

На правах рукописи



Хазиев Эдуард Фаритович

**ИЗМЕНЕНИЕ КАЛЬЦИЕВОГО ТРАНЗИЕНТА В ДВИГАТЕЛЬНОМ
НЕРВНОМ ОКОНЧАНИИ ПОД ДЕЙСТВИЕМ ХОЛИНЕРГИЧЕСКИХ
АГЕНТОВ**

03.01.02 – биофизика

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Казань 2015

Работа выполнена в лаборатории биофизики синаптических процессов Федерального государственного бюджетного учреждения науки Казанского института биохимии и биофизики Казанского научного центра Российской Академии наук (КИББ КазНЦ РАН)

Научный руководитель:

Самигуллин Дмитрий Владимирович

кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории биофизики синаптических процессов ФГБУН КИББ КазНЦ РАН, г. Казань

Официальные оппоненты:

Зефирова Андрей Львович

доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент РАН, заведующий кафедрой нормальной физиологии ГБОУ ВПО Казанского государственного медицинского университета Минздрава России, г. Казань

Никитин Евгений Сергеевич

кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории клеточной нейробиологии обучения ФГБУН Института высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, г. Москва

Ведущее научное учреждение:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, г. Санкт-Петербург.

Защита состоится «18» июня 2015 г. в 11:00 часов на заседании диссертационного совета Д 002.005.01 при Казанском институте биохимии и биофизики Казанского научного центра РАН по адресу: 420111 г. Казань, ул. Лобачевского, д. 2/31, тел/факс.: (843)2927347

С диссертацией можно ознакомиться в Центральной научной библиотеке Казанского научного центра РАН. Электронная версия автореферата размещена на официальном сайте КИББ КазНЦ РАН <http://www.kibb.knc.ru>

Автореферат разослан «__» _____ 2015 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук
e-mail: dissovet@kibb.knc.ru

Пономарёва Анастасия Анатольевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

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 нервное окончание при его деполяризации (Katz, Miledi, 1965 a). 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 транзистент). Таким образом, можно оценивать изменение концентрации ионов, входящих в нервное окончание 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 транзистента в нервно-мышечном синапсе. В данном исследовании мы экспериментально оценивали вход кальция в нервное окончание при различных воздействиях на пресинаптические холинорецепторы.

Цель 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 транзистента в нервном окончании лягушки.
2. Сопоставить действие холиномиметиков на параметры квантовой секреции и на амплитуду кальциевого транзистента.
3. Изучить влияние специфических агонистов и блокаторов холинорецепторов на кальциевый транзистент в двигательном нервном окончании.

4. Проверить гипотезу об участии кальциевых каналов и внутриклеточных кальциевых депо в реализации действия агонистов холинорецепторов на кальциевый транзиент.
5. Исследовать эффекты эндогенного ацетилхолина на кальциевый транзиент.
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 M_2 -подтипа 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 Ca^{2+} -транзиента, который отражает вход ионов кальция в аксоплазму 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 транзиента) в нервном окончании. Показано, что активация мускариновых рецепторов мускарином и никотиновых – никотином приводит к сходному эффекту - уменьшению Ca^{2+} -транзиента. Впервые было показано, что блокада никотиновых рецепторов д-тубокурарином приводит к увеличению Ca^{2+} -транзиента. Впервые было показано, что блокада мускариновых рецепторов атропином и метоктрамином (блокатором M_2 -подтипа мускариновых рецепторов) повышает Ca^{2+} -транзиент. Метоктрамин предотвращал эффекты мускарина, а д-тубокурарин – никотина на Ca^{2+} -транзиент. При обобщении данных об уменьшении Ca^{2+} -транзиента под действием ингибитора холинэстеразы прозерина и об увеличении Ca^{2+} -транзиента 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 -подтипа.

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 нервное окончание 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 нервное окончание. 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 нервное окончание 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 деполаризующего 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.); Международной конференции «Assembly and Disassembly of the Nervous System», Реховот, Израиль, 2015 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.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объект. 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).

Регистрация Ca^{2+} -транзиента. Оценку входа Ca^{2+} в нервное окончание (Ca^{2+} -транзиент) осуществляли с помощью измерения интенсивности свечения Ca^{2+} -чувствительного флуоресцентного красителя, взаимодействующего с кальцием, входящим в нервное окончание (НО) после развития пресинаптического потенциала действия (Tsien, 1989). После выделения нервно-мышечного препарата осуществляли загрузку двигательных НО флуоресцентным Ca^{2+} -красителем Oregon Green 488 BAPTA-1 Hexapotassium Salt (cell impermeant) в концентрации 50 мМ. Загрузку осуществляли через культю нерва (Peng, Zucker, 1993; Wu, Betz, 1996; Tsang et al., 2000). Короткий отрезок нерва длиной ~3 мм помещали в канюлю, изолируя его от раствора Рингера. На срез нерва помещали каплю краски объемом 0,1-0,3 мкл. Далее производили инкубацию препарата в течение 4-6 часов во влажной камере и 15-20 часов в холодильнике при температуре 8 ± 2 °С. Выделенную мышцу помещали в экспериментальную ванночку объемом 5 мл, через которую протекал раствор Рингера следующего состава (мМ): NaCl – 113,0, KCl – 2,5, $NaHCO_3$ – 3,0, $MgCl_2$ – 6,0, $CaCl_2$ – 0,9. pH раствора поддерживали на уровне 7,2-7,4. Мышечные сокращения блокировали снижением содержания ионов кальция в растворе (0,9 мМ) и добавлением магния (6,0 мМ). Эксперименты проводили при температуре $20,0 \pm 0,3$ °С. Регистрацию флуоресцентного сигнала осуществляли с помощью фотометрической установки на базе микроскопа Olympus VX-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 (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. 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. В качестве источника света использовали монохроматор Polyhrom V (Till Photonics, Munich, Germany), настроенный на длину волны возбуждения красителя – 488 нм. Для уменьшения выцветания красителя, освещение препарата осуществляли только при регистрации кальциевых сигналов в ответ на раздражение нерва. Время, необходимое для регистрации сигнала, составляло 400 мс, ограничение времени освещения выполняли при помощи акустооптического затвора, встроенного в монохроматор. Для проведения статистической обработки данных делали

выборку из 60 сигналов. Раздражение нерва осуществляли прямоугольными импульсами сверхпороговой амплитуды длительностью 0.2 мс с частотой 0.5 имп/с при помощи «всасывающего» электрода. Сигнал от фотодиода оцифровывали с помощью АЦП Digidata 1450B (Axon Instruments, California, USA). Регистрацию кальциевых сигналов, синхронизацию освещения и стимуляции производили при помощи программы WinWcp Stanford University (Strathclyde University, Glasgow, UK). Для обработки флуоресцентных сигналов в каждом эксперименте измерялась, помимо изменения интенсивности свечения красителя ΔF , интенсивность свечения красителя без стимуляции F_0 . Изменение интенсивности флуоресцентного сигнала выражали через отношение изменения флуоресценции к базовому свечению $\Delta F/F_0 = (F - F_0)/F_0$, где F – уровень свечения красителя при стимуляции (Sinha, Saggau, 1999; Shahrezaei et al., 2006). В каждом эксперименте проводили усреднение 60 флуоресцентных ответов в контроле и после действия исследуемых веществ.

Электрофизиологические исследования. Спонтанные и вызванные токи концевой пластинки (соответственно, мТКП и ТКП) регистрировали методом двухэлектродной фиксации мембранного потенциала мышечного волокна на уровне -60 мВ. Использовали усилитель Axoclamp 900A. Внутриклеточные электроды, заполненные раствором 3М KCl, имели сопротивление 5-10 МОм. Величину среднего квантового состава ТКП оценивали методом деления площадей ТКП и мТКП. Одновременную регистрацию токов НО и ТКП осуществляли микроэлектродами с диаметром кончика 2.5-3.5 мкм, заполненными раствором Рингера или NaCl (0.5 мМ) с сопротивлением 1.0-1.5 МОм. 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 Axioskop.

Реагенты. В экспериментах были использованы вещества (Sigma): карбахолин, ацетилхолин, прозерин, атропин, д-тубокурарин, мускарин, никотин, пирензепин, метоктрамин, мекамиламин, метилликаконитин (MLA), рианодин, конотоксин GVIA.

Статистическая обработка результатов. Для статистической обработки экспериментально полученных сигналов Ca^{2+} -транзиента 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 $P < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1. Влияние ацетилхолина и карбахолина на Ca^{2+} -транзиент и квантовый состав токов концевой пластинки¹

Производили регистрацию миниатюрных токов концевой пластинки (мТКП) и токов концевой пластинки (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 $46 \pm 10\%$ ($n=4$,

¹ Данная серия экспериментов выполнена совместно с м.н.с. Фатиховым Н.Ф.

$P < 0.05$) по сравнению с контролем (Рис. 1 А, Б). Под влиянием ацетилхолина в концентрации 100 мкМ квантовый состав снижался на $49 \pm 7\%$ ($n=18$, $P < 0.05$).

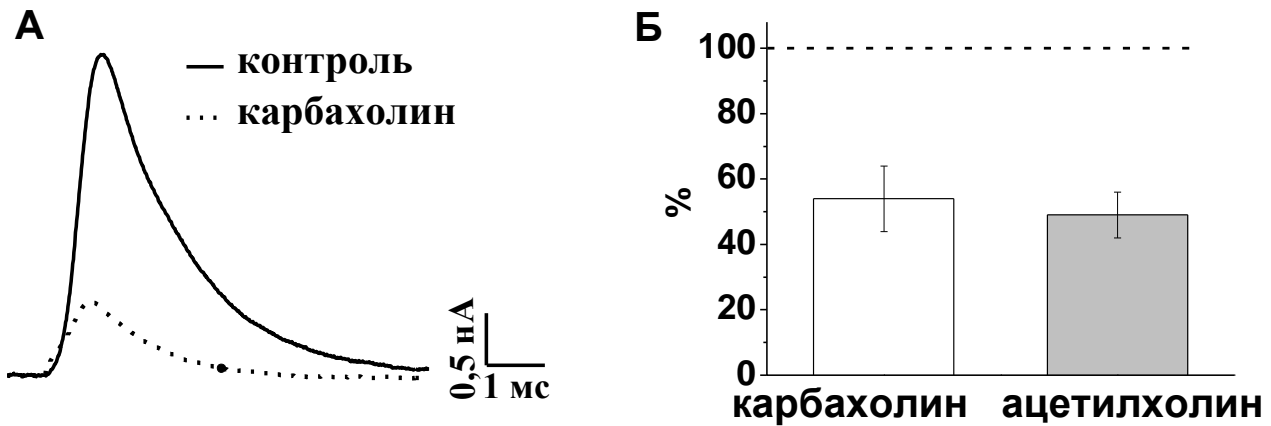


Рис. 1. А – Усредненные вызванные токи концевой пластинки в контроле и под действием карбахолина. Б – изменение квантового состава под действием карбахолина

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

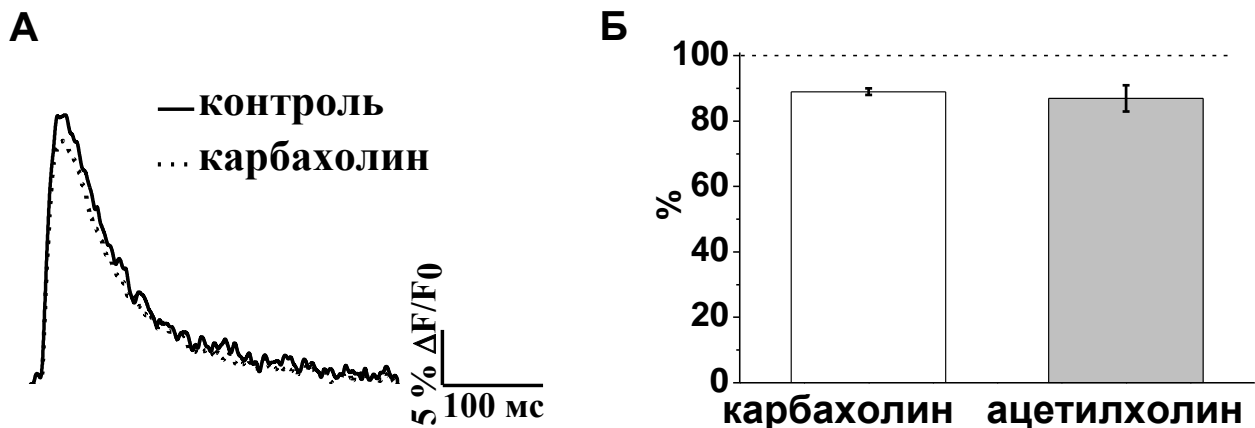


Рис. 2. А – Изменение интенсивности флуоресцентного сигнала $\Delta F/F_0$ в контроле и под действием карбахолина. Б – Изменение амплитуды Ca^{2+} -транзientа под действием карбахолина и ацетилхолина по отношению к контролю в % (контроль принят за 100 %)

Поскольку ацетилхолин и карбахолин уменьшали Ca^{2+} -транзient и квантовый состав токов концевой пластинки, можно сделать вывод о наличии холинергической модуляции процесса выделения медиатора посредством изменения входа 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. 2). Это можно объяснить, принимая во внимание тот факт, что зависимость величины квантового состава от содержания 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.

2. Действие холиномиметика карбахолина и специфических агонистов холинорецепторов никотина и мускарина на Ca^{2+} -транзист до и после обработки препарата антагонистами никотиновых и мускариновых холинорецепторов

Очевидно, что действие холинергических агентов может быть опосредовано пресинаптическими рецепторами никотинового и мускаринового типов (Dodgе, Rahamimoff, 1967; Nikolsky et al., 2004). Для выяснения типов рецепторов, опосредующих эффекты холиномиметиков на Ca^{2+} -транзист, исследовали влияние специфических никотиновых и мускариновых агонистов на величину Ca^{2+} -транзиста. Никотин – активатор всех типов никотиновых рецепторов (Wonnacott, 1997) в концентрации 10 мкМ достоверно снижал амплитуду Ca^{2+} -транзиста на $15\pm 3\%$ ($n=6$, $P<0.05$, Рис. 3 Б). После добавления в перфузионный раствор активатора всех типов мускариновых рецепторов мускарина (10 мкМ) наблюдалось (Рис. 3 Б) снижение амплитуды Ca^{2+} -транзиста на $8\pm 2\%$ ($n=5$, $P<0.05$). Для проверки специфичности описанного действия агонистов были проведены серии экспериментов, в которых агонист вводился после обработки нервно-мышечного препарата блокатором рецепторов соответствующего типа. Эксперименты показали, что частичная блокада никотиновых рецепторов d-тубокурарином (10 мкМ) вызывала достоверное уменьшение эффекта никотина на Ca^{2+} -транзист. Обработка препарата блокатором мускариновых рецепторов атропином (1 мкМ) полностью устраняла пресинаптический эффект мускарина.

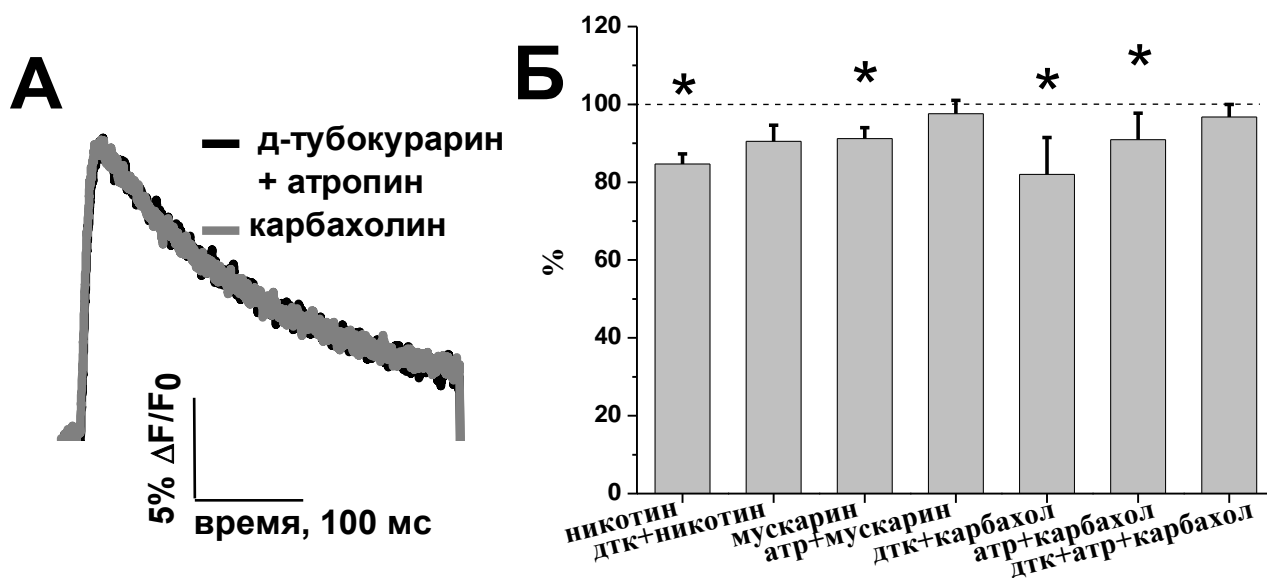


Рис. 3. А – Изменение интенсивности флуоресцентного сигнала $\Delta F/F_0$ под действием карбахолина на фоне предварительной обработки препарата блокаторами – атропином и д-тубокурарином. Б – Изменение амплитуды Ca^{2+} -транзиста под действием карбахолина и специфических агонистов никотиновых и мускариновых рецепторов до и после обработки препарата блокаторами холинорецепторов. На рисунке обозначены: дтк – д-тубокурарин, атр – атропин, карбахол – карбахолин

Приведенные выше данные дают основания думать, что эффекты карбахолина и ацетилхолина могут быть связаны с активацией как никотиновых, так и мускариновых пресинаптических ацетилхолиновых рецепторов. Для проверки этой гипотезы изучали действие карбахолина на фоне блокаторов никотиновых и мускариновых рецепторов. В присутствии атропина карбахолин снижал Ca^{2+} -транзиент на $9\pm 5\%$ ($n=6$, $P<0.05$, Рис. 3 Б), а в присутствии д-тубокурарина – на $18\pm 9\%$ ($n=4$, $P<0.05$, Рис. 3 Б). Предварительная инкубация нервно-мышечного препарата в растворе, содержащем как д-тубокурарин, так и атропин, полностью устраняла эффекты карбахолина на Ca^{2+} -транзиент (Рис. 3 А, Б). Полученные данные свидетельствуют о том, что эффекты холинергических агентов связаны с активацией как никотиновых, так и мускариновых рецепторов. Далее определяли подтипы мускариновых и никотиновых рецепторов, участвующих в регуляции входа кальция в нервное окончание.

3. Выявление подтипов мускариновых рецепторов, опосредующих эффекты холиномиметиков на Ca^{2+} -транзиент

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). Для выяснения подтипа мускариновых рецепторов, реализующих эффект снижения Ca^{2+} -транзиента мускарином, изучали влияние блокаторов, специфичных для этих подтипов рецепторов. Под действием блокатора M_1 -подтипа рецепторов пирензепина (100 нМ) наблюдали снижение амплитуды Ca^{2+} -транзиента на $14\pm 7\%$ ($n=5$, $P<0.05$, Рис. 4 А), но на его фоне мускарин по-прежнему вызывал падение амплитуды Ca^{2+} -сигнала (Рис. 4 А).

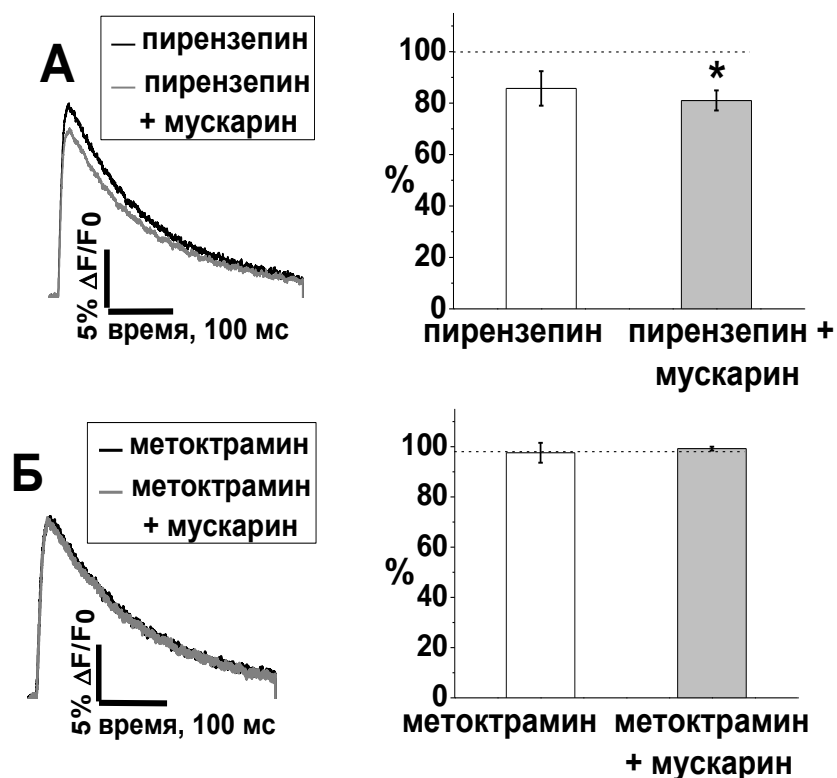


Рис. 4. Изменение амплитуды Ca^{2+} -транзиента под действием мускарина на фоне пирензепина (А) и метоктрамина (Б)

Добавление в перфузируемый раствор метоктрамина (10 нМ), специфического блокатора M_2 -подтипа мускариновых рецепторов, не приводило к изменению параметров Ca^{2+} -ответа. Однако в его присутствии не наблюдали угнетающего действия мускарина (Рис. 4 Б). Таким образом, блокирование M_2 -подтипа мускариновых рецепторов устраняло угнетающее Ca^{2+} -транзистент действие мускарина. Можно заключить, что действие холинергических агентов на Ca^{2+} -транзистент связано с активацией мускариновых рецепторов подтипа M_2 .

4. Выявление подтипов никотиновых рецепторов, опосредующих эффекты холиномиметиков на Ca^{2+} -транзистент

Далее изучали, через какие подтипы никотиновых рецепторов может осуществляться ингибирующее действие холиномиметиков на Ca^{2+} -транзистент в нервном окончании 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 Ca^{2+} -транзистент. Мекамиламин блокирует различные подтипы никотиновых рецепторов при увеличении концентрации от 640 нМ до 6,9 мкМ (Papke et al., 2001; Rabenstein et al., 2006; Ostroumov et al., 2008).

Мекамиламин в концентрации 640 нМ блокирует $\alpha 3\beta 4$ -подтип никотиновых рецепторов. В наших экспериментах добавление мекамиламина в данной концентрации вызывало увеличение Ca^{2+} -транзистента на $18 \pm 3\%$ ($n=5$, $P<0.05$, Рис. 5). Добавление в раствор никотина после обработки блокатором $\alpha 3\beta 4$ -подтипа вызывало снижение Ca^{2+} -транзистента на $9 \pm 4\%$ ($n=5$, $P<0.05$, Рис. 5).

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 Ca^{2+} -транзистента на $16 \pm 2\%$ ($n=3$, $P<0.05$, Рис. 5). Никотин при заблокированных $\alpha 3\beta 4$ - и $\alpha 4\beta 2$ -подтипах вызывал снижение Ca^{2+} -транзистента на $19 \pm 4\%$ ($n=3$, $P<0.05$, Рис. 5).

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 Ca^{2+} -транзистента на $23 \pm 7\%$ ($n=6$, $P<0.05$, Рис. 5). Никотин на фоне заблокированных $\alpha 3\beta 4$ -, $\alpha 4\beta 2$ и $\alpha 3\beta 2$ -подтипов снижал Ca^{2+} -транзистент на $14 \pm 2\%$ ($n=6$, $P<0.05$, Рис. 5).

Мекамиламин в концентрации 6,9 мкМ, помимо вышперечисленных подтипов мускариновых рецепторов, также вызывает блокаду $\alpha 7$ -субъединицы. Эксперименты показали, что добавление его в данной концентрации приводило увеличению Ca^{2+} -транзистента на $15 \pm 8\%$ ($n=3$, $P<0.05$, Рис. 5). Добавление никотина при заблокированной $\alpha 7$ -субъединице мекамиламином вызывало снижение Ca^{2+} -транзистента на $8 \pm 2\%$ ($n=3$, $P<0.05$, Рис. 5).

Метилликаконитин (MLA) является специфическим блокатором $\alpha 7$ -субъединицы никотинового рецептора. Добавление в раствор MLA в концентрации 10 нМ увеличивало Ca^{2+} -транзистент на $13 \pm 11\%$ ($n=5$, $P<0.05$, Рис. 5). Однако, добавление в раствор с MLA никотина приводило к снижению Ca^{2+} -транзистента на $11 \pm 5\%$ ($n=6$, $P<0.05$, Рис. 5).

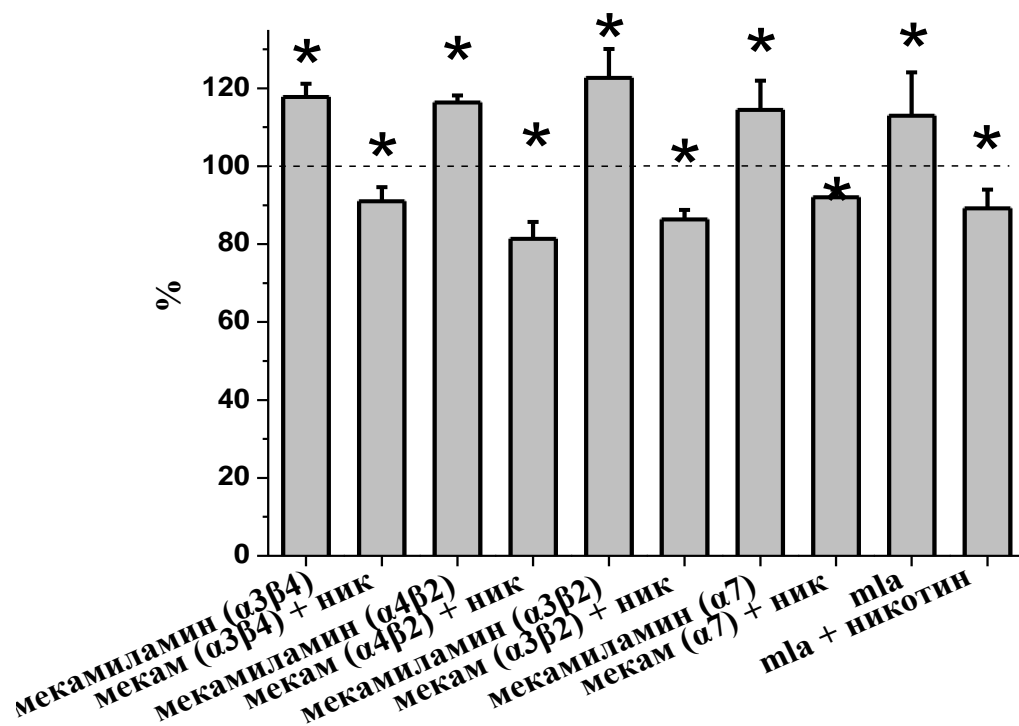


Рис. 5. Изменение амплитуды Ca^{2+} -транзиента под действием никотина на фоне обработки препарата раствором с добавлением MLA (блокада $\alpha 7$) и мекамиламина в концентрациях, блокирующих $\alpha 7$ -, $\alpha 3\beta 2$ -, $\alpha 4\beta 2$ -, $\alpha 3\beta 4$ -подтипы холинорецепторов никотинового типа. На рисунке обозначены: ник – никотин, мекам – мекамиламин. Контроль принят за 100%

Важно заметить, что под действием каждого из блокаторов наблюдали увеличение кальциевого транзиента. Возможно, это является следствием того, что эндогенный ацетилхолин в нормальных физиологических (интактных) условиях угнетает вход 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 Ca^{2+} -транзиента, поскольку на фоне каждого из блокаторов никотин снижал амплитуду Ca^{2+} -транзиента. Можно предположить возможность существования другого подтипа никотиновых рецепторов, который может опосредовать действие никотина на содержание Ca^{2+} в пресинапсе.

5. Участие Ca^{2+} -каналов в реализации эффектов холиномиметиков на Ca^{2+} -транзиент

Одним из механизмов уменьшения входа Ca^{2+} в нервное окончание при активации холинорецепторов может быть прямое воздействие на проводимость потенциал-зависимых Ca^{2+} -каналов N типа. Это основной тип 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 ω -конотоксина GVIA, блокирующего каналы N-типа. В следующей серии экспериментов мы проверяли, не могут ли эффекты холиномиметиков на вход Ca^{2+} в нервное окончание быть связанными с регуляцией работы Ca^{2+} -каналов. Эксперименты показали, что обработка препарата ω -конотоксином GVIA снижает Ca^{2+} -транзист на $35 \pm 7\%$ ($n=5$, $P < 0.05$, Рис. 6 А). При заблокированных каналах N-типа угнетающее действие карбахолина отсутствует (Рис. 6 Б). Можно заключить, что в реализации эффекта карбахолина на уровень Ca^{2+} в нервном окончании лягушки участвуют Ca^{2+} -каналы N-типа.

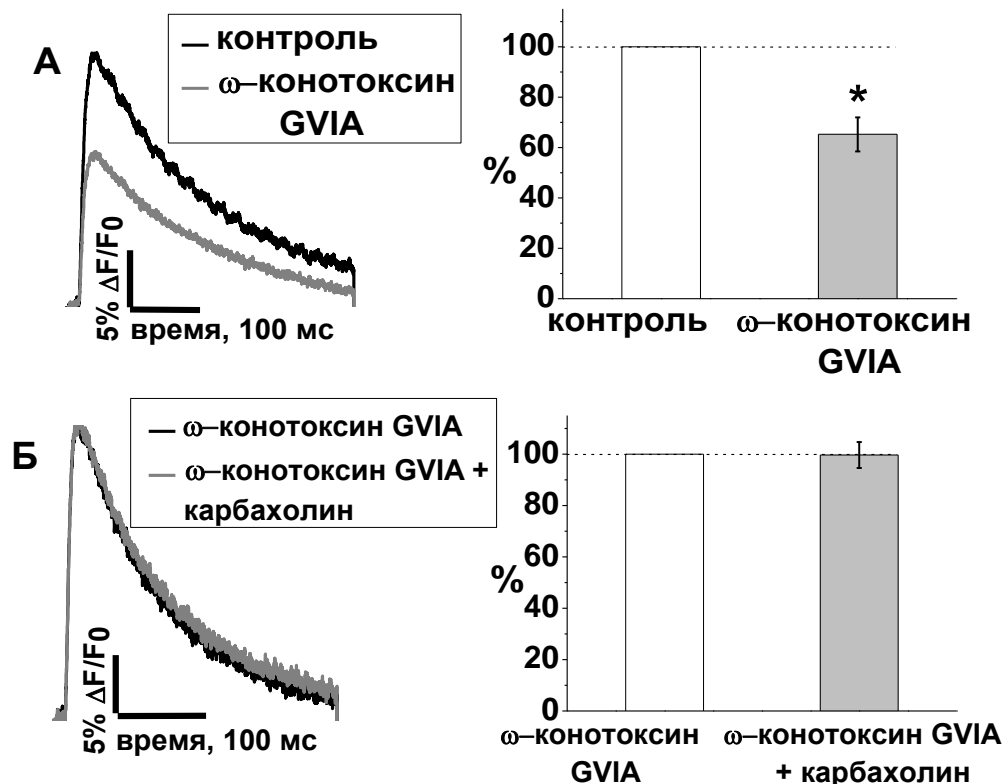


Рис. 6. А – Изменение амплитуды Ca^{2+} -транзиста под действием блокатора N-типа Ca^{2+} -каналов конотоксина по отношению к контролю (100 %). Б – действие карбахолина на Ca^{2+} -транзист на фоне блокады кальциевых каналов ω -конотоксином GVIA

6. Проверка гипотезы об участии эндоплазматического ретикулума в формировании угнетающих эффектов холиномиметиков на Ca^{2+} -транзист

Пресинаптический уровень Ca^{2+} формируется кальцием, входящим через потенциал-чувствительные кальциевые каналы и посредством выброса Ca^{2+} из внутриклеточных депо. Одним из основных внутриклеточных депо в нервном окончании является эндоплазматический ретикулум (ЭР), на поверхности которого находятся рианодиновые рецепторы. Эффекты холиномиметиков на Ca^{2+} -транзист могут быть связаны с модуляцией выброса кальция из ЭР. Для проверки гипотезы об участии внутриклеточного ЭР в реализации угнетающего действия карбахолина на Ca^{2+} -транзист использовали блокатор рианодиновых рецепторов – рианодин в концентрации 10 мкМ. Предварительная аппликация рианодина приводила к снижению Ca^{2+} -транзиста на $19 \pm 4\%$ ($n=5$, $P < 0.05$, Рис. 7 А). Причем применение рианодина в блокирующей концентрации не снимает угнетающего действия карбахолина. Карбахолин, как и в отсутствие блокатора, снижал Ca^{2+} -транзист. Изменение амплитуды Ca^{2+} -ответа составило $12 \pm 8\%$ ($n=5$, $P < 0.05$, Рис. 7 Б).

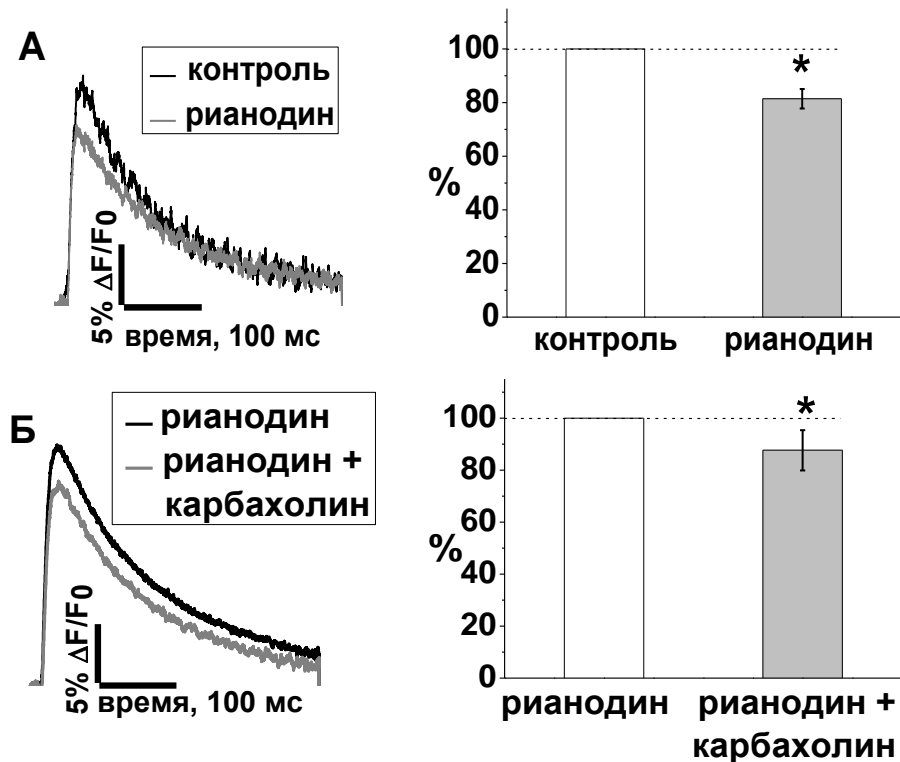


Рис. 7. А – Изменение амплитуды Ca^{2+} -транзientа по отношению к контролю (100 %) при блокаде рианодиновых рецепторов ЭР. Б – Действие карбахолина на Ca^{2+} -транзient на фоне заблокированных рианодиновых рецепторов ЭР

Можно заключить, что выброс Ca^{2+} из ЭР при активации рианодиновых рецепторов участвует в формировании Ca^{2+} -транзientа в условиях низкочастотной стимуляции. Однако, угнетающий эффект холиномиметиков не связан с модуляцией выброса Ca^{2+} из ЭР.

7. Ca^{2+} -транзient в присутствии антагонистов никотиновых и мускариновых холинорецепторов

Поскольку известно, что ацетилхолин из НО выделяется в синаптическую щель при стимуляции двигательного нерва, а также спонтанно в квантовой и неквантовой форме (del Castillo, Engback, 1954; Boyd, Martin, 1956), можно предположить его тоническое угнетающее пресинаптическое действие на Ca^{2+} -транзient через пресинаптические никотиновые и мускариновые рецепторы.

Для проверки этой гипотезы изучали эффекты блокады этих рецепторов в отсутствие экзогенных агонистов соответствующих типов рецепторов.

Блокада никотиновых рецепторов блокатром всех типов никотиновых рецепторов д-тубокурарином (10 мкМ) вызывала увеличение Ca^{2+} -транзientа на $11 \pm 3\%$ ($n=15$, $P < 0.05$, Рис. 8 А). Добавление в раствор неспецифического блокатора мускариновых рецепторов атропина в концентрации 1 мкМ увеличивало Ca^{2+} -транзient на $9 \pm 2\%$ ($n=19$, $P < 0.05$, Рис. 8 Б).

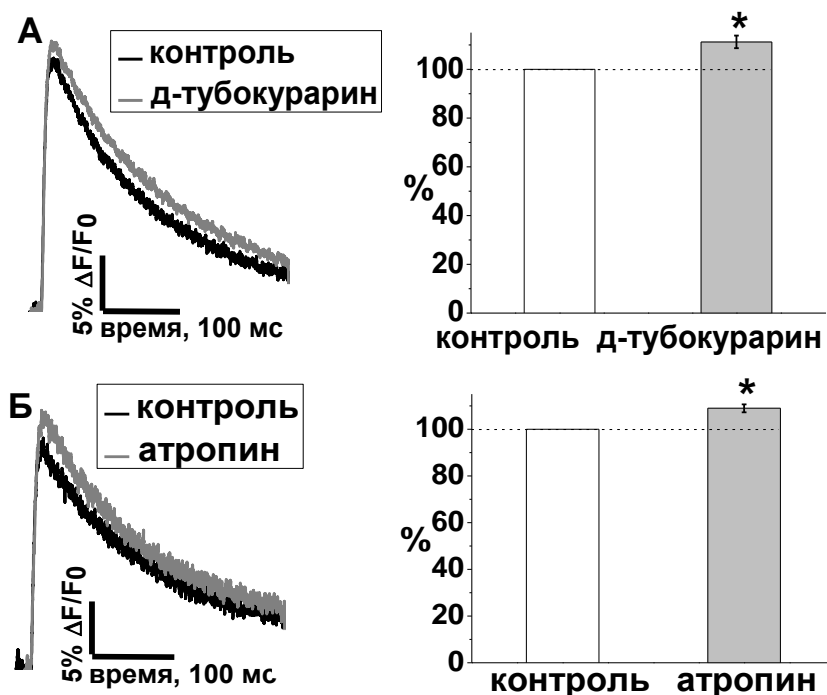


Рис. 8. Изменение амплитуды Ca²⁺-транзientа под действием д-тубокуарина (А) и атропина (Б) по отношению к контролю

Совместная аппликация д-тубокуарина и атропина увеличивала амплитуду Ca²⁺-транзientа на $7 \pm 2\%$ ($n=7$, $P<0.05$). То, что это изменение сопоставимо по величине с эффектами блокаторов по отдельности, указывает на отсутствие аддитивности облегчающих эффектов д-тубокуарина и атропина на Ca²⁺-транзient.

Наблюдаемое возрастание Ca²⁺-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 Ca²⁺ 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 нервное окончание. Это может свидетельствовать о наличии цепи обратной связи регуляции пресинаптического уровня Ca²⁺ при стимуляции двигательного нерва, которая осуществляется при помощи выделяемого в синаптическую щель медиатора – ацетилхолина.

8. Действие ингибитора ацетилхолинэстеразы – прозерина на Ca²⁺-транзient

Проверить гипотезу о тоническом угнетающем действии эндогенного ацетилхолина на вход кальция в нервное окончание можно еще одним способом. Известно, что применение антихолинэстеразных препаратов приводит к накоплению эндогенного ацетилхолина в синаптической щели (Fedorov, 1976). 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 Ca²⁺-транзient ингибирования синаптической ацетилхолинэстеразы прозеринем. В этих условиях, когда

происходило накопление ацетилхолина в синаптической щели при низкочастотной стимуляции двигательного нерва, наблюдали уменьшение Ca^{2+} -ответа: прозерин в концентрации 1 мкМ вызывал уменьшение амплитуды Ca^{2+} -транзиента на $13 \pm 5\%$ ($n=5$, $P < 0.05$, Рис. 9 А, Б). Как и в экспериментах с карбахолом, угнетающее действие прозерина полностью снималось путем обработки препарата блокаторами никотиновых и мускариновых рецепторов (Рис. 9 Б). Эти результаты подтверждают гипотезу о том, что эндогенный ацетилхолин может модулировать содержание Ca^{2+} в пресинапсе за счет воздействия на никотиновые и мускариновые рецепторы.

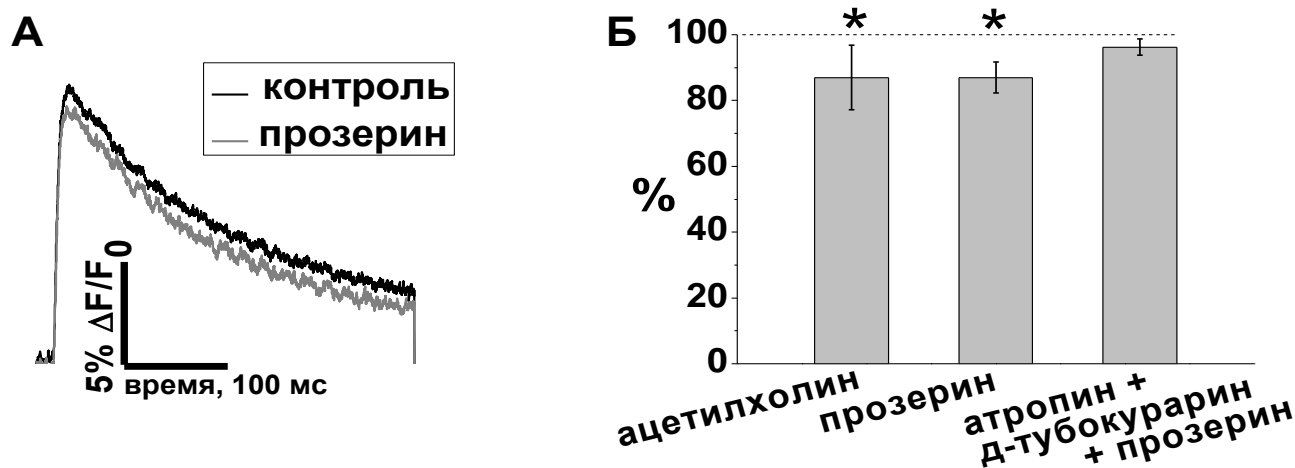


Рис. 9. А – Изменение интенсивности флуоресцентного сигнала $\Delta F/F_0$ в контроле и под действием прозерина. Б – Изменение амплитуды Ca^{2+} -транзиента по отношению к контролю под действием прозерина и прозерина на фоне блокаторов никотиновых и мускариновых рецепторов. Для сравнения эффектов приведено действие экзогенного ацетилхолина

Таким образом, как экзогенный, так и эндогенный ацетилхолин, накапливаемый в щели при блокаде ацетилхолинэстеразы, уменьшали Ca^{2+} -транзиент. Эти данные вместе с увеличением Ca^{2+} -транзиента 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 Ca^{2+} в нервное окончание. Этот угнетающий эффект лежит в основе пресинаптического действия холиномиметиков на процесс выделения медиатора и осуществляется через систему никотиновых и мускариновых рецепторов.

9. Влияние блокады M_2 -холинорецепторов на интенсивность квантовой секреции ацетилхолина при высокочастотной активности синапса²

Стимуляция нерва с высокой частотой не только приводит к аккумуляции в окоლოსинаптическом пространстве нейромедиатора, но и способствует повышению концентрации ионов Ca^{2+} в НО. Таким образом, холинергическая регуляция Ca^{2+} -

² Данная серия экспериментов выполнена совместно с кбн Ковязиной И.В.

метаболизма и квантовой секреции могла бы быть значимой именно в условиях высокого, близкого к физиологическому, уровня нейросекреции. При высокочастотной стимуляции двигательного нерва с частотой 100 имп/с в условиях близкого к физиологическому уровня секреции (содержания ионов Ca^{2+} 1.8 ммоль/л) наблюдали кратковременное возрастание амплитуды ТКП с последующим ее снижением (синаптическая депрессия). В присутствии блокатора M_2 рецепторов метоктрамина (10 нМ) динамика амплитуды ТКП изменялась (Рис. 10). Повышение амплитуды синаптических сигналов по сравнению с контролем можно расценивать как свидетельство устранения блокатором M_2 рецепторов эффекта эндогенного ацетилхолина, накапливающегося в ходе высокочастотной стимуляции нерва.

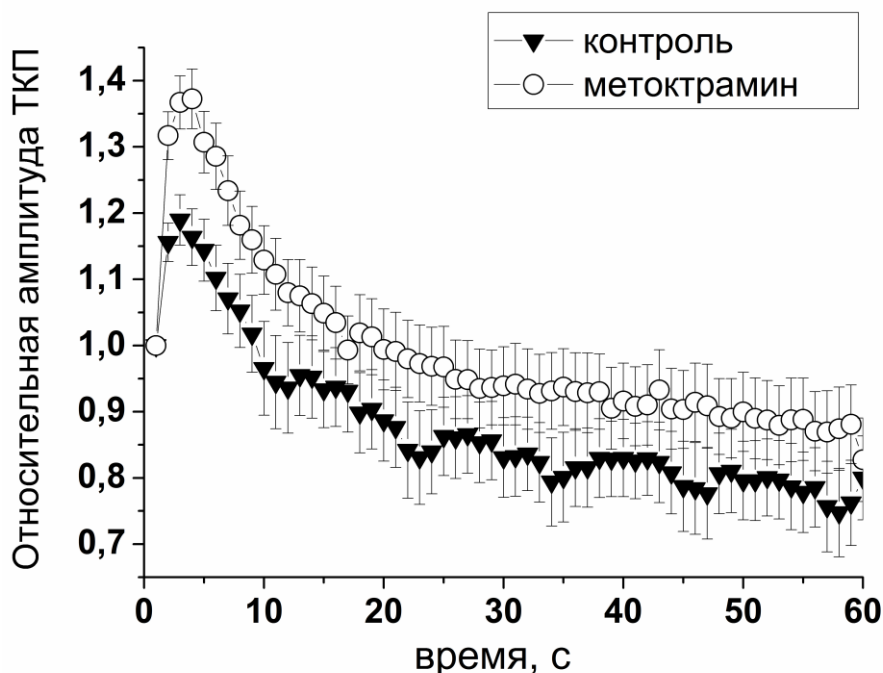


Рис. 10. Относительное изменение амплитуды токов конечной пластинки (ТКП) в ходе высокочастотной пачки импульсов (100 имп/с, за единицу принята амплитуда первого ТКП в пачке) в интактных препаратах и в присутствии M_2 блокатора метоктрамина (10 нМ).

Таким образом, активация M_2 -холинорецепторов при повышенном выделении эндогенного ацетилхолина в случае высокочастотной активности синапса, может угнетать квантовую секрецию ацетилхолина, предположительно за счет снижения уровня внутриклеточного кальция.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенное исследование посвящено изучению влияния холинергических агентов на изменение внутриклеточной концентрации ионов Ca^{2+} , оцениваемой по интенсивности флуоресценции специфического Ca^{2+} -чувствительного красителя, и на параметры синаптической передачи. Ранее был получен экспериментальный материал, который свидетельствует о том, что холиномиметики модулируют синаптическую передачу. Причем никотиновые рецепторы отвечают за изменение кинетики секреции и квантового состава, а мускариновые рецепторы – за регуляцию квантового состава (Nikolsky et al., 2004). В свою очередь квантовый состав и кинетика секреции медиатора зависят от пресинаптического уровня концентрации ионов Ca^{2+} в двигательном нервном окончании (Никольский и др., 2000; Samigullin et al., 2005). Была выдвинута гипотеза о том, что эффекты холиномиметиков на квантовую секрецию медиатора могут быть связаны с модуляцией входа кальция в нервное окончание. Для проверки этой гипотезы мы использовали методику оценки

пресинаптического уровня кальция по интенсивности свечения флуоресцентного кальциевого красителя. В ходе проведенного исследования получен экспериментальный материал, который свидетельствует о том, что карбахолин и ацетилхолин уменьшают интенсивность флуоресцентного Ca^{2+} -ответа. Также получены данные о том, что в условиях ингибирования синаптической ацетилхолинэстеразы прозеринном наблюдается уменьшение кальциевого транзientа. Это свидетельствует о том, что как экзогенные, так и эндогенные холиномиметики способны модулировать вход кальция в нервное окончание. При блокировании мускариновых и никотиновых рецепторов всех подтипов атропином и д-тубокурарином наблюдалось изменение флуоресцентного Ca^{2+} -ответа. Повышение амплитуды Ca^{2+} -транзientа под действием атропина согласуется с ранее описанным возрастанием интенсивности секреции в синапсах лягушки при действии атропина, снимающего тоническое действие эндогенного ацетилхолина. Обобщая данные об уменьшении Ca^{2+} -транзientа под действием ингибитора холинэстеразы прозерина и об увеличении Ca^{2+} -транзientа под действием блокаторов холинорецепторов с данными о повышении амплитуды токов концевой пластинки при блокаде мускариновых рецепторов, можно заключить, что эндогенный ацетилхолин, выделившийся в синаптическую щель во время стимуляции двигательного нерва в физиологических условиях работы нервно-мышечного аппарата, участвует в регуляции входа Ca^{2+} и регулирует выброс квантов медиатора по принципу обратной отрицательной связи. Эта регуляторная цепочка связана с активацией мускариновых и никотиновых рецепторов. Фармакологическое исследование показало, что реализация угнетающего действия холиномиметиков на Ca^{2+} -транзient связана с активацией M_2 -подтипа мускариновых рецепторов. Об этом свидетельствует тот факт, что метоктрамин, специфический блокатор этого подтипа м-холинорецепторов, снимает угнетающее действие мускарина, агониста мускариновых рецепторов. В то время как блокада M_1 -подтипа рецепторов пирензепином, не снимала угнетающее действие мускарина на Ca^{2+} -транзient.

Никотиновые холинорецепторы подтипов $\alpha 7$, $\alpha 3\beta 2$, $\alpha 4\beta 2$, $\alpha 3\beta 4$ задействованы в реализации угнетающего действия эндогенного ацетилхолина на содержание в нервном окончании ионов Ca^{2+} , которые выделяется в синаптическую щель при стимуляции двигательного нерва. Этот вывод сделан на основе экспериментов, показавших, что в условиях блокады этих подтипов рецепторов происходит достоверное увеличение Ca^{2+} -транзientа. Но блокада этих подтипов холинорецепторов не снимает угнетающего действия никотина на Ca^{2+} -транзient. Это может указывать на наличие другого подтипа никотиновых рецепторов, который может опосредовать действие никотина на содержание Ca^{2+} в нервном окончании.

Анализ действия карбахолина при блокаде Ca^{2+} -каналов N типа показал, что регуляция пресинаптического уровня Ca^{2+} холиномиметиками осуществляется посредством модуляции входа кальция через потенциал-чувствительные кальциевые каналы N типа. Блокада Ca^{2+} -каналов конотоксином GVIA снимала эффекты карбахолина на Ca^{2+} -транзient. Рианодин-чувствительные кальциевые депо вносят вклад в формирование Ca^{2+} -транзientа, поскольку под действием рианодина уменьшалась амплитуда Ca^{2+} -сигнала. Но они не задействованы в реализации эффектов холиномиметиков, т.к. блокада рианодиновых рецепторов рианодином не снимала эффекта карбахолина на Ca^{2+} -транзient.

Было показано, что мускариновые агонисты угнетающе действуют на количество освобождаемых квантов в ответ на стимуляцию двигательного нерва (Arenson, 1989; Slutsky et al., 1999, Самигуллин и др., 2014). Повышение амплитуды кальциевого транзиента под действием атропина согласуется с ранее описанным возрастанием интенсивности секреции в синапсах лягушки при действии атропина, снимающего тоническое действие эндогенного ацетилхолина, что свидетельствует о наличии связи между этими эффектами (Tomas et al., 2014). Что подтверждается представленными в работе данными, демонстрирующими увеличение амплитуды постсинаптических токов и уменьшение уровня синаптической депрессии в ходе высокочастотной пачки (100 имп/с) в присутствии метоктрамина.

Таким образом, в условиях высокочастотной активности, наиболее характерной для физиологических условий работы синаптического аппарата, связанной с большим расходом медиатора за короткие временные интервалы, осуществляется мускариновая регуляция кальциевого метаболизма и квантовой секреции.

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 транзиента, 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 транзиента.
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.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО МАТЕРИАЛАМ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи, опубликованные в журналах, рекомендованных ВАК

1. **Хазиев, Э.Ф.** Снижение входа кальция в моторное нервное окончание при активации пресинаптических холинорецепторов / **Э.Ф. Хазиев**, Н. Ф. Фатихов, Д. В. Самигуллин, Г. Л. Барретт, Э. А. Бухараева, академик Е. Е. Никольский // Доклады академии наук. - 2012. Т. 446, № 5, с. 590–593.
2. Samigullin D.V. Estimation of presynaptic calcium currents and endogenous calcium buffers at the frog neuromuscular junction with two different calcium fluorescent dyes / D.V. Samigullin, N.F. Fatikhov, **E.F. Khaziev**, A.I. Skorinkin, E.E. Nikolsky, E.A. Bukharaeva // Front. Synaptic Neurosci. – 2015. 6:29. doi: 10.3389/fnsyn.2014.00029
3. Самигуллин, Д.В. Регуляция мускариновыми рецепторами кальциевого транзientа и синаптической передачи в нервно-мышечном соединении лягушки / Д.В. Самигуллин, **Э.Ф. Хазиев**, И.В. Ковязина, Э.А. Бухараева, Е.Е. Никольский // Гены и клетки. – 2014. - Т. 9, № 3, с. 242–247.

Работы, опубликованные в материалах конференций и иных научных изданиях

4. 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 Puplichers, New-York, Henry Lambert editor. – 2014. Chapter V. P.179-194.
5. Ковязина, И.В. Роль мускариновых холинорецепторов в модуляции кальциевого транзientа и вызванной секреции медиатора в нервно-мышечном соединении лягушки / И.В. Ковязина, А.Н. Ценцевицкий, **Э.Ф. Хазиев**, Д.В. Самигуллин // Сборник статей международной конференции «Рецепторы и внутриклеточная сигнализация». – Пушино, 2013. - Т.1.- С. 328-331
6. **Хазиев, Э.Ф.** Участие $Ca_v2.3$ ($\alpha 1e$) кальциевых каналов в регуляции синаптической активности в нервном окончании лягушки / **Э. Ф. Хазиев**, А.Н. Ценцевицкий, Д.В. Самигуллин // XIII съезд Белорусского общества физиологов и II Международная научная конференция. – Минск, 2012. - Тезисы докладов. – С. 147.
7. **Хазиев, Э.Ф.** Действие холинергических соединений на кальциевый транзient в нервно-мышечном соединении лягушки / **Э.Ф. Хазиев**, Д.В. Самигуллин // XI Всероссийская с международным участием научная школа-конференция «Механизмы адаптации растущего организма к физической и умственной нагрузке». – Казань, 2012. – Тезисы докладов. - С. 154-155.
8. Фатихов, Н.Ф. Роль эндоплазматического ретикулума в регуляции внутриклеточного кальция и секреции медиатора при высокочастотной стимуляции пресинаптического нервного окончания лягушки / Н.Ф. Фатихов, **Э.Ф. Хазиев**, Д.В. Самигуллин // XVI Международная Пушинская школа-конференция молодых ученых «Биология наука XXI века». – Пушино, 2012. – Тезисы докладов. - С. 448-449.
9. Фатихов, Н.Ф. Экспериментальная регистрация и математическое моделирование кальциевого транзientа в пресинаптическом нервном окончании лягушки / Н.Ф. Фатихов, **Э.Ф. Хазиев**, Д.В. Самигуллин // XI Всероссийская с международным участием научная школа-конференция «Механизмы адаптации растущего организма к физической и умственной нагрузке». – Казань, 2012. – Тезисы докладов. – С. 150-151.

10. **Хазиев, Э.Ф.** Эффект карбахолина на кальциевый транзист в нервно-мышечном соединении лягушки / **Э.Ф. Хазиев**, Н.Ф. Фатихов // XIX Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2012». - Москва, 2012. – Тезисы докладов. - С. 261.
11. **Хазиев, Э.Ф.** Холинергическая регуляция кальциевого транзиста в нервно-мышечном соединении лягушки / **Э.Ф. Хазиев**, Н.Ф. Фатихов // XVIII Международная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2011». - Москва, 2011. - Тезисы докладов. - С. 273-274.
12. **Хазиев, Э.Ф.** Действие холинергических соединений на кальциевый транзист в нервно-мышечном соединении лягушки / **Э.Ф. Хазиев**, Д.В. Самигуллин // XI Всероссийская с международным участием научная школа-конференция «Механизмы адаптации растущего организма к физической и умственной нагрузке». - Казань, 2012. – Тезисы докладов. - С. 154-155.
13. Фатихов, Н.Ф. Экспериментальная регистрация и математическое моделирование кальциевого транзиста в пресинаптическом нервном окончании лягушки / Н.Ф. Фатихов, **Э.Ф. Хазиев**, Д.В. Самигуллин // XI Всероссийская с международным участием научная школа-конференция «Механизмы адаптации растущего организма к физической и умственной нагрузке». – Казань, 2012. – Тезисы докладов. - С. 150-151.
14. Самигуллин, Д.В. Участие эндоплазматического ретикулаума в регуляции кальциевой сигнализации в двигательном нервном окончании лягушки / Д.В. Самигуллин, Н.Ф. Фатихов, **Э.Ф. Хазиев** // IV Съезд биофизиков России. – Нижний Новгород, 2012. – Тезисы докладов. - С. 127
15. **Хазиев, Э.Ф.** Влияние эндогенного и экзогенного ацетилхолина на кальциевый транзист в нервно-мышечном соединении лягушки / **Э.Ф. Хазиев** // XX Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2013». – Москва, 2013. – Тезисы докладов. - С. 261.
16. Самигуллин, Д.В. Регистрация и свойства флуоресцентного кальциевого транзиста в периферических синапсах / Д.В. Самигуллин, **Э.Ф. Хазиев**, Н.Ф. Фатихов, Э.А. Бухараева, Е.Е. Никольский // Международная научно-техническая конференция молодых ученых, аспирантов и студентов «Прикладная электродинамика, фотоника и живые системы». – Казань, 2013. – Тезисы докладов. – С. 166-171.
17. Самигуллин, Д.В. Кальциевый метаболизм в двигательных нервных окончаниях и оценка его изменения при модуляции синаптической передачи / Д.В. Самигуллин, **Э.Ф. Хазиев**, Н.Ф. Фатихов, Е.Е. Никольский, Э.А. Бухараева // XXII съезд физиологического общества имени И. П. Павлова. – Волгоград, 2013. - Тезисы докладов. – С. 463.
18. **Хазиев, Э.Ф.** Роль мускариновых холинорецепторов в модуляции кальциевого транзиста и интенсивности вызванной секреции медиатора в нервно-мышечном соединении лягушки / **Э.Ф. Хазиев**, И.В. Ковязина, Д.В. Самигуллин // Международная научно-техническая конференция молодых ученых, аспирантов и студентов «Прикладная электродинамика, фотоника и живые системы». – Казань, 2013. – Тезисы докладов. – С. 187-188.
19. **Хазиев, Э.Ф.** Роль мускариновых и никотиновых рецепторов в реализации эффектов холиномиметиков на вход кальция в нервно-мышечном соединении лягушки / **Э.Ф. Хазиев** //

XXI Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2014». - Москва, 2014. – Тезисы докладов. - С. 428-429.

20. **Хазиев, Э.Ф.** Участие кальциевых каналов в реализации эффектов холиномиметиков на кальциевый транзиент / **Э.Ф. Хазиев**, Э.А. Бухараева, Е.Е. Никольский, Д.В. Самигуллин // XII Международная школа-конференция «Адаптация растущего организма». – Казань, 2014. – Тезисы докладов. - С. 113.