

УДК 612.816:612.815.2:576.5:577.25

МУСКАРИНОВЫЕ АЦЕТИЛХОЛИНОВЫЕ РЕЦЕПТОРЫ ПОДТИПОВ M1–M5 В СОМАТИЧЕСКОЙ МУСКУЛАТУРЕ ДОЖДЕВОГО ЧЕРВЯ *Lumbricus terrestris*

© 2022 г. Л. Ф. Нуруллин^{1, 2, *}, Е. М. Волков^{1, **}

¹Казанский государственный медицинский университет, Казань, 420012 Россия

²Казанский институт биохимии и биофизики – обособленное структурное подразделение
Федерального исследовательского центра КазНЦ РАН, Казань, 420111 Россия

*E-mail: lenizn@yandex.ru

**E-mail: euroworm@mail.ru

Поступила в редакцию 07.04.2022 г.

После доработки 17.04.2022 г.

Принята к публикации 19.04.2022 г.

Методами иммунофлуоресцентной конфокальной микроскопии исследовали наличие и распределение семейства мускариновых ацетилхолиновых рецепторов M1–M5 подтипов в соматических мышечных клетках и холинергических синапсах кожно-мышечного мешка дождевого червя *Lumbricus terrestris*. Установлено, что рецепторы всех подтипов неравномерно распределены в экстрасинаптических зонах мышечных клеток, а также присутствуют в зоне концевых пластинок. Рецепторы подтипов M2, M3, M4 и M5, за исключением подтипа M1, определяются и на пресинаптических мембранах двигательных нервных окончаний.

Ключевые слова: мускариновые ацетилхолиновые рецепторы, соматическая мускулатура, холинергические синапсы, аннелиды

DOI: 10.31857/S0041377122040034

Двигательная иннервация соматической мускулатуры аннелид имеет холинергическую природу (Rozkova, 1973; Walker et al., 1993). Аппликация ацетилхолина (АХ) на мембрану соматических клеток кожно-мышечного мешка дождевого червя вызывает ее деполяризацию. В то же время применение Н-холиноблокаторов (d-тубокурарина, α -бунгаротоксина, гексаметония), а также М-холинолитиков (атропина) не препятствует деполяризующему эффекту экзогенного АХ (Volkov et al., 2001). Последнее указывает на некоторые фармакологические особенности постсинаптических АХ-рецепторов соматических клеток (Walker et al., 1993; Volkov et al., 2007). При этом их принадлежность к каноническим АХ-рецепторам никотинового или мускаринового типов остается до конца неясной. Также известно, что квантовая секреция в холинергических нервно-мышечных синапсах позвоночных модулируется при участии АХ-рецепторов М-типа (Minic et al., 2002; Nikolsky et al., 2004).

В этой связи, несомненный интерес представляет задача по идентификации мускариновых рецепторов семейства подтипов M1–M5 в соматических мы-

шечных клетках и двигательных холинергических нервно-мышечных синапсах аннелид на примере клеток кожно-мышечного мешка дождевого червя с учетом принципиально важного обстоятельства, что данная соматическая двигательная мускулатура является эволюционно-первичной в длинном филогенетическом ряду животных.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Объект и приготовление препаратов. Выделенные препараты фрагментов кожно-мышечного мешка дождевого червя *Lumbricus terrestris* закрепляли с помощью иголок на дне чашек Петри, залитых смолой Sylgard, и перфузировали раствором Древеца–Пакса (состав (мМ): 77 NaCl, 4 KCl, 43 Na₂SO₄, 6 CaCl₂, 2 триса и 167 сахарозы; pH 7.4) около 30 мин при комнатной температуре (22 ± 1°C). Далее в течение 30 мин препараты фиксировали в 2%-ном растворе *p*-формальдегида, отмывали 3 раза по 30 мин в фосфатно-солевом буфере (ФБ, состав (мМ): 137 NaCl, 2.7 KCl, 4.3 Na₂SO₄, 1.4 KH₂PO₄, pH 7.2). Мышцы последовательно инкубировали: 30 мин в 0.5%-ном растворе Triton X-100; 15 мин в растворе, содержащем 5% козьей сыворотки, 1% бычьего сывороточного альбумина (БСА) и 0.5% Triton X-100; 15 мин в

Принятые сокращения: АХ – ацетилхолин; БСА – бычий сывороточный альбумин; ТМР – тетраметилродамин; ТМР- α -Б – тетраметилродамин- α -бунгаротоксин; ФБ – фосфатно-солевой буферный раствор.

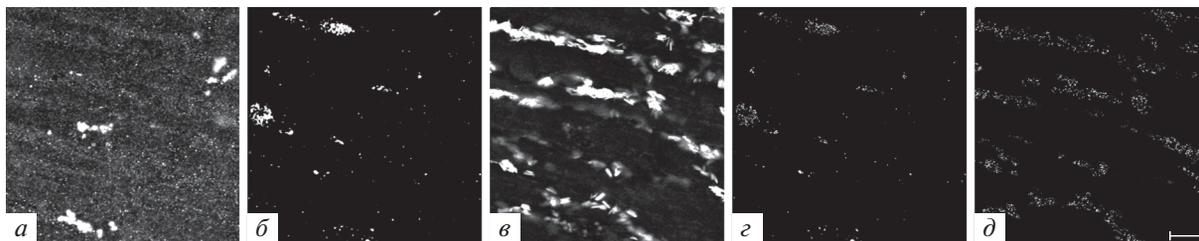


Рис. 1. Флуоресцентное тройное окрашивание препарата соматических мышечных волокон дождевого червя *Lumbricus terrestris*. *a* – Окрашивание антителами к M1-мускариновому АХ-рецептору; *б* – окрашивание антителами к пресинаптическому белку синаптофизину; *в* – окрашивание TMR- α -Б никотиновых АХ-рецепторов. Здесь и на рис. 2–5: *z* – программно-обработанное изображение, полученное при совмещении изображений *a* и *б* (мускариновый рецептор и синаптофизин), демонстрирующее только совпадающие при наложении изображений светлые пиксели; *d* – программно-обработанное изображение, полученное при совмещении изображений *a* и *в* (мускариновый рецептор и TMR- α -Б), показывающее только совпадающие при наложении изображений светлые пиксели. При наложении двух изображений, светлые пиксели, присутствующие только на одном из изображений, на итоговых изображениях не учитывались. Таким образом, можно увидеть места совпадения окрашивания на указанные маркеры. Масштабная линейка на рис. 1–5: 10 мкм.

растворе 1% БСА и 0.5% Triton X-100 (раствор А). Все эти растворы были приготовлены на основе ФБ.

Окрашивание препаратов. Препараты инкубировали в течение 12 ч при температуре 4°C в растворе А с поликлональными антителами к мускариновым АХ-рецепторам подтипов M1, M2, M3, M4, M5 (1 : 200) и синаптофизину (1 : 200). Препараты отмывали в растворе А 3 раза по 30 мин и инкубировали 1 ч при комнатной температуре с соответствующими вторичными антителами, конъюгированными с Alexa 488 или 647 (1 : 800) в растворе А. Окрашивание постсинаптических никотиновых АХ-рецепторов производили с помощью тетраметилпродамин- α -бунгаротоксина (TMR- α -Б, 20 мкг/мл; время инкубации 30 мин). Для подтверждения специфичности связывания поликлональных антител с соответствующими белками проводили контрольные эксперименты. Для негативного контроля препарат инкубировали с вторичными антителами без предшествующей инкубации с первичными антителами. Для позитивного контроля производили инкубацию препарата с первичными антителами в присутствии иммуногенного пептида, на который вырабатывались первичные антитела. Отсутствие окрашивания в контрольных экспериментах указывает на специфичность связывания антител с соответствующими пептидами.

Микроскопия. После отмывки в ФБ, препараты помещали в раствор ФБ с глицерином (1 : 1) и размещали на предметном стекле для проведения микроскопического исследования на лазерном сканирующем конфокальном микроскопе Leica TCS SP5 MP (Leica Microsystems, США). Использовали масляный иммерсионный объектив 63 \times /1.4. Для возбуждения эмиссии флуорофоров применялся аргоновый и гелий-неоновый лазеры. Длины волн возбуждения для флуорофоров: Alexa 488 – 488 нм, TMR – 543 нм, Alexa 647 – 633 нм. Анализ полученных конфокальных изображений проводили в программе ImageJ (NIH, США).

Реактивы. В работе использовали *p*-формальдегид, трис, Тритон X-100, нормальную козью сыворотку, БСА, TMR- α -Б, глицерин (Sigma-Aldrich); первичные поликлональные антитела и соответствующие им иммуногенные пептиды (Santa Cruz Biotechnologies, США); антитела вторичные Alexa 488 и Alexa 647 (Invitrogen, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для локализации двигательных нервных окончаний использовали окрашивание на синаптофизин – интегральный мембранный гликопротеин синаптических везикул (Valtorta et al., 2004; Kwon, Chapman, 2011), а для маркирования никотиновых АХ-рецепторов постсинаптической мембраны – TMR- α -Б (Krause, Wernig, 1985; Nurullin et al., 2011).

Иммуногистохимическое окрашивание фрагментов соматической мускулатуры дождевого червя с целью выявления АХ-рецепторов M1-подтипа носит диффузный характер, встречаясь по всей поверхности мембран соматических клеток (рис. 1*a*), сочетаясь с наличием ограниченных мест более интенсивного окрашивания (рис. 1*a*). При этом необходимо отметить, что данные зоны не перекрываются с районами окрашивания, маркированными на присутствие белка синаптофизина (рис. 1*a, б, z*). В то же время окрашивание на АХ-рецепторы M1-подтипа совпадает с локальным окрашиванием TMR- α -Б никотиновых АХ-рецепторов (рис. 1*a, в, d*). Полученные данные позволяют считать, что мускариновые АХ-рецепторы M1-подтипа присутствуют как в синаптических, так и во внесинаптических зонах мембран соматических мышечных клеток. Наличие АХ-рецепторов M1-подтипа в двигательных нервных окончаниях не подтверждается.

Иммуногистохимическое определение АХ-рецепторов подтипа M2 показало неоднородное окрашивание всей поверхности мембран соматических мышечных клеток (рис. 2*a*). При этом участки с вы-

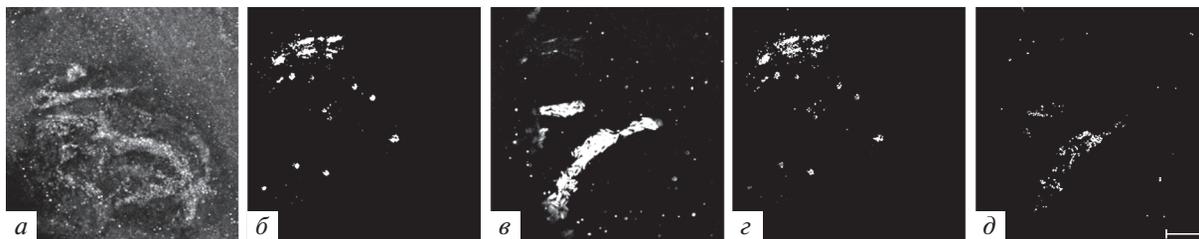


Рис. 2. Присутствие М2-мускариновых АХ-рецепторов при флуоресцентном тройном окрашивании препарата соматических мышечных волокон дождевого червя. *a* – Окрашивание антителами к М2-мускариновому АХ-рецептору; *б* – окрашивание антителами к пресинаптическому белку синаптофизину; *в* – окрашивание никотиновых рецепторов к АХ при помощи TMR- α -Б. *г, д*: см. подпись к рис. 1.

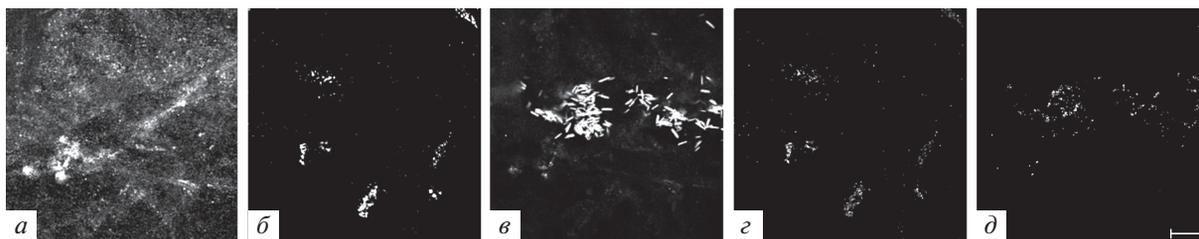


Рис. 3. Выявление М3-мускариновых АХ-рецепторов при тройном флуоресцентном окрашивании препарата соматических мышечных волокон дождевого червя. *a* – Окрашивание антителами к М3-мускариновому АХ-рецептору; *б* – окрашивание антителами к пресинаптическому белку синаптофизину; *в* – окрашивание никотиновых рецепторов к АХ при помощи TMR- α -Б. *г, д*: см. подпись к рис. 1.

явленным присутствием синаптофизина (рис. 2*а, б, г*) и TMR- α -Б (рис. 2*а, в, д*) совпадали с наличием метки на АХ-рецепторы М2-подтипа. Полученные результаты показывают присутствие в соматических мышечных клетках мускариновых АХ-рецепторов М2-подтипа, причем последние присутствуют как на постсинаптической мембране, так и, возможно, в двигательных нервных окончаниях.

Идентификация АХ-рецепторов подтипа М3 выявила их неравномерное окрашивание по всей поверхности мышечных клеток (рис. 3*а*). В ряде районов окрашивание на М3-рецепторы перекрывалось с зонами выявления белка синаптофизина (рис. 3*а, б, г*), а также постсинаптических никотиновых АХ-рецепторов (рис. 3*а, в, д*). Можно думать, что АХ-рецепторы подтипа М3 присутствуют как в двигательных

нервных окончаниях, так и во вне- и постсинаптических регионах мембраны мышечных клеток кожного мускульного мешка.

Иммунофлуоресцентная идентификация мускариновых АХ-рецепторов подтипа М4 показала их присутствие в экстрасинаптической зоне мембран мышечных клеток (рис. 4*а*). При этом М4-рецепторы четко фиксировались в областях окрашивания на синаптофизин (рис. 4*а, б, г*) и никотиновые АХ-рецепторы (рис. 4*а, в, д*). Полученные результаты позволяют считать, что рецепторы М4-подтипа присутствуют как на пре-, так и на постсинаптических мембранах нервно-мышечных синапсов.

Мускариновые АХ-рецепторы М5-подтипа обнаруживаются в виде протяженных структур свечения

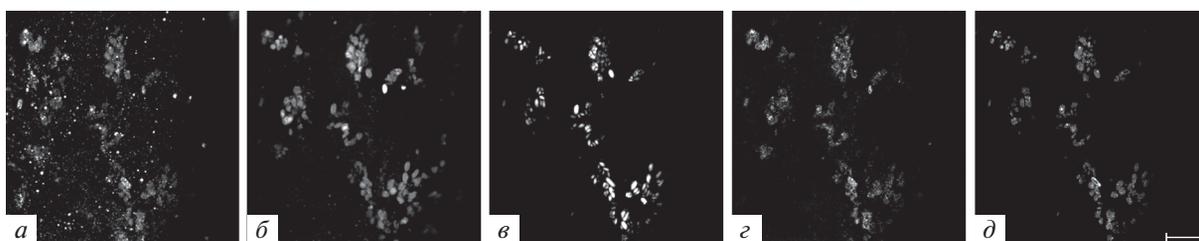


Рис. 4. Наличие М4-мускариновых АХ-рецепторов при тройном флуоресцентном окрашивании препарата соматических мышечных волокон дождевого червя. *a* – Окрашивание антителами к М4-мускариновому АХ-рецептору; *б* – окрашивание антителами к пресинаптическому белку синаптофизину; *в* – окрашивание никотиновых рецепторов к АХ при помощи TMR- α -Б. *г, д*: см. подпись к рис. 1.

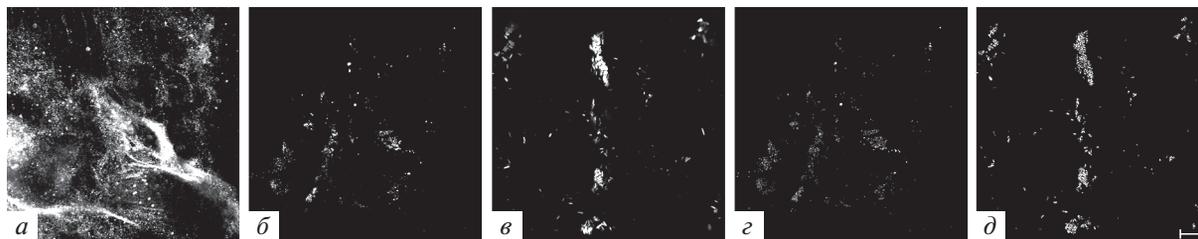


Рис. 5. Обнаружение M5 мускариновых АХ-рецепторов при флуоресцентном тройном окрашивании препарата соматических мышечных волокон дождевого червя. *a* – Окрашивание антителами к M5-мускариновому АХ-рецептору; *b* – окрашивание антителами к пресинаптическому белку синаптофизину; *c* – окрашивание никотиновых рецепторов к АХ при помощи TMR- α -Б. *d*, *e*: см. подпись к рис. 1.

(рис. 5*a*), которое в некоторых районах сопряжено одновременно с окрашиванием на белок синаптофизин (рис. 5*a*, *b*, *c*) и никотиновые АХ-рецепторы (рис. 5*a*, *e*, *d*). При этом окрашивание на M5-рецепторы наблюдается и в экстрасинаптических зонах (рис. 5*a*). Также отмечается окрашивание на АХ-рецепторы M5-подтипа, совпадающее только с зонами выявления TMR- α -Б (рис. 5*a*, *e*, *d*). Таким образом, мускариновые АХ-рецепторы M5-подтипа широко представлены на вне-, пре- и постсинаптических мембранах мышечных клеток. Можно предположить, что существуют два типа синапсов. Первые – имеют на пресинаптической мембране рецепторы типа M5, тогда как вторые – нет. Либо это одни и те же двигательные терминалы, но находящиеся на разных стадиях своего формирования. Однако данные гипотезы требуют экспериментального подтверждения.

Проведенные исследования позволяют сделать следующее заключение. Мембраны соматических мышечных клеток кожно-мышечного мешка дождевого червя *Lumbricus terrestris* содержат семейство мускариновых АХ-рецепторов подтипов M1–M5. При этом мускариновые АХ-рецепторы всех подтипов присутствуют как во внесинаптических зонах, имея при этом неоднородный характер распределения, так и в мембранах концевых пластинок двигательных нервно-мышечных холинергических синапсов, тогда как никотиновые АХ-рецепторы локализуются исключительно в зоне нервно-мышечного контакта (Нуруллин, Волков, 2020). АХ-рецепторы подтипов M2, M3, M4 и M5, за исключением подтипа M1, определяются и в нервных двигательных терминалах.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках плановой темы исследований Казанского государственного медицинского университета и государственного задания ФИЦ КазНЦ РАН.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Авторы заявляют, что все манипуляции с животными соответствовали нормам российского законодательства, а так-

же рекомендациям Guide for the Care and Use of Laboratory Animals <http://www.nap.edu/openbook.php?isbn=0309053773>.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Нуруллин Л.Ф., Волков Е.М. 2020. Иммунофлуоресцентная идентификация изоформ субъединицы $\alpha 1$ потенциал-зависимых Ca^{2+} -каналов семейств Ca_v1 , Ca_v2 и Ca_v3 в зонах холинергических синапсов соматической мускулатуры дождевого червя *Lumbricus terrestris*. Цитология. Т. 62. № 2. С. 141. (Nurullin L.F., Volkov E.M. 2020. Immunofluorescent identification of $\alpha 1$ isoform subunits of voltage-gated Ca^{2+} -channels of Ca_v1 , Ca_v2 , and Ca_v3 families in areas of cholinergic synapses of somatic muscles in earthworm *Lumbricus terrestris*. Cell Tiss. Biol. V. 14. P. 316. <https://doi.org/10.1134/S1990519X20040070> <https://doi.org/10.31857/S0041377120020042>)
- Krause M., Wernig A. 1985. The distribution of acetylcholine receptors in the normal and denervated neuromuscular junction of the frog. J. Neurocytol. V. 14. P. 765. <https://doi.org/10.1007/BF01170827>
- Kwon S.E., Chapman E.R. 2011. Synaptophysin regulates the kinetics of synaptic vesicle endocytosis in central neurons. Neuron. V. 70. P. 847. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.04.001>
- 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. V. 15. P. 439. <https://doi.org/10.1046/j.0953-816x.2001.01875.x>
- Nikolsky E.E., Vyskocil F., Bukharaeva E.A., Samigullin D., Magazanik L.G. 2004. Cholinergic regulation of the evoked quantal release at frog neuromuscular junction. J. Physiol. V. 560. P. 77. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2004.065805>
- Nurullin L.F., Mukhitov A.R., Tsentsevitsky A.N., Petrova N.V., Samigullin D.V., Malomouzh A.I., Bukharaeva E.A., Nikolsky E.E., Vyskočil F. 2011. Voltage-dependent P/Q-type calcium channels at the frog neuromuscular junction. Physiol. Res. V. 60. P. 815. <https://doi.org/10.33549/physiolres.932219>

- Rozkova E.K. 1973. Pharmacology of cholinergic systems in annelids. In: International encyclopedia of pharmacology and therapeutics. Sect. 85. Elsevier, Oxford, New York. V. 1. P. 169.
- Valtorta F., Pennuto M., Bonanomi D., Benfenati F. 2004. Synaptophysin: leading actor or walk-on role in synaptic vesicle exocytosis? *Bioessays*. V. 26. P. 445. <https://doi.org/10.1002/bies.20012>
- Volkov E.M., Nurullin L.F., Volkov M.E., Nikolsky E.E., Vyskočil F. 2011. Mechanisms of carbacholine and GABA action on resting membrane potential and Na⁺/K⁺-ATPase of *Lumbricus terrestris* body wall muscles. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* V. 158. P. 520. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2010.12.016>
- Volkov E.M., Nurullin L.F., Nikolsky E., Vyskočil F. 2007. Miniature excitatory synaptic ion currents in the earthworm *Lumbricus terrestris* body wall muscles. *Physiol. Res.* V. 56. P. 655. <https://doi.org/10.33549/physiolres.931269>
- Walker R.J., Holden-Dye L., Franks C.J. 1993. Physiological and pharmacological studies on annelid and nematode body wall muscle. *Comp. Biochem. Physiol. C. Comp. Pharmacol. Toxicol.* V. 106. P. 49. [https://doi.org/10.1016/0742-8413\(93\)90253-h](https://doi.org/10.1016/0742-8413(93)90253-h)

Muscarinic Acetylcholine Receptors of M1–M5 Subtypes in the Somatic Muscle of the Earthworm *Lumbricus terrestris*

L. F. Nurullin^{a, b, *} and E. M. Volkov^{a, **}

^aKazan State Medical University, Kazan, 420012 Russia

^bKazan Institute of Biochemistry and Biophysics of Federal Research Center “Kazan Scientific Center of the Russian Academy of Sciences”, Kazan, 420111 Russia

*e-mail: lenizn@yandex.ru

**e-mail: euroworm@mail.ru

The presence and distribution of the family of muscarinic acetylcholine receptors M1–M5 subtypes in somatic muscle cells and cholinergic synapses of a body wall of earthworm *Lumbricus terrestris* was studied using immunofluorescent confocal microscopy. It has been established that receptors of all subtypes are non-uniform distributed in the extrasynaptic zones of muscle cells, and are also present in the zone of end plates. Receptors of the subtypes M2, M3, M4 and M5, with the exception of the M1 subtype, are determined on the presynaptic membranes of motor nerve endings.

Keywords: muscarinic acetylcholine receptors, somatic muscles, cholinergic synapses, annelids