

СИМПАТИЧЕСКАЯ ИННЕРВАЦИЯ И ЭНДОГЕННЫЕ КАТЕХОЛАМИНЫ В НЕРВНО-МЫШЕЧНЫХ ПРЕПАРАТАХ МЫШЦ РАЗНОГО ФУНКЦИОНАЛЬНОГО ПРОФИЛЯ

© 2023 С.А. Дмитриева¹, С.Г. Вологин², А.Н. Ценцевский¹, А.Ю. Архипов¹, В.Ф. Хузахметова¹, Г.В. Сибгатуллина¹, Э.А. Бухараева^{1*}

¹ Казанский институт биохимии и биофизики, ФИЦ КазНЦ РАН, 420111 Казань, Россия; электронная почта: elbukhara@gmail.com

² Татарский научно-исследовательский институт сельского хозяйства, ФИЦ КазНЦ РАН, 420059 Казань, Россия

Поступила в редакцию 18.10.2022

После доработки 29.11.2022

Принята к публикации 29.11.2022

Влияние симпатической нервной системы на работу сократительного аппарата скелетной мускулатуры в настоящее время не вызывает сомнений. Однако до недавнего времени не было доказательств того, что окончания симпатических нервов могут располагаться в непосредственной близости к нервно-мышечному синапсу. Также нет достоверных данных о том, какое количество эндогенных адреналина и норадреналина может содержаться вблизи синаптического контакта в скелетных мышцах. В настоящем исследовании на изолированных нервно-мышечных препаратах трёх скелетных мышц разного функционального профиля, содержащих мышечные волокна разных типов, с помощью флуоресцентного анализа, иммуногистохимического метода и иммуноферментного анализа показан близкий контакт между симпатическими и моторными холинергическими нервными окончаниями и наличие в этой области тирозингидроксилазы – фермента, участвующего в синтезе катехоламинов. Определены концентрации эндогенных адреналина и норадреналина в растворе, перфузирующем нервно-мышечный препарат, при разных режимах его функционирования. Сопоставлены эффекты блокаторов α - и β -адренорецепторов, оказываемые на процессы квантовой секреции ацетилхолина из двигательных нервных окончаний. Полученные данные представляют доказательства наличия эндогенных катехоламинов в области нервно-мышечного синапса и их роли в модуляции синаптической функции.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: нервно-мышечное соединение, симпатическая иннервация, тирозингидроксилаза, эндогенные катехоламины, блокаторы адренорецепторов.

DOI: 10.31857/S0320972523030065, EDN: QWOOGC

ВВЕДЕНИЕ

Почти 100 лет назад было открыто, что адреналин (АД) может усиливать сокращения скелетной мускулатуры [1, 2]. Последующие многочисленные исследования показали, что при возрастании сократительной активности мышцы, а также при стрессовых ситуациях в плазме крови человека и животных повышается уровень эндогенных катехоламинов: АД и норадреналина (НА) [3–5]. Увеличение сократительной способности скелетной мускулатуры связывали с воздействием эндогенных катехоламинов на свойства мембраны мышеч-

ных волокон [6, 7]. Относительно недавно с помощью современных методов иммунофлуоресцентной микроскопии и маркеров тирозингидроксилазы, фермента, участвующего в синтезе катехоламинов, было показано, что в некоторых препаратах скелетных мышц, таких как диафрагмальная мышца и длинный разгибатель пальца, варикозы симпатических нервов находятся в непосредственной близости от нервно-мышечного контакта [8, 9]. Многочисленные данные свидетельствуют о влиянии экзогенных активаторов адренорецепторов (АДР) на нервно-мышечные соединения в скелетных мышцах [8, 10–14]. Тесный контакт

Принятые сокращения: АД – адреналин; АДР – адренорецепторы; НА – норадреналин; НМП – нервно-мышечный препарат; m. LAL – мышца *levator auris longus*; m. SOL – мышца *soleus*, m. DIA – диафрагма.

* Адресат для корреспонденции.

между тирозингидроксилазой, ферментом, участвующим в синтезе НА [15], АДР и холин-ергическим нервно-мышечным синапсом в передней большеберцовой мышце, камбаловидной мышце и поднимателе уха свидетельствует о возможности участия эндогенных катехоламинов в регуляции синаптических функций [8, 9]. Ранее с помощью вестерн-блота мы показали, что в нервно-мышечных препаратах (НМП) диафрагмы мыши присутствуют АДР подтипов $\alpha 1A$, $\alpha 1B$, $\alpha 2A$, $\alpha 2B$, $\alpha 2C$ и $\beta 1$ [16, 17]. Активация разных подтипов АДР с помощью соответствующих специфических агонистов приводила к различным изменениям работы синаптического аппарата в синапсах мышц разного функционального профиля, содержащих мышечные волокна разных типов. Так, в НМП диафрагмы, которая содержит мышечные волокна как «быстрого», так и «медленного» типа, активация $\alpha 2$ -АДР приводила к снижению интенсивности квантовой секреции и повышению степени не-синхронности выделения квантов ацетилхолина [16, 17]. В НМП мышцы *levator auris longus* (m. LAL), относящейся к «быстрому» типу, агонист $\beta 2$ -АДР вызывал повышение количества освобождаемых квантов нейромедиатора и гиперполяризацию мембраны мышечного волокна [18], в НМП «медленной» мышцы *soleus* (m. SOL) АД вызывал повышение уровня квантовой секреции и степени синхронности выделения квантов [19]. Эти данные, а также результаты других исследований [20–24] свидетельствуют о том, что изменение активности АДР оказывает модулирующее влияние на работу синаптического аппарата. В связи с этим возникает вопрос: может ли в области синаптического контакта находиться какое-то количество эндогенных катехоламинов, которые могут выделяться из окончаний симпатических нервов и изменять функции НМП? Поэтому целью настоящего исследования явилось установление пространственного расположения симпатических нервов и холин-ергических окончаний двигательного нерва, выявление фермента тирозингидроксилазы в области синаптического контакта и определение концентраций АД и НА в растворе, омывающем НМП мышц разного функционального профиля.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

НМП, растворы. Исследования проводили на изолированных НМП лабораторных мышей линии balb/c (20–23 г, возраст 2–3 мес.) обоих полов, содержавшихся в условиях 12 ч света

и 12 ч темноты; вода и еда были предоставлены в свободном доступе. Все эксперименты проводились согласно протоколу ухода за животными и требованиям Директивы Совета Европейского сообщества 86/609/ЕЕС, а также были одобрены локальным этическим комитетом Казанского медицинского университета (протокол № 10 от 20 декабря 2016 г.). После декапитации выделяли НМП из скелетных мышц разного функционального профиля, содержащих мышечные волокна разного типа – «быстрого» (*m. levator auris longus* – *n. facialis*, m. LAL), «медленного» (*m. soleus* – *n. tibialis*, m. SOL) и смешанного (*m. diaphragma* – *n. phrenicus*, m. DIA). После выделения НМП несколько раз тщательно отмывали от крови и помещали в экспериментальную ванночку объемом 3 мл, содержащую раствор Рингера для теплокровных животных следующего состава: 150 мМ NaCl; 5 мМ KCl; 2 мМ $CaCl_2$; 1 мМ $MgCl_2$; 11 мМ глюкозы; 5 мМ HEPES; pH 7,2–7,4. Все эксперименты проводили при комнатной температуре ($+21 \pm 2$ °C).

Локализация симпатических нервов с помощью флуоресцентного маркера. Для визуализации симпатических нервов использовали флуоресцентный краситель FFN511 («Abscam», Великобритания), который является ложным нейромедиатором, не опосредующим физиологические эффекты и загружающимся в синаптические везикулы [25]. Для визуализации холин-ергического нервно-мышечного синапса использовали краситель FM1-43 (7 мкМ, «Thermo Fisher Scientific», Финляндия), который обратимо связывается с пресинаптической мембраной и затем захватывается посредством эндоцитоза в синаптическую везикулу, маркируя её [26, 27]. Загрузку красителя FM1-43 в НМП производили стимуляцией с частотой 20 Гц в течение 4 мин. После отмывки красителя НМП инкубировали с флуоресцентным ложным нейромедиатором FFN511 (10 мкМ) при стимуляции с частотой 2 Гц в течение 15 мин, а затем отмывали препарат бескальциевым раствором в течение 30 мин для удаления красителя с поверхности НМП. Флуоресценцию FFN511 детектировали при возбуждении УФ и эмиссионном фильтре 450–510 нм; для FM1-43, соответственно, при 480–535 нм. Для фиксирования и анализа изображений использовали микроскоп BX51WI («Olympus», Япония), оснащённый вращающимся диском, осветителем CoolLED pE-300white («CoolLED Ltd.», Великобритания) и sCMOS-камерой Dhyana 400BSI V2 («Tucsen», Китай) под управлением программ-

ного обеспечения Mosaic («Tucsen»). Область интереса ROI (region of interest) визуализировали с помощью объектива UPLANSapo 60× («Olympus») и двухканального обходного разделителя изображения Optosplit II («Cairn Research», Великобритания). Для анализа изображений использовали программу ImagePro («Media Cybernetics», США) [28].

Иммуногистохимическое окрашивание тирозингидроксилазы в НМП. НМП фиксировали 30 мин в 4%-ном (*m/v*) параформальдегиде («Sigma», США), приготовленном на 0,1 М фосфатно-солевом буфере, pH 7,4 (PBS, «Sigma»). Затем их отмывали PBS в течение 15 мин, трижды меняя раствор, после чего инкубировали 30 мин в 0,5%-ном (*m/v*) Triton X-100 («Sigma»). Для блокирования неспецифических сайтов связывания антител препараты выдерживали в 5%-ной (*v/v*) нормальной ослиной сыворотке («Abscam») в течение 30 мин при комнатной температуре. Инкубацию с моноклональными первичными антителами к тирозингидроксилазе (1 : 200; «Millipore», США) производили в течение 15 ч при 4 °C в присутствии 1%-ного БСА. После промывки в 0,5%-ном Triton X-100 (3 раза по 10 мин) препараты инкубировали со вторичными антителами, конъюгированными с Alexa647 («Invitrogen», США), в разведении 2 : 200 и после очередной отмывки инкубировали с маркером ацетилхолиновых рецепторов тетраметилродамин- α -бунгаротоксином («Sigma») в концентрации 20 мкг/мл 30 мин в темноте при комнатной температуре. После завершающей отмывки препараты помещали на предметные стёкла и заключали в фиксирующий раствор «Surgipath SubX» («Leica Microsystems CMS GmbH», Германия). Флуоресценцию регистрировали с помощью конфокального микроскопа Leica TCS SP5 («Leica Microsystems CMS GmbH») при возбуждении аргоновым лазером с длиной волны возбуждения 633 нм и регистрации при 653–695 нм для Alexa647 и длиной волны возбуждения 514 нм и регистрации при 550–590 нм для тетраметилродамин- α -бунгаротоксина. Обработку полученных изображений проводили с помощью лицензионного программного пакета LASX («Leica Microsystems CMS GmbH»).

ИФА содержания катехоламинов. Для определения концентрации эндогенных АД и НА в НМП скелетных мышц с помощью ИФА [29] использовали образцы физиологического раствора, в котором находились НМП в контроле (30 мин), а также после стимуляции двигательного нерва в течение 10 мин с частотой, характерной для работы данного типа мышцы

в физиологических условиях [30]. Для НМП «медленной» *m. SOL* частота стимуляции была 20 Гц, для НМП «быстрой» *m. LAL* — 70 Гц, для НМП «смешанной» *m. DIA* — 50 Гц. Образцы раствора объёмом 1 мл забирали из экспериментальной ванночки, в которой находился НМП, затем немедленно фиксировали в жидком азоте в пробирках, содержащих 5 мМ ЭДТА в качестве консерванта, и хранили при температуре –80 °C до анализа содержания катехоламинов. Количество АД и НА определяли методом ИФА с помощью коммерческого набора CatCombi ELISA («IBL», Германия), который обладает высокой специфичностью и чувствительностью [31]. Экстракцию и концентрирование катехоламинов из раствора осуществляли на боронат-аффинном геле в присутствии буфера для экстракции в течение 30 мин при качании 900 об./мин. В лунки планшета, покрытого козьими антикроличьими антителами к одному из эпитопов АД и НА [29], добавляли свежеприготовленный раствор катехол-о-метилтрансферазы, вносили образцы и добавляли растворы кроличьих биотинилированных антител к другому эпитопу молекул АД или НА, планшет инкубировали при 600 об./мин в течение 2 ч. В ходе инкубации антиген образца связывается одним сайтом с антителами, адсорбированными на лунках планшета, а вторым — с биотинилированными антителами к другому эпитопу антигена. Затем в лунки планшета добавляли раствор свежеприготовленного ферментного конъюгата и инкубировали при комнатной температуре при 600 об./мин в течение 1 ч. В качестве ферментного конъюгата был использован стрептавидин, конъюгированный с щелочной фосфатазой, который связывается с биотинилированными антителами. Все несвязавшиеся компоненты реакций на каждом этапе экстракции и проведения ИФА удаляли из лунок планшета четырёхкратной промывкой буфером с помощью автоматического промывателя иммунологических планшетов HydroFlex («Tescan», Австрия). Затем планшеты инкубировали при 400 об./мин при комнатной температуре с раствором *p*-нитрофенил фосфата (pNPP), являющимся субстратом для щелочной фосфатазы и катализирующим превращение бесцветного pNPP в жёлтый пара-нитрофенол. Через 40 мин реакцию останавливали с помощью стоп-раствора, содержащего 1 М NaOH. Оптическую плотность растворов в лунках определяли при длине волны 405 нм с помощью многоканального фотометра Multiscan FC («Thermo Fisher Scientific»). Концентрацию катехоламинов рассчитывали

после измерения веса мышцы и нормирования на эту величину по калибровочной кривой, которую строили на основании прилагаемых готовых стандартов. Каждый образец анализировали в двух аналитических повторностях.

Статистический анализ. Данные представлены в виде средних значений $\pm$ среднеквадратичное отклонение. Статистическую значимость различий оценивали при помощи непараметрического критерия Манна–Уитни (критерий числа инверсий). Различия принимали значимыми при $p < 0,05$; количество экспериментальных животных — $n \geq 3$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Доказательства наличия симпатической иннервации нервно-мышечного соединения в мышцах разного функционального профиля. Добавление в экспериментальную камеру с физиологическим раствором, в которой находился

НМП, флуоресцентного красителя FM1-43 после кратковременной стимуляции двигательного нерва приводило к загрузке красителя в двигательное нервное окончание, т.к. краситель взаимодействовал с пресинаптической мембраной и в ходе стимуляции посредством эндоцитоза проникал в синаптические везикулы, окрашивая их (рис. 1, *a*).

Добавление в раствор флуоресцентного красителя FFN511, который является ложным нейромедиатором и взаимодействует с везикулярным переносчиком моноаминов, привело к окрашиванию синаптических везикул в симпатических нервах (рис. 1, средний столбец). Полученные в ходе наложения изображения (рис. 1, правый столбец) отчетливо показали наличие тесного контакта холинергических нервных окончаний двигательного нерва, визуализированных FM1-43, и симпатических нервов, где краситель FFN511 локализован не только в области синаптического контакта, но и по ходу двигательного нерва.

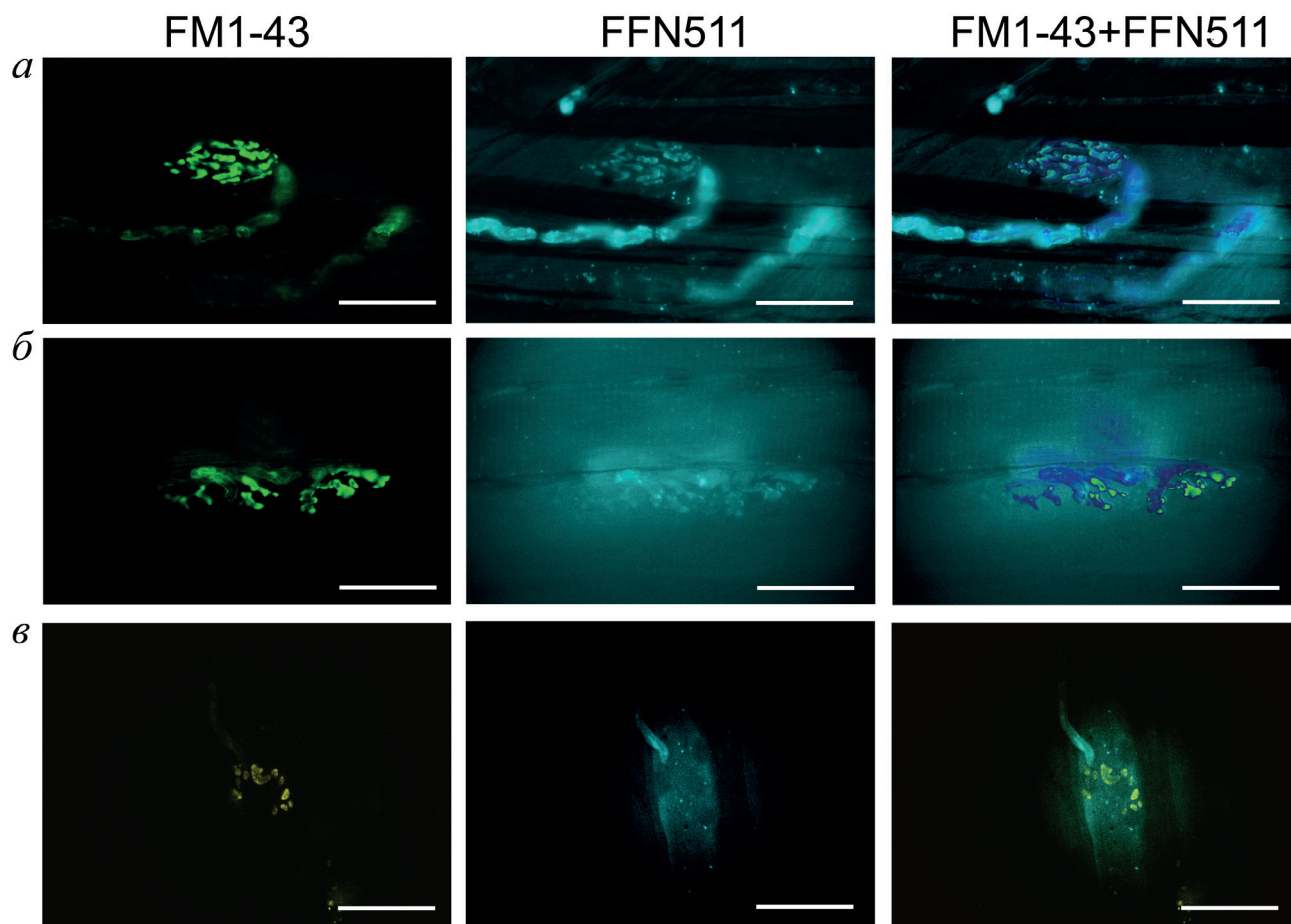


Рис. 1. Окрашивание НМП с помощью флуоресцентного красителя FM1-43, загружающегося в синаптические везикулы холинергического нервного окончания (левый столбец); флуоресцентного ложного нейромедиатора FFN511, визуализирующего симпатические варикозы (средний столбец); оценка расположения флуоресцентных сигналов относительно друг друга при совмещении каналов красителей (правый столбец) в НМП разных типов мышц: *a* — m. LAL, *б* — m. SOL, *в* — m. DIA. Масштаб — 20 мкм

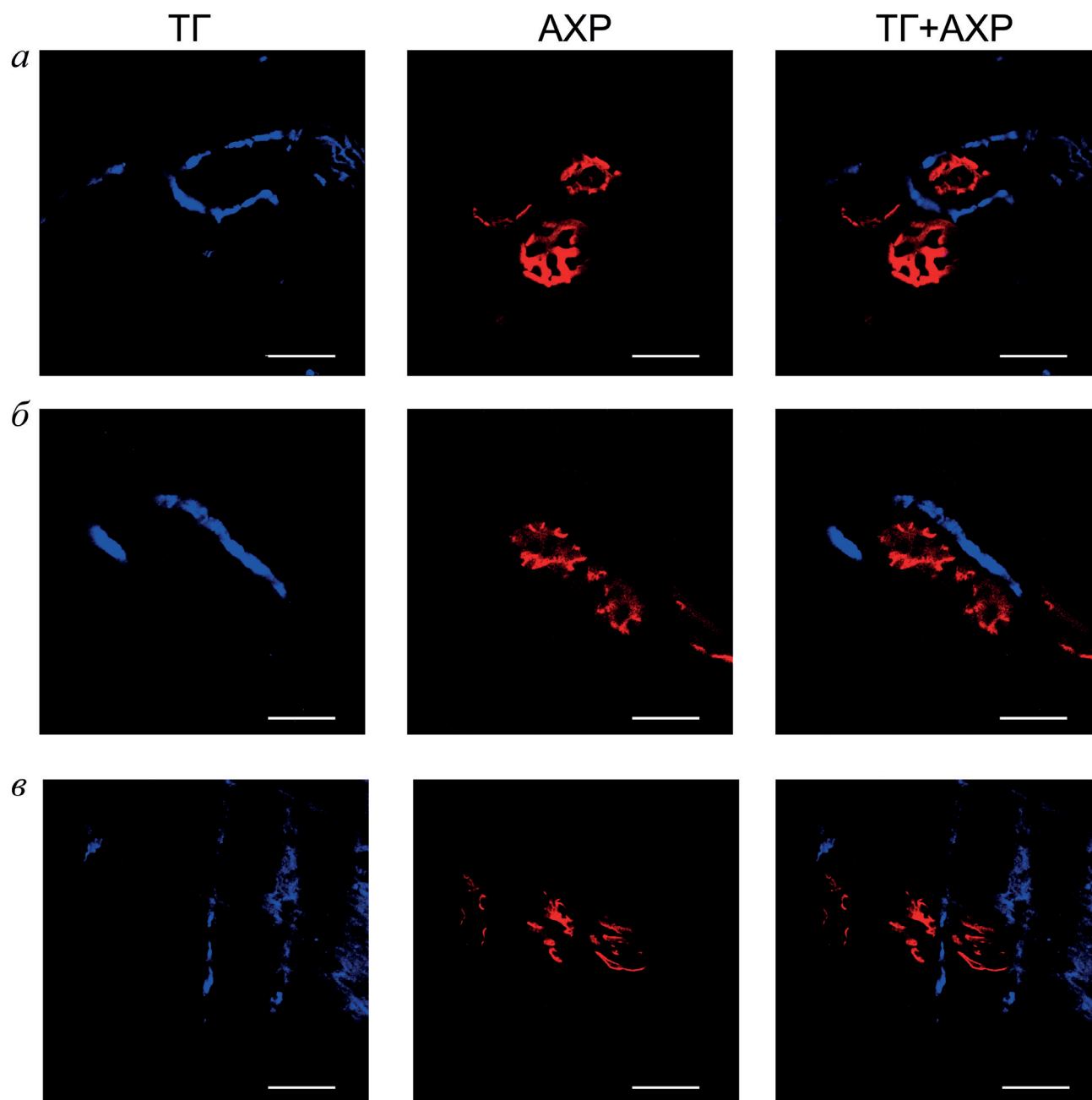


Рис. 2. Идентификация тирозингидроксилазы (ТГ) на гистологических срезах мышц мышей: *a* – *m. LAL*, *б* – *m. SOL*, *в* – *m. DIA*. Конфокальная микроскопия, масштаб – 20 мкм. Препараты окрашивали специфическими антителами к тирозингидроксилазе (ТГ, левый столбец), области синапсов визуализировали с помощью маркера ацетилхолиновых рецепторов (АХР, средний столбец), расположение флуоресцентных сигналов относительно друг друга оценивали при совмещении каналов красителей (правый столбец)

Локализация фермента синтеза катехоламинов, тирозингидроксилазы, вблизи нервно-мышечного синапса. Тирозингидроксилаза является ключевым ферментом биосинтеза катехоламинов [15, 32]. Поэтому до решения вопроса об определении эндогенных катехоламинов в области НМП был проведён иммуногистохимический анализ для определения данного фермента в области синаптического контакта. Использование специфических антител к тирозингидроксилазе и флуоресцентного α -бун-

гаротоксина, специфического агента для визуализации постсинаптических ацетилхолиновых рецепторов в НМП, показало, что в непосредственной близости к нервно-мышечному синапсу в препаратах всех трёх типов мышц наблюдается окрашивание антителами к тирозингидроксилазе (рис. 2). Это наблюдение позволяет заключить, что в области синаптического контакта может содержаться эндогенный НА и/или АД, поскольку показано наличие фермента, участвующего в их синтезе.

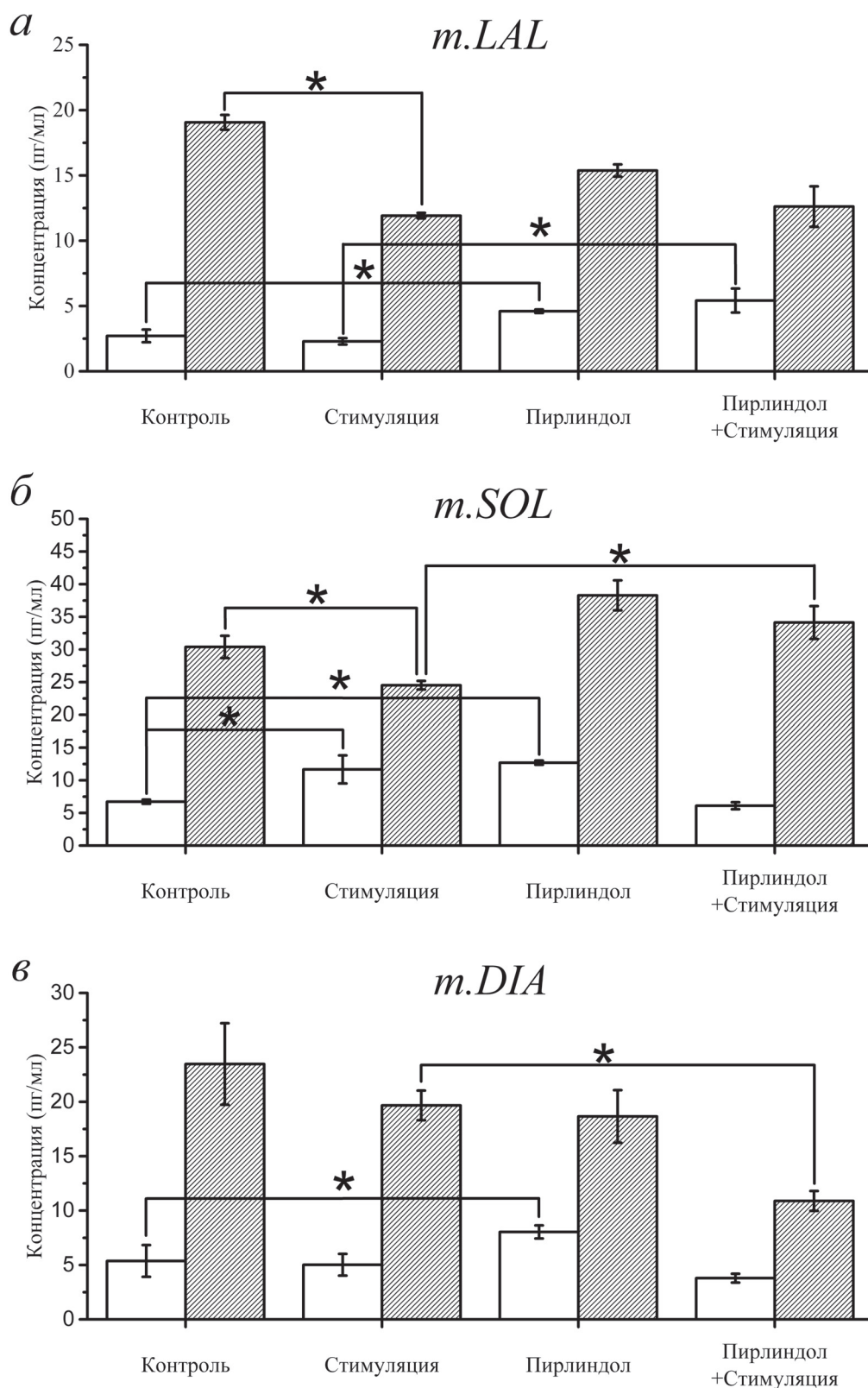


Рис. 3. Соотношение концентраций АД (белые столбцы) и НА (штрихованные столбцы) в образцах перфузионного раствора для трёх мышц и в разных условиях: *а* – *m. LAL*, контроль (30 мин); после стимуляции (10 мин) с частотой 70 Гц; после добавления пирлиндола; после стимуляции в присутствии пирлиндола; *б* – *m. SOL*, контроль (30 мин); после стимуляции (10 мин) с частотой 20 Гц; после добавления пирлиндола; после стимуляции в присутствии пирлиндола; *в* – *m. DIA*, контроль (30 мин); после стимуляции (10 мин) с частотой 50 Гц; после добавления пирлиндола; после стимуляции в присутствии пирлиндола. Представлены средние значения $\pm$ среднее квадратичное отклонение ($n = 6$). По оси ординат – концентрация катехоламинов в пг/мл. Во всех сериях концентрации НА достоверно выше, чем концентрации АД ($p < 0,05$). Различия считали статистически значимыми на уровне 0,05

Иммуноферментное определение концентрации АД и НА в растворе, омывающем НМП, при разных режимах его активности. Для определения концентраций эндогенных АД и НА в растворе, омывающем НМП, образцы перфузионного раствора в объеме 1 мл отбирали из экспериментальной камеры, в которой в состоянии покоя НМП находился в течение 30 мин. Другой НМП после 30 мин нахождения в контрольных условиях стимулировали, раздражая двигательный нерв в течение 10 мин с частотой, характерной для данного типа мышцы [30]. В третьем наборе образцов в раствор до стимуляции добавляли 50 мкМ пирлиндол — ингибитора моноаминоксидазы (МАО), которая обеспечивает деградацию катехоламинов [33]. После сбора образцов и проведения ИФА с учётом нормирования на массу НМП были определены концентрации АД и НА. Полученные данные представлены на рис. 3.

Оказалось, что в состоянии покоя для всех трёх типов мышц содержание НА в несколько раз (от 4 до 7) превышало концентрацию АД. Диапазон концентраций АД составил от $2,7 \pm 0,5$ пг/мл в m. LAL до $6,7 \pm 0,3$ пг/мл в m. SOL, тогда как концентрации НА составили от $19,1 \pm 0,6$ пг/мл (m. LAL) до $30 \pm 1,7$ пг/мл (m. SOL) (рис. 3, а, б). Наиболее высокие концентрации АД и НА были обнаружены в НМП мышцы «медленного» типа, наименьшие — в «быстрой», а для m. DIA «смешанного» типа наблюдались промежуточные значения.

При стимуляции двигательного нерва с частотой, характерной для каждого типа мышц, достоверное увеличение содержания АД на $74,6 \pm 10,7\%$ ($n = 6, p < 0,001$) наблюдалось для НМП «медленной» m. SOL, при этом уровень НА снижался на $45,9 \pm 12,6\%$ ($n = 6, p < 0,01$) (рис. 3, б). В НМП двух других мышц средние значения концентраций АД и НА достоверно не изменялись, поскольку были получены разнонаправленные изменения содержания эндогенных катехоламинов в разных образцах. После добавления пирлиндол — ингибитора МАО [33] — концентрация АД увеличилась в НМП всех трёх типов мышц, тогда как повышение НА наблюдалось только в «медленной» m. SOL (рис. 3, б). После стимуляции двигательного нерва и добавления пирлиндол достоверно увеличилась концентрация АД на $36,2 \pm 9,3\%$ ($n = 6, p < 0,05$) в «быстрой» m. LAL. В стимулированной «медленной» m. SOL на $39,2 \pm 10,0\%$ ($n = 6, p < 0,05$) выросло содержание НА в присутствии пирлиндол (для сравнения рис. 3, а и б), тогда как в образцах m. DIA концентрации АД и НА после стимуляции на фоне пирлиндол снижались. Полученные

данные свидетельствуют о наличии в растворе, омывающем НМП всех трёх типов мышц, эндогенных АД и НА, концентрация которых может меняться в зависимости от ритмической активности.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Существует два основных пула катехоламинов в периферической нервной системе, управляющей мышечными сокращениями. Это, во-первых, функциональный пул, представленный катехоламинами, которые освобождаются из мозгового вещества надпочечников, и НА из окончаний симпатических нервов [34]. Второй — тканевый пул, находящийся в компартментах синтеза и хранения в соме и аксонах симпатических нейронов. В настоящем исследовании мы впервые показали, что симпатические нервы, в которых везикулы в симпатических нервных окончаниях загружены ложным нейромедиатором FFN511, и нервно-мышечные синапсы, в которых двигательные нервные окончания загружены специфическим красителем FM1-43, находятся в непосредственной близости в НМП трёх исследованных скелетных мышц разного функционального профиля: «быстрой» мышцы поднимателя уха, m. LAL, «медленной» постуральной мышцы, m. SOL, и «смешанной» дыхательной мышцы диафрагмы, m. DIA. Фермент, участвующий в синтезе катехоламинов — тирозингидроксилаза — также был выявлен в области синаптического контакта в синапсах всех трёх типов мышц. Полученные нами данные о тесной колокализации тирозингидроксилазы с областью синаптического контакта в целом НМП согласуются с результатами работы Straka et al. 2018 г. [9], показавшими близкое расположение фермента синтеза катехоламинов и синапса на выделенных мышечных волокнах.

Наличие ферментов, участвующих в синтезе катехоламинов вблизи нервных окончаний, дало основания для попытки определить концентрации эндогенных АД и НА в растворе, омывающем НМП в условиях покоя и после стимуляции двигательного нерва с частотами, характерными для физиологического режима активности мышц данного профиля.

Результаты показали, что в НМП всех трёх типов мышц содержание НА многократно превышало концентрацию АД. Источниками эндогенных катехоламинов, как известно, являются мозговое вещество надпочечников для АД и окончания симпатических нервов для НА [35, 36]. Поэтому неудивительно, что результаты

показывают более чем 4-кратное превышение концентрации НА по сравнению с количеством АД, т.к. установлено наличие тесного контакта окончаний симпатических нервов, из которых высвобождается НА, в непосредственной близости к нервно-мышечным синапсам. Полученные с помощью метода ИФА значения концентраций АД и НА в диапазоне от 2 пг/мл до 30 пг/мл по порядку величин совпадают со значениями, определяемыми в плазме крови другими методами — радиоэнзиматическим методом, а также с помощью ВЭЖХ. Концентрация АД, полученная этими методами, составляла 5–19 пг/мл, концентрация НА — 10–34 пг/мл [37, 38]. Анализ содержания НА в образцах, взятых из трёхглавой мышцы голени крысы с помощью микродиализного зонда, вставленного между мышечными волокнами, показал концентрацию НА $2,12 \pm 0,06$ нМ, что соответствует 0,7 нг/мл [38]. Очевидно, что различия в наблюдаемых значениях концентраций могут быть обусловлены множеством разных факторов, таких как характеристики животных (возраст, пол, физическая активность) и экспериментальные условия, в которых проводились измерения.

Учитывая, что эффекты катехоламинов вследствие представительства разных подтипов АДР могут существенно различаться в мышцах, содержащих разные типы мышечных волокон [39], для анализа были выбраны НМП трёх разных скелетных мышц мыши, которые отличаются как составом мышечных волокон, так и функциями, которые они выполняют. Мышца-подниматель уха, m. LAL, состоящая преимущественно из «быстрых» мышечных волокон (тип II), служит для быстрых изменений положения уха грызуна, для которого тонкое восприятие слуховых сигналов является жизненно важным. «Медленная» камбаловидная мышца, m. SOL, с типом I мышечных волокон необходима для обеспечения позы. Диафрагмальная мышца, m. DIA, участвующая в процессе дыхания, содержит оба типа волокон и относится к мышцам «смешанного» типа. Согласно результатам проведённого анализа, наиболее высокие концентрации как АД, так и НА зафиксированы в НМП мышцы m. SOL. Как видно из рис. 1, б, в синапсе этой мышцы флуоресцентный краситель, загружаемый в везикулы окончания симпатического нерва, находится практически непосредственно вблизи холинергического нервного окончания. Стимуляция двигательного нерва с частотой, характерной для данного типа мышцы (20 Гц), привела к повышению содержания АД на 73%, увеличения концентрации НА

не наблюдалось. В НМП двух других мышц не было обнаружено достоверных изменений содержания АД и НА после стимуляции нерва, поскольку имели место разнонаправленные изменения концентраций АД и НА. Одним из возможных вариантов объяснения такого явления может быть предположение об усилении при стимуляции активности системы, которая участвует в деградации катехоламинов и обеспечении их низкой концентрации. Она представлена ферментами MAO, локализованной в митохондриях, и катехол-О-метилтрансферазой, находящейся в симпатических нейронах и синаптической щели [40, 41]. Для того чтобы проверить эту гипотезу, было проведено измерение концентраций АД и НА после добавления обратимого ингибитора MAO пирлиндолла. Ожидаемое увеличение концентрации АД в 2,3 раза наблюдалось в НМП «быстрой» m. LAL и концентрации НА на 39% в «медленной» m. SOL. Интересно, что концентрация НА во внеклеточной жидкости гиппокампа в состоянии покоя составляла приблизительно 14 нМ, при этом добавление блокатора обратного захвата дезипрамина так же, как и в НМП диафрагмы, не оказывало существенного влияния на содержание НА [42]. Эти наблюдения подчёркивают тот факт, что, по-видимому, может существовать несколько регуляторных механизмов, которые влияют на уровень катехоламинов во внеклеточной жидкости.

Эффекты блокаторов АДР на функции НМП.

Если эндогенные АД и НА находятся в непосредственной близости к синаптическому контакту, а активация АДР разных подтипов изменяет его функции, то блокирование этих рецепторов также должно приводить к изменению работы синапса. Действительно, ранее нами было показано, что блокирование $\alpha 2$ -АДР с помощью SKF 86466 и $\beta 2$ -АДР с помощью ICI 118,551 уменьшало спонтанное высвобождение ацетилхолина в НМП диафрагмы [17]. Действие антагониста $\alpha 2$ -АДР йохимбина приводило к снижению квантового состава ПКП и возрастанию несинхронности выделения квантов нейромедиатора. Блокада $\beta 1$ -АДР атенололом вызывала, напротив, синхронизацию секреторного процесса. Ранее Lim и Muir (1983) также показали, что в нервно-мышечных синапсах диафрагмы крыс йохимбин вызывал снижение квантовой секреции ацетилхолина [43]. В синапсах «быстрой» m. LAL блокада $\beta 2$ -АДР с помощью ICI 118,551 вызывала гиперполяризацию мембраны мышечного волокна [18]. Все эти данные указывают на присутствие эндогенных катехоламинов в синаптической щели и их участие

в модуляции работы НМП. Исследования, в которых иммунофлуоресценция, конфокальная микроскопия и вестерн-блоттинг продемонстрировали близость окончаний симпатических нейронов к нервно-мышечным синапсам в диафрагме, длинном разгибателе пальца, передней большеберцовой и камбаловидной мышцах, подтвердили наличие такого контакта [8, 9, 44]. Кроме того, последствия симпатэктомии вызывали значительное снижение силы непрямого мышечного сокращения [24] и уменьшение квантового высвобождения ацетилхолина [43], демонстрируя высокую вероятность влияния эндогенных катехоламинов на синаптическую передачу в НМП. В подтверждение важной функциональной роли эндогенных катехоламинов было показано, что прямая стимуляция симпатических нейронов усиливала нервно-мышечную передачу у молодых мышей посредством высвобождения катехоламинов из симпатических аксонов, которые действуют на β -АДР, экспрессирующиеся в мотонейронах [9, 44]. Эффекты симпатэктомии, оказываемые на нервно-мышечную передачу, включают дезорганизацию цитоскелета в аксонах двигательных нейронов, дефекты миелинизации, уменьшение диаметра аксона и уменьшение площади поперечного сечения мышц [24]. В целом можно сделать вывод, что элементы симпатической нервной системы находятся в непосредственном контакте с нервно-мышеч-

ными синапсами скелетной мускулатуры и участвуют в регуляции работы синаптического контакта, выделяя эндогенные катехоламины, которые влияют на высвобождение нейромедиатора ацетилхолина и, таким образом, могут изменять сократительную функцию скелетной мускулатуры.

Вклад авторов. Э.А. Бухараева — концепция и руководство работой, написание текста; С.А. Дмитриева, С.Г. Вологин — ИФА; А.Н. Ценцевичский, А.Ю. Архипов, В.Ф. Хузахметова — набор экспериментальных НМП; Г.В. Сибгатуллина — иммуногистохимический анализ.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 18-15-0046). Иммуноферментный анализ, пробоподготовка и анализ данных выполнены Дмитриевой С.А. и Володиным С.Г. при поддержке госзадачей ФИЦ КазНЦ РАН.

Благодарности. Авторы благодарят д.б.н. Петрова А.М. за критическое рассмотрение рукописи и полезные рекомендации.

Конфликт интересов. Авторы не имеют конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием животных, соответствовали этическим стандартам учреждения, в котором проводились исследования, и утверждённым правовым актам РФ и международных организаций.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Corkill, A. B., and Tiegs, O. W. (1933) The effect of sympathetic nerve stimulation on the power of contraction of skeletal muscle, *J. Physiol.*, **78**, 161-185, doi: 10.1113/jphysiol.1933.sp002995.
2. Brown, G. L., Bühlbring, E., and Burns, B. D. (1948) The action of adrenaline on mammalian skeletal muscle, *J. Physiol.*, **107**, 115-128, doi: 10.1113/jphysiol.1948.sp004255.
3. Steiner, J. L., Johnson, B. R., Hickner, R. C., Ormsbee, M. J., Williamson, D. L., and Gordon, B. S. (2021) Adrenal stress hormone action in skeletal muscle during exercise training: An old dog with new tricks? *Acta Physiol. (Oxf)*, **231**, e13522, doi: 10.1111/apha.13522.
4. Kvetnansky, R., Lu, X., and Ziegler, M. G. (2013) Stress-triggered changes in peripheral catecholaminergic systems, *Adv. Pharmacol.*, **68**, 359-397, doi: 10.1016/B978-0-12-411512-5.00017-8.
5. Tank, A. W., and Lee Wong, D. (2015) Peripheral and central effects of circulating catecholamines, *Compr. Physiol.*, **5**, 1-15, doi: 10.1002/cphy.c140007.
6. Zouhal, H., Jacob, C., Delamarche, P., and Gratas-Delamarche, A. (2008) Catecholamines and the effects of exercise, training and gender, *Sports Med.*, **38**, 401-423, doi: 10.2165/00007256-200838050-00004.
7. Andersson, D. C., Betzenhauser, M. J., Reiken, S., Umanskaya, A., Shiomi, T., and Marks, A. R. (2012) Stress-induced increase in skeletal muscle force requires protein kinase A phosphorylation of the ryanodine receptor, *J. Physiol.*, **590**, 6381-6387, doi: 10.1113/jphysiol.2012.237925.
8. Khan, M. M., Lustrino, D., Silveira, W. A., Wild, F., Straka, T., Issop, Y., O'Connor, E., Cox, D., Reischl, M., Marquardt, T., Labeit, D., Labeit, S., Benoit, E., Molgó, J., Lochmüller, H., Witzemann, V., Kettelhut, I. C., Navegantes, L. C., Pozzan, T., and Rudolf, R. (2016) Sympathetic innervation controls homeostasis of neuromuscular junctions in health and disease, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **113**, 746-750, doi: 10.1073/pnas.1524272113.

9. Straka, T., Vita, V., Prokshi, K., Hörner, S. J., Khan, M. M., Pirazzini, M., Williams, M. P. I., Hafner, M., Zaglia, T., and Rudolf, R. (2018) Postnatal development and distribution of sympathetic innervation in mouse skeletal muscle, *Int. J. Mol. Sci.*, **19**, 1935, doi: 10.3390/ijms19071935.
10. Kim, J., Grotegut, C. A., Wisler, J. W., Li, T., Mao, L., Chen, M., Chen, W., Rosenberg, P. B., Rockman, H. A., and Lefkowitz, R. J. (2018) β -arrestin 1 regulates β 2-adrenergic receptor-mediated skeletal muscle hypertrophy and contractility, *Skelet. Muscle*, **8**, 39, doi: 10.1186/s13395-018-0184-8.
11. Williams, R. S., Caron, M. G., and Daniel, K. (1984) Skeletal muscle beta-adrenergic receptors: variations due to fiber type and training, *Am. J. Physiol.*, **246**, 160-167, doi: 10.1152/ajpendo.1984.246.2.E160.
12. Hinkle, R. T., Hodge, K. M. B., Cody, D. B., Sheldon, R. J., Kobilka, B. K., and Isfort, R. J. (2002) Skeletal muscle hypertrophy and anti-atrophy effects of clenbuterol are mediated by the beta2-adrenergic receptor, *Muscle Nerve*, **25**, 729-734, doi: 10.1002/mus.10092.
13. Lynch, G. S., and Ryall, J. G. (2008) Role of beta-adrenoceptor signaling in skeletal muscle: implications for muscle wasting and disease, *Physiol. Rev.*, **88**, 729-767, doi: 10.1152/physrev.00028.2007.
14. Tsentsevitsky, A., Kovyazina, I., and Bukharaeva, E. (2019) Diverse effects of noradrenaline and adrenaline on the quantal secretion of acetylcholine at the mouse neuromuscular junction, *Neuroscience*, **423**, 162-171, doi: 10.1016/j.neuroscience.2019.10.049.
15. Nagatsu, T., Levitt, M., and Udenfriend, S. (1964) Tyrosine hydroxylase. The initial step in norepinephrine biosynthesis, *J. Biol. Chem.*, **239**, 2910-2917, doi: 10.1016/S0021-9258(18)93832-9.
16. Tsentsevitsky, A., Nurullin, L., Tyapkina, O., and Bukharaeva, E. (2020) Sympathomimetics regulate quantal acetylcholine release at neuromuscular junctions through various types of adrenoceptors, *Mol. Cell. Neurosci.*, **108**, 103550, doi: 10.1016/j.mcn.2020.103550.
17. Arkhipov, A., Khuzakhmetova, V., Petrov, A. M., and Bukharaeva, E. A. (2022) Catecholamine-dependent hyperpolarization of the junctional membrane via β 2-adrenoreceptor/Gi-protein/ α 2-Na-K-ATPase pathway, *Brain Res.*, **1795**, 148072, doi: 10.1016/j.brainres.2022.148072.
18. Khuzakhmetova, V., and Bukharaeva, E. (2020) Adrenaline facilitates synaptic transmission by synchronizing release of acetylcholine quanta from motor nerve endings, *Cell. Mol. Neurobiol.*, **41**, 395-401, doi: 10.1007/s10571-020-00840-3.
19. Anderson, A. J., and Harvey, A. L. (1988) Effects of the facilitatory compounds catechol, guanidine, noradrenaline and phencyclidine on presynaptic currents of mouse motor nerve terminals, *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, **338**, 133-137, doi: 10.1007/bf00174860.
20. Bukharaeva, E. A., Kim, K. C., Moravec, J., Nikolsky, E. E., and Vyskočil, F. (1999) Noradrenaline synchronizes evoked quantal release at frog neuromuscular junctions, *J. Physiol.*, **517**, 879-888, doi: 10.1111/j.1469-7793.1999.0879s.x.
21. Kuba, K. (1970) Effects of catecholamines on the neuromuscular junction in the rat diaphragm, *J. Physiol.*, **211**, 551-570, doi: 10.1113/jphysiol.1970.sp009293.
22. Kuba, K., and Tomita, T. (1971) Noradrenaline action on nerve terminal in the rat diaphragm, *J. Physiol.*, **217**, 19-31, doi: 10.1113/jphysiol.1971.sp009557.
23. Rodrigues, A. Z., Wang, Z. M., Messi, M. L., and Delbono, O. (2019) Sympathomimetics regulate neuromuscular junction transmission through TRPV1, P/Q- and N-type Ca^{2+} channels, *Mol. Cell. Neurosci.*, **95**, 59-70, doi: 10.1016/j.mcn.2019.01.007.
24. Gubernator, N. G., Zhang, H., Staal, R. G., Mosharov, E. V., Pereira, D. B., Yue, M., Balsanek, V., Vadola, P. A., Mukherjee, B., Edwards, R. H., Sulzer, D., and Sames, D. (2009) Fluorescent false neurotransmitters visualize dopamine release from individual presynaptic terminals, *Science*, **324**, 1441-1444, doi: 10.1126/science.1172278.
25. Betz, W. J., and Bewick, G. S. (1992) Optical analysis of synaptic vesicle recycling at the frog neuromuscular junction, *Science*, **255**, 200-203, doi: 10.1126/science.1553547.
26. Reid, B., Slater, C. R., Bewick, G. S. (1999) Synaptic vesicle dynamics in rat fast and slow motor nerve terminals, *J. Neurosci.*, **19**, 2511-2521, doi: 10.1523/JNEUROSCI.19-07-02511.1999.
27. Petrov, A., Zakirjanova, G., Kovyazina, I., Tsentsevitsky, A., and Bukharaeva, E. (2022) Adrenergic receptors control frequency-dependent switching of the exocytosis mode between "full-collapse" and "kiss-and-run" in murine motor nerve terminal, *Life Sci.*, **296**, 120433, doi: 10.1016/j.lfs.2022.120433.
28. Murphy, J. F., Davies, D. H., and Smith, C. J. (1992) The development of enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) for the catecholamines adrenalin and noradrenalin, *J. Immunol. Meth.*, **154**, 89-98, doi: 10.1016/0022-1759(92)90216-g.
29. Slater, C. R. (2015) The functional organization of motor nerve terminals, *Prog Neurobiol.*, **134**, 55-103, doi: 10.1016/j.pneurobio.2015.09.004.
30. Westermann, J., Hubl, W., Kaiser, N., and Salewski, L. (2002) Simple, rapid and sensitive determination of epinephrine and norepinephrine in urine and plasma by non-competitive enzyme immunoassay, compared with HPLC method, *Clin Lab.*, **48**, 61-71.
31. Tekin, I., Roskoski, R. Jr., Carkaci-Salli, N., and Vrana, K. E. (2014) Complex molecular regulation of tyrosine hydroxylase, *J. Neural. Transm.*, **121**, 1451-1481, doi: 10.1007/s00702-014-1238-7.

32. Bruhwyler, J., Liégeois, J. F., and Géczy, J. (1997) Pirlindole: a selective reversible inhibitor of monoamine oxidase A. A review of its preclinical properties, *Pharmacol. Res.*, **36**, 23-33, doi: 10.1006/phrs.1997.0196.
33. Peyrin, L., and Dalmaz, Y. (1975) Peripheral secretion and inactivation of catecholamines (adrenaline, noradrenaline, dopamine) [In French], *J. Physiol.*, **70**, 353-433.
34. Eisenhofer, G., Kopin, I., and Goldstein, D. (2004) Catecholamine metabolism: a contemporary view with implications for physiology and medicine, *Pharmacol. Rev.*, **56**, 331-349, doi: 10.1124/pr.56.3.1.
35. Hjendahl, P., Daleskog, M., and Kahan, T. (1979) Determination of plasma catecholamines by high performance liquid chromatography with electrochemical detection: comparison with a radioenzymatic method, *Life Sci.*, **25**, 131-138, doi: 10.1016/0024-3205(79)90384-9.
36. Liao, Y. T., Wang, S. M., Wang, J. R., Yu, C. K., and Liu, C. C. (2015) Norepinephrine and epinephrine enhanced the infectivity of enterovirus, *PLoS One*, **10**, e0135154, doi: 10.1371/journal.pone.0135154.
37. Li, J., King, N. C., and Sinoway, L. I. (2005) Interstitial ATP and norepinephrine concentrations in active muscle, *Circulation*, **111**, 2748-2751, doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.104.510669.
38. Martin, W. H., Murphree, S. S., and Saffitz, J. E. (1989) Beta-adrenergic receptor distribution among muscle fiber types and resistance arterioles of white, red, and intermediate skeletal muscle, *Circ. Res.*, **64**, 1096-1105, doi: 10.1161/01.res.64.6.1096.
39. Dorszewska, J., Prendecki, M., Oczkowska, A., Rozycka, A., Lianeri, M., and Kozubski, W. (2013) Polymorphism of the COMT, MAO, DAT, NET and 5-HTT genes, and biogenic amines in Parkinson's disease, *Curr. Genomics*, **14**, 518-533, doi: 10.2174/1389202914666131210210241.
40. Goldstein, D. S. (2020) The "sick-but-not-dead" phenomenon applied to catecholamine deficiency in neurodegenerative diseases, *Semin. Neurol.*, **40**, 502-514, doi: 10.1055/s-0040-1713874.
41. Abercrombie, E. D., Keller, R. W. Jr, and Zigmond, M. J. (1988) Characterization of hippocampal norepinephrine release as measured by microdialysis perfusion: pharmacological and behavioral studies, *Neuroscience*, **27**, 897-904, doi: 10.1016/0306-4522(88)90192-3.
42. Lim, S. P., and Muir, T. C. (1983) Microelectrode recording of the effects of agonists and antagonists on alpha-adrenoceptors on rat somatic nerve terminals, *Br. J. Pharmacol.*, **80**, 41-46, doi: 10.1111/j.1476-5381.1983.tb11047.x.
43. Wang, Z. M., Rodrigues, A. C. Z., Messi, M. L., and Delbono, O. (2020) Aging blunts sympathetic neuron regulation of motoneurons synaptic vesicle release mediated by β_1 - and α_2B -adrenergic receptors in geriatric mice, *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.*, **75**, 1473-1480, doi: 10.1093/gerona/glaa022.
44. Rodrigues, A. C. Z., Messi, M. L., Wang, Z. M., Abba, M. C., Pereyra, A., Birbrair, A., Zhang, T., O'Meara, M., Kwan, P., and Lopez, E. I. S. (2019) The sympathetic nervous system regulates skeletal muscle motor innervation and acetylcholine receptor stability, *Acta Physiol.*, **225**, 13195, doi: 10.1111/apha.13195.

SYMPATHETIC INNERVATION AND ENDOGENOUS CATECHOLAMINES IN NEUROMUSCULAR PREPARATIONS OF MUSCLES OF DIFFERENT FUNCTIONAL PROFILES

S. A. Dmitrieva¹, S. G. Vologin², A. N. Tsentsevitsky¹, A. Y. Arkhipov¹,
V. F. Khuzakhmetova¹, G. V. Sibgatullina¹, and E. A. Bukharaeva^{1*}

¹ Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics, FRC "Kazan Scientific Center of RAS",
420111 Kazan, Russia; e-mail: elbukhara@gmail.com

² Tatar Research Institute of Agriculture, FRC "Kazan Scientific Center of RAS",
420059 Kazan, Russia

Influence of the sympathetic nervous system on the work of skeletal muscles contractile apparatus is now beyond doubt. However, until recently there was no evidence that the endings of sympathetic nerves can be located in close proximity to the neuromuscular synapses, and there is also no reliable data on how much endogenous adrenaline and noradrenaline can be contained near the synaptic contact in skeletal muscles. In this research, using fluorescent analysis, immunohistochemical and enzyme immunoassays the isolated neuromuscular preparations of three skeletal muscles of different functional profiles and containing different types of muscle fibers were examined. Close contact between the sympathetic and motor cholinergic nerve endings and the presence of tyrosine hydroxylase in this area were demonstrated. Concentrations of endogenous adrenaline and noradrenaline in the solution perfusing the neuromuscular preparation were

determined under different modes of its functioning. The effects of α and β adrenoceptor blockers on the processes of acetylcholine quantal secretion from the motor nerve endings were compared. The data obtained provide evidence for the presence of endogenous catecholamines in the neuromuscular junction region and their role in the modulation of the synaptic function.

Keywords: neuromuscular junction, sympathetic innervation, tyrosine hydroxylase, endogenous catecholamines, adrenoceptor blockers