

На правах рукописи



Жиляков Никита Викторович

**РОЛЬ ХОЛИНОРЕЦЕПТОРОВ В РЕГУЛЯЦИИ КАЛЬЦИЕВОГО ТРАНЗИЕНТА И
ОСВОБОЖДЕНИЯ НЕЙРОМЕДИАТОРА В НЕРВНО-МЫШЕЧНОМ СИНАПСЕ
МЫШИ**

1.5.2. – Биофизика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Казань – 2022

Работа выполнена в лаборатории биофизики синаптических процессов Казанского института биохимии и биофизики – обособленного структурного подразделения Федерального исследовательского центра «Казанский научный центр Российской академии наук» (КИББ ФИЦ КазНЦ РАН).

Научный руководитель: **Самигуллин Дмитрий Владимирович** – кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник, заведующий лабораторией биофизики синаптических процессов КИББ ФИЦ КазНЦ РАН, г. Казань.

Официальные оппоненты: **Богодвид Татьяна Халиловна** – доктор биологических наук, доцент кафедры медико-биологических дисциплин Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Поволжский государственный университет физической культуры, спорта и туризма», г. Казань;

Розов Андрей Владимирович – кандидат биологических наук, заведующий лабораторией электрофизиологии. Федеральное государственное бюджетное учреждение «Федеральный центр мозга и нейротехнологий» Федерального медико-биологического агентства России, г. Москва.

Ведущая организация: Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук (ИЭФБ РАН) – Федеральное государственное бюджетное учреждение науки, г. Санкт-Петербург.

Защита состоится «19» января 2023 г. в 11:00 часов на заседании диссертационного совета 24.1.225.02 при ФГБУН «Федеральный исследовательский центр «Казанский научный центр Российской академии наук» по адресу 420111 г. Казань, ул. Лобачевского, д. 2/31

С диссертацией можно ознакомиться в Центральной научной библиотеке ФИЦ КазНЦ РАН и на официальном сайте КИББ ФИЦ КазНЦ РАН: <http://kibb.knc.ru>

Автореферат разослан « » ноября 2022 г.

Отзывы на автореферат в 2-х экземплярах просим направлять по адресу: 420111, г. Казань, ул. Лобачевского, д. 2/31, а/я 261, КИББ – обособленное структурное подразделение ФИЦ КазНЦ РАН, ученому секретарю диссертационного совета (e-mail: dissovet@kibb.knc.ru).

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук



Пономарева Анастасия Анатольевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования

Холинергическая нейротрансмиссия является ключевым звеном передачи сигнала в периферическом отделе и ряде структур центральной нервной системы (ЦНС). Несмотря на то, что она достаточно давно и широко изучается, тем не менее, некоторые аспекты ее модуляции до сих пор не установлены. Так, например, известен факт того, что основной нейромедиатор в нервно-мышечном синапсе ацетилхолин (АХ) влияет на освобождение последующих порций АХ за счет взаимодействия с рецепторами, находящимися на пресинаптической мембране (Ciani and Edwards, 1963; Starke et al., 1989; Miller, 1998; Parnas et al., 2000; Balezina et al. 2006; Nikolsky et al., 2004; Petrov et al., 2018; Cilleros-Mañé et al., 2021; Bukharaeva et al., 2022). Этот процесс называют ауторегуляцией секреции нейромедиатора. Однако, остаются не выясненными вопросы – как именно осуществляется процесс ауторегуляции выделения АХ? Как активация пресинаптических холинорецепторов приводит к изменению в работе машины экзоцитоза?

Секреция нейромедиатора в синаптическую щель, запускается входом ионов кальция через потенциал-чувствительные кальциевые каналы в нервное окончание (НО) (Katz and Miledi, 1969; Neher and Sakaba, 2008). Модуляция выброса нейромедиатора может осуществляться путем регуляции работы потенциал-чувствительных кальциевых каналов. Было показано, что при блокаде некоторых типов потенциал-чувствительных кальциевых каналов, эффекты холинергических агентов на количество освобожденного нейромедиатора устранялись (Prior and Singh, 2000; Santafé et al., 2003). Это косвенно указывает на то, что процесс ауторегуляции секреции нейромедиатора может осуществляться за счет взаимодействия пресинаптических холинорецепторов и кальциевых каналов. Однако, для подтверждения этого взаимодействия необходимо выяснить, как в действительности холинергические агенты влияют на вход кальция в двигательные НО.

Современным инструментом для анализа внутриклеточного кальция, в том числе быстрых изменений его концентрации в нервном окончании в ответ на потенциал действия (кальциевый транзист), являются флуоресцентные методы регистрации, основанные на использовании кальций-чувствительных красителей или генетически кодируемых кальциевых индикаторов (Tsien, 1989; DiGregorio and Vergara, 1997; Sabatini and Regehr, 1998; Rudolf et al., 2003; Palmer and Tsien, 2006; Pérez Koldenkova and Nagai, 2013; Granatiero et al., 2014; Grødem et al., 2021). Ранее, с использованием флуоресцентного кальций-чувствительного красителя Oregon Green ВАРТА 1 и фармакологического подхода в нашей лаборатории было показано, что в двигательных синапсах лягушки активация как метаботропных мускариновых, так и ионотропных никотиновых рецепторов приводила к уменьшению кальциевого транзиста, что

в свою очередь вызывало снижение выброса нейромедиатора. (Самигуллин et al., 2014; Khaziev et al., 2016). Однако, характер изменений кальциевого входа (пресинаптического уровня кальция) в условиях активации холинергических рецепторов в периферических синапсах теплокровных животных до настоящего времени не был установлен.

Понимание роли пресинаптических холинорецепторов в процессе ауторегуляции синаптической передачи, прежде всего в синапсах теплокровных животных имеет принципиально важное значение, поскольку миастенические синдромы обусловлены нарушениями работы никотиновых рецепторов (Carlson and Kraus, 2021). Кроме того, в клинической практике используют миорелаксанты, которые модулируют работу холинергических рецепторов в периферических синапсах. Таким образом понимание молекулярных механизмов холинергической регуляции освобождения нейромедиатора в периферических синапсах имеет важное практическое значение.

В связи с вышесказанным в данном исследовании экспериментально оценивалась роль холинорецепторов в регуляции кальциевого транзientа в двигательных нервных окончаниях теплокровных животных, а также анализировалось их участие в регуляции секреции нейромедиатора.

Цель и задачи исследования

Целью настоящего исследования было изучение вклада пресинаптических холинорецепторов в изменение амплитуды кальциевого транзientа и процесса выделения нейромедиатора в двигательных синапсах мышцы.

В соответствии с целью были поставлены следующие задачи:

1. Разработать экспериментальный метод оценки кальциевого транзientа в двигательных нервных окончаниях мышцы с помощью флуоресцентного красителя.
2. Оценить изменения амплитуды кальциевого транзientа при блокаде разных типов потенциал-зависимых кальциевых каналов и модуляции рианодиновых рецепторов.
3. Исследовать эффекты активации и блокады никотиновых холинорецепторов на амплитуду кальциевого транзientа и параметры квантовой секреции ацетилхолина.
4. Исследовать эффекты активации и блокады мускариновых холинорецепторов на амплитуду кальциевого транзientа и параметры квантовой секреции ацетилхолина.
5. Оценить участие кальциевых каналов и рианодиновых рецепторов в реализации эффектов холинергических агентов.

Положения, выносимые на защиту

В нервно-мышечном синапсе мышцы активация пресинаптических нейрональных никотиновых холинорецепторов вызывает увеличение амплитуды Ca^{2+} -транзientа за счет усиления входа кальция через кальциевые каналы L-типа. Активация этих рецепторов

вызывает снижение количества освободившихся квантов, которое устраняется при блокаде кальциевых каналов L-типа.

В нервно-мышечном синапсе мышцы активация пресинаптических мускариновых холинорецепторов вызывает уменьшение амплитуды Ca^{2+} -транзientа за счет модуляции работы потенциал-зависимых кальциевых каналов P/Q-типа каналов.

Научная новизна работы

Разработан метод для загрузки кальциевого красителя в двигательные синапсы мышцы через культю нерва. Применение данного подхода позволяет регистрировать изменения уровня кальция в аксоплазме двигательного нервного окончания мышцы в ответ на электрический стимул. Проведено сопоставление данных об изменениях квантового выброса медиатора и кальциевого транзientа в двигательном нервном окончании мышцы при варьировании концентрации кальция во внеклеточном пространстве. На основании полученных результатов был сделан вывод о том, что амплитуда флуоресцентного кальциевого транзientа позволяет оценивать пресинаптический уровень кальция, ответственный за выделение квантов нейромедиатора.

Впервые показано, что активация нейрональных никотиновых холинорецепторов сопровождается увеличением входа ионов кальция в двигательную терминаль через каналы L-типа.

Впервые показано, что активация мускариновых рецепторов приводит к снижению величины кальциевого транзientа, за счет модуляции работы P/Q-типа каналов и риаудиновых рецепторов.

Научно-практическая значимость работы

Научно-практическая значимость проведенного исследования прежде всего заключается в разработке экспериментального подхода, позволяющего оценивать пресинаптический уровень кальция в периферических синапсах теплокровных животных. В ходе исследования была разработана методика загрузки флуоресцентных красителей в двигательные терминали теплокровных животных через культю нерва.

Научно-практическое значение результатов проведенного исследования заключается в получении новых данных о механизмах регуляции входа кальция в двигательные нервные окончания теплокровных животных за счет активации пресинаптических холинорецепторов. Сопоставление результатов, полученных при помощи флуоресцентного метода, с данными электрофизиологических экспериментов указывает на то, что эффекты холинергических агентов на процесс квантового освобождения нейромедиатора связаны с изменениями входа Ca^{2+} в нервную терминаль. В целом, полученные знания помогут улучшить понимание молекулярных механизмов ауторегуляции секреции нейромедиатора в периферических

синапсах. Основные выводы и результаты работы будут использованы в учебном процессе в рамках курсов для студентов, обучающихся по биологическим специальностям.

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: Международной научно-технической конференции молодых ученых, аспирантов и студентов «Прикладная электродинамика, фотоника и живые системы» (Казань, 2015 и 2018 гг.), Российской с международным участием конференции по управлению движением «Motor Control 2016» (Казань, 2016 г.), XXIII съезде Физиологического общества им. И. П. Павлова с международным участием (Воронеж, 2017), 6-й европейской конференции о синапсах («6TH EUROPEAN SYNAPSE MEETING») (Милан, Италия, 2017 г.), конференции «Оптогенетика и оптофармакология» (Санкт-Петербург, 2018 г.), XIV Международной научной конференции, посвященной 80-летию Заслуженного деятеля науки РФ и РТ Ситдикова Фарита Габдулхаковича (Казань, 2018 г.), Международной конференции «Актуальные проблемы нейробиологии» (Казань, 2019 г.).

Работа выполнена при поддержке грантами РФФИ № 13-04-00886, 16-04-01051, «Ведущая научная школа» НШ-5584.2014.4 и Программы №7 Президиума РАН.

Реализация результатов исследования

По теме диссертации опубликовано 16 печатных работ, в том числе 5 статей в рецензируемых журналах в международных базах *Web of Science* и *Scopus*.

Структура и объём диссертации

Диссертация изложена на 171 странице, состоит из введения, обзора литературы, описания методики исследования, результатов исследования и их обсуждения, выводов, списка литературы (всего 381 источник).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объект исследования. Для исследования использовали мышей BALB/C (20-23 г, возраст 2-3 месяца) обоих полов. Весь уход за животными и протокол эксперимента соответствовал требованиям Директивы Совета Европейского сообщества 86/609/ЕЕС. После отделения мышцы *levator auris longus* (*m. LAL*) от головы (Angaut-Petit et al., 1987), ее

помещали в чашку Петри. Препарирование осуществлялось в растворе Рингера следующего состава (мМ): NaCl — 135, KCl — 5, MgCl₂ — 1, NaH₂PO₄ — 1, NaHCO₃ — 12, глюкоза — 11, CaCl₂ — 2; pH раствора поддерживался на уровне 7.2—7.4. Раствор аэрировался перед каждым экспериментом карбогеном. Эксперименты выполнялись при температуре 20.0±0.5 °С. Блокада мышечных сокращений осуществлялась путем добавления в раствор μ -конотоксина GIIIB в концентрации 2 мкМ. Нерв стимулировался прямоугольными сверхпороговыми стимулами (длительность 0,2 мс, частота 0,5 Гц) через специальный всасывающий электрод (Казаков et al., 2015), подключенный к изолированному импульсному стимулятору модели 2100 (A-M Systems, США).

Электрфизиологические исследования. Для регистрации изменений вызванных потенциалов концевой пластинки (ПКП) и миниатюрных потенциалов концевой пластинки (мПКП) применялась внутриклеточная микроэлектродная техника. Регистрация сигналов осуществлялась при помощи усилителя Axoclamp 900A и аналого-цифрового преобразователя (АЦП) Axopatch Digidata 1550 (Axon instruments, США). Во время эксперимента проводился контроль мембранного потенциала. Данные экспериментов, в которых мембранный потенциал изменялся более чем на 7 мВ, не учитывались. Запись и обработка данных производились в программном обеспечении pClamp версии 10.2 (Molecular Devices, США). Квантовый состав оценивался путем деления средних амплитуд ПКП на средние амплитуды мПКП.

Регистрация Ca²⁺-транзиента. В рамках данного исследования применялся флуоресцентный кальций-чувствительный краситель гексакалиевая соль Oregon Green 488 BAPTA-1 в концентрации 1 мМ. Загрузка кальций-чувствительного флуоресцентного красителя осуществлялась при помощи разработанного метода (Samigullin et al., 2017; Zhilyakov et al., 2021). Регистрация изменений интенсивности флуоресцентных сигналов производилась при помощи установки на базе микроскопа Olympus BX-51 (Olympus, Япония) с водноиммерсионным объективом x40 и высокоскоростной камеры Neuro CCD SMQ (Redshirt Imaging, США). Оценивали амплитуду кальциевых ответов.

Реагенты. В экспериментах использовались следующие вещества: никотин тартрат соль, кадмия хлорид, карбахолин, мускарин, атропин, метактрамин, пирензепин, конотоксин GV1a, ω -агатоксин, нитрендипин, (\pm)-Bay K 8644, рианодин, апамин, циклоспорин А, диметилсульфоксид (ДМСО). Данные реагенты были приобретены в Sigma Aldrich (США). Также применялись дигидробетаэритрозидин (DH β E) (TOCRIS, Великобритания), μ -конотоксин GIIIB (Peptide institute inc., Япония). Базовые растворы готовили на дистиллированной воде, за исключением нитрендипина, верапамила и рианоидина (растворяли в ДМСО). Дальнейшие разведения всех препаратов проводили в растворе Рингера.

Статистическая обработка данных. Статистический анализ проводился с использованием программного обеспечения GraphPad Prism8. Для анализа распределения данных использовался критерий нормальности Шапиро–Уилка. Проверка нулевой гипотезы проводилась с помощью дисперсионного анализа. Использовался однофакторный дисперсионный анализ с последующим тестом Даннета или Тьюки для множественного сравнения. Также применялся параметрический t-критерий Стьюдента. Данные представлены как среднее значение (СРЗНАЧ) ± стандартная ошибка среднего. Различия между группами считались статистически значимыми при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1. Оценка изменений кальциевого транзientа при помощи красителя Oregon Green ВАРТА-1 в периферических нервных окончаниях мышцы

Для выполнения настоящего исследования необходимо было разработать методику загрузки двигательных синапсов мышцы флуоресцентным кальциевым красителем. Это было реализовано посредством загрузки красителя через культуру нерва на препарате *m. LAL (m. levator auris longus)* мышцы. Для проверки валидности данного протокола и проверки возможного влияния красителя на выброс нейромедиатора были проведены эксперименты, которые показали, что загрузка красителя в выбранной концентрации и по разработанному протоколу не влияет на параметры вызванной и спонтанной секреции медиатора и амплитудно-временные параметры кальциевого сигнала не изменяются с течением времени (1,5 ч). Этот факт учитывался при выполнении всех последующих серий экспериментов.

Для того, чтобы выяснить насколько амплитуда кальциевого транзientа отражает изменение уровня ионов кальция в нервном окончании при модулирующих воздействиях, которые приводят к изменению квантового выброса нейромедиатора, было проведено исследование по регистрации амплитуды Ca^{2+} -транзientа и квантового состава ПКП в нервно-мышечном синапсе мышцы при варьировании внеклеточной концентрации Ca^{2+} от 0.3 до 2 мМ (Рис. 1). Было показано, что даже небольшие изменения амплитуды кальциевого транзientа в нервную терминаль приводят к значительным изменениям количества выделенных квантов АХ. Кривые концентрационной зависимости были построены на одной графической плоскости в логарифмических шкалах. По углу наклона рассчитан коэффициент биохимической кооперативности (Хилла) равный 2.87, который соответствует количеству ионов кальция, которым необходимо связаться с Ca^{2+} сенсором везикулы (синаптотагмином) (Meriney and Fanselow, 2019), чтобы вызвать его активацию. Полученное значение согласуется с коэффициентом биохимической кооперативности (3.01), рассчитанным ранее в электрофизиологических исследованиях (Tsentsevitsky et al., 2015). Таким образом можно заключить что, анализ изменения амплитуды Ca^{2+} транзientа, позволяет оценивать

поступление кальция в нервное окончание и сравнивать его с изменениями количества высвобождаемых квантов нейромедиатора при различных экспериментальных условиях.

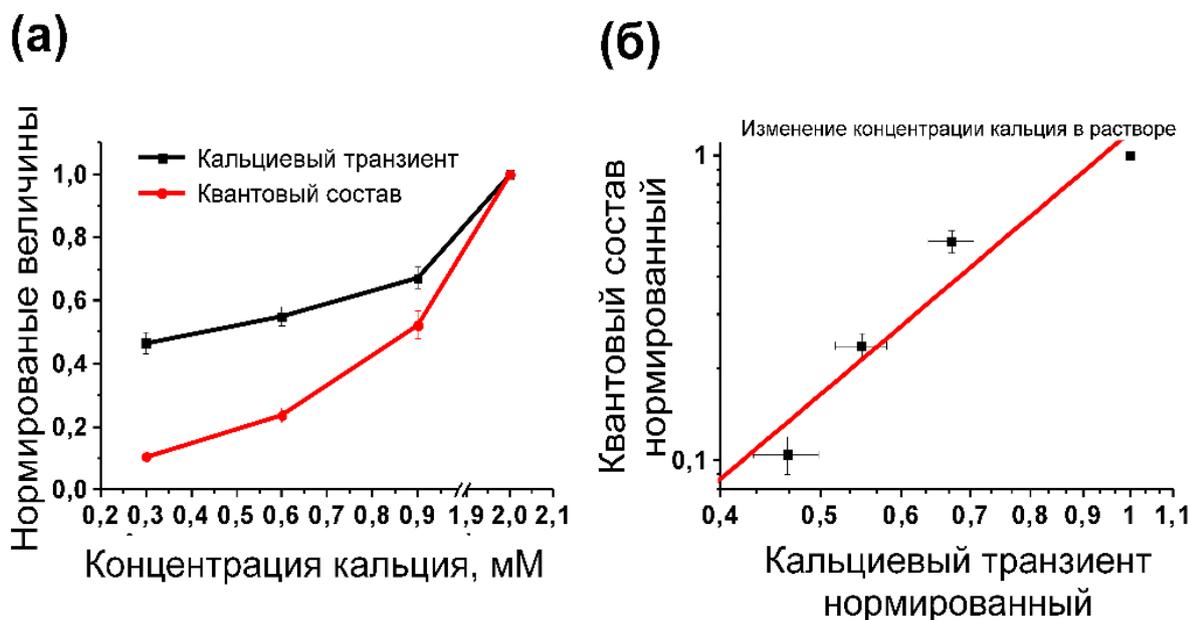


Рис. 1. Кальциевый транзистент и квантовый состав при различной внеклеточной концентрации кальция а) концентрационные кривые (нормированные данные) квантового состава и кальциевого транзистента в зависимости от содержания кальция в растворе б) зависимость квантового состава от изменения кальциевого транзистента при варьировании концентрации кальция во внеклеточной среде.

2. Участие кальциевых каналов и рианодиновых рецепторов в формировании амплитуды кальциевого транзистента

Для установления источника(-ов), формирующих кальциевый сигнал в периферических НО, был проведён скрининг потенциал-чувствительных кальциевых каналов. В двигательных НО теплокровных животных выявлены потенциал-чувствительные кальциевые каналы, как минимум, трех типов: Ca_v1 (L-тип), $Ca_v2.1$ (P/Q-тип) и $Ca_v2.2$ (N-тип) (Pagani et al., 2004), среди которых P/Q-тип является основным (Protti and Uchitel, 1993). Применение ω -агатоксина в концентрации 40 нМ (Protti and Uchitel, 1993). приводило к уменьшению входа кальция на $67.0 \pm 4.4\%$ ($n=5$; $p<0.05$; рис. 2). При увеличении концентрации данного блокатора до 500 нМ наблюдалось понижение амплитуды кальциевого транзистента на $79.0 \pm 3.9\%$ ($n=8$; $p<0.05$; рис. 2). В случае применения блокаторов Са каналов L типа нитрендипина (25 мкМ) и верапамила (50 мкМ) (Cia et al., 2005; Uribe et al., 2013; Gu et al., 2020) регистрировали уменьшение входа кальция в моторное нервное окончание на $18.8 \pm 1.1\%$ ($n=17$; $p<0.05$; рис. 2) и $25.0 \pm 4.4\%$ ($n=9$; $p<0.05$; рис. 2) соответственно. Амплитуда кальциевого транзистента после аппликации блокатора каналов N типа конотоксина GV1a (10 мкМ) не претерпевала достоверных изменений $101.1 \pm 2.8\%$ ($n=7$, $p>0.05$) (рис. 2). Совместное

применение блокаторов нитрендипина (25 мкМ) и ω -агатоксина (500 мкМ) приводило к значительному уменьшению амплитуды кальциевого транзientа на $93.4 \pm 0.8\%$ ($n=10$, $p<0.05$; рис. 2).

На нервно-мышечных синапсах лягушки было показано, что модуляция рианодиновых рецепторов приводит к изменениям амплитуды кальциевого транзientа (Khaziev et al., 2017). В экспериментах по оценке вклада рианодиновых рецепторов в формирование кальциевого транзientа в НО было установлено, что аппликация модулятора этих рецепторов рианодина (10 мкМ) приводит к снижению амплитуды транзientа на $6.5 \pm 2.3\%$ ($n=14$; $p<0.05$; рис. 2). Это свидетельствует о том, что рианодиновые рецепторы вносят вклад в изменение пресинаптического уровня кальция в двигательных синапсах теплокровных животных не только при высокочастотной (Khuzakhmetova et al., 2014), но также и при низкочастотной стимуляции НО.

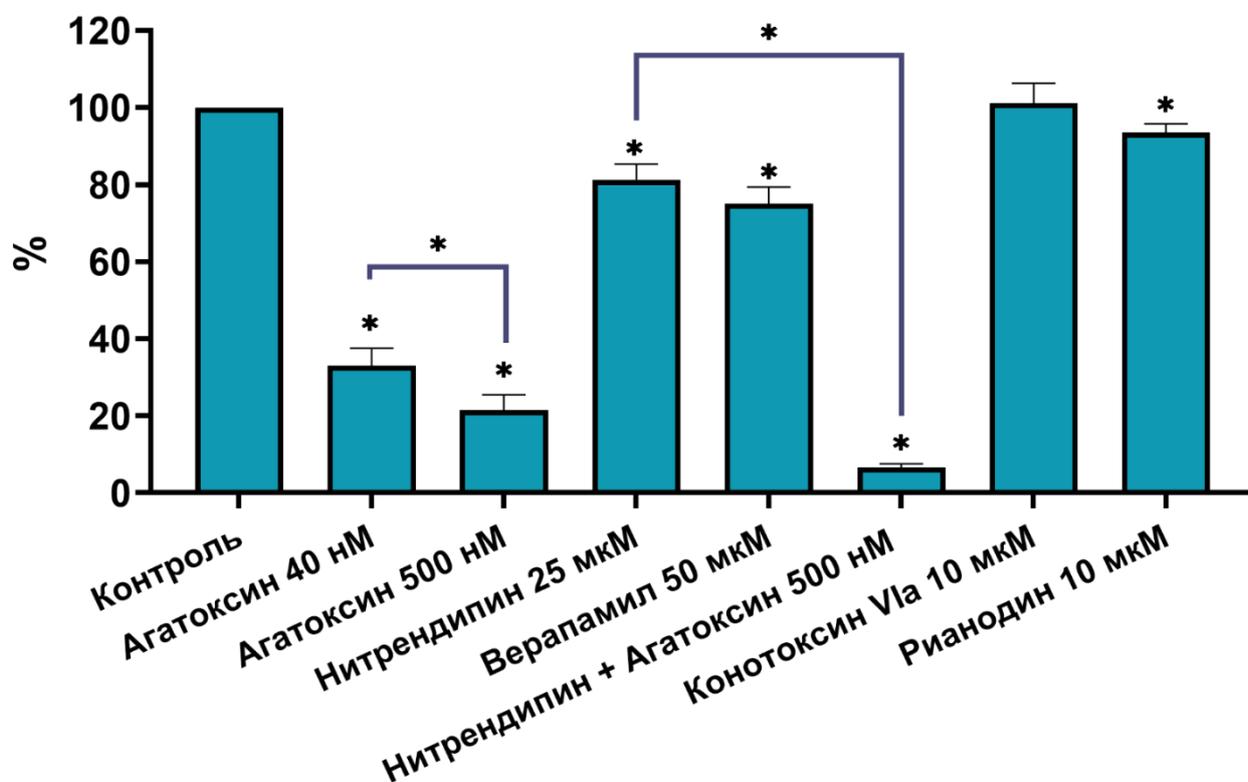


Рис. 2. Эффекты блокатора (-ов) P/Q-типа каналов (ω -агатоксин), L-типа каналов (нитрендипин и верапамил), N-типа каналов (конотоксин GV1a) и рианодиновых рецепторов (рианодин) на кальциевый транзient в НО.

Таким образом мы показали, что в формировании кальциевого транзientа в периферических синапсах мышцы кроме каналов P/Q-типа, которые в основном и определяют вызванное освобождение участвуют также кальциевые каналы L-типа и рианодин чувствительные рецепторы.

Как было показано, АХ, выделяющийся в синаптическую щель, активирует не только мускариновые и никотиновые рецепторы на постсинаптической мембране, но также может взаимодействовать с ауторецепторами на пресинаптической мембране (Ciani and Edwards, 1963; Starke et al., 1989; Petrov et al., 2018; Cilleros-Mañé et al., 2021; Bukharaeva et al., 2022). Вполне возможно, что эти рецепторы могут запускать регуляторные цепочки, влияющие на работу P/Q-тип и L-тип кальциевых каналов плазматической мембраны и рианодиновых рецепторов мембраны эндоплазматического ретикулума (ЭПР), что, в свою очередь, может приводить к модуляции выброса нейромедиатора (Protti and Uchitel, 1993; Prior and Singh, 2000; Khuzakhmetova et al., 2014).

3. Активация нейрональных никотиновых рецепторов приводит к уменьшению квантового состава ПКП, но увеличению амплитуды кальциевого транзientа

Активация никотиновых рецепторов никотином в концентрации 10 мкМ приводила к угнетению выброса нейромедиатора на $12.0 \pm 4.4\%$ ($n=7$, $p<0.05$, рис. 3). Эти данные полностью согласуются с результатами, полученными другими исследователями (Prior and Singh, 2000). Однако, аппликация никотина приводила не к снижению, а к увеличению амплитуды кальциевого транзientа на $13.7 \pm 4.3\%$ ($n=8$, $p<0.05$; рис. 3).

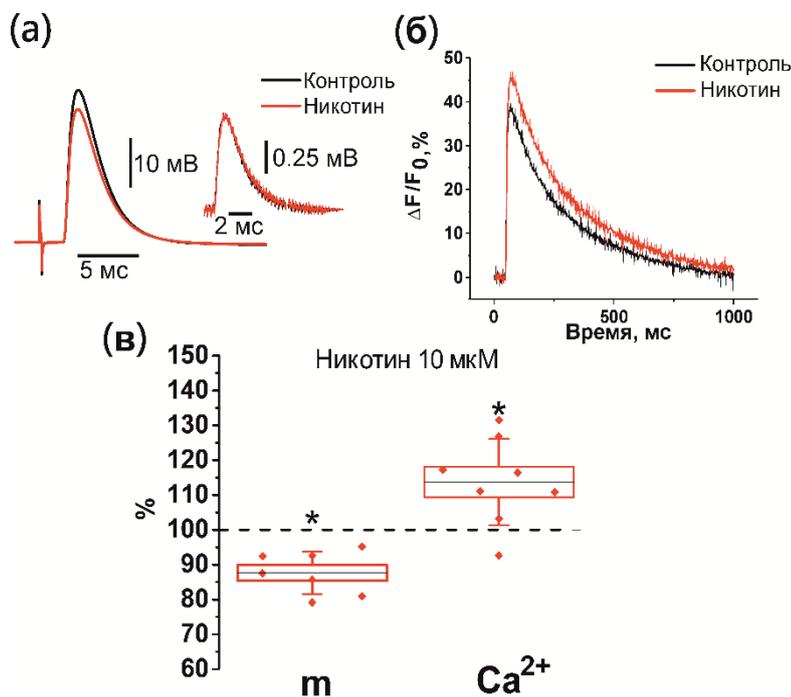


Рис. 3. Эффекты активации никотиновых рецепторов на квантовый состав ПКП и амплитуду кальциевого транзientа: а) репрезентативные сигналы ПКП и мПКП в контроле и после аппликации никотина; б) репрезентативные сигналы кальциевых транзientов в контроле и после аппликации никотина в) квантовый состав (m) и амплитуды кальциевых сигналов (Ca^{2+}), полученные в вышеуказанных сериях и выраженные в процентах от контроля и после аппликации антагониста (СРЗНАЧ \pm ошибка среднего и СКО). Звёздочкой (*) отмечены достоверные изменения ($p<0.05$).

Добавление блокатора холинорецепторов нейронального типа, ДНФЕ, приводило к уменьшению кальциевого транзientа на $12.9 \pm 1.5\%$ ($n=15$; $p<0.05$; рис. 4). Однако на фоне действия этого антагониста эффект никотина, усиливающий кальциевый сигнал, полностью отсутствовал ($100.0 \pm 0.8\%$; $n=15$; $p>0.05$, рис. 4). Следовательно, наблюдаемое увеличение

внутриклеточного содержания кальция, опосредовано активацией нейрональных холинорецепторов.

При аппликации блокатора нейрональных никотиновых рецепторов ДНβЕ, квантовый состав ПКП не изменялся $99.2 \pm 2.4\%$; ($n=11$, $p>0.05$; рис. 4), однако эффекты никотина на фоне данного фармакологического агента полностью отсутствовали (квантовый состав составил $97.4 \pm 4.1\%$ $n=10$, $p>0.05$ рис. 4). Отсутствие эффекта самого блокатора на квантовый выброс может свидетельствовать о том, что эндогенная активация нейрональных никотиновых рецепторов ацетилхолином при редкой частоте стимуляции не вносит достоверных изменений в процесс нейросекреции. Однако, факт отсутствия влияния никотина на квантовый выброс, указывает на то, что его эффекты опосредуются именно никотиновыми холинергическими рецепторами нейронального типа.

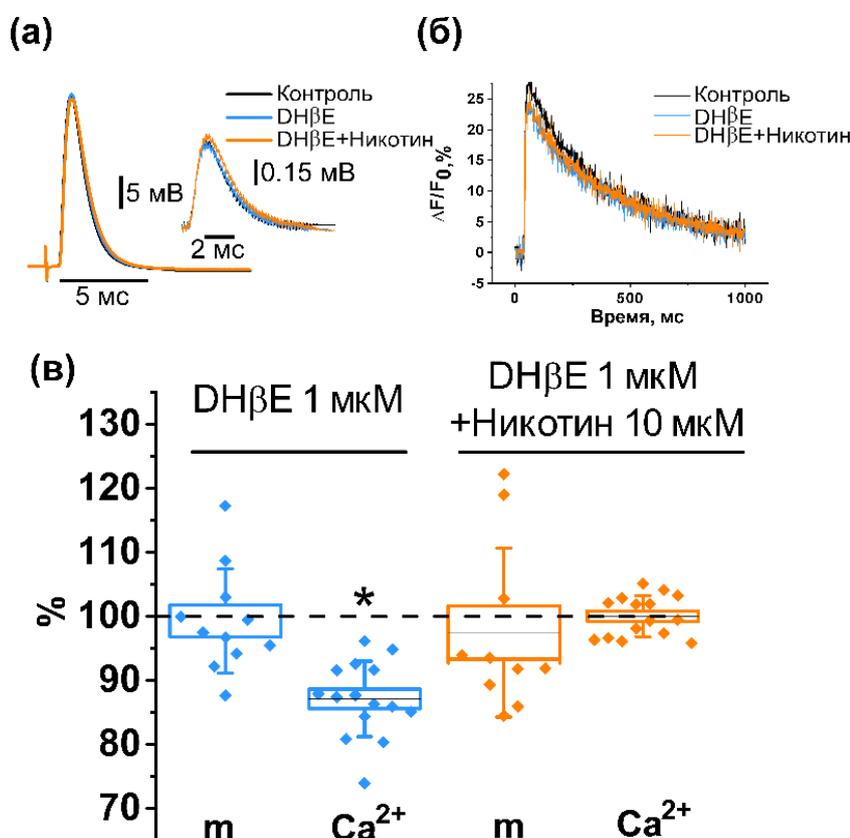


Рис. 4. Эффекты блокатора нейрональных никотиновых рецепторов ДНβЕ на квантовый состав ПКП и амплитуду кальциевого транзientа: а) репрезентативные сигналы ПКП и мПКП в контроле и после аппликации ДНβЕ, б) репрезентативные сигналы кальциевых транзientов в контроле и после аппликации ДНβЕ, в) квантовый состав (m) и амплитуды кальциевых сигналов (Ca^{2+}), полученные в вышеуказанных сериях и выраженные в процентах от контроля и после аппликации антагониста (СРЗНАЧ \pm ошибка среднего и СКО). Звёздочкой (*) отмечены достоверные изменения ($p < 0.05$)

Известно, что ДНβЕ связывается с $\beta 2$ субъединицами никотиновых рецепторов и является селективным антагонистом для нейрональных холинорецепторов, кроме $\alpha 7$ (Alkondon et al., 1992; Stauderman et al., 2000). Следовательно, можно полагать, что в нервно-мышечном синапсе мы имеем дело с нейрональными холинорецепторами состава $\alpha 4\beta 2$.

4. Нейрональные никотиновые рецепторы изменяют кальциевый транзиент в НО, увеличивая вход кальция через каналы L-типа

Для выявления возможного участия кальциевых каналов в эффектах никотина на кальциевый транзиент использовался неселективный блокатор кальций-проницаемых каналов - хлорид кадмия в концентрации 10 мкМ (Wiegand et al., 1990). В результате аппликации хлорида кадмия наблюдалось уменьшение амплитуды кальциевого транзиента на $54.5 \pm 2.7\%$ ($n=9$, $p<0.05$; рис. 5). При этом последующая аппликация никотина не приводила к значимым изменениям ($94.0 \pm 5.1\%$; $n=9$, $p>0.05$; рис. 5). Следовательно, регистрируемое повышение пресинаптического уровня кальция при активации никотиновых рецепторов опосредовано воздействием на кальциевые каналы плазматической мембраны.

На фоне частичной блокады основного типа потенциал-чувствительных кальциевых каналов P/Q-типа при помощи ω -агатоксина (40 нМ) аппликация никотина (10 мкМ) приводила к повышению амплитуды кальциевого транзиента на $29.9 \pm 3.8\%$ ($n=7$, $p<0.05$; рис. 5). Следовательно, эффект активации пресинаптических никотиновых рецепторов на уровень внутриклеточного кальция реализуется не через каналы P/Q-типа.

На фоне блокаторов L-типа каналов верапамила (50 мкМ) и нитрендипина (25 мкМ) аппликация никотина не приводила к каким-либо изменениям кальциевого транзиента, который составил $101.8 \pm 1.5\%$ ($n=9$, $p>0.05$) и $100.7 \pm 1.2\%$ ($n=17$, $p>0.05$), соответственно (рис. 5). Снижающий кальциевый транзиент эффект ДН β Е на фоне заблокированных каналов каналов L-типа нитрендипином также полностью отсутствовал ($100.0 \pm 0.8\%$; $n=10$, $p>0.05$; рис. 5). Кроме того, оценивались эффекты никотина на фоне активатора каналов L-типа, (\pm)-Вау К 8644 в концентрации 5 мкМ. Вау К вызывает увеличение амплитуды кальциевого транзиента на $20.6 \pm 5.0\%$ ($n=8$, $p<0.05$), а последующая аппликация никотина не приводила к каким-либо ее изменениям ($101.5 \pm 1.3\%$; $n=8$, $p<0.05$; рис. 5). Следовательно, в условиях, когда каналы L-типа блокированы или активированы, стимуляция никотиновых рецепторов не может приводить к дополнительному входу Ca^{2+} .

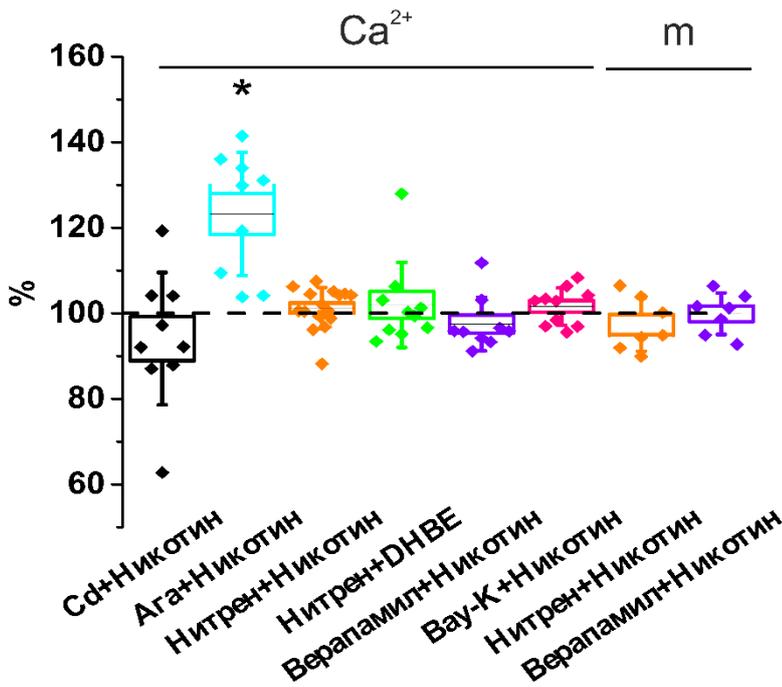


Рис. 5. Действие никотина на кальциевый транзист и квантового состава при модуляции работы потенциал-чувствительных кальциевых каналов. Данные представлены в виде СРЗНАЧ \pm ошибка среднего и СКО квантового состава (m) и амплитуд кальциевых сигналов (Ca^{2+}), полученные в вышеперечисленных сериях и выраженные в процентах от значения после аппликации блокатора/агониста. Звездочкой (*) отмечены достоверные изменения ($p < 0.05$).

Таким образом, полученные результаты позволяют заключить, что существует функциональная связь между нейрональными холинергическими никотиновыми рецепторами и потенциал-чувствительными кальциевыми каналами L-типа.

Было выдвинуто предположение о том, что эта связь лежит в основе наблюдаемого феномена снижения квантового состава при активации данного типа холинорецепторов. В таком случае следует ожидать, что блокада L-типа кальциевых каналов устранил никотин-индуцированное снижение количества выделяемых квантов АХ. И действительно, аппликация никотина на фоне заблокированных каналов L-типа нитрендипином и верапамилом не вызвала никаких изменений процесса вызванного выделения АХ и квантовый состав ПКП составил $96.2 \pm 2.5\%$ ($n=6$, $p > 0.05$) и $100.0 \pm 5.2\%$ ($n=6$, $p > 0.05$), соответственно (рис. 5). Следовательно, можно предположить, что эффекты никотина на кальциевый транзист и квантовый выброс медиатора действительно связаны с модуляцией L-типа кальциевых каналов

5. Выявление внутриклеточных механизмов, ответственных за уменьшение выброса АХ при изменении входа Ca^{2+} в нервное окончание

Одной из возможных мишеней, активируемых кальцием, которые могут быть ответственны за вызванное никотином подавление высвобождения АХ, является апамин-чувствительные каналы K_{Ca} (Balezina et al., 2006). Применение апамина в концентрации 100 нМ не изменяло квантовый состав ПКП ($95.9 \pm 1.8\%$; $n=6$, $p > 0.05$; рис. 6). В присутствии апамина влияние никотина на квантовый состав сохранялось ($10.5 \pm 1.4\%$; $n=6$, $p < 0.05$; рис. 6).

Другой возможной мишенью для никотин-индуцированного снижения выделения АХ может выступать кальцинейрин (Antoni et al., 1998). Этот белок активируется кальцием и кальмодулином, и как было показано угнетает квантовый состав при высокочастотной стимуляции (Tarasova et.al., 2015) В присутствии циклоспорина А (10 мкМ), блокатора кальцинейрина, изменений в квантовом составе не наблюдалось ($97.5 \pm 2.9\%$; $n=7$, $p>0.05$; рис. б), однако никотин на фоне его действия продолжал снижать количество выделяемых квантов АХ на $9.0 \pm 2.9\%$ ($n=8$, $p<0.05$; рис. 6).

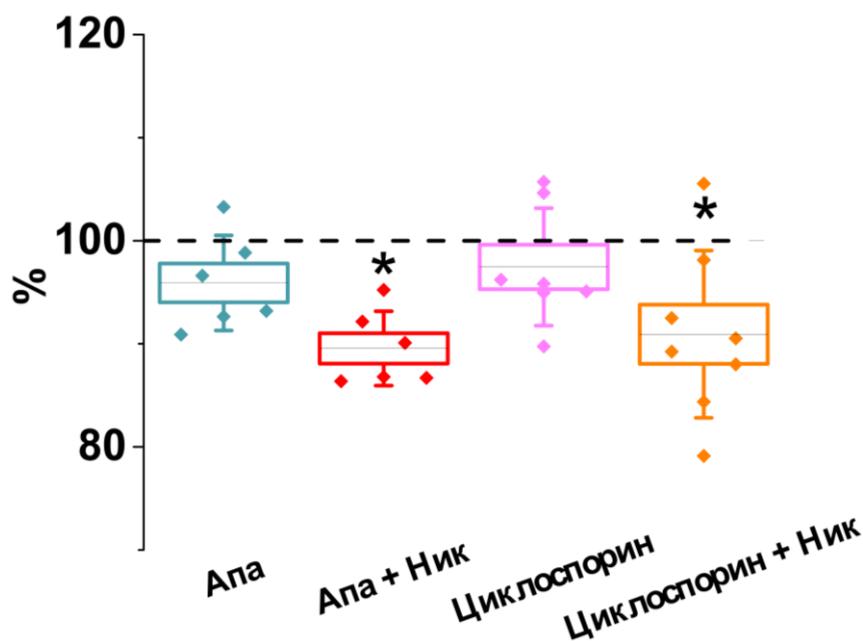


Рис. 6. Вызванное никотином (Ник) снижение высвобождения АХ наблюдается в присутствии апамина (Апа) и на фоне действия циклоспорина А. Данные представлены в виде СРЗНАЧ \pm ошибка среднего и СКО квантового состава ПКП, полученные в вышеперечисленных сериях и выраженные в процентах от значения в контроле (Апа, Циклоспорин) и после аппликации блокаторов. Звёздочкой (*) отмечены достоверные изменения ($p<0.05$).

Таким образом, можно заключить, что наблюдаемое уменьшение квантового состава при активации никотиновых рецепторов нейронального типа не связано ни с апамин-чувствительными КСа каналами и не с кальций-зависимым белком кальцинейрином.

6. Активация мускариновых рецепторов приводит к уменьшению пресинаптического уровня кальция и квантового состава ПКП

Наряду с активацией пресинаптических ионотропных никотиновых рецепторов АХ, активирует и метаботропные мускариновые рецепторы. Они также могут изменять интенсивность кальций-зависимого квантового выделения ацетилхолина (Slutsky et al., 1999; Santafé et al., 2004, 2007).

Агонист метаботропных холинорецепторов мускарин (10 мкМ). Приводил к крайне слабому, но достоверному уменьшению количества выбрасываемых квантов нейромедиатора на $4.7 \pm 2.7\%$ ($n=8$, $p<0.05$, рис. 7).

В то же время кальциевый транзиент после аппликации мускарина уменьшался на $18.5 \pm 2.9\%$ ($n=13$, $p<0.05$, рис. 7). Таким образом, при активации пресинаптических

мускариновых холинорецепторов уменьшается вход ионов кальция в нервную терминаль и снижается количество выделяемого ацетилхолина.

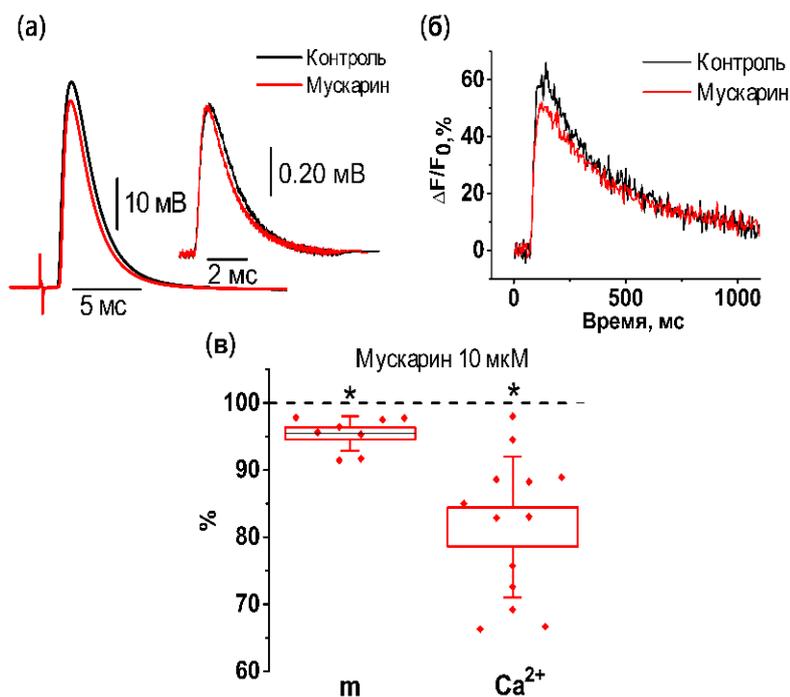


Рис. 7. Эффекты активации мускариновых рецепторов на квантовый состав и амплитуду кальциевого транзientа: а) репрезентативные сигналы вызванных ПКП и мПКП в контроле и после аппликации мускарина (10 μ М) б) репрезентативные сигналы кальциевых транзientов в контроле и после аппликации мускарина в) СРЗНАЧ \pm ошибка среднего и СКО квантового состава (m) и амплитуд кальциевых сигналов (Ca²⁺), полученные в вышеуказанных сериях и выраженные в процентах от контроля. Звёздочкой (*) отмечены достоверные изменения

В результате применения неселективного блокатора мускариновых рецепторов атропина (10 μ М) наблюдалось увеличение количества выделившихся квантов медиатора на $45.94 \pm 2.83\%$ (n=8, p<0.05). Амплитуда кальциевого транзientа также претерпевала рост на $20.0 \pm 2.3\%$ (n=27, p<0.05, рис. 8) в результате применения атропина. Эффект мускарина, снижающий амплитуду кальциевого транзientа, в условиях заблокированных мускариновых рецепторов, полностью отсутствовал.

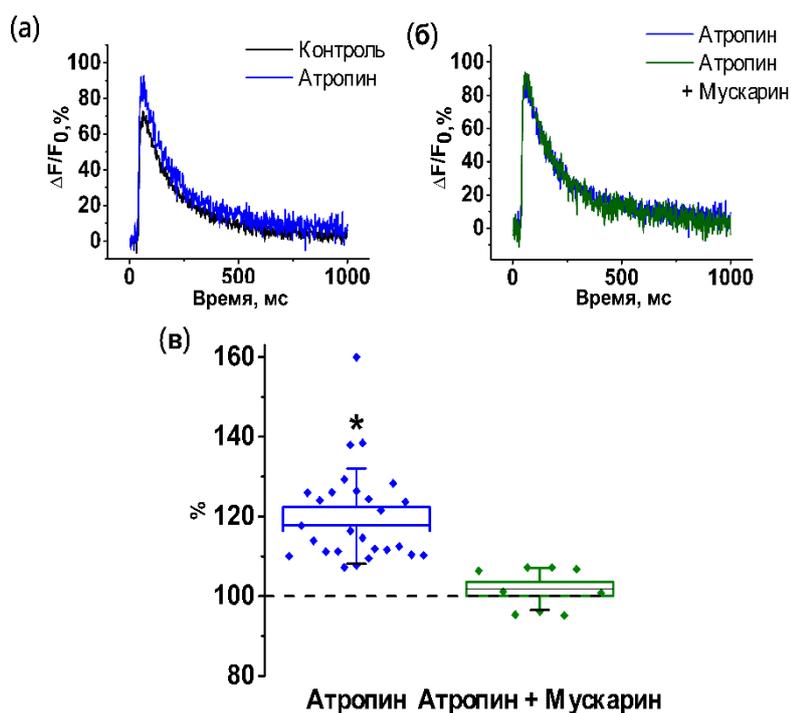


Рис. 8. Амплитуда кальциевого транзientа на фоне блокады мускариновых рецепторов блокатором атропином (10 μ М): (а), (б) репрезентативные сигналы кальциевого транзientа в контроле и после аппликации атропина; (в) СРЗНАЧ \pm ошибка среднего и СКО амплитуды кальциевого сигнала, полученные в вышеперечисленных сериях и выраженные в процентах от значения в контроле и после аппликации блокатора. Звёздочкой (*) отмечены достоверные изменения (p<0.05).

Эксперименты с атропином, указывают на то, что мускариновые холинорецепторы активируются тонически эндогенно выделяемым ацетилхолином. Активация мускариновых рецепторов приводит к уменьшению пресинаптического уровня кальция и квантового состава ПКП.

7. Определение подтипов мускариновых рецепторов, участвующих в регуляции пресинаптического уровня кальция

В нервно-мышечном синапсе мышцы (m. LAL) была показана экспрессия четырех подтипов мускариновых рецепторов M1, M2, M3, M4 из них только M1 и M2 подтипы участвуют в регуляции выброса нейромедиатора, (Minic et al., 2002).

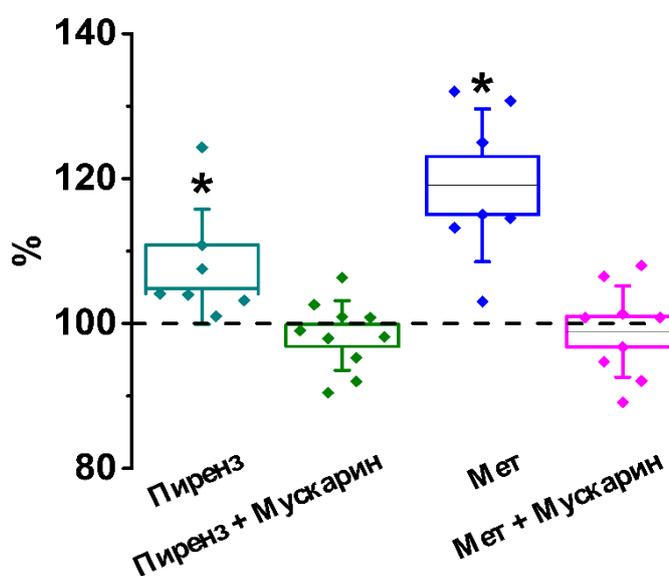


Рис. 9. Амплитуда кальциевого транзientа на фоне блокады мускариновых рецепторов M1 и M2 подтипа при аппликации пирензепина (Пиренз, 10 мкМ) и метактрамина (Мет, 1 мкМ), соответственно, и отсутствие влияния мускарина (10 мкМ) на фоне действия блокаторов. Данные представлены в виде СРЗНАЧ ± ошибка среднего и СКО амплитуды кальциевого сигнала, полученные в вышеперечисленных сериях и выраженные в процентах от значения в контроле и после аппликации блокатора. Звёздочкой (*) отмечены достоверные изменения ($p < 0.05$).

В результате блокады M1 подтипа рецепторов пирензепином наблюдалось увеличение амплитуды кальциевого транзientа на $7.8 \pm 2.9\%$ ($n=7$, $p < 0,05$, рис. 9), а в случае блокады M2 подтипа метоктрамином - на $19 \pm 3.9\%$ ($n=7$, $p < 0,05$, рис. 9). Аппликация мускарина (10 мкМ) после блокады каждого из подтипов мускариновых рецепторов (M1 и M2) не вызывала каких-либо изменений пресинаптического уровня кальция (рис. 9). Исходя из полученных результатов, можно заключить, что активация эндогенным АХ как M1, так и M2 подтипа мускариновых рецепторов приводит к уменьшению кальциевого транзientа в нервно-мышечном синапсе. Вероятнее всего, это происходит вследствие взаимодействия метаботропных холинорецепторов с кальциевыми каналами плазматической мембраны через систему G-белков (Brown, 2018).

8. Мускариновые рецепторы изменяют уровень кальция в пресинаптических окончаниях за счет модуляции работы кальциевых каналов P/Q-типа

На фоне блокады кальциевых каналов P/Q-типа ω -агатоксином (40 нМ), эффекты последующей аппликации мускарина полностью отсутствовали $103.5 \pm 2.5\%$ ($n=7$, $p > 0.05$; рис. 10). Полученный результат указывает на то, что мускариновые рецепторы могут модулировать

вход кальция в двигательные нервные окончания через основной тип потенциал-чувствительных кальциевых каналов P/Q-типа.

На фоне модулятора рианодиновых рецепторов рианофина (10 мкМ) апплицировали мускарин (10 мкМ). Эффект мускарин в данных условиях снижался и уменьшение амплитуды кальциевого транзientа составляло лишь $10.0 \pm 3.4\%$ ($n=9$, $p<0.05$; рис. 10), вместо 18.5% в контроле. Благодаря полученным результатам, можно сделать вывод, что активация мускариновых рецепторов приводит к уменьшению внутриклеточного уровня кальция не только за счет угнетения работы потенциал-чувствительных P/Q-типа каналов, но и изменения выброса Ca^{2+} через рианодиновые рецепторы.

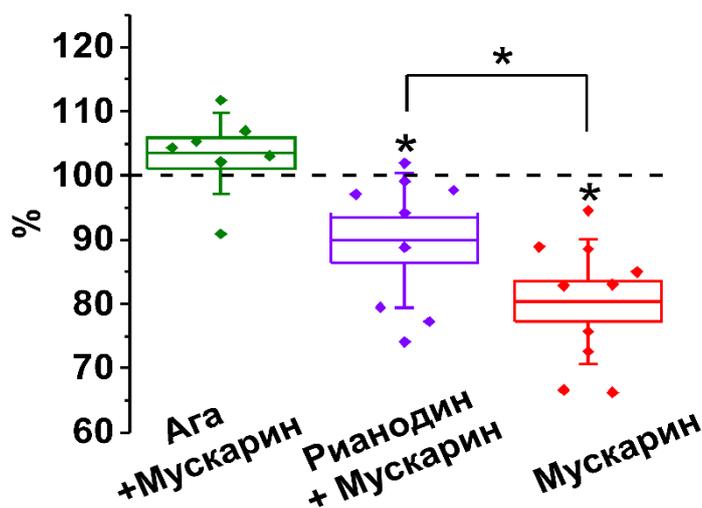


Рис. 10. Отсутствие эффекта мускарин (снижение амплитуды кальциевого транзientа) на фоне блокады P/Q-типа каналов при помощи ω -агатовксина (Ага, 40 нМ). Снижение эффекта мускарин (снижение амплитуды кальциевого транзientа) на фоне блокады рианодиновых каналов при помощи рианофина (10 мкМ) и на фоне его действия уменьшение влияния мускарин (10 мкМ). Звездочкой (*) отмечены достоверные изменения ($p<0.05$).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящем исследовании был осуществлен анализ амплитуд кальциевого транзientа и количества выделяющихся квантов нейромедиатора из двигательных НО мышцы в условиях модуляции работы холинэргических никотиновых и мускариновых рецепторов. Полученные результаты демонстрируют, что активация каждого из типов холинэргических рецепторов угнетает выделение АХ. Это хорошо коррелирует с данными, полученными ранее другими исследователями на других объектах (Protti and Uchitel, 1993; Van der Kloot, 1993; Tian et al., 1994; Prior and Singh, 2000; Santafé et al., 2003; Balezina et al., 2006). Ранее высказывались предположения о том, что эти эффекты могут быть связаны с изменениями Ca^{2+} , входящего в клетку (Prior and Singh, 2000; Urbano et al., 2002), однако прямого подтверждения этой гипотезы до настоящего момента получено не было. Для реализации поставленной задачи, нами была разработана методика загрузки НО теплокровных Ca^{2+} красителем и зарегистрирован Ca^{2+} транзient в периферических НО.

На первом этапе работы поочередно «выключая» возможные источники Ca^{2+} при помощи селективных блокаторов кальциевых каналов, оценивался вклад последних в

формирование Ca^{2+} транзientа. Было установлено, что наибольший вклад в формирование амплитуды Ca^{2+} транзientа вносят потенциал-чувствительные каналы P/Q-типа, в меньшей степени каналы L-типа и лишь малая часть определена кальцием, выбрасываемым из ЭПР через рианодиновые рецепторы.

Поскольку угнетающий эффект никотина на квантовый состав полностью отсутствовал на фоне антагониста нейрональных холинорецепторов ДНβЕ, то было сделано заключение об участии именно этих рецепторов в реализации холинергического механизма регуляции выделения АХ. Особый интерес вызывают результаты, демонстрирующие, что активация именно нейрональных холинорецепторов (чувствительных к ДНβЕ), приводящая к снижению выброса АХ, сопровождается увеличением входа Ca^{2+} в нервную терминаль. При этом отмечен весьма важный момент, а именно, собственный эффект ДНβЕ на амплитуду Ca^{2+} транзientа. Его наличие указывает на то, что имеет место эндогенная активация пресинаптических нейрональных холинорецепторов и это отражается на увеличении входа кальция в моторные нервные окончания. Кроме того, было установлено, что такое увеличение пресинаптического уровня Ca^{2+} опосредуется работой потенциал-чувствительных каналов L-типа. Это само по себе является важным результатом, демонстрирующим функциональное взаимодействие между нейрональными холинорецепторами и каналами L-типа.

На основании проведенных экспериментов по выявлению возможного механизма никотин-индуцированного снижения выброса нейромедиатора можно заключить, что наблюдаемое уменьшение квантового состава при активации никотиновых рецепторов нейронального типа не связано с апамин-чувствительными K_{Ca} каналами и с кальций-зависимым белком кальцинейрином.

Активация мускариновых рецепторов, в отличие от никотиновых рецепторов, сопровождалась понижением амплитуды кальциевого транзientа. Уменьшение уровня внутриклеточного кальция способно объяснить наблюдаемое снижение количества выделяющихся квантов АХ. Далее, в рамках настоящего исследования было определено как влияют на кальциевый транзient M1 и M2 подтипы мускариновых холинорецепторов, принимающие участие в регуляции выброса нейромедиатора (Minic et al., 2002). Получен результат, свидетельствующий о наличии тонической активации ацетилхолином мускариновых рецепторов M1 и M2 подтипов.

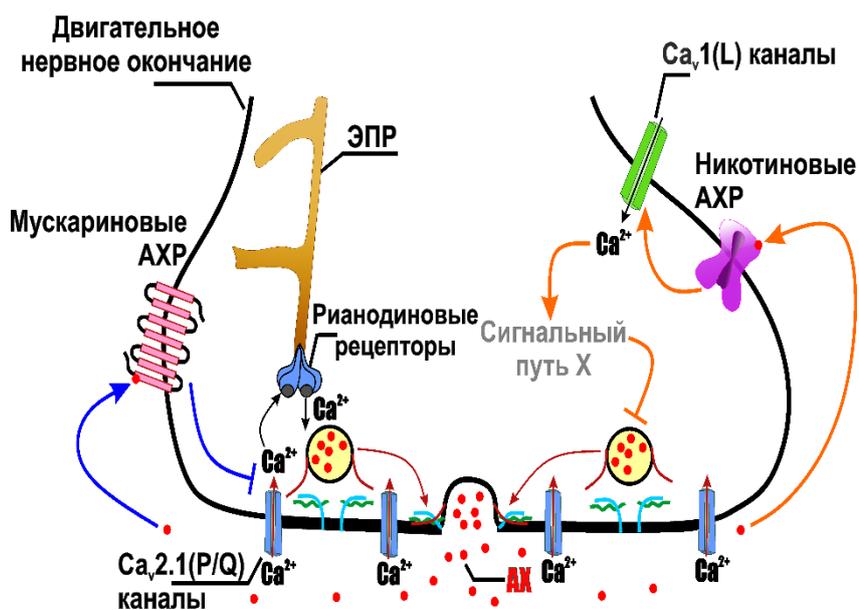


Рис. 11. Схема осуществления ауторегуляции выброса ацетилхолина (АХ) при активации пресинаптических холинорецепторов. АХ активирует нейрональные никотиновые рецепторы, которые потенцируют вход кальция через каналы L-типа, в результате чего запускается неидентифицированная к настоящему моменту сигнальная цепочка (обозначена буквой X), приводящая к угнетению квантового освобождения АХ (отображено оранжевыми

линиями справа). Также АХ активирует мускариновые рецепторы, которые ингибируют потенциал-чувствительные кальциевые каналы P/Q-типа (отображено синими линиями слева).

В настоящем исследовании было установлено, что эффект активации мускариновых рецепторов на кальциевый транзистент реализуется путем влияния на каналы P/Q-типа, а также на освобождение Ca^{2+} из рианодиновых каналов, локализованных на ЭПР. Эти данные хорошо согласуются с работами, проведенными ранее другими исследователями (Santafé et al., 2003, 2004), в которых было показано, что эффекты блокаторов подтипов мускариновых холинорецепторов, ответственных за регуляцию выброса нейромедиатора, полностью снимались на фоне частичной блокады каналов P/Q-типа. На культуре клеток НЕК-293 также было показано, что мускариновые рецепторы при их активации после взаимодействия с АХ способны ингибировать выход кальция из внутриклеточных запасов (Sternfeld et al., 2007).

Таким образом, активация нейрональных никотиновых холинорецепторов приводит к повышению пресинаптического уровня кальция за счет его поступления через L-тип кальциевых каналов. Напротив, активация мускариновых рецепторов M1 и M2 подтипа приводит к снижению пресинаптического уровня Ca^{2+} за счет уменьшения его входа через кальциевые каналы P/Q-типа и уменьшения выброса из ЭПР. Однако, и в том и в другом случае активация этих рецепторов сопровождается угнетением секреции АХ.

ВЫВОДЫ

1. Разработан метод оценки кальциевого транзientа в двигательных нервных окончаниях мышцы с помощью флуоресцентного красителя. Применение данного метода позволило выявить, что формирование пресинаптического кальциевого транзientа в двигательных нервных окончаниях мышцы основной вклад вносит вход кальция через кальциевые каналы P/Q-типа, в меньшей степени через каналы L-типа.
2. Рианодин-чувствительные рецепторы двигательных нервных окончаний участвуют в формировании кальциевого транзientа, возникающего при низкочастотном раздражении двигательного нерва.
3. Активация никотиновых рецепторов, содержащих β_2 -субъединицу, приводит к увеличению амплитуды кальциевого транзientа за счет входа ионов кальция через потенциал-чувствительные кальциевые каналы L-типа.
4. Активация никотиновых рецепторов, содержащих β_2 -субъединицу, приводит к снижению интенсивности секреции квантов медиатора. Этот эффект устраняется при блокаде потенциал-чувствительных кальциевых каналов L-типа.
5. Активация мускариновых рецепторов приводит к уменьшению входа кальция в нервное окончание за счет модуляции работы P/Q-типа каналов и рианодиновых рецепторов.
6. Увеличение кальциевого транзientа в присутствии антагонистов мускариновых холинорецепторов свидетельствует о вовлечении этого типа рецепторов в эндогенную регуляцию кальциевого входа в двигательное нервное окончание.
7. Уменьшение кальциевого транзientа в присутствии специфического антагониста никотиновых рецепторов, содержащих β_2 -субъединицу, свидетельствует о наличии эндогенной регуляции пресинаптического кальциевого входа в двигательном нервном окончании через этот тип рецепторов.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Samigullin, D. V. Calcium Transient Registration in Response to Single Stimulation and During Train of Pulses in Mouse Neuromuscular Junction / E.F. Khaziev, **N. V. Zhilyakov**, I.A. Sudakov, E.A. Bukharaeva, E.E. Nikolsky // *Bionanoscience*. - 2016. - V. 7. - P. 1–5. (Scopus Q4, WoS Q4).
2. Samigullin, D. V. Calcium Transient and Quantal Release in Mouse Neuromuscular Junction Under Extracellular Calcium Concentration Change / **N. V. Zhilyakov**, E.F. Khaziev, E.A. Bukharaeva, E.E. Nikolsky // *Bionanoscience*. - 2018. - V. 8. - P. 984–987. (Scopus Q4, WoS Q4).
3. **Zhilyakov, N. V.** Changes in calcium levels in motor nerve endings in mice on activation of metabotropic cholinergic receptors and GABA receptors / E.F. Khaziev, A.R. Latfullin, A.I. Malomouzh, E.A. Bukharaeva, E.E. Nikolsky, D. V. Samigullin // *Neurosci. Behav. Physiol.* - 2019. - V. 49. - P. 1092–1095. (Scopus Q4)
4. **Zhilyakov, N.** Activation of neuronal nicotinic receptors inhibits acetylcholine release in the neuromuscular junction by increasing Ca²⁺ flux through Cav1 channels / A. Arkhipov, A. Malomouzh, D. Samigullin // *Int. J. Mol. Sci.* - 2021. - V. 22. (Scopus Q1, WoS Q1).
5. **Zhilyakov, N. V.** Registration of Calcium Transients in Mouse Neuromuscular Junction with High Temporal Resolution using Confocal Microscopy / A.Y. Arkhipov, E.F. Khaziev, M.A. Mukhamedyarov, D. V. Samigullin // *J. Vis. Exp.* - 2021. (Scopus Q2, WoS Q3).

Тезисы докладов

1. **Жиляков Н.В.**, Латфуллин А.Р., Хазиев Э.Ф., Бухараева Э.А., Никольский Е.Е., Самигуллин Д.В. Анализ влияния внеклеточного кальция на параметры синаптической передачи // Международной научно-технической конференции молодых ученых, аспирантов и студентов «Прикладная электродинамика, фотоника и живые системы» Россия, Казань, 12-14 апреля 2017 г., КНИТУ-КАИ, 2017. – С. 477-79
2. Самигуллин Д.В., Хазиев Э.Ф., **Жиляков Н.В.**, Бухараева Э.А., Никольский Е.Е., Механизм обратной связи как фактор обеспечения надежности передачи информации при межклеточном взаимодействии // Международной научно-технической конференции молодых ученых, аспирантов и студентов «Прикладная электродинамика, фотоника и живые системы» Россия, Казань, 12-14 апреля 2017 г., КНИТУ-КАИ, 2017. – С. 21-25
3. **Zhilyakov N.**, Khaziev E., Latfullin A., Bukharaeva E., Nikolsky E., Malomouzh A., Samigullin D. Estimation of changes of presynaptic calcium level during activation of muscarinic and GABA receptors in mammalian neuromuscular junction // 6TH EUROPEAN SYNAPSE MEETING Milan, Italy, December 04th – 06th, 2017. – P.87
4. **Жиляков Н. В.**, Хазиев Э. Ф., Маломуж А. И., Бухараева Э.А., Никольский Е.Е., Самигуллин Д.В. Оценка влияния холиномиметиков и гаммааминомасляной кислоты на уровень кальция в двигательных нервных окончаниях мышцы // Первая Всероссийская конференция и Школа с международным участием "Оптогенетика и оптофармакология": Сборник научных трудов, Санкт-Петербург, 11–15 апреля 2018 года / Под общ. редакцией М.Л. Фирсова. – Санкт-Петербург: ООО "Издательство ВВМ", 2018. – С. 66-68.
5. Самигуллин Д.В., Хазиев Э.Ф., **Жиляков Н.В.**, Архипов А. Ю., Бухараева Э.А., Никольский Е.Е. Регистрация быстрых флуоресцентных сигналов при помощи лазерного сканирующего конфокального микроскопа в периферических синапсах //

- «ПРИКЛАДНАЯ ЭЛЕКТРОДИНАМИКА, ФОТОНИКА И ЖИВЫЕ СИСТЕМЫ»
Россия, Казань, 2018г
6. Самигуллин Д.В., Хазиев Э.Ф., **Жиляков Н.В.**, Бухараева Э.А., Никольский Е.Е. Холинергическая регуляция входа кальция в периферических синапсах холонокровных и теплокровных животных как механизм модуляции выброса нейромедиатора синапсах // Материалы XXIII съезда Физиологического общества им. И. П. Павлова с международным участием, Воронеж, 18–22 сентября 2017 года. – Воронеж: Издательство Истоки, 2017. – С. 1980-1982.
 7. Самигуллин Д.В., Хазиев Э.Ф., **Жиляков Н.В.**, Бухараева Э.А., Никольский Е.Е. Имиджинг кальциевого метаболизма в периферических двигательных нервных окончаний // Первая Всероссийская конференция и Школа с международным участием "Оптогенетика и оптофармакология»: Сборник научных трудов, Санкт-Петербург, 11–15 апреля 2018 года / Под общ. редакцией М.Л. Фирсова. – Санкт-Петербург: ООО "Издательство ВВМ", 2018. – С. 107-110.
 8. **Жиляков Н.В.**, Латфуллин А.Р., Хазиев Э.Ф., Морозов О.Г., Самигуллин Д.В. Оценка изменений пресинаптического уровня кальция с помощью флуоресцентных кальций-чувствительных красителей различной аффинности в периферических синапсах // Адаптация развивающегося организма Материалы XIV Международная научная конференция, посвященная 80-летию Заслуженного деятеля науки РФ и РТ Ситдикова Фарита Габдулхаковича. Россия, Казань, 2019.
 9. Самигуллин, Д. В., **Жиляков Н. В.**, Архипов А. Ю. Кальций-зависимая регуляция выброса нейромедиатора в периферическом синапсе при активации пресинаптических рецепторов // Журнал эволюционной биохимии и физиологии. – 2020. – Т. 56. – № 7. – С. 686.
 10. **Жиляков, Н. В.**, Самигуллин, Д. В. Холинергическая регуляция входа кальция в моторное нервное окончание мышцы // Клеточная сигнализация: итоги и перспективы, Казань, 14–17 сентября 2021 года. – Казань: Издательство ФИЦ КазНЦ РАН, 2021. – С. 31-32.
 11. Самигуллин, Д. В., **Жиляков, Н. В.**, Архипов А. Ю., Нуруллин Л.Ф, Хазиев Э.Ф. Секретия ацетилхолина в нервно-мышечном синапсе: участие пресинаптических рецепторов и кальциевых каналов // Клеточная сигнализация: итоги и перспективы, Казань, 14–17 сентября 2021 года. – Казань: Издательство ФИЦ КазНЦ РАН, 2021. – С. 104.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает слова благодарности своему научному руководителю *Самигуллину Дмитрию Владимировичу* за переданные знания, навыки и опыт, а также за проведенную совместно научную работу. Автор искренне благодарен *Маломужу Артему Ивановичу*, *Архипову Арсению Юрьевичу* и *Хазиеву Эдуарду Фаритовичу* за содействие в процессе реализации исследования.

Слова благодарности автор адресует *Петрову Алексею Михайловичу* за внимательное прочтение и рецензирование настоящей работы, за все высказанные замечания и предложения. Также автор очень признателен за высказанные замечания и предложения *Бухараевой Элле Ахметовне* и *Петрову Константину Александровичу*.

Автор выражает большую благодарность всем членам лаборатории биофизики синаптических процессов.

Автор глубоко признателен и благодарен основателю и созидателю лаборатории биофизики синаптических процессов и, к величайшему сожалению, безвременно ушедшему *Никольскому Евгению Евгеньевичу*.