

УДК 612.816:612.815.2:576.5:577.25

## ИММУНОФЛУОРЕСЦЕНТНАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ ГАМКергических СТРУКТУР В СОМАТИЧЕСКОЙ МУСКУЛАТУРЕ ДОЖДЕВОГО ЧЕРВЯ *Lumbricus terrestris*

© 2023 г. Л. Ф. Нуруллин<sup>а, б, \*</sup>, Н. Д. Алмазов<sup>б</sup>, Е. М. Волков<sup>б, \*\*</sup>

<sup>а</sup>Казанский институт биохимии и биофизики – обособленное структурное подразделение  
Федерального исследовательского центра “Казанский научный центр Российской академии наук”,  
Казань, 420111 Россия

<sup>б</sup>Казанский государственный медицинский университет,  
Казань, 420012 Россия

\*e-mail: lenizn@yandex.ru

\*\*e-mail: euroworm@mail.ru

Поступила в редакцию 24.02.2023 г.

После доработки 02.04.2023 г.

Принята к публикации 11.05.2023 г.

Методом иммунофлуоресцентной конфокальной микроскопии в соматической мышце кожно-мускульного мешка дождевого червя установлены ГАМКергические структуры, содержащие медиатор – гамма-аминомасляную кислоту (ГАМК), фермент глутаматдекарбоксилазу (синтезирующий ГАМК), мембранные ГАМК-транспортеры 1, 2, 3 типов, обеспечивающие ее обратный захват, пре- и постсинаптические ГАМК-рецепторы типа А. Данные образования локализованы в зонах холинергических мионевральных синапсов. Предполагается, что ГАМК может участвовать в модуляции двигательной активности соматической мускулатуры дождевого червя, реализуя свое влияние как на пре-, так и на постсинаптических уровнях холинергических мионевральных синапсов.

**Ключевые слова:** ГАМК, фермент глутаматдекарбоксилаза, мембранные ГАМК-транспортеры, ГАМК-рецепторы А- и В-типов, холинергический синапс, дождевой червь

**DOI:** 10.31857/S0233475523060075, **EDN:** GMIYPL

### ВВЕДЕНИЕ

Соматическая мышца дождевого червя имеет холинергическую иннервацию [1]. Мембрана мышечных клеток совместно с ацетилхолиновыми рецепторами (АХР) содержит рецепторы к гамма-аминомасляной кислоте (ГАМК), функционально подобные ГАМК-рецепторам А- и В-типов, селективная активация которых приводит к гиперполяризации мышечной мембраны [2, 3]. Предполагается, что наряду с холинергической иннервацией соматическая мышца дождевого червя имеет ГАМКергическую иннервацию, которая может участвовать в модуляции двигательной активности. Механизмами такого влияния могут быть: на пресинаптическом уровне – регуляция квантовой секреции ацетилхолина [4], на постсинаптическом – изменение величины мембранного потенциала мышечных клеток [2, 3]. Однако прямого подтверждения наличия функционирующих ГАМКергических структур в соматической мышце дождевого червя не имеется. Не установлена также их пространственная связь с холинергическими мионевральными синапсами. Таким образом,

целью настоящего исследования стала иммунофлуоресцентная идентификация присутствия в зоне холинергических синапсов: ГАМК, фермента синтеза ГАМК – глутаматдекарбоксилазы (ГДК), трех типов (GAT-1, 2, 3) мембранных транспортеров обратного захвата ГАМК, а также пре- и постсинаптических мембранных ГАМК-рецепторов, что может служить доказательством присутствия ГАМКергических структур, сопряженных с холинергической иннервацией, в соматической мышце дождевого червя *Lumbricus terrestris*. Необходимо подчеркнуть, что тип *Annelida*, к которому относится дождевой червь, является древнейшей группой животных [5]. У представителей этого типа эволюционно возникали способности активного управления движением соматической мускулатуры [6]. В этой связи данное исследование важно с фундаментальной точки зрения, поскольку позволит расширить представления о формировании нервно-мышечной системы на самых ранних этапах эволюционного развития животного мира.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Объект и приготовление препаратов.** Выделенные препараты фрагментов кожно-мышечного мешка дождевого червя *Lumbricus terrestris* закрепляли с помощью иголок на дне чашек Петри, залитых смолой Sylgard, и перфузировали раствором Древесы–Пакса (состав в мМ: 77 NaCl, 4 KCl, 43 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 6 CaCl<sub>2</sub>, 2 Tris и 167 сахарозы; pH 7.4) около 30 мин при комнатной температуре (22 ± 1 °C). Далее в течение 30 мин препараты фиксировали в 2% растворе параформальдегида, отмывали 3 раза по 30 мин в фосфатно-солевом буфере (ФБ, состав в мМ: 137 NaCl, 2.7 KCl, 4.3 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1.4 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; pH 7.2). Мышцы последовательно инкубировали: 30 мин в 0.5% растворе Triton X-100; 15 мин в растворе, содержащем 5% козье сыворотки, 1% бычьего сывороточного альбумина (БСА) и 0.5% Triton X-100; 15 мин в растворе 1% БСА и 0.5% Triton X-100 (раствор А). Все эти растворы были приготовлены на основе ФБ.

**Окрашивание препаратов.** Препараты инкубировали в течение 12 ч при температуре 4 °C в растворе А с поликлональными антителами. Использовали антитела против ГАМК; ферменту ГДК; ГАМК-транспортёрам GAT-1, 2, 3; α1, β2, γ2 субъединицам ГАМК<sub>A</sub>-рецептора; R1, R2 субъединицам ГАМК<sub>B</sub>-рецептора; синаптофизину. Препараты отмывали в растворе А 3 раза по 30 мин и инкубировали 1 ч при 20 °C с соответствующими вторичными антителами, конъюгированными с Alexa 488 или 647 (1 : 800) в растворе А. Окрашивание постсинаптических никотиновых АХР производили с помощью тетраметилпродамин-α-бунгаротоксина (TMR-α-Б, 20 мкг/мл; время инкубации 30 мин). Для подтверждения специфичности связывания поликлональных антител с соответствующими белками проводили контрольные эксперименты. Для негативного контроля препарат инкубировали с вторичными антителами без предшествующей инкубации с первичными антителами. Для позитивного контроля производили инкубацию препарата с первичными антителами в присутствии иммуногенного пептида, на который вырабатывались первичные антитела. Отсутствие окрашивания в контрольных экспериментах указывает на специфичность связывания антител с соответствующими пептидами.

**Микроскопия.** После отмывки в ФБ, препараты помещали в раствор ФБ с глицерином (1 : 1) и размещали на предметном стекле для проведения микроскопического исследования на лазерном сканирующем конфокальном микроскопе Leica TCS SP5 MP (Leica Microsystems, США). Использовали масляный иммерсионный объектив 63×/1.4. Для возбуждения эмиссии флуорофоров применялся аргоновый и гелий-неоновый лазеры. Длины волн возбуждения для флуорофоров: Alexa 488 – 488 нм, TMR – 543 нм, Alexa 647 – 633 нм. Анализ

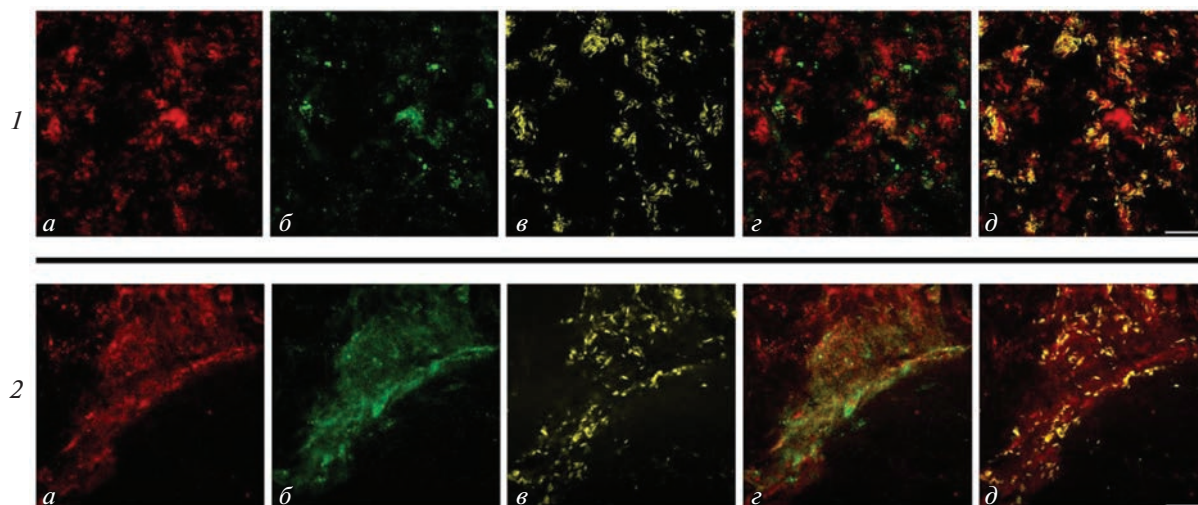
полученных конфокальных изображений проводили в программе ImageJ (НИН, США).

**Реактивы.** В работе использовали параформальдегид, Tris, ФБ, Triton X-100, нормальную козью сыворотку, БСА, TMR-α-Б, глицерин (Sigma-Aldrich); первичные поликлональные антитела и соответствующие им иммуногенные пептиды (Santa Cruz Biotechnologies, США); вторичные антитела, меченные флуорофорами Alexa 488 и Alexa 647 (Invitrogen, США).

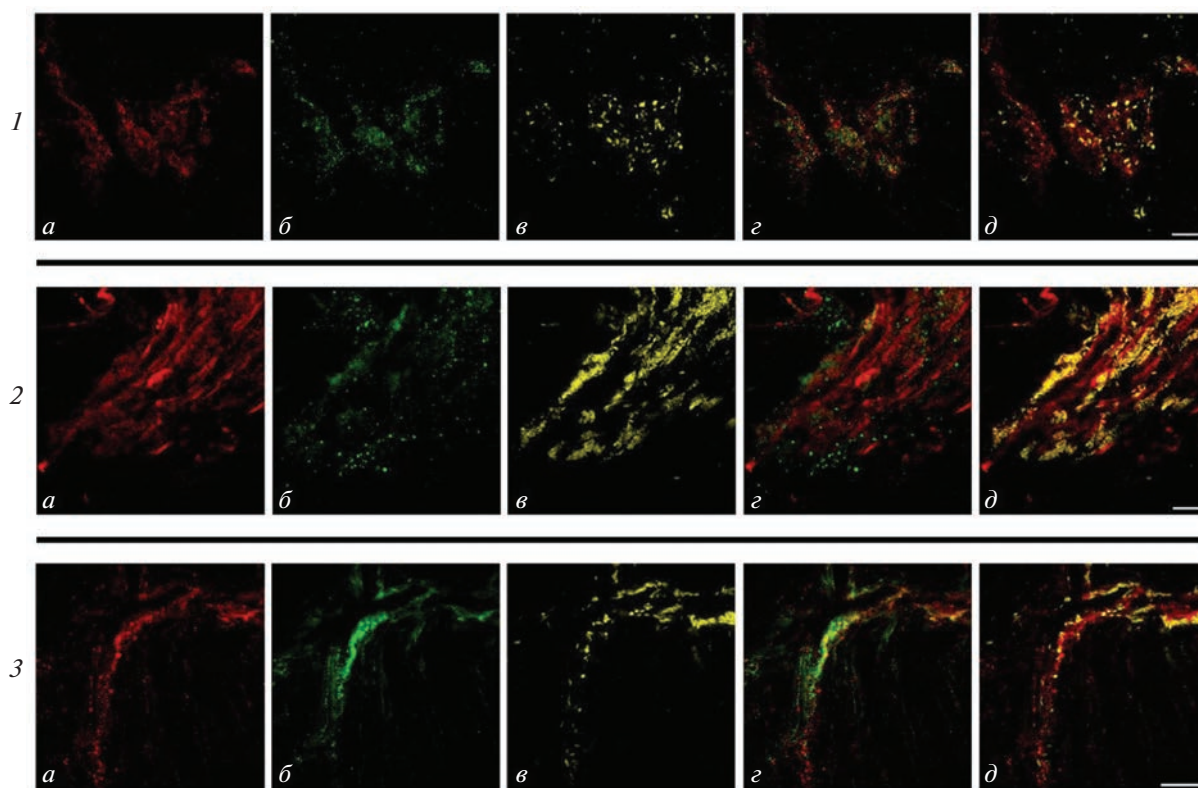
## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Нервные окончания в соматической мускулатуре дождевого червя окрашивались антителами против мембранного гликопротеида синаптофизина, который в больших количествах присутствует в синаптических везикулах [7, 8]. Постсинаптические никотиновые АХР выявлялись окрашиванием образцов флуоресцентным TMR-α-Б [9]. При иммуногистохимическом окрашивании фрагментов кожно-мышечного мешка антителами против ГАМК, синаптофизина и постсинаптических АХР была обнаружена колокализация всех трех флуоресцентных маркеров (рис. 1а–1д, панель 1). Это указывает на присутствие ГАМК в локальной зоне холинергических мионевральных синапсов. Локализация фермента ГДК, выявляемая при иммуногистохимическом окрашивании, также совпадала с зоной концевой пластинки холинергического синапса (рис. 1а–1д, панель 2). Этот результат указывает на то, что в зоне холинергического синапса находятся структуры, способные как синтезировать, так и секретировать ГАМК.

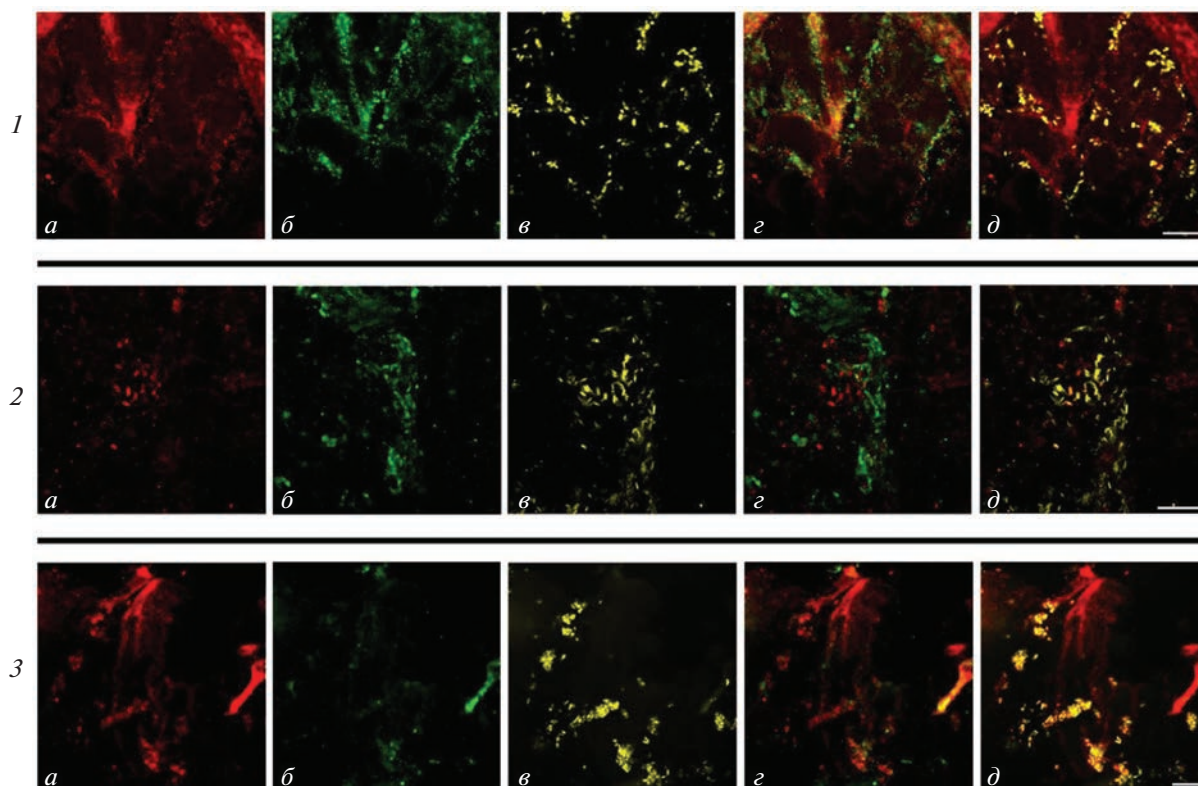
Иммуногистохимическое окрашивание фрагментов кожно-мышечного мешка дождевого червя выявило также присутствие трех типов мембранных транспортеров ГАМК: GAT-1 (рис. 2, панель 1), GAT-2 (рис. 2, панель 2), GAT-3 (рис. 2, панель 3), локализация которых совпадала с локализацией синаптофизина (рис. 2а, 2б, 2г, панели 1–3) и постсинаптических никотиновых АХР (рис. 2а, 2в, 2д, панели 1–3). Таким образом, полученные данные прямо свидетельствуют о наличии в зоне холинергических мионевральных синапсов соматической мышцы червя всех трех типов мембранных транспортеров, обеспечивающих обратный захват ГАМК из примембранных клеточных пространств [10]. Этот процесс обратного транспорта ГАМК является важнейшим механизмом регуляции концентрации ГАМК в межклеточных пространствах. Эксперименты с иммуногистохимическим выявлением субъединиц α1 (рис. 3, панель 1), β2 (рис. 3, панель 2) и γ2 (рис. 3, панель 3) ГАМК<sub>A</sub>-рецептора обнаружили их присутствие в зоне синаптического холинергического контакта, поскольку локализация их флуоресцентного маркера совпадала с таковым для синаптофизина



**Рис. 1.** Флуоресцентное тройное окрашивание препарата соматических мышечных волокон дождевого червя *Lumbricus terrestris*. *a* – Окрашивание антителами против ГАМК (красный цвет; панель 1), против фермента ГДК (красный цвет; панель 2); *б* – окрашивание антителами против пресинаптического белка синаптофизина (зеленый цвет); *в* – окрашивание TMR- $\alpha$ -Б постсинаптических никотиновых АХР (желтый цвет); *г* – наложение изображений *a* и *б*; *д* – наложение изображений *a* и *в*. Масштабная линейка: 10 мкм.



**Рис. 2.** Выявление ГАМК-транспортёров (GAT-1, 2, 3) при флуоресцентном тройном окрашивании препарата соматических мышечных волокон дождевого червя. *a* – Окрашивание антителами к GAT-1 (красный цвет; панель 1), GAT-2 (красный цвет; панель 2), GAT-3 (красный цвет; панель 3); *б* – окрашивание антителами к пресинаптическому белку синаптофизину (зеленый цвет); *в* – окрашивание никотиновых АХР при помощи TMR- $\alpha$ -Б (желтый цвет); *г* – наложение изображений *a* и *б*; *д* – наложение изображений *a* и *в*. Масштабная линейка: 10 мкм.

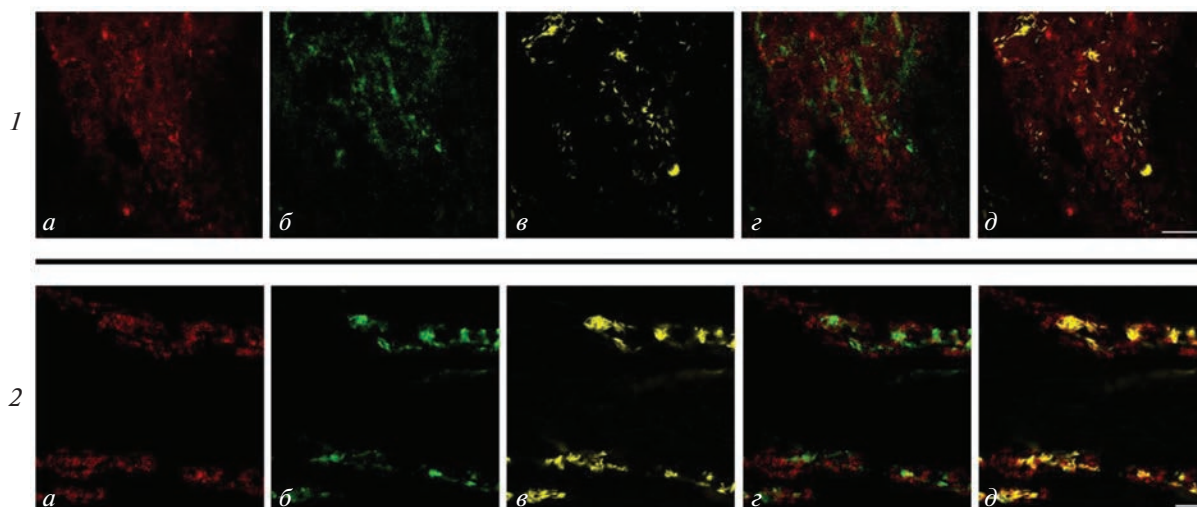


**Рис. 3.** Выявление субъединиц  $\alpha 1$ ,  $\beta 2$ ,  $\gamma 2$  ГАМК<sub>A</sub>-рецептора при тройном флуоресцентном окрашивании препарата соматических мышечных волокон дождевого червя. *a* – Окрашивание антителами к субъединицам  $\alpha 1$  (красный цвет; панель 1),  $\beta 2$  (красный цвет; панель 2),  $\gamma 2$  (красный цвет; панель 3) ГАМК<sub>A</sub>-рецептора; *б* – окрашивание антителами к пресинаптическому белку синаптофизину (зеленый цвет); *в* – окрашивание никотиновых АХР при помощи TMR- $\alpha$ -Б (желтый цвет); *з* – наложение изображений *a* и *б*; *д* – наложение изображений *a* и *в*. Масштабная линейка: 10 мкм.

(рис. 3а, 3б, 3г, панели 1–3) и никотиновых АХР (рис. 3а, 3в, 3д, панели 1–3). Аналогичные результаты получены с окрашиванием субъединиц R1 (рис. 4, панель 1) и R2 (рис. 4, панель 2) ГАМК<sub>B</sub>-рецептора, локализация которых также совпадала с локализацией синаптофизина (рис. 4а, 4б, 4г) и никотиновых АХР (рис. 4а, 4в, 4д). Таким образом, в зоне холинергического мионеврального синапса соматической мышцы дождевого червя присутствуют два типа ГАМК-рецепторов: ионотропные рецепторы типа А [11] и метаболитные рецепторы типа В [12].

Полученные данные позволяют сформулировать следующий вывод. В зоне холинергических мионевральных синапсов в соматической мышце дождевого червя присутствуют полноценные ГАМКергические структуры, включающие все обязательные компоненты, в их числе: медиатор ГАМК; фермент, синтезирующий ГАМК, – ГДК; мембранные транспортеры всех трех типов, обеспечивающие обратный захват ГАМК, а также пре- и постсинаптические ГАМК-рецепторы типа А и В. Возникает закономерный вопрос, какие структуры являются продуцентами ГАМК? Можно выдвинуть следующие три гипотезы. Первая

гипотеза: в зоне концевых пластинок холинергических мионевральных синапсов имеются нервные терминалы ГАМКергических нейронов. Однако для подтверждения данного предположения необходимы дополнительные морфологические ультраструктурные исследования, которые смогут показать наличие двух типов нервных окончаний в локальной зоне нервно-мышечного контакта. Вторая гипотеза: это клетки глиальной нервной ткани. Подобное предположение соответствует данным литературы [13, 14]. При этом ГАМК может выступать в качестве глиотрансмиттера [15, 16]. И, наконец, третье предположение: ГАМК выступает как комедиатор в холинергических синапсах [17, 18]. Последняя гипотеза не противоречит второму предположению. Тем не менее, имеющиеся в нашем распоряжении данные не позволяют сделать окончательный вывод в пользу той или иной выдвинутой нами гипотезы или их сочетания. Данный вопрос на данном этапе исследований, по-видимому, следует оставить открытым. В то же время проведенные нами исследования позволяют заключить, что в зоне холинергических мионевральных синапсов соматической мышцы дождевого червя присутствуют полноценные



**Рис. 4.** Выявление субъединиц R1 и R2 ГАМК<sub>B</sub>-рецептора при флуоресцентном тройном окрашивании препарата соматических мышечных волокон дождевого червя. *a* – Окрашивание антителами к R1 (красный цвет; панель 1) и R2 (красный цвет; панель 2) ГАМК<sub>B</sub>-рецептора; *б* – окрашивание антителами к пресинаптическому белку синаптофизину (зеленый цвет); *в* – окрашивание никотиновых АХР при помощи TMR- $\alpha$ -Б (желтый цвет); *з* – наложение изображений *a* и *б*; *д* – наложение изображений *a* и *в*. Масштабная линейка: 10 мкм.

ГАМКергические структуры, способные синтезировать, осуществлять секрецию и обратный захват медиатора, а также взаимодействовать с пре- и постсинаптическими ионотропными и метаботропными рецепторами. Известно, что в холинергических синапсах позвоночных ГАМК способна модулировать как квантовую, так и неквантовую секрецию медиатора, реализуя свое действие через активацию метаботропных рецепторов В-типа [4]. Аппликация ГАМК на клетки соматической мышцы дождевого червя вызывает гиперполяризацию мышечных мембран посредством селективной активации ГАМК-рецепторов А и В-типов. Последние реализуют свое действие посредством увеличения вклада “амперогенного насосного компонента”  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -насоса и активного  $\text{Cl}^-$ -симпорта в интегральную величину мембранного потенциала покоя [2, 3]. Кроме того, в литературе имеются данные о функциональном сопряжении потенциал-зависимых  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов и метаботропных ГАМК<sub>B</sub>-рецепторов через G-белки [12, 19]. В нейронах активация ГАМК<sub>B</sub>-рецепторов модулирует активность потенциал-зависимых  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов L, N, P/Q, R, T-типов [20–22]. Вход кальция через данные типы каналов запускает экзоцитоз синаптических везикул [23–25], а временное встраивание потенциал-зависимых  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов в везикулярные мембраны в процессе экзоцитоза запускает быстрый и медленный эндоцитоз, что обеспечивает связывание процессов экзоцитоза и эндоцитоза везикул [26]. Как нами было показано ранее, потенциал-зависимые  $\text{Ca}^{2+}$ -каналы экспрессируются в зоне нервно-мышечного контакта сома-

тической мускулатуры дождевого червя [27, 28]. Вполне возможно, что в холинергических мионевральных синапсах дождевого червя один из кальциевых механизмов регуляции экзо- и эндоцитоза везикул осуществляется при участии метаботропных ГАМК<sub>B</sub>-рецепторов.

Таким образом, есть основания считать, что ГАМКергические структуры могут участвовать как в модуляции холинергической секреции в мионевральных синапсах, так и в регуляции порога возбудимости мышечных мембран и, в конечном счете, двигательной активности соматической мышцы дождевого червя.

**Конфликт интересов.** Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

**Источники финансирования.** Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 23-24-00239.

**Соответствие принципам этики.** Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Волков М.Е. 2012. Прижизненная окраска нервных образований флуоресцентными красителями и оптическое определение ацетилхолина в соматической мышце дождевого червя *Lumbricus terrestris*. *Бюл. эксперим. биол. мед.* **154** (7), 112–115.
2. Волков Е.М., Сабирова А.Р., Нуруллин Л.Ф., Гришин С.К., Зефирова А.Л. 2006. Влияние ГАМКергических и адренергических препаратов на активность  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -насоса и котранспорта  $\text{Cl}^-$  в сома-

- тических мышечных клетках дождевого червя *Lumbricus terrestris*. *Бюл. эксперим. биол. мед.* **141** (5), 572–574.
3. Volkov E.M., Nurullin L.F., Volkov M.E., Nikolsky E.E., Vyskočil F. 2011. Mechanisms of carbacholine and GABA action on resting membrane potential and  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase of *Lumbricus terrestris* body wall muscles. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* **158** (4), 520–524.  
<https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2010.12.016>
  4. Malomouzh A.I., Petrov K.A., Nurullin L.F., Nikolsky E.E. 2015. Metabotropic GABA<sub>B</sub> receptors mediate GABA inhibition of acetylcholine release in the rat neuromuscular junction. *J. Neurochem.* **135** (6), 1149–1160.  
<https://doi.org/10.1111/jnc.13373>
  5. Parry L., Tanner A., Vinther J. 2014. The origin of annelids. *Front. Palaeontology.* **57** (6), 1091–1103.  
<https://doi.org/10.1111/pala.12129>
  6. Purschke G., Müller M.C.M. 2006. Evolution of body wall musculature. *Integr. Comp. Biol.* **46** (4), 497–507.  
<https://doi.org/10.1093/icb/icj053>
  7. Valtorta F., Pennuto M., Bonanomi D., Benfenati F. 2004. Synaptophysin: Leading actor or walk-on role in synaptic vesicle exocytosis? *Bioessays.* **26** (4), 445–453.  
<https://doi.org/10.1002/bies.20012>
  8. Kwon S.E., Chapman E.R. 2011. Synaptophysin regulates the kinetics of synaptic vesicle endocytosis in central neurons. *Neuron.* **70** (5), 847–854.  
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.04.001>
  9. Krause M., Wernig A. 1985. The distribution of acetylcholine receptors in the normal and denervated neuromuscular junction of the frog. *J. Neurocytol.* **14** (5), 765–780.  
<https://doi.org/10.1007/BF01170827>
  10. Łątka K., Jończyk J., Bajda M. 2020.  $\gamma$ -Aminobutyric acid transporters as relevant biological target: Their function, structure, inhibitors and role in the therapy of different diseases. *Int. J. Biol. Macromol.* **158**, 750–772.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.04.126>
  11. Sallard E., Letourneur D., Legendre P. 2021. Electrophysiology of ionotropic GABA receptors. *Cell. Mol. Life Sci.* **78** (13), 5341–5370.  
<https://doi.org/10.1007/s00018-021-03846-2>
  12. Shaye H., Stauch B., Gati C., Cherezov V. 2021. Molecular mechanisms of metabotropic GABA<sub>B</sub> receptor function. *Sci. Adv.* **7** (22), eabg3362.  
<https://doi.org/10.1126/sciadv.abg3362>
  13. Araque A., Parpura V., Sanzgiri R.P., Haydon P.G. 1999. Tripartite synapses: Glia, the unacknowledged partner. *Trends Neurosci.* **22** (5), 208–215.  
[https://doi.org/10.1016/S0166-2236\(98\)01349-6](https://doi.org/10.1016/S0166-2236(98)01349-6)
  14. Melone M., Ciappelloni S., Conti F. 2014. Plasma membrane transporters GAT-1 and GAT-3 contribute to heterogeneity of GABAergic synapses in neocortex. *Front. Neuroanat.* **8** (72).  
<https://doi.org/10.3389/fnana.2014.00072>
  15. Angulo M.C., Le Meur K., Kozlov A.S., Charpak S., Audinat E. 2008. GABA, a forgotten gliotransmitter. *Prog. Neurobiol.* **86** (3), 297–303.  
<https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2008.08.002>
  16. Yoon B.E., Lee C.J. 2014. GABA as a rising gliotransmitter. *Front. Neural Circuits.* **8**, 141.  
<https://doi.org/10.3389/fncir.2014.00141>
  17. Takács V.T., Cserép C., Schlingloff D., Pósfai B., Szőnyi A., Sos K.E., Környei Z., Dénes Á., Gulyás A.I., Freund T.F., Nyiri G. 2018. Co-transmission of acetylcholine and GABA regulates hippocampal states. *Nat. Commun.* **9** (1), 2848.  
<https://doi.org/10.1038/s41467-018-05136-1>
  18. Saunders A., Granger A.J., Sabatini B.L. 2015. Corelease of acetylcholine and GABA from cholinergic forebrain neurons. *Elife.* **27** (4), e06412.  
<https://doi.org/10.7554/eLife.06412>
  19. Padgett C.L., Slesinger P.A. 2010. GABA<sub>B</sub> receptor coupling to G-proteins and ion channels. *Adv. Pharmacol.* **58**, 123–147.  
[https://doi.org/10.1016/S1054-3589\(10\)58006-2](https://doi.org/10.1016/S1054-3589(10)58006-2)
  20. Shen W., Slaughter M.M. 1999. Metabotropic GABA receptors facilitate L-type and inhibit N-type calcium channels in single salamander retinal neurons. *J. Physiol.* **516** (Pt 3), 711–718.  
<https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.1999.0711u.x>
  21. Carter T.J., Mynlieff M. 2004. Gamma-aminobutyric acid type B receptors facilitate L-type and attenuate N-type  $\text{Ca}^{2+}$  currents in isolated hippocampal neurons. *J. Neurosci. Res.* **76** (3), 323–333.  
<https://doi.org/10.1002/jnr.20085>
  22. Chalifoux J.R., Carter A.G. 2011. GABA<sub>B</sub> receptor modulation of voltage-sensitive calcium channels in spines and dendrites. *J. Neurosci.* **31** (11), 4221–4232.  
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4561-10.2011>
  23. Seagar M., Lévêque C., Charvin N., Marquèze B., Martin-Moutot N., Boudier J.A., Boudier J.L., Shoji-Kasai Y., Sato K., Takahashi M. 1999. Interactions between proteins implicated in exocytosis and voltage-gated calcium channels. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **354** (1381), 289–297.  
<https://doi.org/10.1098%2Frstb.1999.0380>
  24. Gandini M.A., Zamponi G.W. 2022. Voltage-gated calcium channel nanodomains: Molecular composition and function. *FEBS J.* **289** (3), 614–633.  
<https://doi.org/10.1111/febs.15759>
  25. Catterall W.A. 2011. Voltage-gated calcium channels. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **3** (8), a003947.  
<https://doi.org/10.1101%2Fcsbshperspect.a003947>
  26. Xue L., Zhang Z., McNeil B.D., Luo F., Wu X.S., Sheng J., Shin W., Wu L.G. 2012. Voltage-dependent calcium channels at the plasma membrane, but not vesicular channels, couple exocytosis to endocytosis. *Cell Rep.* **1** (6), 632–638.  
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2012.04.011>
  27. Волков М.Е., Волков Е.М., Нуруллин Л.Ф. 2012. Иммуноцитохимическая идентификация синаптоагмина 1, синтаксина 1,  $\text{Ca}^{2+}$ -канала N-типа и N-холинорецептора в двигательных нервно-мышечных синапсах соматической мышцы дождевого червя *Lumbricus terrestris*. *Цитология.* **54** (11), 847–852.
  28. Нуруллин Л.Ф., Волков Е.М. 2020. Иммунофлуоресцентная идентификация изоформ субъединицы  $\alpha 1$  потенциал-зависимых  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов семейств  $\text{Ca}_v1$ ,  $\text{Ca}_v2$  и  $\text{Ca}_v3$  в зонах холинергических синапсов соматической мускулатуры дождевого червя *Lumbricus terrestris*. *Цитология.* **62** (2), 141–148.  
<https://doi.org/10.31857/S0041377120020042>

## Immunofluorescent Identification of GABAergic Structures in the Somatic Muscle of the Earthworm *Lumbricus terrestris*

L. F. Nurullin<sup>1, 2, \*</sup>, N. D. Almazov<sup>2</sup>, E. M. Volkov<sup>2, \*\*</sup>

<sup>1</sup>*Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics, Kazan Scientific Center of the Russian Academy of Sciences,  
Kazan, 420111 Russia*

<sup>2</sup>*Kazan State Medical University, Kazan, 420012 Russia*

\*e-mail: lenizn@yandex.ru

\*\*e-mail: euroworm@mail.ru

Using the immunofluorescence confocal microscopy, we detected the following GABAergic structures in the somatic muscle of the body wall of the earthworm: neurotransmitter gamma-aminobutyric acid (GABA); the enzyme responsible for synthesis of GABA, glutamate decarboxylase; type 1, 2, and 3 membrane transporters of GABA providing its reuptake; pre- and postsynaptic type A (ionotropic) and type B (metabotropic) GABA receptors. These structures are localized in the areas of cholinergic neuromuscular synapses. We assume that GABA can participate in modulation of motor activity of the earthworm somatic muscles both at pre- and postsynaptic levels of cholinergic neuromuscular synapses.

**Keywords:** GABA, glutamate decarboxylase, membrane GABA transporters, GABA receptors of type A and type B, cholinergic neuromuscular synapses, earthworm *Lumbricus terrestris*