

**ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ МЕХАНИЗМОВ УГНЕТЕНИЯ
КВАНТОВОГО ВЫДЕЛЕНИЯ АЦЕТИЛХОЛИНА ПРИ АКТИВАЦИИ
ВАНИЛЛОИДНЫХ (TRPV1) И ПУРИНОВЫХ РЕЦЕПТОРОВ
В НЕРВНО-МЫШЕЧНОМ СИНАПСЕ МЫШИ**

© 2021 г. А. Ю. Архипов¹, Н. В. Жиляков¹, А. И. Маломуж¹, Д. В. Самигуллин^{1, 2, *}

¹Казанский институт биохимии и биофизики Казанского научного центра РАН,
Казань, Россия

²Казанский национальный исследовательский технический университет им. А.Н. Туполева,
Казань, Россия

*E-mail: samid75@mail.ru

Поступила в редакцию 19.01.2021 г.

После доработки 05.02.2021 г.

Принята к публикации 05.02.2021 г.

Основной целью исследования стало изучение взаимосвязи между сигнальными путями регуляции квантового выделения ацетилхолина (АХ) в периферическом синапсе, которые инициируются активацией ваниллоидных и пуриновых рецепторов. В электрофизиологических экспериментах, проведенных на нервно-мышечном синапсе *m. Levator Auris Longus* мыши, было установлено, что частота миниатюрных потенциалов концевой пластинки (мПКП) и квантовый состав потенциалов концевой пластинки (ПКП) уменьшаются в присутствии агониста ваниллоидных рецепторов (TRPV1) капсаицина. Данный эффект полностью устранялся соединением SB 366791, специфическим конкурентным антагонистом TRPV1-рецепторов. АТФ, так же, как и капсаицин, снижал частоту мПКП и квантовый состав ПКП. На фоне антагониста TRPV1 угнетающий эффект АТФ на секрецию АХ реализовывался в полном объеме. В то же время на фоне активации TRPV1-каналов капсаицином действие АТФ как на спонтанную, так и на вызванную секрецию АХ отсутствовало. Было сделано предположение, что в основе механизмов действия АТФ и капсаицина может лежать изменение входа Ca^{2+} в нервное окончание. Для проверки этой гипотезы были проведены эксперименты по оценке изменений пресинаптического уровня кальция (Ca^{2+} -транзиента) при помощи флуоресцентного кальциевого красителя при стимуляции нерва. Амплитуда Ca^{2+} -транзиента не изменялась ни при аппликации АТФ, ни при добавлении капсаицина. Таким образом, в нервно-мышечном синапсе млекопитающих, наряду с пуринергическим путем регуляции АХ, имеет место и механизм модуляции нейросекреции, опосредованный активацией TRPV1-каналов. Запуск этих механизмов приводит к угнетению процессов как спонтанного, так и вызванного выделения квантов АХ из двигательного нервного окончания. Оба пути регуляции не сопровождаются изменением Ca^{2+} -транзиента, но имеют общее звено в регуляции квантового выброса медиатора.

Ключевые слова: нервно-мышечный синапс, ацетилхолин, TRPV1-рецептор, кальциевый транзистент, АТФ, нейросекреция

DOI: 10.31857/S0869813921040038

ВВЕДЕНИЕ

Синаптическая передача в нервно-мышечном соединении опосредуется высвобождением из нервного окончания молекул ацетилхолина (АХ), которые связываются с рецепторами АХ в постсинаптической области сарколеммы, что приводит к возникновению спонтанных или вызванных потенциалов концевой пластинки [1]. Модуляция синаптической передачи может опосредоваться как собственно молекулами АХ [2], так и синаптически активными молекулами, способными выделяться как из двигательной нервной терминали, так и из глиальных клеток. В качестве таких регуляторов могут выступать молекулы аденозин-5'-трифосфата (АТФ) и его производные, глутамат, N-ацетиласпартилглутамат, вещество Р (нейропептид из семейства тахикининов), оксид азота (NO) и др. [3–7].

Одним из наиболее активно изучаемых регуляторов нервно-мышечной трансмиссии является АТФ, который выделяется из синаптических везикул вместе с АХ [8]. Не только АТФ, но и его производные (АДФ, АМФ и аденозин) способны оказывать модуляторное действие на синаптическую передачу, активируя широкий спектр пуриновых рецепторов, среди которых выделяют две большие группы: рецепторы аденозина, или P1, и рецепторы P2, которые активируются АТФ, АДФ, уридин-5'-дифосфатом и уридин-5'-трифосфатом [8, 9]. АТФ и аденозин снижают уровень квантового высвобождения АХ, активируя пресинаптические пуриновые рецепторы [10, 11]. Предположительно, вышеупомянутые эффекты связаны с подавлением входа кальция в нервное окончание [10, 12].

АТФ является важным медиатором химически индуцированной ноцицепции и боли, высвобождаясь из поврежденной и/или воспаленной ткани [13]. АТФ сенситизирует каналы первого типа подсемейства TRPV, называемые ваниллоидными каналами (англ. “transient receptor potential cation channels”, TRPV1), активируемые капсаицином или протонами [14, 15]. Помимо протонов, в качестве эндогенных активаторов могут выступать такие воспалительные агенты, как “эндованиллоиды” (анандамид, N-арахидоноил дофамин и др.) [14, 16]. Получены данные, указывающие на присутствие TRPV1-каналов в периферических нервно-мышечных синапсах [17]. Активация этих каналов приводит к снижению количества выделяемых квантов АХ при стимуляции двигательного нерва [18].

Таким образом, механизм снижения выделения АХ из нервного окончания может запускаться активацией как пуриновых рецепторов, так и TRPV1-каналов. В связи с этим встал вопрос о наличии или отсутствии взаимосвязи между сигнальными путями регуляции выделения АХ, которые инициируются пуриновыми и ваниллоидными рецепторами. Также встает вопрос о том, могут ли в механизмах модуляторного действия пуринов и агонистов TRPV1-рецепторов на квантовую секрецию АХ в периферических нервных окончаниях теплокровных быть задействованы цепочки, связанные с изменением пресинаптического уровня кальция. Поиск ответов на эти вопросы и стал целью настоящего исследования.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Экспериментальные процедуры выполняли в соответствии с инструкциями по использованию лабораторных животных Казанского федерального университета и Казанского медицинского университета в соответствии с руководством NIH по уходу и использованию лабораторных животных. Протокол эксперимента соответствовал требованиям Директивы Совета европейских сообществ 86/609/ЕЕС.

Исследования были проведены на изолированных нервно-мышечных препаратах мышцы (линия BALB/c, *m. Levator Auris Longus*). Нервно-мышечные препараты помещали в ванночку объемом 3 мл, дно которой было покрыто смолой Sylgard (Dow Corning, США). Препараты растягивали на 15% от их исходного размера в

покое при помощи микроигл из нержавеющей стали. Через ванночку протекал раствор со скоростью 3 мл/мин. следующего состава (в мМ): 137 NaCl; 5 KCl; 1 MgCl₂; 2 CaCl₂; 1 Na₂HPO₄; 15 NaHCO₃; 11 глюкоза. Раствор аэрировали карбогеном (95% O₂, 5% CO₂), pH раствора составлял 7.2–7.4, температуру в ванночке поддерживали встроенными элементами Пельтье на уровне 20.0 ± 0.3°C.

Нерв раздражали прямоугольными стимулами длительностью 0.25 мс супрамаксимальной амплитуды с частотой 0.5 Гц при помощи всасывающего электрода. Во всех экспериментальных сериях сокращения нервно-мышечного препарата блокировали путем добавления в омывающий раствор μ -конотоксина GПВ 2 мкМ (Peptide Institute Inc., Япония).

В ходе экспериментов методами внутриклеточного отведения потенциала осуществлялась регистрация вызванных и спонтанных (миниатюрных) потенциалов концевой пластинки (ПКП и мПКП). Electrodes для измерения потенциалов изготавливались на приборе P-97 Micropipette Puller (Sutter Instrument, США). Сопротивление электродов составляло порядка 30 МОм. Заполнялись электроды 3-х молярным раствором KCl. Регистрация и анализ постсинаптических сигналов осуществлялась с помощью установки для электрофизиологических исследований, включающей в себя: микроскоп BX 51 (Olympus, Япония) с водно-иммерсионным объективом (увеличение 60 \times , апертура 1.00), двухканальный усилитель биопотенциалов AxoClamp 900A (Axon Instruments, США), стимулятор 2100 (A-M Systems, США), аналого-цифровой преобразователь Digidata 1440A (Axon Instruments, США) с частотой дискретизации 100 кГц, микроманипуляторы MPC-200 (Sutter Instruments, США) и компьютер. Для регистрации мембранного потенциала и непрерывной записи событий во время эксперимента к усилителю также был подключен медленный аналого-цифровой преобразователь MiniDigi 1B (Axon Instruments, США) с частотой дискретизации 1 кГц.

Обработка и регистрация данных производилась в программном пакете pCLAMP 10.4. Величина мембранного потенциала, при котором начинали регистрацию, варьировала в диапазоне 65–75 мВ. Результаты экспериментов, в которых мембранный потенциал покоя изменялся в течение опыта более, чем на 10 мВ не анализировались. В каждом эксперименте в одном синаптическом контакте регистрировали 30–50 вызванных ПКП, после чего, в течение 2-х минут записывали мПКП в контроле и после действия фармакологических агентов. Квантовый состав находили путем деления усредненных амплитуд вызванных ПКП на среднюю амплитуду мПКП. Для коррекции квантового состава на нелинейность суммации использовали поправку Мартина [19].

Для регистрации относительного изменения уровня Ca²⁺ в пресинаптической клетке (Ca²⁺-транзientа) использовалась фотометрическая система на базе микроскопа Olympus BX 51, оснащенная высокоскоростной чувствительной камерой Red Shirt Imaging Neuro CCD-smq camera (Red Shirt Imaging, США). Регистрация Ca²⁺-транзientа осуществлялась с использованием специфического Ca²⁺-чувствительного флуоресцентного красителя Oregon Green 488 Bapta 1 hexapotassium salt (Molecular Probes, США). Загрузку кальциевого красителя (1 мМ) в двигательные моторные окончания осуществляли через культю нерва [20].

Для записи и обработки данных в экспериментах по измерению Ca²⁺-транзientа использовались программы Turbo-SM и ImageJ. Данные представлены в виде отношения: $(\Delta F/F_0 - 1) \times 100\%$, где ΔF – интенсивность флуоресценции во время стимуляции, F_0 – интенсивность флуоресценции в состоянии покоя.

Эксперименты осуществляли по следующему протоколу: записывали контрольные сигналы, после чего апплицировали вещество с помощью системы общей перфузии в течение 20 мин и регистрировали сигналы под действием вещества. При-

меняли следующие вещества: капсаицин (1 мкМ, 10 мкМ), SB 366791 (5 мкМ) и АТФ (100 мкМ). В экспериментах с капсаицином и SB 366791 вещества предварительно растворяли в DMSO. В экспериментах, проведенных с этими агентами, в контрольный раствор добавляли такую же концентрацию DMSO, которая присутствовала в растворе с апплицируемым веществом. В конечном итоге концентрация DMSO в растворе не превышала 0.01%.

Экспериментальные данные представлены как среднее значение \pm ошибка среднего. В электрофизиологических экспериментах n – количество синапсов, соответствующее количеству нервно-мышечных препаратов. В экспериментах по регистрации кальциевого транзистента n – количество синапсов в нервно-мышечных препаратах от 4–6 животных. Для статистической обработки результатов использовали двухсторонний критерий Стьюдента. Проверку выборки на нормальное распределение проводили с помощью критерия Андерсона–Дарлинга. В экспериментах с тремя группами данных применяли поправку Бонферрони на множественную проверку гипотез. Различия считали статистически значимыми при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

На начальном этапе исследования оценивали влияние активации ваниллоидных и пуриновых рецепторов на процесс спонтанной квантовой секреции АХ. Частота мПКП в контроле в синапсах *m. LAL* составила 1.2 ± 0.1 имп/с ($n = 15$). На рис. 1 представлены фрагменты нативных записей миниатюрных потенциалов концевой пластинки и гистограммы распределения амплитуд мПКП в контроле и под действием капсаицина. Капсаицин в концентрациях 1 и 10 мкМ приводил к снижению частоты на $13.3 \pm 0.7\%$ ($p < 0.05$, $n = 7$) и $13.2 \pm 4.6\%$ ($p < 0.05$, $n = 4$) соответственно (рис. 1, 2). Так как не наблюдалось выраженного дозозависимого эффекта капсаицина на частоту (и, как показано ниже, на квантовый состав ПКП) в дальнейшем использовали агонист в концентрации 1 мкМ.

Конкурентный антагонист TRPV1-каналов SB 366791 в концентрации 5 мкМ не оказывал влияния на спонтанную секрецию АХ, и частота мПКП составляла $94.6 \pm 6.3\%$ относительно контроля ($p > 0.05$, $n = 8$; рис. 2), в то же время на фоне SB 366791 эффект капсаицина полностью отсутствовал ($109.0 \pm 7.7\%$; $p > 0.05$, $n = 8$; рис. 2). Следовательно, снижение уровня спонтанного выделения АХ под действием капсаицина опосредовано активацией TRPV1-каналов.

Ранее неоднократно было показано, что АТФ угнетающе влияет на процесс спонтанной нейросекреции АХ [10, 21, 22]. В наших экспериментах АТФ в концентрации 100 мкМ приводил к снижению частоты мПКП на $18.2 \pm 6.5\%$ ($p < 0.05$, $n = 6$; рис. 1, 2).

Поскольку АТФ способен модулировать работу TRPV1-каналов [14], то необходимо было оценить возможность реализации угнетающего действия нуклеозидтрифосфата посредством активации ваниллоидных рецепторов. На фоне антагониста TRPV1-каналов SB 366791 в концентрации 5 мкМ угнетающий эффект АТФ реализовывался в полном объеме, и частота мПКП снижалась на $25.5 \pm 6.8\%$ ($p < 0.05$, $n = 7$; рис. 2). В то же время на фоне активации TRPV1-каналов капсаицином действие АТФ на спонтанную квантовую секрецию устранялось, и частота мПКП соответствовала уровню, зарегистрированному в присутствии только капсаицина ($101.0 \pm 9.4\%$; $p > 0.05$, $n = 8$; рис. 2). Во всех экспериментах с добавлением АТФ наблюдалось увеличение времени спада мПКП, которое в среднем составляло 3.0 ± 0.2 мс ($n = 7$) в контроле. При аппликации только нуклеозидтрифосфата время спада увеличивалось на $28.3 \pm 11.0\%$ ($p < 0.05$, $n = 6$); в экспериментах, где АТФ добавляли на фоне антагониста TRPV1-каналов, данный параметр увеличивался на $57.7 \pm 16.3\%$ ($p < 0.05$, $n = 7$). В экспериментальной серии, когда апплицировали АТФ после

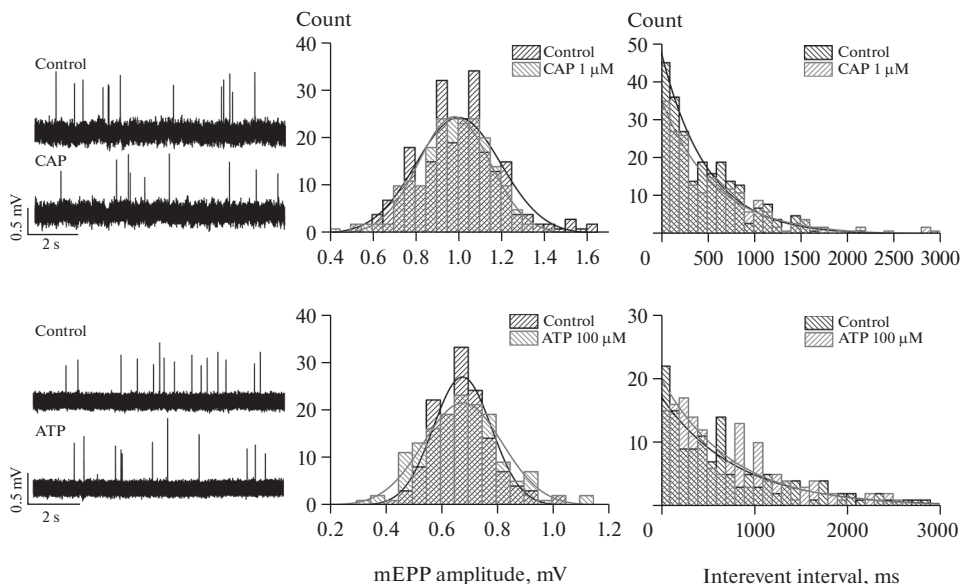


Рис. 1. Миниатюрные потенциалы концевой пластинки (mEPPs), зарегистрированные в нервно-мышечных синапсах *m. LAL* в контроле (Control), под действием капсаицина (CAP) и АТФ (АТР).

Представлены данные в рамках двух репрезентативных экспериментов: верхняя панель эксперимент с капсаицином, нижняя с АТФ. Слева – фрагменты нативных записей мПКП; в центре – гистограммы распределения амплитуд мПКП; справа – гистограммы распределения межимпульсных интервалов мПКП. Кривые на гистограммах – функции плотности вероятности для распределений Гаусса и Пуассона (черные – контроль, серые – после аппликации вещества).

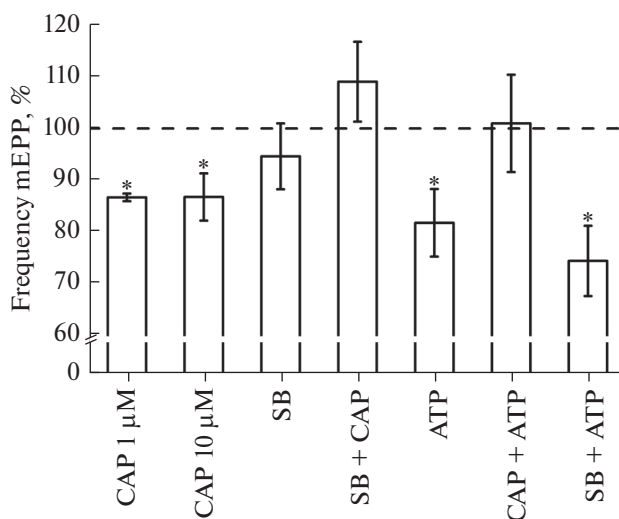


Рис. 2. Влияние агониста TRPV1-каналов капсаицина (CAP; 1 и 10 мкМ), блокатора TRPV1-каналов SB 366791 (SB; 5 мкМ) и АТФ (АТР; 100 мкМ) на частоту мПКП (Frequency mEPP), выраженную в процентах от контрольного значения. В экспериментах с SB 366791 и АТФ капсаицин использовали в концентрации 1 мкМ. Данные представлены как среднее ± стандартная ошибка среднего. $n = 4-8$, $*p < 0.05$ по сравнению с контролем.

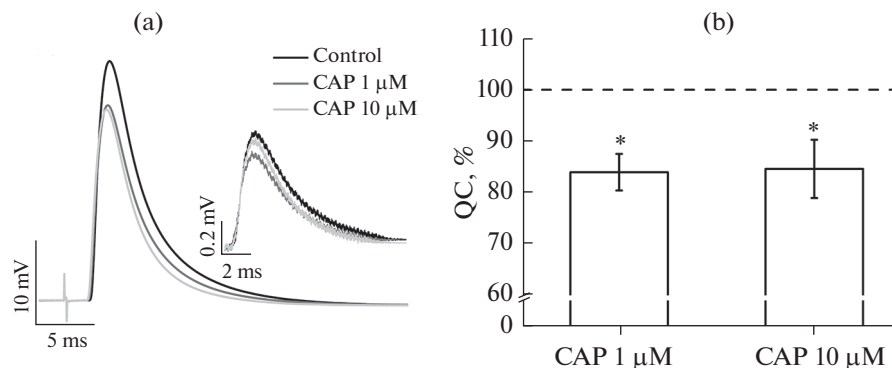


Рис. 3. Угнетающее влияние капсаицина (CAP) в концентрациях 1 мкМ ($n = 7$) и 10 мкМ ($n = 4$) на вызванное стимуляцией нерва выделение АХ. Панель (а) – нативные записи вызванных и миниатюрных потенциалов концевой пластинки (усредненные по 50 сигналам) в отдельно взятом эксперименте в контроле и после аппликации капсаицина. Панель (б) – относительное изменение величины квантового состава потенциалов концевой пластинки (QC), выраженное в процентах от контрольного значения (по всем экспериментам в серии). Данные представлены как среднее \pm стандартная ошибка среднего. * $p < 0.05$ по сравнению с контролем.

капсаицина, время спада возрастало на $65.0 \pm 7.9\%$ ($p < 0.5$, $n = 8$). Во всех других сериях (капсаицин 1 мкМ; капсаицин 10 мкМ; SB 366791; капсаицин 1 мкМ на фоне SB 366791) изменений во времени спада мПКП не наблюдалось ($p > 0.05$ во всех случаях).

Поскольку при активации TRPV1-рецепторов угнетающее влияние АТФ на частоту мПКП полностью отсутствует, то есть основания полагать наличие определенной взаимосвязи между сигнальными путями регуляции спонтанного выделения АХ, которые инициируются пуриновыми и ваниллоидными рецепторами. Возможность наличия такой взаимосвязи регуляторных механизмов была проверена далее в экспериментах с регистрацией вызванной квантовой секреции АХ.

Среднее значение квантового состава в контроле для препарата *m. LAL* составило $34.4 \pm 2.5\%$ ($n = 25$). Под действием капсаицина (1 мкМ) квантовый состав ПКП снижался на $16.0 \pm 3.6\%$ ($p < 0.05$, $n = 7$; рис. 3). Повышение концентрации капсаицина до 10 мкМ не приводило к увеличению угнетающего эффекта, квантовый состав снижался на $15.4 \pm 5.7\%$ ($p < 0.05$, $n = 4$; рис. 3). В присутствии антагониста TRPV1-каналов SB 366791 (5 мкМ) квантовый состав ПКП не изменялся ($102.2 \pm 4.1\%$; $p > 0.05$, $n = 8$; рис. 4), однако ингибирующий эффект капсаицина устранялся полностью ($101.1 \pm 2.1\%$; $p > 0.05$, $n = 8$; рис. 4).

Далее, как и в экспериментах со спонтанной квантовой секрецией, оценивали возможность взаимосвязи между пуринергическим и ваниллоидным сигнальными путями регуляции вызванного освобождения АХ.

АТФ в концентрации 100 мкМ снижал квантовый состав ПКП на $14.9 \pm 3.3\%$ ($p < 0.05$, $n = 6$; рис. 5). Данный угнетающий эффект АТФ на фоне антагониста TRPV1-каналов SB 366791 в концентрации 5 мкМ сохранялся, и квантовый состав снижался на $22.5 \pm 2.0\%$ ($p < 0.05$, $n = 7$; рис. 5). Далее было установлено, что АТФ на фоне активации TRPV1-каналов капсаицином не способен оказывать своего угнетающего влияния на вызванную квантовую секрецию АХ (квантовый состав составил $99.8 \pm 4.8\%$; $p > 0.05$, $n = 7$; рис. 5).

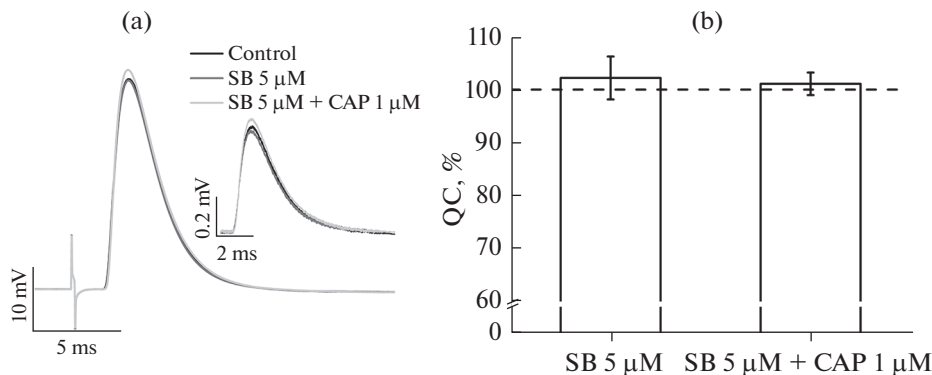


Рис. 4. Отсутствие влияния блокатора TRPV1-каналов SB 366791 (SB; 5 мкМ, $n = 8$), а также эффекта капсаицина (CAP; 1 мкМ, $n = 8$) в присутствии этого блокатора на вызванное стимуляцией нерва выделение АХ. Панель (а) – нативные записи вызванных и мПКП (усредненные по 50 сигналам) в отдельно взятом эксперименте в контроле и после аппликации фармакологических агентов. Панель (б) – относительное изменение величины квантового состава ПКП (QC), выраженное в процентах от контрольного значения (по всем экспериментам в серии). Данные представлены как среднее \pm стандартная ошибка среднего.

Как и в экспериментах с регистрацией мПКП, у вызванных ПКП также наблюдалось увеличение времени спада сигнала во всех случаях ($p < 0.05$), когда апплицировали АТФ (только АТФ, АТФ на фоне капсаицина, АТФ на фоне SB 366791). Эти данные предполагают наличие постсинаптического действия нуклеозидтрифосфата, не связанного напрямую с механизмом действия АТФ на процесс нейросекреции АХ.

Поскольку количество квантов АХ, выделившихся в ответ на стимуляцию двигательного нерва, сильно зависит от уровня входящего в нервную терминаль Ca^{2+} [23], то было сделано предположение, что в основе механизмов действия АТФ и капсаицина может лежать изменение входа Ca^{2+} . Проверка этого предположения весьма интересна, так как TRPV1-рецепторы представляют собой потенциал независимые кальциевые каналы [24].

При регистрации Ca^{2+} -транзientа в нервной терминали, амплитуда которого коррелирует с входом Ca^{2+} в нервное окончание и изменением квантового освобождения медиатора [25], были получены следующие результаты.

Аппликация как агониста (капсаицин, 1 мкМ), так и блокатора (SB 366791, 5 мкМ) TRPV1-рецепторов никак не повлияла на амплитуду Ca^{2+} -транзientа ($106.7 \pm 1.8\%$; $p > 0.05$, $n = 9$ и $101.4 \pm 1.3\%$; $p > 0.05$, $n = 18$ соответственно; рис. 6). При исследовании механизма действия АТФ также не было обнаружено значимого изменения в Ca^{2+} -транзientе, амплитуда которого составила $97.6 \pm 2.5\%$ ($p > 0.05$, $n = 12$; рис. 6).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В настоящем исследовании впервые был обнаружен феномен угнетающего влияния капсаицина на процесс спонтанной квантовой секреции АХ из двигательных нервных окончаний и доказано участие TRPV1-рецепторов в этом регуляторном процессе. Впервые в нервно-мышечном синапсе описан эффект применения соединения SB 366791, специфического конкурентного антагониста TRPV1, кото-

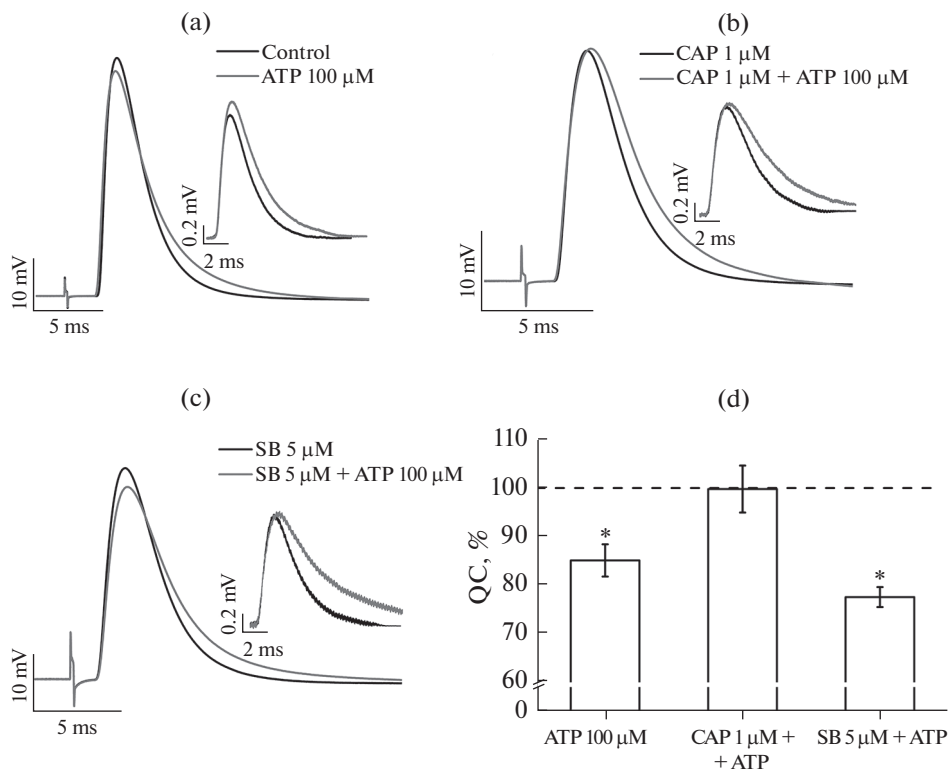


Рис. 5. Угнетающее влияние АТФ (АТФ; 100 мкМ) на вызванное стимуляцией нерва выделение АХ; отсутствие эффекта АТФ после предварительной аппликации агониста TRPV1-каналов капсаицина (CAP; 1 мкМ) и проявление угнетающего действия АТФ после блокады TRPV1-каналов SB 366791 (SB; 5 мкМ). Панели а, б и с – нативные записи вызванных и мПКП (усредненные по 50 сигналам) в отдельно взятом эксперименте в контроле и после аппликации фармакологических агентов. Панель д – относительное изменение величины квантового состава ПКП (QC), выраженное в процентах от контрольного значения (по всем экспериментам в серии). Данные представлены как среднее ± стандартная ошибка среднего. $n = 6-7$, * $p < 0.05$ по сравнению с контролем.

рый устраняет эффект капсаицина в более низкой концентрации, чем используемый в ряде работ капсазепин. Впервые показано, что предварительная активация TRPV1-каналов полностью препятствует развитию угнетающего действия АТФ как на спонтанную, так и на вызванную секрецию АХ. Впервые показано, что при инициации исследуемых регуляторных механизмов значимых изменений пресинаптического уровня кальция (Ca^{2+} -транзientа) при стимуляции нерва не происходит.

Феномен пуринергической модуляции выделения АХ из двигательной нервной терминали позвоночных установлен достаточно давно [8], относительно хорошо исследован [10, 21, 22], и продолжает изучаться по настоящий момент [26]. Полученные в нашей работе данные об угнетающем влиянии АТФ на процессы спонтанной и вызванной квантовой секреции в нервно-мышечном синапсе *m. LAL* полностью согласуются с данными литературы [21, 22]. Более того, нами получены доказательства наличия и постсинаптического действия АТФ, заключающиеся в увеличении времени спада сигналов (как мПКП, так и ПКП). Ранее было доказано, что в основе данного механизма действия АТФ на временные параметры пост-

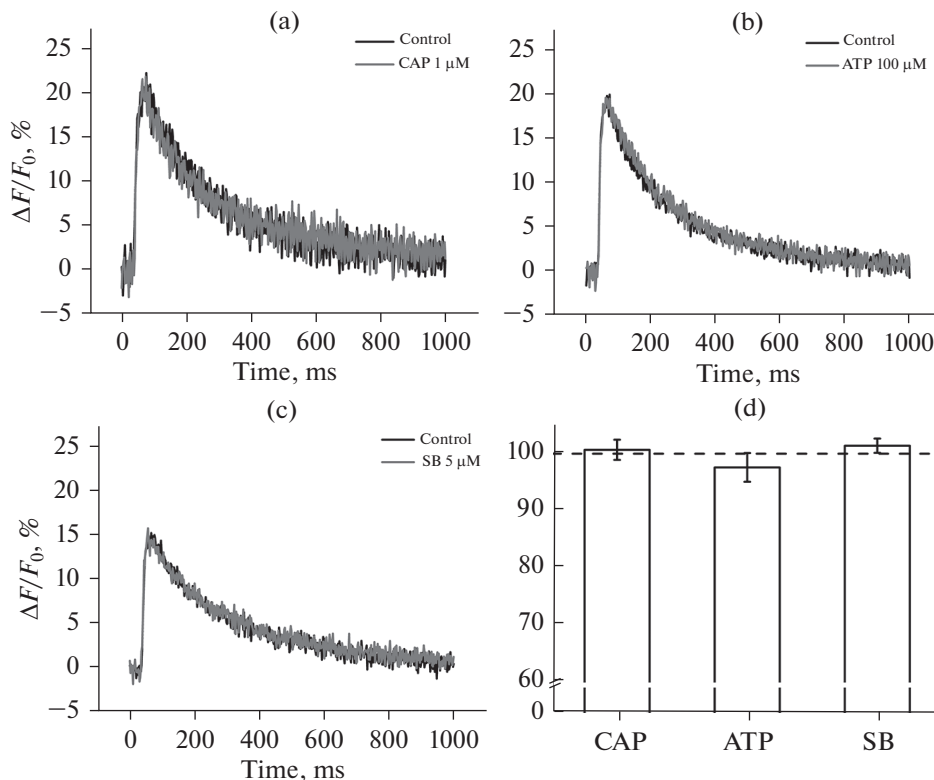


Рис. 6. Отсутствие влияния агониста TRPV1-каналов капсаицина (CAP; 1 μM , $n = 9$), блокатора данных каналов SB 366791 (SB; 5 μM , $n = 18$) и АТФ (АТФ; 100 μM , $n = 12$) на Ca^{2+} -транзист в нервном окончании при стимуляции двигательного нерва. Панели a, b и c – изменения интенсивности флуоресценции ($\Delta F/F_0$) в контроле и после аппликации фармакологических агентов (представлены нативные записи, усредненные по 8 сигналам и зарегистрированные в отдельно взятых экспериментах). Панель d – средние значения и ошибки, выраженные в процентах от контрольного значения амплитуды Ca^{2+} -транзиста (по всем экспериментам в серии). Данные представлены как среднее \pm стандартная ошибка среднего.

синаптических сигналов лежит активация экстраинаптических P2Y1-рецепторов и ингибирование хлорных каналов мембраны мышечного волокна [27].

Возможность участия ваниллоидных рецепторов в регуляции нервно-мышечной нейротрансмиссии у млекопитающих была обнаружена сравнительно недавно и все еще остается слабо изученным феноменом [17, 18]. Так, на препарате диафрагмы мыши было впервые показано угнетающее влияние капсаицина на процесс вызванной нейросекреции АХ, однако какого-либо эффекта агониста ваниллоидных рецепторов на процесс спонтанного квантового выделения медиатора обнаружено не было [18]. В наших же экспериментах получены результаты, подтверждающие наличие данного механизма, угнетающего вызванное высвобождение квантов АХ из нервного окончания. В то же время впервые обнаружено, что капсаицин способен снижать и уровень спонтанного выделения АХ, причем данный эффект агониста полностью устранялся селективным конкурентным антагонистом TRPV1-каналов SB 366791.

Обнаружение факта снижения спонтанной секреции АХ при активации TRPV1-каналов в препарате *m. LAL*, в отличие от препарата диафрагмы, свидетельствует о

наличии некоторых функциональных особенностей синаптических контактов в разных препаратах. Вероятно, эти особенности и накладывают свой отпечаток на то, что выраженность эффектов АТФ на процессы как спонтанной, так и вызванной секреции АХ несколько ниже, чем в синапсах диафрагмы [21, 22].

Схожесть во влиянии АТФ и капсаицина (угнетение обеими фармакологическими агентами процессов как спонтанной, так и вызванной секреции АХ) может свидетельствовать о возможном наличии общего звена в путях пуриnergической и TRPV1-опосредованной регуляции процессов нейросекреции АХ. В настоящем исследовании получены данные, демонстрирующие, что эффект АТФ как на спонтанную, так и на вызванную секрецию АХ отсутствует при предварительной аппликации агониста TRPV1-рецепторов, но сохраняется при блокаде последних селективным антагонистом. Эти результаты позволяют нам заключить: в механизмах, запускаемых активацией как TRPV1-рецепторов, так и пуринорецепторов, имеет место наличие одного общего звена, которое отвечает за снижение количества выделяемых квантов АХ.

В качестве такой мишени могли бы выступить молекулы, тем или иным образом влияющие на метаболизм кальция в нервном окончании. Это могут быть как потенциал-чувствительные кальциевые каналы [12, 28], так и внутриклеточные кальциевые депо [29]. Методика регистрации Ca^{2+} -транзientа в нервном окончании как раз и позволяет нам фиксировать изменения интегрального внутриклеточного кальция. Ранее на нейронах крысы было установлено, что активация P2Y-рецепторов приводит к уменьшению входа ионов кальция через потенциал-зависимые кальциевые каналы N типа [30]. О снижении входа кальция в нервное окончание под действием АТФ свидетельствуют и данные, полученные на нервно-мышечном синапсе лягушки [10, 12]. В свою очередь, TRPV1-каналы проявляют довольно большую селективность к Ca^{2+} и участвуют в регуляции содержания Ca^{2+} в цитозоле клетки [24, 31]. Кроме того, было высказано предположение, что кальций, входящий через TRPV1-каналы в двигательном нервном окончании, способен изменять уровень мембранного PIP2 и приводить, таким образом, к уменьшению уровня выделения АХ [18]. В наших же экспериментах какого-либо изменения интегрального кальция обнаружено не было ни при аппликации АТФ, ни при добавлении капсаицина. Исходя из этих данных, можно предположить, что эффекты активации TRPV1-рецепторов обусловлены увеличением базового уровня кальция, а не кальция, входящего при стимуляции двигательного нерва. Входящий через TRPV1-каналы кальций, в свою очередь, может приводить к активации кальций-зависимых белков, таких как кальмодулин и кальцинейрин, которые, как было установлено ранее, участвуют в механизмах снижения уровня выделения АХ [21, 32, 33]. В то же время подавляющий нейротрансмиссию эффект АТФ можно объяснить активацией метаболитных P2Y-рецепторов, которые, по-видимому, не вносят значительного вклада в изменение входа Ca^{2+} через потенциал-чувствительные кальциевые каналы и выделение Ca^{2+} из депо. При этом имеет место активация той же конечной мишени, регулирующей процесс экзоцитоза синаптических везикул, что и при активации TRPV1-каналов. И в данном случае, в качестве такой мишени может выступать кальмодулин, поскольку показано, что при ингибировании этого белка опосредованный активацией P2Y-рецепторов угнетающий эффект АТФ на выделение АХ полностью отсутствует [20].

Возможное физиологическое значение механизмов регуляции, запускаемых при активации пуриновых и ваниллоидных рецепторов, наиболее вероятно заключается в модуляции процесса нейросекреции АХ по принципу обратной отрицательной связи. Поскольку при квантовом выделении АХ в синаптической щели увеличивается концентрация как АТФ [8], так и протонов [34], то увеличивается и вероятность

активации как пуринорецепторов, так и TRPV-каналов. Как следствие этого – снижение уровня выделения последующих порций медиатора. Кроме того, недавно было установлено, что TRPV1-рецепторы участвуют в реализации симпатической регуляции выброса АХ в периферических нервных окончаниях мышцы [35].

Таким образом, в нервно-мышечном синапсе млекопитающих, наряду с ранее установленным пуринергическим путем регуляции АХ, имеет место и механизм модуляции нейросекреции, опосредованный активацией TRPV1-каналов. Запуск этих механизмов приводит к угнетению процессов как спонтанного, так и вызванного выделения квантов АХ из двигательного нервного окончания. При этом продемонстрировано, что оба этих механизма регуляции не сопровождаются изменением Ca^{2+} -транзientа в нервном окончании и имеют общее звено. На роль такого звена может претендовать белок кальмодулин, однако это еще необходимо проверить экспериментально в будущем.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Экспериментальная часть работы выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 19-04-00490, обработка флуоресцентных изображений выполнена при финансировании в рамках гос. задания ФИЦ КазНЦ РАН.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией данной статьи.

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента (А.Ю.А. и Д.В.С.), сбор данных (А.Ю.А., Н.В.Ж.), обработка данных (А.Ю.А., Н.В.Ж.), написание и редактирование манускрипта (А.Ю.А., А.И.М. и Д.В.С.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Fagerlund M.J., Eriksson L.I.* (2009) Current concepts in neuromuscular transmission. *Br. J. Anaesth.* 103: 108–114.
<https://doi.org/10.1093/bja/aep150>
2. *Petrov K.A., Nikolsky E.E., Masson P.* (2018) Autoregulation of acetylcholine release and micropharmacodynamic mechanisms at neuromuscular junction: Selective acetylcholinesterase inhibitors for therapy of myasthenic syndromes. *Front. Pharmacol.* 9: 1–8.
<https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00766>
3. *Kilbinger H.* (1996) Modulation of acetylcholine release by nitric oxide. *Prog. Brain. Res.* 109: 219–224.
[https://doi.org/10.1016/s0079-6123\(08\)62105-6](https://doi.org/10.1016/s0079-6123(08)62105-6)
4. *Datar P., Srivastava S., Coutinho E., Govil G.* (2005) Substance P: Structure, Function, and Therapeutics. *Curr. Top. Med. Chem.* 4: 75–103.
<https://doi.org/10.2174/1568026043451636>
5. *Pinard A., Lévesque S., Vallée J., Robitaille R.* (2003) Glutamatergic modulation of synaptic plasticity at a PNS vertebrate cholinergic synapse. *Eur. J. Neurosci.* 18: 3241–3250.
<https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2003.03028.x>
6. *Malomouzh A.I., Nikolsky E.E., Lieberman E.M., Sherman J.A., Lubischer J.L., Grossfeld R.M., Urazaev A.K.* (2005) Effect of N-acetylaspartylglutamate (NAAG) on non-quantal and spontaneous quantal release of acetylcholine at the neuromuscular synapse of rat. *J. Neurochem.* 94: 257–267.
<https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2005.03194.x>
7. *Ribeiro J.A., Cunha R.A., Correia-de-Sa P., Sebastiao A.M.* (1996) Purinergic regulation of acetylcholine release. *Prog. Brain Res.* 109: 231–241.
[https://doi.org/10.1016/s0079-6123\(08\)62107-x](https://doi.org/10.1016/s0079-6123(08)62107-x)

8. *Burnstock G.* (2007) Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission. *Physiol. Rev.* 87: 659–797.
<https://doi.org/10.1152/physrev.00043.2006>
9. *Surprenant A., North R.A.* (2009) Signaling at purinergic P2X receptors. *Annu. Rev. Physiol.* 71: 333–359.
<https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.70.113006.100630>
10. *Grishin S., Shakirzyanova A., Giniatullin A., Afzalov R., Giniatullin R.* (2005) Mechanisms of ATP action on motor nerve terminals at the frog neuromuscular junction. *Eur. J. Neurosci.* 21: 1271–1279.
<https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2005.03976.x>
11. *Ginsborg B.L., Hirst G.D.S.* (1972) The effect of adenosine on the release of the transmitter from the phrenic nerve of the rat. *J. Physiol.* 224: 629–645.
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.1972.sp009916>
12. *Khaziev E.F., Samigullin D.V., Tsentsevitsky A.N., Bukharaeva E.A., Nikolsky E.E.* (2018) ATP Reduces the Entry of Calcium Ions into the Nerve Ending by Blocking L-type Calcium Channels. *Acta Naturae.* 10: 93–96.
<https://doi.org/10.32607/20758251-2018-10-2-93-96>
13. *Tominaga M., Wada M., Masu M.* (2001) Potentiation of capsaicin receptor activity by metabotropic ATP receptors as a possible mechanism for ATP-evoked pain and hyperalgesia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 98: 6951–695.
<https://doi.org/10.1073/pnas.111025298>
14. *Morales-Lázaro Sara L., Simon Sidney A., Rosenbaum T.* (2013) The role of endogenous molecules in modulating pain through TRPV1. *J. Physiol.* 591: 3109–3121.
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.2013>
15. *Lishko P.V., Procko E., Jin X., Phelps C.B., Gaudet R.* (2007) The Ankyrin Repeats of TRPV1 Bind Multiple Ligands and Modulate Channel Sensitivity. *Neuron.* 54: 905–918.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.05.027>
16. *Fernández-Carvajal A., Fernández-Ballester G., Devesa I., González-Ros J.M., Ferrer-Montiel* (2011) New strategies to develop novel pain therapies: Addressing thermoreceptors from different points of view. *Pharmaceuticals.* 5: 16–48.
<https://doi.org/10.3390/ph5010016>
17. *Thyagarajan B., Krivitskaya N., Potian J.G., Hognason K., Garcia C.C., McArdle J.J.* (2009) Capsaicin protects mouse neuromuscular junctions from the neuroparalytic effects of botulinum neurotoxin. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 331: 361–371.
<https://doi.org/10.1124/jpet.109.156901>
18. *Thyagarajan B., Potian J.G., Baskaran P., McArdle J.J.* (2014) Capsaicin modulates acetylcholine release at the myoneural junction. *Eur. J. Pharmacol.* 744: 211–219.
<https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2014.09.044>
19. *Martin A.R.* (1976) The effect of membrane capacitance on non-linear summation of synaptic potentials. *J. Theor. Biol.* 59: 179–187.
[https://doi.org/10.1016/S0022-5193\(76\)80031-8](https://doi.org/10.1016/S0022-5193(76)80031-8)
20. *Samigullin D.V., Khaziev E.F., Zhilyakov N.V., Sudakov I.A., Bukharaeva E.A., Nikolsky E.E.* (2017) Calcium Transient Registration in Response to Single Stimulation and During Train of Pulses in Mouse Neuromuscular Junction. *Bionanoscience.* 7: 162–166.
<https://doi.org/10.1007/s12668-016-0318-6>
21. *De Lorenzo S., Veggetti M., Muchnik S., Losavio A.* (2006) Presynaptic inhibition of spontaneous acetylcholine release mediated by P2Y receptors at the mouse neuromuscular junction. *Neuroscience.* 142: 71–85. 2006.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2006.05.062>
22. *Galkin A.V., Giniatullin R.A., Mukhtarov M.R., Švandová I., Grishin S.N., Vyskočil F.* (2001) ATP but not adenosine inhibits nonquantal acetylcholine release at the mouse neuromuscular junction. *Eur. J. Neurosci.* 13: 2047–2053. 2001.
<https://doi.org/10.1046/j.0953-816X.2001.01582.x>
23. *Augustine G.J.* (2001) How does calcium trigger neurotransmitter release? *Curr. Opin. Neurobiol.* 11: 320–326.
[https://doi.org/10.1016/S0959-4388\(00\)00214-2](https://doi.org/10.1016/S0959-4388(00)00214-2)
24. *Caterina M.J., Schumacher M.A., Tominaga M., Rosen T.A., Levine J.D., Julius D.* (1997) The capsaicin receptor: A heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature.* 389: 816–824.
<https://doi.org/10.1038/39807>
25. *Samigullin D.V., Zhilyakov N.V., Khaziev E.F., Bukharaeva E.A., Nikolsky E.E.* (2018) Calcium Transient and Quantal Release in Mouse Neuromuscular Junction Under Extracellular Calcium Concentration Change. *Bionanoscience.* 8: 984–987.
<https://doi.org/10.1007/s12668-018-0558-8>
26. *Ziganshin A.U., Khairullin A.E., Hoyle C.H.V., Grishin S.N.* (2020) Modulatory roles of ATP and adenosine in cholinergic neuromuscular transmission. *Int. J. Mol. Sci.* 21: 1–15.
<https://doi.org/10.3390/ijms21176423>

27. Voss A.A. (2009) Extracellular ATP inhibits chloride channels in mature mammalian skeletal muscle by activating P2Y1 receptors. *J. Physiol.* 587: 5739–5752.
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.2009.179275>
28. Gaydukov A.E., Melnikova S.N., Balezina O.P. (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>
29. Khuzakhmetova V.F., Samigullin D.V., Bukharaeva E.A. (2014) The role of presynaptic ryanodine receptors in regulation of the kinetics of the acetylcholine quantal release in the mouse neuromuscular junction. *Biochem. Suppl. Ser. A Membr. Cell Biol.* 8: 144–152.
<https://doi.org/10.1134/S199074781305005X>
30. Filippov A.K., Brown D.A., Barnard E.A. (2000) The P2Y1 receptor closes the N-type Ca²⁺ channel in neurones, with both adenosine triphosphates and diphosphates as potent agonists. *Br. J. Pharmacol.* 129: 1063–1066.
<https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0703185>
31. Marshall I.C.B., Owen D.E., Cripps T.V., Davis J.B., McNulty S., Smart D. (2003) Activation of vanilloid receptor 1 by resiniferatoxin mobilizes calcium from inositol 1,4,5-trisphosphate-sensitive stores. *Br. J. Pharmacol.* 138: 172–176.
<https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0705003>
32. Tarasova E.O., Gaydukov A.E., Balezina O.P. (2018) Calcineurin and Its Role in Synaptic Transmission. *Biochem.* 83: 674–689.
<https://doi.org/10.1134/S0006297918060056>
33. Ando K., Kudo Y., Aoyagi K., Ishikawa R., Igarashi M., Takahashi M. (2013) Calmodulin-dependent regulation of neurotransmitter release differs in subsets of neuronal cells. *Brain Res.* 1535: 1–13.
<https://doi.org/10.1016/j.brainres.2013.08.018>
34. Zhang Z., Nguyen K.T., Barrett E.F., David G. (2010) Vesicular ATPase Inserted into the Plasma Membrane of Motor Terminals by Exocytosis Alkalinizes Cytosolic pH and Facilitates Endocytosis. *Neuron.* 68: 1097–1108.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.11.035>
35. Rodrigues A.Z.C., Wang Z.M., Messi M.L., Delbono O. (2019) Sympathomimetics regulate neuromuscular junction transmission through TRPV1, P/Q- and N-type Ca²⁺ channels. *Mol. Cell. Neurosci.* 95: 59–70.
<https://doi.org/10.1016/j.mcn.2019.01.007>

Interaction of the Mechanisms of Suppression of the Acetylcholine Quantal Release at the Activation of Vanilloid (TRPV1) and Purine Receptors in the Mouse Neuromuscular Junction

A. Y. Arkhipov^a, N. V. Zhilyakov^a, A. I. Malomouzh^a, and D. V. Samigullin^{a, b, *}

^a*Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics Kazan Scientific Center, Russian Academy of Sciences, Kazan, Russia*

^b*Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education “Tupolev Kazan National Research Technical University—KAI”, Kazan, Russia*

*e-mail: samid75@mail.ru

The main goal of the study was to analyze the relationship between the signaling pathways of the regulation of acetylcholine (ACh) quantal release in the peripheral synapse triggered by the activation of vanilloid (TRPV1) and purine receptors. In electrophysiological experiments carried out at the neuromuscular synapses of the *m. Levator Auris Longus*, it was found that the frequency of miniature endplate potentials (mEPPs) and the quantal content of endplate potentials (EPPs) decrease in the presence of TRPV1 agonist capsaicin. This effect was completely reversed by SB 366791, a specific competitive antagonist of TRPV1 receptors. ATP, like capsaicin, decreased the frequency of mEPPs and the EPP quantal content. Against the background of the TRPV1 antagonist, the inhibitory effect of ATP on ACh secretion was realized in full. At the same time, against the background of TRPV1 channels activation by capsaicin, the effect of ATP on both spontaneous and evoked ACh release was absent. It was suggested that the mechanisms of action of ATP and capsaicin may be associated with a change in Ca²⁺ entry into the nerve ending. To test this hypothesis, experiments were carried out to assess the

changes in the presynaptic calcium level (Ca^{2+} transient) using a fluorescent calcium dye upon nerve stimulation. The amplitude of the calcium transient did not change either with the application of ATP or with the addition of capsaicin. Thus, in the neuromuscular synapse of mammals, along with purinergic pathway of ACh secretion regulation, there is also a mechanism of neurosecretion modulation mediated by the activation of TRPV1 channels. The triggering of these mechanisms leads to the suppression of the processes of both spontaneous and evoked release of ACh quanta from the motor nerve endings. It was demonstrated that both pathways of regulation are not accompanied by a change in the Ca^{2+} transient, but have a common link of regulation of the quantal neurosecretion.

Keywords: neuromuscular junction, acetylcholine, TRPV1 receptor, calcium transient, ATP, neurosecretion