

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

УДК 612.822.3

Потенциация спонтанной секреции ацетилхолина в моторных синапсах мышцы под действием 2-арахидоноилглицерина и анандамида

Е.О. Тарасова*, Н.А. Хоткина, А.Е. Гайдуков , О.П. Балежина

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

*e-mail: cate1990@list.ru

Сравнивали изменения параметров миниатюрных потенциалов концевой пластинки (МПКП) диафрагмы мышцы при экзогенной аппликации двух классических эндоканнабиноидов — 2-арахидоноилглицерина (2-AG) и анандамида (AEA). 2-AG (1 мкМ) вызывал постепенный (в течение 2 ч) прирост амплитуды МПКП на 50%, не влияя при этом на частоту спонтанной секреции ацетилхолина (АХ). Усиливающий секрецию эффект 2-AG предотвращался действием обратного агониста CB1-рецепторов AM 251 или везамикола — блокатора везикулярного ацетилхолинового транспортера. AEA (30 мкМ), напротив, не вызвал изменений амплитуды МПКП, но индуцировал медленно развивающийся прирост частоты МПКП на 75%. Вызываемая AEA потенциация спонтанной секреции АХ предотвращалась AM 251, а также блокированием Ca^{2+} -каналов L-типа нитрендипином (1 мкМ) или ингибированием активности протеинкиназы А с помощью H89 (1 мкМ). Сделано заключение о способности как 2-AG, так и AEA оказывать пресинаптическое усиливающее влияние на спонтанную секрецию АХ. Стимулирующие эффекты эндоканнабиноидов, несмотря на активацию ими одних и тех же CB1-рецепторов, не перекрываются и направлены на увеличение либо размера квантов АХ (в случае 2-AG), либо частоты секреции АХ (в случае AEA). Это позволяет предполагать вовлечение разных внутриклеточных мишеней и каскадов в разнонаправленные стимулирующие эффекты 2-AG и AEA в моторных синапсах мышцы.

Ключевые слова: нервно-мышечный синапс, анандамид, 2-арахидоноилглицерин, миниатюрные потенциалы концевой пластинки (МПКП), Ca^{2+} -каналы L-типа, размер кванта

Ретроградная сигнализация в синапсах была открыта благодаря обнаружению в нейронах особого класса химических сигнализаторов, так называемых эндоканнабиноидов. Они представляют собой липофильные молекулы, образуемые из фосфолипидов мембраны в ответ на поступающие в нейрон сигналы [1]. В настоящее время наиболее известны два структурно различных эндоканнабиноида: 2-арахидоноилглицерин (2-AG) и анандамид (AEA). Оба они могут синтезироваться во время синаптической активности, что приводит к их высвобождению из постсинаптических нейронов и ретроградному действию на пресинаптические G-белок-сцепленные рецепторы. Это, в свою очередь, сопровождается торможением секреции медиатора в центральных синапсах [2, 3]. В последнее время активность эндоканнабиноидной системы обнаруживается и в периферических синапсах [4–6]. Для скелетной мускулатуры описаны ферментные системы синтеза и деградации эндоканнабиноидов [7–9], а также эндоканнабиноидные рецепторы (CB-рецепторы), локализованные как на мышце, так и в области нервно-

мышечных синапсов [4, 5, 10, 11]. Для анализа функционального значения эндоканнабиноидной системы часто используют синтетические агонисты и антагонисты CB-рецепторов, вызывающие как сходное, так и отличное от эффектов классических эндоканнабиноидов действие в синапсах [1, 3]. Ранее мы показали, что синтетический агонист CB-рецепторов WIN 55,212-2 вызывает усиление спонтанной секреции АХ в моторных синапсах диафрагмы мышцы, предотвращаемое блокаторами CB1-рецепторов [5]. Способны ли 2-AG и AEA оказывать аналогичное действие в моторных синапсах или же они обладают собственными эффектами, остается неизвестным. В связи с этим, данная работа была нацелена на сравнительный анализ эффектов 2-AG и AEA в моторных синапсах диафрагмы мышцы и сопоставление их действия с ранее обнаруженными эффектами WIN 55,212-2.

Материалы и методы

Объект исследования. Эксперименты проводили на изолированных нервно-мышечных препара-

тах диафрагмальной мышцы (*m. diaphragma — p. phrenicus*) взрослых (45–60-дневных) мышей обоих полов линии BALB/c, полученных из лаборатории экспериментальных животных биологического факультета МГУ, Москва, Россия. Содержание животных и экспериментальные процедуры осуществлялись в соответствии с директивой 86/609/ЕЕС по обращению человека с лабораторными животными. Заявка на проведение экспериментов с животными (95-ж) была одобрена комиссией МГУ по биоэтике. Всего в эксперименте было использовано 27 экспериментальных животных, и из каждого выделялся один нервно-мышечный препарат.

Электрофизиология. Мыши умерщвлялись посредством быстрого обезглавливания. Затем им вскрывали брюшную и грудную полость и извлекали левую половину диафрагмы с подходящим к ней диафрагмальным нервом. Изолированный нервно-мышечный препарат помещали в экспериментальную камеру объемом 3 мл, перфузируемую оксигенированным (95% O₂, 5% CO₂) раствором Лайли [12]. Внутриклеточную регистрацию спонтанных миниатюрных потенциалов концевой пластинки (МПКП) осуществляли с помощью стеклянных микроэлектродов, заполненных 2,5 М KCl (сопротивление кончика микроэлектрода 15–25 МОм). Сигналы регистрировали, используя усилители Neuroprobe Amplifier Model 1600 (A-M Systems, США) или Axoclamp-2B (Molecular Devices, США), и записывали их с помощью аналого-цифрового преобразователя E-154 (L-Card, Россия) с интерфейсом PowerGraph 6.0 на жесткий диск компьютера для последующего анализа в программе MiniAnalysis (Synaptosoft, США). Критериями удачного введения микроэлектрода в зону концевой пластинки служили стабильный мембранный потенциал (МП) и значение времени нарастания МПКП на участке 10–90% амплитуды <1 мс. При снижении МП от исходного более чем на 5 мВ в ходе регистрации она прекращалась и сигналы от данного синапса не включались в выборку для дальнейшего анализа. В каждом исследованном синапсе МПКП регистрировали в течение 120 с. В контроле регистрировали МПКП в 5–7 синапсах, после чего нервно-мышечный препарат перфузировали раствором Лайли, содержащим исследуемые вещества. При исследовании действия 2-AG или АЕА регистрировали спонтанную активность разных синапсов на протяжении 2 ч перфузии нервно-мышечного препарата раствором, содержащим соответствующий эндоканнабиноид. При исследовании механизма действия эндоканнабиноидов соответствующие реагенты добавляли в перфузирующий раствор за 15 мин до добавления на их фоне 2-AG или АЕА. Далее в таких условиях регистрировали спонтанную активность разных синапсов в течение 2 ч. В каждой серии экспериментов использовали не менее трех нервно-мышечных препаратов.

Анализ данных и статистика. Оценивали МП мышечных волокон, временной ход МПКП (время нарастания и время полуспада), их амплитуду и частоту. Значения параметров временного хода МПКП статистически значимо не менялись по сравнению с контролем во всех сериях экспериментов. Для нивелирования изменения движущей силы сдвига потенциала при изменениях МП стандартизировали значение амплитуд МПКП к МП -70 мВ по формуле $A_{ст.} = A \cdot (-70/МП)$, где A — зарегистрированная амплитуда МПКП, а $A_{ст.}$ — стандартизированная амплитуда МПКП. Статистический анализ данных проводили с использованием программы GraphPad Prism 6.0. Данные в тексте и на рисунках представлены как «среднее ± стандартная ошибка среднего». Нормальность распределения значений параметров МПКП оценивали с помощью критерия Д’Агостино-Пирсона. Достоверность различий между выборками оценивали при помощи однофакторного дисперсионного анализа в случае нормальных распределений значений в каждой сравниваемой выборке. В случае распределения, отличного от нормального хотя бы в одной из выборок, использовали критерий Краскелла-Уоллеса. Различия между выборками считали значимыми при $p < 0,05$ (n — количество исследованных синапсов).

Материалы. В экспериментах использовали: эндоканнабиноиды АЕА (Merck, США) и 2-AG, обратный агонист CB1-рецепторов — AM 251; ингибитор протеинкиназы А H89; ингибитор фосфолипазы C U73122; блокатор Ca²⁺ каналов L-типа — нитрендипин (все — Tocris Bioscience, США), блокатор везикулярного ацетилхолинового транспорта — везамикол (Enzo Life Sciences, США). Для приготовления стоковых растворов всех веществ, кроме H89, в качестве растворителя использовали DMSO (диметилсульфоксид) (Хеликон, Россия). Растворителем для H89 служила деионизированная H₂O. Конечная концентрация DMSO в рабочем растворе составляла не более 0,01% (v/v) и не оказывала самостоятельного действия на параметры спонтанной активности в моторных синапсах мыши.

Результаты и обсуждение

В первой части работы были исследованы изменения параметров МПКП нервно-мышечных синапсов диафрагмы мыши на фоне действия 2-AG (1 мкМ). Мы установили, что среднее значение МП мышечных волокон не менялось под действием 2-AG на протяжении 2 ч его аппликации. В течение этого времени не регистрировали изменений средней частоты МПКП: в контроле она составила $0,46 \pm 0,04$ Гц ($n = 16$), $0,46 \pm 0,04$ Гц в первый ($n=16$) и $0,38 \pm 0,04$ Гц ($n=17$, $p > 0,05$) во второй час аппликации. При этом наблюдалось постепенное возрастание амплитуды МПКП от

1,35±0,11 мВ в контроле до 2,03±0,24 мВ ко второму часу действия 2-АГ ($p<0,05$), которое сохранялось при отмывке в течение одного часа (рис. 1А). Известно, что возрастание амплитуды МПКП может иметь как пре-, так и постсинаптическую природу [13]. Для проверки возможной природы обнаруженного эффекта 2-АГ мы ингибировали везамиколом (1 мкМ) транспорт АХ в синаптические везикулы. Сам везамикол не оказывает влияния на амплитуду МПКП на протяжении его длительного воздействия [4, 12], но в его присутствии 2-АГ оказался не способен вызывать прирост амплитуды МПКП (рис. 1Б). Поскольку 2-АГ может оказывать действие на оба типа СВ-рецепторов, но СВ1 более распространен в нервной системе [1], для проверки рецепторного действия 2-АГ был выбран обратный агонист СВ1-рецепторов АМ 251 (1 мкМ), широко используемый для предотвращения развития СВ1-опосредованных эффектов. Сам АМ 251 не приводил к изменению параметров МПКП [4, 5], однако на его фоне 2-АГ не вызывал прироста амплитуды МПКП (рис. 1В). Полученные данные позволяют предполагать, что обнаруженные нами эффекты 2-АГ могут быть результатом его пресинаптического рецепторного действия на СВ1-рецепторы. Их активация запускает внутриклеточный сигнальный каскад, конечной мишенью которого является стимулирование накачки АХ в везикулы и повышение, тем самым, размера спонтанно секретируемых квантов. Аналогичный эффект везамикола, заключающийся в предотвращении отставленного по времени увеличения амплитуды МПКП под действием агонистов эндоканнабиноидных рецепторов, был недавно описан для нервно-мышечных синапсов диафрагмы мыши [4].

Во второй части работы был проведен анализ эффектов иного эндоканнабиноида — АЕА (30 мкМ). Как и в случае с 2-АГ, на фоне действия АЕА не происходило статистически значи-

мых изменений МП мышечных волокон. В отличие от амплитуды МПКП, возrastавшей в присутствии 2-АГ, параметром МПКП, чувствительным к действию АЕА, оказалась их частота: происходило выраженное увеличение ее среднего значения от 0,37±0,03 Гц ($n=15$) в контроле до 0,65±0,05 Гц на второй час аппликации АЕА ($n=17$, $p<0,05$) (рис. 2А). При этом не наблюдалось достоверных изменений амплитуды МПКП: в контроле среднее значение этого параметра составило 1,61±0,14 мВ, а на втором часу воздействия АЕА — 1,64±0,14 ($p>0,05$). Для тестирования рецепторной специфичности АЕА-индуцированного прироста частоты МПКП также был использован АМ 251 (1 мкМ). Оказалось, что на фоне обратного агониста СВ1-рецепторов полностью предотвращается прирост частоты МПКП, вызываемый АЕА (рис. 2Б). Это дает основание предполагать, что, как и в случае с 2-АГ, АЕА-индуцированный эффект является специфическим и, по-видимому, связан с активацией именно СВ1-рецепторов.

Возможными причинами прироста частоты МПКП в моторных синапсах могут являться повышение активности ряда ферментов — протеинкиназы А (РКА), фосфолипазы С (PLC) и/или повышение уровня Ca^{2+} в терминали с участием разных типов Ca^{2+} -каналов [5, 14]. В связи с этим, далее мы исследовали, будет ли прирост частоты МПКП, вызываемый АЕА, проявляться на фоне действия ингибиторов PLC или РКА, а также блокирования Ca^{2+} -каналов. Оказалось, что ингибитор PLC U73122 (5 мкМ), который сам по себе не оказывает влияния на параметры МПКП [12], не способен предотвратить прирост частоты МПКП, вызываемый АЕА (рис. 2В). Этот факт расходится с ранее полученными нами данными о том, что при активации СВ1-рецепторов их синтетическим агонистом WIN 55,212-2, статистически значимый прирост частоты МПКП предотвращался блоки-

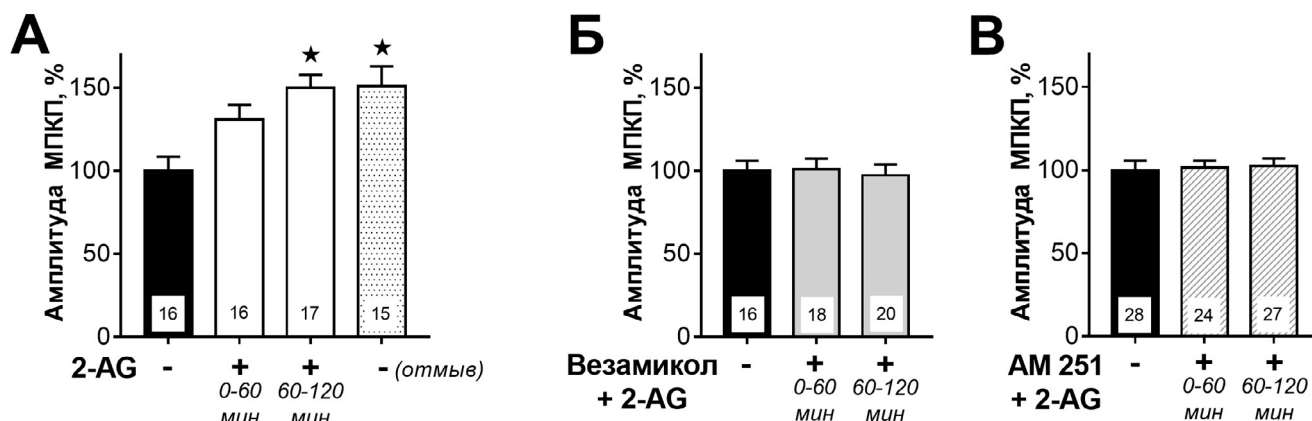


Рис. 1. Пресинаптический механизм стимулирующего действия 2-АГ (1 мкМ) на спонтанную секрецию АХ. (А) Увеличение амплитуды МПКП при действии 2-АГ. (Б) Амплитуда МПКП в контроле и при действии 2-АГ в присутствии ингибитора везикулярного АХ транспортера — везамикола (1 мкМ). (В) Амплитуда МПКП в контроле и при действии 2-АГ в присутствии обратного агониста СВ1-рецепторов АМ 251 (1 мкМ). Средние значения амплитуды МПКП нормализованы к контролю (принят за 100%). Цифры внутри столбцов гистограмм — количество исследованных синапсов в соответствующих выборках. ★ — $p<0,05$, по сравнению с контролем.

рованием активности PLC и протеинкиназы C, но не ингибированием РКА [5]. В данной работе, при использовании АЕА в качестве агониста СВ1-рецепторов, прирост частоты МПКП предотвращался с помощью ингибитора РКА Н89 (1 мкМ), но не предотвращался ингибитором PLC (рис. 2Г). Наконец, нитрендипин, избирательный блокатор потенциал-зависимых Ca^{2+} -каналов L-типа, который сам по себе достоверно не влиял на параметры МПКП [15], также предотвращал прирост частоты МПКП, вызванный АЕА (рис. 2Д). Последний факт свидетельствует о Ca^{2+} -зависимости эффекта прироста частоты МПКП в моторных нервных терминалях под действием АЕА, что созвучно с нашими предыдущими данными о зависимости увеличения частоты МПКП при действии WIN 55,212-2 от депонированного Ca^{2+} и активности рианодиновых рецепторов [5], которые, как правило, активируются и выбрасывают Ca^{2+} из депо в ответ на вход Ca^{2+} через Ca^{2+} -каналы L-типа. Способность этих каналов в случае усиления их активности с помощью действия ферментов (РКА) либо их агониста BayK8644 вызывать вход Ca^{2+} в терминаль и приводить к приросту частоты МПКП ранее описана

в литературе [16, 17]. Мы впервые показали, что прирост частоты МПКП, индуцируемый АЕА, связан не только со срабатыванием пресинаптических Ca^{2+} -каналов L-типа, но и с активацией РКА в терминалях моторных синапсов. Это позволяет предполагать, что в данном случае действие АЕА опосредуется активацией не канонического G_i -белка, а другого – вероятно, G_s -типа. Как известно, именно этот тип G-белка является стимулятором аденилатциклазного сигнального каскада, направленного на активацию РКА. В свою очередь, одной из мишеней такой сигнализации в моторных нервных терминалях мыши являются пресинаптические Ca^{2+} -каналы L-типа [15].

Возможность вовлечения в реализацию действия эндоканнабиноидов сигнального пути, стимулирующего аденилатциклазу и РКА, значительно менее исследована по сравнению с классической активацией G_i -зависимых сигнальных путей. Вместе с тем, такое предположение выглядит вполне правомочным. Это связано с открытием у эндоканнабиноидов, при действии на их рецепторы, многочисленных проявлений смещенного агонизма [18]. В частности, обсуждается способность СВ1-рецептора под действием разных аго-

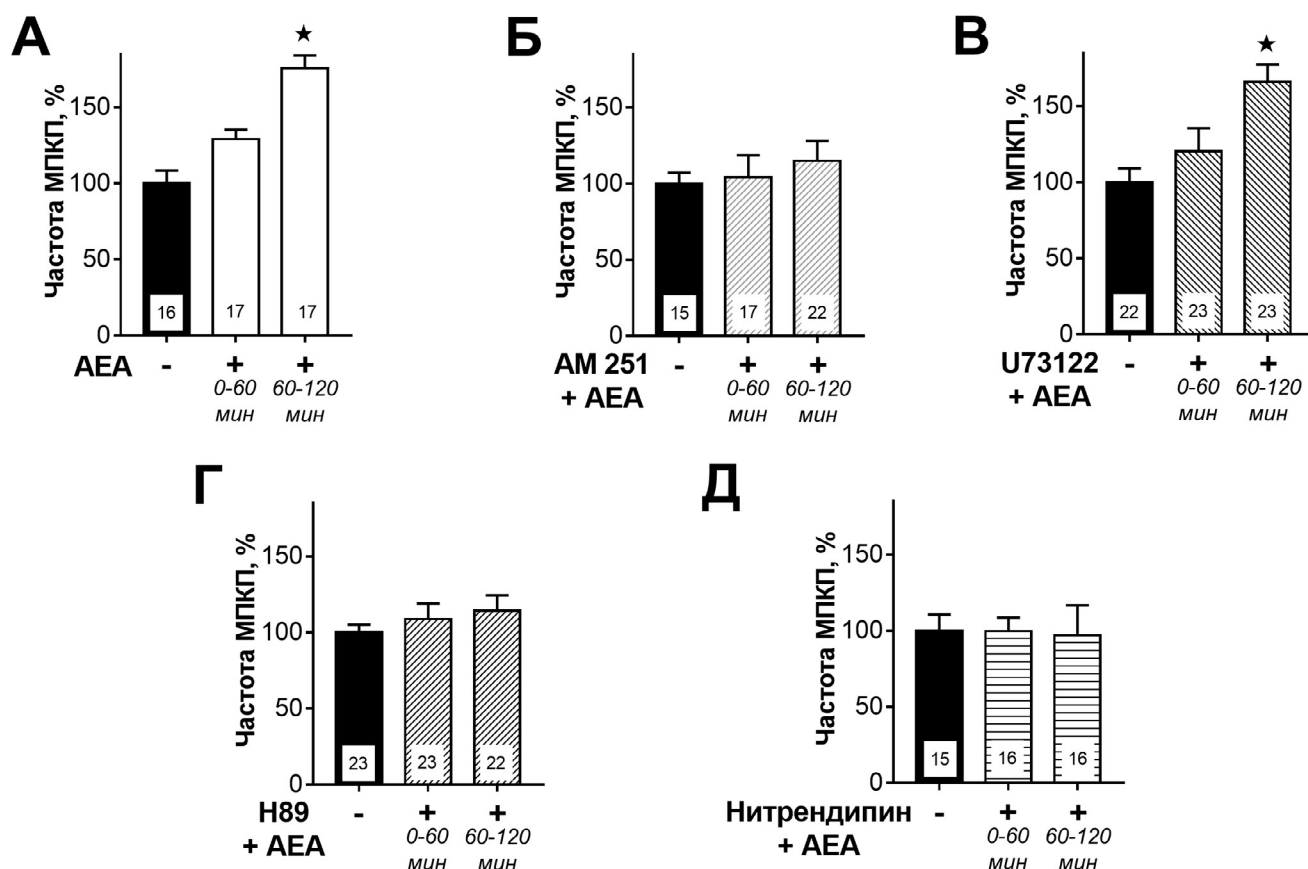


Рис. 2. Пресинаптический механизм стимулирующего действия АЕА (30 мкМ) на спонтанную секрецию АХ. (А) Увеличение частоты МПКП при действии АЕА. (Б) Частота МПКП в контроле и при действии АЕА в присутствии обратного агониста СВ1-рецепторов АМ 251 (1 мкМ). (В) Частота МПКП в контроле и при действии АЕА в присутствии ингибитора PLC U73122 (5 мкМ). (Г) Частота МПКП в контроле и при действии АЕА в присутствии ингибитора РКА Н89 (1 мкМ). (Д) Частота МПКП в контроле и при действии АЕА в присутствии блокатора Ca^{2+} -каналов L-типа нитрендипина (1 мкМ). Средние значения частоты МПКП нормализованы к контролю (принят за 100%). Цифры внутри столбцов гистограмм – количество исследованных синапсов в соответствующих выборках. * – $p < 0,05$, по сравнению с контролем.

нистов либо напрямую активировать G_s -белок [19], либо ингибировать G_i -белок и, тем самым, усиливать тоническую активность G_s -белок-сцепленного каскада и РКА [20]. Наконец, недавно описана способность агонистов эндоканнабиноидных рецепторов активировать каскад с участием G_s -белка и РКА не напрямую, а посредством сцепки с β -аррестинами [21]. Какой именно тип G-белков и опосредуемых ими реакций стимулирует активность Ca^{2+} -каналов L-типа и РКА, приводя к стойкому возрастанию частоты МПКП под действием АЕА в моторных синапсах, предстоит выяснить в дальнейших экспериментах.

Обнаруженное в нашей работе медленное развитие эффектов эндоканнабиноидов, занимающее порядка 2 ч от начала их аппликации, отмечалось в моторных синапсах и ранее, при исследовании действия агонистов СВ-рецепторов на параметры МПКП [4, 5], а также в синапсах центральной нервной системы при СВ-опосредованной модуляции долговременной пластичности [2, 18]. Такая динамика проявления эффектов, по-видимому, является следствием вовлечения разных по протяженности сигнальных путей и разных конечных мишеней [22]. Конкретные причины медленно развивающихся эффектов эндоканнабиноидов в моторных синапсах — это вопрос, безусловно требующий дальнейших исследований.

Таким образом, сравнительный анализ эффектов двух разных по структуре эндоканнабиноидов впервые показал, что 2-АГ и АЕА вызывают пресинаптические рецепторные и усиливающие спонтанную секрецию АХ воздействия в моторных синапсах мыши. 2-АГ увеличивает амплитуду МПКП, не изменяя их частоту, а АЕА — наоборот, увеличивает частоту МПКП, не влияя на их амплитуду.

Примеры облегчающих влияний эндоканнабиноидов на секрецию медиаторов, хотя и отмечены в литературе, но остаются немногочисленными [18, 23]. Они рассматриваются сегодня как проявление значительно более широкого, чем предполагалось ранее, спектра функциональной активности эндоканнабиноидов в синапсах. Активно обсуждается способность СВ-рецепторов к смещенному агонизму и возможности их взаимодействия не только с каноническим G_i -белком, но и другими типами G-белков (G_q и/или G_s) [18, 22], а также взаимодействие СВ-рецепторов с β -аррестинами, что запускает отдельные сигнальные каскады. Гетерорецепторные комплексы, образуемые СВ1-рецепторами с другими мембранными рецепторами клеток, также могут опосредовать атипичные эффекты эндоканнабиноидов [24]. Соответственно, отмечаемые в литературе расхождения по направленности, мишеням и временному диапазону действия эндоканнабиноидов сейчас постепенно находят свое объяснение из-за

функциональной полипотентности этих сигнальных молекул [22, 24]. Характерная для эндоканнабиноидов сложная детерминированность и неоднозначность физиологического действия, по-видимому, проявилась и в моторных синапсах млекопитающих и стала причиной разнонаправленных стимулирующих эффектов 2-АГ и АЕА, несмотря на активацию ими одних и тех же пресинаптических СВ1-рецепторов. Детальные механизмы такого действия 2-АГ и АЕА, опосредуемого СВ1-типом рецепторов, еще предстоит выяснить.

На наш взгляд, эффекты экзогенных 2-АГ и АЕА, проявляющиеся при их длительном действии и имеющие долговременные проявления, могут служить моделью тонических конститутивных эффектов эндоканнабиноидов в моторных синапсах. Возможный вклад именно тонических эффектов эндоканнабиноидов в поддержание гомеостаза нейронов и синапсов в раннем онтогенезе обсуждается и в отношении синапсов центральной нервной системы [25]. При этом очевидно, что в иных условиях функционирования синапсов, в частности, в случае высвобождения эндоканнабиноидов из мышечных волокон или перисинаптических шванновских клеток в покое или при мышечном сокращении, эффекты эндоканнабиноидов могут отличаться. Их проявление еще предстоит выяснить.

Подводя итог полученным в работе данным, можно констатировать, что анализ действия двух классических эндоканнабиноидов (2-АГ и АЕА) в моторных синапсах мыши впервые выявил их неканоническое однонаправленное действие в виде индукции медленно развивающейся потенциации спонтанной секреции АХ. Несмотря на активацию одного и того же типа рецепторов (СВ1-типа), 2-АГ и АЕА вызвали направленное увеличение соответственно либо амплитуды МПКП (отражающей рост размера квантов АХ), либо частоты МПКП (отражающей учащение спонтанного выброса квантов АХ). Мы показали, что направленные на разные параметры МПКП стимулирующие эффекты предполагают вовлечение разных сигнальных путей и их мишеней, в том числе активацию РКА и Ca^{2+} -каналов L-типа, сопряженную с приростом частоты МПКП при действии АЕА, и увеличение загрузки АХ в синаптические везикулы при действии 2-АГ.

В совокупности полученные данные расширяют представления о возможных проявлениях функциональной активности эндоканнабиноидов, не только в режиме «по требованию» в ответ на вызванную активность синапсов, но, возможно, и в тоническом режиме в синапсах в состоянии покоя. Очевидно, что всестороннее осмысление множественных и неоднозначных эффектов функционирования эндоканнабиноидной сигнальной системы в моторных синапсах требует дальнейшего анализа.

Настоящее исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 19-04-00616а). Проведение экспериментов осуществлялось

с соблюдением этических норм работы с животными, установленными Комиссией по биоэтике МГУ. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Hillard C.J. Circulating endocannabinoids: From whence do they come and where are they going? // *Neuropsychopharmacology*. 2018. Vol. 43. N 1. P. 155–172.
2. Heifets B.D., Castillo P.E. Endocannabinoid signaling and long-term synaptic plasticity // *Annu. Rev. Physiol.* 2009. Vol. 71. P. 283–306.
3. Ohno-Shosaku T., Tanimura A., Hashimoto-dani Y., Kano M. Endocannabinoids and retrograde modulation of synaptic transmission // *Neuroscientist*. 2012. Vol. 18. N 2. P. 119–132.
4. 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. Nature Publishing Group*. 2018. Vol. 8. N 1: 4685.
5. Gaydukov A.E., Dzhalagoniya I.Z., Tarasova E.O., Balezina O.P. The participation of endocannabinoid receptors in the regulation of spontaneous synaptic activity at neuromuscular junctions of mice // *Biochem. Suppl. Ser. A Membr. Cell Biol.* 2020. Vol. 14. N 1. P. 7–16.
6. Ge D., Odierna G.L., Phillips W.D. Influence of cannabinoids upon nerve-evoked skeletal muscle contraction // *Neurosci. Lett.* 2020. Vol. 725: 134900
7. Cavanaugh P., McAinch A.J., Hatzinikolas G., Janovska' A., Game P., Wittert G.A. The expression of receptors for endocannabinoids in human and rodent skeletal muscle // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2007. Vol. 364. N 1. P. 105–110.
8. Crespillo A., Suarez J., Bermudez-Silva F.J., Rivera P., Vida M., Alonso M., Palomino A., Lucena M.A., Serrano A., Perez-Martin M., Macias M., Fernandez-Llebrez P., Rodriguez de Fonseca F. Expression of the cannabinoid system in muscle: Effects of a high-fat diet and CB1 receptor blockade // *Biochem. J.* 2011. Vol. 433. N 1. P. 175–185.
9. Hutchins-Wiese H.L., Li Y., Hannon K., Watkins B.A. Hind limb suspension and long-chain omega-3 PUFA increase mRNA endocannabinoid system levels in skeletal muscle // *J. Nutr. Biochem.* 2012. Vol. 23. N 8. P. 986–993.
10. Maccarrone M., Bab I., Biro T., Cabral G.A., Dey S.K., Di Marzo V., Konje J.C., Kunos G., Mechoulam R., Racher P., Sharkey K.A., Zimmer A. Endocannabinoid signaling at the periphery: 50 years after THC // *Trends Pharmacol. Sci.* 2015. Vol. 36. N 5. P. 277–296.
11. Oláh T., Bodnar D., Toth A., Vincze J., Fodor J., Reischl B., Kovacs A., Ruzsnavszky O., Dienes B., Szentesi P., Friedrich O., Csernoch L. Cannabinoid signalling inhibits sarcoplasmic Ca^{2+} release and regulates excitation–contraction coupling in mammalian skeletal muscle // *J. Physiol.* 2016. Vol. 594. N 24. P. 7381–7398.
12. Gaydukov A., Bogacheva P., Tarasova E., Molchanova A., Miteva A., Pravdivceva E., Balezina O. Regulation of acetylcholine quantal release by coupled thrombin/BDNF signaling in mouse motor synapses // *Cells*. 2019. Vol. 8. N 7: 762.
13. Бalezina О.П., Гайдуков А.Е. Пресинаптическая регуляция размера квантов медиатора // *Усп. физиол. наук*. 2018. № 2. С. 20–44.
14. Losavio A., Muchnik S. Role of L-type and N-type voltage-dependent calcium channels (VDCCs) on spontaneous acetylcholine release at the mammalian neuromuscular junction // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1998. Vol. 841. P. 636–645.
15. Tarasova E.O., Miteva A.S., Gaydukov A.E., Balezina O.P. The role of adenosine receptors and L-type calcium channels in the regulation of the mediator secretion in mouse motor synapses // *Biochem. Suppl. Ser. A Membr. Cell Biol.* 2015. Vol. 9. N 4. P. 318–328.
16. Urbano F.J., Depetris R.S., Uchitel O.D. Coupling of L-type calcium channels to neurotransmitter release at mouse motor nerve terminals // *Pflugers Archiv. Eur. J. Physiol.* 2001. Vol. 441. N 6. P. 824–831.
17. Atchison W.D., O'Leary S.M. Bay K 8644 increases release of acetylcholine at the murine neuromuscular junction // *Brain Res.* 1987. Vol. 419. N 1–2. P. 315–319.
18. Chevalere V., Heifets B.D., Kaeser P.S., Südhof T.C., Castillo P.E. Endocannabinoid-Mediated Long-Term Plasticity Requires cAMP/PKA Signaling and $RIM1\alpha$ // *Neuron*. 2007. Vol. 54. N 5. P. 801–812.
19. Glass M., Felder C.C. Concurrent stimulation of cannabinoid CB1 and dopamine D2 receptors augments cAMP accumulation in striatal neurons: Evidence for a G(s) linkage to the CB1 receptor // *J. Neurosci.* 1997. Vol. 17. N 14. P. 5327–5333.
20. Eldeeb K., Leone-Kabler S., Howlett A.C. CB1 cannabinoid receptor-mediated increases in cyclic AMP accumulation are correlated with reduced Gi/o function // *J. Basic Clin. Physiol. Pharmacol.* 2016. Vol. 27. N 3. P. 311–322.
21. Delgado-Peraza F., Ahn K.H., Nogueras-Ortiz C., Mungrue I.N., Mackie K., Kendall D.A., Yudowski G.A. Mechanisms of biased β -arrestin-mediated signaling downstream from the cannabinoid 1 receptor // *Mol. Pharmacol.* 2016. Vol. 89. N 6. P. 618–629.
22. Ibsen M.S., Connor M., Glass M. Cannabinoid CB1 and CB2 receptor signaling and bias // *Cannabis Cannabinoid Res.* 2017. Vol. 2. N 1. P. 48–60.
23. Piette C., Cui Y., Gervasi N., Venance L. Lights on endocannabinoid-mediated synaptic potentiation // *Front. Mol. Neurosci.* 2020. Vol. 13: 132.
24. Haspula D., Clark M.A. Cannabinoid receptors: An update on cell signaling, pathophysiological roles and therapeutic opportunities in neurological, cardiovascular, and inflammatory diseases // *Int. J. Mol. Sci.* 2020. Vol. 21. N 20: 7693.
25. Gonzalez-Islas C., Garcia-Bereguain M.A., Wenner P. Tonic and transient endocannabinoid regulation of AMP aergic miniature postsynaptic currents and homeostatic plasticity in embryonic motor networks // *J. Neurosci.* 2012. Vol. 32. N 39. P. 13597–13607.

Поступила в редакцию 17.11.2020 г.

После доработки 23.12.2020 г.

Принята в печать 11.01.2021 г.

RESEARCH ARTICLE

Spontaneous acetylcholine release potentiation induced by 2-arachidonoylglycerol and anandamide in mouse motor synapses

E.O. Tarasova*, N.A. Khotkina, A.E. Gaydukov , O.P. Balezina

Department of Human and Animal Physiology, Biological Faculty, Lomonosov Moscow State University, Leninskiye Gory, 1–12, Moscow, 119234, Russia

**e-mail: cate1990@list.ru*

We compared the changes in miniature endplate potential (MEPP) parameters of the mouse diaphragm caused by exogenous application of two classical endocannabinoids — 2-arachidonoylglycerol (2-AG) (1 μM) and anandamide (AEA) (30 μM). 2-AG caused a slowly developing stable increase in MEPP amplitude by 50%, without affecting the frequency of the MEPPs. This effect was prevented by AM-251, an inverse agonist of CB1-receptors, as well as by vesamicol, a blocker of the vesicular ACh transporter. On the contrary, AEA did not cause significant changes in the MEPP amplitude, but induced a slowly developing (within 2 hours) increase in MEPP frequency by on average 75%. The effect of AEA was prevented by AM-251 (1 μM) as well as by blocking of L-type Ca^{2+} -channels with nitrendipine (1 μM) and inhibition of PKA activity by H89 (1 μM). We concluded that both 2-AG and AEA are able to exert a non-canonical facilitating presynaptic effect on spontaneous ACh release. Even though these endocannabinoids activate the same type of CB-receptors, their facilitating effects do not overlap and are strictly aimed either at potentiating the size of ACh quanta (in case of 2-AG) or increasing the frequency of MEPP (in case of AEA). We assume that different intracellular targets and signaling pathways may be involved in the differentiated facilitating effects of 2-AG and AEA in mouse neuromuscular junctions.

Keywords: *neuromuscular junction, anandamide, 2-arachidonoylglycerol, miniature endplate potentials (MEPPs), L-type Ca^{2+} -channels, quantal size*

Funding: The research was funded by Russian Foundation for Basic Research, project number 19-04-00616a.

Сведения об авторах

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@list.ru

Хоткина Наталья Александровна — магистр первого года обучения кафедры физиологии человека и животных биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-27-92, e-mail: natashakhotkina@yandex.ru

Гайдуков Александр Евгеньевич — канд. биол. наук, вед. науч. сотр. кафедры физиологии человека и животных биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-27-92, e-mail: gaydukov@gmail.com; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1963-1382>

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