

**ВЛИЯНИЕ АЛЛОСТЕРИЧЕСКОГО МОДУЛЯТОРА M₅
ХОЛИНОРЕЦЕПТОРОВ VU 0238429 НА НЕРВНО-МЫШЕЧНУЮ ПЕРЕДАЧУ
В ДИАФРАГМАЛЬНОЙ МЫШЦЕ МЫШИ**

© 2022 г. И. В. Ковязина^{1, 2, *}, А. А. Хамидуллина²,
Н. С. Фёдоров³, А. И. Маломуж^{1, **}

¹Казанский институт биохимии и биофизики ФИЦ Казанский научный центр РАН,
Казань, Россия

²Казанский Государственный медицинский университет, Казань, Россия

³Казанский Федеральный университет, Казань, Россия

*E-mail: irina.kovyazina@list.ru

**E-mail: artur57@gmail.com

Поступила в редакцию 15.10.2021 г.

После доработки 10.11.2021 г.

Принята к публикации 13.11.2021 г.

Исследовали влияние соединения VU 0238429, аллостерического модулятора мускариновых холинорецепторов M₅ подтипа, на амплитудно-временные параметры спонтанных и вызванных потенциалов концевой пластинки, а также на силу мышечных сокращений при низко- и высокочастотном раздражении двигательного нерва. Показано, что холинорецепторы M₅ подтипа могут регулировать квантовый выброс ацетилхолина из двигательных нервных окончаний в диафрагме мышцы: увеличивать уровень секреции медиатора при низкочастотной стимуляции нерва и снижать его при стимуляции с частотой 70 Гц. Фармакологическая потенциация M₅ холинорецепторов оказывает угнетающее действие на силу мышечных сокращений, вызванных как прямой, так и непрямой стимуляцией, что необходимо учитывать при разработке лекарственных препаратов на основе модуляторов этих рецепторов.

Ключевые слова: нервно-мышечный контакт, M₅ холинорецептор, ацетилхолин, потенциал концевой пластинки, модуляция синаптической передачи, мышечное сокращение

DOI: 10.31857/S0869813922010083

Мускариновые холинорецепторы M₁–M₅ подтипов широко представлены в центральной и периферической нервной системе, где они контролируют ряд важных физиологических процессов [1]. Несмотря на то, что рецепторы M₅ подтипа составляют всего 2% от общей популяции мускариновых холинорецепторов в головном мозге [2], они экспрессируются в отдельных областях, представляющих терапевтический интерес. Агонисты и антагонисты M₅ холинорецепторов рассматриваются как потенциальные фармакологические агенты для лечения целого ряда расстройств, включая шизофрению, болезнь Альцгеймера, наркозависимость и болезнь Паркинсона [1, 3]. Данные, полученные на мышах, нокаутированных по гену, кодирующему мускариновые рецепторы M₅ подтипа, свидетельствуют о том, что именно эти рецепторы отвечают за вызванное ацетилхолином расширение сосудов головного мозга, и, следовательно, их лиганды могут быть использованы в

качестве терапевтического средства при лечении цереброваскулярных заболеваний или острого ишемического инсульта [2, 4].

Ранее, с помощью методов иммуногистохимии, было показано, что M₅ рецепторы присутствуют в области нервно-мышечного контакта скелетных мышц позвоночных [5, 6], однако их физиологическая роль в периферических синапсах остается до конца не выясненной. По данным Wright и соавт. [5] M₅ рецепторы локализуются на мышечных волокнах и/или шванновских клетках и контролируют рост мышц, а также размер моторных синапсов.

Недостаток информации о физиологической роли M₅ рецепторов во многом обусловлен тем, что до недавнего времени отсутствовали селективные фармакологические агенты, с помощью которых можно было бы исследовать функции этих рецепторов. Сравнительно недавно скрининговые и медицинские исследования позволили идентифицировать первые M₅ селективные аллостерические лиганды, в частности соединение VU 0238429, проявляющее высокоизбирательное потенцирующее действие на этот подтип холинорецепторов [7]. Данное соединение более чем в 30 раз избирательнее по отношению к M₅ рецепторам по сравнению с M₁ и M₃ подтипами и неэффективно в отношении M₂ и M₄ подтипов мускариновых рецепторов [7].

В настоящей работе мы исследовали влияние селективного аллостерического модулятора мускаринового ацетилхолинового рецептора M₅ подтипа – соединения VU 0238429 на амплитудно-временные характеристики одноквантовых (миниатюрных) и многоквантовых потенциалов концевой пластинки (ПКП), а также на силу мышечных сокращений при разных режимах стимуляции двигательного нерва. Показано, что холинорецепторы M₅ подтипа могут регулировать процесс квантового выделения ацетилхолина из моторных нервных окончаний. Кроме того, фармакологическая потенциация этих рецепторов снижает силу мышечных сокращений, что необходимо учитывать при поиске лекарственных препаратов, мишенью которых являются мускариновые холинорецепторы M₅ подтипа.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Препарат и растворы

Исследования были проведены на изолированных нервно-мышечных препаратах диафрагмы лабораторных мышей линии BALB/c массой 22–25 г. Животные содержались при комнатной температуре (20–24°C) в хорошо вентилируемом помещении с 12-часовым циклом свет/темнота и неограниченным доступе к пище и воде.

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

Животных подвергали глубокому наркозу, а затем быстро декапитировали и выделяли диафрагмальную мышцу в реберном кольце вместе с диафрагмальными нервами, длина культы которых составляла не менее 0.5 см. Далее препарат разделяли на две полудиафрагмы с подходящими к ним нервами.

Изолированную мышцу с фрагментом нерва помещали в экспериментальную камеру, через которую протекал предварительно аэрированный раствор Рингера–Кребса следующего состава (в мМ): 137 NaCl, 5 KCl, 1 MgCl₂, 2 CaCl₂, 1 Na₂HPO₄, 15 NaHCO₃, 11 глюкоза; pH раствора составлял 7.3–7.4, температуру в ванночке поддерживали на уровне 22.0 ± 0.1°C.

Соединение VU 0238429 (Tocris, Великобритания) растворяли в растворе DMSO, а затем в буферном растворе до концентрации 1 мкМ, и подавали в экспериментальную камеру путем перфузии (финальная концентрация DMSO 0.01%).

Регистрация потенциалов концевой пластинки

Потенциалы концевой пластинки (ПКП) регистрировали внутриклеточно с использованием стандартной микроэлектродной техники. При регистрации ПКП мышечные сокращения блокировали μ -конотоксином GIBB (3 мкМ, Peptide Institute Inc., Япония).

Регистрацию синаптических сигналов осуществляли с помощью комплекса, включающего микроэлектродный усилитель TEV-200A (Dagan Corporation, США) с полосой пропускания от 0.03 до 10 кГц, изолированный импульсный стимулятор 2100 (AM Systems, США), высокоскоростной аналогово-цифровой цифровой преобразователь (Digidata 1322A, Axon Instrument Inc., США) с частотой дискретизации 10 мкс и программное обеспечение AxoClamp (Axon Instrument Inc.). Двигательный нерв стимулировали прямоугольными импульсами супрамаксимальной величины и длительностью 100 мкс с частотой 0.5–70 Гц.

ПКП регистрировали в контроле и через 20 мин после добавления соединения VU 0238429 в омывающий раствор. Зарегистрированные сигналы анализировали с использованием программного обеспечения Clampfit (Axon Instrument Inc.) в автономном режиме. Оценивали амплитуду, время нарастания и постоянную времени спада (10–90% амплитуды) ПКП. Квантовый состав ПКП оценивали двумя способами: 1) как соотношение средних значений амплитуд вызванных и спонтанных (“одноквантовых”) ответов; 2) как соотношение площадей вызванных и “одноквантовых” ответов. При анализе параметров ПКП, зарегистрированных в режиме высокочастотных пачек (10 с с частотами 10, 50 и 70 Гц), параметры сигналов выражали в процентах по отношению к первому сигналу, а затем усредняли ($n = 20–30$ пачек).

Тензометрия

Фрагмент полудиафрагмы (шириной около 1 см) помещали в экспериментальную ванночку тензометрической установки SIN Muscle Tester (WPI, США), оснащенной усилителем SI-BAM21-LC (WPI) и контроллером температуры SI-TCM2 (WPI). “Реберный” край фрагмента полудиафрагмы фиксировали крючком, который был соединен с датчиком силы (SI-KG2B, WPI), “сухожильный” край фиксировали крючком, закрепленным на плече микроманипулятора со встроенным микрометром. При помощи микрометра препарат растягивался на 10–15% от длины и в течение 15–20 мин перед началом эксперимента промывался раствором Рингера–Кребса в условиях редкой стимуляции для достижения устойчивого состояния.

Мышцу стимулировали прямоугольными стимулами супрамаксимальной амплитуды длительностью 100 мкс. Протокол стимуляции во всех экспериментах (сокращения при прямом и непрямом раздражении) был идентичный: 20 с с частотой 0.5 Гц, 10 с с частотами 10, 50 и 70 Гц. Время периода между стимуляциями составляло 20 с.

Ответы при непрямом раздражении вызывались стимуляцией диафрагмального нерва через “всасывающий” электрод. При прямом раздражении сокращения диафрагмы вызывали стимуляцией через два серебряных проволочных электрода, находящихся в экспериментальной ванночке в непосредственной близости от препарата. При этом в растворе присутствовал блокатор никотиновых холинорецепторов d-тубокурарин (2 мкМ, Sigma, США). Сигналы от датчика силы получали и анализировали в цифровом виде с использованием (ЦАП-АЦП) системы LabTrax 8/16 (WPI) и программного обеспечения MDAC Software (WPI). Сила сокращений (макси-

мальная амплитуда одиночных и тетанических изометрических сокращений) измерялась в граммах. Регистрация сокращений осуществлялась в контроле и через 20 мин после добавления соединения VU 0238429 в омывающий раствор.

Статистика

Экспериментальные результаты представлены в виде среднего значения и стандартной ошибки среднего (*SEM*). Для статистической обработки результатов экспериментов использовали двухсторонний критерий Стьюдента (для параметрических данных) либо непараметрический критерий Манна–Уитни.

Для описания относительного изменения квантового состава ПКП в ходе стимуляции нерва с частотой 10 Гц использовали модель, описанную в работе [8]. Для частот стимуляции выше 10 Гц эту модель модифицировали путем добавления “медленной” экспоненциальной компоненты:

$$m(t) = A \exp(-t/B) + C / (1 + \exp(-(t - D)/E)) \exp(-t/F).$$

В этой формуле $m(t)$ соответствует квантовому составу ПКП в момент времени t , A – квантовый состав в начале стимуляции (отн. ед.), B – постоянная времени истощения готового к освобождению пула везикул (с), C – средняя амплитуда плато (отн. ед.), D – полупериод восполнения везикулярного пула (с), E – крутизна динамики восстановления везикулярного пула (с), а F – постоянная времени “медленной” фазы снижения квантового состава (при 50 и 70 Гц, с).

Для сравнения относительного изменения амплитуд ПКП при высокочастотной стимуляции нерва в контроле и в присутствии VU 0238429 использовался F-тест. Статистический анализ осуществлялся с помощью программного обеспечения OriginLab 2021b. Различия между группами считали статистически значимыми при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Влияние аллостерического модулятора M₅ холинорецепторов VU 0238429 на амплитудно-временные параметры ПКП при низко- и высокочастотной стимуляции двигательного нерва

Потенциация M₅ холинорецепторов не оказывала влияния на амплитуду миниатюрных ПКП (МПКП) и их частоту (рис. 1а), а также временные параметры (времена роста и постоянная времени спада, на рисунке не представлены).

В присутствии соединения VU 0238429 (1 мкМ) при редкой частоте стимуляции нерва (0.5 Гц) квантовый состав ПКП был в среднем на 17% выше, чем в контроле (34.2 ± 2.3 по сравнению с 28.1 ± 1.2 , $n_1 = 22$, $n_2 = 29$, тест Стьюдента для независимых выборок, $p < 0.05$, рис. 1б). При оценке квантового состава соотношением площадей многоквантовых и одноквантовых (миниатюрных) ПКП значения этой величины составили 34.2 ± 1.9 в контроле и 41.6 ± 2.9 в присутствии соединения VU 0238429, то есть относительное изменение квантового состава составило 22%. Длительность переднего фронта многоквантовых ПКП (10–90%) также достоверно увеличивалась: с 0.75 ± 0.18 мс в контроле до 0.87 ± 0.16 мс ($n_1 = 22$, $n_2 = 29$, тест Стьюдента для независимых выборок, $p < 0.05$, рис. 1б). При этом длительности заднего фронта ПКП (τ времени спада ПКП) в контроле и в присутствии соединения VU 0238429 достоверно не различались (2.81 ± 0.13 и 3.09 ± 0.08 мс, соответственно, $n_1 = 22$, $n_2 = 29$, тест Стьюдента для независимых выборок, $p > 0.05$, рис. 1б).

Значения мембранного потенциала мышечного волокна, при которых регистрировали ПКП и МПКП в контроле и в присутствии соединения VU 0238429 также достоверно не различались (-60.4 ± 2.1 мВ для VU 0238429 по сравнению с -60.0 ± 1.2 мВ в контроле, $n_1 = 22$, $n_2 = 29$, тест Стьюдента для независимых выборок, $p > 0.05$).

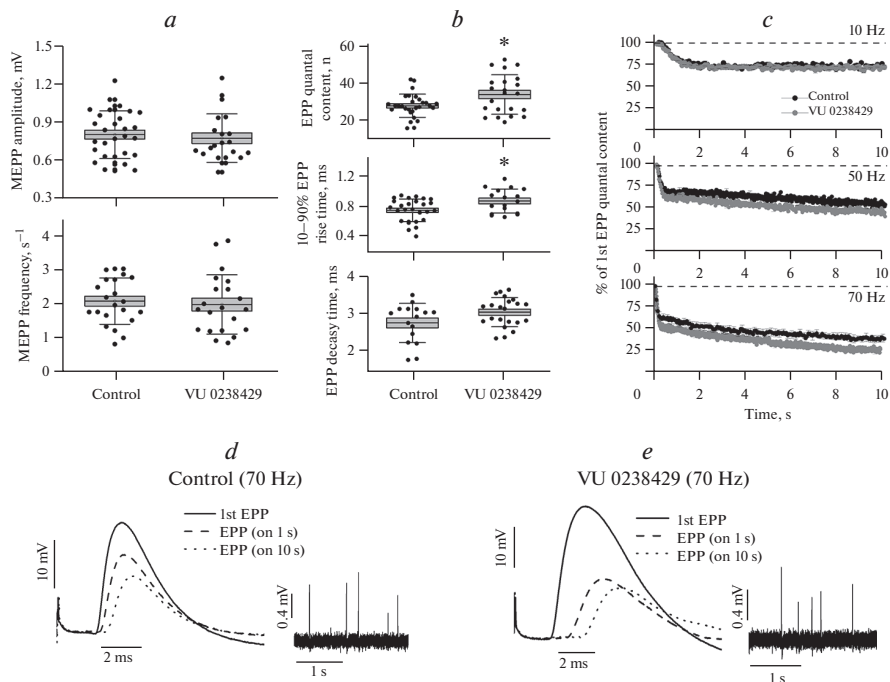


Рис. 1. Влияние модулятора мускариновых холинорецепторов M₅ подтипа VU 0238429 (1 мкМ) на амплитудно-временные параметры миниатюрных (МПКП; МЕРР) и вызванных (ПКП; ЕРР) потенциалов концевой пластинки.

Панель (a) — амплитуда (amplitude) и частота (frequency) миниатюрных потенциалов концевой пластинки в контроле и после аппликации VU 0238429.

Панель (b) — квантовый состав (EPP quantal content), время нарастания (10–90% EPP rise time) и постоянная времени спада (decay time) вызванных потенциалов концевой пластинки при низкочастотной стимуляции нерва (0.5 Гц) в контроле и после аппликации VU 0238429. На панелях a и b данные представлены по отдельным клеткам в контроле и после аппликации VU 0238429: кружки — значения по отдельным опытам, горизонтальная линия — среднее значение ± стандартная ошибка (прямоугольник) и стандартное отклонение (вертикальный отрезок) для всей серии экспериментов ($n_1 = 22$, $n_2 = 29$). * $p < 0.05$ по сравнению с контролем (тест Стьюдента для независимых выборок).

Панель (c) — относительные изменения амплитуды ПКП при стимуляции нерва с частотой 10, 50 и 70 Гц в течение 10 с: черные кружки — контроль, серые кружки — VU 0238429. За 100% принята амплитуда 1-го ПКП в пачке. $n = 15$.

Панели (d), (e) — репрезентативные записи вызванных потенциалов концевой пластинки, зарегистрированных в ходе стимуляции с частотой 70 Гц в типичном эксперименте в контроле (control) и в присутствии VU 0238429: сплошная линия — 1-й ПКП в пачке импульсов, пунктирная линия — ПКП после 1 с стимуляции, линия точками — ПКП после 10 с стимуляции с частотой 70 Гц. На врезках представлены МПКП из тех же экспериментов, зарегистрированные до начала стимуляции.

При высокочастотном раздражении нерва (10–70 Гц) развивалась синаптическая депрессия, то есть последовательное снижение квантового состава ПКП в ходе пачки импульсов, наиболее выраженное при стимуляции нерва с частотой более 10 Гц (рис. 1c–e). Так, при стимуляции нерва с частотой 70 Гц квантовый состав ПКП в первые 200 мс быстро снижался (на 40% в контроле и на 50% в присутствии VU 0238429) и продолжал снижаться в последующие 10 с соответственно до $38.2 \pm 3.6\%$ и $27.8 \pm 4.5\%$ ($n = 15$) от исходных значений в контроле и в присутствии

Таблица 1. Параметры модели, описывающей изменение квантового состава ПКП при высокочастотной стимуляции нерва

	<i>A</i> (отн. ед)	<i>B</i> (с)	<i>C</i> (отн. ед)	<i>D</i> (с)	<i>E</i> (с)	<i>F</i> (с)
10 Гц						
контроль	0.88 ± 0.04	1.67 ± 0.27	0.75 ± 0.01	1.14 ± 0.44	1.34 ± 0.09	–
VU 0238429	0.87 ± 0.03	1.48 ± 0.16	0.72 ± 0.01	0.96 ± 0.27	1.16 ± 0.07	–
50 Гц						
контроль	0.89 ± 0.08	0.28 ± 0.05	0.73 ± 0.01	0.15 ± 0.15	0.29 ± 0.02	39.13 ± 1.03
VU 0238429	1.05 ± 0.01	0.43 ± 0.02	0.64 ± 0.01	0.49 ± 0.03	0.24 ± 0.01	31.69 ± 0.80
70 Гц						
контроль	1.02 ± 0.03	0.38 ± 0.02	0.57 ± 0.01	0.42 ± 0.02	0.17 ± 0.01	25.56 ± 0.73
VU 0238429	1.05 ± 0.01	0.22 ± 0.01	0.53 ± 0.02	0.31 ± 0.01	0.12 ± 0.01	13.58 ± 0.13

VU 0238429. Аппроксимация относительного изменения квантового состава ПКП при высокочастотной стимуляции нерва моделью, состоящей из экспоненциального спада и возрастающей логистической функции (см. Методы исследования), показала достоверные различия в динамике этого параметра в контроле и при потенциации M₅ рецепторов (F-тест, $p < 0.05$, $n = 15$, табл. 1).

Влияние аллостерического модулятора M₅ холинорецепторов VU 0238429 на силу мышечных сокращений при прямой и непрямой стимуляции

Сила сокращений фрагмента полудиафрагмы мышцы при стимуляции двигательного нерва составляла по максимальной амплитуде: 0.72 ± 0.09 г при 0.5 Гц; 0.87 ± 0.11 г при 10 Гц; 4.81 ± 0.52 г при 50 Гц и 5.15 ± 0.63 г при 70 Гц ($n = 7$). Добавление в перфузионный раствор соединения VU 0238429 в концентрации 1 мкМ приводило к снижению силы сокращений на всех исследуемых частотах стимуляции (рис. 2а). Так, регистрируемый параметр снижался на 24.5 ± 4.7% при 0.5 Гц; на 23.3 ± 3.6% при 10 Гц; 23.6 ± 4.6% при 50 Гц и 24.0 ± 5.7% при 70 Гц ($p < 0.05$; $n = 7$ для всех случаев).

Для того, чтобы установить, обусловлен ли выявленный нами угнетающий эффект VU 0238429 изменениями в холинергической трансмиссии в мионевральном синапсе, были проведены эксперименты с прямой стимуляцией мышцы в условиях блокады никотиновых холинорецепторов. Контрольные значения силы сокращений в данной серии экспериментов составляли по максимальной амплитуде 0.58 ± 0.07 г при 0.5 Гц; 0.58 ± 0.07 г при 10 Гц; 4.41 ± 0.79 г при 50 Гц и 4.46 ± 0.76 г при 70 Гц ($n = 7$).

В присутствии VU 0238429 сила сокращений при прямой стимуляции также снижалась (рис. 2б). Это угнетающее действие аллостерического модулятора так же как и в случае непрямой стимуляции проявлялось на всех исследуемых частотах и составляло соответственно: 17.2 ± 3.1% при 0.5 Гц; 15.3 ± 3.7% при 10 Гц; 16.6 ± 3.1% при 50 Гц и 16.5 ± 3.4% при 70 Гц ($p < 0.05$; $n = 7$ для всех случаев). Выраженность угнетающего эффекта соединения VU 0238429 при прямой и непрямой стимуляции нервно-мышечного препарата достоверно не отличалась для всех частот (критерий Манна–Уитни, $p > 0.05$).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Пять подтипов мускариновых рецепторов млекопитающих, M₁–M₅, составляют две функционально разные группы: рецепторы с нечетными номерами (M₁, M₃, M₅) активируют предпочтительно G-белки G_q/G₁₁-типа; четные подтипы (M₂, M₄) активируют G_i/G_o белки. Большинство клеток экспрессируют два или более под-

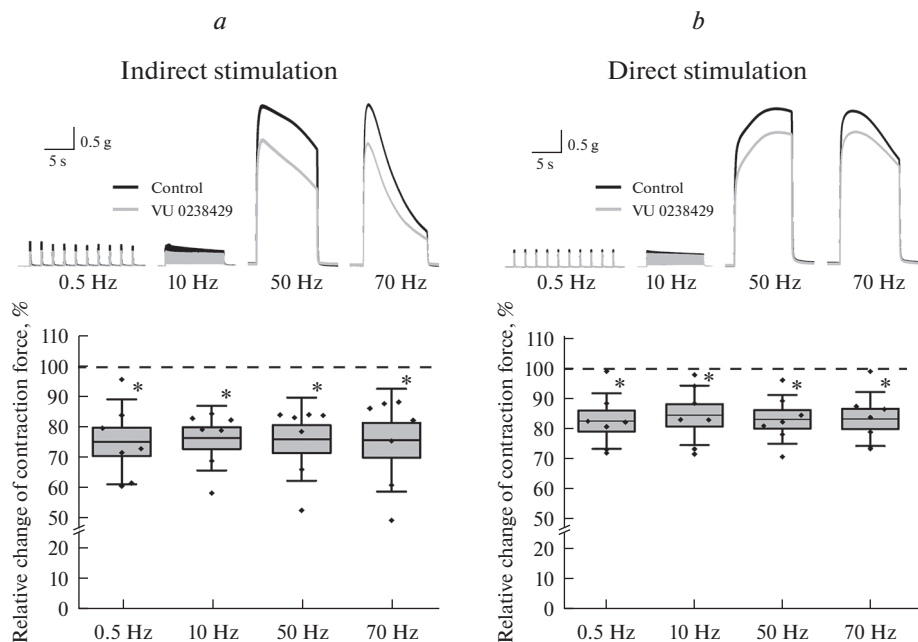


Рис. 2. Угнетающее влияние модулятора мускариновых холинорецепторов M_5 подтипа VU 0238429 (1 мкМ) на силу сокращения полудиафрагмы мышцы при неярмой (панель (a), Indirect stimulation) и ярмой (панель (b), Direct stimulation) стимуляции с частотами 0,5, 10, 50 и 70 Гц. В верхних частях панелей – нативные записи сокращений в отдельном взятых экспериментах в контроле (черный) и через 20 мин после аппликации VU 0238429 (серый).

В нижних частях панелей представлены относительные изменения силы сокращений после аппликации VU 0238429 по отношению к контролю (%): кружки – значения по отдельным опытам, горизонтальная линия – среднее значение \pm стандартная ошибка (прямоугольник) и стандартное отклонение (вертикальный отрезок) для всей серии экспериментов ($n = 7$). * $p < 0.05$ по сравнению с контролем (парный тест Стьюдента для абсолютных значений в г в контроле и в присутствии VU 0238429).

типа мускариновых рецепторов, которые вызывают разнообразные физиологические ответы в зависимости от локализации и идентичности подтипов [1, 9]. Так, в нервно-мышечных контактах позвоночных были обнаружены мускариновые рецепторы всех известных на данный момент пяти подтипов [5, 6]. И если для холинорецепторов M_1 , M_2 и M_3 подтипов было показано их участие в регуляции квантовой и неквантовой секреции [5, 6, 10–13], то роль рецепторов M_5 подтипа в нервно-мышечных контактах до сих пор не ясна. Отчасти этот недостаток информации был обусловлен отсутствием селективных лигандов для данного подтипа холинорецепторов.

Сравнительно недавно были синтезированы селективные в отношении M_5 рецепторов аллостерические модуляторы, позволяющие лучше изучить функции этих рецепторов в центральной и периферической нервной системах и, возможно, разработать лекарственные препараты на основе агонистов и антагонистов M_5 рецепторов. Последнее особенно важно, если учесть, что недостаточная или, наоборот, избыточная активация M_5 рецепторов может быть основным звеном патогенеза целого ряда заболеваний – болезни Альцгеймера, Паркинсона, наркозависимости, депрессии и шизофрении [1, 3]. Поскольку помимо головного мозга M_5 рецепторы

располагаются и в скелетной мускулатуре [5, 14], необходимо учитывать возможные последствия приема таких препаратов на опорно-двигательную систему при проведении терапии нейродегенеративных заболеваний.

В данной работе изучили эффекты положительного аллостерического модулятора M₅ холинорецепторов – соединения VU 0238429 – на амплитудно-временные параметры ПКП и силу сокращений диафрагмальной мышцы.

Результаты исследования свидетельствуют о том, что повышенная активация холинорецепторов M₅ подтипа приводит к повышению квантового выброса ацетилхолина из двигательных нервных окончаний и увеличению длительности переднего фронта (10–90% время роста) ПКП. Изменение времени роста ПКП может быть следствием десинхронизации освобождения синаптических везикул в отдельных активных зонах [15]. Стимуляция с частотой 70 Гц приводила к несколько более выраженной депрессии амплитуд последовательных ПКП в пачке, что может быть связано с повышенным расходом медиатора и уменьшением количества везикул, готовых к освобождению. Ранее было показано, что M₅ рецепторы в моторных синапсах мышцы локализируются на мышечных волокнах либо в шванновских клетках и регулируют размер волокон и концевых пластинок [5]. О наличии мускариновых рецепторов, в частности M₁ и M₃ подтипов, на сарколемме сообщалось и ранее [16, 17]. Наблюдаемые нами эффекты соединения VU 0238429 на процесс нейросекреции предполагают либо наличие некоторого количества M₅ рецепторов на нервном окончании, либо ретроградный эффект от их активации на мышечной либо шванновской клетках.

Наши результаты тензометрии косвенно подтверждают наличие холинорецепторов M₅ подтипа на сарколемме. Так, сила сокращений снижалась в присутствии аллостерического модулятора VU 0238429 в одинаковой степени при прямой и непрямой стимуляции диафрагмы. Судя по всему, основной причиной снижения амплитуды сокращений при непрямой стимуляции является тот же фактор, что и при прямой стимуляции, то есть происходят изменения в сократимости мышечных волокон, а не в работе синаптического аппарата. Если более выраженная депрессия амплитуд ПКП при высокочастотной стимуляции нерва и отражается на снижении силы сокращений, то этот вклад не столь существенен.

Эффект активации M₅ рецепторов на сократительную способность мышц, по всей видимости, связан с влиянием на электромеханическое сопряжение, а не на работу сократительного аппарата мышечных волокон. На данный момент внутриклеточные механизмы, связанные с активацией M₅ холинорецепторов, наиболее полно изучены в нейронах. Показано, что активация M₅ рецепторов запускает целый ряд клеточных реакций, таких как инактивирование аденилатциклазы, деградация фосфоинозитидов, изменение уровня циклического АМФ и модуляция работы калиевых каналов [18–20]. В нейронах гиппокампа была продемонстрирована способность мускариновых рецепторов всех подтипов модулировать работу натриевых каналов и снижать амплитуду натриевых токов. В частности, для M₅ рецепторов эта регуляция осуществляется через активацию протеинкиназы C [21]. Кроме того, было показано, что в культуре клеток фибробластов мышцы (NIH 3T3) активация всех экспрессированных там мускариновых рецепторов может угнетать функционирование кальциевых каналов L типа также путем активации протеинкиназы C [22]. Вопрос колокализации M₅ рецепторов с натриевыми и/или кальциевыми каналами в скелетных мышцах и возможность их функциональной регуляции до сих пор остается открытым.

Использованное в данном исследовании соединение VU 0238429 является положительным аллостерическим модулятором ацетилхолиновых рецепторов, то есть оно избирательно увеличивает вероятность связывания эндогенного ацетилхолина

с рецепторами M_5 подтипа. Обнаруженные эффекты фармакологического соединения свидетельствуют о том, что в изолированном диафрагмальном препарате мышцы даже при низкочастотной активности присутствует ацетилхолин в концентрации, достаточной для активации рецепторов, в том числе, на скелетной мышце.

Доказательства выделения ацетилхолина в изолированном нервно-мышечном препарате в отсутствие стимуляции нерва были получены еще в 60-е годы прошлого столетия, причем, как оказалось, определенная часть медиатора выделяется непосредственно из скелетной мышцы [23, 24]. Впоследствии было установлено, что выделяемый из мышцы ацетилхолин синтезируется холин- и карнитин-ацетилтрансферазами [25, 26] и концентрации этого медиатора может быть достаточно для активации мускариновых холинорецепторов. В отсутствие стимуляции нерва была продемонстрирована эндогенная активация мускариновых холинорецепторов M_1 подтипа, которая сказывается на уровне некантового выделения ацетилхолина из нервного окончания [10]. В этой же работе было показано, что для реализации физиологического эффекта активации этих мускариновых рецепторов (которые имеют сходие с M_5 механизмы трансдукции сигнала) достаточно концентрации миметика всего в несколько нМ. Согласно данным различных авторов, в области синаптического контакта ацетилхолин детектируется в концентрации в несколько десятков нМ, создаваемой в результате некантового выделения медиатора. С помощью этого процесса выделяется основная масса ацетилхолина именно в отсутствие нервной импульсации (см. обзоры [27, 28]). Следовательно, есть все основания полагать, что даже в покое может иметь место активация мускариновых холинорецепторов как в синапсе, так и за его пределами ацетилхолином, который выделяется как из нервного окончания, так и непосредственно из мышцы, и это способно отражаться на сократимости скелетной мускулатуры.

Таким образом, холинорецепторы M_5 подтипа могут модулировать процесс нейросекреции ацетилхолина в моторных синапсах скелетных мышц. Кроме того, их активация приводит к снижению сократительной активности мышечных волокон, что необходимо учитывать при разработке потенциальных лекарственных препаратов, мишенью которых являются M_5 рецепторы.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Электрофизиологические исследования выполнены при финансовой поддержке гранта РФФИ (№ 20-04-00571), эксперименты по регистрации мышечных сокращений выполнены в рамках государственного 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 экспериментов (И.В.К. и М.А.И.), сбор данных (А.А.Х. и Н.С.Ф.), обработка данных (И.В.К., А.А.Х., Н.С.Ф. и М.А.И.), написание и редактирование манускрипта (И.В.К. и М.А.И.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Wess J, Eglén RM, Gautam D* (2007) Muscarinic acetylcholine receptors: mutant mice provide new insights for drug development. *Nat Rev Drug Discov* 6: 721–733. <https://doi.org/10.1038/nrd2379>

2. Yamada M, Basile AS, Fedorova I, Zhang W, Duttaroy A, Cui Y, Lamping KG, Faraci FM, Deng CX, Wess J (2003) Novel insights into M5 muscarinic acetylcholine receptor function by the use of gene targeting technology. *Life Sci* 74: 345–353.
<https://doi.org/10.1016/j.lfs.2003.09.022>
3. Langmead CJ, Watson J, Reavill C (2008) Muscarinic acetylcholine receptors as CNS drug targets. *Pharmacol Ther* 117: 232–243.
<https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2007.09.009>
4. Araya R, Noguchi T, Yuhki M, Kitamura N, Higuchi M, Saito TC, Seki K, Itohara S, Kawano M, Tanemura K, Takashima A, Yamada K, Kondoh Y, Kanno I, Wess J, Yamada M (2006) Loss of M5 muscarinic acetylcholine receptors leads to cerebrovascular and neuronal abnormalities and cognitive deficits in mice. *Neurobiol Dis* 24: 334–344.
<https://doi.org/10.1016/j.nbd.2006.07.010>
5. Wright MC, Potluri S, Wang X, Dentcheva E, Gautam D, Tessler A, Wess J, Rich MM, Son YJ (2009) Distinct muscarinic acetylcholine receptor subtypes contribute to stability and growth, but not compensatory plasticity, of neuromuscular synapses. *J Neurosci* 29: 14942–14955.
<https://doi.org/10.1523/jneurosci.2276-09.2009>
6. Tsentsevitsky AN, Kovyazina IV, Nurullin LF, Nikolsky EE (2017) Muscarinic cholinergic receptors (M1-, M2-, M3- and M4-type) modulate the acetylcholine secretion in the frog neuromuscular junction. *Neurosci Lett* 649: 62–69.
<https://doi.org/10.1016/j.neulet.2017.04.015>
7. Bridges TM, Marlo JE, Niswender CM, Jones CK, Jadhav SB, Gentry PR, Plumley HC, Weaver CD, Conn PJ, Lindsley CW (2009) Discovery of the first highly M5-preferring muscarinic acetylcholine receptor ligand, an M5 positive allosteric modulator derived from a series of 5-trifluoromethoxy N-benzyl isatins. *J Med Chem* 52: 3445–3448.
<https://doi.org/10.1021/jm900286j>
8. Ruiz R, Cano R, Casañas JJ, Gaffield MA, Betz WJ, Tabares L (2011) Active zones and the readily releasable pool of synaptic vesicles at the neuromuscular junction of the mouse. *J Neurosci* 31: 2000–2008.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4663-10.2011>
9. Nathanson NM (2008) Synthesis, trafficking, and localization of muscarinic acetylcholine receptors. *Pharmacol Ther* 119: 33–43.
<https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2008.04.006>
10. Malomouzh AI, Mukhtarov MR, Nikolsky EE, Vyskočil F (2007) Muscarinic M1 acetylcholine receptors regulate the non-quantal release of acetylcholine in the rat neuromuscular junction via NO-dependent mechanism. *J Neurochem* 102: 2110–2117.
<https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2007.04696.x>
11. Tsentsevitsky AN, Zakyrganova GF, Petrov AM, Kovyazina IV (2020) Breakdown of phospholipids and the elevated nitric oxide are involved in M3 muscarinic regulation of acetylcholine secretion in the frog motor synapse. *Biochem Biophys Res Commun* 524: 589–594.
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.01.112>
12. Garcia N, Santafé MM, Salon I, Lanuza MA, Tomàs J (2005) Expression of muscarinic acetylcholine receptors (M1-, M2-, M3- and M4-type) in the neuromuscular junction of the newborn and adult rat. *Histol Histopathol* 20: 733–743.
<https://doi.org/10.14670/HH-20.733>
13. Oliveira L, Timóteo MA, Correia-de-Sá P (2009) Negative crosstalk between M1 and M2 muscarinic autoreceptors involves endogenous adenosine activating A1 receptors at the rat motor endplate. *Neurosci Lett* 459: 127–131.
<https://doi.org/10.1016/j.neulet.2009.05.001>
14. Levey AI (1993) Immunological localization of m1-m5 muscarinic acetylcholine receptors in peripheral tissues and brain. *Life Sci* 52: 441–448.
[https://doi.org/10.1016/0024-3205\(93\)90300-r](https://doi.org/10.1016/0024-3205(93)90300-r)
15. Bukharaeva EA, Kim KK, Nikol'skii EE, Vyskochil F (2000) Synchronization of evoked secretion of quanta of mediator as a mechanism facilitating the action of sympathomimetics. *Neurosci Behav Physiol* 30: 139–146.
<https://doi.org/10.1007/BF02463151>
16. Malomouzh AI, Arkhipova SS, Nikolsky EE, Vyskočil F (2011) Immunocytochemical demonstration of M(1) muscarinic acetylcholine receptors at the presynaptic and postsynaptic membranes of rat diaphragm endplates. *Physiol Res* 60: 185–188.
<https://doi.org/10.33549/physiolres.932131>
17. Newman Z, Malik P, Wu TY, Ochoa C, Watsa N, Lindgren C (2007) Endocannabinoids mediate muscarine-induced synaptic depression at the vertebrate neuromuscular junction. *Eur J Neurosci* 25: 1619–1630.
<https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2007.05422.x>
18. Felder CC, Ma AL, Briley EM, Axelrod J (1993) Muscarinic acetylcholine receptor subtypes associated with release of Alzheimer amyloid precursor derivatives activate multiple signal transduction pathways. *Ann NY Acad Sci* 695: 15–18.
<https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1993.tb23020.x>

19. Guo J, Schofield GG (2003) Activation of muscarinic m5 receptors inhibits recombinant KCNQ2/KCNQ3 K⁺ channels expressed in HEK293T cells. *Eur J Pharmacol* 462: 25–32. [https://doi.org/10.1016/s0014-2999\(03\)01323-2](https://doi.org/10.1016/s0014-2999(03)01323-2)
20. Cumbay MG, Watts VJ (2005) Galphaq potentiation of adenylate cyclase type 9 activity through a Ca²⁺/calmodulin-dependent pathway. *Biochem Pharmacol* 69: 1247–1256. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2005.02.001>
21. Cantrell AR, Ma JY, Scheuer T, Catterall WA (1996) Muscarinic modulation of sodium current by activation of protein kinase C in rat hippocampal neurons. *Neuron* 16: 1019–1026. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(00\)80125-7](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(00)80125-7)
22. Pemberton KE, Jones SV (1997) Inhibition of the L-type calcium channel by the five muscarinic receptors (m1-m5) expressed in NIH 3T3 cells. *Pflugers Arch* 433: 505–514. <https://doi.org/10.1007/s004240050306>
23. Mitchell JF, Silver A (1963) The spontaneous release of acetylcholine from the denervated hemidiaphragm of the rat. *J Physiol* 165: 117–129. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1963.sp007046>
24. Krnjevic K, Straughan DW (1964) The release of acetylcholine from the denervated rat diaphragm. *J Physiol* 170: 371–378. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1964.sp007337>
25. Molenaar PC, Polak RL (1980) Acetylcholine synthesizing enzymes in frog skeletal muscle. *J Neurochem* 35: 1021–1025. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1980.tb07855.x>
26. Tucek S (1982) The synthesis of acetylcholine in skeletal muscles of the rat. *J Physiol* 322: 53–69. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1982.sp014022>
27. Krivoi II (2002) Mechanisms of the non-neurotransmitter actions of acetylcholine in the neuromuscular apparatus. *Neurosci Behav Physiol* 32: 149–156. <https://doi.org/10.1023/a:1013975324963>
28. Vyskocil F, Malomouzh AI, Nikolsky EE (2009) Non-quantal acetylcholine release at the neuromuscular junction. *Physiol Res* 58: 763–784. <https://doi.org/10.33549/physiolres.931865>

Effects of Compound VU 0238429, an Allosteric Modulator of M₅ Cholinergic Receptors, on the Neuromuscular Transmission in the Mouse Diaphragm

I. V. Kovyazina^{a, b, *}, A. A. Khamidullina^b, N. S. Fedorov^c, and A. I. Malomouzh^{a, **}

^aKazan Institute of Biochemistry and Biophysics, FRC Kazan Scientific Center, Russian Academy of Sciences, Kazan, Russia

^bKazan State Medical University, Department of Medical and Biological Physics, Kazan, Russia

^cKazan Federal University, Kazan, Russia

*E-mail: irina.kovyazina@list.ru

**E-mail: artur57@gmail.com

The effects of compound VU 0238429, an allosteric modulator of muscarinic cholinergic receptors of M₅ subtype, on the amplitude and temporal parameters of spontaneous and evoked endplate potentials as well as on the force of muscle contractions at different patterns of motor nerve stimulation were studied. It was shown that M₅ cholinergic receptors regulate the quantal release of acetylcholine from motor nerve endings in the mouse diaphragm. Specifically, M₅ activation increases the level of transmitter release during low-frequency nerve stimulation (0.5 Hz) and enhances the synaptic depression at 70 Hz. Also, the pharmacological potentiation of M₅ cholinergic receptors exerts the depressing effect on the force of skeletal muscle contractions at both direct and indirect stimulation with frequencies in the range from 0.5 to 70 Hz, that must be taken into account when developing new medicals aimed to affect M₅ cholinergic receptors.

Keywords: neuromuscular contact, M₅ cholinergic receptor, acetylcholine, endplate potential, modulation of synaptic transmission, muscle contraction