

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ



УДК 612.822.3

Регуляция активности регенерирующих моторных синапсов с участием эндоканнабиноидов

П.О. Богачева , К.А. Чернышев , Е.О. Тарасова ,
Д.А. Потапова , О.П. Балежина*

Кафедра физиологии человека и животных, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12

**e-mail: balezina@mail.ru*

В работе исследовали влияние эндоканнабиноидов арахидоноилэтаноламида (АЭА), известного также как анандамид, и 2-арахидоноилглицерина (2-АГ) на параметры миниатюрных потенциалов концевой пластинки (МПКП) и вызванных потенциалов концевой пластинки (ПКП) моторных синапсов, восстанавливающихся в ходе реиннервации мышцы — длинного разгибателя пальцев руки. 2-АГ увеличивал амплитуду МПКП на 35%, а также увеличивал амплитуду ПКП на 37%, не влияя при этом на квантовый состав ПКП и другие параметры секреции медиатора. Эффект предотвращался ингибитором везикулярного транспортера ацетилхолина везамиколом и обратным агонистом каннабиноидных рецепторов СВ1-типа AM251. АЭА не вызывал изменений амплитуды и других параметров МПКП, однако снижал квантовый состав ПКП на 27%. Тормозный эффект АЭА предотвращался AM251, а также блокатором Ca^{2+} -каналов L-типа нитрендипином. Впервые установлено, что в регенерирующих моторных синапсах АЭА и 2-АГ, активируя один и тот же тип пресинаптических СВ-рецепторов, имеют разные конечные мишени, влияют на разные параметры квантовой секреции ацетилхолина и оказывают разнонаправленное воздействие на синаптическую передачу. Наличие как облегчающих, так и тормозных эффектов эндоканнабиноидов может служить для тонкой настройки и регуляции синаптической передачи в созревающих моторных контактах.

Ключевые слова: регенерация, моторные синапсы, эндоканнабиноиды, анандамид, 2-арахидоноилглицерин, потенциалы концевой пластинки

DOI: 10.5959/MSU0137-0952-16-79-2S-12

Введение

Эндоканнабиноиды (ЭК) — липофильные молекулы, высвобождаемые из фосфолипидов клеточных мембран. Наиболее широко представлены два классических ЭК — арахидоноилэтаноламид (АЭА), известный также как анандамид, и 2-арахидоноилглицерин (2-АГ), близкие по структуре, но синтезируемые и расщепляемые с помощью разных ферментных систем. Подробно описана их продукция и свойства в центральных синапсах: образуясь в постсинаптических структурах во время синаптической активности, ЭК ретроградно воздействуют на пресинаптические каннабиноидные рецепторы СВ1- или СВ2-типа [1]. Это приводит к торможению секреции медиаторов и подавлению передачи в синапсах ЦНС [2].

Спектр активности ЭК, однако, не исчерпывается их центральным действием. Описана возможность синтеза и высвобождения ЭК в целом ряде

периферических органов и тканей, в том числе и в скелетной мускулатуре [3]. Показано присутствие СВ-рецепторов как на мышечных волокнах, так и в нервных терминалях моторных синапсов [3, 4]. Немногочисленные исследования влияния ЭК на моторные синапсы скелетных мышц, однако, дали противоречивые результаты [5–7].

В последние годы нами были обнаружены неканонические, не имеющие аналогов в синапсах ЦНС, эффекты ЭК, облегчающие передачу в зрелых моторных синапсах. 2-АГ, действуя на пресинаптические СВ1-рецепторы, увеличивал размер кванта медиатора и амплитуду МПКП [5, 8–10]. АЭА, также активируя СВ1-рецепторы, увеличивал квантовый состав ПКП [8, 9]. Могут ли АЭА и 2-АГ оказывать аналогичные либо другие влияния и на функционально незрелые, регенерирующие моторные синапсы, — оставалось не изученным. Целью данной работы стало исследование

реактивности регенерирующих синапсов к воздействиям экзогенных АЭА и 2-АГ, а также определение возможных рецепторов и механизмов, участвующих в эффектах ЭК в регенерирующих синапсах, используя модель денервации-реиннервации мышцы — длинного разгибателя пальцев (*m. extensor digitorum longus (m. EDL)*) мышцы.

Материалы и методы

Объект исследования. Эксперименты проводили на нервно-мышечных препаратах длинного разгибателя пальцев и малоберцового нерва (*m. EDL — n. peroneus*), взрослых (P45–60) самцов мышей линии BALB/c, полученных из лаборатории экспериментальных животных биологического факультета МГУ, Москва, Россия. Содержание животных и экспериментальные процедуры соответствовали директиве 86/609/ЕЕС по обращению человека с лабораторными животными. Мыши умерщвлялись посредством ингаляции изофлюраном и последующего быстрого обезглавливания.

Для запуска новообразования синапсов за 11 сут до эксперимента проводили хирургическую операцию по передавливанию *n. peroneus*. Под изофлюрановой анестезией животным разрезали кожу и мышцы бедра и раздавливали участок нерва в 10 мм от его входа в *m. EDL* глазным пинцетом (толщина браншей 1 мм) с силиконовыми насадками. Успешность повреждения оценивали по появлению на нерве прозрачного участка в месте сдавливания. Подобная модель денервации-реиннервации широко используется в нейрофизиологии [11–16].

Электрофизиологические эксперименты. Изолированный нервно-мышечный препарат помещали в экспериментальную камеру объемом 3 мл, перфузируемую оксигенированным (95% O₂, 5% CO₂) раствором Лайли (135 мМ — NaCl, 1 мМ — MgCl₂, 4 мМ — KCl, 0,9 мМ — NaH₂PO₄, 2 мМ — CaCl₂, 11 мМ — C₆H₁₂O₆, 16 мМ — NaHCO₃).

Внутриклеточную регистрацию спонтанных одноквантовых миниатюрных потенциалов концевой пластинки (МПКП) и вызванных стимуляцией нерва (50 Гц, 1 с) потенциалов концевой пластинки (ПКП) осуществляли с помощью стеклянных микроэлектродов (сопротивление кончика 15–20 МОм) и усилителя биопотенциалов Axoclamp–2B (Molecular Devices, США). Сигналы оцифровывали при помощи АЦП Е–154 (L-Card, Россия) с программным интерфейсом PowerGraph (ДиСофт, Россия). Обработку сигналов проводили при помощи программы MiniAnalysis (Synaptosoft, США).

Для регистрации ПКП, нерв раздражали серебряными биполярными электродами. Для предотвращения мышечных сокращений в ответ на стимуляцию предварительно проводили рассечение мышечных волокон *m. EDL* (методика описана ранее [17]). Такой подход позволяет одновременно

регистрировать МПКП и ПКП в одном и том же синапсе и в дальнейшем рассчитывать квантовый состав ПКП.

Регистрировали спонтанную и/или вызванную активность как минимум 5 синапсов в контроле, затем в омывающий раствор добавляли исследуемые вещества и регистрировали активность 5–10 синапсов на протяжении 60 мин инкубации с веществами.

В каждой серии экспериментов использовали не менее 3 нервно-мышечных препаратов.

Анализ данных и статистика. Оценивали мембранный потенциал (МП) мышечных волокон, время нарастания и время полуспада МПКП, их амплитуду и частоту; амплитуду и квантовый состав ПКП. Для нивелирования изменения движущей силы сдвига потенциала при изменениях МП стандартизировали значение амплитуд МПКП в нерассеченных нервно-мышечных препаратах к МП –70 мВ; в рассеченных препаратах амплитуды МПКП и ПКП стандартизировали к –50 мВ. Квантовый состав (КС) ПКП оценивали, как отношение амплитуды ПКП к средней амплитуде МПКП в данном синапсе.

Статистический анализ проводили в GraphPad Prism 8.0 (GraphPad, США). Нормальность распределения значений оценивали по критерию Д’Агостино–Пирсона. Достоверность различий между выборками оценивали при помощи критериев Стьюдента, Манна–Уитни и двухфакторного дисперсионного анализа. Уровень статистической значимости отличий между выборками составлял 0,05 (*n* — количество исследованных синапсов). Все данные представлены как среднее ± стандартная ошибка среднего.

Материалы. В экспериментах использовали: АЭА (Merck, США); 2-АГ, AM251 и нитрендипин (Tocris, США); везамикол (Enzo Life Sciences, США). Для приготовления стоковых растворов всех веществ в качестве растворителя использовали DMSO (Хеликон, Россия). Финальная концентрация DMSO в рабочем растворе составляла не более 0,01% (v/v) и не оказывала самостоятельного действия на параметры синаптической активности.

Результаты и обсуждение

Синапсы, находящиеся на ранней стадии формирования в ходе реиннервации мышечных волокон, имеют не только структурные, но и функциональные отличия от зрелых. Поэтому, прежде чем перейти к изложению результатов, стоит охарактеризовать базовые параметры синаптической передачи в регенерирующих синапсах *m. EDL* и их отличия от таковых в зрелых синапсах этой мышцы.

Спонтанная одноквантовая секреция характеризуется очень низкой частотой, но при этом достаточно высокой амплитудой за счет встречающихся «гигантских» МПКП, а также более

продолжительными временами нарастания и спада. Амплитуда и квантовый состав ПКП значительно ниже, чем в зрелых синапсах. Это связано с меньшим размером самих нервных терминалей и количеством активных зон в них, и, как следствие, со сниженным размером готового к выбросу пула везикул [13]. Кроме этого, при высокочастотном раздражении нерва в регенерирующих моторных синапсах наблюдается особый паттерн синаптической пластичности: в отличие от зрелых синапсов, депрессия передачи по ходу залпа ПКП не развивается, а напротив, амплитуда ПКП возрастает по сравнению с первым ПКП.

Таким образом, мембранный потенциал покоя в нерасщепленных волокнах реиннервированной *m. EDL* составлял $-65,1 \pm 0,5$ мВ. В препаратах интактной *m. EDL* это значение равнялось $-68 \pm 0,7$ мВ.

Средние значения параметров МПКП в регенерирующих синапсах в контроле таковы: амплитуда $1,0 \pm 0,05$ мВ, частота $0,2 \pm 0,04$ Гц, время нарастания 10–90% $1,4 \pm 0,06$ мс, время полуспада $4,5 \pm 0,18$ мс. В зрелых же синапсах эти параметры следующие: амплитуда МПКП $0,8 \pm 0,04$ мВ, частота $0,6 \pm 0,04$ Гц, время нарастания 10–90% $0,9 \pm 0,03$ мс, время полуспада $2,7 \pm 0,11$ мс.

Параметры ПКП в регенерирующих синапсах в контроле, в среднем, таковы: амплитуда $11,0 \pm 0,8$ мВ, квантовый состав 15 ± 1 . В функционально зрелых синапсах амплитуда ПКП, в среднем, достигает $17,0 \pm 0,6$ мВ, а квантовый состав $26,0 \pm 1$.

Влияние 2-АГ на секрецию медиатора в регенерирующих моторных синапсах. При аппликации 2-АГ (1 мкМ) не наблюдали изменений МП мышечных волокон, частоты или временных параметров МПКП. При этом значительно, на 35%, возросла средняя амплитуда МПКП (рис. 1А). Это сопровождалось сдвигом кумулятивной кривой вероятности распределения амплитуд вправо, в область более высоких значений (рис. 1Б).

Таким образом, 2-АГ в регенерирующих синапсах приводил к возрастанию амплитуды МПКП, не затрагивая другие параметры, что полностью повторяет его эффект, ранее обнаруженный нами в зрелых моторных синапсах [9].

Необходимо было выяснить, связано ли такое увеличение амплитуды МПКП с увеличением размера кванта ацетилхолина (АХ). Везамикол (ингибитор везикулярного транспорта АХ, в концентрации 1 мкМ) полностью предотвращал потенцирующий эффект 2-АГ (рис. 1В, Г). Из этого следует, что наблюдаемый эффект развивался на пресинаптическом уровне и был ассоциирован с увеличением размера отдельных квантов АХ. Эти данные снова оказались аналогичны полученным ранее на зрелых моторных синапсах [8]. Это означает, что уже на стадии новообразования нервно-мышечных контактов функционально незрелые синапсы обладают реактивностью к 2-АГ, схожей с таковой у зрелых синапсов.

Влияние 2-АГ на вызванную многоквантовую секрецию АХ выражалось в равномерном приросте амплитуды ПКП в залпах на 33%. Значения

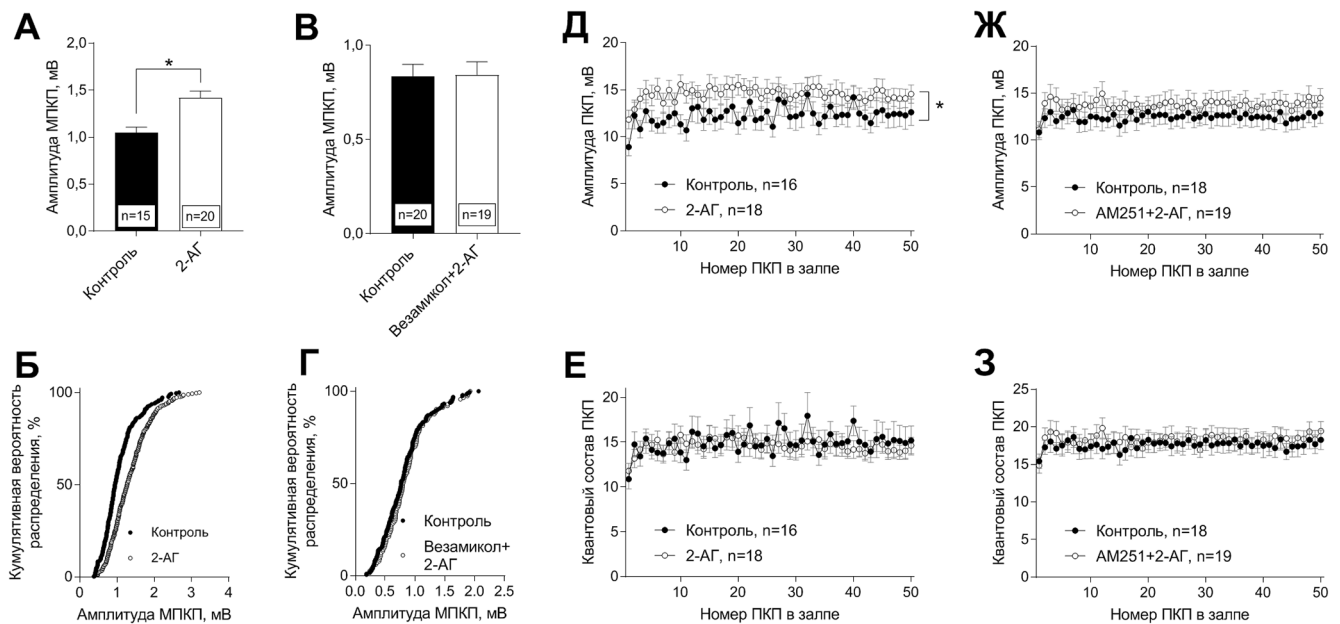


Рис. 1. Влияние 2-арахидоноилглицерина (2-АГ) на спонтанную и вызванную секрецию ацетилхолина (АХ) в регенерирующих моторных синапсах. **А** — возрастание амплитуды миниатюрных потенциалов концевой пластинки (МПКП) под действием 2-АГ, **Б** — сдвиг кумулятивной кривой вероятности распределения МПКП под действием 2-АГ, **В** — отсутствие влияния 2-АГ на амплитуду МПКП в присутствии везамикола, **Г** — отсутствие сдвига кумулятивной кривой вероятности распределения МПКП в присутствии везамикола и 2-АГ, **Д** — увеличение амплитуды потенциалов концевой пластинки (ПКП) в залпе под действием 2-АГ, **Е** — отсутствие изменений квантового состава (КС) ПКП под действием 2-АГ, **Ж**, **З** — отсутствие изменений амплитуды и КС ПКП в присутствии AM251 и 2-АГ; * — значимые различия при $p < 0,05$.

КС ПКП остались при этом на прежнем уровне, поскольку амплитуда МПКП, зарегистрированных параллельно с ПКП, также значимо выросла (рис. 1Д, Е).

На основании этих результатов можно предполагать, что увеличение амплитуды ПКП было связано с увеличением размера каждого кванта АХ в составе многоквантовых ПКП. Количество же квантов, секретируемых в ответ на каждый стимул, не изменялось.

Обнаружив выраженное потенцирующее влияние 2-АГ на синаптическую передачу в регенерирующих синапсах, было необходимо установить, каким типом СВ-рецепторов оно опосредовано.

Мы использовали обратный агонист каннабиноидных рецепторов СВ1-типа AM251 (1 мкМ). Сам по себе он не оказывал влияния на спонтанную и вызванную секрецию АХ. Однако в присутствии AM251 2-АГ более не приводил к возрастанию амплитуды ПКП (рис. 1Ж, 3). Это свидетельствует о том, что в регенерирующих синапсах 2-АГ реализует свои потенцирующие влияния на размер кванта медиатора, путем активации СВ1-рецепторов и последующего запуска механизма, приводящего к усилению загрузки АХ в везикулы и, как следствие, к росту размера квантов АХ. Подобная цепочка событий, включающая также участие протеинкиназы А, была описана нами ранее в зрелых моторных синапсах [8, 9]. Возможность запуска такого необычного для ЭК, неканонического регуляторного каскада в терминалах зрелых моторных синапсов была показана и в работе Морша и соавт.: при действии синтетического агониста СВ1-рецепторов,

также наблюдался рост амплитуды МПКП и ПКП, предотвращавшийся везамиколом [7].

В данной работе же нам впервые удалось обнаружить неканоническое, облегчающее синаптическую передачу, влияние экзогенного 2-АГ и в моторных синапсах с ослабленным функциональным статусом, находящихся на ранней стадии регенерации.

Влияние АЭА на секрецию медиатора в регенерирующих моторных синапсах. При аппликации АЭА (10 мкМ) не наблюдалось достоверных изменений МП мышечных волокон и параметров МПКП — их амплитуды, частоты или временного хода. На кумулятивной кривой вероятности распределения амплитуд МПКП не наблюдали сдвига относительно контроля (рис. 2А, Б). Таким образом, в отличие от 2-АГ, АЭА не влиял на спонтанную активность регенерирующих моторных терминалей. Однако ранее мы продемонстрировали, что в зрелых моторных синапсах АЭА облегчает спонтанную секрецию АХ, увеличивая частоту МПКП [9], а Морш и соавт. обнаружили увеличение амплитуды МПКП в присутствии АЭА [7].

Неожиданными и не совпадающими с эффектами в зрелых синапсах оказались и изменения ПКП. АЭА приводил к равномерному снижению амплитуды ПКП по ходу залпов на 27%. Поскольку амплитуда МПКП значимо не изменялась, то вместе с амплитудой ПКП параллельно снижался и их КС, в среднем, на 22% (рис. 2В, Г). Эти данные показывают, что действие АЭА в регенерирующих синапсах направлено на регуляцию количества секретируемых квантов медиатора, а не на размер отдельных квантов.

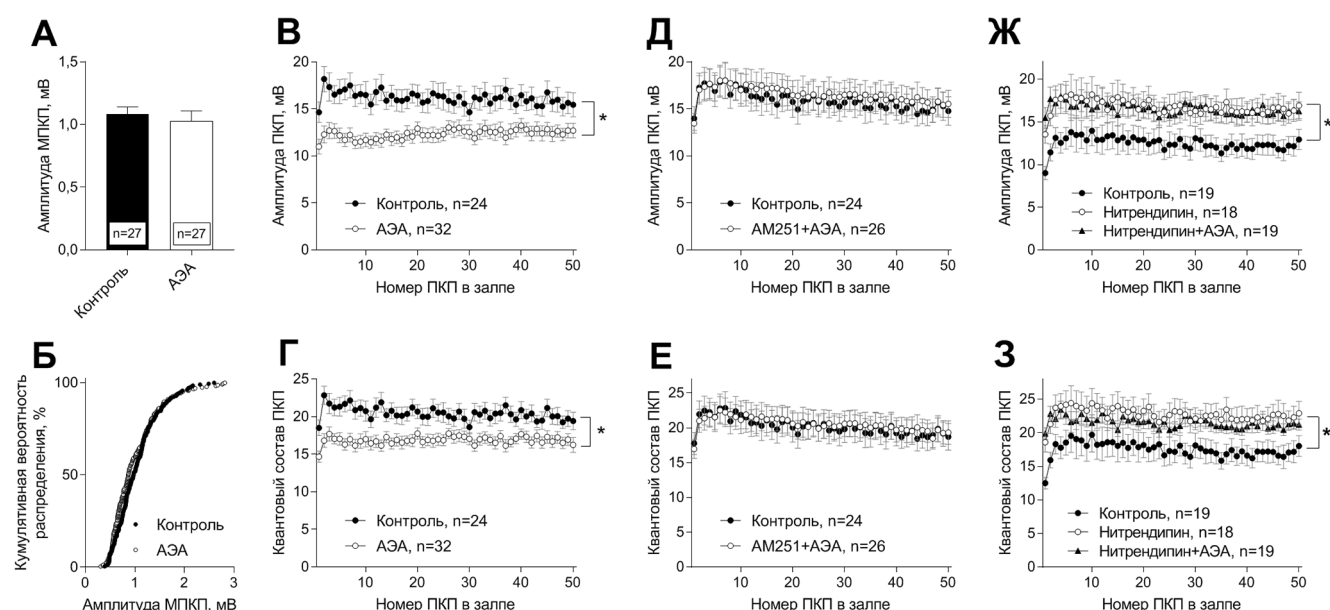


Рис. 2. Влияние арахидоноилэтаноламида (АЭА) на спонтанную и вызванную секрецию АХ в регенерирующих моторных синапсах. А — отсутствие изменений амплитуды МПКП под действием АЭА, Б — отсутствие сдвига кумулятивной кривой вероятности распределения МПКП под действием АЭА, В — снижение амплитуды ПКП в залпе под действием АЭА, Г — снижение КС ПКП в залпе под действием АЭА, Д — отсутствие изменений амплитуды ПКП в залпе в присутствии AM251 и АЭА, Е — отсутствие изменений КС ПКП в залпе в присутствии AM251 и АЭА, Ж — утрата влияния АЭА на амплитуду ПКП в залпе на фоне действия нитрендипина, З — утрата влияния АЭА на КС ПКП в залпе на фоне действия нитрендипина. * — значимые различия при $p < 0,05$.

Удивительным оказался и тот факт, что тормозный эффект АЭА полностью предотвращался в присутствии АМ251 (1 мкМ) (рис. 2Д, Е), а значит, и этот ЭК оказывал свое действие в регенерирующих синапсах путем активации рецепторов СВ1-типа.

Далее было необходимо установить, каким же образом АЭА приводит к снижению КС ПКП в регенерирующих синапсах.

Ранее в наших исследованиях эффектов АЭА в зрелых синапсах было установлено, что в качестве мишени действия АЭА могут выступать потенциалзависимые Ca^{2+} -каналы L-типа [9]. Мы предположили, что и в функционально незрелых синапсах действие АЭА может быть нацелено на активацию этого типа каналов. Дополнительным основанием для такого предположения был и тот факт, что снижение уровня вызванной секреции медиатора, напоминающее эффекты АЭА, наблюдалось при активации Ca^{2+} -каналов L-типа в регенерирующих синапсах. Блокада же этих каналов приводила к выраженному облегчению вызванной секреции [14, 18, 19]. Поэтому мы далее исследовали, сохранится ли тормозный эффект АЭА в условиях блокады Ca^{2+} -каналов L-типа нитрендипином.

Под действием нитрендипина (1 мкМ), как и ожидалось, наблюдали статистически значимый прирост амплитуды и КС ПКП на 50% по всему ходу залпа. Однако в этих условиях добавление АЭА (10 мкМ) не привело к дальнейшим изменениям амплитуды и КС ПКП (рис. 2Ж, 3).

Итак, несмотря на наличие собственного, облегчающего передачу, эффекта нитрендипина, последующее добавление АЭА могло бы нивелировать этот прирост амплитуды и КС ПКП, если бы он действовал через независимые от Ca^{2+} -каналов L-типа сигнальные каскады. Но тормозный эффект АЭА не проявился на фоне действия нитрендипина. Это позволяет предполагать, что мишенью действия АЭА в регенерирующих синапсах действительно являются Ca^{2+} -каналы L-типа.

Из литературных данных известно, что в центральных синапсах пресинаптические Ca^{2+} -каналы L-типа оказывают стимулирующее действие на секрецию медиатора [20, 21]. Эти каналы ингибируются при действии агонистов СВ1-рецепторов, а АЭА способен оказывать на них ингибирующее действие и независимо от активации СВ-рецепторов [22]. Однако способность АЭА не тормозить, а усиливать активность Ca^{2+} -каналов L-типа с помощью СВ1-опосредованного действия до сих пор не была показана. Такой неканонический механизм действия АЭА является, видимо, специфическим для периферических синапсов и представляет интерес для дальнейшего изучения.

Таким образом, мы установили, что и 2-АГ, и АЭА в регенерирующих синапсах: активируют пресинаптические СВ1-рецепторы, но при этом

вызывают противоположно направленные изменения квантовой секреции АХ, благодаря действию на разные параметры синаптической передачи (размер кванта в случае 2-АГ и КС ПКП в случае АЭА). Такой дуализм может быть следствием известного явления смещенного агонизма, характерного для ЭК, когда действие разных каннабиноидных лигандов (2-АГ, АЭА или других) на один и тот же тип метаботропных СВ-рецепторов может приводить к активации разных внутриклеточных каскадов и мишеней в нервных терминалях [5]. Для СВ1-рецепторов показана возможность взаимодействия как с $G_{i/o}$ белками, так и с G_s и G_q [23, 24]. При этом разные агонисты могут поощрять определенные конформации СВ1-рецептора и, соответственно, его взаимодействие с разными типами G-белков, запуская в дальнейшем разные сигнальные пути [25].

Заключение

В данной работе впервые удалось обнаружить ранее не известное, облегчающее синаптическую передачу, влияние экзогенного 2-АГ в регенерирующих синапсах, выражающееся в виде повышения амплитуды МПКП и ПКП. Это действие 2-АГ оказалось аналогичным таковому в зрелых синапсах и связанным с активацией пресинаптических СВ1-рецепторов и последующим увеличением размера квантов АХ. Роль такого потенцирования синаптической передачи под действием 2-АГ в регенерирующих синапсах может заключаться в повышении надежности синаптической передачи и поддержании эффективности моторного контроля.

У другого ЭК (АЭА) в регенерирующих синапсах впервые было обнаружено противоположно направленное СВ1-зависимое тормозное действие, подавляющее секрецию АХ за счет снижения КС ПКП. Причиной такого торможения оказалась дополнительная активация пресинаптических Ca^{2+} -каналов L-типа, которые, как известно, обладают необычным подавляющим действием на вызванную секрецию АХ в синапсах, находящихся на ранних стадиях формирования.

Предполагаемая роль АЭА в регенерирующих синапсах может заключаться в снижении вероятности истощения пула везикул при многоквантовой секреции, вызванной высокочастотной стимуляцией нерва.

Таким образом, исследование эффектов ЭК в функционально незрелых моторных синапсах впервые показало, что, несмотря на ослабленное функциональное состояние, такие контакты обладают высокой реактивностью к двум основным ЭК — АЭА и 2-АГ. Это раскрывает важную роль ЭК системы в регуляции синаптической передачи не только в центральных, но и в периферических синапсах, в том числе и на разных стадиях их функциональной зрелости. Наличие у ЭК систе-

мы как облегчающих, так и тормозных эффектов в регенерирующих моторных синапсах, а также неканонические механизмы их реализации, могут служить для тонкой регуляции процессов созревания, стабилизации или элиминации синапсов в ходе онтогенеза или при посттравматической реиннервации.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Hillard C.J. Circulating endocannabinoids: From whence do they come and where are they going? *Neuropsychopharmacology*. 2018;43(1):155–172.
- Ohno-Shosaku T., Tanimura A., Hashimoto-dani Y., Kano M. Endocannabinoids and retrograde modulation of synaptic transmission. *Neuroscientist*. 2012;18(2):119–132.
- Dalle S., Schouten M., Meeus G., Slagmolen L., Koppo K. Molecular networks underlying cannabinoid signaling in skeletal muscle plasticity. *J. Cell. Physiol.* 2022;237(9):3517–3540.
- Ge D., Odierna G.L., Phillips W.D. Influence of cannabinoids upon nerve-evoked skeletal muscle contraction. *Neurosci Lett*. 2020;725:134900.
- Balezina O.P., Tarasova E.O., Gaydukov A.E. Non-canonical Activity of endocannabinoids and their receptors in central and peripheral synapses. *Biochemistry (Mosc.), Suppl. Ser. A Membr. Cell Biol*. 2021;86(7):818–832.
- Haynes E.M., Kalmar J.M., Vis-Dunbar M., Crosby K.M., Mriduraj A., Jakobi J.M. A systematic review of how cannabinoids affect motoneuron output. *J. Neurophysiol.* 2023;130(2):247–263.
- Morsch M., Protti D.A., Cheng D., Braet F., Chung R.S., Reddel S.W., Phillips W.D. Cannabinoid-induced increase of quantal size and enhanced neuromuscular transmission. *Sci. Rep.* 2018;8(1):4685.
- Tarasova E.O., Khotkina N.A., Bogacheva P.O., Chernyshev K.A., Gaydukov A.E., Balezina O.P. Noncanonical potentiation of evoked quantal release of acetylcholine by cannabinoids anandamide and 2-arachidonoylglycerol in mouse motor synapses. *Biochemistry (Mosc.), Suppl. Ser. A Membr. Cell Biol*. 2021;15(4):395–405.
- Tarasova E.O., Khotkina N.A., Gaydukov A.E., Balezina O.P. Spontaneous acetylcholine release potentiation induced by 2-arachidonoylglycerol and anandamide in mouse motor synapses. *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2021;76(1):1–6.
- Tarasova E., Bogacheva P., Chernyshev K., Balezina O. Quantal size increase induced by the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol requires activation of CGRP receptors in mouse motor synapses. *Synapse*. 2024;78(1):e22281.
- McArdle J.J., Albuquerque E.X. A Study of the reinnervation of fast and slow mammalian muscles. *J. Gen. Physiol.* 1973;61(1):1–23.
- McArdle J.J. Complex end-plate potentials at the regenerating neuromuscular junction of the rat. *Experimental. Neurology*. 1975;49(3):629–638.
- Argentieri T.M., Aiken S.P., Laxminarayan S., McArdle J.J. Characteristics of synaptic transmission in reinnervating rat skeletal muscle. *Pflügers Arch.* 1992;421(2–3):256–261.
- Балезина О. П., Богачева П. О., Орлова Т. Ю. Влияние блокаторов кальциевых каналов L-типа на активность новообразуемых синапсов мыши. *Бюлл. эксп. биол. мед.* 2007;143(2):128–131.
- Favero M., Lorenzetto E., Bidoia C., Buffelli M., Busetto G., Cangiano A. Synapse formation and elimination: role of activity studied in different models of adult muscle reinnervation. *J. Neurosci. Res.* 2007;85(12):2610–2619.
- Teodori R.M., Betini J., de Oliveira L.S., Sobral L.L., Takeda S.Y., de Lima Montebelo M.I. Swimming exercise in the acute or late phase after sciatic nerve crush accelerates nerve regeneration. *Neural. Plast.* 2011;2011:783901.
- Gaydukov A.E., Bogacheva P.O., Tarasova E.O., Molchanova A.I., Miteva A.S., Pravdivceva E.S., Balezina O.P. Regulation of acetylcholine quantal release by coupled thrombin/BDNF signaling in mouse motor synapses. *Cells*. 2019;8(7):762.
- Sugiura Y., Ko, C.P. Novel modulatory effect of L-type calcium channels at newly formed neuromuscular junctions. *J. Neurosci.* 1997;17(3):1101–1111.
- Santafe M.M., Garcia N., Lanuza M.A., Uchitel O.D., Tomas J. Calcium channels coupled to neurotransmitter release at dually innervated neuromuscular junctions in the newborn rat. *Neurosci.* 2001;102(3):697–708.
- Rey S., Maton G., Satake S., Llano I., Kang S., Surmeier D.J., Silverman R.B., Collin T. Physiological involvement of presynaptic L-type voltage-dependent calcium channels in GABA release of cerebellar molecular layer interneurons. *J. Neurochem.* 2020;155(4):390–402.
- Deng W.K., Wang X., Zhou H.C., Luo F. L-type Ca^{2+} channels and charybdotoxin-sensitive Ca^{2+} -activated K^{+} channels are required for reduction of GABAergic activity induced by β_2 -adrenoceptor in the prefrontal cortex. *Mol. Cell. Neurosci.* 2019;101:103410.
- Boczek T., Zylinska L. Receptor-dependent and independent regulation of voltage-gated Ca^{2+} channels and Ca^{2+} -permeable channels by endocannabinoids in the brain. *Int. J. Mol. Sci.* 2021;22(15):8168.
- Zou S., Kumar U. Cannabinoid receptors and the endocannabinoid system: Signaling and function in the central nervous system. *Int. J. Mol. Sci.* 2018;19(3):833.
- Laprairie R.B., Bagher A.M., Kelly M.E., Dupre D.J., Denovan-Wright E.M. Type 1 cannabinoid receptor ligands display functional selectivity in a cell culture model of striatal medium spiny projection neurons. *J. Biol. Chem.* 2014;289(36):24845–24862.
- Al-Zoubi R., Morales P., Reggio P. H. Structural insights into CB1 receptor biased signaling. *Int. J. Mol. Sci.* 2019;20(8):1837.

Поступила в редакцию: 12.03.2024

После доработки: 15.04.2024

Принята в печать: 25.04.2024

RESEARCH ARTICLE

Regulation of neurotransmission in regenerating neuromuscular junctions involving endocannabinoids

P.O. Bogacheva , K.A. Chernyshev , E.A. Tarasova , D.A. Potapova , O.P. Balezina* 

Department of Human and animal physiology, School of Biology, Lomonosov Moscow State University, Leninskie gory 1–12, Moscow, 119234, Russia;

**e-mail: balezina@mail.ru*

The work was dedicated to investigation of the influence of two endocannabinoids – arachidonylethanolamide (AEA), also known as anandamide, and 2-arachidonoylglycerol (2-AG) on the parameters of miniature endplate potentials (MEPP) and evoked endplate potentials (EPP) of motor synapses at the early stage of regeneration during muscle reinnervation. 2-AG increased the amplitude of MEPP by 35%, and also increased the amplitude of EPP by 37%, without affecting quantal content of EPP or any other parameters of neurotransmitter secretion. This effect was prevented by vesicular acetylcholine transporter inhibitor vesamicol and by inverse agonist of CB1-type cannabinoid receptors AM251. AEA did not change the amplitude or any other parameters of MEPP, but reduced the quantal content of EPP by 27%. The inhibitory effect of AEA was prevented by AM251 and by the L-type Ca^{2+} channel blocker nitrendipine. Thus, it was established for the first time that in newly formed motor synapses AEA and 2-AG activate the same type of presynaptic cannabinoid receptors, but have different final targets, influence different parameters of quantal ACh secretion and have multidirectional effects on synaptic transmission. The presence of both facilitatory and inhibitory effects of endocannabinoids in regenerating synapses may serve to fine-tune and regulate synaptic transmission during their maturation.

Keywords: *regeneration, neuromuscular junctions, endocannabinoids, anandamide, 2-arachidonoylglycerol, endplate potentials*

Funding: The research was funded by Russian Science Foundation, project number 23-25-00065.

Сведения об авторах

Богачева Полина Олеговна — канд. биол. наук, доц. кафедры физиологии человека и животных биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-27-92; e-mail: untergang@inbox.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3525-4815>

Чернышев Кирилл Андреевич — студент магистратуры 2 года обучения кафедры физиологии человека и животных биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-27-92; e-mail: cherkir2000@yandex.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7692-5080>

Тарасова Екатерина Олеговна — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. кафедры физиологии человека и животных биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-27-92; e-mail: cate1990@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2233-1228>

Потапова Диана Андреевна — студент магистратуры 1 года обучения кафедры физиологии человека и животных биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-27-92; e-mail: potapovadiana2001@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0009-0008-3866-647X>

Балезина Ольга Петровна — докт. биол. наук, проф. кафедры физиологии человека и животных биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-27-92; e-mail: balezina@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6072-134X>