

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
Казанский институт биохимии и биофизики  
Казанского научного центра Российской академии наук

*На правах рукописи*

**Хазиев Эдуард Фаритович**

**Изменение кальциевого транзientа в двигательном  
нервном окончании под действием холинергических  
агентов**

03.01.02 - биофизика

Диссертация на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Научный руководитель  
к.б.н. с.н.с. Самигуллин Дмитрий Владимирович

Казань 2015

**ОГЛАВЛЕНИЕ**

1. ВВЕДЕНИЕ	6
2. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	11
2.1. Холинергическая синаптическая передача и роль холиномиметиков в регуляции выброса квантов медиатора в нервно-мышечном синапсе	11
2.2. Роль ионов $Ca^{2+}$ в процессе синаптической передачи	13
2.3. Потенциал-зависимые кальциевые каналы	15
2.4. Молекулярные аспекты регуляции освобождения медиатора и пресинаптического уровня кальция в нервном окончании. Роль пресинаптических рецепторов	17
2.5. Участие метаботропных рецепторов в регуляции пресинаптического уровня кальция и выброса квантов медиатора	21
2.5.1. Регуляция активности пресинаптических кальциевых каналов метаботропными рецепторами	21
2.5.2. Ацетилхолиновые мускариновые рецепторы (м-холинорецепторы). Регуляция входа кальция и освобождения медиатора	24
2.5.3. Участие м-холинорецепторов в регуляции секреции квантов медиатора через систему регуляции белков экзоцитоза	26
2.6. Участие ионотропных рецепторов в регуляции пресинаптического уровня кальция и выброса квантов медиатора	28
2.6.1. Влияние ионотропных рецепторов на выброс квантов медиатора	28
2.6.2. Никотиновые ацетилхолиновые рецепторы (н-холинорецепторы)	30
2.6.3. Локализация субъединиц никотиновых ацетилхолиновых	

рецепторов	32
2.6.4. Физиологически активные вещества, воздействующие на никотиновые холинорецепторы	33
2.6.5. Кальциевая проводимость никотиновых рецепторов	35
2.7. Измерение пресинаптического уровня кальция	39
2.7.1. Методы оценки пресинаптического уровня кальция	39
2.7.2. Кальциевые индикаторы. Измерение $\text{Ca}^{2+}$ при помощи флуоресцентных красителей	43
2.7.3. $\text{Ca}^{2+}$ -флуоресцентные красители, возбуждаемые видимым светом	48
2.7.4. Высокоаффинные кальциевые индикаторы	49
2.7.5. Низкоаффинные кальциевые индикаторы	51
3. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	54
3.1. Объект исследования	54
3.2. Загрузка препарата флуоресцентным кальциевым красителем	54
3.3. Регистрация кальциевого транзиента	57
3.4. Обработка флуоресцентных сигналов	60
3.5. Выбор метода блокады мышечных сокращений	61
3.6. Электрофизиологические исследования	63
3.7. Реагенты	64
3.8. Статистическая обработка результатов	64
4. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ОБСУЖДЕНИЕ	65
4.1. Оценка влияния загрузки красителя на параметры квантовой секреции	65
4.2. Параметры зарегистрированного кальциевого транзиента	66
4.3. Влияние изменения концентрации кальция в омывающем растворе на кальциевый транзиент	68
4.4. Действие неселективного блокатора кальциевых каналов кадмия	70
4.5. Влияние ацетилхолина и карбахолина на квантовый состав токов	

концевой пластинки	71
4.6. Влияние ацетилхолина и карбахолина на $\text{Ca}^{2+}$ -транзиент	72
4.7. Действие агонистов холинорецепторов никотина и мускарина на $\text{Ca}^{2+}$ -транзиент	74
4.8. Действие холиномиметика карбахолина на $\text{Ca}^{2+}$ -транзиент в присутствии антагонистов никотиновых и мускариновых холинорецепторов	76
4.9. Активация мускариновых рецепторов при блокаде никотиновых и активация никотиновых рецепторов при блокаде мускариновых	78
4.10. Выявление подтипов мускариновых рецепторов, опосредующих эффекты холиномиметиков на кальциевый транзиент	80
4.11. Выявление подтипов никотиновых рецепторов, опосредующих эффекты холиномиметиков на кальциевый транзиент	82
4.12. Участие кальциевых каналов в реализации эффектов холиномиметиков на кальциевый транзиент	86
4.13. Проверка гипотезы об участии эндоплазматического ретикулума в формировании угнетающих эффектов холиномиметиков на кальциевый транзиент	87
4.14. Выявление эффектов эндогенного ацетилхолина на $\text{Ca}^{2+}$ -транзиент	89
4.14.1. $\text{Ca}^{2+}$ -транзиент под действием антагонистов никотиновых и мускариновых холинорецепторов	89
4.14.2. Действие ингибитора ацетилхолинэстеразы – прозерина на $\text{Ca}^{2+}$ -транзиент	92
4.15. Влияние блокады $\text{M}_2$ -холинорецепторов на интенсивность квантовой секреции ацетилхолина при высокочастотной активности синапса	93
5. ЗАКЛЮЧЕНИЕ	96
6. ВЫВОДЫ	103

7. СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	105
8. ЛИТЕРАТУРА	107

## 1. ВВЕДЕНИЕ

### **Актуальность исследования**

Известно, что ацетилхолин, освободившийся в синаптическую щель из нервных окончаний после их деполяризации потенциалом действия, вызывает не только генерацию постсинаптического потенциала в мышечной клетке, но и модулирует интенсивность процесса выделения последующих порций медиатора (Dodge, Rahamimoff, 1967). Процесс модуляции синаптической передачи ацетилхолином за счет активации пресинаптических холинорецепторов рассматривается как один из механизмов, обеспечивающих синаптическую пластичность.

Несмотря на большое количество исследований (Никольский, Гиниатуллин, 1979; Wessler, 1989; Macleod et al., 1994; Van der Kloot et al., 1997; Nikolsky et al., 2004), на сегодняшний день детали молекулярного механизма ауторегуляции синаптической передачи изучены недостаточно. Ряд авторов постулируют способность ацетилхолиновых рецепторов нервных окончаний модулировать выброс медиатора за счет изменения эффективности работы машины экзоцитоза. Поскольку ключевую роль в инициации процесса выделения медиатора выполняют ионы кальция, было выдвинуто предположение о том, что активация пресинаптических холинорецепторов угнетает вход кальция в НО при его деполяризации. Однако прямого подтверждения справедливости этой гипотезы до последнего времени не было получено.

В последнее десятилетие для анализа метаболизма кальция в нервном окончании применяют оптические методы регистрации, основанные на использовании кальций-чувствительных флуоресцентных красителей, изменяющих уровень своего свечения при взаимодействии со свободными ионами кальция (кальциевый транзиент). Таким образом, можно оценивать изменение концентрации ионов, входящих в НО во время потенциала действия (Tsien, 1989). Также используя эту методику можно оценивать вклад различных модуляторов синаптической передачи в формирование уровня концентрации

ионов кальция в нервных окончаниях. Для изучения роли изменения пресинаптического уровня кальция в процессе ауторегуляции секреции квантов медиатора в нашей лаборатории была налажена методика регистрации кальциевого транзientа в нервно-мышечном синапсе. В данном исследовании мы экспериментально оценивали вход кальция в НО при различных воздействиях на пресинаптические холинорецепторы.

### **Цель и задачи исследования**

Целью исследования является изучение роли ионов кальция в реализации процесса ауторегуляции секреции ацетилхолина в нервно-мышечном соединении лягушки.

В соответствии с целью были поставлены следующие задачи:

1. Изучить действие экзогенных холинергических агентов на амплитуду кальциевого транзientа в нервном окончании лягушки.
2. Сопоставить действие холиномиметиков на параметры квантовой секреции и на амплитуду кальциевого транзientа.
3. Изучить влияние специфических агонистов и блокаторов холинорецепторов на кальциевый транзient в двигательном нервном окончании.
4. Проверить гипотезу об участии кальциевых каналов и внутриклеточных кальциевых депо в реализации действия агонистов холинорецепторов на кальциевый транзient.
5. Исследовать эффекты эндогенного ацетилхолина на кальциевый транзient.
6. Изучить влияние холинергических агентов на параметры вызванной секреции квантов медиатора при высокочастотной стимуляции двигательного нерва.

### **Положение, выносимое на защиту**

В нервно-мышечном синапсе лягушки активация пресинаптических мускариновых холинорецепторов подтипа  $M_2$  и д-тубокурарин-чувствительных

никотиновых холинорецепторов экзогенными холиномиметиками и ацетилхолином эндогенного происхождения снижают квантовую секрецию медиатора за счет уменьшения входа ионов кальция в цитоплазму нервного окончания через потенциал-зависимые кальциевые каналы N-типа.

### **Научная новизна работы**

Впервые проведен анализ изменения  $\text{Ca}^{2+}$ -транзientа, который отражает вход ионов кальция в аксоплазме двигательного нервного окончания лягушки при активации и блокаде холинергических рецепторов разных типов. Установлено, что активация холинорецепторов ацетилхолином или его негидролизуемым аналогом – карбахолином снижает пресинаптический уровень кальция (оцениваемый по величине кальциевого транзientа) в нервном окончании.

Показано, что активация мускариновых рецепторов мускарином и никотиновых – никотином приводит к сходному эффекту – уменьшению  $\text{Ca}^{2+}$ -транзientа. Впервые было показано, что блокада никотиновых рецепторов д-тубокурарином приводит к увеличению  $\text{Ca}^{2+}$ -транзientа. Впервые было показано, что блокада мускариновых рецепторов атропином и метоктрамином (блокатором  $M_2$ -подтипа мускариновых рецепторов) повышает  $\text{Ca}^{2+}$ -транзient. Метоктрамин предотвращал эффекты мускарина, а д-тубокурарин – никотина на  $\text{Ca}^{2+}$ -транзient.

При обобщении данных об уменьшении  $\text{Ca}^{2+}$ -транзientа под действием ингибитора холинэстеразы прозерина и об увеличении  $\text{Ca}^{2+}$ -транзientа под действием блокаторов холинорецепторов с данными, полученными электрофизиологическими методами исследований, было сделано заключение о том, что эндогенный ацетилхолин, выделившийся в синаптическую щель во время стимуляции двигательного нерва в физиологических условиях работы нервно-мышечного аппарата, участвует в регуляции входа кальция и уменьшает выброс квантов медиатора по принципу обратной отрицательной связи через никотиновые и мускариновые рецепторы  $M_2$ -типа.



### **Научно-практическая значимость работы**

Основное научно-практическое значение результатов проведенных исследований состоит в получении новых данных о наличии цепи обратной связи, регулирующей вход кальция в НО за счет активации пресинаптических холинорецепторов эндогенным ацетилхолином, освобожденным в ходе предшествующей активности или экзогенными холиномиметиками. Сравнение полученных результатов флуоресцентного исследования с данными электрофизиологических экспериментов указывает на то, что описанные ранее эффекты ацетилхолина и его миметиков на параметры вызванной секреции квантов медиатора связаны с изменением входа  $Ca^{2+}$  в НО. Исследования показали, что эффекты холиномиметиков наиболее сильно проявляются при высокочастотной стимуляции двигательного нерва. Поскольку данный вид стимуляции наиболее близок к условиям естественной физиологической активности синапса, можно полагать, что обнаруженный нами путь регуляции квантового освобождения, включающий в себя изменение входа кальция в НО посредством системы холинергических ауторецепторов, может играть существенную роль в обеспечении надежности работы синаптического аппарата.

Участие пресинаптических рецепторов в регуляции квантовой секреции ацетилхолина из двигательного нервного окончания необходимо учитывать при создании новых фармакологических препаратов, используемых в качестве миорелаксантов. Наличие у миорелаксантов деполяризующего типа выраженного пресинаптического эффекта требует большой осторожности их применения у пациентов, имеющих пресинаптические дефекты синаптической функции.

### **Личный вклад диссертанта в исследования**

Приведенные в работе данные получены при личном участии соискателя на всех этапах работы, включая составление плана исследования, проведение экспериментов, обработку полученных данных и оформление публикаций.

### **Достоверность полученных данных**

Достоверность полученных данных основана на большом объеме результатов экспериментальных исследований с использованием адекватных методических подходов и статистической обработки полученных результатов.

### **Апробация работы**

Материалы работы представлены на Международных научных конференциях студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов» (Москва, 2011, 2012, 2013, 2014 гг.); XI и XII Всероссийской с международным участием научной школе-конференции «Физиологические механизмы адаптации растущего организма» (Казань, 2012 и 2014 гг.); Международной конференции «От нейрона к мозгу» (Казань, 2013 г.); Международной научной конференции «Современные технологии в нейробиологии» («Technological Trends in Neurobiology») (Казань, 2013 г.); IV Съезде биофизиков России (Нижний Новгород, 2012 г.); XXII съезде физиологического общества имени И. П. Павлова (Волгоград, 2013 г.); Итоговой научной конференции КазНЦ РАН за 2014 год (Казань, 2015 г.).

Работа выполнена при поддержке грантами РФФИ № 13-04-00886, «Ведущая научная школа» НШ-5584.2014.4 и Программы №7 Президиума РАН.

### **Реализация результатов исследования**

По теме диссертации опубликовано 20 печатных работ, в том числе 3 статьи в рецензируемых журналах (из списка ВАК).

### **Структура и объём диссертации**

Диссертация изложена на 130 страницах, состоит из введения, обзора литературы, описания методики исследования, результатов исследования и их обсуждения, выводов, списка литературы, иллюстрирована 41 рисунком и 1 таблицей. Список цитируемой литературы содержит 243 источника, из них 227 – иностранных авторов.

## 2. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 2.1. Холинергическая синаптическая передача и роль холиномиметиков в регуляции выброса квантов медиатора в нервно-мышечном синапсе

В химических синапсах потенциал действия передается через синаптическую щель шириной 20-50 нм посредством специализированного передатчика – нейромедиатора (трансммиттера). По типу посредника различают адренергические, холинергические, дофаминергические, гистаминергические, пуринергические, ГАМКергические, опиатергические и другие синапсы. Сами медиаторы могут иметь различную природу. Единственным представителем класса сложных эфиров среди медиаторов является ацетилхолин (АХ) – самый распространенный нейромедиатор в организме человека. Медиаторы и синапсы различают возбуждающие (АХ, глутаминовая кислота, аргинин) и тормозящие (ГАМК, глицин, вещество Р, серотонин, АТФ, дофамин).

В нервно-мышечном соединении холоднокровных и теплокровных ацетилхолин является основным нейротрансммиттером, ответственным за передачу сигнала между нервом и мышцей. Также ацетилхолин, освободившийся в синаптическую щель из нервных окончаний после их деполяризации потенциалом действия, может оказывать модулирующее воздействие на процесс нейросекреции, изменяя количество последующих порций медиатора, посредством пресинаптических никотиновых и мускариновых ауторецепторов (Wu, Saggau, 1997; Parnas et al., 2000).

Опосредовать эту модуляцию выброса медиатора могут рецепторы, расположенные на пресинаптической мембране (Ciani, Edwards, 1963; Miyamoto, 1977; Steinbach, Stevens, 1979; Starke, 1989; Bowman et al., 1990; Miller, 1998; MacDermott et al., 1999).

Способность холинергических агентов изменять квантовый состав была показана многими исследователями (Ciani, Edwards, 1963; Никольский, Гиниатуллин, 1979; Dunant, Walker, 1982; Ito, Yoshitomi, 1988; Vizi, Somogyi,

1989; Dolezal, Tueek, 1993; Re et al., 1993; Van der Kloot et al, 1997; Slutsky et al., 1999; Minic et al, 2002; Santafe et al., 2003).

Известно, что холинергические агенты влияют не только на квантовый состав, но и на временные параметры выброса квантов медиатора (Katz, Miledi, 1965; Magazanik, Minenko, 1986; Minenko, Magazanik, 1986). Экспериментально показано, что ацетилхолин и его негидролизуемый аналог карбахолин снижают квантовый состав и увеличивают дисперсию синаптических задержек одноквантовых ответов. (Samigullin et al., 2003a).

Многочисленные исследования показывают, что медиатор ацетилхолин и его экзогенные аналоги оказывают модулирующее влияние на процесс освобождения квантов медиатора в синапсах центральной и периферической нервной системы, взаимодействуя с пресинаптическими ауторецепторами никотинового и мускаринового типов (Dodge, Rahamimoff, 1967; Никольский, Гиниатуллин, 1979; Wessler, 1989; Nikolsky et al., 2004). Направленность и выраженность изменений процессов секреции квантов медиатора под действием холинергических агентов различаются в зависимости от объектов и условий, в которых эти эффекты наблюдаются (Katz, Miledi, 1965; Magazanik, Minenko, 1986; Minenko, Magazanik, 1986).

В нашей лаборатории несколько лет назад было показано, что никотиновые рецепторы ответственны за изменение как кинетики секреции, так и квантового состава, а мускариновые рецепторы – исключительно за регуляцию квантового состава (Nikolsky et al., 2004). Также было показано, что параметры секреции – квантовый состав и кинетика секреции зависят от концентрации кальция в омывающем растворе, причем это справедливо как для синапсов холоднокровных, так и теплокровных (Никольский и др., 2000; Samigullin et al., 2005).

Изучение эффектов различных мускариновых и никотиновых агентов может пролить свет на механизмы холинергической модуляции и ее возможное физиологическое значение.

Также важно определить подтипы рецепторов, вовлеченных в реализацию пресинаптического действия холиномиметиков.

## 2.2. Роль ионов $\text{Ca}^{2+}$ в процессе синаптической передачи

В химических синапсах выброс медиатора происходит в процессе секреции накопленных и уже готовых к выбросу везикул. Роль триггера, запускающего машину экзоцитоза, играют ионы кальция (Katz, Miledi, 1965 a; Katz, Miledi, 1968; Duncan, 1983). Распространяющийся потенциал действия деполяризует мембрану пресинаптического окончания и открывает потенциал-чувствительные кальциевые каналы, вследствие чего ионы кальция из внеклеточной среды устремляются внутрь клетки (Zimmermann, 1990; Зефирова, 2000). Причем участие кальциевых каналов плазматической мембраны в процессе экзоцитоза не заканчивается на транспортировке ионов кальция.  $\text{Ca}^{2+}$ -каналы связаны с белками синтаксином и SNAP-25, что обеспечивает локализацию и докирование синаптической везикулы в активной зоне и предотвращает возможность случайного выброса медиатора (Mehta et al., 1996; Балежина, 2002; Зефирова, 2002; Kidokoro, 2003; Eguagaray et al., 2004; Tafoya, 2008).

Ионы кальция, вошедшие в нервную терминаль, взаимодействуют с белком, отвечающим за организацию белкового комплекса, который связывает везикулу, содержащую медиатор, с плазматической мембраной (Duncan, 1983; Boudier et al., 1996; Seagar, Takahashi, 1998). Основным белковым рецептором для кальция является кальмодулин. Кальмодулин содержит четыре участка связывания кальция: для запуска процесса формирования белкового комплекса, реализующего экзоцитоз (Webb et al., 2001; Levitan, 2008). То есть для инициации высвобождения нейромедиатора из одной везикулы необходимо взаимодействие с белком четырех ионов кальция, вошедших при деполяризации нервного окончания.

Для запуска экзоцитоза необходимо создание повышенной концентрации ионов кальция у везикулы в очень короткий отрезок времени.  $\text{Ca}^{2+}$ -микродомен, представляющий собой «облако» ионов кальция, локализованное у внутреннего входа канала в цитоплазме, имеет очень короткое время жизни и концентрацию ионов кальция более 100 мкМ (Matthews, 1996; Seagar et al., 1999; Зефирова, 2000,

Балезина, 2002). Связь  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов с докированными синаптическими везикулами обеспечивает запуск экзоцитоза при выполнении условия локализации  $\text{Ca}^{2+}$ -сенсоров везикул внутри микродомена. Вход ионов кальция через большое количество близкорасположенных каналов образует область повышенной концентрации ионов кальция в определённом участке нервного окончания и формирует кальциевый микродомен.  $\text{Ca}^{2+}$ -микродомен может включать и несколько соседних, близко расположенных активных зон.  $\text{Ca}^{2+}$ -микродомен существует дольше, чем длится входящий кальциевый ток, и обеспечивает более высокий уровень освобождения медиатора в своей окрестности, поскольку буферные системы, участвующие в регуляции уровня концентрации кальция, способны некоторое время поддерживать высокую локальную концентрацию кальция внутри клетки (Балезина, 2002; Meriney, Dittrich, 2013). При помощи методов математического моделирования, проведения экспериментов по регистрации кальциевых сигналов с высоким разрешением и оценки вызванного освобождения медиатора в нервных окончаниях холоднокровных показана роль срабатывания отдельных кальциевых каналов в процессе освобождения нейромедиатора. Синапсы холоднокровных характеризуются большим запасом готовых к выбросу везикул. Обнаружено, что для освобождения одной везикулы в районе активной зоны достаточно срабатывания одного кальциевого канала. Но вероятность освобождения везикулы достаточно низкая и составляет около 6% даже в случае открытия нескольких кальциевых каналов (Luo, 2015).

Регуляция содержания ионов кальция в цитозоли осуществляется за счет трансмембранного транспорта и цитоплазматического связывания кальция. Существует два основных типа структур транспорта ионов кальция через мембрану: 1)  $\text{Ca}^{2+}$ -каналы плазматической мембраны и ЭР, 2) кальциевые насосы и обменники плазматической мембраны (Авдонин, 1994, Poage, Meriney, 2002). Таким образом, изменение концентрации ионов кальция может осуществляться как за счет поступления его из наружной среды, так и за счет выброса из внутриклеточных структур –  $\text{Ca}^{2+}$ -депо (например, гладкого эндоплазматического

ретикулума, митохондрий,  $\text{Ca}^{2+}$ -связывающих белков и других структур) (Pozzan et al., 1994; Skitieva et al., 2012). Большая часть ионов  $\text{Ca}^{2+}$ , входящих в клетку, практически немедленно связывается белками машины экзоцитоза (Костюк, 1986). Дополнительным механизмом, ответственным за вывод ионов кальция из цитоплазмы, является натрий-кальциевый обменник, который выводит  $\text{Ca}^{2+}$ , используя энергию натриевого электрохимического градиента (Baker, 1969). Роль ионов  $\text{Ca}^{2+}$ , высвобождаемых из цистерн гладкого ЭР, в запуске и контроле секреторных процессов в нервных терминалях на данный момент времени остается малоизученной.

### **2.3 Потенциал-зависимые кальциевые каналы**

Кальциевые каналы обеспечивают приток ионов  $\text{Ca}^{2+}$  в цитоплазму клетки и несут в себе важные функции, а именно: участие в электрогенезе, поддержание определенного внутриклеточного уровня концентрации ионов  $\text{Ca}^{2+}$ , запуск секреции нейромедиатора (Костюк, 1986; Catterall, 1999, 2008).

По механизму активации кальциевые каналы делятся на потенциал-управляемые и агонист-управляемые каналы. Потенциал-управляемые каналы, обеспечивая вход кальция в клетку во время потенциала действия, вызывают как секрецию нейромедиатора, так и сокращение мышечного волокна (Meir et al., 1999; Wadel et al., 2007; Catterall, Few, 2008). Активация агонист-управляемых каналов приводит к их значительной проницаемости для ионов кальция в физиологических условиях.

Потенциал-зависимые кальциевые каналы являются одним из наиболее изученных классов ионных каналов на данный момент (Hagiwara et al., 1975; Birnbaumer et al. 1994; Tareilus, Breer, 1995). Ионы кальция, входящие в НО через потенциал-зависимые кальциевые каналы во время потенциала действия, инициируют выброс нейромедиатора и, таким образом, играют очень важную роль в синаптической передаче.

Потенциал-зависимые кальциевые каналы были классифицированы электрофизиологически по порогу потенциала активации. На данный момент

выявлено 6 типов потенциал-зависимых кальциевых каналов: L ( $Ca_v1.1-4$ ), P/Q ( $Ca_v2.1$ ), N ( $Ca_v2.2$ ), R ( $Ca_v2.3$ ), T ( $Ca_v3.1-3$ ) (Frank, 2014; Simms, Zamponi, 2014). Например, каналы типа L, P/Q и N являются высокопороговыми, T-тип – низкопороговый. Для R-типа кальциевых каналов характерен промежуточный порог активации.

Каналы также различают по структуре, чувствительности и функциям, которые они выполняют. Показано, что в отличие от центральной нервной системы, где процесс секреции опосредован функционированием различных типов потенциал-зависимых каналов, в периферической нервной системе взрослых позвоночных животных вовлечен только один тип кальциевых каналов – N или P/Q. В случае синапсов лягушки это N-тип кальциевых каналов ( $Ca_v2.2$ ), блокатором которого является  $\omega$ -конотоксин GVIA. Однако, существуют данные об участии других типов кальциевых каналов в регуляции экзоцитоза периферических синапсов холонокровных животных. Показано существование различных типов кальциевых каналов в нервно-мышечном соединении лягушки и отмечена их возможная роль в модуляции как количества квантов медиатора в ответ на нервный импульс, так и временного хода секреции (Tsentsevitsky et al., 2014). При помощи иммуногистохимических методов была показана экспрессия  $\alpha_{1A}$ ,  $\alpha_{1B}$ ,  $\alpha_{1E}$ ,  $\alpha_{1G}$ ,  $\alpha_{1H}$ ,  $\alpha_{1I}$ ,  $\alpha_{1D}$ ,  $\alpha_{1F}$  субъединиц P/Q-, N-, R-, T- и L-типов потенциал-зависимых кальциевых каналов. С использованием флуоресцентной и электрофизиологической методик показано, что специфические блокаторы кальциевых каналов снижают кальциевый транзист, вызванный потенциалом действия и также снижают спонтанный и вызванный выброс медиатора. Блокада высокопороговых кальциевых каналов приводила к синхронизации кинетики выброса медиатора (Tsentsevitsky et al., 2014).

Одним из возможных функциональных значений такого разнообразия типов кальциевых каналов на мембране пресинаптической клетки может быть наличие дополнительных регуляторных цепочек, осуществляющих пресинаптическую модуляцию выброса квантов медиатора при различных режимах работы синаптического аппарата (Miller, 1998; Tsentsevitsky et al., 2014). Вполне



возможно, что контроль над входом кальция через эти разнообразные типы кальциевых каналов может осуществляться посредством пресинаптических рецепторов (Miller, 1998).

#### **2.4 Молекулярные аспекты регуляции освобождения медиатора и пресинаптического уровня кальция в нервном окончании. Роль пресинаптических рецепторов**

Основными сигнальными входами клеток, через которые они могут получать информацию от других сигнальных систем организма, являются синаптические рецепторы. Термин «рецептор» в начале XX века был предложен для обозначения специализированных структур, опосредующих биологические эффекты химических веществ (Bennett, 2000). Основная функция рецепторов заключается в распознавании и обработке информации, которую несет в своей структуре молекула лиганда – нейромедиатора, и в запуске ответа сопряженных с рецептором клеточных элементов (Marwaha, 1984). Известно, что синаптические рецепторы локализуются в цитоплазматических мембранах, причем как в пост-, так и в пресинаптических областях. Рецепторы, расположенные на постсинаптической мембране, включены в систему управления функцией постсинаптической клетки, например, принимают участие в запуске механизма сокращения мышечного волокна. Функция пресинаптических рецепторов состоит в регуляции количества выделяемого нервным окончанием медиатора (Starke, 1981).

Структура известных рецепторов представляет собой белковую молекулу с непосредственно примыкающими к ней липидами. Липиды способны изменять конформацию белковой молекулы и тем самым участвовать в процессах межклеточного управления. Понятие рецепции включает в себя процесс распознавания определенного лиганда и формирование ответа на соответствующие молекулярные сигналы, возникающие при участии рецепторов (Starke, 1981).

В настоящее время известно большое количество рецепторов нейромедиаторов, разнообразных по своим фармакологическим свойствам и механизмам действия. Наиболее распространенной является классификация синаптических рецепторов по нейромедиаторам, их активирующим: холинорецепторы, адренорецепторы, ГАМК-рецепторы и т.д. Существует классификация синаптических рецепторов по их фармакологическим свойствам, например, никотиновые холинорецепторы и мускариновые холинорецепторы, активация которых влечет за собой физиологические эффекты, подобные вызываемым никотином и мускарином, соответственно. Однако структурно и функционально рецепторы одной группы могут отличаться, например, различие никотиновых холинорецепторов нервно-мышечных синапсов и вегетативных ганглиев проявляется в разной их чувствительности к антагонистам. По механизму физиологического действия выделяют ионотропные и metabotropные рецепторы (Vetulani, 1988). К ионотропным относят рецепторы, регулирующие проводимость ионных каналов без участия каких-либо молекулярных посредников. К этой группе относятся никотиновые рецепторы. Стимуляция metabotropных рецепторов ведет к изменению скорости синтеза внутриклеточных вторичных посредников. К этой группе относятся мускариновые холинорецепторы.

Начальная стадия функционирования рецепторов любого типа заключается в узнавании и связывании лиганда. Дальнейшие этапы механизма действия рецепторов значительно различаются для ионотропных и metabotropных типов. Физико-химическими механизмами узнавания и связывания медиатора рецептором обеспечивается такое важнейшее свойство рецепторов, как специфичность их активации. Узнавание лиганда рецептором происходит при структурном соответствии их молекул и благодаря индуцируемому лигандом конформационным изменениям макромолекулы рецептора (Vetulani, 1988). Механизм узнавания позволяет рецептору взаимодействовать лишь с функционально значимыми молекулами. В случае, если лиганд комплементарен

рецептору, он связывается с ним за счет ван-дер-ваальсовых, гидрофобных, кулоновских взаимодействий, водородных связей.

В ионотропных рецепторах следующее за связыванием лиганда сопряжение рецептора с ионным каналом не имеет промежуточных молекулярных звеньев. При этом связывающий участок расположен либо в пределах белковой канальной молекулы, либо непосредственно к ней примыкает (Matthews-Bellinger, Salpeter, 1978). Известно, что для активации ионотропных холинорецепторов необходимо связывание не менее двух молекул АХ (Fu, Liu, 1997). При связывании комплементарного медиатора с ионотропным рецептором конформационные изменения канальной молекулы приводят к тому, что определенные ионы получают возможность проходить сквозь ионный канал по их электрохимическому градиенту. Этот вид рецепции осуществляется в пределах мембраны без участия внутриклеточных структур.

Участок связывания лигандов метаботропных рецепторов также расположен на наружной поверхности цитоплазматической мембраны, однако сама рецепторная молекула, проходя сквозь клеточную мембрану, на ее внутренней стороне сопрягается с G-белками (Ben-Chaim et al., 2003) которые, в свою очередь, связаны с различными ферментативными системами. При активации рецептора G-белки способны изменять скорость синтеза вторичных посредников, которые впоследствии приводят к модификации функциональной клеточной активности.

Для понимания того, каким образом пресинаптические рецепторы могут регулировать процесс освобождения медиатора и пресинаптический уровень кальция в нервных окончаниях, необходимо осветить некоторые молекулярные механизмы, ответственные за выброс медиатора и контроль концентрации кальция в клетке, который, как отмечалось, непосредственно ответствен за выброс квантов медиатора.

Как уже упоминалось выше, пресинаптические рецепторы подразделяются на несколько типов, в том числе G-белок-связанные (метаботропные) (Miller, 1990; Wu, Saggau, 1997) и мультисубъединичные ионные каналы (ионотропные)

(McGehee, Role, 1996). Активация обоих типов рецепторов может регулировать выброс медиатора в различных условиях. Есть несколько основных объяснений того, как пресинаптические рецепторы могут регулировать выброс медиатора и уровень пресинаптического кальция.

1. Ингибирование  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов. Мы знаем, что вход  $\text{Ca}^{2+}$  через соответствующим образом локализованные каналы является основным импульсом к выбросу синаптических пузырьков. Таким образом, изменения во входе ионов  $\text{Ca}^{2+}$  за счет регулирования этих каналов должны, безусловно, влиять на высвобождение медиатора (Wu, Saggau, 1997). В самом деле, это мы будем подробно обсуждать ниже, активация многих-рецепторов, связанных с G – белками, влияет на активность кальциевых каналов.

2 Активация пресинаптических ионных каналов. Стимуляция пресинаптического рецептора может активировать проводимость в нервных окончаниях (например, проводимость K- или Cl-канала), тем самым «шунтировать» потенциал действия в этой области нейрона (Segev, 1990; Gage, 1992; Graham, Redman, 1994).

Активация такой пресинаптической проводимости может сократить продолжительность и амплитуду потенциала действия в пресинаптических окончаниях, соответственно входящий кальциевый ток может быть уменьшен, и меньше нейротрансмитера будет освобождено. Кроме того, активация Na- или Cl-проницаемых пресинаптических каналов может деполяризовать терминаль достаточно для того, чтобы инактивировать зависящие от потенциала натриевые и кальциевые каналы, тем самым блокируя распространение потенциала действия в терминали или продолжительность деполяризации в месте выброса медиатора. (Zhang, Jackson, 1993).

3 Регулирование непосредственно выброса медиатора. Как уже обсуждалось выше, последние шаги, которые ведут к освобождению синаптических пузырьков, включают комплекс белков, в том числе несколько  $\text{Ca}^{2+}$ -чувствительных компонентов. Активация пресинаптических рецепторов может влиять на прохождение сигнала к одному или нескольким из этих белков и

влиять на процесс выброса медиатора в точке, удаленной по отношению к входу кальция в НО.

Существуют доказательства того, что все эти механизмы могут быть задействованы при активации пресинаптических рецепторов. В некоторых случаях несколько путей регуляции могут быть задействованы одновременно.

Ниже мы рассмотрим эти возможные пути регуляции на примере метаботропных и ионотропных рецепторов.

## **2.5. Участие метаботропных рецепторов в регуляции пресинаптического уровня кальция и выброса квантов медиатора**

### **2.5.1 Регуляция активности пресинаптических кальциевых каналов метаботропными рецепторами**

Ключевую роль в выбросе квантов медиатора в синапсах холоднокровных и теплокровных в основном занимают потенциал-зависимые кальциевые каналы N и P/Q типов (Dunlap et al., 1983; Miller, 1990; Wheeler et al., 1994; Herlitze, 1996; Jones, Elmslie, 1997; Wu, Saggau, 1997). Активация многих связанных с G-белками рецепторов приводит к ингибированию кальциевых токов через эти типы кальциевых каналов. Это было показано в экспериментах, выполненных электрофизиологическими методами пэтчклемп регистрации (Miller, 1990; Hille, 1994; Dolphin, 1995; Jones, Elmslie, 1997; Wu, Saggau, 1997). Например, известно, что G-белки, сопряженные с пуринорецепторами, являются отрицательными регуляторами каналов N- и P/Q-типов (Currie, Fox, 1997). Существует несколько механизмов передачи сигнала между рецептором и кальциевыми каналами. Вот один из наиболее изученных механизмов. Активация рецептора изменяет свойства открытого кальциевого канала (воротные свойства) так, что он не может открываться под действием деполяризации в нормальном диапазоне, хотя более сильная деполяризация может приводить к открытию канала (Bean, 1989; Boland, 1993; Patel, 1996; Jones, Elmslie, 1997). В зависимости от условий, в результате будет происходить либо уменьшение движущей силы ионов кальция и (или) ингибирование кальциевого тока. Кинетика уменьшения скорости и

ингибирования подвержена сильной зависимости от степени деполяризующего импульса и имеет достоверную физиологическую значимость. Например, вероятность ингибирования может сильно уменьшаться во время быстрых пачек стимуляции потенциалами действия (Elmslie et al., 1992). Это объясняет эффект так называемого «частотно-зависимого» феномена пресинаптического ингибирования (Penington et al., 1992; Toth, Miller, 1995). Также есть данные, что пресинаптическое ингибирование менее эффективно при частотной работе нейронов. Однако, при проверке этого предположения, было формально показано, что ингибирование кальциевых каналов не усиливается при стимуляции в нормальном частотном диапазоне, как можно было ожидать (Penington et al., 1992; Toth, Miller, 1995). Таким образом, «частотно-зависимый» феномен пресинаптического ингибирования может трактоваться с разных точек зрения (Miller, 1991).

Как осуществляется ингибирование  $Ca^{2+}$ -канала? Активация рецептора изначально приводит к активации гетеротримерных G белков. Первый вопрос – как G-белки влияют на поведение  $Ca^{2+}$ -канала? Учитывая тот факт, что никакой диффундирующий вторичный посредник не принимает участия в этом процессе (Hille, 1994), вполне вероятно, что G-белок оказывает свое воздействие за счет непосредственного связывания с каналом. Существуют экспериментальные данные, позволяющие предположить, что это  $\beta/\gamma$ -субъединицы G белков отвечают за передачу сигнала (Herlitze et al., 1996; Ikeda, 1996; Shekter et al., 1997). Таким образом, G-белок-опосредованная модуляция  $Ca^{2+}$ -каналов аналогична в этом отношении регуляции G-белок-связанных калиевых каналов (так называемых GIRK) посредством рецепторов и G-белков – процессу, который также включает в себя передачу сигнала через  $\beta/\gamma$ -субъединицы G-белков (Huang et al., 1995). В настоящее время известны несколько G-белок-опосредованных эффектов, осуществляющихся таким образом (Chen et al., 1995).

Изначально при определении точки взаимодействия между  $\beta/\gamma$  субъединицами и  $Ca^{2+}$ -каналами предполагалось, что связывающий домен находится в первой интрацеллюлярной петле, соединяющей домены 1 и 2  $\alpha 1$ -

субъединицы – главной порообразующей субъединицы  $\text{Ca}^{2+}$ -канала (DeWaard et al., 1997; Zamponi et al., 1997). В самом деле, мало кто сомневается, что  $\beta/\gamma$ -субъединицы могут взаимодействовать с  $\text{Ca}^{2+}$ -каналами на этом сайте, как это было показано разными методами исследований – как мутагенезом, так и биохимическими исследованиями (DeWaard et al., 1997; Herlitze et al., 1997; Zamponi et al., 1997). Эта интрацеллюлярная петля содержит сегмент (QXXER), который, как было показано, участвует в связывании  $\beta/\gamma$ -субъединицы G-белка с несколькими другими эффекторами, в том числе с GIRK-подобными K-каналами (Chen et al., 1995). Этот мотив присутствует в  $\alpha_{1B}$ ,  $\alpha_{1A}$ ,  $\alpha_{1E}$ , дигидропиридин-нечувствительных  $\text{Ca}^{2+}$ -каналах, каждый из которых в некоторой степени можно модулировать посредством  $\beta/\gamma$ -субъединицы G-белка (Herlitze et al., 1996; Ikeda, 1996; Shekter et al., 1997). С другой стороны, этот мотив отсутствует в дигидропиридин-чувствительных  $\text{Ca}^{2+}$ -каналах ( $\alpha_{1C}$ ,  $\alpha_{1D}$ ,  $\alpha_{1S}$ ), работа которых не модулируется непосредственно G белками (Zhang et al., 1996; Bourinet et al., 1996). Предполагается, что синтетические пептиды, 1/2 петли, которых включает в себя эту последовательность, уменьшают G-белок-опосредованное ингибирование  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов, основанных на  $\alpha_{1A}$  или  $\alpha_{1B}$  субъединицах. Это поддерживает предложение о том, что  $\beta/\gamma$ -связь на этом сайте опосредована G-белок-ингибированием (DeWaard et al, 1997; Zamponi et al., 1997).

Тем не менее, понимание этого процесса представляется далеко не полным. Следует учитывать, например, эксперименты, в которых был произведен обмен 1/2 линкера между различными  $\alpha_1$ -субъединицы. Было показано, что, хотя  $\alpha_{1A}$ ,  $\alpha_{1B}$ ,  $\alpha_{1E}$  ингибируются G-белками, они значительно отличаются по своей чувствительности. Так,  $\alpha_{1B}$  является наиболее чувствительной, а  $\alpha_{1E}$  – наименее (Bourinet et al., 1996; Toth et al., 1996). Кроме того,  $\beta/\gamma$ -субъединицы, вероятно, также связываются с более чем одним сайтом на  $\alpha_1$ -субъединицах  $\text{Ca}^{2+}$ -канала. Так, DeWaard и др. (DeWaard et al, 1997) показали, что существует второй сайт связывания на 1/2 линкера, который имеет даже более высокую аффинность для  $\beta/\gamma$ -субъединицы. Интересно, что этот сайт не обладает QXXER-связывающим сегментом. Кроме того, Zhang и др (Zhang et al., 1996) показали, что участки  $\alpha_1$ -

субъединицы, лежащие за пределами 1/2 линкера, также принимают участие в G-белок-опосредованном ингибировании. Соответственно,  $\beta/\gamma$ -сайт связывания в настоящее время определен в С-терминальном хвосте  $\alpha_1$ -субъединиц (Pozzan et al., 1997). Таким образом, точный путь, в котором  $\beta/\gamma$ -связывание преобразуется в ингибирование канала, до сих пор не до конца изучен.

### **2.5.2. Ацетилхолиновые мускариновые рецепторы (м-холинорецепторы). Регуляция входа кальция и освобождения медиатора**

В нервно-мышечном окончании метаботропные рецепторы представлены семейством мускариновых ацетилхолиновых рецепторов (Bowman et al., 1990).

М-рецепторы принадлежат к классу G-белок-связанных метаботропных рецепторов. Существует 5 подтипов мускариновых рецепторов:  $M_1$ - $M_5$  (Hulme, 1990; Caulfield, Birdsall, 1998). Нечетные ( $M_1$ ,  $M_3$  и  $M_5$ ) рецепторы связаны преимущественно с G белками семейства  $G_q/11$  (не чувствительными к коклюшному токсину), а четные ( $M_2$  и  $M_4$ ) рецепторы связаны с семейством  $G_i/G_o$  белков (чувствительных к коклюшному токсину). Многие нервные клетки содержат более одного подтипа, некоторые – до четырех подтипов мускариновых рецепторов (Fukuda, 1987). Активация рецептора изменяет активность одного или более ионных каналов в мембране, что приводит к изменению функционального состояния клетки.

При активации рецепторов  $M_1$ ,  $M_3$ ,  $M_5$  регуляция происходит по следующему сценарию. Фосфолипаза  $C\beta$  (PLC $\beta$ ) активируется в ответ на конкретные внеклеточные стимулы прямым взаимодействием с гетеротримерным G-белком  $G_q$ . Затем происходит гидролиз мембранного фосфолипида фосфатидилинозит 4,5-бисфосфата (PIP2). PIP2 в свою очередь может участвовать в образовании инозитолтрифосфата и диацилглицерола (McLaughlin et al., 2002; Malomouzh et al., 2007; Brown, Sihra, 2008; Rodriguez-Menchaca et al., 2012). Это же приводит к ответу ионных каналов. Например, к ингибированию подпороговых калиевых каналов семейства KV7 (калиевые каналы М-типа) (Brown, Adams 1980).



Активация мХР  $M_2$  и  $M_4$  сопровождается включением G- белка  $G_{i/o}$ , что, в свою очередь, приводит к активации его субъединицы  $G_{\beta\gamma}$ , которая, как было показано выше, может напрямую взаимодействовать с кальциевыми каналами.

Один из наиболее поразительных аспектов мускариновой регуляции, особенно в ЦНС – это то, что выброс ацетилхолина является предметом глубокого постоянного автоингибирования в результате совместной активации м-холинорецепторов. Еще в 1969 году Дудар и Сцерб установили трехкратное увеличение заполненности ацетилхолином коры головного мозга, вызванное афферентной стимуляцией после добавления атропина (Brown, Sihra, 2008).

На культивированных нейронах коры головного мозга фармакологическими и генетическими методами было показано, что тормозное действие ацетилхолина осуществляется при участии  $M_2$ -холинорецепторов. Тормозные эффекты были заблокированы 100 нМ метоктрамина, но не устранялись в присутствии 100 нМ пирензепина (Allen, Brown, 1996). В соответствии с этим, не наблюдалось мускаринового торможения и в срезах мозга мышей, нокаутированных по  $M_2$ -мускариновым рецепторам (Brown, Sihra, 2008).

Механизм пресинаптического автоторможения, включает в себя блок входа ионов кальция через потенциал-зависимые кальциевые каналы. Вероятно, основной причиной пресинаптического автоингибирования является прямое потенциал-зависимое воздействие  $\beta\gamma$ -субъединицы на  $\alpha$ -субъединицу потенциал-зависимого кальциевого канала, как было рассмотрено нами выше (Herlitze et al., 1996; Ikeda, 1996; Shekter et al., 1997). Таким образом, поведение нейронов определяют  $M_2$ -рецепторы – их стимуляция производит глубокое потенциал-зависимое ингибирование токов через кальциевые каналы N- и P/Q-типа. По аналогии с лучше изученными потенциал-зависимыми  $M_4$ -рецепторами, вызывающими торможение  $Ca^{2+}$ -тока в симпатических нейронах, это является, вероятно, результатом активации G-белка  $G_0$  и последующего прямого взаимодействия  $G_0$ -связанных  $\beta\gamma$ -субъединиц с  $Ca^{2+}$ -каналами. Однако нельзя исключать дополнительных воздействий на выброс медиатора вслед за входом ионов  $Ca^{2+}$  (Brown, Sihra, 2008).

### **2.5.3. Участие м-холинорецепторов в регуляции секреции квантов медиатора через систему регуляции белков экзоцитоза**

Наряду с регуляцией вызванного освобождения через модуляцию работы ионных каналов, мускариновые рецепторы участвуют в регуляции выброса медиатора посредством механизма, который включает в себя активацию пресинаптических ауторецепторов потенциалом действия (Allen, Brown, 1993; Slutsky et al., 1999). Так, было показано, что мускариновый ацетилхолиновый рецептор, а именно его  $M_2$ -подтип, является посредником в системе АХ-ауторегуляции и взаимодействует с ключевыми белками машины экзоцитоза (SNARE и синаптотагмин). Это взаимодействие носит потенциал-зависимый характер – оно сильно при потенциале покоя и слабеет при росте деполяризации. (Linial et al., 1997). Причем было показано, что  $M_2$ -рецептор действительно взаимодействует с синтаксином, когда с рецептором связался ацетилхолин (Pouz et al., 1999). Также было показано, что  $M_2$ -рецептор претерпевает потенциал-чувствительный сдвиг аффинности: он демонстрирует высокое сродство при потенциале покоя и низкое в состоянии деполяризации мембраны.

Существуют данные литературы о том, что вызванный выброс ацетилхолина повышается под действием антагонистов мускариновых ацетилхолиновых рецепторов (скополамин, атропин) на подвздошной кишке морской свинки (Morita, et al., 1988; Peteris, Ogren, 1988), на мочевом пузыре крыс (D'Agostino et al., 1986), на диафрагме мыши и крысы (Wessler, 1989), а также показано аналогичное действие специфического блокатора  $M_2/M_4$ -подтипа м-холинорецепторов метоктрамина на нервно-мышечном препарате лягушки (Slutsky et al., 1999). Все эти данные поддерживают представления о том, что в покое машина экзоцитоза находится под тоническим угнетающим воздействием, продуцируемым тонической концентрацией ацетилхолина в результате высокой занятости мускариновых ауторецепторов. На основании описанных данных существует следующая гипотеза потенциал-зависимого управления высвобождением нейромедиатора (Parnas, 2000). В покое (потенциал покоя и

соответствующая концентрация медиатора в синаптической щели) машина экзоцитоза поддерживается в угнетенном состоянии. Это происходит потому, что при потенциале покоя рецептор находится в состоянии с высокой аффинностью, так что даже низкая тоническая концентрация медиатора в синаптической щели достаточна для удержания большой доли ауторецепторов занятыми. Рецепторы в связанном состоянии тесно взаимодействуют с машиной экзоцитоза, сохраняя ее в заблокированном состоянии. При деполяризации мембраны этот блок устраняется и инициируется выброс медиатора благодаря быстрому сдвигу  $M_2$ -рецептора в состояние с низкой аффинностью, что сопровождается диссоциацией медиатора. Незанятый рецептор тем самым отсоединяется от экзоцитозной машины, которая взаимодействует с ионами кальция, входящими во время деполяризации, и начинается выброс медиатора. Во время реполяризации мембраны ауторецептор быстро возвращается в состояние с высокой аффинностью и вновь связывает медиатор. Занятый медиатором рецептор восстанавливает связь с экзоцитозной машиной и наступает блок освобождения медиатора. (Slutsky et al., 2001)

Таким образом, безусловно, что пресинаптические мускариновые рецепторы вовлечены в механизм модуляции высвобождения нейромедиатора в холинергических синапсах. Однако в литературе встречаются противоречивые данные о действии неселективного агониста м-холинорецепторов мускарина на освобождение медиатора. Подтипы мускариновых рецепторов, вовлеченных в угнетение или увеличение освобождения медиатора, полностью не определены. Например, некоторые исследователи полагают, что активация только  $M_2$ -рецептора отвечает за тормозящие эффекты мускарина (Allen, Brown, 1993; Bellingham, Berger, 1996), в то время как другие авторы сообщают о торможении выброса посредством  $M_2$  или  $M_3$  рецепторов (Ren, Harty, 1994; Vannucchi, Pereu, 1995).

В литературе существует ряд выводов относительно участия входа ионов кальция в механизме м-ауторецептор-опосредованной регуляции высвобождения ацетилхолина (Caulfield, 1993; Borst, Sakmann, 1996; Nikolsky et al., 2004; Хазиев и др., 2012). Показано, что торможение выброса ацетилхолина посредством

мускариновых агонистов выше при низких внеклеточных концентрациях кальция и опосредуемое мускарином угнетающее действие на выброс медиатора сильнее при низких частотах стимуляции. По другим данным действие мускарина на выброс ацетилхолина на синапсах мозга оставалось на одном уровне в широком диапазоне концентраций внеклеточного кальция 0,25-4 мкМ (Dolezal, Tucek, 1993). Slutsky с соавторами показали, что мускарин оказывает двойное действие, приводящее как к снижению, так и увеличению количества высвобождающихся квантов ацетилхолина. Было показано, что увеличение освобождения обусловлено ростом притока ионов  $Ca^{2+}$  и опосредовано  $M_1$ -подтипом мускариновых холинорецепторов. Уменьшение количества выделяющихся квантов, в свою очередь, опосредовано  $M_2$ -подтипом мускариновых рецепторов и не зависит от изменения кальциевого тока (Slutsky et al., 1999).

Все вышеперечисленное указывает на необходимость изучения мускаринового пути регуляции выброса медиатора и выяснения роли изменения кальциевого метаболизма в реализации эффектов блокаторов и активаторов мускариновых рецепторов.

## **2.6 Участие ионотропных рецепторов в регуляции пресинаптического уровня кальция и выброса квантов медиатора**

### **2.6.1 Влияние ионотропных рецепторов на выброс квантов медиатора**

Как и метаботропные рецепторы, ионотропные пресинаптические рецепторы также могут участвовать в регуляции высвобождения нейромедиатора. Существуют доказательства того, что активация пресинаптических ГАМК, никотиновых холинергических, и разнообразных типов глутаматных рецепторов в различных частях нервной системы, может модулировать выброс медиатора (Rathouz, Berg, 1994; Dajas-Bailador, Wonnacott, 2004). Все эти рецепторы имеют мультисубъединичный состав и являются лиганд-активируемыми ионными каналами (Dajas-Bailador, Wonnacott, 2004; Fucile, 2004). Активация рецепторов приводит непосредственно к открытию ионных каналов в пресинаптических

терминалях и последующему перераспределению ионов, что влияет на выброс медиатора (Shen, Yakel, 2009). Модуляция может проходить по нескольким путям регуляции (Shen, Yakel, 2009). Например, активация ионного канала, который является проницаемым для К или Cl, может вызвать шунтирование потенциала действия в пресинаптических окончаниях, что приведет к менее эффективному открыванию Ca<sup>2+</sup>-каналов и последующему торможению выброса медиатора. С другой стороны, и это наиболее вероятно, активация каналов, приводящая к перераспределению ионов Cl или Na, может деполяризовать терминаль, что, в свою очередь, приведет к инактивации потенциал-зависимых Na- и Ca<sup>2+</sup>-каналов и ингибированию распространения потенциала действия в терминали и притока Ca<sup>2+</sup>. С другой стороны, если происходит активация канала, достаточно проницаемого для Ca<sup>2+</sup>, можно было бы ожидать усиление высвобождения трансмиттера в связи с увеличением входа Ca<sup>2+</sup> непосредственно в терминаль. Это может приводить в результате к торможению освобождения, когда будут истощены все источники медиатора (Shen, Yakel, 2009). Существуют доказательства того, что сочетание всех этих процессов может происходить в пресинаптических нервных терминалях. Можно привести в качестве примера капсаицин, который связывается с пресинаптическим рецептором на небольших немиелинизированных сенсорных болевых рецепторах, в результате чего открываются ионные каналы, проницаемые для Ca<sup>2+</sup> и Na (Bleakman et al., 1991; Caterina et al., 1997). Это открывание приводит к повышению возбудимости нейронов и притоку Ca<sup>2+</sup>, на начальном этапе вызывая увеличение выброса медиатора (субстанция Р) в спинном мозге и увеличение боли. Однако, когда источники медиатора истощены, наступает гипалгезия (снижение болевой чувствительности). В связи с этим, препараты на основе капсаицина используются местно при лечении таких расстройств, как опоясывающий лишай (Bleakman et al., 1991; Caterina et al., 1997).

### **2.6.2. Никотиновые ацетилхолиновые рецепторы (н-холинорецепторы)**

Одними из основных представителей ионотропных рецепторов в синапсах теплокровных и холоднокровных является никотиновый рецептор - Н-холинорецептор. В 1914 году Дэйл классифицировал действие ацетилхолина на никотин-подобное и мускарин-подобное. Н-холинорецептор — тип ацетилхолиновых рецепторов, входящий в группу рецептор-ионных каналов вместе с ГАМК, глициновым и серотониновым 5-НТЗ рецепторами (Shen, Yakel, 2009). При попадании двух молекул ацетилхолина на молекулу данного рецептора приоткрывается проницаемый для катионов канал, что приводит к деполяризации клеточной мембраны и генерации нервного импульса в нейроне или сокращению мышечного волокна (в случае нервно-мышечного синапса). Данный рецептор найден в химических синапсах, как в центральной, так и в периферической нервной системе, в нервно-мышечных синапсах, а также в эпителиальных клетках многих видов животных (Fu, Liu, 1997).

Никотиновые рецепторы на мышце и на симпатических ганглиях различаются по чувствительности к соединениям бис-триметиламмония с 6 и 10 атомами углерода в полиметиленовой цепи, что явилось первым доказательством структурного различия мышечных и нейрональных никотиновых рецепторов (Shen, Yakel, 2009).

Высокоаффинные змеиные  $\alpha$ -токсины, например,  $\alpha$ -бунгаротоксин, который является необратимым лигандом и специфическим антагонистом ацетилхолина для никотиновых рецепторов в нервно-мышечных синапсах, позволили выделить белки структурной молекулы никотиновых рецепторов в четыре группы субъединиц:  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  и  $\delta$  (Patrick et al., 1993; McGehee, Role, 1996; Role, Berg, 1996). Впоследствии во взрослых скелетных мышцах была обнаружена еще одна субъединица  $\epsilon$ . Ионный канал формируется всеми субъединицами холинорецептора, а связывание ацетилхолина происходит на  $\alpha$ -субъединице. Сам ионный канал имеет конусообразный вид, широкой частью обращен к наружной поверхности клетки. Активация ацетилхолином никотиновых рецепторов сопровождается изменением проницаемости клеточных мембран для ионов (Verrino, 1992; Miller, 1998). Например, н-холинорецепторы постсинаптической

мембраны мышечного волокна способны управлять проницаемостью этой мембраны для ионов натрия, калия и кальция, что в конечном счете приводит к генерации потенциала действия и к сокращению мышечной клетки (Катц, 1968).

Каждая из пяти субъединиц, образующих никотиновый рецептор, содержит липидный бислой, создавая поры. Основной сайт связывания агониста ацетилхолина расположен на внеклеточной поверхности каждой из  $\alpha$ -субъединиц и окружен двумя соседними остатками цистеина (номера 192 и 193 в первичной структуре); для формирования функционального сайта связывания, данные цистеиновые остатки должны быть объединены дисульфидным мостиком между входящими в их состав атомами серы (Wonnacott, 1997; Karlin, 2002). Учитывая то, что  $\beta$ -,  $\gamma$ - и  $\delta$ -субъединицы лишены агонист-связывающего сайта, они называются «структурными» субъединицами. Было доказано, что относительно небольшие пертурбации, а именно поворот на  $4^\circ$  двух агонист-связывающих субъединиц, приводят к значительному смещению сегментов, формирующих стенки ионного канала, и открытию поры ионного канала, что является условием возникновения катионного тока через рецептор (Wonnacott, 1997).

После связывания агониста никотиновые ацетилхолиновые рецепторы подвергаются аллостерическому переходу из закрытой конформации покоя в открытое состояние, которое обеспечивает приток ионов  $\text{Na}^+$  и в меньшей степени  $\text{Ca}^{2+}$  в нормальных физиологических условиях (Sine, Engel, 2006). В закрытом состоянии ионный канал перекрывается гидрофобным кольцом, препятствующим прониканию ионов. Внеклеточное связывание агониста приводит к конформационным изменениям, в результате которых вращательными движениями  $M_2$ -спираль выстилает пору (Wonnacott, 1997; Sine, Engel, 2006). Уширение кольца увеличивает пору примерно на 3 ангстрема, чего достаточно для проникновения ионов. Несмотря на присутствие агониста, каналы никотиновых рецепторов закрываются в течение времени от секунд до минут, до наступления состояния десенситизации. В этом состоянии рецептор не активируется. В активном (открытом) состоянии никотиновый рецептор связывает агонист с низким сродством. В состоянии десенситизации рецептор

демонстрирует более высокий уровень сродства к агонисту (Changeux, Edelstein, 2005; Unwin, 2005).

### **2.6.3. Локализация рецепторов с разным субъединичным составом**

Известно, что никотиновые ацетилхолиновые рецепторы модулируют процесс выделения нейротрансмиттера. Однако, субсинаптическое (пре-, -пост, -внесинаптическое) распределение различных подтипов субъединиц никотиновых ацетилхолиновых рецепторов до конца не изучено, что может быть связано с тем, что в управлении синаптической передачей каждая из субъединиц играет свою определенную роль (Garção et al., 2014).

Показано, что субъединицы никотиновых рецепторов структурно независимы друг от друга и, как правило, широко распределены в нервной системе позвоночных (Albuquerque et al., 2008). Экспериментальное выделение композиции субъединиц оказалось чуть более сложной задачей. Текущее понимание субъединичной композиции никотинового ацетилхолинового рецептора во многом обязано следующим методикам: подтип-селективному радиолигандному связыванию, фармакологическому описанию, электрофизиологии, работе с подтип-специфическими антителами и нокаутированными животными.

Существуют данные о гетерогенном (разнородном) распределении  $\alpha 2$ - $\alpha 7$  и  $\beta 2$ - $\beta 4$  субъединиц в нервно-мышечном соединении, симпатических ганглиях и ЦНС (Wonnacott, 1997). Наиболее широкое распространение выявлено у субъединиц  $\alpha 4$ ,  $\beta 2$ ,  $\alpha 7$  и у никотиновых ацетилхолиновых рецепторов  $\alpha 4\beta 2$  и  $\alpha 7$ . Рецептор  $\alpha 4\beta 2$  обладает высоким сродством к никотину. В зависимости от стехиометрии рецептора, в различных сочетаниях количества субъединиц, рецепторы могут различаться по сродству к агонистам (никотин, ацетилхолин, карбахолин) и по пропускной способности ионов, например, кальция.

В работе Garção и др. (Garção et al., 2014) показано, что  $\alpha 7$ - субъединицы н-холинорецепторов в основном обнаружены в пресинаптической активной зоне (во внесинаптической фракции), однако в небольшом количестве они представлены и



на постсинапсе. Исходя из этих данных можно предположить, что  $\alpha 7$ -холинорецепторы могут принимать участие в быстрой прямой синаптической передаче, как это происходит в гиппокампе. С другой стороны, в последних работах показано наличие и функциональная активность  $\alpha 7$  никотиновых рецепторов в пресинаптических швановских клетках (Petrov et al., 2014).

В свою очередь,  $\beta 2$ - и  $\alpha 4$ -субъединицы представлены в основном во внесинаптической фракции и имеют более низкую плотность распределения в пресинаптической активной зоне (исследования проводились на мышах) (Garção et al., 2014).

#### **2.6.4. Физиологически активные вещества, воздействующие на никотиновые холинорецепторы**

Ацетилхолин является эндогенным агонистом для всех подтипов никотиновых рецепторов (Wonnacott, 1997). В качестве агониста ацетилхолин наиболее популярен при активации никотиновых ацетилхолиновых рецепторов в электрофизиологических экспериментах, однако минусом является отсутствие селективности к никотиновым рецепторам, против мускариновых, а также его восприимчивость к гидролизу. При использовании ацетилхолина для активации никотиновых рецепторов необходимо устранить активацию мускариновых ацетилхолиновых рецепторов, используя блокаторы, часть из которых может взаимодействовать и с n-рецепторами.

Карбахолин – модификация ацетилхолина, его негидролизуемый аналог. Карбахолин обладает более низким сродством к  $\alpha 4\beta 2$  и  $\alpha 7$  рецепторам, однако он используется и в качестве агониста мускариновых рецепторов (Jensen et al., 2003).

Никотин – «исторический» агонист никотиновых рецепторов, давший название данному классу рецепторов (Langley, 1907). Все подтипы никотиновых рецепторов активируются никотином (кроме  $\alpha 9$  и  $\alpha 9\alpha 10$ , для которых никотин является антагонистом) (Elgoyhen, 2001).

Конкурентные антагонисты n-холинорецепторов взаимодействуют обратимо с сайтом связывания агониста, или же садятся близко к нему,

предотвращая возможность взаимодействия агонистов с сайтом связывания. Ингибирование обратимым конкурентным антагонистом преодолимо повышением концентрации агониста (Wonnacott, 1997). Соответственно подбирается концентрация для достижения функциональной блокады. Наиболее конкурентоспособные антагонисты получают из обширного набора натуральных природных источников. К сожалению, существует очень ограниченное количество подтип-селективных блокаторов никотиновых рецепторов и не все они доступны на рынке.

Д-тубокурарин является классическим неселективным антагонистом н-холинорецепторов. Причем он блокирует как нейрональные, так и мышечные рецепторы в концентрации порядка 10  $\mu\text{M}$  (Chavez-Noriega et al., 1997). Важно заметить, что механизм ингибирования д-тубокурарином может быть комплексным, включающим неконкурентные взаимодействия (Bertrand et al., 1992).

$\alpha$ -бунгаротоксин – наиболее используемый подтип-селективный никотиновый антагонист, который связывается с мышечными и  $\alpha 7$ - $\alpha 9$  никотиновыми ацетилхолиновыми рецепторами (Wonnacott, 1997). Обладает очень медленной кинетикой связывания. Как правило, необходимо порядка часа для достижения эффекта полной блокады. Причем время инкубирования в растворе с  $\alpha$ -бунгаротоксином может быть сокращено путем увеличения его концентрации (Wonnacott, 1997).

MLA (метилликаконитин) – алкалоид, сильный конкурентный блокатор, селективен для  $\alpha 7$  рецепторов, причем, в отличие от  $\alpha$ -бунгаротоксина, различает мышечные и нейрональные рецепторы. Блокада при помощи MLA быстра и обратима (Wonnacott, 1997).

Мекамиламин – первичный неконкурентный антагонист нейрональных никотиновых рецепторов. Мекамиламин в концентрации от 0,1  $\mu\text{M}$  до 1  $\mu\text{M}$  блокирует большинство нейрональных никотиновых рецепторов. При 10  $\mu\text{M}$  мекамиламин используют для достижения полной блокады *in vitro* (Parke et al., 2001).

Некоторые соединения, имеющие в качестве мишени не никотиновые холинорецепторы, также действуют и как неконкурентные блокаторы н-рецепторов (Wonnacott, 1997). Эти агенты не могут рассматриваться в качестве специфических к никотиновым рецепторам, однако это взаимодействие может представлять фармакологический и физиологический интерес. Например, данные о блокаторе потенциал-зависимых кальциевых каналов N-типа  $\omega$ -конотоксине GVIA носят противоречивый характер. По одним данным,  $\omega$ -конотоксин GVIA не оказывает действия на никотиновые холинорецепторы, по другим же он может блокировать н-холинорецепторы: блокада  $\alpha 3\beta 4$  хотя и обратима, но вызывает более длительное ингибирование потенциал-зависимых кальциевых каналов (Wonnacott, 1997).

### **2.6.5. Кальциевая проницаемость никотиновых рецепторов**

Проницаемые для катионов ионотропные рецепторы проницаемы и для ионов кальция (Pankratov, Lalo, 2013). Причем некоторые из них демонстрируют большую проницаемость для ионов  $\text{Ca}^{2+}$ , чем для одновалентных катионов. Такие рецепторы могут рассматриваться как лиганд-управляемые  $\text{Ca}^{2+}$ -каналы.

Суперсемейство ионотропных рецепторов или лиганд-управляемых  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов представлено тремя топологически различными классами. Это тримерные P2X пуринорецепторы, тетрамерные глутаматэргические рецепторы и пентамерные ацетилхолиновые и серотониновые рецепторы у позвоночных. Некоторые ионотропные рецепторы более селективны к двухвалентным катионам, в частности к ионам кальция. Физиологическое значение этих каналов определяется, в том числе, их способностью пропускать  $\text{Ca}^{2+}$ -потoki после активации рецепторов медиатором (Pankratov, Lalo, 2013)

Большой внеклеточный домен ацетилхолинового рецептора ( $\sim 20 \text{ \AA}$ ), связан с «воротами» – узкой трансмембранной порой. Особенностью ацетилхолин-управляемого канала является наличие еще одной небольшой полости, формирующейся внеклеточным доменом, которая имеет узкие боковые отверстия для ионов (Unwin, 2005). Ионная проницаемость ацетилхолин-управляемого

канала в основном определяется влиянием множества распределенных заряженных групп, выстилающих стенки полостей (Unwin, 2005). Селективный фильтр канала формируется несколькими цитоплазматическими и/или внеклеточными кольцами аминокислотных цепей, обеспечиваемых каждой из пяти субъединиц.  $\text{Ca}^{2+}$ -селективность в значительной степени зависит от заряда гидрофильных аминокислот, содержащихся в области транс-мембранного домена 2 (Albuquerque et al., 2009; Corringer et al., 1999). В мышечных никотиновых рецепторах и в  $\alpha 3$ -субъединице, формирующей никотиновый рецептор, это кольцо формируется незаряженными остатками и относительная  $\text{Ca}^{2+}$ -проницаемость низка. В  $\alpha 7$ -субъединице, соответствующей аминокислотой является глутамат, который делает каналы, сформированные этой субъединицей, предпочтительными для ионов  $\text{Ca}^{2+}$ . Это было проверено путем замещения глутамата другими гидрофильными остатками, которые снижали  $\text{Ca}^{2+}$ -проницаемость до уровня других никотиновых ацетилхолиновых рецепторов (Corringer et al., 1999). Совмещение  $\alpha 7$ -субъединицы с другими субъединицами в рамках н-холинорецептора, например с  $\alpha 5$ -субъединицей, увеличивает  $\text{Ca}^{2+}$ -проницаемость рецептора (Girod et al., 1999; Albuquerque et al., 2009).

Проницаемость для ионов  $\text{Ca}^{2+}$  имеет определенные физиологические последствия. Важно отметить, что работа лиганд-управляемых  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов модулируется как внеклеточным, так и внутриклеточным кальцием. Модуляция работы  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов может регулироваться с помощью  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимых внутриклеточных мессенджеров (Fenster et al., 1999; Khiroug et al., 2003; Chen et al., 2008; Albuquerque et al., 2009). Повышение внутриклеточного содержания ионов  $\text{Ca}^{2+}$ , обеспечиваемое  $\alpha 7$ -н-холинорецепторами, как было показано ранее, увеличивает десенситизацию холинергических реакций в гиппокампе интернейронов (Khiroug et al., 2003). С другой стороны, также было показано, что активация  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимого фосфорилирования ускоряет восстановление после десенситизации других нейрональных рецепторов, в частности  $\alpha 4\beta 2$  (Fenster et al., 1999).

Помимо  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой модуляции, вклад лиганд-управляемых кальциевых каналов в синаптическую передачу сигналов также может быть обусловлен молекулярными трансформациями в клеточной мембране и латеральной диффузией в синапсе. Было показано, что подобные трансформации в н-холинорецепторах имеют много общего с такими процессами, как модуляция фосфорилированием, зависимость от SNARE-комплекса. Такого рода регуляция работы н-холинорецепторов лежит в основе эффекта привыкания к никотину (Albuquerque et al., 2009).

Проницаемы для  $\text{Ca}^{2+}$  ионотропные пресинаптические рецепторы могут вступать в  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимое взаимодействие друг с другом. Функциональная перекрестная связь между пуринорецепторами P2X и никотиновыми Ах-рецепторами, в частности  $\alpha 3\beta 4$  и  $\alpha 4\beta 2$  подтипов, была показана в течение последних десятилетий (Nakazawa, 1994; Searl et al., 1998; Khakh et al., 2000). Это проявляется в перекрестном торможении при активации одного канального подтипа и изменении проводимости другого, либо в отсутствии аддитивности при активации обоих рецепторов. Взаимодействие между P2X- и н-холинорецепторами демонстрирует независимость от ионного потока через P2X-рецептор, что происходит, скорее всего, за счет конформационного связывания (Khakh et al., 2000). Деятельность рецепторов NMDA также может регулироваться  $\text{Ca}^{2+}$ -притоком через н-холинорецепторы (Chen et al., 2008).

Обильная экспрессия лиганд-управляемых  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов в нервной системе подразумевает их важность для синаптической функции. Из-за их способности обеспечивать эффективный приток ионов  $\text{Ca}^{2+}$ , физиологические роли NMDA, P2X и АХ рецепторов заключаются, прежде всего, в кратко- и долгосрочном регулировании синаптической передачи, в то время как их непосредственный вклад в формирование потенциала действия ограничен.

Многочисленные исследования сообщали о значительном  $\text{Ca}^{2+}$ -притоке через н-холинорецепторы в мышцах и нервных клетках еще до идентификации  $\alpha 7$  и  $\alpha 4\beta 2$  подтипов (Decker, Dani, 1990; Mulle et al., 1992). Широко признано, что н-холинорецептор-опосредованная  $\text{Ca}^{2+}$ -сигнализация участвует в холинергической

модуляции высвобождения медиатора, дифференцировке нейронов и синаптической пластичности (Alkondon, Albuquerque, 2004; Albuquerque et al., 2009).

Важная роль в холинергической модуляции принадлежит пресинаптическому  $\alpha 7$ -подтипу никотиновых холинорецепторов (Gray et al., 1996; Marchi et al., 2002; Alkondon, Albuquerque, 2004). В целом активация пресинаптических рецепторов  $\alpha 7$  облегчает высвобождение нейромедиатора через  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимый, тетродотоксин-нечувствительный SNARE-комплекс-зависимый механизм (Albuquerque et al., 2009).

«Классическая» физиологическая роль для постсинаптических никотиновых рецепторов – это деполяризации клеточной мембраны, активация натриевых каналов и запуск потенциала действия в мышечных клетках и периферических нейронах (Albuquerque et al., 2009). Однако, постсинаптические никотиновые рецепторы могут также иметь другую, не менее важную роль. Медленное модуляторное действие постсинаптических н-холинорецепторов может быть опосредовано несколькими  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимыми вторичными посредниками (Mulle et al., 1992; Fenster et al., 1999; Chang, Berg, 2001; Mansvelder, McGehee, 2002; Brunzell et al., 2003). Существует все больше доказательств (Fenster et al., 1999; Damaj, 2000; Brunzell et al., 2003; Chen et al., 2008) о причастности как PKC, PKA, CAMK II, так и внеклеточной регулируемой киназы (ERK) в этом модуляторном действии. Недавние исследования свидетельствуют о вкладе ERK и CREB в синаптическую пластичность (Chang, Berg, 2001; Mansvelder, McGehee, 2002; Brunzell et al., 2003; Walters, et al., 2005; Canal et al., 2011) и в когнитивную недостаточность при болезни Альцгеймера (Chen et al., 2008). На основании этих результатов, можно предположить, что относительно небольшое число никотиновых холинорецепторов при расположении и активации в непосредственной близости от ключевых регуляторных сайтов, может повлиять на прохождение нейронного сигнала, развитие и восприимчивость к экзогенным воздействиям.

Все вышесказанное указывает на то, что холинорецепторы играют важную роль в регуляции многих внутриклеточных процессов. Также не вызывает сомнений участие пресинаптических холинорецепторов в регуляции кальциевого метаболизма в клетке. Для дальнейшего изучения их роли в регуляции вызванного освобождения медиатора и выяснения возможной связи авторегуляторных цепочек с профилем входа кальция в НО необходимо проведение исследований, в которых будет оценен пресинаптический уровень кальция при модуляции работы холинорецепторов.

## **2.7 Измерение пресинаптического уровня кальция**

### **2.7.1 Методы оценки пресинаптического уровня кальция**

С момента открытия основополагающей роли кальция в процессе выброса квантов медиатора, как в синапсах ЦНС, так и в периферических синапсах встал вопрос о возможности регистрации пресинаптического уровня кальция в клетке и регистрации входящих кальциевых токов (Katz, Miledi, 1965 a; Borst, Sakmann, 1996; Гришин, 2014). Существуют различные методы регистрации кальциевых токов НО, применяемые в зависимости от решаемых в эксперименте задач. При выборе метода регистрации полезного кальциевого сигнала следует учитывать особенности исследуемого препарата. От его размеров и морфологических особенностей может зависеть выбор той или иной методики.

В качестве отдельной группы методов можно выделить электрофизиологические методики регистрации кальциевых токов, основанные на применении стеклянных микроэлектродов. Эти методики основаны на применении внутриклеточных или внеклеточных (экстраклеточных) микроэлектродов. Методики с применением внутриклеточных микроэлектродов используются на объектах, морфология которых и линейные размеры допускают прокол мембраны клетки и удержание внутри нее одного или двух микроэлектродов. К таким методам можно отнести метод двухэлектродной фиксации мембранного потенциала (Hodgkin, Huxley, 1939). Он позволяет получить прямые данные о потоке ионов кальция через мембрану. Один

внутриклеточный электрод используется для измерения разности потенциалов на мембране, через второй электрод подается ток, который необходимо для фиксации потенциала на заданном уровне. Величина приложенного тока регистрируется. При электрофизиологических измерениях  $Ca^{2+}$ -тока возникают две основные проблемы: фиксация потенциала мембраны клетки для регистрации токов и отделение потоков других ионов. Решение первой проблемы подразумевает работу на клетках, имеющих относительно простую форму, либо изолированных клетках (Костюк, 1986; Гришин, 2014). Разделение токов различных ионов реализуется путем применения блокаторов каналов. Например, применяется тетродоксин для блокады натриевых каналов. Поскольку полная блокада калиевых каналов экспериментально невозможна, была реализована методика полного устранения – вымывания ионов калия из исследуемых клеток (Kostyuk et al., 1975, 1977; Гришин, 2014). Данный метод хорошо работает на клетках беспозвоночных, например моллюсков (Frankenhaeuser, Hodgkin, 1957; Shapiro et al., 1980; Augustine et al., 1985). С помощью этой методики были получены данные о переходных кальциевых токах в гигантском нейроне аплизии (Geduldig, Gruener, 1970). Так же этот метод применим для измерения кальциевого тока в кардиомиоцитах. В работе Glenn et al. (1991) описаны временные и амплитудные параметры кальциевого тока, зарегистрированного в изолированных неонатальных кардиомиоцитах. При помощи фиксации мембранного потенциала возможна регистрация кальциевых токов при работе на срезах мозга млекопитающих (Borst, Sakmann, 1998). Хочется отметить, что, к сожалению, данный метод не применим на НО теплокровных и холоднокровных по причине их морфологических особенностей. НО позвоночных имеют малые размеры, что не позволяет удерживать в них внутриклеточные микроэлектроды.

В отдельное направление электрофизиологических исследований кальциевых токов можно выделить методы с применением экстраклеточных микроэлектродов. Первыми применили эту методику Катц и Миледи (Katz, Miledi, 1965 (a); Katz, Miledi, 1968) для регистрации токов нервного окончания и токов концевой пластинки на НО холоднокровных. При экстраклеточном



отведении потенциалов регистрация ведется от небольшого участка мембраны под кончиком регистрирующего электрода (диаметром 2–5 мкм). При таком методическом подходе удалось провести исследование пресинаптических кальциевых токов в НО млекопитающих (Molgó, Mallart, 1985; Hamilton, Smith, 1991), земноводных (Katz, Miledi, 1965 (a); Зефирова и др., 1985; Augustine et al., 1991) и ящериц (Lindgren, Moore, 1991). Как и в случае внутриклеточных отведений для отделения кальциевой составляющей электрофизиологического ответа НО применялась блокада калиевого тока.

Одной из модификаций данного метода является так называемая “macro-patch clamp” (макропэтч) методика, при которой стимуляция НО осуществляется не через нерв, а непосредственно через отводящий экстраклеточный электрод. Это позволяет заблокировать наряду с калиевыми токами также и натриевые токи. Поскольку не возникает распространяющегося потенциала действия, в НО можно демаскировать кальциевую составляющую ответа. При данных условиях отведения был опосредованно выявлен кальциевый ток при вычитании ответов, полученных при использовании блокаторов различных ионных каналов, из ответов НО в нативных условиях (Slutsky et al., 2002).

Выше описанные методики с применением экстраклеточных микроэлектродов позволяют вести работу по регистрации кальциевых токов на небольших НО теплокровных и холоднокровных животных. Но данная регистрация кальциевой составляющей сигнала является непрямой, в силу применения дополнительной блокады ионных токов и использования методов вычитания сигналов. Используемые экспериментальные условия при модифицированном электрогенезе НО далеки от реальных физиологических условий, при которых происходит работа нервно-мышечного аппарата.

Еще одним из методов, позволяющих регистрировать интегральную кальциевую составляющую потенциала действия, является метод периневрального отведения кальциевого тока НО. Этот метод так же относится к внеклеточным методам. Переходящее в НО нервное волокно покрыто так

называемой периневральной оболочкой. Она выполняет функцию изолятора нервного ствола от окружающей среды. Оболочка состоит из жировых клеток, которые окружены слоем плотной соединительной ткани, прикрепленной к сарколемме (Bourne, 1968; Гришин, 2014). Метод заключается во введении электрода в периневральное пространство над последним миелиновым сегментом НО. За счет хороших изолирующих свойств нервной оболочки контакт электрода получается достаточно плотным и токи утечки минимальны. Электрод фиксирует интегральный ток НО. Природа этого тока такова. В периневрии от одного перехвата Ранвье к другому и далее к претерминальному участку НО циркулирует ток (Gundersen et al., 1982), который обусловлен электрогенезом ближайших перехватов Ранвье и нервного окончания. Было показано, что если заблокировать калиевую составляющую этого тока при помощи добавления в перфузионный раствор блокаторов калиевых каналов (тетраэтиламмоний и 3,4-диаминопиридин), из зарегистрированного сигнала можно выделить кальциевую составляющую, обусловленную аддитивным, входящим во все НО кальциевым током (Гришин, 2014). При помощи этого метода регистрировались и изучались кальциевые токи в НО теплокровных и холоднокровных (Mallart, 1984, 1985).

Применение микропипеток, стенки внутренней полости (0,5-1,0 мкм) которых покрыты силгардом, для соединения с очень малым участком клеточной мембраны, положило начало методике «patch-clamp» регистрации (Hamill et al., 1981; Гришин, 2014). За счет отрицательного давления в полости пипетки, внутрь засасывается микроучасток мембраны, и тем самым обеспечивается плотный контакт. Большое сопротивление утечки в области контакта значительно уменьшает фоновый шум, что позволяет регистрировать токи от одиночных каналов (Hamill et al., 1981; Гришин, 2014). При помощи данного метода была зарегистрирована активность одиночных кальциевых каналов на нейронах виноградной улитки (Luh, 1981). Была получена информация о временных характеристиках работы этих каналов (Luh, Brown, 1984). Также с помощью данного метода зарегистрирована активность одиночных кальциевых каналов на участках мембраны нейронов *Limnea* (Костюк, 1986). Этот метод требует особого

подхода к выбору объекта исследования, так как мембраны клеток для получения плотного контакта с электродом не должны быть покрыты соединительной тканью. Поэтому в качестве объекта исследования используют либо диссоциированные клетки, либо клетки в культуре ткани. Были зарегистрированы кальциевые токи в кокультуре нервных и мышечных клеток *Xenopus* в ассоциированном состоянии (Yazejian et al., 1997). Этот метод не подходит для работы на нервно-мышечных соединениях выделенных *in vitro*, поскольку они покрыты соединительной тканью и на них невозможно осуществить плотный контакт электрода.

### **2.7.2. Кальциевые индикаторы. Измерение $Ca^{2+}$ при помощи флуоресцентных красителей**

Все описанные выше методики регистрации кальциевого тока в возбудимых клетках либо неприменимы на нервно-мышечных окончаниях, либо имеют существенные ограничения или требуют создания особых экспериментальных условий (применение блокаторов). Многих недостатков вышеописанных методик лишены альтернативные – оптические – методы регистрации кальциевого тока, основанные на использовании специальных кальций-чувствительных флуоресцентных красителей (Tsien, 1989; DiGregorio, Vergara, 1997; Sabatini, Regehr, 1998; Suzuki et al., 2000; Luo et al., 2011). Эти методы в последние годы нашли широкое применение в связи с развитием техники регистрации и измерения оптических сигналов и появлением надежных и стабильных источников флуоресцентного освещения (Sabatini, Regehr, 1998; Saggau, 2006).

Флуоресцентные индикаторы позволяют изучать поведение кальция и применяются для исследования изменения внутриклеточной концентрации свободного кальция. Все современные химические флуоресцентные кальциевые индикаторы основаны на ВАРТА (рН-нечувствительном гомологе EGTA) и имеют модульную структуру, состоящую из связывающего участка и флуоресцентного красителя (Grynkiwicz et al., 1985; Tsien, 1989). В зависимости

от целей эксперимента и используемого оборудования подбирают индикаторы с определенной комбинацией связывающих участков и красителей.

Механизм действия кальциевого флуоресцентного индикатора основан на связывании буфера с кальцием, что при освещении светом с длиной волны возбуждения вызывает изменение конформации красителя с испусканием кванта света. Причем длина волны излучения должна быть отлична от длины волны возбуждения (Adams, 2010). В присутствии ионов кальция флуоресцентный индикатор способен изменять интенсивность флуоресценции или свои спектральные характеристики.

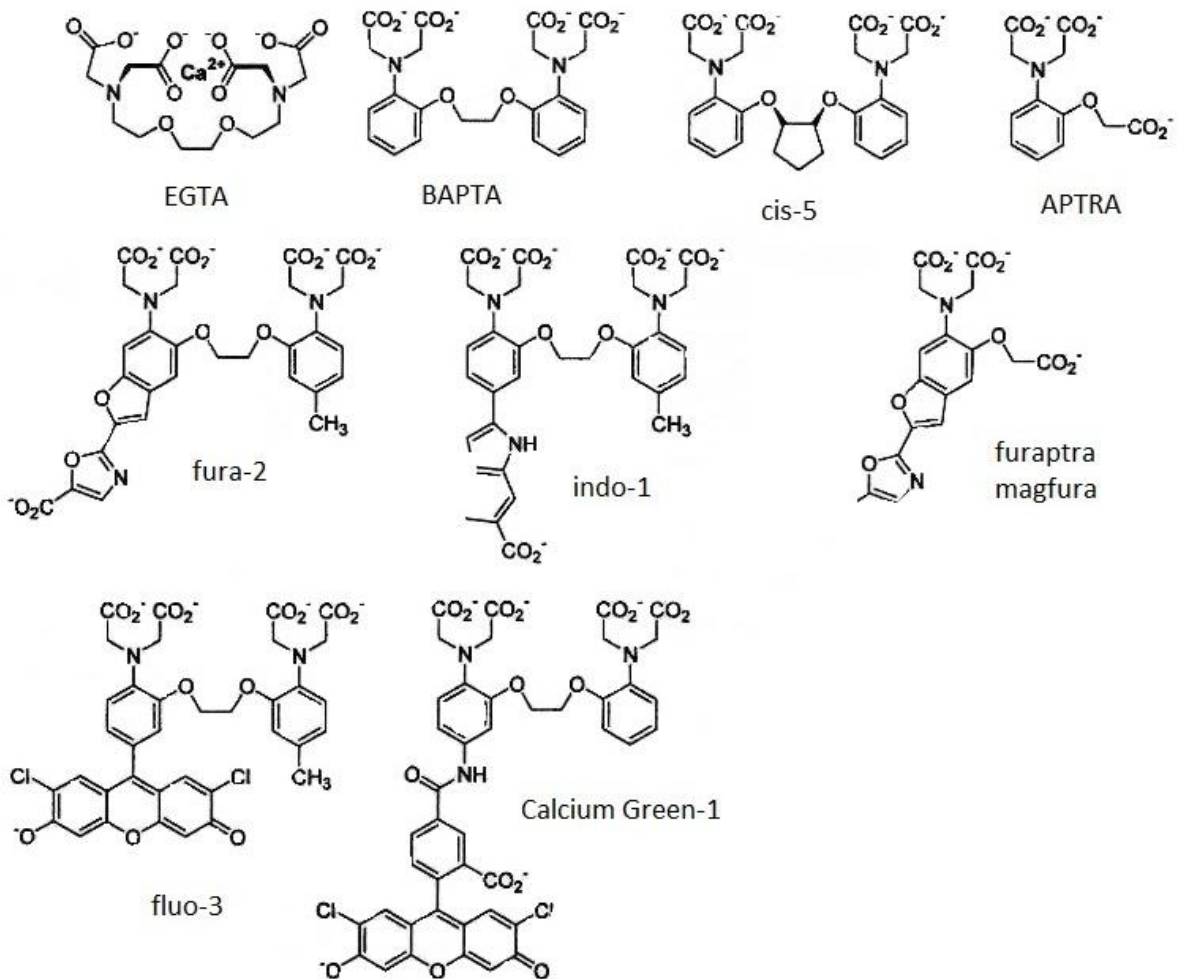


Рис. 1. Структура хелаторов  $\text{Ca}^{2+}$  и индикаторов (Николлс, 2003)

Химические индикаторы, основанные на ВАРТА (рис. 1) - рН-нечувствительном гомологе EGТА, связывают кальций намного быстрее, чем

красители с EGTA, благодаря тому, что ВАРТА является сильным кальциевым буфером и сохраняет свою высокую селективность к кальцию ( $K_d=100$  ммоль/л при pH 7.0) в присутствии конкурирующих миллимолярных концентраций магния и быстрого включения-выключения металлических связей (буферы ВАРТА связывают и освобождают ионы  $Ca^{2+}$  в 50-400 раз быстрее, чем EGTA) (Adams, 2010).

Связывающие участки основанных на ВАРТА хелаторов могут способствовать изменению аффинности, обеспечивающей чувствительность и определяющей сродство к кальцию в широком диапазоне концентраций (от наномолей до миллимолей).

Свойства флуоресцентных индикаторов формируют ряд факторов, которые следует учитывать при определении направления применения красителей (Indicators for  $Ca^{2+}$ , [www.invitrogen.com](http://www.invitrogen.com)).

Форма индикатора (соль, эфир, декстран-сопряжённая форма), в зависимости от выбранного метода загрузки красителя, влияет на внутриклеточное распределение и удержание индикатора. Соль и декстран-форму загружают, как правило, микроинъекциями. Напротив, проникающие в клетку ацетоксиметилловые эфиры (АМ) можно пассивно загружать в клетку, где они расщепляются внутриклеточной эстеразой.

Выбор длины волны возбуждения и излучения определяется в основном типом используемого оборудования, а также автофлуоресценцией образца и наличием других флуоресцентных или фотоактивируемых элементов в эксперименте.

Основной характеристикой  $Ca^{2+}$ -индикаторов является константа диссоциации ( $K_d$ ), которая отражает их сродство к  $Ca^{2+}$ . Выбор красителя с определенной  $K_d$  должен быть согласован с диапазоном концентраций  $Ca^{2+}$ , который предполагается исследовать. Индикаторы имеют линейный характер изменения интенсивности флуоресценции при регистрации изменения концентрации кальция приблизительно от  $0.1 K_d$  до  $10 K_d$ . Флуоресценция свободного индикатора очень слаба и увеличивается в 100 раз при связывании с

$\text{Ca}^{2+}$  (Adams, 2010). Кальциевые индикаторы с большим сродством (низкая  $K_d$ ) при определенных условиях могут некорректно отражать кальциевые сигналы клеток и являться буферами внутриклеточного  $\text{Ca}^{2+}$ . Для изучения изменения концентрации кальция во внутренних органеллах клеток, где его концентрация может достигать 1 мМ, применяются кальциевые индикаторы с низким сродством к кальцию (Mag-Indo-1, Mag-fura-5, Mag-fluo-4, Magnesium Green). Эти индикаторы малочувствительны к изменениям кальция в цитозоле при низкой активности клеток (100 нМ – 2 мкМ). Но при ритмической активности клеток, когда идет массиванный вход кальция через клеточные мембраны применение этих индикаторов более предпочтительно, поскольку позволяет отражать изменение концентрации кальция без искажений (Lin, Allana, 2005).

Точные значения константы  $K_d$  одного и того же индикатора в разных объектах могут отличаться. Это связано с тем, что  $K_d$  зависит от многих факторов, которые включают pH, температуру, ионную силу и вязкость раствора, связывание зондов с белками, присутствие  $\text{Mg}^{2+}$  и других ионов (Бережнов, 2007). Это затрудняет проведение калибровки кальциевых красителей, поскольку знание точных значений  $K_d$  индикатора в объекте исследования необходимо для конвертации значений интенсивности флуоресценции в значения абсолютных концентраций кальция.

Флуоресцентные зонды для измерения концентрации кальция разделяются на две основные группы, возбуждаемые ультрафиолетовым (менее 400 нм) и видимым светом (400-700нм). У первых есть ряд существенных недостатков. Ультрафиолетовый свет обладает сильным фототоксическим эффектом. Это проявляется в том, что в живых тканях под действием ультрафиолета изменяется кальциевый гомеостаз, что конечно вносит ошибки в результаты экспериментов. Есть и определенные методические трудности при использовании ультрафиолетовых красителей. Не все оптические системы для регистрации подходят для использования с данными типами красителей. Оптика должна быть скорректирована на ультрафиолетовый диапазон длин волн. Источники

ультрафиолетового света не всегда доступны в стандартных оптических системах. Ультрафиолетовые лазеры громоздкие, дорогие и сложны в использовании.

Несмотря на существенные недостатки, ультрафиолетовые индикаторы до сих пор широко используются. Эти красители позволяют проводить ратиометрические исследования. Принцип ратиометрических измерений заключается в следующем. При связывании с кальцием наблюдается сдвиг спектра возбуждения (Fura-2) или спектра испускания флуоресценции (Indo-1) красителя. Такой методический подход позволяет одновременно оценивать интенсивность флуоресценции кальций-связанной и кальций-свободной форм красителя при использовании пары красителей с различными длинами волн возбуждения или свечения. Отношение интенсивностей флуоресценции связанной и свободной формы красителя не зависит от концентрации красителя в клетке, выгоранием красителя и т.д. (Бережнов, 2007).

Для ратиометрических измерений концентрация ионов кальция соотносится с измеренной интенсивностью флуоресценции как  $[Ca^{2+}] = \beta \times K_d \times (R - R_{min}) / (R_{max} - R)$ , где  $R$  – экспериментально измеренное отношение интенсивностей флуоресценции при двух длинах волн;  $R_{min}$  – измеренное отношение интенсивностей флуоресценции при минимальной концентрации  $Ca^{2+}$ ;  $R_{max}$  – отношение интенсивностей флуоресценции при максимальной концентрации кальция;  $\beta$  – отношение интенсивностей флуоресценции кальций-свободной формы красителя при минимальной и максимальной концентрации кальция. Для красителя Fura-2 это отношение можно принять за 1;  $K_d$  – константа диссоциации  $Ca^{2+}$ -индикатора: либо табличные значения, либо полученные при калибровке в препарате;  $R_{max}$  и  $R_{min}$  получают во время калибровки *in vivo*. Для этого создают условия, при которых концентрация кальция в цитозоле достигает максимума. Например, с использованием ионофора. Для создания нулевого уровня внутриклеточного свободного кальция в точке калибровки флуоресцентных индикаторов используется, в том числе и ВАРТА или EGТА, а препарат помещают в безкальциевую среду.

### 2.7.3. Ca<sup>2+</sup>-флуоресцентные красители, возбуждаемые видимым светом

Применение Ca<sup>2+</sup>-индикаторов с целью измерения уровня концентрации ионов кальция предусматривает возбуждение флуоресцентного свечения видимым или УФ-светом. Индикаторы, возбуждимые видимым светом, имеют ряд преимуществ относительно УФ-возбудимых (Indicators for Ca<sup>2+</sup>, [www.invitrogen.com](http://www.invitrogen.com)):

- Эффективное возбуждение свечения малой энергией при использовании большинства лазерных приборов, включая конфокальный сканирующий микроскоп.
- Более сильное поглощение красителей, что позволяет использовать меньшую концентрацию красителя, снижая тем самым влияние фототоксичности на живые клетки.
- Большое изменение интенсивности Ca<sup>2+</sup>-зависимой флуоресценции при регистрации транзientа Ca<sup>2+</sup>.
- Излучение в той области спектра, где более низкий шум клеточной автофлуоресценции от исследуемого препарата и малое рассеянное фоновое свечение.
- Совместимость с фотоактивируемыми зондами и другими УФ-поглощающими реагентами, что удобно при проведении многопараметрических измерений. Длинноволновые Ca<sup>2+</sup>-индикаторы способны накапливать увеличение выбранного параметра для одновременного измерения прочих физиологических параметров, таких как pH и мембранный потенциал.

Получение точных значений концентрации кальция для одноволновых красителей возможно при их калибровке по формуле

$$[Ca^{2+}] = K_d \times (F - F_{min}) / (F_{max} - F),$$

где  $F$  – экспериментально измеренные интенсивности флуоресценции,

$F_{min}$  – измеренные интенсивности флуоресценции в отсутствии Ca<sup>2+</sup>,

$F_{max}$  – измеренные интенсивности флуоресценции в присутствии насыщающий краситель концентрации Ca<sup>2+</sup>,

$K_d$  – константа диссоциации Ca<sup>2+</sup>-индикатора (Бережнов, 2007).



В некоторых случаях нет необходимости измерения абсолютных значений концентраций кальция в цитозоле клеток. В этом случае с помощью флуоресцентных одноволновых кальциевых красителей можно измерять относительные изменение концентрации кальция в контроле и после, какого либо воздействия. Оценивают интенсивность флуоресценции до и после воздействия. В этом случае необходимо оценить диапазон возможных изменений концентрации кальция в процессе эксперимента и корректно выбрать подходящий флуоресцентный краситель в зависимости от экспериментальных условий (высокоаффинный или низкоаффинный).

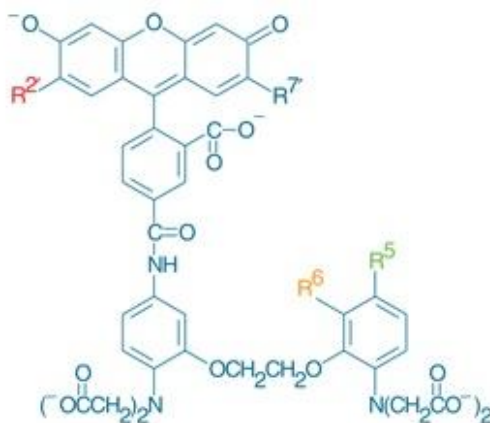
#### **2.7.4. Высокоаффинные кальциевые индикаторы**

Длинноволновый кальциевый индикатор Oregon Green 488 BAPTA 1-калиевая соль (рис. 2) является исключительно ярким красителем, и легко возбуждим светом видимого диапазона. Этот индикатор разработан в форме водорастворимой соли калия. Связываясь с кальцием, индикатор демонстрирует увеличение интенсивности флуоресцентного излучения при малом смещении длины волны. В настоящее время индикаторы Oregon Green используются при изучении динамики кальция в изолированных и неизолированных препаратах.

Поглощательная способность Oregon Green BAPTA-1 при 488нм составляет приблизительно 93% от своего пикового значения, в то время как поглощательная способность индикаторов fluo-3 и Calcium Green при 488нм составляет только 45% от их максимумов. Следовательно, Oregon Green 488 BAPTA более эффективно возбуждается на длине волны 488 нм, чем красители fluo-3 и Calcium Green (Indicators for  $\text{Ca}^{2+}$ , [www.invitrogen.com](http://www.invitrogen.com); Adams, 2010).

Спектральные свойства Oregon Green 488 BAPTA (рис. 3) позволяют использовать низкие концентрации красителя. Кроме того, квантовый выход комплексов Oregon Green 488 BAPTA и Calcium Green составляет приблизительно 0.7, по сравнению с 0.14 для fluo-3. Как и Calcium Green-1, Oregon Green 488 BAPTA-1 умеренно люминесцирует в растворе без  $\text{Ca}^{2+}$ , а при насыщении  $\text{Ca}^{2+}$  его флуоресценция повышается приблизительно в 14 раз. Из-за смещенного

максимума возбуждения в синюю область (492нм), индикатор эффективно возбуждается в 488нм аргоновым лазером. Oregon Green Варта проявляет лучшую фотостабильность и низкую рН-зависимость при физиологических значениях рН, чем производные флуоресцеина (Бережнов, 2007).



Индикатор	$K_d(\text{Ca}^{2+})$	$R^{2'}$	$R^{7'}$	$R^5$	$R^6$
Calcium Green-1	0.19 $\mu\text{M}$	Cl	Cl	H	H
Calcium Green-5N	14 $\mu\text{M}$	Cl	Cl	$\text{NO}_2$	H
Oregon Green 488 BAPTA-1	0.17 $\mu\text{M}$	F	F	H	H
Oregon Green 488 BAPTA-6F	3 $\mu\text{M}$	F	F	H	F
Oregon Green 488 BAPTA-5N	20 $\mu\text{M}$	F	F	$\text{NO}_2$	H

Рис. 2. Красители Calcium Green и Oregon Green 488 ВАРТА с различным сродством к  $\text{Ca}^{2+}$

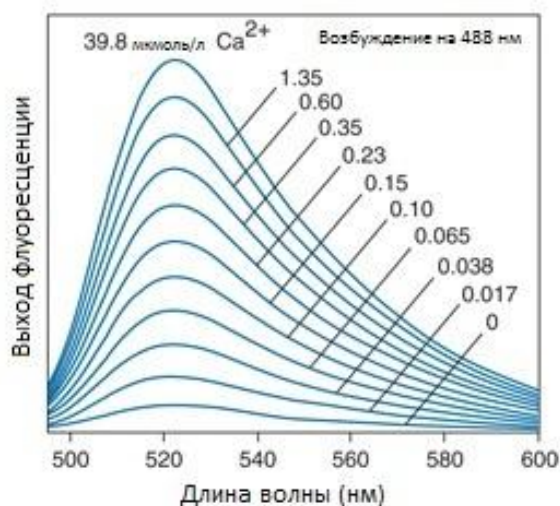


Рис. 3.  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимый спектр излучения флуоресценции красителя Oregon Green 488 ВАРТА-1

Высокоаффинные кальциевые красители хорошо подходят для изучения небольшого изменения входа кальция в возбудимые клетки за счет высокой чувствительности. Например, для изучения входа кальция в возбудимые клетки во время одиночных потенциалов действия (Lin, Allana, 2005; Самигуллин и др., 2010). Но за счет большого сродства к кальцию он не применим в случаях высокоамплитудных изменений концентрации кальция, как например при высокочастотной стимуляции возбудимых клеток, когда происходит накопление кальция в цитозоле. В таких случаях данный тип красителей насыщается и уже не может корректно отражать относительное изменение концентрации кальция.

### **2.7.5. Низкоаффинные кальциевые индикаторы**

Красители со сравнительно низким сродством к  $\text{Ca}^{2+}$  и константой диссоциации значительно выше 1 мкМ могут быть использованы для обнаружения внутриклеточного уровня  $\text{Ca}^{2+}$  в микромолярном диапазоне (рис. 4). Такой повышенный уровень  $\text{Ca}^{2+}$  порождается мобилизацией внутриклеточного резерва кальция и возбуждающей стимуляцией гладких мышц и нейронов. Кроме того, низкоаффинные индикаторы имеют более высокие показатели скорости диссоциации ионов, что делает их более подходящими для отслеживания кинетики быстрого изменения  $\text{Ca}^{2+}$ , чем индикаторы со значением  $K_d$  для  $\text{Ca}^{2+}$  <1 мкМ (Indicators for  $\text{Ca}^{2+}$ , [www.invitrogen.com](http://www.invitrogen.com); Adams, 2010).

Низкоаффинный  $\text{Ca}^{2+}$ -индикатор Magnesium Green имеет константу диссоциации с  $\text{Ca}^{2+}$  в отсутствие  $\text{Mg}^{2+}$   $K_d=6$  мкМ (22°C).

Эти низкоаффинные красители дают относительно малую флуоресценцию, за исключением клеток, в которых происходит высокоамплитудный выход или приток  $\text{Ca}^{2+}$  (например, из внутриклеточного  $\text{Ca}^{2+}$ -депо). Кроме того, высокая скорость диссоциации  $\text{Ca}^{2+}$  способствует наблюдению кинетики выхода быстрого  $\text{Ca}^{2+}$ .

Таким образом, выбор красителя предусматривает согласование его параметров (флуоресценции, аффинности и диссоциации с ионами кальция) с целями эксперимента.

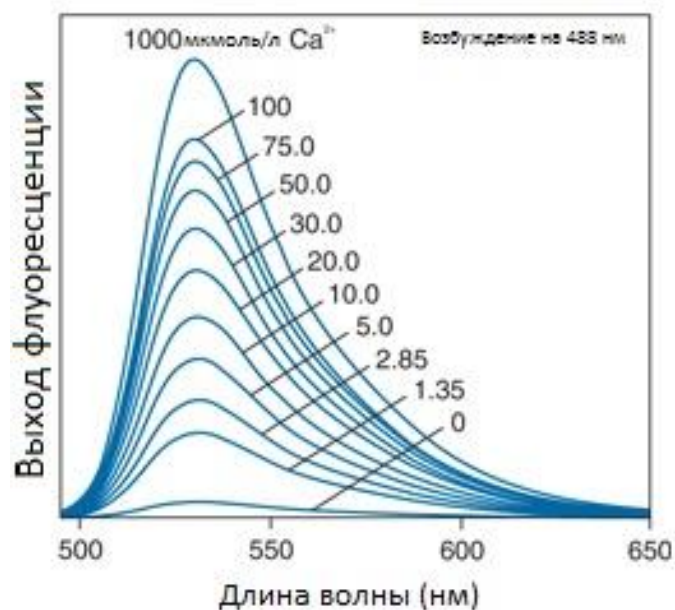


Рис. 4. Спектр излучения флуоресценции кальций-зависимого индикатора Calcium Green-5N

Обобщая данные литературы, касающиеся саморегуляции экзоцитоза и механизма действия холинергических соединений в нервно-мышечных синапсах позвоночных, можно отметить, что недостаточно изучены вопросы, касающиеся роли ионов кальция в реализации действия холиномиметиков.

Малые размеры пресинаптического окончания нервно-мышечного соединения лягушки не позволяют измерять кальциевый ток традиционными электрофизиологическими методами (DiGregorio, Vergara, 1997; Sabatini, Regehr, 1998; Suzuki et al., 2000; Luo et al., 2011), поэтому для анализа метаболизма кальция в нервном окончании применяют оптические методы регистрации, основанные на использовании описанных выше кальций-чувствительных флуоресцентных красителей, интенсивность свечения которых изменяется при взаимодействии со свободными ионами кальция (кальциевый транзиент). Таким образом, можно оценивать изменение уровня внутриклеточного кальция, изменяющегося за счет поступающих ионов в нервное окончание во время потенциала действия.

Для оценки динамических свойств кальциевого метаболизма в нервных окончаниях холоднокровных при воздействии на пресинаптические

холинорецепторы, в нашей лаборатории была отлажена методика регистрации кальциевого транзientа. Этот метод позволяет количественно оценивать изменения внутриклеточного содержания ионов кальция при вмешательстве в кальциевый метаболизм (Etter et al, 1994; Mintz et al., 1995; Zou et al., 1999; Самигуллин и др., 2010).

### 3. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

#### 3.1. Объект исследования

Эксперименты выполняли на изолированном нервно-мышечном препарате кожно-грудинной мышцы (*m. cutaneus pectoris*) озерной лягушки (*Rana ridibunda*) в осенне-зимний период. Животных анестезировали и декапетировали в соответствии с требованиями этических норм по работе с лабораторными животными (директива совета ЕС 86/609/ЕЕС от 24 ноября 1986 года).

Выделение препарата и процесс очистки мышцы от соединительной ткани производили в растворе Рингера следующего состава (мМ): NaCl – 113.0, KCl – 2.5, NaHCO<sub>3</sub> – 3.0, CaCl<sub>2</sub> – 1.8; pH раствора поддерживали на уровне 7.2-7.4.

#### 3.2. Загрузка препарата флуоресцентным кальциевым красителем

Выделенный препарат кожно-грудинной мышцы с фрагментом нерва помещали в чашку Петри, залитую смолой Silgard, для загрузки флуоресцентного кальциевого красителя. Загрузку кальциевого красителя Oregon Green 488 BAPTA-1 Hexapotassium Salt, cell impermeant, в концентрации 50 мМ осуществляли через культуру нерва за счет диффузии и антероградного (направленного от тела) аксонного транспорта (Peng, Zucker, 1993; Neher, 1995; Wu, Betz, 1996; Shahrezaei et al., 2006; Tsang et al., 2000).

pH раствора для загрузки стабилизировали на уровне 7.2 – 7.4 при помощи хепеса (Suzuki et al., 2000). При таком способе загрузки непроникающий сквозь клеточную мембрану краситель загружается только в цитозоль нервного окончания, что позволяет регистрировать кальциевые сигналы от пресинаптической нервной клетки.

Короткий отрезок нерва длиной 2-3 мм помещали в канюлю, изолируя его от физиологического раствора Рингера, содержащегося в чашке. На срез нерва помещали каплю краски объемом 0,1-0,3 мкл (рис. 5).

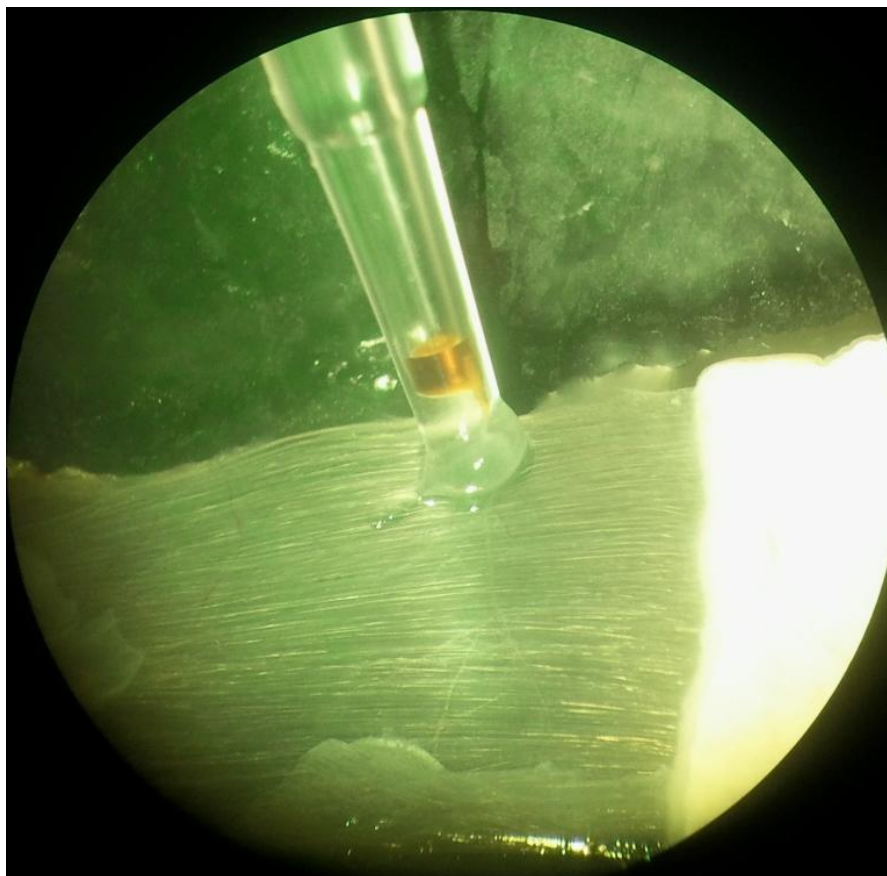


Рис. 5. Загрузка красителя через культую нерва

Далее производили инкубацию препарата в два этапа. На первом этапе выдерживали препарат в растворе Рингера с нормальным содержанием ионов кальция ( $\text{CaCl}_2$  1.8 мМ) в условиях комнатной температуры в течение 4-6 часов во влажной камере. На втором – 15-20 часов в холодильнике при температуре  $8 \pm 2$  °С. На этом этапе отмывался краситель, попадающий на препарат снаружи и продолжалась диффузия краски по нервному стволу.

Нервно-мышечный препарат лягушки хорошо переносит длительную инкубацию *in vitro*, что абсолютно необходимо для загрузки флуоресцентных красителей в двигательные нервные окончания через культую нерва.

В результате проведённой процедуры краситель загружался в ствол нерва и в терминальные ответвления проксимальной области (расположенные ближе к входу нерва, рис. 6). Было установлено, что примерная концентрация красителя, загруженного в нерв этим методом, составляет 40-150 мкМ. (Suzuki et al., 2000).

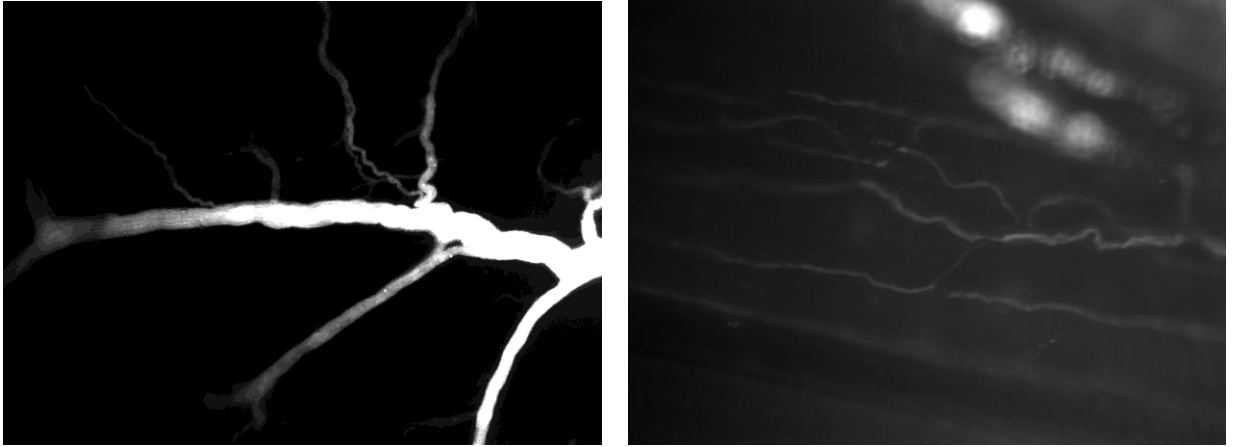


Рис. 6. Загруженный красителем нерв (слева, увеличение  $\times 10$ ) и загруженные терминалы (справа, увеличение  $\times 400$ )

После загрузки красителя и инкубации препарата изолированную мышцу с фрагментом нерва помещали в экспериментальную камеру объемом 5 мл, через которую со скоростью 5 мл/мин протекал поддерживающий жизнедеятельность мышцы физиологический раствор Рингера с пониженным содержанием ионов кальция (мМ): NaCl – 113.0, KCl – 2.5, NaHCO<sub>3</sub> – 3.0, MgCl<sub>2</sub> – 6.0, CaCl<sub>2</sub> – 0.9; pH раствора поддерживался на уровне 7.2-7.4.

Мышца в ванночке равномерно растягивалась и закреплялась по всему периметру стальными иголочками. Эксперименты проводили при температуре  $20.0 \pm 0.3$  °С, температуру контролировали при помощи датчика, погруженного в ванночку, и стабилизировали встроенными в камеру элементами Пельтье.

Эксперименты производили при пониженной, по сравнению с физиологическим уровнем, концентрации ионов кальция (0.9 мМ) и постоянном содержании ионов Mg<sup>2+</sup> (6.0 мМ). Пониженное содержание ионов кальция в среде и присутствие магния предотвращали мышечные сокращения в ответ на стимуляцию нерва.

Подачу растворов к биологическому препарату осуществляли через систему перфузии. Она состояла из сообщающихся сосудов и клапанов, благодаря которым в ходе эксперимента можно было регулировать скорость протекания раствора через ванночку. Смена растворов происходила посредством



переключения клапанов, открывающих сосуды, содержащие растворы с исследуемыми веществами.

Нерв раздражали с помощью всасывающего электрода прямоугольными импульсами длительностью 0.2 мс сверхпороговой амплитуды с частотой 0.5 имп/с.

### **3.3. Регистрация кальциевого транзientа**

Оценку входа кальция в НО осуществляли с помощью измерения интенсивности свечения кальций-чувствительного флуоресцентного красителя ( $\text{Ca}^{2+}$ -транзient), взаимодействующего с кальцием, входящим в НО после развития пресинаптического потенциала действия (Tsien, 1989).

Регистрацию флуоресцентного сигнала осуществляли с помощью фотометрической установки на базе микроскопа Olympus BX-51 с водноиммерсионным объективом х60 и высокочувствительным регистратором на основе фотодиода S1087 (Hamamatsu) (Sinha, Saggau, 1999; Самигуллин и др., 2010).

Настройку фотодиода на фокальную плоскость микроскопа и выбор области регистрации осуществляли при помощи оптической системы Viewfinder фирмы Till Photonics. Данная система позволяет выводить на экран монитора изображение объекта исследования и диафрагмы, при помощи которой осуществляется выбор зоны, с которой будет производиться регистрация сигнала (рис. 7).

Размер области регистрации настраивали, изменяя размер щелевой диафрагмы. Для регистрации выбирали удлиненную терминальную веточку. Затем устройство переводили в режим регистрации, и сигнал с выбранной области поступал на фотодиод.

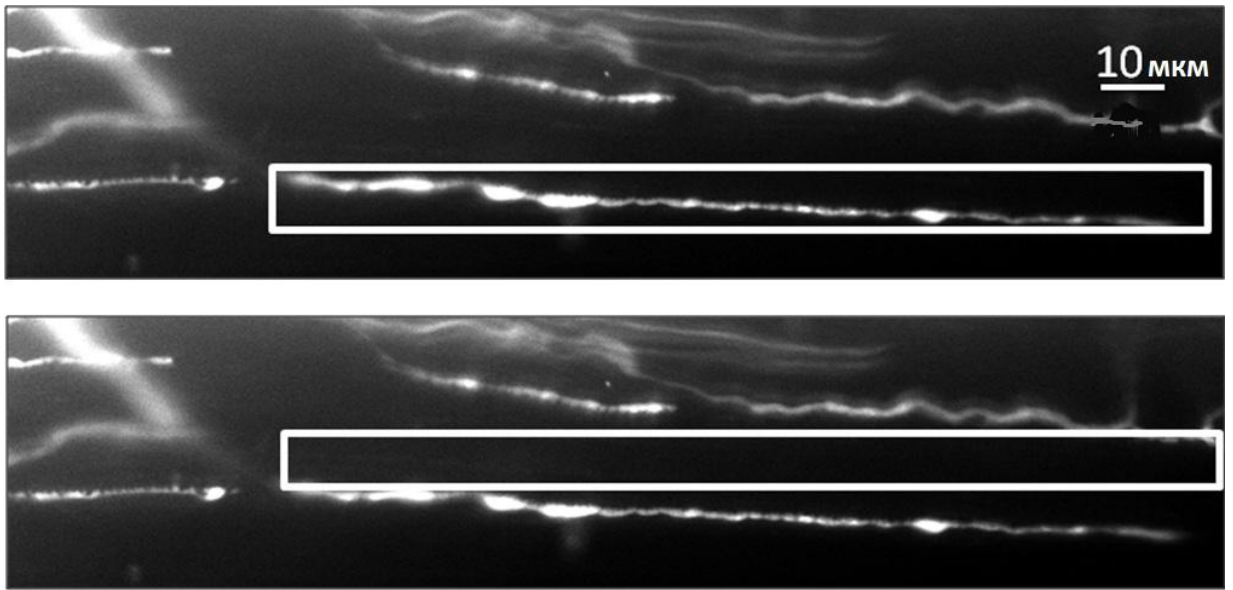


Рис. 7. Нервная терминаль, загруженная флуоресцентным красителем и зона регистрации кальциевого транзientа (белый прямоугольник наверху) и фонового свечения (внизу)

В качестве источника освещения использовали монохроматор Polyhrom V (Till Photonics, Munich, Germany), который был настроен на длину волны возбуждения красителя – 488 нм. При регистрации флуоресцентных сигналов в ответ на единичный стимул, для уменьшения явления выгорания красителя, препарат освещали в промежутки времени 400 мс только во время регистрации кальциевых сигналов с частотой повторения 0.5 Гц. Для выделения флуоресцентного сигнала использовали следующий набор фильтров: 505DCXT дихроическое зеркало, E520LP эмиссия (Chroma). Для уменьшения фонового свечения область освещения ограничивали при помощи ирисовой диафрагмы.

Для точного позиционирования фотодиода и проверки амплитудно-частотной характеристики регистрирующей аппаратуры производили калибровку экспериментальной установки. В качестве источника калибровочных сигналов использовали точечный источник света. Подавали сигнал, состоящий из последовательности прямоугольных импульсов, на модель точечного источника – светодиод, световой сигнал от которого через оптоволокно диаметром 30 мкм подавался в фокальную плоскость микроскопа. При помощи юстировочных

винтов фотодиод располагали так, чтобы при регистрации обеспечить максимальную амплитуду сигнала. Область регистрации выбирали исходя из условий эксперимента.

Раздражение нерва осуществляли прямоугольными импульсами с амплитудой, превышающей порог возбуждения нерва, длительностью 0.2 мс с интервалом 2 с при единичной стимуляции. Импульсы поступали со стимулятора, запуск которого производили с компьютера. Стимуляцию осуществляли при помощи «всасывающего» suction-электрода.

Сигнал от фотодиода оцифровывали с помощью АЦП Digidata 1450B (Axon Instruments, California, USA). Регистрацию кальциевых сигналов и синхронизацию освещения и стимуляции производили при помощи программы WinWcp Stanford University (Strathclyde University, Glasgow, UK). На рис. 8 представлено окно рабочей программы.

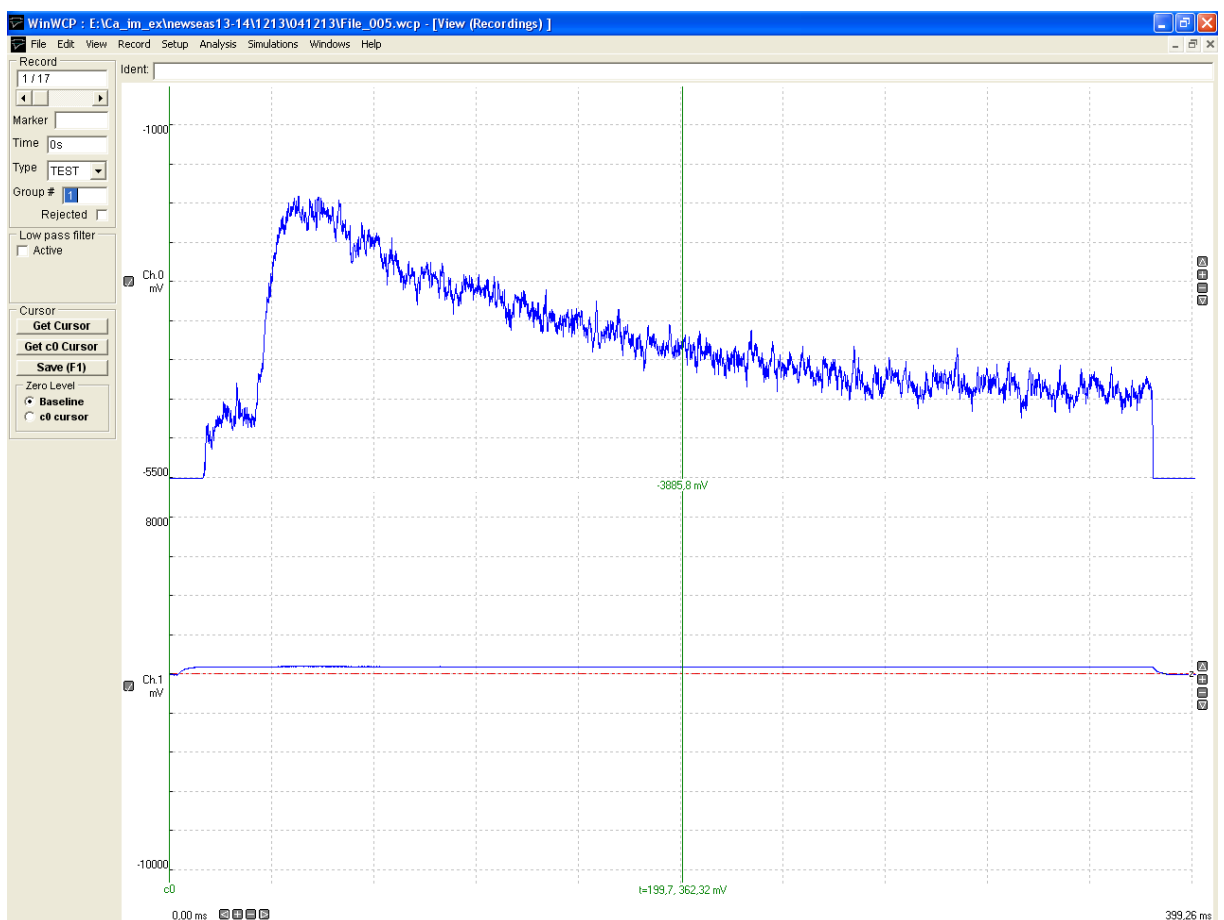


Рис. 8. Зарегистрированный сигнал в окне программы WinWcp Stanford University

### 3.4. Обработка флуоресцентных сигналов

С помощью фотодиода регистрировали изменение свечения флуоресцентного кальциевого красителя и измеряли также интенсивность свечения базового уровня -  $F_0$ . Уровень базового свечения рассчитывался относительно фонового сигнала, зарегистрированного вне зоны загруженной кальциевым красителем терминали (рис. 9).  $F_0$  регистрировали в каждом эксперименте. Сигнал, соответствующий изменению интенсивности свечения красителя во время стимуляции нерва нормировали на величину, соответствующую базовому свечению (рис. 9). Количественное представление изменения интенсивности флуоресцентного сигнала выражали через отношение относительного изменения флуоресценции к базовому свечению  $\Delta F/F_0 = (F - F_0)/F_0$  (Shahrezaei et al., 2006; Sinha, Saggau, 1999).

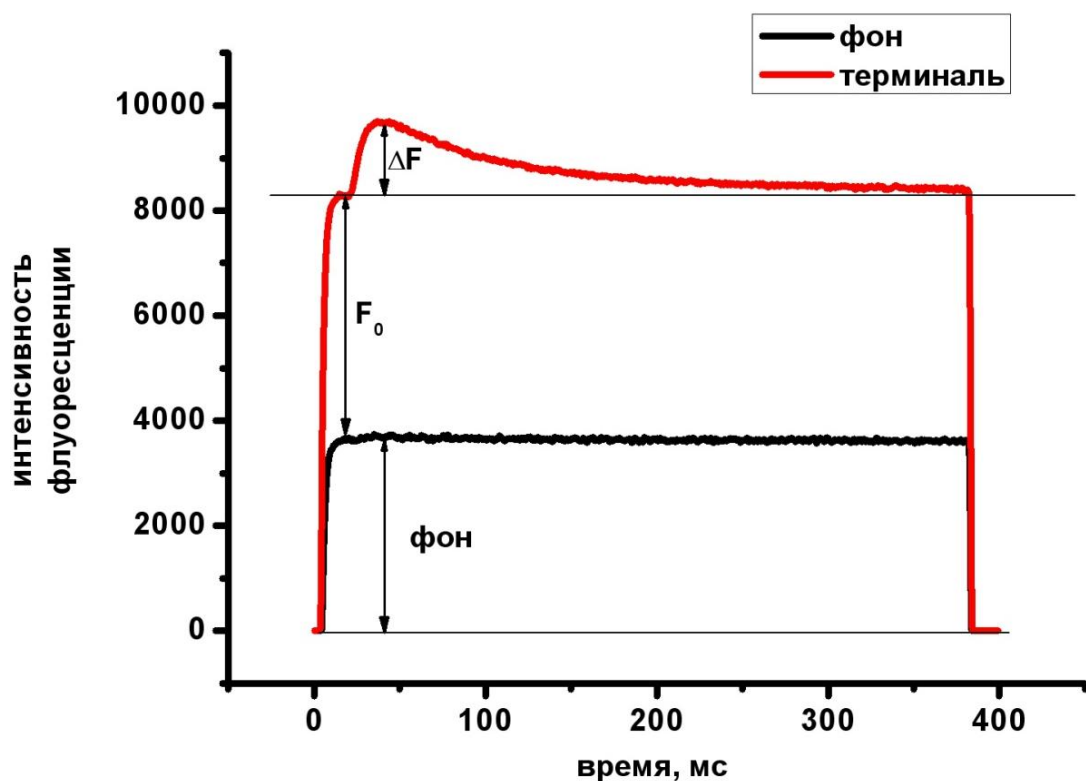


Рис. 9. Количественное представление изменения интенсивности флуоресцентного сигнала

Эта методика представления данных является общепринятой для данного метода измерений. После нормировки интенсивность свечения кальциевого красителя представляли в процентах по отношению к базовому свечению как  $\Delta F/F_0$  (рис. 10).

В каждом эксперименте проводили усреднение 60 флуоресцентных ответов в контроле и после действия исследуемых веществ.

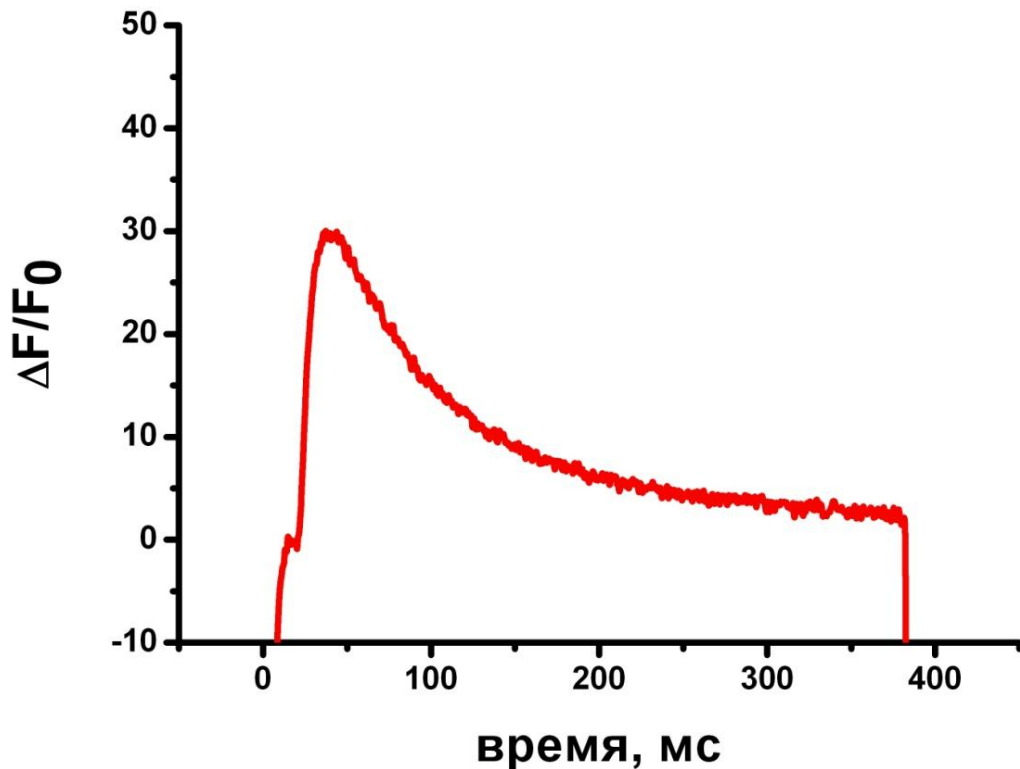


Рис. 10. Флуоресцентный сигнал после процедуры обработки

### 3.5. Выбор метода блокады мышечных сокращений

При выполнении экспериментов на нервно-мышечном препарате возникает вопрос о предотвращении мышечных сокращений. К традиционным способам предотвращения мышечных сокращений относятся применение блокаторов постсинаптических никотиновых рецепторов и рассечение нервно-мышечного препарата (Barstad, Lilleheil, 1968); также допустимо уменьшение концентрации ионов кальция в омывающем препарат растворе и добавление ионов магния (Katz, Miledi, 1965 а). В данной работе применение д-тубокурарина (блокатора никотиновых рецепторов, как нейрональных, так и мышечных) невозможно,

поскольку цели исследования предполагают применение холинергических агентов, которые являются активаторами никотиновых рецепторов, а курара также влияет на пресинаптические никотиновые и мускариновые холинорецепторы (Ferry, Kelly, 1988).

Второй возможный вариант устранения мышечной активности кожно-грудинного препарата лягушки в ответ на стимуляцию нерва – это проведение процедуры рассечения мышечных волокон (Barstad, Lilleheil, 1968). Для проверки возможности использования рассеченного препарата при изучении относительного содержания ионов кальция, был произведен эксперимент, в котором регистрировался временной контроль: записывался  $\text{Ca}^{2+}$ -транзиент в течение трех часов после рассечения мышечных волокон.

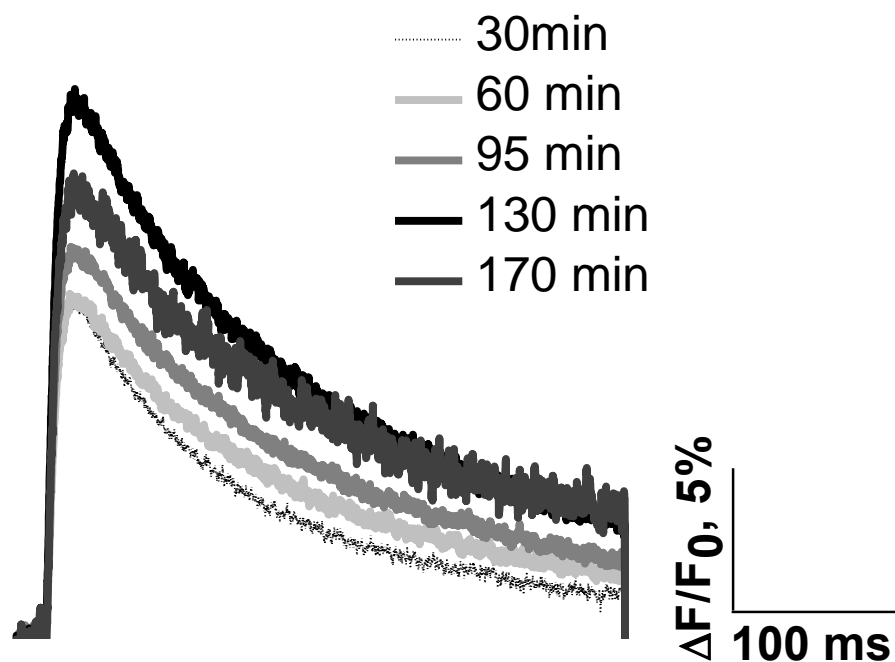


Рисунок 11. Изменение кальциевого транзientа, зарегистрированного на рассеченном препарате, в течении времени (~3 часа)

В ходе всего эксперимента на протяжении ~ 3 часов наблюдалось увеличение кальциевого транзientа (рис. 11). Возможно следующее объяснение данного явления: калий, выходящий из рассеченных мышечных волокон, вызывает деполяризацию нервного окончания. Возможно, в связи с пролонгацией

деполяризации во время ПД и наблюдается увеличение амплитуды кальциевого транзиента, поскольку больше ионов кальция входит внутрь нервных окончаний. Увеличение амплитуды  $\text{Ca}^{2+}$ -транзиента в рамках одного эксперимента сделало невозможным использование в данной работе рассеченного препарата.

Третий возможный путь предотвращения мышечных сокращений – снижение концентрации ионов кальция в растворе и добавление ионов магния – конкурента ионов кальция (Katz, Miledi, 1965 a).

Экспериментальные условия были подобраны таким образом, чтобы амплитуда  $\text{Ca}^{2+}$ -транзиента не уменьшалась значительным образом и отсутствовали мышечные сокращения:  $\text{Ca}^{2+}$  0.9 мМ и  $\text{Mg}^{2+}$  6 мМ. Пониженное содержание ионов кальция в среде и присутствие магния предотвращали мышечные сокращения в ответ на стимуляцию нерва. По умолчанию все приведенные в работе серии экспериментов по проверке гипотезы о возможном влиянии ацетилхолина, выделяющегося из везикул в синаптическую щель во время стимуляции двигательного нерва, на кальциевый транзиент в нервном окончании лягушки, проводили в данных условиях ( $\text{Ca}^{2+}$  0.9 мМ,  $\text{Mg}^{2+}$  6 мМ).

### **3.6. Электрофизиологические исследования**

Спонтанные и вызванные стимуляцией нерва внутриклеточные токи концевой пластинки (ТКП) регистрировали с использованием стандартной внутриклеточной микроэлектродной техники (двухэлектродная фиксация мембранного потенциала мышечного волокна на уровне -60 мВ) с использованием усилителя Axoclamp 900A и внутриклеточных электродов, заполненных раствором 3М KCl с сопротивлением 5-10 МОм. Средний квантовый состав ТКП оценивали методом деления площадей ТКП и мТКП.

Регистрацию внеклеточных токов нервного окончания и токов концевой пластинки осуществляли при помощи стандартной экстраклеточной методики. Микроэлектроды с диаметром кончика 2.5-3.5 мкм, заполненные раствором Рингера или NaCl (0.5 мМ), имели сопротивление 1.0-1.5 МОм. Микроэлектроды изготавливали из трубок диаметром 1.5-1.8 мм, содержащих микрокапилляры, на

полуавтоматической кузнице МЭ-2. Кончик микроэлектрода обламывали и оплавливали на специальной установке, изготовленной в нашей лаборатории. Микроэлектродам придавали «Г-образную» форму, поскольку в установке использовали микроскоп с большим увеличением (x600) и малым фокусным расстоянием. Отведенные сигналы после фильтрации до 10 кГц усиливали и подавали на вход 16 разрядного АЦП, квантуя с интервалом 10 мкс. Регистрацию и анализ сигналов осуществляли с помощью программы, созданной в нашей лаборатории.

### **3.7. Реагенты**

В экспериментах были использованы следующие вещества (все фирмы Sigma): карбахолин, ацетилхолин, прозерин, атропин, д-тубокурарин, мускарин, никотин, пирензепин, метоктрамин, мекамиламин, MLA, рианодин, конотоксин GVIA. Поскольку некоторые реактивы растворялись в ДМСО (диметилсульфоксид), конечная концентрация которого в растворе не превышала 0.1%, то предварительно были проведены эксперименты по анализу эффектов растворителя на исследуемые процессы. Было показано, что на протяжении более 2-х часов регистрации ДМСО не оказывало достоверно значимого влияния на амплитуду кальциевого транзientа.

### **3.8. Статистическая обработка результатов**

Для статистической обработки экспериментально полученных сигналов  $\text{Ca}^{2+}$ -транзientа использовали программу Origin версий 7.5 и 8.1. Использовали стандартные методы определения средних величин, стандартных ошибок, параметрический t-критерий Стьюдента для попарно связанных вариантов (Бронштейн, Семендяев, 1986; Гланц, 1999). Достоверность различия средних значений определяли по стандартным критериям при  $P < 0.05$ .



## 4. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ОБСУЖДЕНИЕ

### 4.1. Оценка влияния загрузки красителя на параметры квантовой секреции

В экспериментах по регистрации кальциевого транзientа использовали кальциевый краситель, который связывается с кальцием, что может потенциально воздействовать на физиологическую активность препарата. Для оценки воздействия загрузки красителя на параметры секреции квантов медиатора, которые характеризуют физиологическое состояние препарата, была проведена следующая серия экспериментов. Измеряли параметры секреции квантов медиатора до и после загрузки кальциевого красителя.

Сначала производили оценку квантового состава и частоты миниатюрных потенциалов концевой пластинки, зарегистрированных экстраклеточно, затем препарат подвергали процедуре загрузки красителя по методике, описанной выше, с последующей инкубацией. Затем вновь оценивали квантовый состав и частоту миниатюрных потенциалов концевой пластинки. Отведение сигналов осуществляли от одной и той же терминали до и после загрузки красителя. Зарегистрированные токи концевой пластинки приведены на рисунках 12 А и Б. Эксперименты показали, что загрузка красителя достоверно не изменяет ни количество выделившихся квантов, ни частоту миниатюрных (рис. 12). Квантовый состав до загрузки составил  $1,06 \pm 0,09\%$  ( $n=2$ ,  $P < 0,05$ ), после загрузки –  $0,99 \pm 0,07\%$  ( $n=2$ ,  $P < 0,05$ , рис. 12 В). Частота миниатюрных потенциалов концевой пластинки до загрузки –  $0,32 \pm 0,03\%$  имп/с ( $n=4$ ,  $P < 0,05$ ), после –  $0,32 \pm 0,15\%$  имп/с ( $n=4$ ,  $P < 0,05$ , рис. 12 Г).

Можно заключить, что процедура загрузки кальциевого красителя в терминаль не изменяет параметры вызванной и спонтанной секреции квантов медиатора, что согласуется с литературными данными (Wu, Betz, 1996).

Результаты этих экспериментов дают основания полагать, что наблюдаемые при помощи данной методики регистрации относительные изменения концентрации кальция в пресинаптическом нервном окончании не являются артефактом, связанным с неспецифическим действием самого красителя на

синаптические процессы, а отражают действие исследуемых физиологически активных веществ.

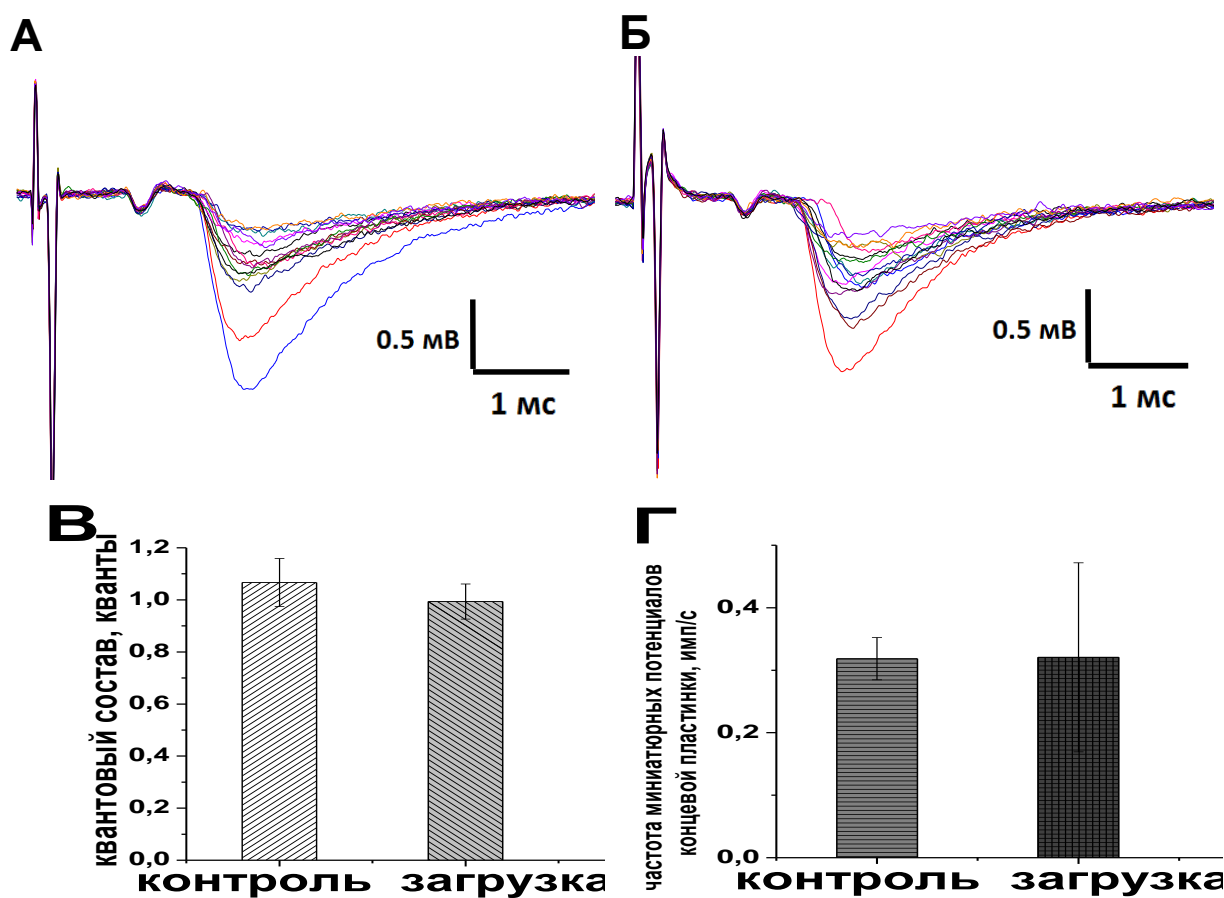


Рис. 12. Токи концевой пластинки, зарегистрированные: А – до загрузки красителя; Б – после загрузки красителя; В – квантовый состав до и после загрузки красителя; Г – частота миниатюрных потенциалов концевой пластинки до и после загрузки красителя

#### 4.2. Параметры зарегистрированного кальциевого транзиента

В результате проведенной загрузки кальциевого красителя в области терминальных ответвлений наблюдали флуоресцентное свечение. В ответ на раздражение двигательного нерва флуоресцентное свечение изменялось вследствие взаимодействия красителя с кальцием, поступившим в терминаль во время потенциала действия нервного окончания. На рисунке 13 изображен профиль флуоресцентного свечения, зарегистрированный измерительным комплексом.

Профиль  $\text{Ca}^{2+}$ -сигнала определяется притоком кальция и концентрацией эндогенных кальций-связывающих буферов (Ahmed, Connor, 1988; Burnashev, Rozov, 2005; Lin et al., 2005). После входа через потенциал-зависимые кальциевые каналы, 95% ионов  $\text{Ca}^{2+}$  связывается с участками связывания, расположенными на расстоянии 10-50 нм от места входа (Neher, 1995). Задний фронт сигнала определяется процессом диссоциации красителя с ионами кальция. Он определяется параметрами красителя, в частности, его сродством к кальцию.

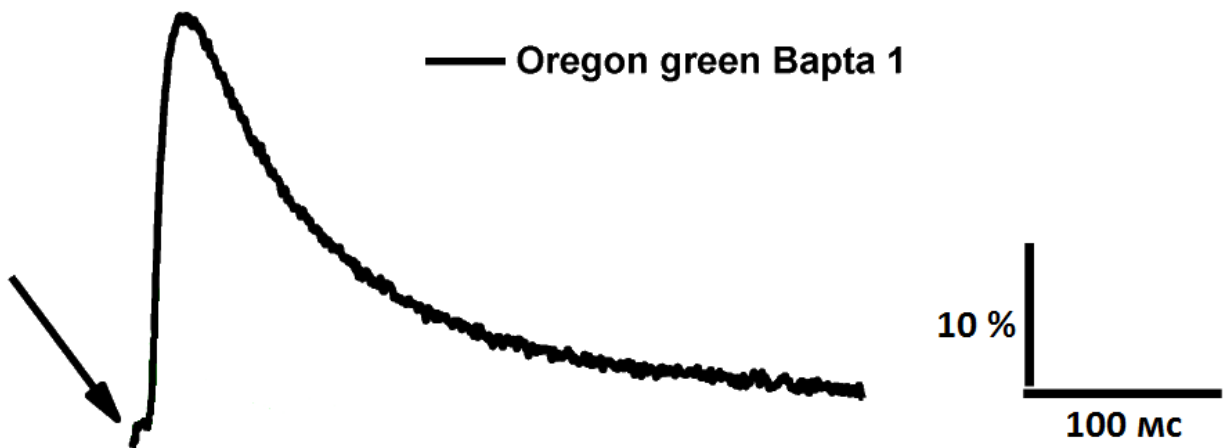


Рис.13 Временной ход кальциевого транзientа, полученный от нервного окончания после загрузки высокоаффинного красителя Oregon Green ВАРТА 1 в ответ на один электрической стимул. Усреднение производилось по 60 сигналам. Момент стимуляции НО указан стрелкой

	Пик $\Delta F/F_0$ (%)	Время нарастания 20%-80% (мс)	$\tau$ , (мс)
Oregon Green ВАРТА 1	$26 \pm 6$ (n=9)	$6.00 \pm 0.36$ (n=9)	$89.07 \pm 7.34$ (n=9)

Табл. 1. Амплитудно-временные параметры кальциевого сигнала.

Временные параметры сигналов флуоресценции зависят от взаимодействия красителя и кальция, а именно от скорости прямой и обратной реакций образования комплекса кальций-краситель (табл. 1).

Данные представлены как среднее  $\pm$  стандартная ошибка.  $n$  – количество нервно-мышечных соединений. Пик  $\Delta F/F_0$  является усреднением максимальных значений (амплитуд).

После открытия потенциал-зависимых кальциевых каналов кальций входит в терминаль, и, в процессе диффузии от места входа, он связывается с молекулами красителя, которые распределены по всему объему терминали. Фаза нарастания сигнала флуоресценции от комплекса краситель-кальций в области, зарегистрированной фотодиодом, зависит от скорости диффузии кальция. Пока кальций медленно диффундирует по всей терминали, начинается диссоциация комплексов кальций-краситель и длительность фазы роста флуоресцентного сигнала также зависит от скорости этого процесса. Фаза спада флуоресцентного сигнала зависит от скорости диссоциации комплекса красителя с кальцием.

В данной работе использовался высокоаффинный краситель Oregon Green ВАРТА 1. Поскольку данный краситель характеризуется высоким сродством к кальцию, а, следовательно, и длительным временем жизни комплекса кальций-краситель, то медленная скорость диссоциации высокоаффинного красителя приводит к более длительной восходящей фазе.

#### **4.3. Влияние изменения концентрации кальция в омывающем растворе на кальциевый транзист**

По данным литературы, кальциевый транзист отражает уровень концентрации внутриклеточного кальция, изменяющийся во время распространяющегося потенциала действия. В основном амплитуда кальциевого транзиста определяется входом кальция в НО (Mintz et al., 1995; Самигуллин и др., 2010).

Для того, чтобы убедиться, что изменение амплитуды кальциевого транзиста в наших условиях отражает изменением уровня ионов кальция в НО,

мы провели следующие эксперименты: в омывающем препарат растворе изменяли концентрацию кальция и регистрировали флуоресцентный сигнал в ответ на низкочастотную стимуляцию. После загрузки кальциевого красителя в области терминальных ответвлений наблюдали базовое флуоресцентное свечение. При однократном раздражении нерва в бескальциевом растворе изменения уровня флуоресценции не наблюдалось, при повышении концентрации кальция в среде до 1,8 ммоль/л. амплитуда флуоресцентных сигналов увеличивалась. Эти данные согласуются с полученными ранее (Самигуллин и др., 2010). На рисунке 14 представлены зарегистрированные кальциевые транзиенты при различной концентрации кальция в омывающем растворе. Видно, что при изменении концентрации кальция изменяется интенсивность свечения красителя. Таким образом, можно сказать, что кальциевый транзиент действительно отражает изменение входа кальция в пресинаптическое окончание.

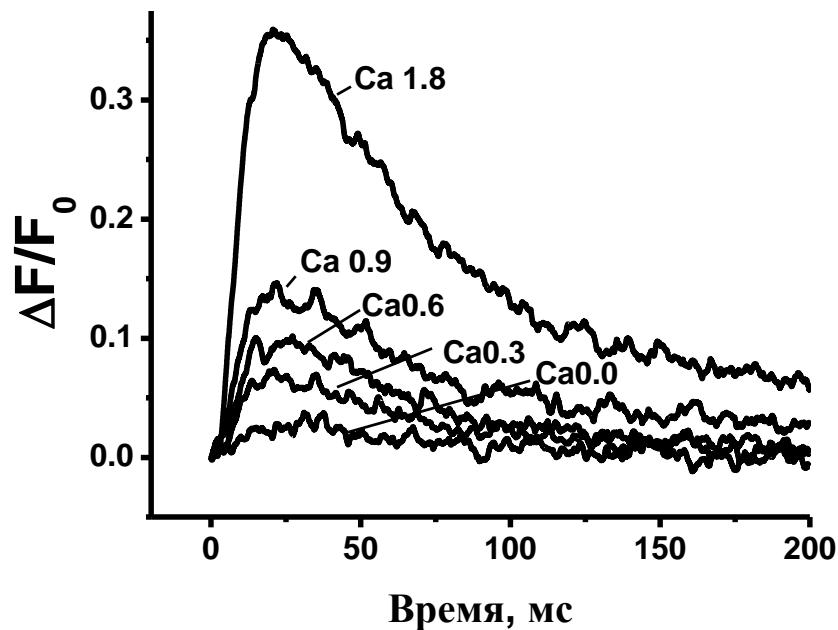


Рис. 14. Кальциевый ответ на низкочастотную стимуляцию при различном содержании ионов кальция в растворе

#### 4.4. Действие неселективного блокатора кальциевых каналов кадмия

Известно, что во время распространяющегося потенциала действия локальная деполяризация пресинаптической мембраны приводит к открытию потенциал-чувствительных кальциевых каналов (Matthews, 1996; Poage, Meriney, 2002; Shahrezai, 2006). Через них кальций входит в пресинаптический нейрон по градиенту концентраций. Для того, чтобы убедиться, что зарегистрированные кальциевые сигналы отражают вход кальция через потенциал-чувствительные кальциевые каналы, мы провели эксперименты, по регистрации кальциевого транзientа до и после добавления в раствор кадмия. Кадмий является неспецифическим блокатором кальциевых каналов. Он блокирует все известные потенциал-чувствительные кальциевые каналы. На рисунке 15 представлены сигналы в контроле и после добавления кадмия. Флуоресцентные сигналы полностью исчезли при добавлении в омывающий раствор кадмия в концентрации 50 мкМ. Эти данные согласуются с полученными ранее (Самигуллин и др., 2010).

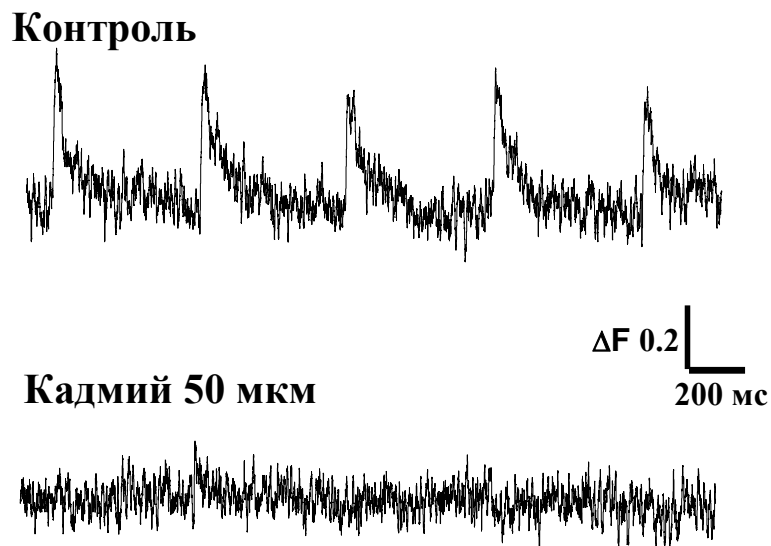


Рис. 15. Кальциевый транзient, зарегистрированный при низкочастотной стимуляции до (сверху) и после аппликации кадмия – неселективного блокатора кальциевых каналов (снизу)

На основании полученных данных можно сделать заключение, что зарегистрированные сигналы отражают динамику входа кальция в НО во время потенциала действия через потенциал-зависимые кальциевые каналы и эта методика может применяться для измерения величины кальциевого транзientа в НО в ответ на единичную стимуляцию двигательного нерва (Самигуллин и др., 2010).

#### **4.5. Влияние ацетилхолина и карбахолина на квантовый состав токов концевой пластинки<sup>1</sup>**

Ацетилхолин, освободившийся в синаптическую щель из холинергических НО после их деполяризации потенциалом действия, вызывает не только генерацию постсинаптического потенциала, но и модулирует интенсивность процесса выделения последующих порций медиатора, активируя пресинаптические ауторецепторы (Nikolsky et. al, 2004).

Эффекты ацетилхолина воспроизводятся в экспериментах при добавлении в омывающий изолированный нервно-мышечный препарат экзогенного ацетилхолина или его аналогов, включая негидролизуемый холиномиметик карбахолин (Dodge, Rahamimoff, 1967; Никольский, Гиниатуллин, 1979).

В выбранных экспериментальных условиях производили регистрацию мТКП и ТКП. Добавление карбахолина в концентрации 10 мкМ приводило к снижению амплитуды мТКП и ТКП на  $26\pm 5\%$  ( $n=4$ ,  $P<0.05$ ) и  $61\pm 8\%$  ( $n=4$ ,  $P<0.05$ ), соответственно.

В присутствии карбахолина квантовый состав уменьшался на  $46\pm 10\%$  ( $n=4$ ,  $P<0.05$ ) по сравнению с контролем (рис. 16 А, Б). Под влиянием ацетилхолина в концентрации 100 мкМ квантовый состав снижался на  $49\pm 7\%$  ( $n=18$ ,  $P<0.05$ , рис. 16 А).

Снижение квантового состава в присутствии холиномиметиков позволяет предположить наличие в нервно-мышечном синапсе холоднокровных механизма

---

<sup>1</sup> Данная серия экспериментов выполнена совместно с м.н.с. Фатиховым Н.Ф.

отрицательной обратной связи, участвующей в регуляции интенсивности квантовой секреции ацетилхолина.

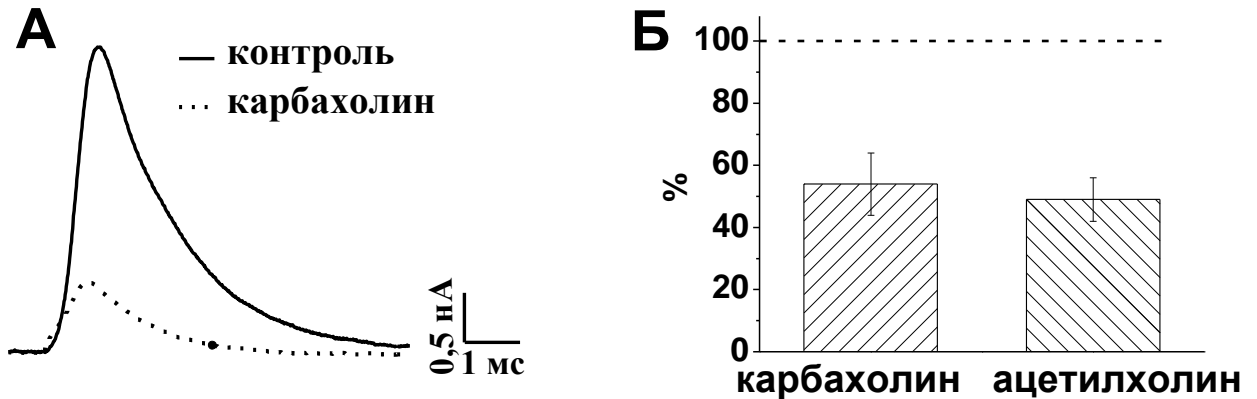


Рис. 16. А – Усредненные вызванные токи концевой пластинки в контроле и под действием карбахолина. Б – изменение квантового состава под действием карбахолина и ацетилхолина

#### 4.6. Влияние ацетилхолина и карбахолина на $\text{Ca}^{2+}$ -транзист

Поскольку процессы, ответственные как за величину квантового состава потенциалов концевой пластинки, так и за кинетику выделения квантов являются кальций-зависимыми (увеличение концентрации кальция в НО увеличивает квантовый состав и синхронизирует выделение квантов) (Katz, Miledi, 1965 с; Wessler, 1989; Samigullin et al., 2005), естественно предположить, что в основе угнетающего эффекта холиномиметиков лежит уменьшение входа кальция в двигательное НО. Для проверки справедливости этой гипотезы в следующей серии экспериментов сопоставляли изменение квантового состава токов концевой пластинки и входа кальция ( $\text{Ca}^{2+}$  транзист) в НО в ответ на низкочастотную стимуляцию.

Добавление в перфузионный раствор карбахолина в концентрации 10 мкМ приводило к достоверному снижению амплитуды  $\text{Ca}^{2+}$ -транзиста на  $11 \pm 1\%$  ( $n=5$ ,  $P < 0.05$ ) по сравнению с контролем (рис. 17 А, Б). Под влиянием ацетилхолина наблюдалось достоверное снижение амплитуды кальциевого транзиста на  $13 \pm 4\%$  ( $n=6$ ,  $P < 0.05$ , рис. 17 Б).



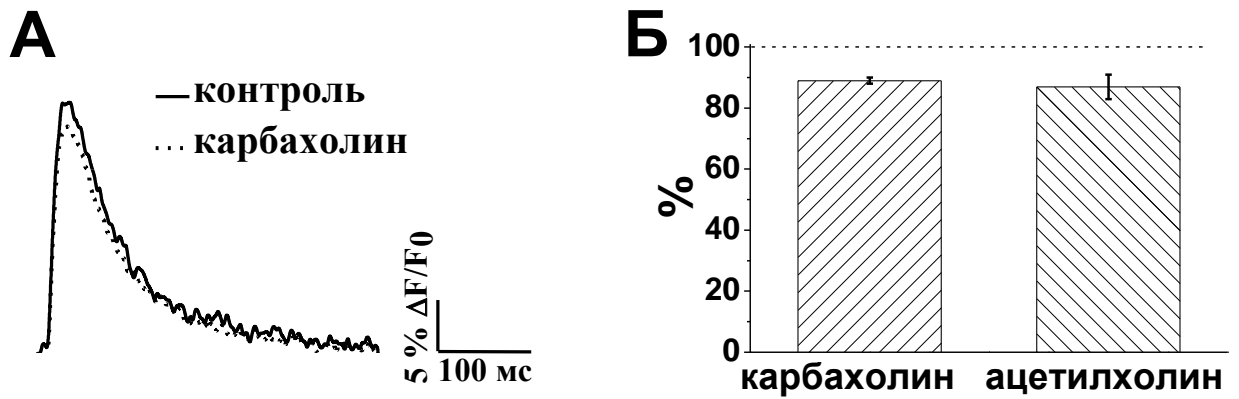


Рис. 17. А – Изменение интенсивности флуоресцентного сигнала  $\Delta F/F_0$  в контроле и под действием карбахолина. Б – Изменение амплитуды  $\text{Ca}^{2+}$ -транзientа под действием карбахолина и ацетилхолина по отношению к контролю в % (контроль принят за 100 %)

Поскольку ацетилхолин и карбахолин уменьшали  $\text{Ca}^{2+}$ -транзient и квантовый состав токов концевой пластинки, можно сделать вывод о наличии холинергической модуляции процесса выделения медиатора посредством изменения входа  $\text{Ca}^{2+}$  в моторное НО (Хазиев, 2012).

Обращает на себя внимание тот факт, что относительно небольшое изменение входа кальция в терминаль вызывает существенное угнетение вызванного освобождения медиатора (Рис. 16, 17). Это можно объяснить, принимая во внимание тот факт, что зависимость величины квантового состава от содержания  $\text{Ca}^{2+}$  является экспоненциальной (Dodge, Rahamimoff, 1967).

Поскольку эффекты карбахолина и экзогенного ацетилхолина схожи, в дальнейших экспериментах использовали карбахолин, так как он не подвергается гидролизу, вследствие чего его концентрация остается постоянной в ходе всего эксперимента.

#### 4.7. Действие агонистов холинорецепторов никотина и мускарина на $\text{Ca}^{2+}$ -транзистент и проверка специфичности этого действия

Поскольку ранее было показано, что действие холинергических агентов может быть опосредовано пресинаптическими рецепторами никотинового и мускаринового типов (Dodge, Rahamimoff, 1967; Никольский, Гиниатуллин, 1979; Wessler, 1989; Никольский и др., 2000; Nikolsky et al., 2004), то далее в исследовании проверялось, как связаны эффекты уменьшения кальциевого транзистента под действием карбахолина с активацией этих двух типов рецепторов. Для выяснения типа рецепторов, опосредующих угнетающее пресинаптическое действие карбахолина, исследовали влияние специфических никотиновых и мускариновых агонистов на величину  $\text{Ca}^{2+}$ -транзистента.

В первой серии экспериментов изучали действие специфического агониста никотиновых рецепторов никотина на амплитуду кальциевого транзистента. Никотин – активатор всех типов никотиновых рецепторов (Wonnacott, 1997) в концентрации 10 мкМ достоверно снижал амплитуду  $\text{Ca}^{2+}$ -транзистента на  $15 \pm 3\%$  ( $n=6$ ,  $P<0.05$ , рис. 18) по сравнению с контролем.

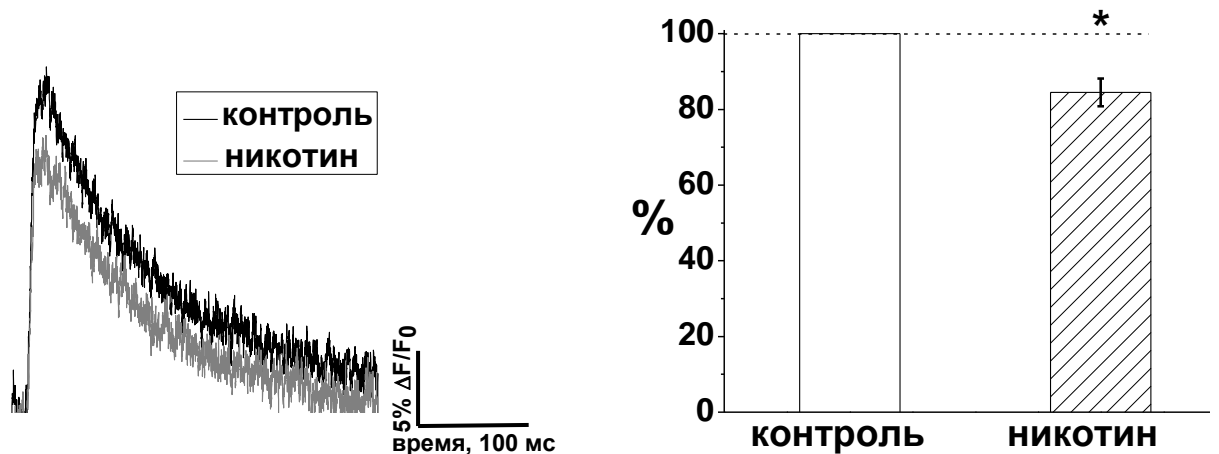


Рис. 18. Действие специфического агониста никотиновых рецепторов никотина на амплитуду  $\text{Ca}^{2+}$ -транзистента

Во второй серии экспериментов изучали действие специфического агониста мускариновых рецепторов – мускарина на величину  $\text{Ca}^{2+}$ -транзистента. После

добавления в перфузионный раствор мускарина (10 мкМ) наблюдали снижение амплитуды  $\text{Ca}^{2+}$ -транзиента на  $8\pm 2\%$  ( $n=5$ ,  $P<0.05$ , рис. 19).

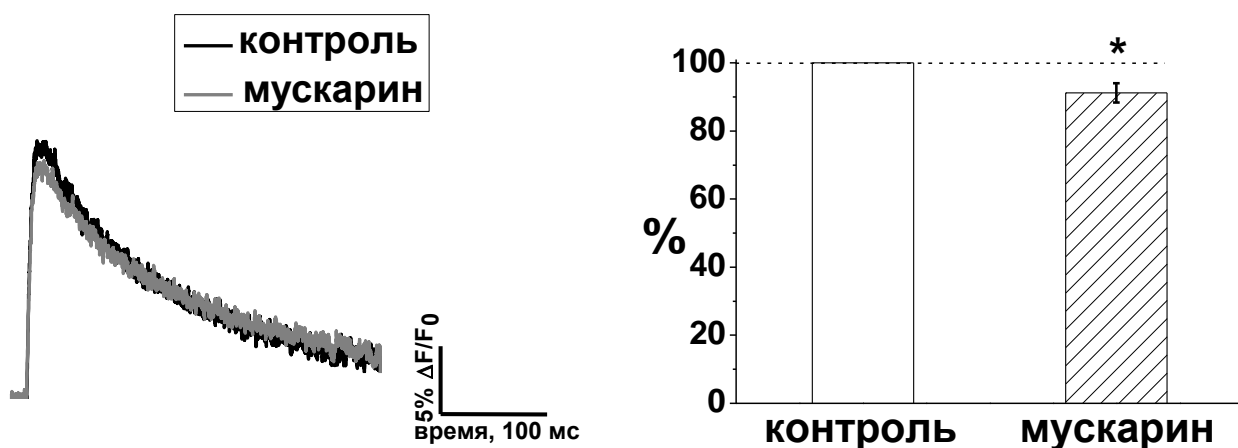


Рис. 19. Действие специфического агониста мускариновых рецепторов мускарина на амплитуду  $\text{Ca}^{2+}$ -транзиента

Для подтверждения справедливости предположения о том, что эффекты никотина и мускарина связаны с активацией соответствующих рецепторов (никотиновых и мускариновых), были проведены эксперименты с использованием блокатора всех подтипов никотиновых рецепторов д-тубокурарина и блокатора всех мускариновых рецепторов атропина. Эксперименты производили по следующей схеме: предварительно в омывающий раствор добавляли блокатор, а по прошествии 15-20 минут вводили соответствующий агонист.

Эксперименты показали, что предварительная блокада никотиновых рецепторов д-тубокурарином (10 мкМ) вызвала достоверное уменьшение действия никотина на амплитуду  $\text{Ca}^{2+}$ -транзиента.

Обработка нервно-мышечного препарата неспецифическим блокатором мускариновых рецепторов атропином (1 мкМ) полностью устраняла эффект мускарина на  $\text{Ca}^{2+}$ -транзист. Таким образом, описанное выше действие никотина и мускарина, равно как и карбахолина, угнетающее вызванную секрецию квантов медиатора, обусловлено снижением входа ионов  $\text{Ca}^{2+}$  в НО вследствие активации

никотиновых и мускариновых пресинаптических холинорецепторов. На рисунке 20 приведены для сравнения эффекты специфических агонистов и их же эффекты, но после обработки препарата блокатором соответствующего типа.

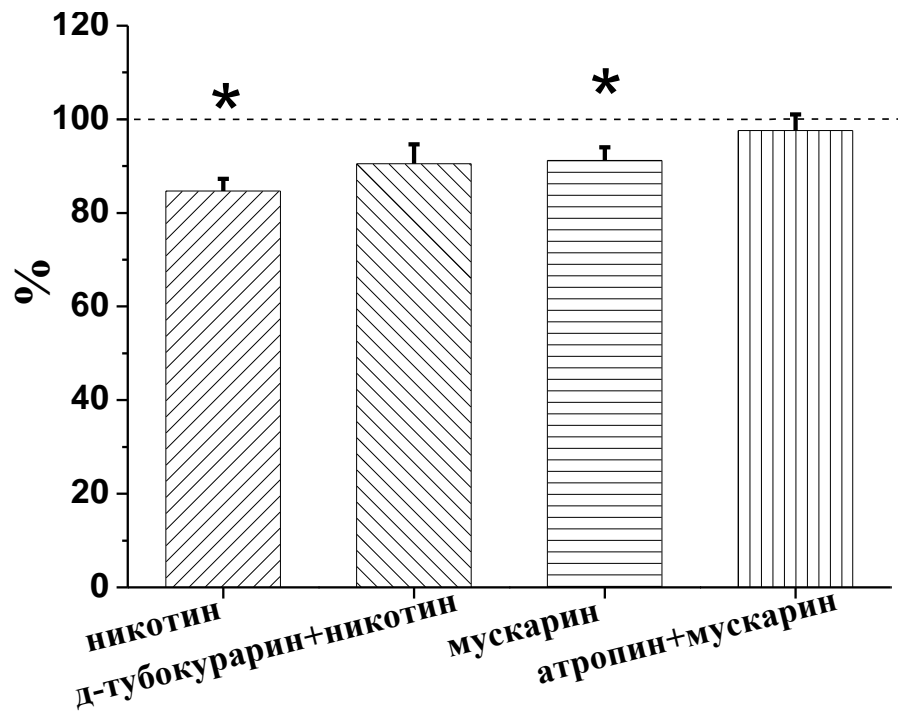


Рис. 20. Изменение амплитуды  $\text{Ca}^{2+}$ -транзientа под действием специфических агонистов никотиновых и мускариновых рецепторов до и после обработки препарата блокаторами холинорецепторов.

#### 4.8. Действие холиномиметика карбахолина на $\text{Ca}^{2+}$ -транзient в присутствии антагонистов никотиновых и мускариновых холинорецепторов

Приведенные выше данные дают основания думать, что эффекты карбахолина и ацетилхолина могут быть связаны с одновременной активацией как никотиновых, так и мускариновых пресинаптических ацетилхолиновых рецепторов. Для проверки этой гипотезы изучали действие карбахолина на фоне блокаторов никотиновых и мускариновых рецепторов.

Были проведены две серии экспериментов, в ходе которых блокировали один из типов рецепторов, после чего в омывающий раствор вводили карбахолин. Карбахолин в присутствии д-тубокурарина снижал  $\text{Ca}^{2+}$ -транзient на  $18 \pm 9\%$  ( $n=4$ ,  $P < 0.05$ , рис. 21 А), а в присутствии атропина – на  $9 \pm 5\%$  ( $n=6$ ,  $P < 0.05$ , рис. 21 Б).

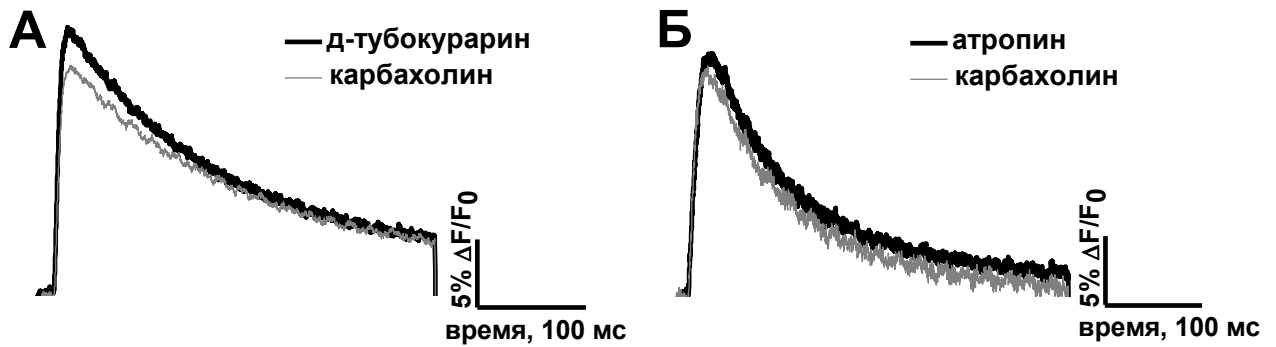


Рис. 21. Кальциевые транзисты, зарегистрированные при введении в раствор карбахолина, после предварительной обработки препарата блокатором атропином (А) и д-тубокурарином (Б)

В следующей серии экспериментов препарат выдерживали в растворе, содержащем блокаторы двух типов рецепторов, а затем в раствор вводили холиномиметик – карбахолин. Предварительная инкубация нервно-мышечного препарата в растворе, содержащем как д-тубокурарин, так и атропин, полностью устраняла эффекты карбахолина на  $Ca^{2+}$ -транзист (рис. 22, 23). Полученные данные свидетельствуют о том, что эффекты холинергических агентов связаны с активацией как никотиновых, так и мускариновых рецепторов.

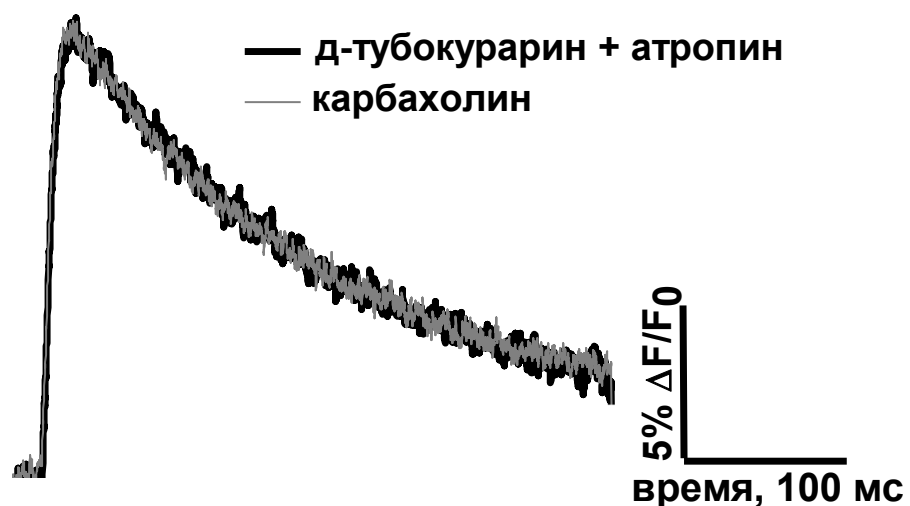


Рис. 22. Изменение интенсивности флуоресцентного сигнала  $\Delta F/F_0$  под действием карбахолина на фоне предварительной обработки препарата блокаторами – атропином и д-тубокурарином

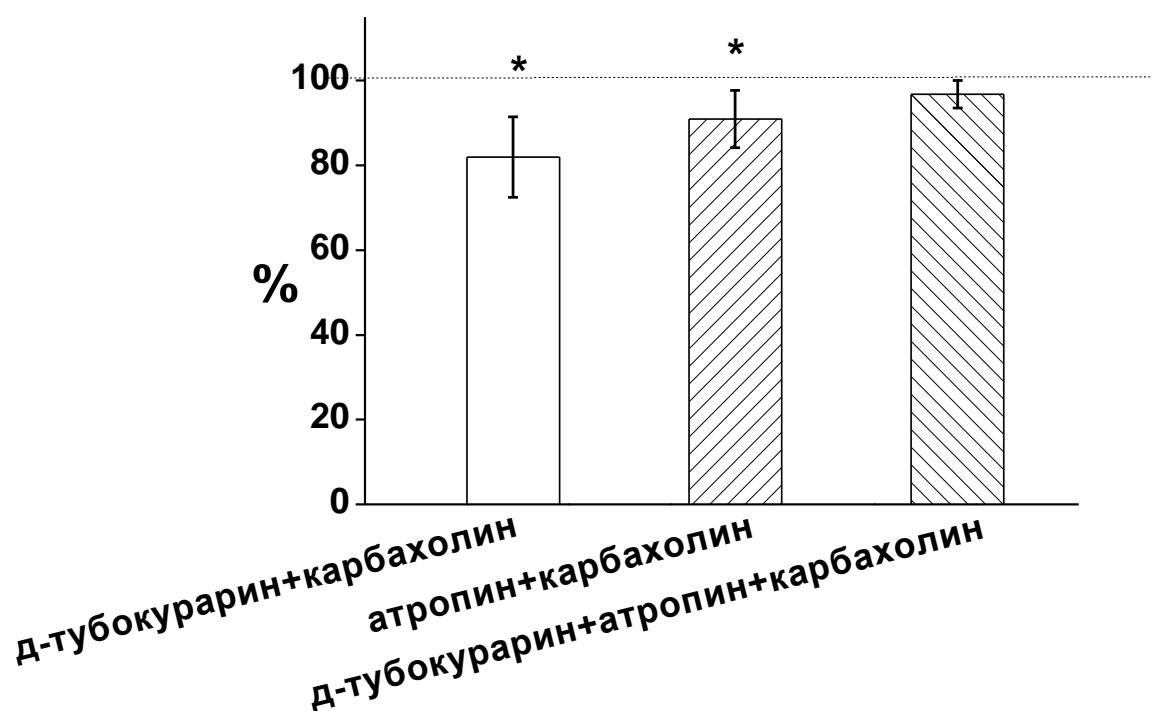


Рис. 23. Изменение амплитуды Ca<sup>2+</sup>-транзientа под действием карбахолина после обработки препарата блокаторами холинорецепторов

#### **4.9. Активация мускариновых рецепторов при блокаде никотиновых и активация никотиновых рецепторов при блокаде мускариновых**

В предыдущих сериях экспериментов было показано, что угнетающее действие холиномиметиков на кальциевый транзient опосредуется как никотиновыми, так и мускариновыми холинорецепторами. По данным литературы, активатор одного типа рецепторов может также воздействовать и на рецепторы другого типа. В следующих двух сериях экспериментов проверяли предположение о взаимосвязи путей регуляции Ca<sup>2+</sup>-транзientа через никотиновые и мускариновые рецепторы. В экспериментах предварительно блокировали один тип рецепторов и активировали другой. Эксперименты показали, что при блокаде никотиновых рецепторов д-тубокурарином активация мускариновых приводит приблизительно к тому же эффекту, что и в отсутствие д-тубокурарина – снижает Ca<sup>2+</sup>-транзient на 8±2% (n=7, P<0.05, рис. 24).

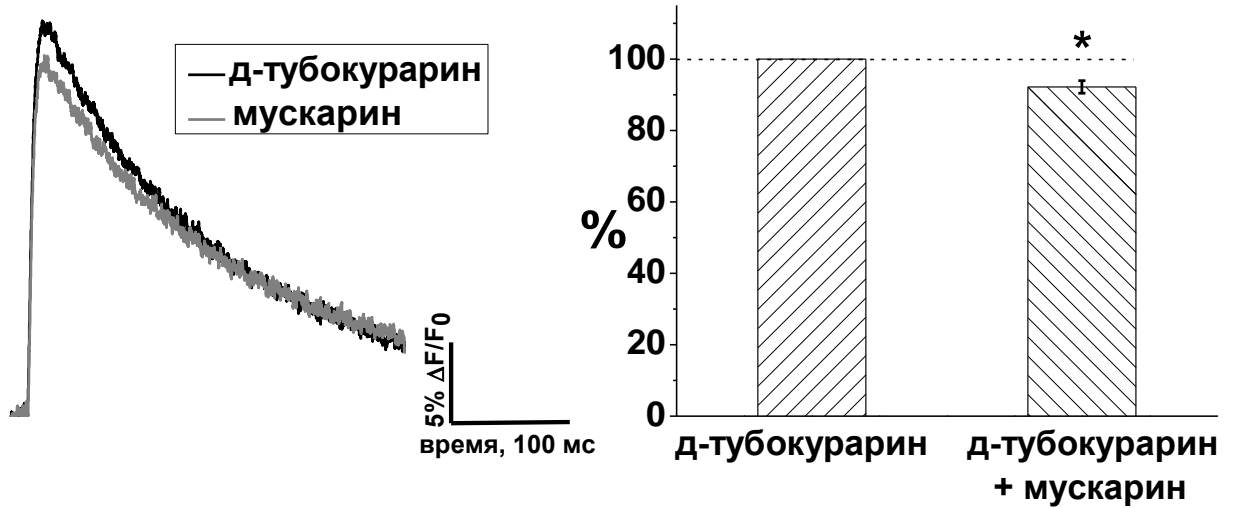


Рис. 24. Действие агониста мускарина на фоне заблокированных д-тубокурарином никотиновых рецепторов

Предварительная блокада мускариновых рецепторов атропином также не приводила к сколько-нибудь значимому изменению в действии никотина на  $\text{Ca}^{2+}$ -транзистент, который снижался на  $8 \pm 3\%$  ( $n=7$ ,  $P < 0.05$ , рис. 25).

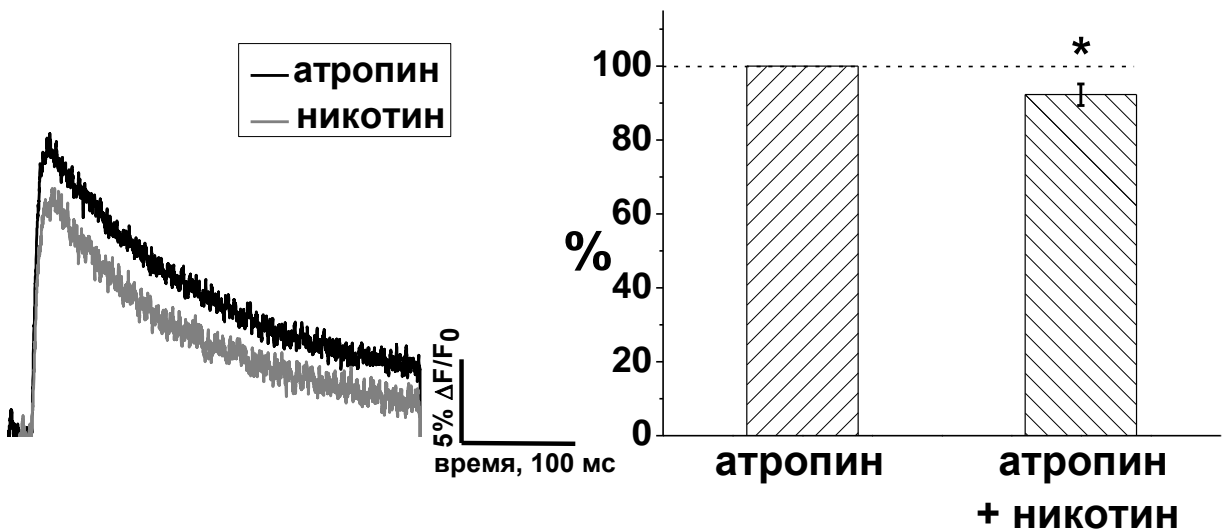


Рис. 25. Действие агониста никотина на фоне заблокированных атропином мускариновых рецепторов

Результаты двух серий экспериментов указывают на то, что активность одного типа рецептора не зависит от состояния другого типа рецепторов в момент активации. То есть блокада или ее отсутствие по отношению к никотиновым рецепторам не изменяет работу мускариновых рецепторов при их активации. Аналогично, результат активации никотиновых рецепторов не зависит от того, заблокированы или нет мускариновые рецепторы.

Далее определяли подтипы мускариновых и никотиновых рецепторов, участвующих в регуляции входа кальция в НО.

#### **4.10. Выявление подтипов мускариновых рецепторов, опосредующих эффекты холиномиметиков на кальциевый транзист**

Известно, что на мембране НО могут присутствовать мускариновые рецепторы подтипов  $M_1$  и  $M_2$ , которые участвуют в регуляции квантового освобождения медиатора (Fukuda et al., 1987; Tomas et al., 2014). Также есть данные о регуляции кальциевого тока через  $M_2$ -подтип мускариновых рецепторов (Slutsky, 2001). В следующих сериях экспериментов выясняли подтипы мускариновых рецепторов, задействованных в реализации действия холиномиметиков на кальциевый транзист. Для выяснения подтипа мускариновых рецепторов, реализующих эффект снижения  $Ca^{2+}$ -транзиста мускарином, было изучено влияние блокаторов, специфичных для этих подтипов рецепторов. При действии блокатора  $M_1$ -подтипа рецепторов пирензепина в концентрации 100 нМ наблюдалось снижение амплитуды  $Ca^{2+}$ -транзиста на  $14 \pm 7\%$  ( $n=5$ ,  $P<0.05$ , рис. 26), но на его фоне мускарин по-прежнему вызывал падение амплитуды кальциевого сигнала (рис. 26). При этом эффект мускарина, снижающий  $Ca$ -транзист, в присутствии блокатора  $M_1$ -рецепторов был выражен даже сильнее, чем без предварительного блокирования этого подтипа рецепторов. Для сравнения: мускарин снижал амплитуду  $Ca^{2+}$ -ответа в присутствии пирензепина на  $19 \pm 4\%$  ( $n=6$ ,  $P<0.05$ ), тогда как в отсутствии блокатора – на  $8 \pm 2\%$  ( $n=5$ ,  $P<0.05$ ).



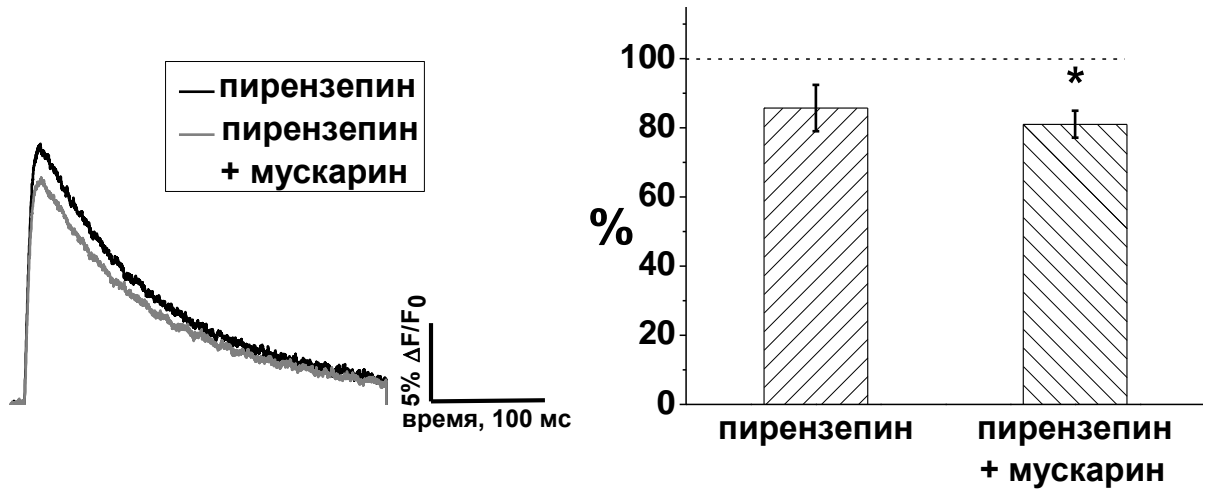


Рис. 26. Действие агониста мускарина на  $\text{Ca}^{2+}$ -транзистент после обработки препарата пирензепином

Добавление в перфузионную среду метоктрамина (10 нМ), специфического блокатора  $M_2$ -подтипа мускариновых рецепторов, не приводило к изменению параметров кальциевого ответа. Однако в его присутствии не наблюдалось угнетающего действия мускарина (рис. 27). Таким образом, блокирование  $M_2$ -подтипа мускариновых рецепторов устраняло угнетающее  $\text{Ca}^{2+}$ -транзистент действие мускарина.

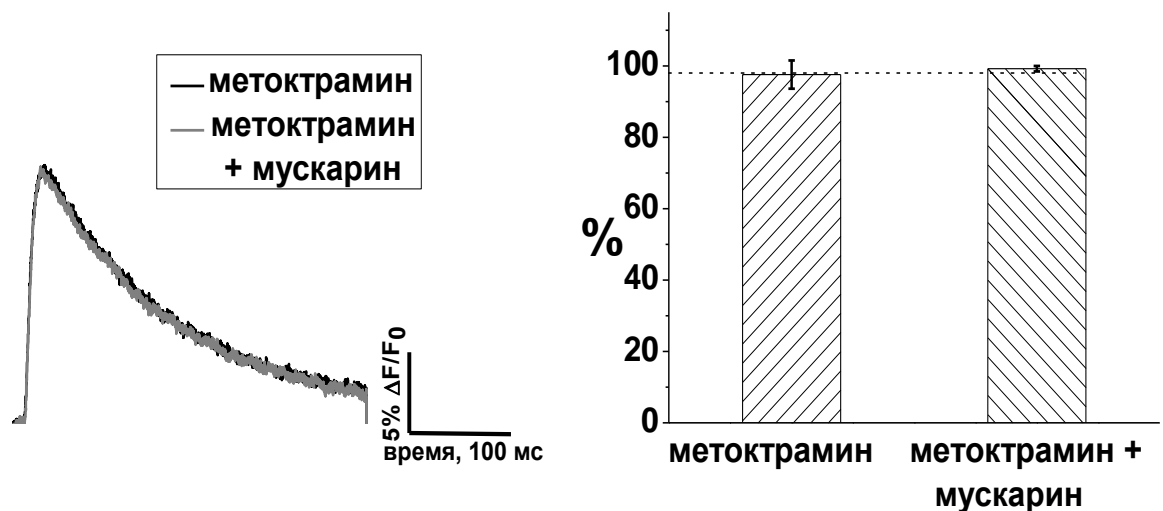


Рис. 27. Действие агониста мускарина на  $\text{Ca}^{2+}$ -транзистент после обработки препарата метоктрамином

Можно заключить, что действие холинергических агентов на  $\text{Ca}^{2+}$ -транзистент связано с активацией мускариновых рецепторов подтипа  $M_2$ . Поскольку блокада пирензепином  $M_1$ -подтипа мускариновых рецепторов приводила к снижению  $\text{Ca}^{2+}$ -транзистента, можно предположить, что в нормальных интактных условиях активация этих рецепторов увеличивает входящий поток ионов кальция. Следовательно, мускариновые холинорецепторы подтипов  $M_1$  и  $M_2$  имеют разнонаправленное действие в регуляции пресинаптического уровня кальция

#### **4.11. Выявление подтипов никотиновых рецепторов, опосредующих эффекты холиномиметиков на кальциевый транзистент**

Далее изучали, через какие подтипы никотиновых рецепторов может осуществляться ингибирующее действие холиномиметиков на  $\text{Ca}^{2+}$ -транзистент в НО лягушки.

Известно, что на НО представлены никотиновые рецепторы, различающиеся субъединичным составом (Wonnacott, 1997; Garção et al., 2014). Исследовали влияние специфических блокаторов 4 подтипов никотиновых холинорецепторов на  $\text{Ca}^{2+}$ -транзистент.

Мекамиламин в концентрации 640 нМ блокирует  $\alpha 3\beta 4$ -подтип никотиновых рецепторов (Papke et al., 2001; Rabenstein et al., 2006; Ostroumov et al., 2008). В наших экспериментах добавление мекамиламина в данной концентрации вызывало увеличение  $\text{Ca}^{2+}$ -транзистента на  $18 \pm 3\%$  ( $n=5$ ,  $P < 0.05$ , рис. 28).

Добавление в раствор никотина после обработки блокатором  $\alpha 3\beta 4$ -подтипа вызывало снижение  $\text{Ca}^{2+}$ -транзистента на  $9 \pm 4\%$  ( $n=5$ ,  $P < 0.05$ , рис. 28).

Мекамиламин в концентрации 2.5 мкМ блокирует, помимо  $\alpha 3\beta 4$ -, еще и  $\alpha 4\beta 2$ -подтип никотиновых холинорецепторов. Добавление в раствор Рингера мекамиламина в концентрации 2.5 мкМ, приводило к увеличению  $\text{Ca}^{2+}$ -транзистента на  $16 \pm 2\%$  ( $n=3$ ,  $P < 0.05$ , рис. 29).

Никотин при заблокированных  $\alpha 3\beta 4$ - и  $\alpha 4\beta 2$ -подтипах вызывал снижение  $\text{Ca}^{2+}$ -транзистента на  $19 \pm 4\%$  ( $n=3$ ,  $P < 0.05$ , рис. 29).

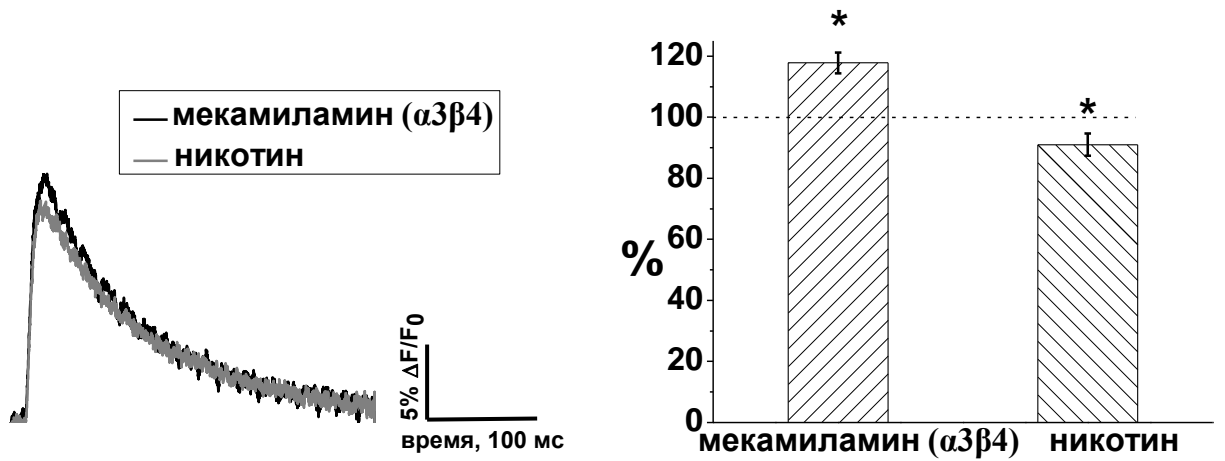


Рис. 28. Изменение амплитуды  $\text{Ca}^{2+}$ -транзientа под действием никотина на фоне обработки препарата раствором с добавлением мекамиламина в концентрации 640 нМ, блокирующей  $\alpha 3\beta 4$ -подтип холинорецепторов никотинового типа

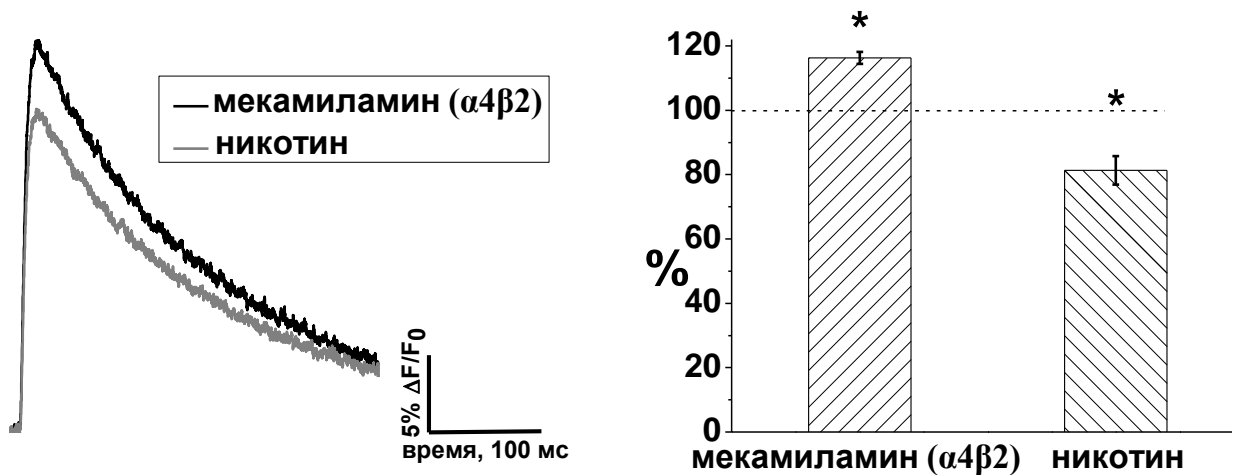


Рис. 29. Изменение амплитуды  $\text{Ca}^{2+}$ -транзientа под действием никотина на фоне обработки препарата раствором с добавлением мекамиламина в концентрации 2.5 мкМ, блокирующей  $\alpha 4\beta 2$ -,  $\alpha 3\beta 4$ -подтипы холинорецепторов никотинового типа

В концентрации 3.6 мкМ мекамиламин является блокатором  $\alpha 3\beta 4$ -,  $\alpha 4\beta 2$  и  $\alpha 3\beta 2$ -подтипов никотиновых рецепторов. Добавление мекамиламина в данной концентрации вызывало увеличение  $\text{Ca}^{2+}$ -транзientа на  $23 \pm 7\%$  ( $n=6$ ,  $P < 0.05$ , рис. 30).

Никотин на фоне заблокированных  $\alpha 3\beta 4$ -,  $\alpha 4\beta 2$  и  $\alpha 3\beta 2$ -подтипов снижал  $\text{Ca}^{2+}$ -транзиент на  $14 \pm 2\%$  ( $n=6$ ,  $P<0.05$ , рис. 30).

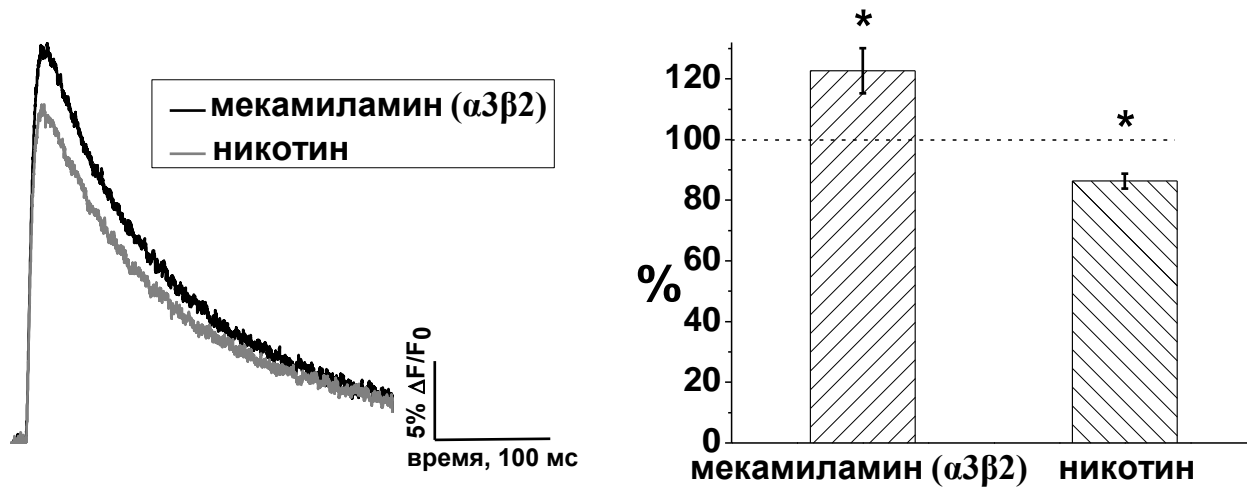


Рис. 30. Изменение амплитуды  $\text{Ca}^{2+}$ -транзиента под действием никотина на фоне обработки препарата раствором с добавлением мекамиламина в концентрации 3.6 мкМ, блокирующей  $\alpha 3\beta 2$ -,  $\alpha 4\beta 2$ -,  $\alpha 3\beta 4$ -подтипы холинорецепторов никотинового типа

Мекамиламин в концентрации 6.9 мкМ, помимо вышеперечисленных подтипов мускариновых рецепторов, также вызывает блокаду  $\alpha 7$ -субъединицы. Эксперименты показали, что добавление его в данной концентрации приводило увеличению  $\text{Ca}^{2+}$ -транзиента на  $15 \pm 8\%$  ( $n=3$ ,  $P<0.05$ , рис. 31).

Добавление никотина при заблокированной  $\alpha 7$ -субъединице мекамиламином вызывало снижение  $\text{Ca}^{2+}$ -транзиента на  $8 \pm 2\%$  ( $n=3$ ,  $P<0.05$ , рис. 31).

Метилликаконитин (MLA) является специфическим блокатором  $\alpha 7$ -субъединицы никотинового рецептора. Добавление в раствор MLA в концентрации 10 нМ увеличивало  $\text{Ca}^{2+}$ -транзиент на  $13 \pm 11\%$  ( $n=5$ ,  $P<0.05$ , рис. 32).

Однако, добавление в раствор с MLA никотина приводило к снижению  $\text{Ca}^{2+}$ -транзиента на  $11 \pm 5\%$  ( $n=6$ ,  $P<0.05$ , рис. 32).

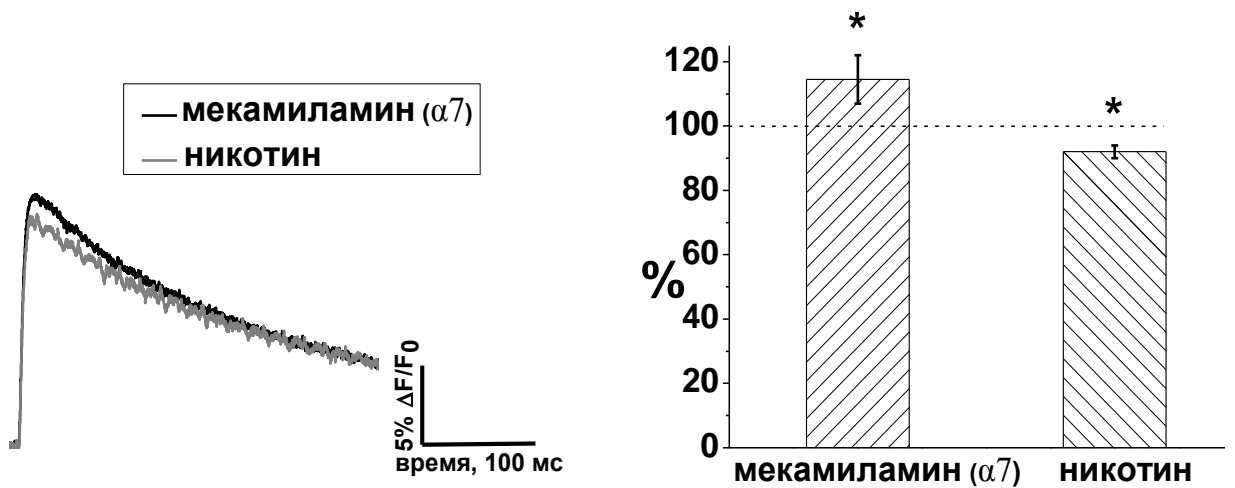


Рис. 31. Изменение амплитуды  $\text{Ca}^{2+}$ -транзientа под действием никотина на фоне обработки препарата раствором с добавлением мекамилламина в концентрации 6.9 мкМ, блокирующей  $\alpha 7$ -,  $\alpha 3\beta 2$ -,  $\alpha 4\beta 2$ -,  $\alpha 3\beta 4$ -подтипы холинорецепторов никотинового типа

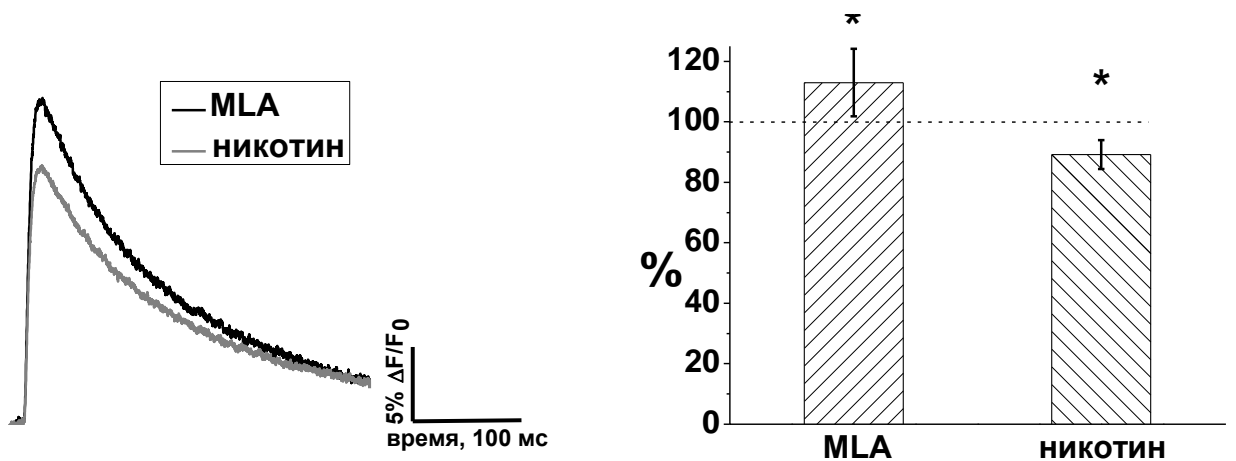


Рис. 32. Изменение амплитуды  $\text{Ca}^{2+}$ -транзientа под действием никотина на фоне обработки препарата раствором с добавлением MLA (блокада  $\alpha 7$ - подтипа холинорецепторов никотинового типа)

Важно заметить, что под действием каждого из блокаторов наблюдали увеличение кальциевого транзientа. Возможно, это является следствием того, что эндогенный ацетилхолин в нормальных физиологических (интактных) условиях угнетает вход  $\text{Ca}^{2+}$  в НО через исследованные подтипы никотиновых рецепторов. Таким образом, никотиновые холинорецепторы следующего субъединичного состава –  $\alpha 7$ ,  $\alpha 3\beta 2$ ,  $\alpha 4\beta 2$ ,  $\alpha 3\beta 4$  – задействованы в реализации угнетающего

действия эндогенного ацетилхолина, выделяющегося в синаптическую щель при низкочастотной стимуляции, на содержание кальция в НО. Однако, ни один из проверявшихся подтипов рецепторов не участвует в реализации угнетающего действия никотина (экзогенного модулятора) на амплитуду  $\text{Ca}^{2+}$ -транзientа, поскольку на фоне каждого из блокаторов никотин снижал амплитуду  $\text{Ca}^{2+}$ -транзientа. Можно предположить возможность существования другого подтипа никотиновых рецепторов, который может опосредовать действие никотина на содержание  $\text{Ca}^{2+}$  в пресинапсе.

#### **4.12. Участие кальциевых каналов в реализации эффектов холиномиметиков на кальциевый транзient**

Одним из механизмов уменьшения входа  $\text{Ca}^{2+}$  в НО при активации холинорецепторов может быть прямое воздействие на проводимость потенциал-зависимых  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов N типа (Borst, Sakmann, 1998). Это основной тип  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов, который представлен в нервном окончании лягушки.

Van der Kloot et al. (1997) наблюдали снижение квантового состава потенциалов концевой пластинки в синапсах лягушки под действием карбахолина, выраженность которого уменьшалась в присутствии  $\omega$ -конотоксина GVIA, блокирующего каналы N-типа.

В следующей серии экспериментов мы проверяли, не могут ли эффекты холиномиметиков на вход  $\text{Ca}^{2+}$  в НО быть связанными с регуляцией работы  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов.

Эксперименты показали, что обработка препарата  $\omega$ -конотоксином GVIA снижает  $\text{Ca}^{2+}$ -транзient на  $35 \pm 7\%$  ( $n=5$ ,  $P < 0.05$ , рис. 33).

При заблокированных каналах N-типа угнетающее действие карбахолина отсутствовало (рис. 34). Можно заключить, что в реализации эффекта карбахолина на уровень  $\text{Ca}^{2+}$  в нервном окончании лягушки участвуют  $\text{Ca}^{2+}$ -каналы N-типа.

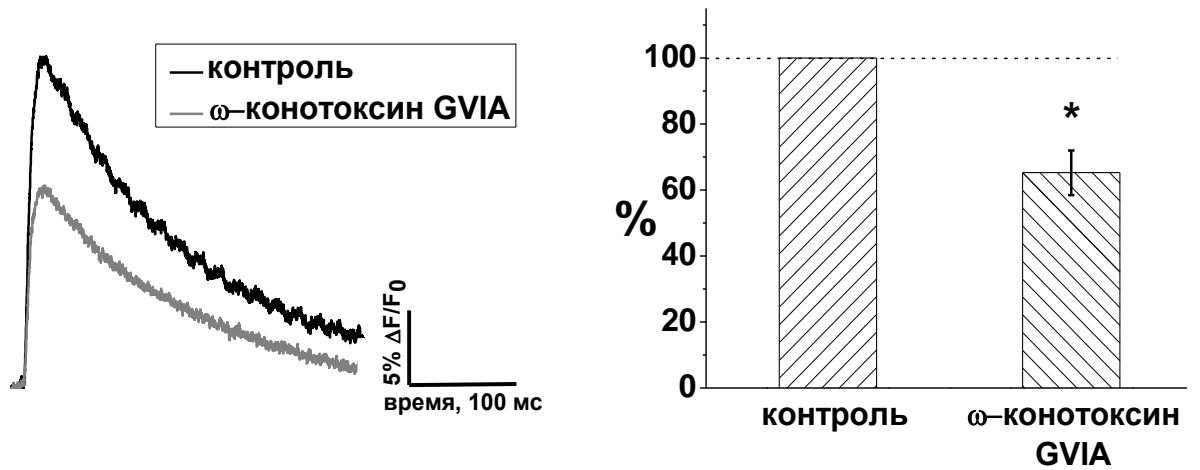


Рис. 33. Изменение амплитуды  $\text{Ca}^{2+}$ -транзientа под действием блокатора N-типа  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов  $\omega$ -конотоксином GVIA по отношению к контролю (100 %)

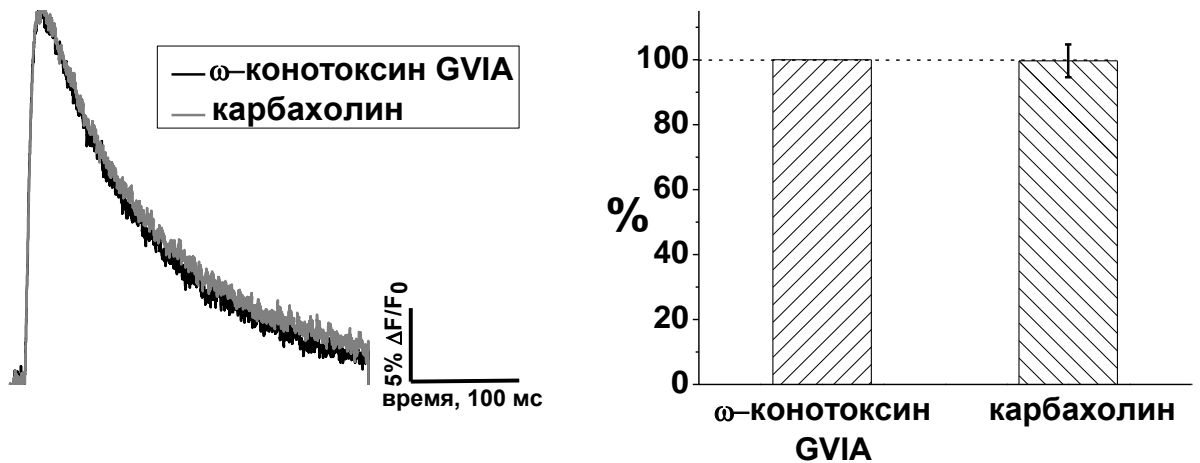


Рис. 34. Действие карбахолина на кальцевый транзient при блокаде кальцевых каналов  $\omega$ -конотоксином GVIA

На основании проведенных экспериментов можно сделать заключение о том, что в реализации эффекта карбахолина на уровень кальция в нервном окончании лягушки участвуют кальцевые каналы N-типа.

#### 4.13. Проверка гипотезы об участии эндоплазматического ретикулума в формировании угнетающих эффектов холиномиметиков на кальцевый транзient

Пресинаптический уровень  $\text{Ca}^{2+}$  формируется кальцием, входящим через потенциал-чувствительные кальцевые каналы и посредством выброса  $\text{Ca}^{2+}$  из

внутриклеточных депо. Одним из основных внутриклеточных депо в НО является эндоплазматический ретикулум (ЭР), на поверхности которого находятся рианодиновые рецепторы (Anderson et al., 1989). Эффекты холиномиметиков на  $\text{Ca}^{2+}$ -транзистент могут быть связаны с модуляцией выброса кальция из ЭР. Для проверки гипотезы об участии внутриклеточного ЭР в реализации угнетающего действия карбахолина на  $\text{Ca}^{2+}$ -транзистент использовали блокатор рианодиновых рецепторов – рианодин в концентрации 10 мкМ. Предварительная аппликация рианодина приводила к снижению  $\text{Ca}^{2+}$ -транзистента на  $19\pm 4\%$  ( $n=5$ ,  $P<0.05$ , рис. 35).

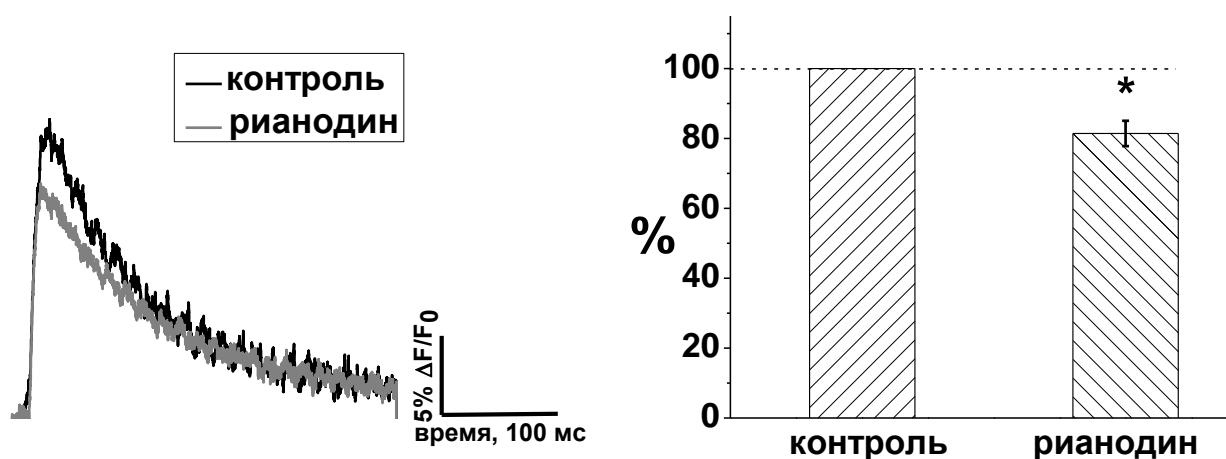


Рис. 35. Изменение амплитуды  $\text{Ca}^{2+}$ -транзистента по отношению к контролю (100 %) при блокаде рианодиновых рецепторов ЭР

Причем применение рианодина в блокирующей концентрации не снимает угнетающего действия карбахолина. Карбахолин, как и в отсутствие блокатора, снижал  $\text{Ca}^{2+}$ -транзистент. Изменение амплитуды  $\text{Ca}^{2+}$ -ответа составило  $12\pm 8\%$  ( $n=5$ ,  $P<0.05$ , рис. 36).

Можно заключить, что выброс  $\text{Ca}^{2+}$  из ЭР при активации рианодиновых рецепторов участвует в формировании  $\text{Ca}^{2+}$ -транзистента при низкочастотной стимуляции. Но эффекты холиномиметиков на  $\text{Ca}^{2+}$ -транзистент, скорее всего, не связаны с выбросом  $\text{Ca}^{2+}$  из эндоплазматического ретикулума.



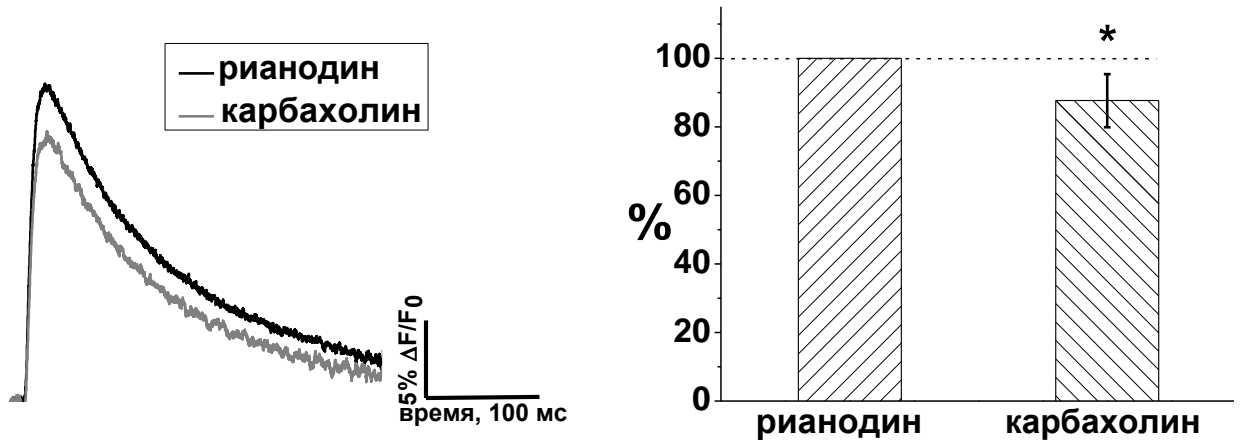


Рис. 36. Действие карбахолина на  $\text{Ca}^{2+}$ -транзиент на фоне заблокированных рианодиновых рецепторов ЭР

#### 4.14. Выявление эффектов эндогенного ацетилхолина на $\text{Ca}^{2+}$ -транзиент

##### 4.14.1. $\text{Ca}^{2+}$ -транзиент под действием антагонистов никотиновых и мускариновых холинорецепторов

С точки зрения физиологической значимости наблюдаемых эффектов экзогенных холиномиметиков, полученных в предыдущих сериях экспериментов, представляет интерес изучение воздействия эндогенного ацетилхолина на регуляцию уровня кальция в нервных окончаниях холоднокровных.

Поскольку известно, что ацетилхолин из НО выделяется в синаптическую щель при стимуляции двигательного нерва, а также спонтанно в квантовой и неквантовой форме, можно предположить его тоническое угнетающее пресинаптическое действие на  $\text{Ca}^{2+}$ -транзиент через пресинаптические никотиновые и мускариновые рецепторы.

Для проверки этой гипотезы проверяли эффекты блокады этих рецепторов в отсутствии экзогенных агонистов соответствующих типов рецепторов.

Блокада никотиновых рецепторов блокатором всех типов никотиновых рецепторов д-тубокуарином (10 мкМ) вызвала увеличение  $\text{Ca}^{2+}$ -транзिएнта на  $11 \pm 3\%$  ( $n=15$ ,  $P < 0.05$ , рис. 37).

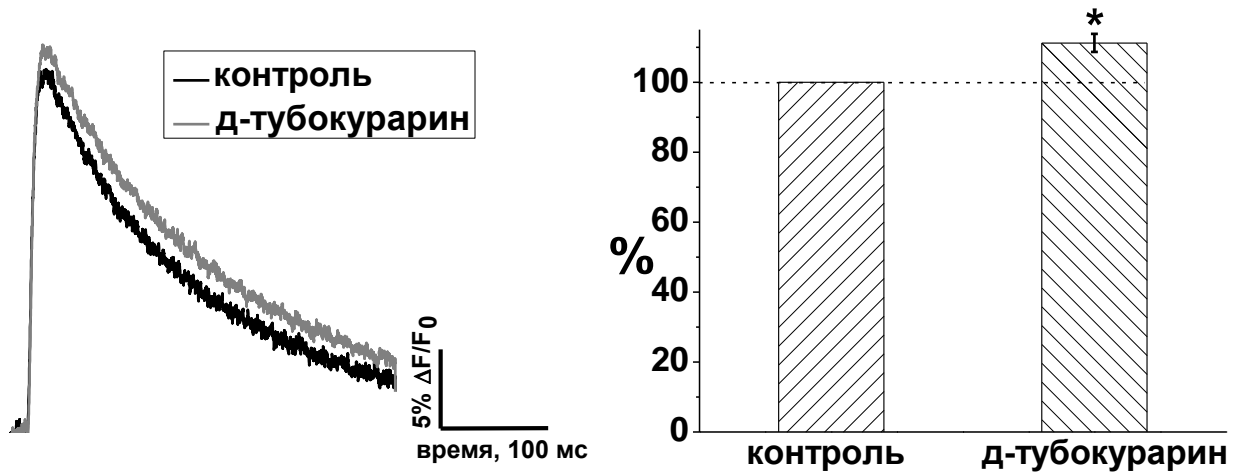


Рис. 37. Изменение амплитуды  $\text{Ca}^{2+}$ -транзientа под действием д-тубокуарина по отношению к контролю

В следующей серии экспериментов применялся антагонист мускариновых рецепторов. Добавление в раствор неспецифического блокатора мускариновых рецепторов атропина в концентрации 1 мкМ увеличивало  $\text{Ca}^{2+}$ -транзient на  $9 \pm 2\%$  ( $n=19$ ,  $P < 0.05$ , рис. 38).

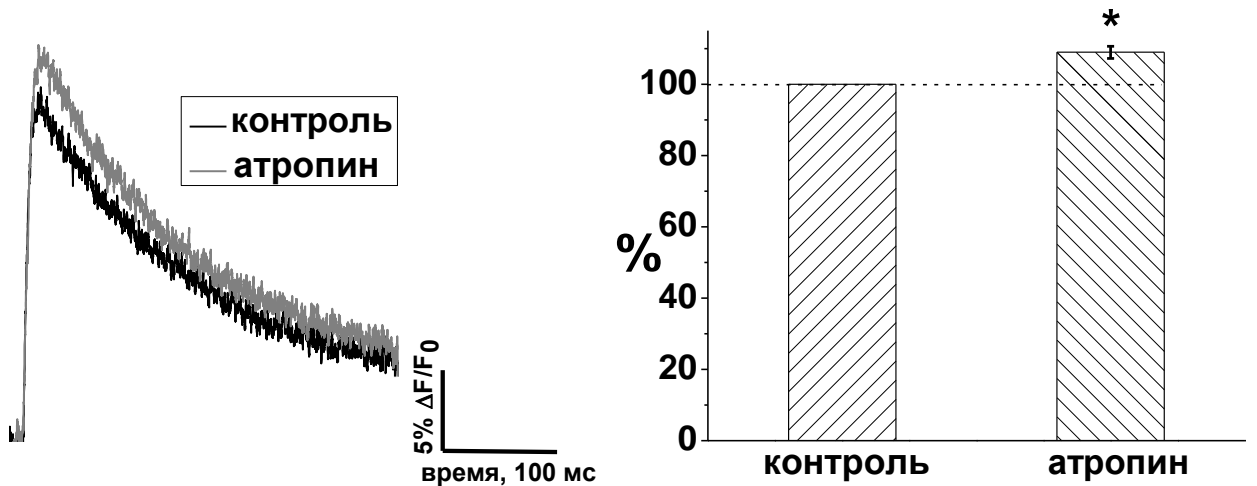


Рис. 38. Изменение амплитуды  $\text{Ca}^{2+}$ -транзientа под действием атропина (Б) по отношению к контролю

Совместная аппликация д-тубокуарина и атропина увеличивала амплитуду  $\text{Ca}^{2+}$ -транзientа на  $7 \pm 2\%$  ( $n=7$ ,  $P < 0.05$ , рис. 39). То, что это изменение сопоставимо по величине с эффектами блокаторов по отдельности, указывает на

отсутствие аддитивности облегчающих эффектов d-тубокурарина и атропина на  $\text{Ca}^{2+}$ -транзиент.

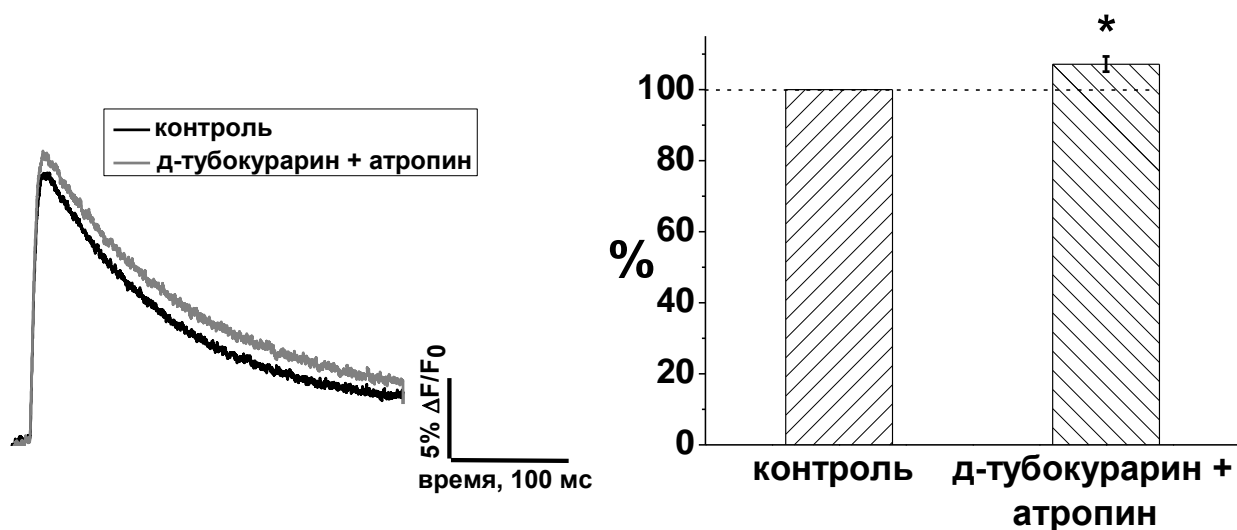


Рис. 39. Действие антагонистов никотиновых и мускариновых рецепторов д-тубокурарина и атропина на амплитуду  $\text{Ca}^{2+}$ -транзиента при совместной аппликации

Наблюдаемое возрастание  $\text{Ca}^{2+}$ -ответа в присутствии блокаторов холинорецепторов позволяет предполагать, что в области пресинаптической мембраны может находиться некоторое количество эндогенного ацетилхолина, который, взаимодействуя с никотиновыми и мускариновыми рецепторами, обуславливает подавление входа ионов  $\text{Ca}^{2+}$  в НО. По этим результатам можно заключить, что эндогенный ацетилхолин, который выделяется в синаптическую щель во время стимуляции двигательного нерва или спонтанно, может активировать в нормальных интактных условиях никотиновые и мускариновые рецепторы и, таким образом, модулировать вход кальция в НО. Это может свидетельствовать о наличии цепи обратной связи регуляции пресинаптического уровня  $\text{Ca}^{2+}$  при стимуляции двигательного нерва, которая осуществляется при помощи выделяемого в синаптическую щель медиатора - ацетилхолина.

#### 4.14.2. Действие ингибитора ацетилхолинэстеразы – прозерина на $\text{Ca}^{2+}$ -

## транзиент

Проверить гипотезу о тоническом угнетающем действии эндогенного ацетилхолина на вход кальция в НО можно еще одним способом. Известно, что применение антихолинэстеразных препаратов приводит к накоплению эндогенного ацетилхолина в синаптической щели.

Для того, чтобы оценить, может ли эндогенный ацетилхолин, освобождающийся из НО как в квантовой, так и в неквантовой форме, изменять величину кальциевого ответа, исследовали влияние на  $\text{Ca}^{2+}$ -транзиент ингибирования синаптической ацетилхолинэстеразы прозеринем. Ингибирование ацетилхолинэстеразы приводит к повышению содержания эндогенного ацетилхолина, освобождающегося в синаптическую щель (Fedorov, 1976).

В этих условиях, когда происходило накопление ацетилхолина в синаптической щели при низкочастотной стимуляции двигательного нерва, наблюдали уменьшение  $\text{Ca}^{2+}$ -ответа: прозерин в концентрации 1 мкМ вызывал уменьшение амплитуды  $\text{Ca}^{2+}$ -транзиента на  $13 \pm 5\%$  ( $n=5$ ,  $P < 0.05$ , рис. 40 А, Б).

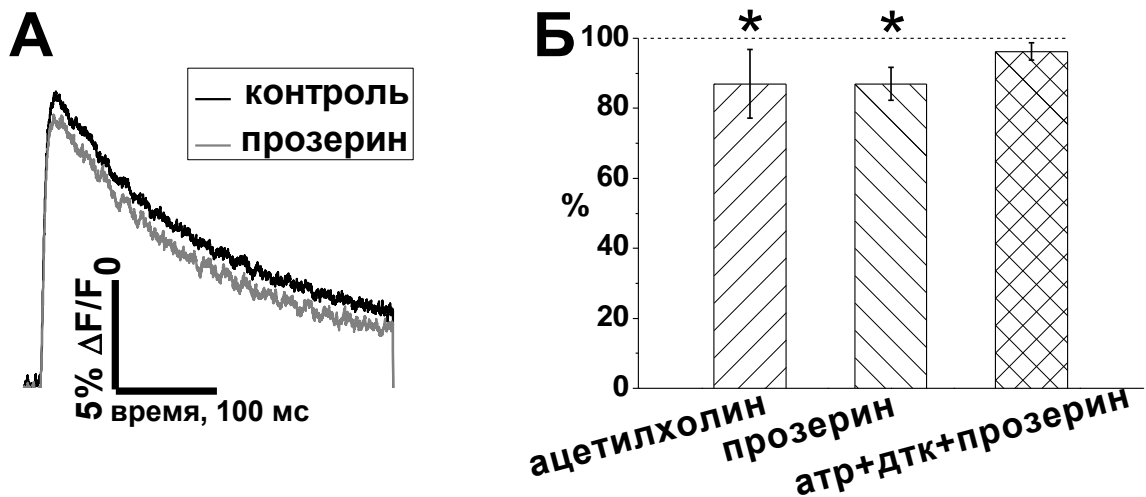


Рис. 40. А – Изменение интенсивности флуоресцентного сигнала  $\Delta F/F_0$  в контроле и под действием прозерина. Б – Изменение амплитуды  $\text{Ca}^{2+}$ -транзиента по отношению к контролю под действием прозерина и прозерина на фоне блокаторов. Для сравнения эффектов приведено действие экзогенного ацетилхолина

Как и в экспериментах с карбахолоном, угнетающее действие прозерина полностью снимали путем обработки препарата блокаторами никотиновых и мускариновых рецепторов (рис. 40 Б). Эти результаты подтверждают гипотезу о том, что эндогенный ацетилхолин может модулировать содержание  $\text{Ca}^{2+}$  в пресинаптическом окончании за счет воздействия на никотиновые и мускариновые рецепторы.

Таким образом, как экзогенный, так и эндогенный ацетилхолин, накапливаемый в щели при блокаде ацетилхолинэстеразы, уменьшали  $\text{Ca}^{2+}$ -транзист.

Эти данные вместе с увеличением  $\text{Ca}^{2+}$ -транзиста под действием блокаторов никотиновых и мускариновых рецепторов свидетельствует о том, что эндогенный ацетилхолин, выделяющийся в синаптическую щель в условиях низкочастотной стимуляции нерва действует угнетающе на вход  $\text{Ca}^{2+}$  в НО. Этот угнетающий эффект лежит в основе пресинаптического действия холиномиметиков на процесс выделения медиатора и осуществляется через систему никотиновых и мускариновых рецепторов.

#### **4.15. Влияние блокады $\text{M}_2$ -холинорецепторов на интенсивность квантовой секреции ацетилхолина при высокочастотной активности синапса<sup>2</sup>**

Известно, что стимуляция нерва с высокой частотой приводит к аккумуляции в околосинаптическом пространстве нейромедиатора, который может активировать соответствующие ауторецепторы. В то же самое время, высокочастотная стимуляция способствует повышению концентрации ионов кальция в нервном окончании. Таким образом, холинергическая регуляция кальциевого метаболизма и квантовой секреции могла бы быть значимой именно в условиях высокого, близкого к физиологическому, уровня нейросекреции.

---

<sup>2</sup> Данная серия экспериментов выполнена совместно с кбн Ковязиной И.В.

При ритмической стимуляции двигательного нерва с частотой 100 имп/с в условиях близкого к физиологическому уровню секреции (содержания ионов кальция 1.8 ммоль/л) наблюдалось кратковременное возрастание амплитуды ТКП – облегчение, связанное с накоплением  $\text{Ca}^{2+}$  в пресинапсе, с последующим ее снижением (синаптическая депрессия). В присутствии блокатора  $\text{M}_2$  рецепторов метоктрамина (10 нМ) динамика амплитуды ТКП изменялась (рис. 41). Повышение амплитуды синаптических сигналов по сравнению с контролем можно расценивать как свидетельство устранения блокатором  $\text{M}_2$  рецепторов эффекта эндогенного ацетилхолина, накапливающегося в ходе высокочастотной ритмической стимуляции нерва.

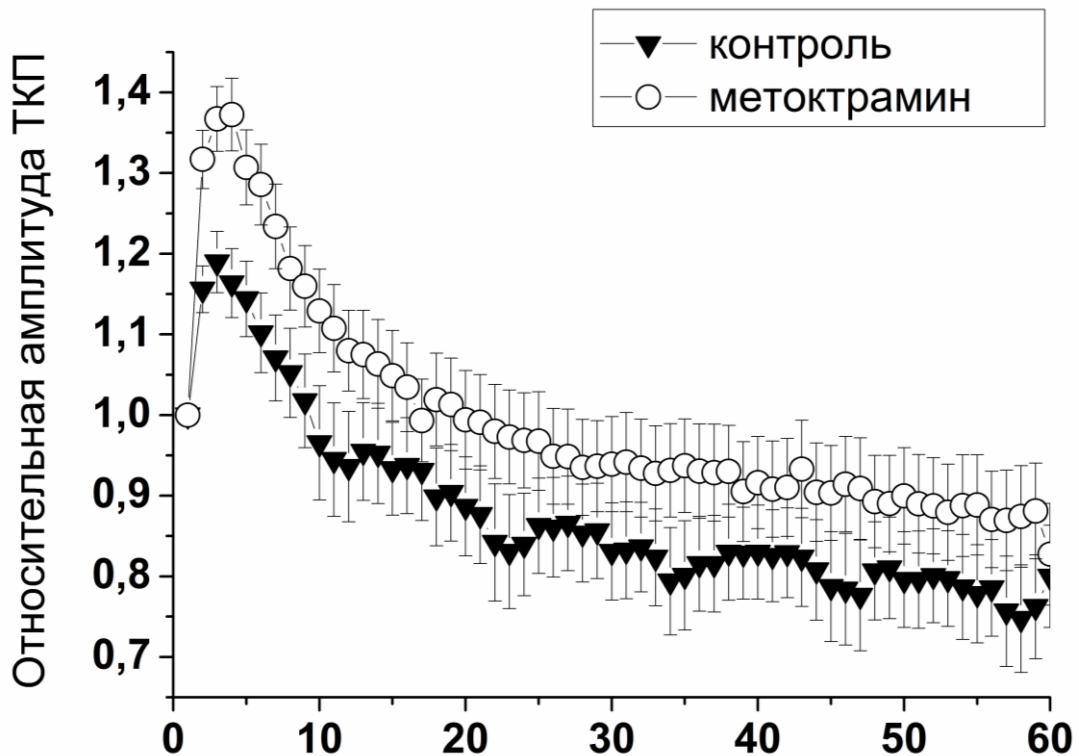


Рис. 41. Относительное изменение амплитуды токов концевой пластинки (ТКП) в ходе высокочастотной пачки импульсов (100 имп/с, за единицу принята амплитуда первого ТКП в пачке) в интактных препаратах и в присутствии  $\text{M}_2$  блокатора метоктрамина (10 нМ).

Таким образом, активация  $\text{M}_2$  холинорецепторов при повышенном выделении эндогенного ацетилхолина в случае высокочастотной активности

синапса, может угнетать квантовую секрецию ацетилхолина за счет снижения уровня внутриклеточного кальция.

## 5. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Передача возбуждения с нерва на мышцу в нервно-мышечном синапсе осуществляется за счет выброса ацетилхолина из пресинаптической клетки и его взаимодействия с рецепторами на постсинаптической мембране. Процесс выброса медиатора запускается, в свою очередь, входом кальция в НО во время потенциала действия нерва. Было показано, что ацетилхолин может взаимодействовать как с рецепторами постсинаптической мембраны, так и с рецепторами, расположенными на пресинаптической мембране. Получено большое количество данных, свидетельствующих о том, что в холинергическом синапсе ацетилхолиновые пресинаптические рецепторы влияют на процесс квантового освобождения самого нейромедиатора (Ciani, Edwards, 1963; Miyamoto, 1977; Steinbach, Stevens, 1979; Starke, 1989; Bowman et al., 1990; Miller, 1998; MacDermott et al., 1999; Slutsky et al., 2001; Nikolsky et al., 2004; Tomas et al., 2014). Однако направленность и механизмы реализации модулирующего действия на квантовую секрецию пресинаптических ауторецепторов ацетилхолина остаются до сих пор окончательно не выясненными. Это связано с тем, что экспериментальные данные были получены на разных объектах с применением разных способов блокирования мышечных сокращений, при разных режимах стимуляции двигательного нерва, с использованием агонистов и антагонистов различной природы. До сих пор остается открытым вопрос: изменяется ли внутриклеточное содержание ионов кальция при активации пресинаптических холинорецепторов? Ситуация осложняется тем, что сам медиатор ацетилхолин взаимодействует с рецепторами как никотинового, так и мускаринового типов, которые кардинально отличаются по природе процессов, следующих за их активацией. Кроме того, существование разных подтипов как никотиновых, так и мускариновых холинорецепторов, и их различная зависимость от функционального состояния пресинаптической мембраны приводит к тому, что даже в синапсах животных одного и того же вида активация и блокирование этих рецепторов приводит к разнонаправленным изменениям секреции квантов



медиатора (Katz, Miledi, 1965 c; Ganguly, 1979; Wessler, 1989; Borst, Sakmann, 1998).

В данной работе было проведено исследование влияния ацетилхолина, а также активации и блокирования рецепторов мускаринового и никотинового типа на изменение внутриклеточной концентрации ионов кальция, оцениваемой по интенсивности флуоресценции специфического кальций-чувствительного красителя, и на параметры синаптической передачи при различных режимах стимуляции двигательного нерва.

В ходе проведенного исследования получен экспериментальный материал, который свидетельствует о том, что карбахолин и ацетилхолин уменьшают интенсивность флуоресцентного кальциевого ответа. Также получены данные о том, что в условиях ингибирования синаптической ацетилхолинэстеразы прозеринном, а также при блокировании мускариновых и никотиновых рецепторов всех подтипов атропином и д-тубокурарином, наблюдалось изменение флуоресцентного кальциевого ответа.

Эти данные свидетельствуют о том, что ацетилхолин, освобождающийся из нервной терминали даже в условиях низкочастотного раздражения, уменьшает содержание ионов кальция в нервном окончании посредством пресинаптических холинорецепторов.

Таким образом, наблюдаемые ранее эффекты холиномиметиков на квантовую секрецию медиатора в нервном окончании холоднокровных скорее всего связаны с изменением входа кальция в пресинаптический нейрон. Обобщая данные об уменьшении кальциевого транзientа под действием ингибитора холинэстеразы прозерина и об увеличении кальциевого транзientа под действием блокаторов холинорецепторов с данными, полученными электрофизиологическими методами исследований, можно сделать заключение о том, что эндогенный ацетилхолин, выделившийся в синаптическую щель во время стимуляции двигательного нерва в физиологических условиях работы нервно-мышечного аппарата, участвует в регуляции входа кальция и регулирует выброс квантов медиатора по принципу обратной отрицательной связи.

Было показано, что мускарин угнетающе действует на количество освобождаемых квантов в ответ на стимуляцию двигательного нерва (Arenson, 1989; Slutsky et al., 1999; Самигуллин и др., 2014). Предварительная блокада мускариновых рецепторов атропином предотвращала эффекты мускарина как на квантовую секрецию (Самигуллин и др., 2014), так и на изменение кальциевого транзientа, что свидетельствует о наличии связи между этими эффектами. Повышение амплитуды кальциевого транзientа под действием атропина согласуется с ранее описанным возрастанием интенсивности секреции в нервно-мышечном синапсе при действии атропина, снимающего тоническое действие эндогенного ацетилхолина (Tomas et al., 2014).

В условиях высокочастотной активности, связанной с большим расходом медиатора за короткие временные интервалы, мускариновая регуляция кальциевого метаболизма и квантовой секреции может быть более значимой. Наши данные, демонстрирующие увеличение амплитуды постсинаптических токов и уменьшение уровня синаптической депрессии в ходе высокочастотной пачки (100 имп/с) в присутствии метоктрамина подтверждают это предположение.

Эффекты мускариновых агонистов и антагонистов на вызванное освобождение квантов медиатора в нервных окончаниях зависят от величины деполяризации нервного окончания (Slutsky et al., 1999, 2001, 2003), от степени зрелости концевой пластинки (Santafe, 2001, 2002); а так же от уровня активности ацетилхолинэстеразы (Minic et al., 2002, 2003). Суммируя эти данные, можно сделать заключение о том, что проявление мускариновых пресинаптических эффектов сильно зависит от экспериментальных условий.

Высокочастотный режим работы характерен для периферических синапсов в режиме физиологической активности. В нашем исследовании показано, что во время ритмической стимуляции двигательного нерва, наиболее близкой к физиологическим условиям активности концевой пластинки, активация мускариновых холинорецепторов может угнетать квантовую секрецию ацетилхолина. О чем говорит увеличение квантового состава в пачке импульсов при блокаде мускариновых рецепторов метоктрамином. Т.е. при исходной

активной фазе работы мускариновых рецепторов, ацетилхолин, выделившийся в результате пачечной работы синапса инактивирует механизм выброса медиатора.

Было показано, что отрицательная обратная связь регуляции выброса ацетилхолина может осуществляться через пресинаптические, связанные с G-белками, мускариновые рецепторы. Известно пять субъединиц мускариновых рецепторов ( $M_1$ - $M_5$ ), из которых  $M_2$ -подтип рецептора является наиболее известным пресинаптическим рецептором, вовлеченным в регуляцию работы синапса по принципу отрицательной обратной связи. Этот рецептор может воздействовать на выброс ацетилхолина посредством уменьшения кальциевого тока (Zamponi, Snutch, 1998). Данный механизм регуляции, осуществляется по двум путям. Первый – ингибирование встроенных в мембрану  $Ca^{2+}$ -каналов – этот способ быстрый, потенциал- и пертуссистоксин-чувствительный и работает при взаимодействии с  $\beta/\gamma$ -субъединицей G-белка (Herlitze et al., 1996), с N- и P / Q – типом кальциевых каналов. Второй – более медленный процесс, потенциал-независимый и пертуссистоксин-нечувствительный, осуществляется через неизвестный вторичный посредник (Bernheim et al., 1991; Beech et al., 1992).

В нашем исследовании показано, что наблюдаемые эффекты агонистов и антагонистов мускариновых рецепторов связаны с активацией мускариновых рецепторов  $M_2$ -подтипа. Активация этих рецепторов приводит к уменьшению кальциевого транзientа, который в наших экспериментальных условиях в основном отражает вход кальция в нервное окончание во время пресинаптического потенциала действия (Mintz et al., 1995). Связь холинорецепторов с кальциевыми каналами N-типа подтверждается нами в серии экспериментов проведенной с применением блокатора кальциевых каналов N типа, на фоне которого отсутствовали эффекты холиномиметика.

С другой стороны, есть данные о том, что существует путь ингибирования выброса ацетилхолина через систему мускариновых рецепторов, не связанный с уменьшением входа кальция (Slytsky et al., 1999; Slutsky et al., 2002). Этот путь включает в себя два разных процесса. Первый – потенциал чувствительный и РТХ чувствительный характеризуется медленной временной константой и высокой

аффинностью к мускарину. Второй потенциал-нечувствительный и РТХ-нечувствительный имеет быструю кинетику и низкую аффинность к мускарину. Эти данные были получены при применении фокальной стимуляции и измерения кальциевого тока при помощи блокады других токов и в присутствии пирензепина (Pankratov, Lalo, 2014)

В нашем случае регистрация кальциевого тока осуществлялась при помощи кальций-чувствительных красителей, без применения блокады натриевых и калиевых каналов и в условиях стимуляции двигательного нерва. Эти экспериментальные условия более близки к физиологическим, чем в работах цитируемых авторов (Slytsky et al., 1999; Slutsky et al., 2002). Отсутствие эффектов метоктрамина на амплитуду кальциевого тока согласуется с нашими данными (Slutsky et al., 2001).

Изучение никотинового пути сигнализации в нервных окончаниях традиционными электрофизиологическими методами с использованием оценки квантового состава осложняется в связи с тем, что амплитуда постсинаптических ответов напрямую зависит от функционального состояния никотиновых рецепторов на постсинаптической мембране. В связи с этим при расчете квантового состава неизбежно присутствует постсинаптический компонент, а применение блокаторов никотиновых рецепторов приводит зачастую к значительному уменьшению амплитуды постсинаптических вызванных потенциалов или токов концевой пластинки. Это в свою очередь вносит ошибки в подсчет квантового состава традиционными методами, при применении которых используется амплитуда вызванных многоквантовых ответов и амплитуда одноквантовых миниатюрных токов или потенциалов концевой пластинки. В связи с этим в нашем исследовании мы ограничились оценкой исключительно кальциевого транзиента при изучении пресинаптических эффектов холиномиметиков при активации и блокаде никотиновых рецепторов.

В нашей работе мы обнаружили, что одним из путей регуляции кальциевого метаболизма холиномиметиками может быть активация никотиновых рецепторов. Как уже говорилось выше, применение д-тубокурарина, блокатора пре- и

постсинаптических никотиновых рецепторов, приводило к увеличению кальциевого транзientа, что говорит о том, что активация эндогенным ацетилхолином никотиновых рецепторов приводит к угнетению входа кальция. Также это подтверждают эксперименты, выполненные с применением активатора никотиновых рецепторов никотина. Применение этого агента в концентрации 10 мкМ приводило к снижению кальциевого транзientа, что говорит о том, что активация никотиновых рецепторов, так же как и мускариновых, приводит к снижению входа кальция в НО.

Поскольку данный тип рецепторов широко представлен на пресинаптической мембране нервно-мышечного соединения у лягушки, мы попытались определить, какой тип рецепторов участвует в реализации эффектов холиномиметиков на  $Ca^{2+}$ -транзient. Существуют данные о том, что в области пресинаптических нервных окончаний могут находиться  $\alpha 7$  никотиновые рецепторы. Применение блокатора  $\alpha 7$  никотиновых рецепторов MLA в концентрации 10 нм привело к увеличению кальциевого транзientа, что свидетельствует о том, что данный тип рецепторов задействован в реализации угнетающего действия эндогенного ацетилхолина на вход кальция в НО. В то же самое время MLA не вызывал полного устранения эффекта никотина на кальциевый транзient, указывая на то, что кроме рассмотренного подтипа рецепторов может существовать другой тип никотиновых рецепторов, участвующих в реализации угнетающего действия холиномиметиков.

В следующей серии экспериментов нами применялся блокатор мекамиламин в трех концентрациях: 640 нМ, 2,5 мкМ и 3,6 мкМ, в которых он блокирует  $\alpha 3\beta 4$ -подтип,  $\alpha 4\beta 2$ -подтип и  $\alpha 3\beta 2$ -подтипа никотиновых холинорецепторов, соответственно. Во всех приведенных концентрациях мекамиламин увеличивал кальциевый транзient, но на фоне этого блокатора никотин продолжал уменьшать вход кальция в НО.

Из этого можно сделать заключение о том, что в реализации эффектов эндогенного холиномиметика – ацетилхолина задействованы никотиновые рецепторы с  $\alpha 7$ -субъединицей и  $\alpha 3\beta 4$ -подтипа,  $\alpha 4\beta 2$ -подтипа и  $\alpha 3\beta 2$ -подтипа. Но

судя по всему данные типы рецепторов не участвуют в реализации действия никотина.

Таким образом, активация пресинаптических мускариновых рецепторов преимущественно  $M_2$ -подтипа и никотиновых д-тубокурарин-чувствительных рецепторов в синапсах лягушки снижает интенсивность вызванного освобождения квантов, благодаря уменьшению внутриклеточного содержания ионов кальция в нервном окончании и обеспечивает модуляцию амплитуды постсинаптических потенциалов концевой пластинки в условиях ритмической стимуляции двигательного нерва.

## 6. ВЫВОДЫ

1. Изменение интенсивности вызванной квантовой секреции медиатора из двигательных нервных окончаний лягушки под действием экзогенных холиномиметиков обусловлено снижением входа ионов кальция в моторное нервное окончание.
2. Угнетающее действие холиномиметиков на вход ионов кальция в двигательное нервное окончание связано с активацией мускариновых рецепторов  $M_2$ -подтипа и никотиновых д-тубокурарин-чувствительных пресинаптических холинорецепторов.
3. Угнетающий эффект ацетилхолина и его миметиков на кальциевый транзист связан со снижением входа ионов кальция в цитоплазму нервных окончаний через потенциал-зависимые кальциевые каналы N-типа.
4. Рианодин-чувствительные кальциевые депо двигательных нервных окончаний участвуют в формировании кальциевого транзиста, возникающего при низкочастотном раздражении двигательного нерва, но не вносят заметного вклада в реализацию угнетающего пресинаптического действия холиномиметиков на кальциевый транзист.
5. Частичное ингибирование ацетилхолинэстеразы, способствующее накоплению эндогенного ацетилхолина в синаптической области, приводит к снижению кальциевого транзиста.
6. Неспецифические антагонисты никотиновых и мускариновых холинорецепторов (д-тубокурарин и атропин) увеличивают кальциевый транзист в нервных окончаниях нервно-мышечных препаратов с интактной ацетилхолинэстеразой, что свидетельствует о наличии «тонического» эффекта эндогенного ацетилхолина на процесс секреции медиатора.
7. Как экзогенные холиномиметики, так и эндогенный ацетилхолин участвуют в модуляции процесса освобождения медиатора путем изменения входа ионов кальция в нервное окончание. Данный способ модуляции нейросекреции посредством активации пресинаптических ацетилхолиновых

рецепторов можно рассматривать как один из конкретных молекулярных механизмов, обеспечивающих ауторегуляцию процесса синаптической передачи возбуждения.



## 7. СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- АТФ – аденозинтрифосфат
- АХ – ацетилхолин
- ГАМК – гамма-аминомасляная кислота
- ДМСО – диметилсульфоксид, биполярный апротонный растворитель
- мТКП – миниатюрные токи концевой пластинки
- мХР – мускариновые холинорецепторы
- нХР – никотиновые холинорецепторы
- НО – нервное окончание
- ПД – потенциал действия
- ПМ – плазматическая мембрана
- ТКП – токи концевой пластинки
- УФ – ультрафиолет
- ЦНС – центральная нервная система
- ЭР – эндоплазматический ретикулум
- АМ – ацетоксиметилловые эфиры
- ВАРТА – чувствительная к кальцию аминополикарбоновая кислота
- Ca<sup>2+</sup> – кальций
- Ca<sup>2+</sup>-транзиент – кальциевый транзиент
- САМК II – кальмодулин-зависимая протеинкиназа II
- CREB – циклический аденозинмонофосфат-зависимый транскрипционный фактор
- EGTA – аминополикарбоновая кислота
- ERK – внеклеточная регулируемая киназа
- GIRK – G-белок-связанные встроенные калиевые каналы
- in vitro – «в пробирке», вне живого организма
- In vivo – внутри живого организма
- K<sub>d</sub> – константа диссоциации
- MLA – метилликаконитин

NMDA – ионотропный рецептор глутамата, селективно связывающий N-метил-D-аспартат (NMDA)

pH – водородный показатель

PIP2 – фосфатидилинозит 4,5-бисфосфата; фосфолипидный компонент клеточных мембран

PKC – протеинкиназа C

PKA – протеинкиназа A

PLC $\beta$  – фосфолипаза C $\beta$

SNARE – семейство белков, обеспечивающих слияние везикул с пресинаптической мембраной

## 8. ЛИТЕРАТУРА

1. Авдонин, П. В. Рецепторы и внутриклеточный кальций / П. В. Авдонин, В. А. Ткачук. - М.: "Наука", 1994. - 288 с.
2. Балезина, О. П. Роль внутриклеточных кальциевых запасов в нервных терминалях в регуляции секреции медиатора / О. П. Балезина // Успехи физиологических наук. - 2002. - Т. 33.- № 3. - С. 38-56.
3. Бережнов, А. В. Применение флуоресцентной микроскопии в исследованиях динамики  $Ca^{2+}$  в клетках /А. В. Бережнов, В. П. Зинченко, Е. И. Федотова, В. А. Яшин // г. Пущино. - 2007. – С. 42-62.
4. Бронштейн И. Н. Справочник по математике / И. Н. Бронштейн, К. А. Семендяев // М.: Наука, 1986. – 723 с.
5. Гланц С. Медико-биологическая статистика / С. Гланц // М.: Практика, 1999. – 460 с.
6. Гришин С. Трансмембранный кальциевый ток: механизм, методы регистрации, кальций-опосредованные модуляторы синаптической передачи / С. Н. Гришин // Биологические мембраны – 2014 – Т. 31. – № 3. – С. 155-167.
7. Зефирова, А. Л. Кальциевый ток нервного окончания лягушки / А. Л. Зефирова, И. А. Халилов, Х. С. Хамитов // Докл. АН СССР. - 1985. - Т. 282. - № 3. - С. 744–746.
8. Зефирова, А. Л. Молекулярные механизмы квантовой секреции медиатора в синапсе / А. Л. Зефирова, С.Ю. Черанов // Усп. физиол. наук. - 2000. - Т. 31. - № 3. - С. 3-22.
9. Зефирова, А. Л. Ионные каналы нервного окончания / А. Л. Зефирова, Г. Ф. Ситдикова // Успехи физиол. наук. - 2002. - Т. 33. - № 4. - С. 3-33.
10. Катц, Б. Нерв, мышца и синапс / Б. Катц. - М.: «Мир», 1968. – 220 с.
11. Костюк, П. Г. Кальций и клеточная возбудимость / П.Г. Костюк // М.: Наука, 1986. - С. 5-256.
12. Никольский, Е. Е. Прекращение пресинаптического действия карбахолина тубокурарином / Е. Е. Никольский, Р. А. Гиниатуллин // Бюлл. эксп. биол. и

- медицины. – 1979. – Т. 2. – С. 171-164.
13. Никольский, Е. Е. Особенности временного хода вызванной секреции квантов медиатора в разных отделах двигательного нервного окончания лягушки / Е. Е. Никольский, Э. А. Бухараева, Д. В. Самигуллин, Р. Х. Гайнулов // Росс. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. – 2000. – Т. 86. – № 9. – С. 1195-1209.
  14. Николлс, Дж. Г. От нейрона к мозгу / Дж. Г. Николлс / – М.: УРСС, 2003 – С. 26-29.
  15. Самигуллин, Д. В. Особенности кальциевого ответа в различных участках нервной терминали лягушки в ответ на нервный импульс / Д. В. Самигуллин, А. Л. Васин, Э. А. Бухараева, Е. Е. Никольский // Докл. Акад. наук. - 2010. – Т. 431. – С. 711-713.
  16. Хазиев, Э. Ф. Снижение входа кальция в моторное нервное окончание при активации пресинаптических холинорецепторов / Э. Ф. Хазиев, Н. Ф. Фатихов, Д. В. Самигуллин, Г. Барретт, Э. А. Бухараева, Е. Е. Никольский // Докл. Акад. наук. - 2012. – Т. 446. – № 5. – С. 590–593.
  17. Adams, S. R. How calcium indicators work / S. R. Adams // Cold Spring Harb. Protoc. – 2010. – V. 2010. - № 3.
  18. Ahmed, Z. Calcium regulation by and buffer capacity of molluscan neurons during calcium transients / Z. Ahmed, J. Connor // Cell Calcium. – 1988. – V. 9. - № 2. – P. 57-69.
  19. Albuquerque, E. X. Mammalian nicotinic acetylcholine receptors: from structure to function / E. X. Albuquerque, E. F. Pereira, M. Alkondon, S. W. Rogers // Physiol Rev. – 2009. - V. 89. - № 1. – P. 73-120.
  20. Alkondon, M. The nicotinic acetylcholine receptor subtypes and their function in the hippocampus and cerebral cortex / M. Alkondon, E. X. Albuquerque // Prog. Brain Res. – 2004. - V. 145. – P. 109–120.
  21. Allen, T. G. M<sub>2</sub> muscarinic receptor-mediated inhibition of the Ca<sup>2+</sup> current in rat magnocellular cholinergic basal forebrain neurones / T. G. Allen, D. A. Brown // J. Physiol. – 1993. – V. 466. – P. 173-89.
  22. Allen, T. G. Detection and modulation of acetylcholine release from neurites of rat

- basal forebrain cells in culture / T. G. Allen, D. A. Brown // *J. Physiol.* – 1996. – V. 492 (Pt 2). – P. 453-66.
23. Anderson, K. Structural and functional characterization of the purified cardiac ryanodine receptor-Ca<sup>2+</sup> release channel complex / K. Anderson, F. A. Lai, Q. Y. Liu, E. Rousseau, H. P. Erickson, G. Meissner // *J. Biol. Chem.* - 1989. - V. 264. - P. 1329-1335.
24. Augustine, G. J. Calcium entry and transmitter release at voltage clamped nerve terminals of squid / G. J. Augustine, M. P. Charlton, S. J. Smith // *J. Physiol.* – 1985. – V. 367. – P. 163–181.
25. Augustine, G. J. The calcium signal for transmitter secretion from presynaptic nerve terminals / G. J. Augustine, E. M. Adler, M. P. Charlton // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* – 1991. – V. 635. – P. 365–381.
26. Baker, R.D. Electrical activity of small intestinal smooth muscle / R.D. Baker, A.J. Surg // *J. Physiol. Rev.* – 1969 . - V. 117. - № 6. – P. 781-97.
27. Bard, L. Glutamate receptor dynamics and protein interaction: lessons from the NMDA receptor / L. Bard, L. Groc // *Mol. Cell. Neurosci.* – 2011. - V. 48. – P. 298–307.
28. Barstad, J. A. Transversely cut diaphragm preparation from rat. An adjuvant tool in the study of the physiology and pharmacology of the myoneural junction / J. A. Barstad, G. Lilleheil // *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* . – 1968. – V. 175. - № 2. – P. 373-90.
29. Bean, B. P. Neurotransmitter inhibition of neuronal calcium currents by changes in channel voltage dependence / B. P. Bean // *Nature.* – 1989. – V. 340 – P. 153–56.
30. Beech, D. J. Pertussis toxin and voltage dependence distinguish multiple pathways modulating calcium channels of rat sympathetic neurons / D. J. Beech, L. Bernheim, B. Hille // *Neuron.* – 1992. – V. 8. - № 1. – P. 97-106.
31. Bellingham, M. C. Presynaptic depression of excitatory synaptic inputs to rat hypoglossal motoneurons by muscarinic M2 receptors / M. C. Bellingham, A. J. Berger // *Neurophysiol.* – 1996. – V. 76. - № 6. – P. 3758-70.
32. Ben-Chaim, Y. The M2 muscarinic G-protein-coupled receptor is voltage-sensitive /

- Y. Ben-Chaim, O. Tour, N. Dascal, I. Parnas, H. Parnas // *Biol Chem.* – 2003. - V. 278. - № 25. – P. 22482-91.
33. Bennett, M. R. The concept of transmitter receptors: 100 years on / M. R. Bennett // *Neuropharmacology.* – 2000. - V. 39. - № 4. – P. 523-46.
34. Birnbaumer, L. The naming of voltage-gated calcium channels / L. Birnbaumer, K. P. Campbell, W. A. Catterall, M. M. Harpold, F. Hofmann, W. A. Horne, Y. Mori, A. Schwartz, T. P. Snutch, T. Tanabe // *Neuron.* – 1994. – V. 13. - № 3. – P. 505-6.
35. Bertrand, D. Pharmacological properties of the homomeric alpha 7 receptor / D. Bertrand, S. Bertrand, M. Ballivet // *Neurosci Lett.* – 1992. – V. 146. - № 1. – P. 87-90.
36. Bleakman, L. The effect of capsaicin on voltage gated calcium currents and calcium signals in cultured dorsal root of ganglion cells / D. Bleakman, J. D. Brorson, R. J. Miller // *Br. J. Pharmacol.* – 1991. – V. 101. – P. 423–32.
37. Boland, L. M. Modulation of N-type calcium channels in bullfrog sympathetic neurons by luteinizing hormone releasing hormone: kinetics and voltage dependence / L. M. Boland, B. P. Bean // *J. Neurosci.* – 1993. – V. 13. – P. 516–33.
38. Borst, J. Calcium influx and transmitter release in a fast CNS synapse / J. Borst, B. Sakmann // *Nature.* – 1996. – V. 383. - № 6599. – P. 431-434.
39. Borst, J. G. Calcium current during a single action potential in a large presynaptic terminal of the rat brainstem / J. G. Borst, B. Sakmann // *The Journal of Physiology.* – 1998. – V. 506. - № 1. – P. 143–157.
40. Boudier, J. A. Distribution of components of the SNARE complex in relation to transmitter release sites at the frogneuromuscular junction / J. A. Boudier, N. Charvin, N. Charvin, J. L. Boudier, M. Fathallah, M. Tagaya, M. Takahashi, M. J. Seagar // *Eur J Neurosci.* – 1996. – V. 8. - № 3. – P. 545–52.
41. Bourinet, E. Determinants of the G-protein dependent opioid modulation of neuronal calcium channels / E. Bourinet, T. W. Soong, A. Stea, T. P. Snutch // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1996. – V. 93. – P. 1486–91.
42. Bourne, G. H. Structure and function of nervous tissue / G. H. Bourne // NY &

- London: Acad. Press . – 1968. – P. 542.
43. Bowman, W. C. Presynaptic receptors in the neuromuscular junction / W. C. Bowman, C. Prior, I. G. Marshall // *Ann N Y Acad Sci.* – 1990. – № 604. – P. 69–81.
44. Boyd, J. A. The end-plate potential in mammalian muscle / J. A. Boyd, A. R. Martin // *J. Physiol.* – 1956. – V. 132. – P. 74-91.
45. Brown, D. A. Muscarinic suppression of a novel voltage-sensitive  $K^+$ -current in a vertebrate neurone / D. A. Brown, P. R. Adams // *Nature.* – 1980. – V. 283 - № 5748. – P. 673-6.
46. Brown, D. A. Presynaptic signaling by heterotrimeric G-proteins / D. A. Brown, T. S. Sihra // *Handb. Exp. Pharmacol.* – 2008. – V. 184. – P. 207-60.
47. Brunzell, D. H. In vivo nicotine treatment regulates mesocorticolimbic CREB and ERK signaling in C57Bl/6J mice / D.H. Brunzell, D.S. Russell, M.R. Picciotto // *J. Neurochem.* – 2003. - V. 84. – P. 1431–1441.
48. Burnashev, N. Presynaptic  $Ca^{2+}$  dynamics,  $Ca^{2+}$  buffers and synaptic efficacy / N. Burnashev, A. Rozov // *Cell Calcium.* – 2005. – V. 37. - № 5. – P. 489-495.
49. Canal, F. Compartmentalization of the MAPK scaffold protein KSR1 modulates synaptic plasticity in hippocampal neurons / F. Canal, O. Palygin, Y. Pankratov, S. A. Correa, J. Muller // *FASEB J.* – 2011. - V. 25. – P. 2362–2372.
50. Caulfield, M. P. Muscarinic receptors — characterization, coupling and function / M. P. Caulfield // *Pharmacology and Therapeutics.* – 1993. – V. 58. – P. 319-379.
51. Caterina, M. J. The capsaicin receptor: a heat activated ion channel in the pain pathway / M. J. Caterina, M. A. Shumacher, M. Tominaga, T. A. Rosen, J. D. Levine, D. Julius // *Nature.* – 1997. – V. 289. – P. 816–24.
52. Catterall, W. A. Interactions of presynaptic  $Ca^{2+}$  channels and snare proteins in neurotransmitter release / W. A. Catterall, R.D. Baker, A.J. Surg // *Ann. NY Acad. Sci.* – 1999. - V. 30. - № 868. – P. 144-59.
53. Catterall, W. A. Calcium channel regulation and presynaptic plasticity / W. A. Catterall, A. P. Few // *Neuron.* – 2008. - V. 59. - № 6. – P. 882-901.
54. Caulfield, M. P. International Union of Pharmacology. XVII. Classification of

- muscarinic acetylcholine receptors / M. P. Caulfield, N. J. Birdsall // *Pharmacol Rev.* – 1998. - V. 50. - № 2. – P. 279-90.
55. Ciani, S. The effect of acetylcholine on neuromuscular transmission in the frog / S. Ciani, C. Edwards // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* – 1963. – V. 142 – P. 21-3.
56. Chang, K. T. Voltage-gated channels block nicotinic regulation of CREB phosphorylation and gene expression in neurons / K. T. Chang, D. K. Berg // *Neuron.* – 2001. - V. 32. – P. 855–865.
57. Changeux J. P. Allosteric mechanisms of signal transduction / J. P. Changeux, S. J. Edelstein // *Science.* – 2005. - V. 308. - № 5727. – P. 1424-8.
58. Chavez-Noriega, L. E. Pharmacological characterization of recombinant human neuronal nicotinic acetylcholine receptors h alpha 2 beta 2, h alpha 2 beta 4, h alpha 3 beta 2, h alpha 3 beta 4, h alpha 4 beta 2, h alpha 4 beta 4 and h alpha 7 expressed in *Xenopus oocytes* / L. E. Chavez-Noriega, J. H. Crona, M. S. Washburn, A. Urrutia, K. J. Elliott, E. C. Johnson // *J Pharmacol Exp Ther.* – 1997. - V. 280. - № 1. – P. 346-56.
59. Chen, J. A region of adenylyl cyclase 2 critical for regulation by G-protein subunits / J. Chen, M. DeVivo, J. Dingles, A. Harry, J. Li // *Science.* – 1995. - V. 268. – P. 1166–69.
60. Chen, G. Regulation of the NMDA receptor-mediated synaptic response by acetylcholinesterase inhibitors and its impairment in an animal model of Alzheimer's disease / G. Chen, P. Chen, H. Tan, D. Ma, F. Dou, J. Feng, Z. Yan // *Neurobiol. Aging.* – 2008. - V. 29. – P. 1795–1804.
61. Corringer, P. J. Mutational analysis of the charge selectivity filter of the alpha7 nicotinic acetylcholine receptor / P. J. Corringer, S. Bertrand, J. L. Galzi, A. Devillers-Thiery, J. P. Changeux, D. Bertrand // *Neuron.* – 1999. - V. 22. – P. 831–843.
62. Currie, K. P. Comparison of N- and P/Q-type voltage-gated calcium channel current inhibition / K. P. Currie, A. P. Fox // *J Neurosci.* – 1997. - V. 17. - № 22. – P. 4570-4579.
63. D'Agostino, G. Presynaptic inhibitory muscarinic receptors modulating [3H]



- acetylcholine release in the rat urinary bladder / G. D'Agostino, H. Kilbinger, M. C. Chiari, F. Grana // *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. – 1986. – V. 239. – P. 522–528.
64. Dajas-Bailador, F. A. Nicotinic acetylcholine receptors and the regulation of neuronal signalling / F. A. Dajas-Bailador, S. Wonnacott // *Trends Pharmacol Sci*. – 2004. – V. 25. – P. 317–24.
65. Damaj, M. I. The involvement of spinal  $\text{Ca}^{(2+)}$ /calmodulin-protein kinase II in nicotine-induced antinociception in mice / M. I. Damaj // *Eur. J. Pharmacol*. – 2000. – V. 404. – P. 103–110.
66. Decker, E. R. Calcium permeability of the nicotinic acetylcholine receptor: the single-channel calcium influx is significant / E. R. Decker, J. A. Dani // *J. Neurosci*. – 1990. – V. 10. – № 1. – P. 3413–3420.
67. del Castillo J. The nature of the neuromuscular block produced by magnesium / J. del Castillo, L. Engback // *J. Physiol*. – 1954. – V. 124. – P. 370-384.
68. DeWaard, M. Direct binding of G-protein  $\beta/\gamma$  complex to voltage dependent calcium channels / M. DeWaard, H. Lui, D. Walker, V. E. S. Scott, C. A. Gurnett // *Nature*. – 1997. – V. 385. – P. 446–50.
69. DiGregorio, D. A. Localized detection of action potential-induced presynaptic calcium transients at a *Xenopus* neuromuscular junction / D. A. DiGregorio, J. L. Vergara // *The Journal of Physiology*. – 1997. – V. 505. – № 3. – P. 585-592.
70. Dodge, F. Co-operative action a calcium ions in transmitter release at the neuromuscular junction / F. Dodge, R. Rahamimoff // *J. Physiol*. – 1967. – V. 193. – № 2. – P. 419-432.
71. Dolezal, V. Presynaptic muscarine receptors and the release of acetylcholine from cortical prisms: roles of  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{K}^{+}$  concentration / V. Dolezal, S. Tucek // *Naunyn—Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*. – 1993. – V. 348. – P. 228—233.
72. Dolphin, A. C. Voltage dependent calcium channels and their modulation by neurotransmitters and G-proteins / A. C. Dolphin // *Exp. Physiol*. – 1995. – V. 80. – P. 1–36.

73. Dunant, Y. Cholinergic inhibition of acetylcholine release in the electric organ of Torpedo / Y. Dunant, A. I. Walker // *Eur J Pharmacol.* – 1982. – V. 78. - № 2. – P. 201-12.
74. Duncan, C. J. Role of calcium in triggering the release of transmitters at the neuromuscular junction / C. J. Duncan // *Cell Calcium.* – 1983. - V. 4. - № 3. – P. 171-93.
75. Dunlap, K. Exocytotic Ca channels in mammalian central neurons / K. Dunlap, J. I. Luebke, T. J. Turner // *Trends Neurosci.* – 1983. - V. 18. – P. 89–98.
76. Eguiagaray, J. G. Neurotransmitters, calcium signaling and neuronal communication / J. G. Eguiagaray, J. Egea, J. J. Bravo-Cordero, A. G. García // *Neurocirugia (Astur).* – 2004. - T. 15. - № 2. – V. 109-18.
77. Elgoyhen, A. B.  $\alpha 10$ : a determinant of nicotinic cholinergic receptor function in mammalian vestibular and cochlear mechanosensory hair cells / A. B. Elgoyhen, D. E. Vetter, E. Katz, C. V. Rothlin, S. F. Heinemann, J. Boulter // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2001. - T. 98. - № 6. – V. 3501-6.
78. Elmslie, K. S. LHRH and GTP-  $\gamma$ S modify calcium current activation in bullfrog sympathetic neurons / K. S. Elmslie, P. J. Kammermeier, S. W. Jones // *Neuron.* – 1992. - T. 5. – V. 75–80.
79. Etter, E. F. Detection of changes in near-membrane  $Ca^{2+}$  concentration using a novel membrane-associated  $Ca^{2+}$  indicator / E. F. Etter, M. A. Kuhn, F. S. Fay // *J Biol Chem.* – 1994. - T. 269. - № 13. – V. 10141-9.
80. Fedorov, V. V. Effect of cholinesterase inhibitors on synaptic potentials of the frog neuromuscular junction / V. V. Fedorov // *Neurosci Behav Physiol.* – 1976. - T. 7. - № 3. – V. 201-6.
81. Fenster, C. P. Regulation of  $\alpha 4\beta 2$  nicotinic receptor desensitization by calcium and protein kinase C / C. P. Fenster, M. L. Beckman, J. C. Parker, E. B. Sheffield, T. L. Whitworth, M. W. Quick, R. A. Lester // *Mol. Pharmacol.* – 1999. - V. 55. – P. 432–443.
82. Ferry, C. B. The nature of the presynaptic effects of (+)-tubocurarine at the mouse neuromuscular junction / C. B. Ferry, S. S. Kelly // *J Physiol.* – 1988. - V. 403. – P.

425-37.

83. Frank, C. A. How voltage-gated calcium channels gate forms of homeostatic synaptic plasticity / C. A. Frank // *Front Cell Neurosci.* – 2014. - V. 8. - № 40.
84. Frankenhaeuser, B. The action of calcium on the electrical properties of squid axons / B. Frankenhaeuser, A. L. Hodgkin // *J. Physiol.* – 1957. - V. 137. - № 2. – P. 218–244.
85. Fu, W. M. Regulation of acetylcholine release by presynaptic nicotinic receptors at developing neuromuscular synapses / W. M. Fu, J. J. Liu // *Mol Pharmacol.* – 1997. - V. 51. - № 3. – P. 390-8.
86. Fucile, S.  $\text{Ca}^{2+}$  permeability of nicotinic acetylcholine receptors / S. Fucile // *Cell Calcium.* – 2004. - V. 35. – P. 1–8.
87. Fukuda, K. Molecular distinction between muscarinic acetylcholine receptor subtypes / K. Fukuda, T. Kubo, I. Akiba // *Nature.* – 1987. - V. 327. – P. 623–625.
88. Gage, P. W. Activation and modulation of neuronal K channels by GABA / P. W. Gage // *Trends Neurosci.* – 1992. - V. 15. – P. 46–51.
89. Ganguly, D. K. Effects of oxotremorine demonstrate presynaptic muscarinic and dopaminergic receptors on motor nerve terminals / D. K. Ganguly // *Nature.* – 1979. – V. 278. – P. 645-6.
90. Garção, P. Subsynaptic localization of nicotinic acetylcholine receptor subunits: a comparative study in the mouse and rat striatum / P. Garção, C. R. Oliveira, R. A. Cunha, P. Agostinho // *Neurosci Lett.* – 2014. - V. 566. – P. 106-10.
91. Geduldig, D. Voltage clamp of the *Aplysia* giant neurone: early sodium and calcium currents / D. Geduldig, R. Gruener // *J. Physiol.* – 1970. - V. 211(1). – P. 217–244.
92. Girod, R. Heteromeric complexes of alpha5 and/or alpha7 subunits: effects of calcium and potential role in nicotine-induced presynaptic facilitation / R. Girod, G. Crabtree, G. Ernstrom, J. Ramirez-Latorre, D. McGehee, J. Turner, L. Role // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* – 1999. - T. 868. – P. 578–590.
93. Graham, B. A stimulation of action potentials in synaptic boutons during presynaptic inhibition / B. Graham, S. Redman // *J. Neurophysiol.* – 1994. - T. 71. – P. 538–49.

94. Gray, R. Hippocampal synaptic transmission enhanced by low concentrations of nicotine / R. Gray, A. S. Rajan, K. A. Radcliffe, M. Yakehiro, J. A. Dani // *Nature*. – 2004. - V. 383. – P. 713–716.
95. Grynkiewicz, G. A new generation of  $\text{Ca}^{2+}$  indicators with greatly improved fluorescence properties / G. Grynkiewicz, M. Poenie, R. Y. Tsien // *J. Biol. Chem.* – 1985. – V. 260. - № 6. – P. 3440-50.
96. Gundersen, C.B. The antagonism between botulinum toxin and calcium in motor nerve terminals / C. B. Gundersen, B. Katz, R. Miledi // *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* – 1982. – V. 216. - № 1204. – P. 369–376.
97. Hagiwara, S. Voltage clamp analysis of two inward current mechanisms in the egg cell membrane of a starfish / S. Hagiwara, S. Ozawa, O. Sand // *Gen Physiol.* – 1975. – V. 65. - № 5. – P. 617-44.
98. Hamill, O. P. An improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches / O. P. Hamill, A. Marty, E. Neher, B. Sakmann, F. J. Sigworth // *Pflugers Arch.* – 1981. – V. 391. - № 2. – P. 85–100.
99. Hamilton, B. R. Autoreceptor-mediated purinergic and cholinergic inhibition of motor nerve terminal calcium currents in the rat / B. R. Hamilton, D. O. Smith // *J. Physiol.* – 1991. – V. 432. – P. 327–341.
100. Herlitze, S. Modulation of  $\text{Ca}^{2+}$  channels by G-protein beta gamma subunits / S. Herlitze, D. E. Garcia, K. Mackie, B. Hille, T. Scheuer, W. A. Catterall // *Nature*. – 1996. – V. 380. - № 6571. – P. 258-62.
101. Herlitze, S. Molecular determinants of inactivation of G-protein modulation in the intracellular loop connecting domains I and II of the calcium channel  $\alpha_{1A}$  subunit / S. Herlitze, G. H. Hockerman, T. Scheuer, W. A. Catterall // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1997. – V. 94. – P. 1512–16.
102. Hille, R. Modulation of ion channel function by G-protein coupled receptors / R. Hille // *Trends Neurosci.* – 1994. – V. 17. – P. 531–36.
103. Hodgkin A.L. Action potentials recorded from inside a nerve fibre / A. L. Hodgkin, A. F. Huxley // *Nature*. – 1939. – V. 144. – P. 710–711.

104. Huang, C. Evidence that direct binding of  $G_{\beta/\gamma}$  to the GIRK1 G-protein inwardly rectifying  $K^+$  channel is important for channel activation / C. Huang, P. A. Slesinger, P. J. Casey, Y. N. Jan, L. Y. Jan // *Neuron*. – 1995. – V. 15. – P. 1133–43.
105. Hughes, B. W. Molecular architecture of the neuromuscular junction / B. W. Hughes, L. L. Kusner, H. J. Kaminski // *Muscle Nerve*. – 2006. – V. 33. - № 4. – P. 445-61.
106. Hulme, E. C. Muscarinic acetylcholine receptors: typical G-coupled receptors / E. C. Hulme // *Symp Soc Exp Biol*. – 1990. – V. 44. – P. 39-54.
107. Ikeda, S. Voltage dependent modulation of N-type calcium channels by G-protein subunits / S. Ikeda // *Nature*. – 1996. – V. 380.– P. 255–58.
108. Ilouz, N. Depolarization affects the binding properties of muscarinic acetylcholine receptors and their interaction with proteins of the exocytic apparatus / N. Ilouz, L. Branski, J. Parnis, H. Parnas, M. Linial // *J. Biol. Chem*. – 1999 . – V. 274. - № 41. – P. 29519-28.
109. Ito, Y. Autoregulation of acetylcholine release from vagus nerve terminals through activation of muscarinic receptors in the dog trachea / Y. Ito, T. Yoshitomi // *Br J Pharmacol*. – 1988. – V. 93. - № 3. – P. 636-46.
110. Jarvis, S. E. G Protein Modulation of N-type Calcium Channels Is Facilitated by Physical Interactions between Syntaxin 1A and Gbg / S.E. Jarvis, J. M. Magga, A. M. Beedle, J. E. A. Braun, and G. W. Zamponi // *Trends Neurosci*. – 2000. - V. 275. - № 9. – P. 6388-94.
111. Jensen, A. A. Carbamoylcholine homologs: novel and potent agonists at neuronal nicotinic acetylcholine receptors / A. A. Jensen, I. Mikkelsen, B. Frølund, H. Bräuner-Osborne, E. Falch, P. Krogsgaard-Larsen // *Mol Pharmacol*. – 2003. - V. 64. - № 4. – P. 865-75.
112. Jones, S. W. Transmitter modulation of neuronal calcium channels / S. W. Jones, K. S. Elmslie // *J. Membr. Biol*. – 1997. - V. 155. – P. 1–10.
113. Katz, B. The effect of calcium on acetylcholine release from motor nerve terminals / B. Katz, R. Miledi // *Proc. R. Soc. B*. - 1965 (a). – V. 161. – P. 496-503.
114. Katz, B. Propagation of electric activity in motor nerve terminals / B. Katz, R.

- Miledi // Proc. R. Soc. B. – 1965 (b). – V. 161. – P. 496-503.
115. Katz, B. The measurement of synaptic delay, and the time course of acetylcholine release at the neuromuscular junction / B. Katz, R. Miledi // Proc. R. Soc. B. - 1965 (c). – V. 161. – P. 483-495.
116. Katz, B. The role of calcium in neuromuscular facilitation / B. Katz, R. Miledi // J Physiol. – 1968. – V. 195. - № 2. – P. 481-492.
117. Karlin, A. Emerging structure of the nicotinic acetylcholine receptors / A. Karlin // Nat Rev Neurosci. – 2002. - V. 3. - № 2. – P. 102-14.
118. Khakh, B. S. State-dependent cross-inhibition between transmitter-gated cation channels / B. S. Khakh, X. Zhou, J. Sydes, J. J. Galligan, H. A. Lester // Nature. – 2000. - V. 406. – P. 405–410.
119. Khiroug, L. Functional mapping and  $Ca^{2+}$  regulation of nicotinic acetylcholine receptor channels in rat hippocampal CA1 neurons / L. Khiroug, R. Giniatullin, R. C. Klein, D. Fayuk, J. L. Yakel // J.Neurosci. – 2003. - V. 23. – P. 9024–9031.
120. Kidokoro, Y. Roles of SNARE proteins and synaptotagmin I in synaptic transmission: studies at the Drosophilaneuromuscular synapse / Y. Kidokoro // Neurosignals. – 2003. - V. 12. - № 1. – P. 13–30.
121. Kojima, Y. Inhibition of cholinergic transmission by opiates in ileal myenteric plexus is mediated by kappa receptor. Involvement of regulatory inhibitory G protein and calcium N-channels / Y. Kojima, T. Takahashi, M. Fujina, C. Owyang // J Pharmacol Exp Ther. – 1994. - V. 268. - № 2. – P. 965-70.
122. Kostyuk, P. G. Effect of internal fluoride and phosphate on membrane currents during intracellular dialysis of nerve cells / P. G. Kostyuk, O. A. Krishtal, V. I. Pidoplichko // Nature. – 1975. - V. 257. - № 5528. – P. 691-693.
123. Kostyuk, P. G. Asymmetrical displacement currents in nerve cell membrane and effect of internal fluoride / P. G. Kostyuk, O. A. Krishtal, V. I. Pidoplichko // Nature. – 1977. - V. 267. - № 5606. – P. 70-72.
124. Kupchik, Y. M. A novel, extremely fast, feedback inhibition of glutamate release in the crayfish neuromuscular junction / Y. M. Kupchik, H. Parnas, I. Parnas // J Neuroscience – 2011. - V. 172. – P. 44-54.

125. Langley, J. N. On the contraction of muscle, chiefly in relation to the presence of "receptive" substances: Part I./ J. N. Langley // *J Physiol.* – 1907. - V. 36(4-5). – P. 347-84.
126. Levitan, E. S. Signaling for vesicle mobilization and synaptic plasticity / E. S. Levitan // *Mol Neurobiol.* – 2008. - V. 37. - № 1. – P. 39-43.
127. Lin, J. W. Probing the endogenous  $\text{Ca}^{2+}$  buffers at the presynaptic terminals of the crayfish neuromuscular junction / J. W. Lin, Q. Fu, T. Allana // *Journal of Neurophysiology.* – 2005. – V. 94. - № 1. – P. 377-386.
128. Lindgren C.A. Calcium current in motor nerve endings of the lizard / C. A. Lindgren, J. W. Moore // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* – 1991. – V. 635. – P. 58–69.
129. Linial, M. Voltage-dependent interaction between the muscarinic ACh receptor and proteins of the exocytic machinery / M. Linial, N. Ilouz, H. Parnas // *J. Physiol.* – 1997. – V. 504. - № 2. – P. 251-8.
130. Luo, F. Single-pixel optical fluctuation analysis of calcium channel function in active zones of motor nerve terminals / F. Luo, M. Dittrich, J. R. Stiles, S. D. Meriney // *The Journal of Neuroscience.* – 2011. – V. 31. - № 31. – P. 11268-11281.
131. Luo, F. Transmitter release is evoked with low probability predominately by calcium flux through single channel openings at the frog neuromuscular junction / F. Luo, M. Dittrich, S. Cho, J. R. Stiles, S. D. Meriney // *J Neurophysiol.* – 2015. – doi: 10.1152/jn.00879.2014. [Epub ahead of print].
132. Lux, H. D. Single channel  $\text{Ca}^{2+}$  currents in *Helix pomatia* neurons / H. D. Lux, K. Nagy // *Pflugers Arch.* – 1981. – V. 391. - № 3. – P. 252–254.
133. Lux, H. D. Single channel  $\text{Ca}^{2+}$  currents in *Helix pomatia* neurons / H. D. Lux, A. M. Brown // *J. Gen. Physiol.* – 1984. – V. 83. - № 5. – P. 727–50.
134. MacDermott , A. B. Presynaptic ionotropic receptors and the control of transmitter release / A. B. MacDermott, L. W. Role, S. A. Siegelbaum // *Annu Rev Neurosci.* – 1999. – V. 22. – P. 443-85.
135. Macleod, G. T. Calcium dependence of quantal secretion from visualized sympathetic nerve varicosities on the mouse vasdeferens / G. T. Macleod, N. A. Lavidis, M. R. Bennett // *J Physiol.* – 1994. – V. 480. - № 1. – P. 61-70.

136. Magazanik, L. Polymodal distribution of synaptic delays in the frog neuromuscular junction / L. Mansvelder, M. Minenko // *Neurophysiology* – 1986. - V. 18. – P. 748–763.
137. Mallart, A. Presynaptic currents in frog motor endings / A. Mallart // *Pflugers Arch* – 1984. - V. 400. – P. 8–13.
138. Mallart, A. Electric current flow inside perineural sheaths of mouse motor nerves/ A. Mallart // *J. Physiol*– 1985. - V. 368. – P. 565–575.
139. Malomouzh, A. I. Muscarinic M1 acetylcholine receptors regulate the non-quantal release of acetylcholine in the rat neuromuscular junction via NO-dependent mechanism / A. I. Malomouzh, M. R. Mukhtarov, E. E. Nikolsky, F. Vyskocil // *J Neurochem.* – 2007. - V. 102. - № 6. – P. 2110–7.
140. Mansvelder, H. D. Cellular and synaptic mechanisms of nicotine addiction / H. D. Mansvelder, D. S. McGehee // *Neurosci.* – 2002. - V. 53. – P. 606–617.
141. Marchi, M. Direct evidence that release-stimulating  $\alpha 7$  nicotinic cholinergic receptors are localized on human and rat brain glutamatergic axon terminals / M. Marchi, F. Risso, C. Viola, P. Cavazzani, M. Raiteri // *J. Neurochem.* – 2002. - V. 80. – P. 1071–1078.
142. Marwaha, J. Neuroreceptors: general perspectives / J. Marwaha // *Monogr. Neural. Sci.* – 1984. - T. 10. – P. 1-3.
143. Matthews, G. Neurotransmitter release / G. Matthews // *Annu Rev Neurosci.* – 1996. - T. 19. – P. 219-33.
144. Matthews-Bellinger, J. Distribution of acetylcholine receptors at frog neuromuscular junctions with a discussion of some physiological implications / J. Matthews-Bellinger, M. M. Salpeter // *J. Physiol.* – 1978. - V. 279. – P. 197-213.
145. McGehee, D. S. Presynaptic ionotropic receptors / D. S. McGehee, L. W. Role // *Curr Opin Neurobiol.* – 1996. - V. 6. - № 3. – P. 342-9.
146. McLaughlin, S. PIP2 and proteins: interactions, organization, and information flow / S. McLaughlin, J. Wang, D. Murray // *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* – 2002. - V. 31. – P. 151–175.
147. Mehta, P. P. SNAP-25 and synaptotagmin involvement in the final  $\text{Ca}^{2+}$ -



- dependent triggering of neurotransmitter exocytosis / P. P. Mehta, E. Battenberg, M. C. Wilson // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 1996. - V. 93. - № 19. – P. 10471-6.
148. Meir, A. Ion channels in presynaptic nerve terminals and control of transmitter release / A. Meir, S. Ginsburg, A. Butkevich, S. G. Kachalsky, I. Kaiserman, R. Ahdut, S. Demircoren, R. Rahamimoff // *Physiol Rev.* – 1999. - V. 79. - № 3. – P. 1019-88.
149. Meriney, S. D. Organization and function of transmitter release sites at the neuromuscular junction / S. D. Meriney, M. Dittrich // *J. Physiol.* – 2013. - V. 591. - № 13. – P. 3159-65.
150. Millar, N. S. Assembly and trafficking of nicotinic acetylcholine receptors / N. S. Millar, P. C. Harkness // *Mol. Membr. Biol.* – 2008. - V. 25. – P. 279–292.
151. Miller, R. J. Receptor-mediated regulation of calcium channels and neurotransmitter release / R. J. Miller // *FASEB J.* – 1990. - V. 4. - № 15. – P. 3291-3299.
152. Miller, R. J. The control of neuronal Ca homeostasis / R. J. Miller // *Prog. Neurobiol.* – 1991. - V. 37. – P. 255–85.
153. Miller, R. J. Presynaptic receptors / R. J. Miller // *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* – 1998. - V. 38. – P. 201–27.
154. Minenko, M. Phenomena of asynchronous evoked transmitter release at the neuromuscular junction of the frog / M. Minenko, L. Magazanik // *Neurophysiology* – 1986. - V. 18. – P. 346–354.
155. Minic, J. Regulation of acetylcholine release by muscarinic receptors at the mouse neuromuscular junction depends on the activity of acetylcholinesterase / J. Minic, J. Molgó, E. Karlsson, E. Krejci // *Eur. J. Neurosci.* – 2002. – V. 15. - № 3. – P. 439-48.
156. Minic, J. Butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase activity and quantal transmitter release at normal and acetylcholinesterase knockout mouse neuromuscular junctions / J. Minic, A. Chatonnet, E. Krejci, J. Molgó // *Br. J. Pharmacol.* – 2003. – V. 138. - № 1. – P. 177-87.
157. Mintz, I. M. Calcium control of transmitter release at a cerebellar synapse / I. M.

- Mintz, B. L. Sabatini, W. G. Regehr // *Neuron*. – 1995. – V. 15. - № 3. – P. 675-88.
158. Molgó, J. Effects of Anemonia sulcatatoxin II on presynaptic currents and evoked transmitter release at neuromuscular junctions of the mouse / J. Molgó, A. Mallart // *Pflugers Arch* . – 1985. – V. 405. - № 4. – P. 349–353.
159. Morita , K. Muscarinic presynaptic inhibition of synaptic transmission in myenteric plexus of guinea-pig ileum / K. Morita, R. A. North, T. Tokimasa // *J. Physiol*. – 1982 . – V. 333. – P. 141-9.
160. Mulkey , R. M. Action potentials must admit calcium to evoke transmitter release / R. M. Mulkey, R. S. Zucker // *Nature* – 1991 . – V. 350. - № 6314. – P. 153-5.
161. Mulle, C. Calcium influx through nicotinic receptor in rat central neurons: its relevance to cellular regulation / C. Mulle, D. Choquet, H. Korn, J. P. Changeux // *Neuron*. – 1992. - V. 8. – P. 135–143.
162. Miyamoto, M. D. The actions of cholinergic drugs on motor nerve terminals / M. D. Miyamoto // *Pharmacol. Rev.* – 1977 . – V. 29(3). - № 3. – P. 221-47.
163. Nakazawa, K. ATP-activated current and its interaction with acetylcholine-activated current in rat sympathetic neurons / K. Nakazawa // *J. Neurosci.* – 1994. - T. 14. – P. 740–750.
164. Neher, E. The use of fura-2 for estimating Ca buffers and Ca fluxes / G. Grynkiewicz, M. Poenie, R. Y. Tsien // *Neuropharmacology*. – 1995. – V. 34. - № 11. – P. 1423-42.
165. Nicholls, J. From neuron to brain / J. Nicholls, A. Martin, B. Wallace // *Sin. Ass. Inc. Sanderland. USA*. – 1992. - P. 807.
166. Nikolsky, E. E. Cholinergic regulation of the evoked quantal release at frog neuromuscular junction / E. E. Nikolsky, F. Vyskocil, E. A. Bukharaeva, D. V. Samigullin, L. G. Magazanik // *J. Physiol. (L)*. – 2004. – V. 560. – P. 77-88.
167. Pankratov, Y. Calcium permeability of ligand-gated  $Ca^{2+}$  channels / Y. Pankratov, U. Lalo // *Eur. J. Pharmacol.* – 2014. - V. 739C. - № C. – P. 60-73.
168. Papke R. L. Inhibition of wild-type and mutant neuronal nicotinic acetylcholine receptors by local anesthetics / R. L. Papke, B. A. Horenstein, A. N. Placzek // *Mol Pharmacol*. – 2001. - V. 60. - № 6. – P. 1365-74.

169. Parnas, H. Autoreceptors, membrane potential and regulation of transmitter release / H. Parnas, L. Segel, J. Dudel, I. Parnas // Trends in Neurosciences. – 2000. – V. 23. – P. 60–68.
170. Patel, P. G. Elementary events underlying voltage dependent G-protein inhibition of N-type calcium currents / P. G. Patel, M. De Leon, R. R. Reed, S. Dubel, T. P. Snutch // Biophys. J. – 1996. – V. 71. – P. 2509–21.
171. Patrick, J. Functional diversity of neuronal nicotinic acetylcholine receptors / J. Patrick, P. Seguela, S. Verrinos, M. Amador, C. Luetje // Prog. Brain. Res. – 1993. – V. 98. – P. 113–20.
172. Peng, Y. Release of LHRH is linearly related to the time integral of presynaptic  $Ca^{2+}$  elevation above a threshold level in bullfrog sympathetic ganglia / Y. Peng, R. Zucker // Neuron. – 1993. – V. 10. - № 3. – P. 465-473.
173. Penington, N. J. Action potential waveforms reveal simultaneous changes in I<sub>Ca</sub> and I<sub>K</sub> produced by 5-HT in rat dorsal raphe neurons / N. J. Penington, J. S. Kelly, A. P. Fox // Proc. R. Soc. London Ser. B. – 1992. – V. 248. – P. 171–79.
174. Peteris, A. Interaction of forskolin with effect of atropine on [3H] acetylcholine secretion in guinea-pig ileum myenteric plexus / A. Peteris, V. R. Ogren // Journal of Physiology. – 1988. – V. 395. – P. 441–453.
175. Petralia, R. S. Trafficking and Targeting of NMDA Receptors / R. S. Petralia, R. A. Al-Hallaq, R. J. Wenthold // Biology of the NMDA Receptor. – 2009. - Boca Raton. - FL CRC Press. – Chapter 8.
176. Petrov, K. A. Schwann cells sense and control acetylcholine spillover at the neuromuscular junction by  $\alpha 7$  nicotinic receptors and butyrylcholinesterase / K. A. Petrov, E. Girard, A. D. Nikitashina, C. Colasante, V. Bernard V, L. Nurullin, J. Leroy, D. Samigullin, O. Colak, E. Nikolsky, B. Plaud, E. Krejci // J Neurosci. – 2014. – V. 34. - № 36. – P. 11870-83.
177. Poage, R. E. Presynaptic calcium influx, neurotransmitter release, and neuromuscular disease / R. E. Poage, S. D. Meriney // Physiol Behav. – 2002. – V. 77. – P. 507–12.
178. Pozzan, T. Molecular and cellular physiology of intracellular calcium stores / T.

- Pozzan, R. Rizzuto, P. Volpe, Meldolesi // *J. Physiol. Rev.* – 1994 . - V. 74. - № 3. – P. 595-636.
179. Pozzan, T. Direct interaction of  $G_{\beta/\gamma}$  with a C-terminal  $G_{\beta/\gamma}$ -binding domain of the  $Ca^{2+}$  channel  $\alpha 1$  subunit is responsible for channel inhibition by G protein coupled receptors / N. Qin, D. Platino, R. Olcese, E. Stefani, L. Birnbaumer // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* – 1997. - V. 94. – P. 8866–71.
180. Rathouz, M. M. Synaptic-type acetylcholine receptors raise intracellular calcium levels in neurons by two mechanisms / M. M. Rathouz, D. K. Berg // *Neurosci* – 1994. - V. 14. – P. 6935–45.
181. Re, L. Modulation of acetylcholine release by presynaptic muscarinic autoreceptors / L. Re // *Acta Physiol Pharmacol Ther Latinoam.* – 1999. - V. 49. - № 4. – P. 215-23.
182. Ren, J. Presynaptic muscarinic receptors modulate acetylcholine release from rat antral mucosal/submucosal nerves / J. Ren, R. F. Harty // *Dig Dis Sci.* – 1994. - V. 39. - № 5. – P. 1099-106.
183. Rodriguez-Menchaca, A. A. PIP2 controls voltage-sensor movement and pore opening of Kv channels through the S4-S5 linker / A. A. Rodriguez-Menchaca, S. K. Adney, Q. Y. Tang, X. Y. Meng, A. Rosenhouse-Dantsker, M. Cui, D. E. Logothetis // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2012. - V. 109. - № 36. – P. E2399-408. doi: 10.1073/pnas.1207901109. Epub 2012 Aug 13.
184. Role, L. W. Nicotinic receptors in the development and modulation of CNS synapses / L. W. Role, D. K. Berg // *Neuron.* – 1996. - V. 16. – P. 1077–85.
185. Sabatini, B. L. Optical measurement of presynaptic calcium currents / B. L. Sabatini, W. G. Regehr // *Biophysical Journal.* – 1998. - V. 74. - № 3. – P. 1549-1563.
186. Saggau, P. New methods and uses for fast optical scanning / P. Saggau // *Curr Opin Neurobiol.* – 2006. - V. 16. - № 5. – P. 543-50.
187. Samigullin, D. Calcium Dependence Of Uni-Quantal Release Latencies And Quantal Content At Mouse Neuromuscular Junction / D. Samigullin, E. A. Bukharaeva, F. Vyskočil, E. E. Nikolsky // *Physiol Res.* – 2005. – V. 54. – P. 129-

- 132.
188. Santafe, M. Calcium channels coupled to neurotransmitter release at dually innervated neuromuscular junctions in the newborn rat / M. Santafe, A. Garcia, M. Lanuza, O. Uchitel, J. Tomas // *Neuroscience*. - 2001. - V. 102. - № 3. - P. 697-708.
189. Santafe, M. M. Decreased calcium influx into the neonatal rat motor nerve terminals can recruit additional neuromuscular junctions during the synapse elimination period / M. M. Santafe, N. Garcia, M. A. Lanuza, O. D. Uchitel, I. Salon, J. Tomas // *Neuroscience*. - 2002. - V. 110. - № 1. - P. 147-154.
190. Santafe, M. M. Modulation of ACh release by presynaptic muscarinic autoreceptors in the neuromuscular junction of the newborn and adult rat / M. M. Santafe, I. Salon, N. Garcia, M. A. Lanuza, O. D. Uchitel, J. Tomas // *Eur J Neurosci*. - 2003. - V. 17. - № 1. - P. 119-27.
191. Santafé M. M. Muscarinic autoreceptors modulate transmitter release through protein kinase C and protein kinase A in the rat motor nerve terminal / M. M. Santafe, M. A. Lanuza, N. Garcia, J. Tomàs // *Eur. J. Neurosci*. - 2006. - № 8. - P. 2048-56.
192. Santafé M. M. Coupling of presynaptic muscarinic autoreceptors to serine kinases in low and high release conditions on the rat motor nerve terminal / M. M. Santafe, M. A. Lanuza, N. Garcia, M. Tomas, J. Tomàs // *E Neuroscience*. - 2007. - № 148. - P. 432-40.
193. Seagar, M. Interactions between presynaptic calcium channels and proteins implicated in synaptic vesicle trafficking and exocytosis / M. Seagar, M. Takahashi // *J Bioenerg Biomembr*. - 1998. - V. 30. - № 4. - P. 347-56.
194. Seagar, M. Interactions between proteins implicated in exocytosis and voltage-gated calcium channels / M. Seagar, C. Lévêque, N. Charvin, B. Marquèze, N. Martin-Moutot, J. A. Boudier, J. L. Boudier, Y. Shoji-Kasai, K. Sato, M. Takahashi // *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. - 1999. - V. 354. - № 1381. - P. 289-97.
195. Searl, T. J. Mutual occlusion of P2X ATP receptors and nicotinic receptors on sympathetic neurons of the guinea-pig / T. J. Searl, R. S. Redman, E. M. Silinsky // *J. Physiol*. - 1998. - V. 510. - P. 783-791.

196. Segev, I. Computer study of presynaptic inhibition controlling the spread of action potentials into axonal terminals / I. Segev // *J. Neurophysiol.* – 1990. - V. 633. – P. 987–98.
197. Shahrezaei, V.  $\text{Ca}^{2+}$  from One or Two Channels Controls Fusion of a Single Vesicle at the Frog Neuromuscular Junction / V. Shahrezaei, A. Cao, K. Delaney // *J. Neuroscience.* – 2006. – V. 26. - № 51. – P. 13240-13249.
198. Shapiro, E. Presynaptic inhibition in *Aplysia* involves a decrease in the  $\text{Ca}^{2+}$  current of the presynaptic neuron / E. Shapiro, V. F. Castellucci, E. R. Kandel // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* . – 1980. – V. 77. - № 2. – P. 1185–1189.
199. Shekter, L. R. Regulation of human neuronal calcium channels by G-protein  $\alpha$ -subunits expressed in human embryonic kidney 293 cells / L. R. Shekter, R. Taussig, S. E. Gillard, R. J. Miller // *Mol. Pharmacol.* – 1997. – V. 52. – P. 282–91.
200. Shen, J. X. Nicotinic acetylcholine receptor-mediated calcium signaling in the nervous system / J. X. Shen, J. L. Yakel // *Acta Pharmacol Sin.* – 2009. - V. 30. - № 6. – P. 673-80.
201. Simms, B. A. Neuronal voltage-gated calcium channels: structure, function, and dysfunction / B. A. Simms, G. W. Zamponi // *Neuron.* – 2014. - V. 82. - № 1. – P. 24-45.
202. Sine, S. M. Recent advances in Cys-loop receptor structure and function / S. M. Sine, A. G. Engel // *Nature.* – 2006. - V. 440. - № 7083. – P. 448-55.
203. Sinha, S. R. Optical recording from populations of neurons in brain slices / S. R. Sinha, P. Saggau // *Modern Techniques in Neuroscience Research.* – 1999. - Ch. 16. – P. 459-486.
204. Sinha, S. R. Simultaneous optical recording of membrane potential and intracellular calcium from brain slices / S. R. Sinha, P. Saggau // *Methods.* – 1999. - V. 18. - № 2. – P. 204-14, 175.
205. Skitieva, O. I. Role of stored calcium in the regulation of neurotransmitter quantum size / O. I. Skitieva, V. I. Lapteva, O. P. Balezina // *Bull Exp Biol Med.* – 2012. - V. 152. - № 4. – P. 392-6.
206. Slutsky, I. Presynaptic effects of muscarine on ACh release at the frog

- neuromuscular junction / I. Slutsky, H. Parnas, I. Parnas // *J. Physiol.* – 1999. – V. 514. - № 3. – P. 769-82.
207. Slutsky, I. Presynaptic M<sub>2</sub> muscarinic receptors are involved in controlling the kinetics of ACh release at the frog neuromuscular junction / I. Slutsky, I. Silman, I. Parnas, H. Parnas // *Journal of Physiology.* – 2001. – V. 536. - № 3. – P. 717–725.
208. Slutsky, I. Ca<sup>2+</sup>-independent feedback inhibition of acetylcholine release in frog neuromuscular junction / I. Slutsky, G. Rashkovan, H. Parnas, I. Parnas // *J. Neurosci.* – 2002. – V. 22. - № 9. – P. 3426-33.
209. St. John P. A. Agonists Cause Endocytosis of Nicotinic Acetylcholine Receptors on Cultured Myotubes / St. John P. A., H. Gordon // *J Neurobiol.* – 2001. - V. 49. - № 3. – P. 212-23.
210. Starke, K. Presynaptic receptors / K. Starke // *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* – 1981. - V. 21. – P. 7-30.
211. Starke, S. Modulation of neurotransmitter release by presynaptic autoreceptors / K. Starke, M. Göthert, H. Kilbinger // *Physiol. Rev.* – 1989. - V. 69. - № 3. – P. 864-989.
212. Suzuki, S. Ca<sup>2+</sup> dynamics at the frog motor nerve terminal / S. Suzuki, M. Osanai, M. Murase, N. Suzuki, K. Ito, T. Shirasaki, K. Narita, K. Ohnuma, K. Kuba, H. Kijima // *European Journal of Physiology.* – 2000. – V. 440. - № 3. – P. 351-365.
213. Suzuki, S. Ca<sup>2+</sup> dynamics at the frog motor nerve terminal / S. Suzuki, M. Osanai, M. Murase, N. Suzuki, K. Ito, T. Shirasaki, K. Narita, K. Ohnuma, K. Kuba, H. Kijima // *Pflügers Arch.* – 2000. – V. 440. - № 3. – P. 351-365.
214. Tafoya, L. C. The role of the t-SNARE SNAP-25 in action potential-dependent calcium signaling and expression in GABAergic and glutamatergic neurons / L. C. Tafoya, C. W. Shuttleworth, Y. Yanagawa, K. Obata, M. C. Wilson // *BMC Neurosci.* – 2008. - V. 9. - № 105.
215. Tareilus, E. Presynaptic calcium channels: pharmacology and regulation / E. Tareilus, H. Breer // *Neurochem Int.* – 1995. - № 6. – P. 539-58.
216. Tomas, J. Presynaptic Membrane Receptors in Acetylcholine Release Modulation in the Neuromuscular Synapse / J. Tomas, M. M. Santafe, N. Garcia, M. A. Lanuza,

- M. Tomas, N. Besalduch, T. Obis, M. Priego, E. Hurtado // Spain J Neurosci Res. – 2014. - V. 92. - № 5. – P. 543-54.
217. Toth, P. T. Presynaptic Calcium and sodium currents evoked by action potential waveforms in rat sympathetic neurones / P. T. Toth, R. J. Miller // J. Physiol. – 1995. - V. 485. – P. 43–57.
218. Toth, P. T. Selective G-protein regulation of neuronal calcium channels / P. T. Toth, L. R. Shekter, G. H. Ma, L. H. Philipson, R. J. Miller // J. Neurosci. – 1996. - V. 16. – P. 4617–24.
219. Tsang, C. W. Alpha-Latrotoxin releases calcium in frog motor nerve terminals / C. W. Tsang, D. B. Elrick, M. P. Charlton // J Neurosci. – 2000. - V. 20. - № 23. – P. 8685-92.
220. Tsentsevitsky, A.N. Presynaptic Voltage-Dependent Calcium Channels at the Frog Neuromuscular Junction / A.N. Tsentsevitsky, D.V. Samigullin, L.F. Nurullin, E.F. Khaziev, E.E. Nikolsky, E.A. Bukharaeva // Frogs: Genetic Diversity, Neural Development and Ecological Implications. NOVA Publishers, New-York, Henry Lambert editor. – 2014. Chapter V. P.179-194
221. Tsien, R. Y. Fluorescent indicators of ion concentrations / R. Y. Tsien // Methods Cell Biol. – 1989. - V. 30. – P. 127-56.
222. Unwin, N. Refined structure of the nicotinic acetylcholine receptor at 4A resolution / N. Unwin // J. Mol. Biol. – 2005. - V. 346. – P. 967–989.
223. Van der Kloot, W. Cholinergic agonists decrease quantal output at the frog neuromuscular junction by targeting a calcium channel blocked by w-conotoxin / W. Van der Kloot, J. M. Ligia, A. Naves // Pflugers Arch. – 1997. - V. 434. - № 6. – P. 735-41.
224. Vannucchi, M. G. Muscarinic receptor modulation of acetylcholine release from rat cerebral cortex and hippocampus / M. G. Vannucchi, G. Pepeu // Neurosci Lett. – 1995. - V. 190. - № 1. – P. 53-6.
225. Verrino, S. Calcium modulation and high calcium permeability of neuronal nicotinic acetylcholine receptors / S. Verrino, M. Amador, C. W. Luitje, J. Patrick, J. A. Dani // Neuron. – 1992. - V. 8. – P. 127–34.



226. Vetulani, J. Pharmacological receptors: the membrane receptors for neurotransmitters and drugs / J. Vetulani // *Acta Physiol Pol.* – 1988 . - V. 39. - № 2. – P. 81-97.
227. Vizi, E. S. Prejunctional modulation of acetylcholine release from the skeletal neuromuscular junction: link between positive (nicotinic)- and negative (muscarinic)-feedback modulation / E. S. Vizi, G. T. Somogyi // *Br J Pharmacol.* – 1989. - V. 97. - № 1. – P. 65-70.
228. Wadel K. The coupling between synaptic vesicles and Ca<sup>2+</sup> channels determines fast neurotransmitter release / K. Wadel, E. Neher, T. Sakaba // *Neuron.* – 2007. - V. 53. - № 4. – P. 563-75.
229. Walters, C. L. Mu-opioid receptor and CREB activation are required for nicotine reward / C. L. Walters, J. N. Cleck, Y. C. Kuo, J. A. Blendy // *Neuron.* – 2005. - V. 46. – P. 933–943.
230. Webb, S. E. Calcium in development: from ion transients to gene expression / S.E. Webb, M. Moreau, C. Leclerc, A. L. Miller // *Bioessays.* – 2001. - V. 23. - № 4. – P. 372-4.
231. Wessler, I. Control of transmitter release from the motor nerve by presynaptic nicotinic and muscarinic autoreceptors / I. Wessler // *Trends Pharmacol Sci.* – 1989. - V. 10. - № 3. – P. 110-114.
232. Wheeler, D. B. Roles of N type and Q type Ca channels in supporting hippocampal synaptic transmission / D. B. Wheeler, A. Randall, R. W. Tsien // *Science.* – 1994. - V. 264. – P. 107–11.
233. Wonnacott, S. Presynaptic nicotinic ACh receptors / S. Wonnacott // *Trends Neurosci.* – 1997. - V. 20. – P. 92–98.
234. Wu, L. G. Nerve activity but not intracellular calcium determines the time course of endocytosis at the frog neuromuscular junction / L. G. Wu, W. J. Betz // *Neuron.* – 1996. – V. 17. - № 4. – P. 769-779.
235. Wu, L. G. Presynaptic inhibition of elicited neurotransmitter release / L. G. Wu, P. Saggau // *Trends Neurosci.* – 1997. - V. 20. - № 5. – P. 204-12.
236. Yazejian, B. Direct measurements of presynaptic calcium and calcium-activated

- potassium currents regulating neurotransmitter release at cultured *Xenopus* nerve-muscle synapses / B. Yazejian, D. A. DiGregorio, J. L. Vergara, R. E. Poage, S. D. Meriney, A. D. Grinnell // *J. Neurosci.* – 1997. - V. 17. - № 9. – P. 2990–3001.
237. Zamponi, G. Crosstalk between G-proteins and protein kinase C mediated by the calcium channel  $\alpha 1$ -subunit / G. Zamponi, W. E. Bourinet, D. Nelson, J. Nargeot, T. P. Snutch // *Nature.* – 1997. – V. 385. - № 3. – P. 442–46.
238. Zamponi, G. W. Modulation of voltage-dependent calcium channels by G proteins / G. W. Zamponi, T. P. Snutch // *Curr. Opin. Neurobiol.* – 1998. – V. 8. - № 3. – P. 351-6.
239. Zhang, S. J. GABA activated chloride channels in secretory nerve endings / S. J. Zhang, M. B. Jackson // *Science* – 1993. – V. 259. – P. 531–34.
240. Zhang, J. F. Multiple structural elements in voltage dependent Ca channels support their inhibition by G-proteins / J. F. Zhang, P. T. Ellinor, R. W. Aldrich, R. W. Tsien // *Neuron* – 1996. – V. 17. – P. 991–1003.
241. Zimmermann, H. Neurotransmitter release / H. Zimmermann // *FEBS Lett.* – 1990. - V. 268. - № 2. – P. 394-9.
242. Zou, H. Imaging  $\text{Ca}(2+)$  entering the cytoplasm through a single opening of a plasma membrane cation channel / H. Zou, L. M. Lifshitz, R. A. Tuft, K. E. Fogarty, J. J. Singer // *J Gen Physiol.* – 1999. – V. 114. - № 4. – P. 575-88.
243. Zucker, R. S. Relationship between transmitter release and presynaptic calcium influx when calcium enters through discrete channels / R. S. Zucker, A. L. Fogelson // *Pflugers Arch.* – 1986. - V. 83. - № 9. – P. 3032-6.