

## УЧАСТИЕ ПРЕСИНАПТИЧЕСКИХ АДЕНОЗИНОВЫХ РЕЦЕПТОРОВ А2А-ТИПА В МОДУЛИРОВАНИИ СЕКРЕЦИИ МЕДИАТОРА В НЕРВНО-МЫШЕЧНЫХ СИНАПСАХ МЫШИ

Тарасова Е.О.<sup>1</sup>, Гайдуков А.Е.<sup>1</sup>, Балежина О.П.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Москва, Россия (119234, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12), e-mail: [cate1990@list.ru](mailto:cate1990@list.ru)

В электрофизиологическом исследовании на нервно-мышечных синапсах мыши показано, что в условиях короткого ритмического залпа (50 Гц в течение 1 секунды) потенциалов концевой пластинки (ПКП) блокада рецепторов аденозина А2А-типа их избирательным антагонистом ZM241385 не влияет на секрецию медиатора. Но на данном фоне растормаживание L-типа кальциевых каналов под действием ингибитора кальцинейрина CsA не приводит к усилению вызванного выброса ацетилхолина (АХ). Агонист А2А-рецепторов CGS-21680 вызывает значительное увеличение квантового состава ПКП по всему ходу залпа. При предварительном «демаскировании» кальциевых каналов L-типа циклоспорином А аппликация CGS-21680 не приводит к дополнительному усилению нервно-мышечной передачи. Сделано заключение, что каскад, запускаемый активацией А2А-рецепторов эндогенным аденозином, не участвует в тоническом модулировании секреции медиатора, но его действие необходимо для облегчения выброса ацетилхолина при растормаживании L-типа кальциевых каналов.

Ключевые слова: аденозиновые рецепторы А2А-типа, кальцинейрин, L-тип кальциевых каналов, нервно-мышечный синапс

## MODULATORY ROLE OF PRESYNAPTIC A2A-TYPE ADENOSINE RECEPTORS IN TRANSMITTER RELEASE IN MOUSE NEUROMUSCULAR JUNCTIONS

Tarasova E.O.<sup>1</sup>, Gaydukov A.E.<sup>1</sup>, Balezina O.P.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation (119991, Moscow, Leninskie Gory, 1-12), e-mail: [cate1990@list.ru](mailto:cate1990@list.ru)

Electrophysiological research revealed that the block of A2A-type adenosine receptors by their selective antagonist ZM241385 doesn't alter transmitter release during short rhythmic trains (50 Hz during 1 second) of end plate potentials (EPP) in mouse neuromuscular junctions. Nevertheless, under these conditions activation of L-type voltage-gated calcium channels through calcineurin inhibition by cyclosporine A (CsA) doesn't lead to facilitation of evoked acetylcholine (ACh) secretion. A2A-receptor agonist CGS-21680 produces a significant increase of quantal content of each EPP in the train. We demonstrated that when L-type calcium channels are preliminary activated by CsA application, the addition of CGS-21680 doesn't result in further potentiation of evoked synaptic transmission. The conclusion has been made that the molecular cascade starting from activation of A2A-receptors by endogenous adenosine doesn't participate in transmitter release modulation, but it is necessary for ACh release facilitation via L-type calcium channel activation.

Keywords: A2A-type adenosine receptors, calcineurin, L-type calcium channels, neuromuscular junction

### Введение

Известно, что при залповой активности нервно-мышечных синапсов из АТФ в синаптической щели может образовываться аденозин и действовать на свои пресинаптические рецепторы, в частности на рецепторы А2А-типа. Вследствие того что на нервном окончании присутствуют различные типы аденозиновых рецепторов, влияние аденозина на вызванную активность синапсов не является однозначным [2].

Показано, что связывание аденозина с пресинаптическими А2А-рецепторами влечёт за собой усиление работы аденилатциклазы и последующую активацию РКА. В мотонейронах РКА обладает множеством мишеней, в том числе она способна фосфорилировать

кальциевые каналы L-типа [5]. В нервно-мышечных синапсах этот тип кальциевых каналов обычно не принимает участия в регуляции выброса ацетилхолина [1]. Однако при определённых условиях L-тип кальциевых каналов может вовлекаться в работу синапса и тем самым облегчать секрецию медиатора [3]. В связи с этим нас интересовало, способен ли внутриклеточный молекулярный каскад, запускаемый при активации A2A-рецепторов, влиять на L-тип кальциевых каналов и за счёт этого усиливать выброс ацетилхолина в нервно-мышечных синапсах мышцы.

### **Цели исследования**

- 1) Выявить роль аденозиновых рецепторов A2A-типа в модулировании секреции ацетилхолина в нервно-мышечных синапсах мышцы.
- 2) Проследить влияние каскада, реализуемого через A2A-рецепторы, на активность кальциевых каналов L-типа.

### **Материалы и методы**

Исследование вызванной и спонтанной активности моторных синапсов мышей проводили на изолированных «рассеченных» нервно-мышечных препаратах диафрагмальной мышцы (*m. diaphragma - n. phrenicus*) при комнатной температуре (20°C). Препарат помещали в камеру объемом 4 мл и перфузировали оксигенированным (95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>) раствором Лайли для теплокровных животных (содержащим (мМ): NaCl – 135, NaHCO<sub>3</sub> – 16.3, глюкоза – 11, KCl – 4, CaCl<sub>2</sub> – 2, MgCl<sub>2</sub> – 1, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 0.9; pH 7.2-7.4). Регистрацию миниатюрных потенциалов концевой пластинки (МПКП) и вызванных потенциалов концевой пластинки (ПКП) осуществляли внутриклеточно при помощи стандартной микроэлектродной техники отведения потенциалов. Для этого были использованы стеклянные (Pugex) микроэлектроды, заполненные 2,5 М KCl (сопротивление кончика 10-15 МОм). При исследовании ритмической активности синапсов стимулировали диафрагмальный нерв короткими пачками сверхпороговых импульсов с частотой 50 Гц (в течение 1 секунды). Сигналы регистрировали при помощи усилителя Axoclamp-2B (Molecular Devices). Запись сигналов осуществлялась на жесткий диск компьютера с помощью аналого-цифрового преобразователя “L-Card E-154” с интерфейсом “PowerGraph”. В каждой серии экспериментов использовали не менее трех нервно-мышечных препаратов. В контроле регистрировали миниатюрные потенциалы концевой пластинки (МПКП) и вызванные ПКП не менее чем в 5 разных синапсах. Затем в перфузирующий раствор в определенном порядке добавляли исследуемые вещества и проводили регистрацию электрических ответов от разных синапсов в течение 60-90 минут. Полученные данные обрабатывали в программе “MiniAnalysis” (Synptosoft). Помимо определения средних значений амплитуд МПКП и ПКП, производили расчёт квантового

состава ПКП (как отношение средней скорректированной на нелинейную сумму амплитуды ПКП к средней амплитуде МПКП). Достоверность различий между выборками оценивали по t-критерию Стьюдента и критерию Манна-Уитни. Уровень значимости (p) отличий между двумя выборками составлял 0,05 (n – количество исследованных синапсов).

В экспериментах использовали следующие фармакологические препараты:

Циклоспорин А (ингибитор кальцинейрина), EnzoLife Sciences©; ZM241385 (антагонист А2А-рецепторов), CGS-21680 (агонист А2А-рецепторов), оба препарата Sigma©.

Для приготовления маточных растворов всех препаратов в качестве растворителя использовали диметилсульфоксид (DMSO). Финальные концентрации DMSO в рабочем растворе составляли не более 0,05 % (v/v) и не оказывали самостоятельного действия на параметры спонтанной и вызванной активности в моторных синапсах мышцы.

### **Результаты и обсуждение**

Для выявления роли аденозиновых рецепторов А2А-типа в регуляции секреции ацетилхолина (АХ) в моторных синапсах мышцы, в первой серии экспериментов мы проводили блокаду этих рецепторов при помощи их избирательного антагониста ZM241385 (10 нМ). При аппликации ZM241385 не происходило изменений ни средней амплитуды МПКП (в контроле  $1,02 \pm 0,05$  мВ (n=21), на фоне ZM241385 –  $1,00 \pm 0,06$  мВ (n=19,  $p > 0,05$ )); ни квантового состава ПКП на всём протяжении залпа ПКП (квантовый состав первого ПКП в залпе составлял  $30,77 \pm 1,45$  (n=21) в контроле и  $30,51 \pm 1,44$  (n=19,  $p > 0,05$ ) на фоне блокатора). Значит, каскад, запускаемый при активации А2А-рецепторов, не оказывает выраженного облегчающего влияния на секрецию АХ.

Вероятно, роль этого каскада реакций может становиться более значимой при специальных условиях, например, при растормаживании L-типа кальциевых каналов. Известно, что можно добиться включения L-типа кальциевых каналов в регуляцию выброса АХ с помощью CsA, снимая тормозный контроль на эти каналы со стороны кальцинейрина, при этом происходит значительный прирост квантового состава ПКП [4]. Поэтому далее мы решили исследовать, играют ли А2А-рецепторы какую-либо роль в облегчении выброса АХ, происходящем при ингибировании кальцинейрина с помощью циклоспорина А (CsA).

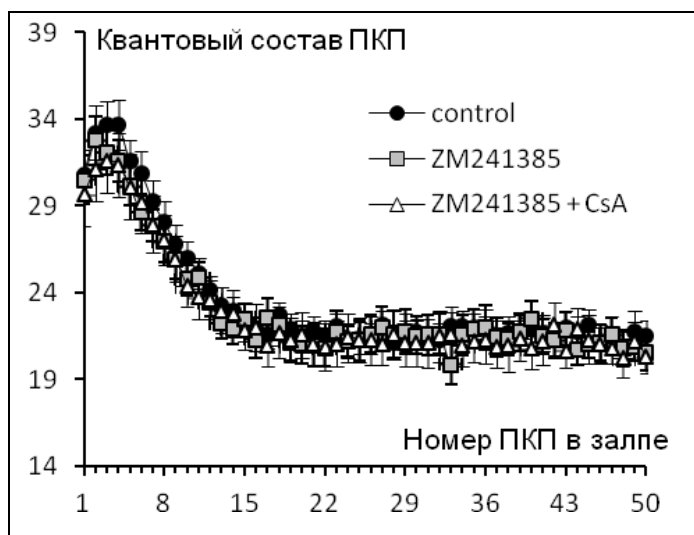
Оказалось, что облегчающее действие CsA на вызванную секрецию АХ предотвращается аппликацией ZM241385 (Рис. 1).

Следовательно, внутриклеточный каскад, запускаемый активацией A2A-рецепторов эндогенным аденозином, и кальцинейрин функционально антагонистичны и имеют общую мишень – L-тип кальциевых каналов. Причем, в норме доминирует тормозное тоническое подавление работы L-типа каналов со стороны кальцинейрина, несмотря на одновременное активирующее действие со стороны A2A-рецепторов. При этом, как мы впервые установили, для демаскирования L-типа кальциевых

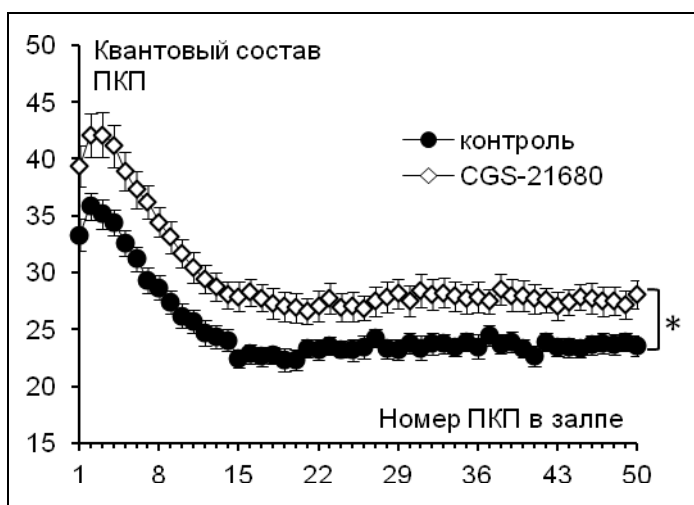
каналов необходимым условием является не только ингибирование кальцинейрина, но и одновременная активность A2A-рецепторов.

Мы предположили, что усиление сигнализации через A2A-рецепторы способно приводить к сдвигу баланса регуляторных воздействий на L-тип кальциевых каналов в сторону потенцирования их работы в противовес тормозному влиянию кальцинейрина на эти каналы.

Аппликация селективного агониста A2A-рецепторов CGS-21680 (1 мкМ) приводила к приросту квантового состава ПКП по всему ходу залпа (Рис. 2).



**Рис. 1.** Изменение квантового состава ПКП по ходу короткого ритмического залпа (50 Гц) в контроле (n=21), на фоне 10 нМ ZM241385 (n=19) и при действии 1 мкМ CsA на фоне ZM241385 (n=18).



**Рис. 2.** Изменение квантового состава ПКП по ходу короткого ритмического залпа (50 Гц) в контроле (n=19) и на фоне действия 1 мкМ CGS-21680 (n=28). \* - p<0,05.

Квантовый состав первого ПКП в залпе составил  $33,29 \pm 1,41$  ( $n=19$ ) в контроле, а на фоне CGS-21680 (1 мкМ) –  $39,42 \pm 1,81$  ( $n=28$ ,  $p < 0,05$ ). При этом амплитуда МПКП достоверно не изменялась и равнялась  $0,95 \pm 0,05$  мВ в контроле и  $1,05 \pm 0,05$  мВ ( $p > 0,05$ ) на фоне действия CGS-21680.

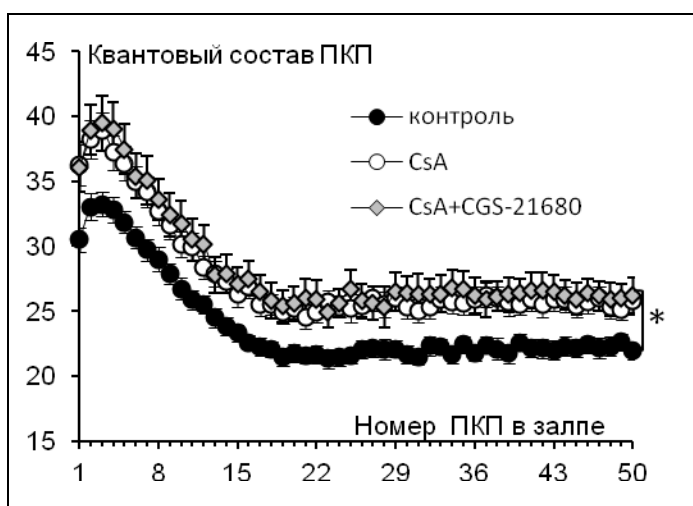
То есть каскад реакций, запускаемый экзогенным агонистом А2А-рецепторов, участвует в облегчении вызванной секреции АХ, несмотря на присутствие функционально активного кальцинейрина в терминали.

Нас интересовало, играет ли растормаживание L-типа кальциевых каналов ключевую роль в каскаде, осуществляемом при активации А2А-типа рецепторов экзогенным агонистом, или же действие этих рецепторов на нервно-мышечную передачу может реализовываться и другими путями. Поэтому далее мы исследовали влияние агониста А2А-рецепторов CGS-21680 (1 мкМ) на фоне демаскирования кальциевых каналов L-типа при действии CsA (1 мкМ).

При аппликации CsA квантовый состав каждого ПКП в залпе увеличивался по сравнению с контролем (для первого ПКП в залпе от  $30,51 \pm 0,92$  ( $n=29$ ) до  $36,26 \pm 1,57$  ( $n=34$ ,  $p < 0,05$ )). На фоне CsA добавление CGS-21680 не вызывало дополнительного прироста квантового состава ПКП в залпе (Рис. 3). Амплитуда МПКП не претерпевала достоверных изменений на протяжении всего эксперимента (в контроле –  $1,02 \pm 0,04$  мВ ( $n=29$ ), под влиянием CsA –  $1,09 \pm 0,04$  мВ ( $n=34$ ), при действии CGS-21680 на фоне CsA –  $1,14 \pm 0,05$  ( $n=27$ ,  $p > 0,05$ )).

Таким образом, если L-тип кальциевых каналов уже демаскирован (за счет снятия тормозного действия кальцинейрина и присутствия активирующего действия эндогенного аденозина на L-тип каналов), то дополнительная активация А2А-рецепторов их экзогенным агонистом уже не приводит к дополнительному усилению секреции медиатора. Отсюда следует, что основной мишенью внутриклеточного каскада реакций, начинающегося с А2А-рецепторов, действительно являются кальциевые каналы L-типа.

### Заключение



**Рис. 3.** Изменение квантового состава ПКП по ходу короткого ритмического залпа (50 Гц) в контроле ( $n=29$ ), на фоне 1 мкМ CsA ( $n=34$ ) и при действии 1 мкМ CGS-21680 ( $n=28$ ) на фоне CsA. \* -  $p < 0,05$

Итак, нами показано участие пресинаптических аденозиновых рецепторов A<sub>2</sub>A-типа в модуляции секреции ацетилхолина в нервно-мышечных синапсах мышцы в условиях короткого ритмического залпа. Активация A<sub>2</sub>A рецепторов экзогенным агонистом приводит к облегчению выброса медиатора, связанного с растормаживанием L-типа кальциевых каналов терминалей. Вместе с тем, активация A<sub>2</sub>A-рецепторов эндогенным аденозином сама по себе не достаточна для облегчения передачи, но необходима для растормаживания кальциевых каналов L-типа и последующего облегчения выброса АХ при блокаде фосфатазы кальцинейрина.

### Список литературы

1. Balezina O.P., Bogacheva P.O., Orlova T.Y. Effect of L-type calcium channel blockers on activity of newly formed synapses in mice // Bull. Exp. Biol. Med. – 2007. – Vol. 143, №2 – P.171-4.
2. Garcia N. Adenosine A<sub>1</sub> and A<sub>2</sub>A receptor-mediated modulation of acetylcholine release in the mice neuromuscular junction // Eur. J. Neurosci. – 2013. – Vol. 38, №2. – P. 2229-41.
3. Gaydukov A.E., Melnikova S.N., Balezina O.P. 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. – 2009. – Vol.148, №2 – P. 163-6.
4. Gaydukov A.E., Tarasova E.O., Balezina O.P. Calcium-dependent phosphatase calcineurin downregulates evoked neurotransmitter release in neuromuscular junctions of mice // Neurochemical Journal – 2013. – Vol. 7, № 1 – P. 29-33.
5. Oliveira L., Correia-de-Sá P. Protein kinase A and Ca(v)1 (L-Type) channels are common targets to facilitatory adenosine A<sub>2</sub>A and muscarinic M1 receptors on rat motoneurons // Neurosignals – 2005. – Vol. 14, №5. – P. 262-72.

### Рецензенты:

Гудков С.В., д.б.н, в.н.с., Федеральное Государственное Бюджетное Учреждение Науки Институт Теоретической и Экспериментальной Биофизики РАН (ИТЭБ РАН), г. Москва.

Белова Н.А., д.б.н, в.н.с., Федеральное Государственное Бюджетное Учреждение Науки Институт Теоретической и Экспериментальной Биофизики РАН (ИТЭБ РАН), г. Москва.