлен запускаемый продоменом BDNF Rho-киназный сигнальный путь) и $\beta\gamma$ -субъединицами G_i -белков [5]. В моторных синапсах млекопитающих наличествует целый ансамбль пресинаптических метаболитных рецепторов, сопряженных с G_i -белками. К числу наиболее вероятных кандидатов можно отнести мускариновые M2-холинорецепторы, аденозиновые A_1 -рецепторы и P2Y13-пуринорецепторы. Необходимо было установить, какие именно из них вовлечены в реализацию негативного действия продомена BDNF на нервно-мышечную передачу?

Объектом исследования были нервно-мышечные препараты диафрагмы взрослых мышей линии C57/Bl6 обоих полов. Регистрацию спонтанной секреции квантов ацетилхолина (МПКП) и быстрой синхронной многоквантовой секреции (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. Данный паттерн стимуляции (короткие высокочастотные залпы) использовали, потому что это напоминает паттерн разрядки мотонейронов, иннервирующих дыхательную мускулатуру, и квантовая секреция в данном случае проявляет характерные компоненты кратковременной синаптической пластичности. Регистрацию синаптической активности проводили с использованием усилителя Neuroprobe Amplifier Model 1600 (A-M Systems) и аналого-цифровой преобразователя E-154 (L—Card) с интерфейсом PowerGraph 6.0. Для анализа данных использовали программное обеспечение MiniAnalysis (Synaptosoft), последующую статистическую обработку проводили в GraphPad Prism 8. В каждой серии экспериментов использовали не менее трех нервно-мышечных препаратов. В контроле регистрировали активность не менее 5 разных синапсов. Затем в перфузионный раствор добавляли определенные фармакологические препараты и регистрировали активность разных синапсов на протяжении 40—60 мин. Анализировали изменения мембранного потенциала мышечных волокон, амплитудно-временные характеристики МПКП и ПКП. Проводили расчёт квантового состава ПКП с использованием коррективы амплитуд ПКП на нелинейную суммацию. Нормальность распределения значений параметров в выборках оценивали с использованием критерия Д'Агостино-Пирсона. Применяли t-критерий Стьюдента при сравнении нормально распределенных величин параметров МПКП и ПКП, в ином случае — критерий Манна-Уитни. Двухфакторный дисперсионный анализ с апостериорным критерием Тьюки использовали при сравнении изменений амплитуд и квантового состава ПКП в коротких залпах. Данные представлены в виде среднего \pm стандартная ошибка среднего, уровень значимости $p = 0.05$.

Сначала мы проверяли возможную роль активности мускариновых M2-холинорецепторов в качестве коактиватора GIRK при действии продомена BDNF. Ингибитор M2-холинорецепторов метоктрамин (0.1 мкМ) вызывал равномерное увеличение амплитуд и квантового состава каждого ПКП в коротком высокочастотном залпе по сравнению с контролем, не оказывая влияния на амплитудно-временные характеристики МПКП. Данные изменения могли свидетельствовать о вовлечении в регуляцию выброса квантов

ацетилхолина Ca^{2+} -каналов L-типа [6]. Действительно, метоктрамин-индуцированное усиление вызванного выброса ацетилхолина полностью предотвращалось под действием нитрендипина (1 мкМ)-блокатора этого типа Ca^{2+} -каналов, который сам по себе не влияет на амплитуду и квантовый состав ПКП в залпах. При этом в присутствии метоктрамина и нитрендипина продомен BDNF полностью сохранил способность угнетать квантовую секрецию ацетилхолина.

Совокупность полученных данных свидетельствует, во-первых, о том, что мускариновые M2-холинорецепторы 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-холинорецепторы не сопряжены с GIRK и не участвуют в их стимуляции под действием продомена BDNF.

Ранее мы показали, что тормозное влияние на вызванный выброс ацетилхолина со стороны пуринорецепторов (A_1 и P2Y13) требует функционирования каналов, образованных паннексином 1 (паннексон), в качестве дополнительному к везикулярному источнику синаптической АТФ [7]. Кроме того, в моторных синапсах мышей, нокаутных по гену паннексина1, и имеющих нормальные характеристики квантовой секреции АХ [8], продомен BDNF утрачивал способность ее угнетать [4]. Недавно мы выявили, что фармакологическое блокирование паннексон пробенецидом (1 мМ) не приводит к изменениям параметров вызванной многоквантовой секреции ацетилхолина в моторных синапсах мышей дикого типа [8]. Однако, как и в нервно-мышечных синапсах мышей, нокаутных по гену паннексина1, при заблокированных пробенецидом паннексонах в моторных синапсах мышей дикого типа продомен BDNF полностью утрачивал способность уменьшать амплитуды МПКП и ПКП и снижать квантовый состав ПКП в коротких ритмических залпах.

Эти данные говорят о том, что для вовлечения GIRK в регуляцию квантовой секреции ацетилхолина в моторных синапсах под действием продомена BDNF необходимо адекватное функционирование компонентов пуринергической модулирующей системы. Нам оставалось выяснить, эндогенная активация каких пуринорецепторов — P2Y13 или A_1 — в условиях залповой активности моторных синапсов будет обеспечивать GIRK-опосредованное тормозное 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 текущего исследования мы установили, что активность P2Y13-рецепторов, как и мускариновых M2-холинорецепторов, направлена на предотвращение вовлечения в регуляцию квантовой секреции АХ Ca^{2+} -каналов L-типа — потенцирующее действие MRS2211 в отношении вызванного выброса ацетилхолина предотвращалось нитрендипином. Однако продомен BDNF при ингибировании P2Y13-рецепторов MRS2211 и заблокированных нитрендипином Ca^{2+} -каналах L-типа эффективно проявлял свое тормозное влияние на квантовую секрецию АХ — угнетал как амплитуду постсинаптических потенциалов, так и квантовый состав ПКП. Таким образом, мы убедились, что, несмотря на присутствие в моторных синапсах мыши P2Y13-рецепторов, их активность и физиологическую значимость как негативных регуляторов выброса ацетилхолина, они не сопряжены с активацией GIRK и комплексным торможением секреции ацетилхолина под влиянием продомена BDNF.

Уже известно, что A_1 -рецепторы, благодаря их активации эндогенным аденозином, тормозят квантовую секрецию АХ и препятствуют вовлечению Ca^{2+} -каналов L-типа [6,7]. 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.

Таким образом, проведенные нами исследования впервые показали, что эндогенная активация именно пресинаптических аденозиновых A_1 -рецепторов, давно известных в качестве тормозящих нервно-мышечную передачу в моторных синапсах млекопитающих, необходима для реализации комплексного механизма угнетения квантовой секреции ацетилхолина 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 ацетилхолина в моторных синапсах мыши.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта 22—25—00111.

Список литературы

1. Garcia N, Tomàs M, Santafe MM, Lanuza MA, Besalduch N, Tomàs J. Localization of brain-derived neurotrophic factor, neurotrophin-4, tropomyosin-related kinase b receptor, and p75 NTR receptor by high-resolution immunohistochemistry on the adult mouse neuromuscular junction. *J. Peripher. Nerv. Syst.* 2010;15 (1):40—49.
2. Gaydukov A, Bogacheva P, Tarasova E, Molchanova A, Miteva A, Pravdivceva E, Balezina O. Regulation of Acetylcholine Quantal Release by Coupled Thrombin/BDNF Signaling in Mouse Motor Synapses. *Cells.* 2019;8 (7):762.
3. Kojima M, Matsui K, Mizui T. BDNF pro-peptide: physiological mechanisms and implications for depression. *Cell Tissue Res.* 2019;377 (1):73—79.
4. Bogacheva PO, Molchanova AI, Pravdivceva ES, Miteva AS, Balezina OP, Gaydukov AE. ProBDNF and Brain-Derived Neurotrophic Factor Prodomain Differently Modulate Acetylcholine Release in Regenerating and Mature Mouse Motor Synapses. *Front. Cell. Neurosci.* 2022;16:866802.
5. Luo H, Marron Fernandez de Velasco E, Wickman K. Neuronal G protein-gated K⁺ channels. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2022; 323 (2): 439—460.
6. Tarasova E, Miteva A, Gaidukov A, Balezina O. The role of adenosine receptors and L-type calcium channels in the regulation of the mediator secretion in mouse motor synapses. *Biochem. Moscow Suppl. Ser. A Membr. Cell Biol.* 2015;15:318—328.
7. Miteva AS, Gaydukov AE, Shestopalov VI, Balezina OP. The role of pannexin 1 in the purinergic regulation of synaptic transmission in mouse motor synapses. *Biochem. Moscow Suppl. Ser. A Membr. Cell Biol.* 2017;11:311—320.
8. Miteva AS, Gaydukov AE, Balezina OP. Acetylcholine release in mouse motor synapses. Changes of purinergic regulation under conditions of pharmacological blockade of pannexin 1 and its genetic knockout. *Biochem. Moscow Suppl. Ser. A Membr. Cell Biol.* 2021;15:378—386.

COUPLING OF PRESYNAPTIC METABOTROPIC RECEPTORS AND GIRK POTASSIUM CHANNELS DURING REGULATION OF QUANTAL NEUROTRANSMITTER RELEASE BY BDNF PRODOMAIN IN MOUSE MOTOR SYNAPSES

Gaydukov A. E. ¹, Molchanova A. I. ¹

¹ M. V. Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

Abstract: Endogenous activation of presynaptic adenosine A1 receptors, but not P2Y13 receptors or M2 cholinergic receptors, is necessary for stimulation of GIRK channels under the action of the BDNF prodomain in motor synapses, leading to complex inhibition of acetylcholine quantal release.

Key words: neuromuscular junction, BDNF prodomain, GIRK, pannexin, adenosine.