

КАЗАНСКИЙ ИНСТИТУТ БИОХИМИИ И БИОФИЗИКИ –
ОБОСОБЛЕННОЕ СТРУКТУРНОЕ ПОДРАЗДЕЛЕНИЕ ФЕДЕРАЛЬНОГО
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОГО ЦЕНТРА «КАЗАНСКИЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК»

На правах рукописи

Жиляков Никита Викторович

**Роль холинорецепторов в регуляции кальциевого транзientа и
освобождения нейромедиатора в нервно-мышечном синапсе мышцы**

1.5.2. – биофизика

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

НАУЧНЫЙ РУКОВОДИТЕЛЬ:
к.б.н., в.н.с. Самигуллин Дмитрий Владимирович

Казань – 2022

ОГЛАВЛЕНИЕ

| | |
|---|----|
| СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ | 4 |
| ВВЕДЕНИЕ | 6 |
| ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ | 12 |
| 1.1. Нейротрансмиссия в холинергическом синапсе..... | 12 |
| 1.2 Внутриклеточный уровень кальция и кальциевый гомеостаз | 14 |
| 1.3 Роль ионов кальция в процессах синаптической передачи..... | 22 |
| 1.4 Потенциал-чувствительные кальциевые каналы..... | 23 |
| 1.4.1 Cav1 тип кальциевых каналов | 24 |
| 1.4.2 Cav2 тип кальциевых каналов | 27 |
| 1.4.3 Cav3 тип кальциевых каналов | 29 |
| 1.5 Холинергическая регуляция выброса нейромедиатора и входа кальция в моторное окончание. | 31 |
| 1.6 Метаботропные рецепторы..... | 32 |
| 1.6.1 Мускариновые рецепторы | 35 |
| 1.6.2 Влияние мускариновых рецепторов на выброс квантов медиатора.... | 37 |
| 1.7 Ионотропные рецепторы | 40 |
| 1.7.1 Никотиновые рецепторы | 41 |
| 1.7.2 Влияние никотиновых рецепторов на выброс квантов медиатора | 44 |
| 1.8 Методы регистрации пресинаптического уровня кальция. | 45 |
| 1.8.1 Флуоресцентные кальциевые индикаторы | 47 |
| 1.8.2 Методы загрузки кальциевых индикаторов | 56 |
| ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ | 59 |
| 2.1 Объект исследования | 59 |
| 2.2 Электрофизиологические исследования..... | 60 |
| 2.3 Флуоресцентные красители и методика их загрузки | 61 |
| 2.4 Регистрация и обработка кальциевых сигналов | 65 |
| 2.5 Реагенты | 68 |
| 2.6 Статистическая обработка данных | 69 |
| ГЛАВА 3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ | 70 |
| 3.1 Оценка влияния красителя на процесс выброса нейромедиатора..... | 70 |
| 3.2 Параметры зарегистрированного кальциевого транзientа | 71 |
| 3.3 Оценка изменения кальциевого транзientа и квантового выброса нейромедиатора при изменении внеклеточной концентрации ионов кальция | 75 |

| | |
|---|-----|
| 3.4 Эффекты блокады всех типов потенциал-чувствительных кальциевых каналов путем аппликации хлорида Cd..... | 77 |
| 3.5 Участие кальциевых каналов и рианодиновых рецепторов в формировании кальциевого транзientа. Роль Cav1 каналов в процессе выделения нейромедиатора. | 79 |
| 3.6 Роль никотиновых рецепторов в регуляции пресинаптического уровня кальция и выделения нейромедиатора..... | 88 |
| 3.6.1 Влияние никотина на электрофизиологические параметры нервно-мышечного синапса. | 88 |
| 3.6.2 Активация нейрональных никотиновых рецепторов приводит к уменьшению квантового состава ПКП, но увеличению амплитуды кальциевого транзientа | 92 |
| 3.6.3 Нейрональные никотиновые рецепторы изменяют уровень кальция в пресинаптических окончаниях, открывая кальциевые каналы L-типа (Cav1) | 96 |
| 3.6.4 Никотин-индуцированное снижение высвобождения ацетилхолина опосредовано кальциевыми каналами L-типа (Cav1)..... | 103 |
| 3.6.5 Выявление внутриклеточных механизмов, ответственных за уменьшение выброса АХ, при изменении входа Ca^{2+} в нервное окончание | 105 |
| 3.7 Роль мускариновых рецепторов в регуляции пресинаптического уровня кальция и выделения нейромедиатора..... | 109 |
| 3.7.1 Активация мускариновых рецепторов приводит к уменьшению пресинаптического уровня кальция и квантового состава ПКП | 109 |
| 3.7.2 Определение подтипов мускариновых рецепторов, участвующих в регуляции пресинаптического уровня кальция | 113 |
| 3.7.3 Мускариновые рецепторы изменяют уровень кальция в пресинаптических окончаниях, модулируя работу кальциевых каналов P/Q-типа ($Ca_v2.1$) | 117 |
| 3.7.4 Влияние активации мускариновых рецепторов на кальциевый транзient при модуляции рианодин-чувствительных рецепторов. | 119 |
| ЗАКЛЮЧЕНИЕ | 121 |
| ВЫВОДЫ..... | 128 |
| СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | 129 |

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

1. АТФ – аденозинтрифосфат
2. АХ – ацетилхолин
3. АХЭ – ацетилхолинэстераза
4. АЦП – аналого-цифровой преобразователь
5. ГАМК – гамма-аминомасляная кислота
6. ГКИ – генетически кодируемые индикаторы
7. ДМСО – диметилсульфоксид, биполярный апротонный растворитель
8. mNa^+/Ca^{2+} обменник – митохондриальный натрий-кальциевый обменник
9. мПКП – миниатюрные потенциалы концевой пластинки
10. МПП – мембранный потенциал покоя
11. мХР – мускариновые ацетилхолиновые рецепторы
12. НО – нервное окончание
13. нХР – никотиновые ацетилхолиновые рецепторы
14. ПКА – протеинкиназа А
15. ПКС – протеинкиназа С
16. ПД – потенциал действия
17. ПКП – потенциалы концевой пластинки
18. ПМ – плазматическая мембрана
19. СКО – среднееквадратическое отклонение
20. СРЗНАЧ – среднее значение
21. УФ – ультрафиолет
22. ЦНС – центральная нервная система
23. ЭПС – эндоплазматическая сеть
24. АМ – ацетоксиметилловый (эфир)
25. ВАРТА – чувствительная к кальцию аминополикарбонная кислота
26. Ca^{2+} – кальций
27. Ca^{2+} -транзиент – кальциевый транзиент
28. СаМ – кальмодулин
29. САМК II – кальмодулин-зависимая протеинкиназа II

30. Ca_v – потенциал-чувствительные кальциевые каналы
31. CDI – кальций-зависимое ингибирование
32. CDF – кальций-зависимая фасилитация
33. CRAC – каналы, управляемые кальциевыми депо, активируемые высвобождением кальция
34. DH β E – дигидробетаэритроэдин
35. GIRK – G-белок-связанные встроенные калиевые каналы
36. GPCR – G-белок связанные рецепторы
37. In vivo – внутри живого организма
38. IP $_3$ – инозитолтрифосфат
39. IP $_3$ R – инозитолтрифосфатный рецептор
40. K_D – константа диссоциации
41. Na^+/Ca^{2+} обменник – натрий-кальциевый обменник
42. NMDA – ионотропный рецептор глутамата, селективно связывающий N-метил-D-аспартат (NMDA)
43. m – квантовый состав
44. PDK1 – фосфоинозитидзависимая киназа 1
45. pH – водородный показатель
46. PIP $_2$ – фосфатидилинозит 4,5-бисфосфата; фосфолипидный компонент клеточных мембран
47. PLC β – фосфолипаза C β
48. PMCA – плазма-мембранная кальциевая АТФаза
49. SERCA – Ca^{2+} -АТФаза сарко-эндоплазматического ретикулума
50. SNARE – семейство белков, обеспечивающих слияние везикул с пресинаптической мембраной
51. TrkB – тирозинкиназный рецептор B

ВВЕДЕНИЕ

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; Nikolsky et al., 2004; Balezina et al., 2006; 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 освобождаемого 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 транзистент), 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 BAPTA 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 транзистента, 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+} -транзиента 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 транзиента 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 транзиента 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 транзиента, за счет модуляции работы P/Q-типа каналов и рианодиновых 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.

Получены новые данные 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 19 печатных работ, в том числе 5 статей в рецензируемых журналах (из списка ВАК).

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). Работа содержит 36 рисунков и 4 таблицы.

ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Нейротрансмиссия в холинергическом синапсе

Сигнал от нейрона к эффекторной клетке передается на уровне специализированного межклеточного контакта, называемого синапсом. В подавляющем большинстве синапсов в нервной системе млекопитающих и человека передача сигнала осуществляется при помощи химического посредника - нейромедиатора. Существует большое множество нейромедиаторов, отличающихся по химическому составу. В зависимости от природы основного посредника, различают следующие типы синапсов: глутаматергические, адренергические, дофаминергические, пуринаергические, ГАМКергические, холинергические и т.д.

Синтез молекул нейромедиатора происходит либо в теле нейрона, либо в нервных окончаниях (терминалях) (Purves and Williams, 2001). Именно в этой части синапса нейромедиатор хранится в небольших контейнерах, называемых синаптическими везикулами. Везикулы способны осуществлять слияние с мембраной нервной терминали, благодаря взаимодействию с белками комплекса SNARE, находящихся в области активных зон. В результате такого взаимодействия нейромедиатор покидает пределы пресинаптической части и оказывается в синаптической щели (~50 нм), этот процесс называют экзоцитозом. Выделившееся содержимое одной везикулы принято считать одним квантом медиатора. Экзоцитоз осуществляется спонтанно, однако возникновение деполяризирующего потенциала, потенциала действия (ПД), на пресинаптической мембране, вызывает резкое значительное повышение концентрации кальция, приводящее к генерализованному слиянию синаптических везикул и массовому выделению нейромедиатора в синаптическую щель (Cohen-Cory, 2002).

Ацетилхолин (АХ) является основным нейромедиатором в периферической нервной системе позвоночных, в частности, ответственен за передачу сигнала с двигательного нерва на скелетную мышцу (Fillenz and

Hanafin, 1947; Del Castillo and Katz, 1957; Ciani and Edwards, 1963). Поскольку нервно-мышечный контакт является ключевым звеном в инициации любого двигательного акта (от произвольного движения конечностей до дыхания и сокращения голосовых связок), то изучение процессов регуляции нервно-мышечной трансмиссии представляется актуальным как для фундаментальной нейробиологии, так и для прикладной медицины.

Выделившийся в синаптическую щель АХ активирует никотиновые ацетилхолиновые рецепторы (нХР), которые находятся на постсинаптической мембране мышечного волокна (концевой пластинке) и обеспечивают вход ионов натрия внутрь, вызывая тем самым, ее деполяризацию. В случае достижения определенного порога деполяризации, генерируется постсинаптический ПД, который распространяется вдоль мышечной мембраны за счет открытия натриевых каналов, присутствующих в мышечной мембране, и это, в конечном итоге, приводит к сокращению мышцы (Cohen-Cory, 2002).

Как правило, воздействие АХ на рецепторы, находящихся на постсинаптической мембране, продолжается недолго – всего лишь 1-2 мс, поскольку АХ гидролизуется ферментом ацетилхолинэстеразой (которая расщепляет медиатор до холина и уксусной кислоты). Таким образом, ацетилхолинэстераза (АХЭ) позволяет удалить медиатор из синаптической щели после передачи сигнала, благодаря чему рецепторы способны быстро восстановиться и быть готовыми связаться со вновь выделившимся медиатором. Образовавшийся при гидролизе медиатора холин подвергается обратному захвату нервным окончанием, где он превращается в АХ, благодаря соединению с ацетил-коэнзимом (Ацетил-КоА) при помощи фермента холин ацетилтрансферазы, после чего заново упаковывается в везикулы (Taylor and Brown, 1999).

Как было показано многими исследователями, рецепторы, чувствительные к АХ, экспрессируются не только на пост-, но также на

пресинаптической мембране и Шванновской клетке (Bowman et al., 1990; Miller, 1990; Santafé et al., 2004; Petrov et al., 2014; Tomàs et al., 2014). Там они играют роль сенсора, определяющего содержание АХ в синаптической щели и способного регулировать процесс выделения последующих порций нейромедиатора (Ciani and Edwards, 1963; Minenko and Magazanik, 1986; Prior and Singh, 2000; Balezina et al., 2006; Petrov et al., 2014; Wang et al., 2016, 2018). Этот процесс называют ауторегуляцией секреции нейромедиатора, который является важной компонентой, не только в обеспечении надежности синаптической передачи, но и в основе такого свойства межклеточного контакта, как синаптическая пластичность (Wang et al., 2018). Принципиально важной задачей является определение подтипов рецепторов, участвующих в реализации ауторегуляции АХ.

Поскольку активность машины экзоцитоза напрямую зависит от количества ионов кальция, входящих в клетку после возникновения ПД, то было выдвинуто предположение о том, что активация холинергических рецепторов, находящихся на пресинаптической мембране может изменять его. При этом, получены экспериментальные свидетельства, указывающие на возможное участие потенциал-чувствительных кальциевых каналов (Ca_v) L-типа (Prior and Singh, 2000) и P/Q- типа (Santafé et al., 2004) в процессах модуляции нейросекреции.

1.2 Внутриклеточный уровень кальция и кальциевый гомеостаз

Обычно концентрации ионов снаружи нейронов находятся в миллимолярном диапазоне (около 1,5-2 мМ). Однако, концентрация кальция внутри нейронов очень низкая, обычно 50 - 100 нМ (для сравнения, цитоплазматическая концентрация натрия составляет около 15 мМ, калия - около 140 мМ, а хлора - около 10 мМ.). В результате разница концентрации кальция около плазматической мембраны составляет примерно пять порядков (примерно 20000-40000: 1). Этот градиент концентрации кальция создает очень большую движущую силу для входа Ca^{2+} вблизи покоящейся мембраны,

таким образом, когда кальциевые каналы на поверхности мембраны открываются, большое количество кальция течет через открытые каналы, и наблюдается резкий рост внутриклеточного кальция. Поскольку внутриклеточная концентрация кальция в обычном состоянии довольно низкая, но может подвергаться быстрому, значительному локальному увеличению, благодаря открытию кальциевых каналов, кальций служит точным биохимическим триггером внутри клеток. Клетки используют различные механизмы для поддержания низкой концентрации ионов кальция, включая внутрисплазматические транспортеры, внутриклеточные органеллы (хранилища), и белковые буферы.

Существует 2 плазматических мембранных транспортера, которые выкачивают кальций из цитоплазмы, если его уровень превышает концентрации в покое (Brini and Carafoli, 2011). Для этого процесса необходима энергия, потому что даже когда внутриклеточная концентрация кальция значительно возрастает относительно состояния покоя (10мкМ), то концентрация кальция за пределами клетки все равно намного больше (1.5-2.5 мМ). Таким образом, насосным системам необходимо использовать источники энергии, чтобы выкачивать кальций против сильного концентрационного градиента.

Первый транспортер, или насос, это плазма-мембранная кальциевая АТФаза (plasma membrane Ca^{2+} ATPase, PMCA; Рис. 1). Этот транспортер является частью большого семейства ионных липидных транспортеров, называемых «Р-АТФазы», названные так благодаря их способности фосфорилировать самих себя с использованием АТФ (Palmgren and Nissen, 2011).

PMCA насос содержит вискоаффинный кальций-связывающий сайт. Аффинность – свойство характеризующее силу связывания свободной молекулы и связующего агента. Сила связывания обычно измеряется путем определения равновесия константы диссоциации (K_D). K_D рассчитывается из соотношения скорости разрушения связи, деленной на скорость связывания,

а K_D и аффинность обратно пропорциональны. Таким образом малое значение K_D указывает на большую степень аффинности молекулы к его связывающему агенту. РМСА насос часто также ассоциируется с кальций-связывающим белком кальмодулином. Когда внутриклеточный уровень кальция повышается, кальций активирует кальмодулин, который связывается с РМСА и увеличивает аффинность кальций-связывающего сайта.

Значение K_D для РМСА составляет около 300-500нМ (Carafoli, 1991; Mangialavori et al., 2010), это значит, что, когда цитоплазматическая концентрация кальция возрастает с 50-100нМ до 300-500 нМ, существует 50% процентная вероятность что кальций соединится со связывающим сайтом на РМСА в отдельно взятый момент времени.

Вторым транспортером, который вносит вклад в удалении излишков кальция из цитоплазмы это натрий-кальциевый обменник (Na^+/Ca^{2+} обменник (NCX); Рис. 1), который принадлежит большому семейству кальций/катионных обменников (Brini and Carafoli, 2011). Как следует из названия, Na^+/Ca^{2+} обменник обменивает ионы кальция на ионы натрия через плазматическую мембрану, перемещая один ион кальция из клетки, он перемещает три иона натрия в клетку. Этот насос также должен транспортировать ионы кальция против сильного градиента концентрации кальция, но он не использует АТФ в качестве источника энергии для этого процесса. Вместо этого Na^+/Ca^{2+} обменник использует сильный градиент натрия, снаружи клеточной мембраны. Перемещение ионов натрия вниз по градиенту их концентрации обеспечивает энергию, необходимую для перемещения ионов кальция против градиента их концентрации.

Если бы Na^+/Ca^{2+} обменник был более активным, это электрогенное действие слегка деполяризовало клетку. Однако Na^+/Ca^{2+} обменник не так активен, потому что он имеет более низкое сродство к связыванию кальция, чем транспортер РМСА; его расчетное сродство к связыванию с кальцием находится в диапазоне 700 нМ - 1 мкМ (Blaustein et al., 1991; Lee et al., 2007). Несмотря на низкое сродство, Na^+/Ca^{2+} обменник работает с большей

производительностью, чем РМСА, это означает, что он качает кальций быстрее, в то время пока он активен. Тем не менее, поскольку концентрация кальция в нервном окончании редко достигает уровней, достаточно высоких для активации $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ обменника, считается, что он только кратковременно активен после высокочастотной пачки ПД. Обычно считается, что $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ обменник расположен далеко от активной зоны нервной терминали (Juhaszova et al., 2000). Эти характеристики делают этот насос хорошо подходящим для быстрого восстановления после повышения кальция в нервном окончании.

В дополнение к мембранным насосам нервные окончания имеют органеллы, которые участвуют в кальциевом гомеостазе. Одной из таких органелл является эндоплазматическая сеть (ЭПС). ЭПС, как правило, больше известна своими функциями в теле клетки, но он также присутствует в аксонах и нервных окончаниях, где он поддерживает гомеостаз кальция (de Juan-Sanz et al., 2017), выступая в качестве внутриклеточной органеллы для хранения кальция. Концентрация кальция в покое внутри эндоплазматического ретикулума оценивается примерно в 150 - 500 мкМ, и значительно варьируется между в зависимости от типа клетки и ее активности (Yu and Hinkle, 2000; de Juan-Sanz et al., 2017).

Эндоплазматический ретикулум содержит несколько белковых комплексов, которые способствуют гомеостазу кальция. Первым является Ca^{2+} -АТФаза сарко-эндоплазматического ретикулума (sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase, SERCA). SERCA – это насос, который работает точно так же, как насос РМСА, описанный ранее, за исключением того, что он расположен на ЭПС. Там он связывается с ионами кальция в цитоплазме и качает их в ЭПС. Вторым является рианодиновый рецептор, который опосредует индуцированное кальцием высвобождение кальция (механизм положительной обратной связи) из эндоплазматического ретикулума. Рианодиновый рецептор представляет собой тип ионного канала, который открывается цитоплазматическим кальцием, позволяя большему количеству кальция проходить из ЭПС в цитоплазму. В синапсах рианодиновый рецептор,

по-видимому, участвует в зависимых от активности изменениях в синаптической передаче, поскольку поступление кальция во время ПД может вызывать высвобождение кальция из эндоплазматического ретикулума. Затем кальций, высвобождаемый из эндоплазматического ретикулума, вносит вклад в высвобождение нейротрансмиттера, запускаемого кальцием, во время следующего ПД (Unni et al., 2004; Khuzakhmetova et al., 2014; Futagi and Kitano, 2015; Johenning et al., 2015).

Третий белок является инозитолтрифосфатный рецептор (IP3R). Этот белок представляет собой лиганд-управляемый ионный канал, который активируется вторичным мессенджером инозитолтрифосфатом (IP3). При активации IP3, лиганд-управляемый ионный канал IP3R открывается, чтобы обеспечить высвобождение кальция из эндоплазматического ретикулума. Этот рецептор участвует в большом количестве модуляторных механизмов в синапсах, часто запускаемых G-белок связанными рецепторами.

Наконец, белки, называемые STIM1 и каналы, управляемые кальциевыми депо, активируемые высвобождением кальция (CRAC), могут определять концентрацию кальция в ЭПС и восполнять ее, когда она становится слишком низкой. STIM1 воспринимает кальций в той части белка, которая находится внутри ЭПС. Если белок STIM1 обнаруживает, что концентрация кальция в эндоплазматическом ретикулуме низкая, он связывается с другими белками STIM1 для создания мультибелкового комплекса, который связывается с белком Orai (Prakriya, 2013), который формирует пору канала CRAC. Связывание комплекса STIM1 с каналом CRAC побуждает канал открыться и пропускать кальций из внеклеточной жидкости в цитоплазму клетки (Hogan and Rao, 2015). Это происходит в локальных доменах, расположенных очень близко к эндоплазматической сети, где SERCA закачивает этот кальций в ЭПС.

Еще важными клеточными органеллами, участвующими в обеспечении кальциевого гомеостаза, являются митохондрии (Kwon et al., 2016) (Рис. 1). Повышение кальция в митохондриях важно для множества процессов. Так,

например, увеличение митохондриального кальция может активировать некоторые ферменты, которые задействованы в цикле Кребса и цепи транспорта электронов митохондрий, за счет чего запускается синтез АТФ (Delbaere et al., 1991; Tarasov et al., 2012; Ma et al., 2017). Также вход кальция в митохондрии защищает нейрон от Ca^{2+} токсичности и эксайтотоксичности, путем буферизации его цитозольного уровня (Blaustein, 1988; Werth and Thayer, 1994; El Idrissi, 2006; Bezprozvanny and Mattson, 2008). Кроме того, Ca^{2+} закаченный в митохондрии участвует в митохондриальном транспорте в нейронах из их тел в синапсы и обратно (Kang et al., 2008; MacAskill et al., 2009; Cai et al., 2011). Повышение кальция в синапсах в процессе синаптической передачи приводит к тому, что митохондрии остаются них (Kang et al., 2008; MacAskill et al., 2009; Cai et al., 2011).

Известно, что митохондрии буферизуют большое количество кальция при высокочастотной синаптической передачи, захватывая излишки Ca^{2+} , а затем постепенно, в течении длительного времени выбрасывают его, за счет откачивающих механизмов (Tang and Zucker, 1997; Kirichok et al., 2004). Это позволяет предотвратить нарушения синаптической передачи, поддерживать синапс и осуществлять тонкую подстройку цитозольных и митохондриальных уровней кальция в течении долгого времени. На самом деле кальциевая буферизация, осуществляемая митохондриями, важна даже в случаях, когда нейрон находится в покое – нервные терминалы без митохондрий обладают повышенной частотой спонтанного освобождения нейромедиатора (Kwon et al., 2016). Таким образом, поддержание уровня кальция в митохондриях является необходимым для правильного функционирования нейронов.

Митохондрия имеет внутреннюю и внешнюю мембраны, которые делят ее на два водных компартмента – межмембранное пространство и матрикс. Митохондриальный матрикс является огромным хранилищем Ca^{2+} , и может использоваться для динамического контроля внутриклеточного уровня кальция. Большая часть Ca^{2+} митохондриального матрикса находится в виде нерастворимого фосфата кальция, а другая часть находится в свободной

форме, однако их процентное соотношение может меняться. Только свободный кальций может перемещаться сквозь мембраны митохондрий.

Движение кальция вдоль внешней мембраны митохондрии обусловлено работой потенциал-чувствительного анионного канала. Этот сравнительно неселективный канал позволяет Ca^{2+} проникать внутрь межмембранного пространства митохондрий (Shoshan-Barmatz et al., 2017), в то время как более селективные механизмы контролируют прохождение кальция сквозь внутреннюю мембрану (как внутрь матрикса, так и из него). Существует 2 основных механизма, первый из которых обеспечивается работой митохондриального кальциевого унипортера, находящегося на внутренней мембране и обеспечивающего вход кальция по градиенту концентрации в матрикс. Второй обеспечивается работой митохондриального натрий-кальциевого обменника ($\text{mNa}^+/\text{Ca}^{2+}$ обменник), который так же находится на внутренней мембране. Он похож на $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ обменник плазматической мембраны, о котором говорилось выше (Palty and Sekler, 2012). $\text{mNa}^+/\text{Ca}^{2+}$ обменник использует натриевый градиент в качестве движущей силы, чтобы перемещать Ca^{2+} против его концентрационного градиента из матрикса. Митохондрии ощутимо не задействованы в обеспечении кальциевого гомеостаза при событиях, сопровождающихся небольшим входом Ca^{2+} , таких как одиночный ПД, однако они интенсивно используются в случае высокочастотной активности, при котором происходит значительное увеличение входа кальция (Kim et al., 2005).

В нейронах экспрессируется большое количество белков, связывающихся с Ca^{2+} (Schwaller, 2020) (Рис. 1). Эти белки находятся в цитоплазме в диапазоне концентраций от 10 мкМ до нескольких миллимолей. К таким белкам, можно отнести кальретинин, кальбиндин и парвальбумин. Эти белки действуют как как буферы, которые быстро снижают концентрацию свободного кальция в цитоплазме, после быстрого входа кальция в нервное окончание (НО). Кальций-связывающие белки зачастую оказывают влияние на синаптические функции и даже опосредовать

синаптическую пластичность (Pongs et al., 1993; Caillard et al., 2000; Schwaller et al., 2002).

Таким образом, можно заключить, что клетка оснащена кальций-контролирующими системами, обеспечивающими кальциевый гомеостаз, поскольку с помощью данного иона, осуществляется множество важных функций. Концентрация кальция в покое поддерживается на уровне 50-100 нМ, и система реагирует на резкое увеличение кальция в результате возникновения ПД, ограничивает распространение Ca^{2+} в цитоплазме и обеспечивает быстрое восстановление к уровням в покое.



Рис. 1. Краткое изложение механизмов буферизации и обработки кальция в нервных окончаниях. Эта схема представляет собой ряд механизмов, которые контролируют кальций в нервном окончании.

1.3 Роль ионов кальция в процессах синаптической передачи

Первые исследователи, изучавшие высвобождение нейромедиатора в химических синапсах, обнаружили, что концентрация внеклеточного кальция сильно влияла на количество его высвобождаемых квантов (Katz and Miledi, 1965). Когда экспериментально уменьшалась концентрация внеклеточного кальция с 2 мМ до 0,2 мМ, вероятность высвобождения нейромедиатора, вызванного ПД, также уменьшалась. Эти результаты указывают на то, что ПД открывает временный путь для входа кальция, который вызывает высвобождение нейромедиатора. Во время кратковременной деполяризации, вызванной потенциалом действия, концентрация внеклеточного кальция пропорциональна входу кальция, движущемуся внутрь клеток по градиенту концентрации. Эта интерпретация подтверждается экспериментом, в котором исследователи убрали весь кальций из внеклеточного раствора, а затем добавляли определенное количество кальция с помощью пипетки, расположенной очень близко к изучаемому синапсу. Когда внеклеточный кальций отсутствовал, потенциал концевой пластинки (ПКП) отсутствовал, но, когда кальций добавляли из пипетки в раствор, во время стимуляции нерва, ПКП мог быть зарегистрирован в постсинаптической мышечной клетке. Этот эксперимент показал, что процесс высвобождения нейротрансмиттера, напрямую зависит от кальция.

Немного позднее другие исследователи изучили эту взаимосвязь в нервно-мышечном соединении лягушки, варьируя концентрацию внеклеточного кальция (Dodge and Rahamimoff, 1967). Они построили график зависимости концентрации внеклеточного кальция от количества, выброшенного нейромедиатора (измеренного как величина ПКП), они обнаружили, что соотношение концентрация кальция/выброс нейромедиатора было нелинейным. Например, небольшие изменения в концентрации внеклеточного кальция привели к гораздо большим изменениям в высвобождении нейротрансмиттера (измеренных как изменения размера

ПКП). При построении графика в логарифмических шкалах отношение имело наклон около 4. Примечательно, что каждый синапс, который был изучен (для всех видов и типов нейронов), демонстрирует аналогичную зависимость между высвобождением кальция (с коэффициентами наклона 3-5). Так, например, для двигательных синапсов мыши коэффициент был рассчитан и равнялся 3 (Tsentsevitsky et al., 2015). Эти результаты показывают, что в моторных синапсах мыши необходимо как минимум 3 ионам кальция необходимо связаться с Ca^{2+} сенсором везикулы (синаптотагмином) (Meriney and Fanelow, 2019), чтобы вызвать его активацию.

Таким образом, после возникновения ПД на нервной терминали, концентрация кальция в ней резко возрастает, и запускается высвобождение нейротрансмиттера при повышении кальция до 10-100 мкМ в нервном окончании (Heidelberger et al., 1994; Schneggenburger and Neher, 2000). Такое повышение концентрации кальция в клетке обеспечивают потенциал-чувствительные кальциевые каналы, которые в покое находятся в закрытом состоянии и открываются в ответ на стимуляцию и изменение потенциала на мембране пресинаптической клетки.

1.4 Потенциал-чувствительные кальциевые каналы

Потенциал-чувствительные кальциевые каналы (Ca_v) осуществляют ряд ключевых функций возбудимых клеток, включая высвобождение медиатора и секрецию гормонов (Catterall et al., 2013), сокращение мышцы (Bannister and Bean, 2013), связь возбуждения и транскрипции (Wheeler et al., 2012). За десятилетия, прошедшие с момента первоначального электрофизиологического определения высоковольтных и низковольтных активируемых токов Ca^{2+} у беспозвоночных (Hagiwara et al., 1975), а затем в нейронах млекопитающих и клетках предсердия (Carbone and Lux, 1984; Bean, 1985), были определены подтипы Ca_v -каналов, лежащие в основе этих токов. В настоящее время ясно, что разделение между высоковольтными и низковольтными активируемыми Ca^{2+} -каналами было довольно-таки

искусственным, поскольку существует континуум порогов активации среди различных подтипов Ca_v , который может быть дополнительно усилен различными комбинациями вспомогательных субъединиц, а также путем альтернативного сплайсинга (Helton et al., 2005; Gray et al., 2007; Liao et al., 2009). Впоследствии, использование фармакологических и биохимических инструментов, а также наличие линий мышей, у которых отсутствует экспрессия специфических подтипов Ca_v -каналов, позволило сопоставить свойства клонированных изоформ Ca_v -каналов с теми, которые были идентифицированы в разных тканях.

1.4.1 Ca_v1 тип кальциевых каналов

Семейство кальциевых каналов Ca_v1 , известно также как потенциал-чувствительные кальциевые каналы L-типа. Они были обозначены буквой L, благодаря ранним исследованиям на миоцитах сердца (Nilius, 1986) и нейронах (Carbone and Lux, 1984; Nowycky et al., 1985), в которых было показано, что они обладают продолжительным проведением (long-lasting) токов во время деполяризации. Особенностью, данного типа Ca^{2+} каналов, является их высокая чувствительность к определенным органическим блокаторам (антагонистам каналов Ca^{2+} L-типа). Эти вещества применяются в качестве основных фармакологических инструментов для определения вклада L-типа каналов *in vitro*, но они также активно применяются в клинической практике для лечения сердечно-сосудистых заболеваний. Производные блокаторов с радиоактивной меткой позже были использованы для обратимого маркирования каналов L-типа в головном мозге, сердце, гладких и скелетных мышцах. Плотность каналов L-типа в скелетных мышцах оказалась выше на порядок, чем в остальных тканях, что позволило очистить комплекс каналов, определить его субъединицы и клонировать порообразующую субъединицу $\alpha 1$. Канал L-типа скелетных мышц, образованный субъединицами $\alpha 1 Ca_v1.1$, кодируется геном *CACNA1S* (Catterall et al., 2005). Полученная информация впоследствии позволила

осуществить клонирование α 1 субъединиц подтипов $Ca_v1.2$ (CACNA1C) и $Ca_v1.3$ (CACNA1D). Еще позже удалось идентифицировать еще один подтип каналов L-типа $Ca_v1.4$ (CACNA1F), находящихся в сетчатке (Beck-Hansen et al., 1998; Strom et al., 1998). Все четыре изоформы L-типа каналов обладают сходными фармакологическими свойствами, но различаются распределением в тканях и биофизических свойств. Более того, все они подвержены альтернативному сплайсингу, который может влиять на их активность и взаимодействие с другими модулирующими белками. Такая функциональная неоднородность позволяет подстраивать кальциевые сигналы в зависимости от необходимости клеток. Для всех четырех изоформ каналов L-типа, были описаны генетические заболевания человека, приводящие к усилению или нарушению клеточных функций.

Учитывая тканеспецифическую локализацию каналов L-типа и их различные функциональные роли, относящиеся к области экспрессии, эти каналы также имеют различный порог активации и кинетику. Например, $Ca_v1.1$ и $Ca_v1.2$ требуют деполяризационного порога +7 и -30 мВ для их активации (Dolphin, 2006; Tuluc et al., 2009). $Ca_v1.3$ и $Ca_v1.4$ не требуют деполяризационного порога, столь же сильного для активации, и они составляют около -55 и -40 мВ, соответственно. Также известно, что каналы $Ca_v1.3$ активируются с быстрой кинетикой по сравнению с $Ca_v1.1$ (Lipscombe et al., 2004). Хотя $Ca_v1.3$ тесно связан с $Ca_v1.2$, он, по-видимому, обладает более сходными свойствами с $Ca_v1.4$, включая быструю кинетику, низкий порог активации и более низкую чувствительность к 1,4-DHP.

Известно, что в нейронах $Ca_v1.3$ и $Ca_v1.2$ каналы преимущественно локализованы на соме клеток, в шипиках и дендритах (Di Biase et al., 2008; Jenkins et al., 2010). Там они ответственны за формирование активности нейронов и запускают кальций-зависимые пути, участвующие в контроле экспрессии генов, формирующих связь возбуждения-транскрипции (Ma et al., 2013). Обеспечивая синаптическую пластичность в нейронах, они участвуют в процессах обучения и памяти, а также развитии нейронов (Striessnig et al.,

2014). Каналы L-типа связаны с кальмодулином и кальмодулин киназой II, которые являются важными сигнальными белками в клетке, которые могут осуществлять регуляцию активности канала в зависимости от концентрации кальция (Wheeler et al., 2008; Christel and Lee, 2012; Ma et al., 2013).

Иммуногистохимическими исследованиями было показано присутствие субъединицы $\alpha 1C$ и $\alpha 1D$, порообразующей субъединицы Ca_v L-типа, в зрелом нервно-мышечном соединении мышцы (Pagani et al., 2004; Khuzakhmetova et al., 2014). Получены экспериментальные свидетельства, указывающие на возможное участие потенциал-чувствительных кальциевых Ca_v1 каналов в процессах модуляции нейросекреции (Prior and Singh, 2000). Также было установлено, что в нервно-мышечном соединении мышцы, при высокочастотной стимуляции вход кальция через каналы Ca_v1 способствует эндоцитозу синаптических везикул, направляя их в пул с высокой вероятностью освобождения (Perissinotti et al., 2008). Интересно также, что в синапсах лягушки, угнетающее действие на вход кальция в НО, при активации P2-рецепторов, опосредовано работой каналов Ca_v1 (Khaziev et al., 2018). На том же объекте было установлено, что G белок-связанные калиевые каналы (GIRK) оказывают модулирующее действие на процесс экзоцитоза синаптических везикул, взаимодействуя с Ca_v1 каналами (Tsentssevitsky et al., 2022). В то же время, результаты целого ряда работ демонстрируют, что потенциал-чувствительные кальциевые каналы L-типа в зрелых нервно-мышечных контактах не участвуют в вызванном освобождении АХ или их функционирование «замаскировано» (Penner and Dreyer, 1986; Atchison, 1989; Arenson and Gill, 1996; Urbano and Uchitel, 1999). В частности, было показано, что эти каналы включаются в случае блокады серин/ треонин фосфатаз или проникающий сквозь мембраны хелатор кальция ВАРТА-АМ (Arenson and Gill, 1996; Urbano and Uchitel, 1999).

Таким образом, можно сделать вывод о том, что Ca_v1 каналы задействованы в реализации множества внутриклеточных сигнальных путей,

взаимодействуя со различными сигнальными молекулами, при этом их функционирование может изменяться в зависимости от условий.

1.4.2 Cav2 тип кальциевых каналов

Как и каналы L-типа, описанные в предыдущей главе, представители семейства Ca_v2 представляют собой гетеромультимерные наборы порообразующей субъединицы $Ca_v\alpha1$ со вспомогательными субъединицами $Ca_v\beta$ и $Ca_v\alpha2\delta$, причем первые определяют подтип канала. Ca_v2 -тип каналов кодируется тремя генами (CACNA1A, CACNA1B и CACNA1E), которые кодируют субъединицы $Ca_v\alpha1$ $Ca_v2.1$, $Ca_v2.2$ и $Ca_v2.3$ соответственно (Mori et al., 1991; Dubel et al., 1992; Williams et al., 1992). Каналы $Ca_v2.1$ вызывают токи R-типа и Q-типа, продемонстрированные на нейронах, вероятно, различие вызвано комбинацией ассоциированной субъединицы $Ca_v\beta$ (Richards et al., 2007) и ходом альтернативного сплайсинга субъединиц самих по себе. Работой каналов $Ca_v2.2$ и $Ca_v2.3$ обусловлены нейрональные токи N-типа и R-типа соответственно. Каждый из членов семейства каналов Ca_v2 может подвергаться альтернативному сплайсингу, создавая, таким образом, широкий спектр токов Ca_v2 со специфическими биофизическими и фармакологическими свойствами. Например, альтернативный сплайсинг каналов $Ca_v2.1$ в линкерной области домена I – II может радикально изменить потенциал-зависимую инактивацию, тогда как вставка участка аспарагин-пролин в область петли домена IV S3 – S4 резко изменяет чувствительность каналов к токсину ω -агатоксин-IVA (Bourinet et al., 1999). Функциональной характеристике кальциевых каналов Ca_v2 и генов, кодирующих их $\alpha1$ -субъединицы, в значительной степени способствовало открытие токсинов, которые специфически блокируют эти каналы: ω -агатоксин IVA для каналов «P/Q-типа» (сейчас известный как $Ca_v2.1$ канал и содержащий $\alpha1A$), ω -конокотоксин GVIA для каналов «N-типа» (сейчас известные как каналы $Ca_v2.2$ и содержащий $\alpha1B$).

Считается что каналы Ca_v2 в основном управляют вызванной синаптической передачей (Wheeler et al., 1994). Хотя эти каналы экспрессируются в различных субклеточных локусах, они играют важную роль на пресинаптических нервных окончаниях, где они открываются в ответ на входящий потенциал действия (Westenbroek et al., 1992, 1995). Последующее поступление ионов кальция затем вызывает слияние синаптических пузырьков, после чего происходит высвобождение нейротрансмиттера в синаптическую щель. Так, например, на синапсах холоднокровных было показано участие P/Q-типа каналов в обеспечении входа кальция в НО, при возникновении ПД, и, как следствие, снижение количества освобождаемых квантов нейромедиатора (Nurullin et al., 2011). Чтобы обеспечить эффективную связь между механизмом высвобождения нейротрансмиттера и поступлением кальция, каналы $Ca_v2.1$ и $Ca_v2.2$ содержат сайт взаимодействия синаптических белков (синпринт), который взаимодействует с синтаксином 1А и SNAP25 (Sheng et al., 1994, 1996; Rettig et al., 1996). Каналы могут быть локализованы в непосредственной близости от синаптических пузырьков. Это также позволяет регулировать активность кальциевых каналов этими синаптическими белками. В частности, синтаксин 1А является мощным регулятором доступности каналов $Ca_v2.1$ и $Ca_v2.2$ (Bezprozvanny et al., 1995); кроме того, он облегчает G-белок опосредованное ингибирование $Ca_v2.2$ -каналов (Jarvis et al., 2000; Jarvis and Zamponi, 2001; Zamponi, 2003). В дополнение к поддержке высвобождения везикул члены семейства Ca_v2 -каналов также выполняют другие сигнальные функции. Например, каналы $Ca_v2.1$ и $Ca_v2.2$ функционально взаимодействуют с кальций-активируемыми калиевыми каналами с большой проводимостью и обеспечивают приток кальция, необходимый для эффективной активации этих каналов (Berkefeld et al., 2006; Berkefeld and Fakler, 2008). Это, в свою очередь, позволяет каналам Ca_v2 регулировать возбудимость нейронов путем изменения проводимости калия (Loane et al., 2007). Кроме того, активность канала Ca_v2 была связана с CREB-зависимой транскрипцией гена посредством

активации кальмодулин киназы II (Wheeler et al., 2012), а также с активацией ядерного фактора активированных T-клеток (Hernández-Ochoa et al., 2007). В этой связи, экспрессия синтаксина 1A, по-видимому, инициируется активацией кальциевых каналов $Ca_v2.1$ (Sutton et al., 1999), через CREB-зависимый путь. Эти фундаментальные роли Ca_v2 -каналов для нейрональной функции и коммуникации проявляются во многих важных физиологических функциях животного, начиная от моторного контроля и заканчивая передачей сенсорной информации.

1.4.3 Ca_v3 тип кальциевых каналов

Кальциевые каналы Ca_v3 (T-типа) за счет небольшой деполяризации мембраны переходят в открытое состояние, обеспечивая вход кальция в электрически возбудимые клетки. Благодаря низкому порогу активации и их способности поддерживать небольшой ток Ca_v3 способны регулировать возбудимость нейронов (Khosravani and Zamponi, 2006). При нормальном потенциале покоя Ca_v3 кальциевые каналы инактивированы. Даже небольшой и непродолжительной гиперполяризации мембраны может быть достаточно чтобы каналы активировались (Coulter et al., 1989; Huguenard and Prince, 1992).

Вход кальция через каналы Ca_v3 способствует секреторным процессам (Gackière et al., 2013) и высвобождению нейромедиатора в дорзальных рогах спинного мозга (Todorovic and Lingle, 1998; Jacus et al., 2012; García-Caballero et al., 2014; Stemkowski et al., 2016). Кроме того, кальциевые каналы T-типа связаны физически и функционально с кальций-активируемыми калиевыми каналами (Anderson et al., 2010, 2013; Engbers and Turner, 2012; Engbers et al., 2013; Rehak et al., 2013). Кальциевые каналы Ca_v3 это белки, состоящие из четырех мембранных доменов, образованных $Ca_v\alpha1$ субъединицей (Catterall, 2011) с шестью трансмембранными спиралями, с петлями поры. У млекопитающих экспрессируется три разных $\alpha1$ субъединицы кальциевого канала T –типа - $Ca_v3.1$, $Ca_v3.2$ и $Ca_v3.3$ - со сходными фармакологическими свойствами, но они отличаются своими биофизическими свойствами и

распространенностью (Cribbs et al., 1998; Perez-Reyes et al., 1998; Lee et al., 1999; Perez-Reyes, 2003; McKay et al., 2006). Преобладающей изоформой канала Ca_v3 , участвующей в передаче сигналов о боли, является $Ca_v3.2$ (Bourinet et al., 2005), они экспрессируются в специфических субпопуляциях первичных афферентных нейронов (François et al., 2015). Активность кальциевых каналов Т-типа проявляется в ганглионарных нейронах задних корешков спинного мозга у грызунов, у которых были повреждения нервов (Jagodic et al., 2007; Wen et al., 2010; Yue et al., 2013), а также в экспериментальных моделях диабета (Jagodic et al., 2007; Cao and Cooper, 2011). Причинами запуска этой активности, разнообразны и включают посттрансляционные модификации, такие как гликозилирование (Orestes et al., 2013; Weiss et al., 2013; Lazniewska et al., 2016) и деубиквитинирование (García-Caballero et al., 2014; Gadotti et al., 2015). Учитывая роль этих каналов в регулировании возбудимости афферентных волокон и синаптической функции в задних рогах спинного мозга и их динамической регуляции во время состояния передачи боли, вполне вероятно, что блокирование или истощение каналов $Ca_v3.2$ в этих тканях должно опосредовать обезболивающие эффекты. Действительно, подавление кальциевых каналов $Ca_v3.2$ (но не каналов $Ca_v3.1$ или $Ca_v3.3$) защищает от механической гиперчувствительности у мышей с повреждением нервов (Bourinet et al., 2005).

Таким образом потенциал-чувствительные кальциевые каналы играют важную сигнальную роль в возбудимых клетках. Далее по тексту мы будем использовать буквенные обозначения типов каналов во избежание возникновения заблуждений.

1.5 Холинергическая регуляция выброса нейромедиатора и входа кальция в моторное окончание.

С середины прошлого века стали накапливаться данные, свидетельствующие о том, что АХ, освободившийся в синаптическую щель из нервных окончаний, активирует не только холинергические рецепторы на постсинаптической клетке, вызывая сокращение мышцы как это было описано выше, но также и холинорецепторы, находящиеся на пресинаптической мембране и, тем самым, оказывает модулирующее воздействие на процесс нейросекреции путём изменения количества и/или динамики выделения последующих порций медиатора (Ciani and Edwards, 1963; Miyamoto, 1977; Starke et al., 1989; Bowman et al., 1990; Prior et al., 1995; Wu and Saggau, 1997; Miller, 1998; MacDermott et al., 1999; Parnas et al., 2000; Bukharaeva et al., 2007). Сначала, фармакологически, а в последствии и другими методами анализа было доказано, что на двигательной нервной терминали присутствуют как метаботропные мускариновые, так и ионотропные никотиновые холинорецепторы, активация которых и способна приводить к ауторегуляции выделения АХ (Bowman et al., 1990; Miller, 1990; Prior and Singh, 2000; Santafé et al., 2004; Tomàs et al., 2014; Самигуллин et al., 2014; Wang et al., 2018). Кроме того, холинергические оба типа рецепторов представлены и на сателлитных клетках (Шванновских клетках), при этом были получены свидетельства того, что они так же могут оказывать действие на процесс выделения АХ (Petrov et al., 2014).

Как уже говорилось ранее, действие холинорецепторов, участвующих в ауторегуляции выделения квантов АХ, зачастую ассоциируют с изменениями работы потенциал-чувствительных кальциевых каналов. Действительно, на синапсах лягушки было показано, что активация холинорецепторов как селективными агонистами, так и за счет увеличения содержания АХ в растворе, приводила к уменьшению кальциевого транзientа (Khaziev et al., 2016). Несмотря на большое количество исследований,

посвящённых изучению механизмов ауторегуляции выделения квантов АХ, прямых сведений о влиянии активации холинорецепторов на изменения пресинаптического уровня кальция в синапсах теплокровных животных к настоящему времени получено не было.

Ниже мы рассмотрим эти возможные пути регуляции выделения нейромедиатора на примере metabotropic и ionotropic рецепторов.

1.6 Метаботропные рецепторы

Метаботропные рецепторы или G-белок связанные рецепторы (GPCR), представляют собой большое семейство, состоящее примерно из 800 членов, которые связывают различные лиганды, включая гормоны, липиды, хемокины и лейкотриены. Эти рецепторы способны обнаруживать присутствие крайне разнообразного набора молекул вне клетки и в ответ инициировать множество внутриклеточных сигнальных каскадов.

Все GPCR характеризуются трансмембранным доменом с общей структурной архитектурой. Этот домен, который необходим для передачи сигнала через клеточную мембрану, состоит из связки из семи α -спиралей, встроенных в клеточную мембрану, соединенных тремя внеклеточными и тремя внутриклеточными петлями (Rosenbaum et al., 2009).

GPCR это белки, несущие семь трансмембранных доменов, которые связаны с внутриклеточным тримерным G-белком (α , β или γ) и разделены на шесть суперсемейств и обозначаются латинскими буквами А, В, С, D, Е и F. Самый большой филогенетический класс GPCR, известный как класс А, содержит только трансмембранный домен с амино- и карбоксильными концами разной длины и содержания последовательностей. Таким образом, нативные лиганды GPCR класса А связываются непосредственно с трансмембранным доменом. Большинство GPCR в других филогенетических классах (включая классы В, С и F) также включают внеклеточный домен, связанный с аминоконцом трансмембранного домена. (Fredriksson et al., 2003;

Lagerström and Schiöth, 2008). Эти внеклеточные домены обычно участвуют в связывании эндогенных лигандов либо в дополнение к, либо вместо трансмембранного домена.

Из всех конформационных изменений, которым подвергается GPCR, некоторые, по-видимому, особенно важны с функциональной точки зрения. Перестройки трансмембранных спиралей, играют решающую роль в передаче сигнала через мембрану (Venkatakrishnan et al., 2013). Когда GPCR переходит из неактивного состояния (в котором он не связывается с внутриклеточными сигнальными белками) в активное состояние (в котором связывается), эти спирали смещаются, наклоняются и скручиваются относительно друг друга (Yohannan et al., 2004). Ряд доказательств указывают на то, что трансмембранные спирали GPCR могут принимать несколько различных конформационных состояний, а не только одно активное состояние и единственное неактивное состояние, и эти состояния имеют различные значения для передачи сигналов рецептора (Nygaard et al., 2013; Yuan et al., 2014; Manglik et al., 2015; Staus et al., 2016). Фосфорилирование остатков на C-конце и определенных внутриклеточных петлях также может изменить склонность рецептора к соединению с различными внутриклеточными партнерами, вероятно, вызывая структурные изменения в этих участках (Butcher et al., 2012; Venkatakrishnan et al., 2014). В то время как наибольшие конформационные изменения как правило происходят на внутриклеточной стороне GPCR, однако внеклеточная половина рецептора также изменяет конформацию. В частности, участок связывания лиганда претерпевает тонкие, но важные изменения в структуре, которые связаны с конформационными изменениями спиралей на внутриклеточной стороне (Rasmussen et al., 2011, 2011; Huang et al., 2015). Подвижность внеклеточных петель рецептора может влиять на кинетику связывания лигандов, которые связываются в связывающий участок (Wheatley et al., 2012). Эти петли могут также образовывать альтернативные сайты связывания для лигандов, известных как

аллостерические модуляторы, присутствие которых может вызывать локальные конформационные изменения, которые изменяют свойства связывающего участка, включая его сродство к эндогенным лигандам (Dror et al., 2013; Kruse et al., 2013; Wootten et al., 2013).

Как уже было сказано гетеротримерные G-белки состоят из $G\alpha$ и $G\beta\gamma$ тесно связанных субъединиц. G-белки крепятся непосредственно к мембране клетки и через них рецептор осуществляет свои функции. $G\alpha$ субъединицы подразделяются на множество классов, например, $Gs\alpha$ (G стимулирующий), $Gi\alpha$ (G ингибирующий), $Go\alpha$ (G другой), $Gq/11\alpha$ и $G12/13\alpha$. Они по-разному распознают эффекторную молекулу, но имеют схожий механизм активации

Важно отметить, что многие типы G-белок связанных рецепторов (GPCR) функционально связаны с кальциевыми каналами N-типа (Dolphin, 2003; Tedford and Zamponi, 2006). Активация этих рецепторов инициирует обмен нуклеотидов в связанной субъединице $G\alpha$, продуцируя активные сигнальные молекулы ($G\alpha$ -GTP и $G\beta\gamma$). Субъединицы $G\beta\gamma$ физически ассоциируются с каналом N-типа, чтобы обеспечить сильное зависящее от напряжения ингибирование канала (Herlitze et al., 1996; Ikeda, 1996), которое возникает в результате стабилизации закрытой конформации канала (Jones et al., 1997). Каналы P/ Q-типа регулируются аналогичным образом, но они подвергаются гораздо меньшей степени ингибирования (Arnot et al., 2000). Хотя большинство клинически используемых лекарств действуют через различные GPCR, эти рецепторы связаны со многими последующими эффекторными системами; следовательно, степень, в которой клиническое действие рецепторных агонистов и антагонистов включает Ca_v P/ Q-типа и N-типа, неясна.

Рецепторы гамма-аминомасляной кислоты (ГАМК) представляют собой еще один класс рецепторов, которые ингибируют кальциевые каналы N-типа в синапсах дорсальных рогов (Terrence et al., 1985); однако связанные побочные эффекты со стороны центральной нервной системы (ЦНС) обычно

исключают клиническое использование системных агонистов ГАМК-рецепторов, таких как баклофен (Schuele et al., 2005; Bortolato et al., 2010). Тем не менее, интратекальный баклофен используется у пациентов для лечения спастичности и связанной с ней центральной боли после повреждения головного или спинного мозга (Slonimski et al., 2004). В целом, каналы N-типа являются важными эффекторами рецепторов 7-трансмембранной спирали, причем физиологическое значение этой регуляции наиболее четко иллюстрируется в первичном афферентном болевом пути. Хотя вполне вероятно, что агонисты других GPCR опосредуют свои последующие эффекты через кальциевые каналы P/ Q-типа и N-типа во многих других физиологических процессах (Kisilevsky et al., 2008).

Как отмечалось ранее, каналы N-типа физически ассоциируются с белками, которые участвуют в быстрой синаптической передаче (Sheng et al., 1994). Было показано, что конкурентное нарушение взаимодействия N-типа с синтаксином 1А с помощью синтетических пептидов синпринта блокирует синаптическую передачу (Mochida et al., 1996).

Далее рассмотрим мускариновые рецепторы, поскольку они являются мишенью эндогенного АХ, и соответственно могут участвовать как в процессах его секреции, так и регуляции.

1.6.1 Мускариновые рецепторы

Мускариновые холинергические рецепторы (мХР) принадлежат к классу А (родопсиновых) GPCR. Путем молекулярного клонирования были идентифицированы пять подтипов мХР, связанных с G-белком, которые получили название М1-М5 (Wess, 1996; Caulfield and Birdsall, 1998). На основании их связывания с конкретными группами гетеротримерных белков G, мХР можно разделить на два функциональных класса: рецепторы М2 и М4 предпочтительно связаны с путями передачи сигнала G_i/o , тогда как подтипы М1, М3 и М5 активируют белки $G_q/11$ (Wess, 1996). Мускариновые рецепторы широко экспрессируются во многих органах, тканях и типах клеток тела

(Levey, 1993; Yasuda et al., 1993; Levey et al., 1994; Wolfe and Yasuda, 1995; Caulfield and Birdsall, 1998; Eglen and Nahorski, 2000; Zhang et al., 2002; Wess, 2004; Eglen, 2006). М1-подтип мХР в большом количестве экспрессируются в головном мозге, включая кору головного мозга, гиппокамп и полосатое тело. Рецепторы М2 были обнаружены в центральной нервной системе, сердце и органах, содержащих гладкие мышцы. Подтип М3 можно найти в головном мозге и в периферических органах, которые иннервируются парасимпатическими нервами. Рецепторы М4 в основном представлены ограничено в лобной доле мозга и наконец рецепторы М5 присутствуют только в небольшом количестве в головном мозге, например, в дофаминергических нейронах среднего мозга.

Белки мускариновых рецепторов представляют собой отдельные полипептиды из 460–590 аминокислот с внеклеточным N-концом и внутриклеточным С-концом (Wess, 1993). Гидропатический анализ аминокислотных последовательностей выявил семь участков из 20–24 аминокислот, которые, вероятно, образуют мембрану, охватывающую а-спиральные структуры. Аминокислотный состав участков, охватывающих мембрану, является высококонсервативным (сходство последовательностей 90%) среди пяти подтипов, так как он относится к большому семейству рецепторов, связанных с G-белком (Brann et al., 1993; Wess, 1993). Между пятой и шестой мембранными единицами находится большая внутриклеточная петля, которая сильно варьирует по составу и размеру. Несколько сайтов фосфорилирования расположены на третьей внутриклеточной петле, а также на С-конце. Дисульфидный мостик образуется между консервативным цистеином, прилегающим к третьему трансмембранному сегменту, и цистеином в середине второй внеклеточной петли во всех пяти подтипах. Химическая модификация этих цистеиновых групп снижает аффинность связывания агонистов, а также способность рецептора связываться с G-белками-трансдукторами. Было обнаружено, что

рецепторы M3 (по крайней мере) образуют димеры с дисульфидной связью на поверхности клетки. Химерные рецепторы и мутационный анализ выявили сайты на рецепторных белках, которые специфически участвуют в связывании лиганда и сцеплении с G-белками (Nadler et al., 1999). Ацетилхолин связывается с сайтом внутри участка, образованного приблизительно расположенными по кругу трансмембранными доменами. В соответствии с классическим фармакологическим анализом считается, что сайт связывания конкурентных антагонистов перекрывает сайт узнавания ацетилхолина, но дополнительно включает смежные гидрофобные области рецепторного белка и мембраны. Мускариновые рецепторы также обладают сайтом(-ами) или участком, который участвует в аллостерической регуляции различными соединениями, включая галламин (Brann et al., 1993). Эти лиганды конкурируют с классическими мускариновыми лигандами, но замедляют диссоциацию ранее связанных зондов, указывая на существование тройного комплекса (рецептор плюс аллостерические и ортостерические лиганды).

1.6.2 Влияние мускариновых рецепторов на выброс квантов медиатора

На основании исследований проведенных на генно-модифицированных мышцах, M2 и M4 холинорецепторы были идентифицированы как основные пресинаптические ингибирующие рецепторы (Zhang et al., 2002; Zhou et al., 2002; Slutsky et al., 2003; Trendelenburg et al., 2003). Эти подтипы рецепторов связаны с G-белками класса Gi/o и могут влиять на пресинаптическую передачу сигналов посредством множества механизмов. Активация ингибирующих белков Gai/o с помощью M2/4 мХР приводит к ингибированию аденилатциклазы, что приводит к снижению внутриклеточного уровня цАМФ. Кроме того, субъединицы Gβγ, высвобождаемые из активированных белков Gi/o, являются важными регуляторами нейрональной функции путем ингибирования нейрональных Ca²⁺-каналов, активации G-белок-связанных калиевых каналов и стимуляции митоген-активируемых киназ MAPK и ERK1/2 (Wess, 1996). Среди этих

механизмов $G\beta\gamma$ -опосредованное ингибирование пресинаптических Ca^{2+} каналов, по-видимому, является наиболее важным механизмом ингибирования высвобождения нейромедиатора (Boehm and Kubista, 2002; Kubista and Boehm, 2006). Активация МАРК, индуцированная ацетилхолином, практически не наблюдалась в культурах нейронов новорожденных мышей, лишенных рецепторов М1 (Berkeley et al., 2001). Аналогичным образом, активация белка Gq и гидролиз фосфоинозитидов отсутствовали в препаратах мозга с дефицитом М1, что указывает на то, что рецепторы М1 являются наиболее распространенными мускариновыми рецепторами, связанными с Gq, в головном мозге (Porter et al., 2002; Vymaster et al., 2003). Облегчающие мХР, которые связаны с белками Gq/11, могут усиливать высвобождение нейромедиатора, главным образом за счет опосредованного протеинкиназой С (ПКС) фосфорилирования белков, отвечающих за экзоцитоз везикул (Boehm and Kubista, 2002; Kubista and Boehm, 2006).

Ауторегуляция АХ мускариновыми рецепторами наблюдалась так же в исследованиях, проведенных на двигательных синапсах теплокровных животных. Рецепторы М1 и М2 могут модулировать вызванное высвобождение медиатора, а именно посредством положительной и отрицательной обратной связи соответственно (Slutsky et al., 1999; Minic et al., 2002; Santafé et al., 2003, 2006). Было показано, что рецептор М2 ингибирует высвобождение АХ, тогда как рецептор М1 увеличивает высвобождение. Оба механизма, опосредуемые М1- и М2-подтипами действуют одновременно (Tomàs et al., 2014) с некоторым перевесом М2, поскольку их одновременная активация уменьшает высвобождение, а блокада увеличивает выброс нейромедиатора (Santafé et al., 2003). Рецепторы М3 и М4 никак не влияют на вызванное высвобождение АХ. Таким образом, в зрелых синапсах активация мХР, по-видимому, обеспечивает надежность синаптической передачи за счет уменьшения степени вызванного высвобождения (Tomàs et al., 2017) в исходных условиях. Изменения синаптической активности способны

приводить к тому, что подтипы могут играть разные функциональные роли (Minic et al., 2002; Santafé et al., 2006).

На нервно-мышечном контакте взрослых животных, была также обнаружена связь между путями активации тирозинкиназного рецептора В (TrkB) и мХР (García et al., 2010; Tomàs et al., 2014). Сигнальные пути обоих рецепторов, опосредованы одним ферментным каскадом, который вызывает изменения в работе Ca_v P/Q-типа (Santafé et al., 2006; Amaral and Pozzo-Miller, 2012).

Кроме того, были получены экспериментальные свидетельства, указывающие на то, что в зрелых синапсах М1 подтип мХР вносит вклад в регулирование М2 подтипа, ингибирующим секрецию АХ, опосредованную протеинкиназой А (ПКА) (Santafé et al., 2006). Этот баланс дополнительно регулируется аденозином, высвобождающимся совместно с АХ (Oliveira et al., 2009; García et al., 2013; Santafé et al., 2015) и TrkB (García et al., 2010). Однако, в случае, когда нервно-мышечная передача низкая (например, на стадии развития синапса) или имеются нарушения, баланс между подтипами мХР смещается в пользу М1, отчасти из-за М2 опосредованного переключения с ПКА на активацию ПКС (Santafé et al., 2007; García et al., 2010; Tomàs et al., 2014).

В недавнем исследовании авторам удалось открыть часть молекулярного механизма взаимодействия мХР М1 и М2 подтипов, который опосредует процесс регуляции нейротрансмиссии (Cilleros-Mañé et al., 2021). Было показано, что активация М1-подтипа способствует фосфорилированию фосфоинозитидзависимой киназы-1 (PDK1) и праймированию пресинаптических изоформ ПКСβI и ПКСε в нервно-мышечном соединении. Однако, запуске М1-сигнального пути индуцируется снижение уровня ПКСβI, но не влияет на уровень ПКСε, причем происходит ее перемещение от мембраны в цитозоль. Этот сигнальный путь запускает фосфорилирование ПКС Munc18-1 (Ser313), SNAP-25 (Ser187) и MARCKS (Ser152/156) и их

рекрутирование на мембране. С другой стороны, активация M2 тоже способствует фосфорилированию PDK1 и праймированию PKC ϵ в компартменте мембраны. Но важно отметить, что M2 рецепторы ответственны за снижение уровня белка PKC ϵ в мембранном компартменте посредством PKA-зависимого пути. Это ингибирование распространяется на субстраты PKC Munc18-1 и MARCKS. Интересно, что, когда PKA заблокирована, активация M2 может способствовать фосфорилированию Munc18-1 и MARCKS, подобно M1 подтипу. Комплементарная активность мускариновых рецепторов M1 и M2 уравнивает праймирование PKC β I и PKC ϵ , уровни белка и активность машины экзоцитоза.

1.7 Ионотропные рецепторы

Все ионотропные рецепторы представляют собой лиганд-управляемые ионные каналы, которые включают лиганд-связывающий сайт для молекул нейротрансмиттера и ионопроводящую пору (Meriney and Fanselow, 2019). Когда медиатор связывается с рецептором, это вызывает конформационное изменение белка, активируя рецептор и открывая рецепторный канал. После открытия канала поток ионов регулируется многими факторами, в том числе движущей силой для проникающих ионов. Как и во всех ионных каналах, лиганд-управляемые ионные каналы имеют равновесный потенциал, который определяется электрохимическим градиентом для проникающих ионов. Открытие канала, вызванное нейротрансмиттером, происходит в относительно коротком промежутке времени (по сравнению с передачей сигналов, индуцируемых metabotropic рецепторами), поэтому лиганд-управляемые ионные каналы могут обеспечивать быструю синаптическую передачу. Тем не менее, есть некоторые типы ионотропных рецепторов, которые не располагаются непосредственно возле сайтов высвобождения передатчика, а вместо этого располагаются в экстрасинаптической части на постсинаптической клетке. Вместо непосредственного управления процессом синаптической передачи, эти экстрасинаптические рецепторы модулируют

или изменяют быструю синаптическую передачу, которая опосредована другим рецептором. Ионотропные рецепторы можно разделить на четыре основных семейства: 1) семейство пентамерных (цис-петля), 2) семейство глутаматных рецепторов, 3) семейство тримерных рецепторов и 4) семейство TRP рецепторов (Meriney and Fanselow, 2019).

Семейство пентамерных лиганд-управляемых ионных каналов, иногда называемых «рецепторами цис-петли», которые имеют общую трехмерную модульную структуру. Все эти рецепторы имеют характерную внеклеточную петлю, содержащую консервативные аминокислоты, которые удерживаются в петлевой конфигурации дисульфидной связью между двумя цистеиновыми (цис) аминокислотами (за счет чего, название «цис-петля»; (Miller and Smart, 2010; Thompson et al., 2010). Как следует из названия «пентамер», эти рецепторы образованы пятью отдельными белковыми субъединицами, причем каждая субъединица содержит четыре охватывающих мембрану сегмента (называемых M1- M4). Пора этих рецепторов выстлана вторыми (M2) сегментами, по одному от каждой из пяти субъединиц, составляющих полный рецептор. К семейству рецепторов пентамерных лиганд-управляемых ионных каналов относятся, например, ацетилхолиновые никотиновые рецепторы.

1.7.1 Никотиновые рецепторы

Никотиновые рецепторы широко экспрессируются в нервной системе, осуществляя холинергическую передачу в синапсах периферических ганглиев и в различных областях мозга. В центральной нервной системе (ЦНС) холинергическая иннервация, действующая через nXP, регулирует такие процессы, как высвобождение нейромедиатора, возбудимость клеток и интеграцию нейронов, что имеет решающее значение для сетевых операций и влияют на физиологические функции, такие как возбуждение, сон, усталость, беспокойство, обработка болевых импульсов, прием пищи и ряд когнитивных функций (McGehee and Role, 1995; Role and Berg, 1996; Gotti et al., 1997; Lindstrom, 1997; Changeux and Edelstein, 2001; Hogg et al., 2003).

К настоящему времени клонированы двенадцать генов, кодирующих субъединицы nXP, и, как и все другие члены суперсемейства лиганд-управляемых ионных каналов, они кодируют пептиды, которые имеют гидрофильный внеклеточный участок аминокислотной группы, за которым следуют три гидрофобных трансмембранных домена (M1 – M3), большая внутриклеточная петля, а затем четвертый гидрофобный трансмембранный домен (M4) (Sargent, 1993; Hogg et al., 2003). Эти субъединицы имеют общего предка, были высококонсервативными в ходе эволюции, и эта же субъединица имеет более 80% идентичности аминокислот среди видов позвоночных (Le Novere and Changeux, 1995). Гены, которые были клонированы к настоящему времени, делятся на два подсемейства из девяти нейрональных субъединиц α ($\alpha 2$ - $\alpha 10$) и трех субъединиц β ($\beta 2$ - $\beta 4$) (Le Novere and Changeux, 1995; Lindstrom, 2000). Субъединицы имеют два смежных цистеина, которые гомологичны, присутствующим в положениях 192 и 193 субъединицы $\alpha 1$ nXP мышечного типа, тогда как у субъединиц β ($\beta 1$ – $\beta 4$) отсутствует пара соседних цистеинов (Le Novere and Changeux, 1995; Changeux and Edelstein, 1998). Субъединицы α и β вносят вклад в фармакологическую специфичность подтипов nXP (Luetje and Patrick, 1991).

Никотиновые ацетилхолиновые рецепторы имеют пять субъединиц, называемых α (по два на рецептор), β , ϵ и δ (хотя в эмбриональных рецепторах и рецепторах у электрических рыб и угрей белок γ -рецептора занимает место белка ϵ , изменяя проводимость и среднее время открытия канала (Schuetze and Role, 2003). На каждом мышечном никотиновом рецепторе имеется два сайта связывания ацетилхолина (по одному на каждую α -субъединицу), которые связывают ацетилхолин с относительно низкой аффинностью (микромольный диапазон). Оба эти сайта должны быть заняты для нормального открытия канала. Открытые каналы никотиновых рецепторов преимущественно пропускают натрий в клетку, а калий - из клетки (Fucile et al., 2003; Fucile, 2004), а также небольшое количество кальция в клетку (что составляет всего около 2% ионной проводимости в клетке мышечная форма никотинового

рецептора). Сами по себе, эти каналы имеют равновесный потенциал около 210 мВ, который находится на между равновесными потенциалами натрия (160 мВ) и калия (280 мВ). Небольшое количество кальция, который поступает через канал, важно для биохимической передачи сигналов в синапсе. Нейронные мембраны могут также содержать никотиновые ацетилхолиновые рецепторы, но эти рецепторы имеют немного другой состав. Так называемые «нейрональные никотиновые рецепторы» включают только α и β субъединицы. Некоторые из этих рецепторов являются гомомерными и содержат только α -субъединицы; например, никотиновый рецептор α -7 назван так, потому что он полностью состоит из субъединиц α -7. Другие являются гетеромерными и включают как α , так и β субъединицы. Нейрональные никотиновые рецепторы обычно имеют более высокое сродство к ацетилхолину, чем мышечная форма, и более высокий процент от их общего ионного потока состоит из кальция (2% - 5% в гетеромерных нейрональных никотиновых рецепторах, 6% - 12% в гомомерных α -7 нейронах никотиновые рецепторы), хотя ионы натрия и калия остаются основными ионами для этих рецепторов (Fucile et al., 2003; Fucile, 2004; Dani, 2015). В центральной нервной системе α -7 никотиновые рецепторы могут быть расположены как на пре-, так и на постсинаптической части, но обычно они не располагаются близко к сайтам высвобождения нейромедиатора. Как таковые, α -7 никотиновые рецепторы реагируют, главным образом, на паракринную передачу, форму передачи, при которой молекулы диффундируют от своего сайта высвобождения и связываются с удаленными рецепторами (Lendvai and Vizi, 2008). Гомомерные нейрональные никотиновые рецепторы, такие как α -7, имеют пять идентичных сайтов, связывающих ацетилхолин, по одному на каждую α -субъединицу, хотя есть свидетельства того, что для запуска открытия канала необходим только один сайт (Andersen et al., 2013). Поскольку эти сайты, связывающие ацетилхолин, имеют высокую аффинность к ацетилхолину, необходимо только одному из них связаться с ацетилхолином для открытия канала. Эти рецепторы очень чувствительны к

низкой концентрации ацетилхолина, которая присутствует в экстрасинаптических областях центральной нервной системы.

1.7.2 Влияние никотиновых рецепторов на выброс квантов медиатора

Нейрональные никотиновые рецепторы являются мощными модуляторами передачи сигналов и высвобождения нейротрансмиттера в нервной системе. активация нХР может играть важную роль в гомеостазе Ca^{2+} и передаче сигналов не только из-за проникновения Ca^{2+} через различные подтипы нХР, но также потому, что деполяризация нХР плазматической мембраны может активировать потенциал-чувствительные кальциевые каналы и увеличивать внутриклеточный кальций, и это может вызвать мобилизацию Ca^{2+} из внутриклеточных запасов (Garduño et al., 2012).

Активация нХР возбуждает клетки-мишени и обеспечивает быструю синаптическую передачу (например, в автономных ганглионарных нейронах и ограниченных областях мозга), но анатомические и функциональные данные свидетельствуют о том, что нХР преимущественно расположены в претерминальных и пресинаптических участках, регулирующих секрецию нейромедиатора в нескольких областях мозга. В частности, было обнаружено, что пресинаптические нХР участвуют в высвобождении АХ норадреналина, дофамина, глутамата и ГАМК (Gotti et al., 2006). Точная стехиометрия нативных гетеромерных нХР до сих пор неясна. Биохимические и электрофизиологические исследования показали, что подтипы $\alpha 4\beta 2$ цыпленка и $\alpha 4\beta 2$ и $\alpha 3\beta 4$ человека имеют стехиометрию 2α и 3β при экспрессии в ооцитах или клетках, инъецированных кРНК или кДНК в соотношении 1/1 (α / β) (Gotti and Clementi, 2004). Более того, исследования, проводившиеся на ооцитах, показали, что изменение соотношения кДНК $\alpha 4 / \beta 2$ приводит к множеству подтипов: соотношение 1:10 благоприятствует экспрессии подтипа ($\alpha 4$)² ($\beta 2$)³, который очень чувствителен к АХ, а соотношение 10: 1 благоприятствует экспрессии подтипа ($\alpha 4$)³ ($\beta 2$)², который менее чувствителен к АХ (Nelson et al., 2003; Moroni and Bermudez, 2006). Подтипы ($\alpha 4$)² ($\beta 2$)³ и ($\alpha 4$)³ ($\beta 2$)²

также имеют различную проницаемость для Ca^{2+} , причем последние имеют значительно более высокую проницаемость для Ca^{2+} , чем первые (Taria et al., 2007).

Существуют экспериментальные данные, свидетельствующие о том, что активация нейрональных нХР запускает процесс аутоингибирования секреции нейромедиатора в нервно-мышечном соединении (Van der Kloot, 1993; Prior and Singh, 2000; Balezina et al., 2006; Petrov et al., 2014). Кроме того, есть основания полагать, что данный механизм опосредуется работой потенциал-чувствительных кальциевых каналов L-типа (Prior and Singh, 2000). Однако, в другой работе демонстрируется, что активация постсинаптических мышечных нХР, содержащих $\alpha 1$ -субъединицу, запускает процесс аутоингибирования выделения АХ (Wang et al., 2018). Таким образом, согласно вышеупомянутым исследованиям, как пре-, так и постсинаптические нХР могут участвовать в процессе регуляции выброса нейромедиатора. В своих гипотезах авторы ссылаются на необходимость оценки изменений пресинаптического уровня кальция в условиях модуляции работы нХР, в том числе на основании того, что наблюдаемые эффекты зависят от внеклеточной концентрации кальция (Tian et al., 1994; Prior and Singh, 2000; Wang et al., 2016).

1.8 Методы регистрации пресинаптического уровня кальция.

С того момента, как исследователями была установлена важнейшая роль ионов кальция в возбудимых клетках, в частности синапсах, возникла необходимость регистрации изменений внутриклеточного содержания кальция (Katz and Miledi, 1965; Borst and Sakmann, 1996; Grishin, 2014). К настоящему моменту существует ряд методик, позволяющих осуществлять регистрацию кальциевых сигналов, причем их выбор основан на морфологических особенностях препарата.

1.8.1 Электрофизиологические методы

Данные методы позволяют измерять кальциевые токи с помощью стеклянных микроэлектродов, которые подводятся к клетке с помощью микроманипулятора. Существует два типа электрофизиологической регистрации кальция – внутриклеточная и внеклеточная (экстраклеточная). При внутриклеточной регистрации осуществляется прокол клеточной мембраны, причем желательно двумя электродами, один из которых будет регистрировать токи (или потенциалы), в то время как другой будет инжектировать ток для удержания мембранного потенциала на определенном уровне от -40 до -70 мВ, путем подачи на него тока. В соответствии с вышесказанным, необходимо понимать, что линейные размеры исследуемых клеток должны соответствовать тому, чтобы было возможным удержание в ней хотя бы одного микроэлектрода, что на примере пресинаптической терминали нервно-мышечного соединения является крайне проблематичной задачей. Важно отметить, что для выделения кальциевой составляющей электрофизиологического сигнала, необходимо ограничить ток через другие ионные каналы. Для исключения натриевого тока применяется блокатор тетродотоксин. Методика вымывания калия из клеток применялась для устранения калиевого тока (Kostyuk et al., 1975, 1977; Grishin, 2014).

При экстраклеточном отведении потенциалов микроэлектрод подводится к клетке, ток регистрируется кончиком электрода, диаметр которого составляет 2-5 мкм (Katz and Miledi, 1965). В данном подходе для выделения кальциевого тока, применяются те же методы, что и в случае внутриклеточной регистрации.

Существует модификация экстраклеточной регистрации, называемая «макропэтч», в случае применения которой стимуляция осуществляется непосредственно через регистрирующий электрод, а не через отрезок нерва. Благодаря тому, что ПД не распространяется, можно опосредованно выявить

кальциевую составляющую, путем вычитания ответов, зарегистрированных на фоне применения блокаторов ионных каналов (Slutsky et al., 2002).

Еще один метод, позволяющий регистрировать кальциевые токи, этот называется метод периневрального отведения. Он был разработан в 1984 году Маллартом. Метод заключается в следующем: заполненный раствором Рингера стеклянный электрод вводится в периневральное пространство. После прокалывания перинервие мембранный потенциал сдвигается на 4-6 мВ. Нервная оболочка обладает достаточно хорошими изолирующими свойствами, контакт получается очень плотный и, соответственно, токи утечки минимальны. Электрод фиксирует интегральный ток НО. В периневрии от одного перехвата Ранвье к другому и далее к претерминальному участку НО циркулирует ток, который обусловлен электрогенезом ближайших перехватов Ранвье и нервного окончания (Mallart, 1985). При помощи данной методики, было показано, что в случае применения блокаторов калиевых каналов, из регистрируемого сигнала можно выделить кальциевую составляющую, обусловленную аддитивным, входящим во все НО кальциевым током (Grishin, 2014).

Вышеописанные методики позволяют регистрировать кальциевые токи, однако они требуют для этого применения специальных фармакологических агентов, для устранения токов через другие ионные каналы. Вследствие этого, условия функционирования синапсов будут далеки от физиологических, а в соответствии с этим полученные данные могут сильно отличаться от того, как это есть в действительности. Этому серьёзного недостатка лишены оптические методы регистрации.

1.8.1 Флуоресцентные кальциевые индикаторы

В основе оптического метода регистрации внутриклеточного уровня кальция лежит применение специальных кальций-чувствительных красителей (индикаторов) (Tsien, 1989; DiGregorio and Vergara, 1997; Sabatini and Regehr,

1998). Эти красители изменяют интенсивность флуоресцентного свечения, в зависимости от концентрации Ca^{2+} в клетке.

На сегодняшний день доступен ряд индикаторов, чувствительных к Ca^{2+} . Выбор наиболее подходящего для каждой конкретной экспериментальной ситуации является одним из наиболее важных вопросов, которые необходимо решить перед началом эксперимента по измерению концентрации Ca^{2+} . В настоящее время доступны два основных типа Ca^{2+} зондов: (1) чувствительные к Ca^{2+} синтетические молекулы («химические индикаторы») и (2) генетически кодируемые индикаторы Ca^{2+} (ГКИ). Все существующие ГКИ, такие как биолюминесцентный экворин (Brini et al.; Tosatto et al.; Granatiero et al., 2014), флуоресцентные белки на основе зеленого флуоресцентного белка (GFP) (Rudolf et al., 2003; Palmer et al., 2006; Tosatto et al., 2017) и кальмодулин-содержащие конструкции (GCaMP) (Nakai et al., 2001; Chen et al., 2013; Grødem et al., 2021) имеют участок связывания Ca^{2+} и зеленый флуоресцентный белок, который становится ярче, когда появляется Ca^{2+} . Использование ГКИ для измерения активности позволяет регистрировать сигналы от интересующего типа клеток, повторять измерения одних и тех же клеток в течение нескольких месяцев и записывать большие популяции нейронов. В идеале ГКИ должны быть единообразно экспрессированы во всей популяции нейронов.

Трансгенные мыши требуют сложных схем размножения, которые сопряжены с большими затратами, как финансовыми, так и с точки зрения состояния здоровья животных. Они также зависят от драйверных мутаций, препятствующих использованию других мутаций (Madisen et al., 2015). Более того, поскольку ГКИ экспрессируются на протяжении всего развития, сообщалось о частой икталльной активности для нескольких таких линий мышей (Steinmetz et al., 2017), что ставит под сомнение их надежность.

Некоторые ГКИ, например GCaMP, также могут доставляться в клетки с помощью вирусного вектора либо путем локальной инъекции непосредственно в интересующую ткань (Goldey et al., 2014), либо путем интрацеребровентрикулярных инъекций (Kim et al., 2014). Кроме того,

используя аденоассоциированный вирус серотипа 9, который проникает через гематоэнцефалический барьер (Foust et al., 2009) у новорожденных мышей, GCaMP можно вводить посредством внутривенной инъекции в хвостовую вену, височную вену (Lampe et al., 2014) или поперечный синус (Hamodi et al., 2020). Однако эти методы администрирования технически сложны. Они также сопряжены с риском сверхэкспрессии ГКИ из-за молодого возраста на момент инъекции и длительного периода между инъекциями и экспериментами, которые могут привести к повреждению клеток или иктальным событиям. Местные инъекции вирусных векторов, как правило, приводят к очень вариабельной экспрессии в зависимости от концентрации вирусных частиц и часто связаны с повреждением или гибелью клеток (Yang et al., 2018).

Таким образом, в случае использования ГКИ необходимо преодолеть ряд сложностей с их доставкой в клетку-мишень или организм, а также важно учитывать их относительно медленную кинетику и ограниченный динамический диапазон. В связи с вышесказанным можно считать, что химические Ca^{2+} зонды по-прежнему являются сильным инструментом, особенно для измерения общей концентрации Ca^{2+} в цитозоле.

Другой метод состоит из металлохромных Ca^{2+} -красителей, светопоглощение которых зависит от концентрации Ca^{2+} . Этот вид красителей обладает следующими важными характеристиками: 1) он быстрый, следовательно, может отражать быстрые кальциевые транзиенты (вход кальция в клетку), 2) обладает небольшой буферизацией Ca^{2+} и 3) имеет сродство к Ca^{2+} , подходящее для обнаружения изменений концентрации Ca^{2+} в диапазоне соответствующего для внутриклеточной среды. Однако, этот тип красителей имеет и ряд недостатков: 1) проявляет заметную чувствительность к Mg^{2+} и pH, 2) имеет тенденцию связываться с внутриклеточными белками, 3) демонстрирует нелинейное связывание Ca^{2+} и 4) не проходит сквозь мембраны, поэтому его необходимо вводить микроинъекциями для внутриклеточной регистрации кальция (Bruton et al., 2012).

Благодаря работе Роджера Тсиена еще в 1980-х годах, когда он изобрел первые флуоресцентные химические индикаторы Ca^{2+} путем модификации молекулы хелатора Ca^{2+} EGTA, стало возможным непосредственно отслеживать кальциевые транзиенты в живых клетках. Quin-2 был первым флуоресцентным красителем Ca^{2+} , который был создан (Tsien et al., 1982; Tsien, 2002) и вскоре после этого улучшен с точки зрения интенсивности флуоресценции, спектрального сдвига, селективности и его сродства к Ca^{2+} , широко используемый в настоящее время индикатор Fura-2 (Grynkiewicz et al., 1985). Это позволило оценивать Ca^{2+} -гомеостаз в различных клеточных системах, а также *in vivo* (Borst et al., 1992; Sobel and Tank, 1994; Stosiek et al., 2003). Как уже было сказано, принцип, лежащий в основе использования Ca^{2+} -чувствительных красителей в качестве индикаторов кальция, основан на способности увеличивать или уменьшать интенсивность их флуоресценции в зависимости от концентрации Ca^{2+} . На сегодняшний день доступен чрезвычайно широкий выбор Ca^{2+} индикаторов (рис. 2), охватывающий все возможные комбинации спектральных (например, спектры возбуждения и излучения) и химических (например, сродство Ca^{2+} , интенсивность флуоресценции) свойств (Paredes et al., 2008; Bootman et al., 2013).

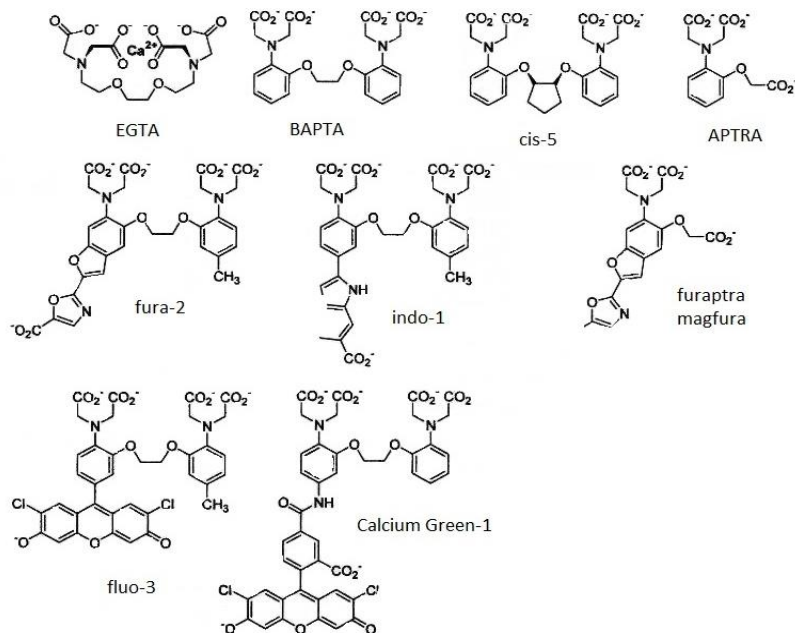


Рис. 2. Химические формулы хелаторов кальция и нескольких флуоресцентных кальций-чувствительных индикаторов на их основе.

На основе спектральных характеристик можно выделить два основных класса флуоресцентных индикаторов Ca^{2+} : одно- и двухволновые индикаторы. Одноволновые индикаторы Ca^{2+} , такие как Fluo-4 и Oregon Green BAPTA-1, показывают Ca^{2+} -зависимое изменение интенсивности флуоресценции без каких-либо изменений в их спектрах возбуждения или излучения. Двухволновые индикаторы имеют сдвиг длины волны возбуждения (например, Fura-2) или излучения (например, Indo1) при связывании Ca^{2+} . Эти двухволновые зонды, из которых Fura-2, несомненно, является наиболее часто используемым, обычно возбуждаются ультрафиолетом, который обладает потенциальным фототоксическим эффектом и требуют чередования длин волн возбуждения или излучения, в результате чего имеется ограниченное временное разрешение. Однако возможность выполнять ратиометрические измерения, которые не зависят от неравномерной загрузки красителя, толщины клеток, фотобликинга (выцветание под воздействием света) и утечки красителя, позволяет количественно измерить покоящийся внутриклеточный кальция. По этой причине кальциевые красители с двумя длинами волн считаются желательными индикаторами для оценки кальциевого гомеостаза в подавляющем большинстве клеточных систем, несмотря на то, что их интенсивность флуоресценции обычно ниже, чем у одноволновых химических индикаторов кальция.

Одной из основных характеристик Ca^{2+} -индикаторов является их сродство (аффинность) к Ca^{2+} , которое отражает K_D . Этот показатель должен быть сопоставим с теми диапазонами концентрации кальция, в которые планируется исследовать. Таким образом, индикаторы позволяют регистрировать изменения в диапазоне от десятой доли K_D до значений, превышающих K_D в десять раз (Deitmer et al., 1998).

Ca^{2+} -зонды с высокой аффинностью (малая K_D) могут являться буферами внутриклеточного Ca^{2+} и вносить искажения кальциевых сигналов клеток. Значение K_D кальциевых индикаторов существенно зависит от многих

факторов, например, pH, температуру, ионное взаимодействие и вязкость раствора, связывание зондов с белками, присутствие Mg^{2+} и других ионов.

Для измерения точных значений концентрации кальция для одноволновых красителей необходимо выполнить калибровку по формуле: $[Ca^{2+}] = K_D \times (F - F_{min}) / (F_{max} - F)$, где F – экспериментальное значение интенсивности флуоресценции, F_{min} – измеренное значение интенсивности флуоресценции в отсутствии Ca^{2+} , F_{max} – измеренное значение интенсивности флуоресценции в присутствии насыщающий краситель концентрации Ca^{2+} , K_D – константа диссоциации Ca^{2+} -индикатора (Grynkiewicz et al., 1985). Однако, подобные измерения требуют калибровки непосредственно в объекте исследования. Для многих приложений нет необходимости знать точную концентрацию кальция. Если необходимо получать информацию только об относительном изменении концентрации кальция при различных воздействиях, то нет необходимости проводить калибровку красителя. Достаточно оценивать относительное изменение свечения красителя после воздействия. Это позволяет судить об изменении концентрации кальция в различных экспериментальных условиях

Индикаторы также могут отличаться по длине волны возбуждения – одни возбуждаются при освещении УФ-излучением, другие длинами волн видимого диапазона. К первым относятся, например, Fura-2 и indo-1 ратиометрические индикаторы Ca^{2+} . Fura-2 стал предпочтительным красителем для ратиометрических исследований, так как практичнее изменять длину волны возбуждения, чем длину волны излучения (Barreto-Chang and Dolmetsch, 2009; O'Connor and Silver, 2013). При связывании с кальцием Fura-2 обладает спектром возбуждения 300 и 400 нм, а излучение происходит на длине волны ~ 510 нм. Однако, indo-1 является более подходящим красителем для проточной цитометрии, где лучше использовать один лазер для возбуждения – спектральный диапазон 351–364 нм аргон-ионного лазера - и регистрировать сигналы в двух диапазонах.

При выполнении ратиометрических измерений концентрацию ионов кальция можно вычислить по формуле: $[Ca^{2+}] = \beta \times K_d \times (R - R_{\text{мин}}) / (R_{\text{макс}} - R)$, в которой R – отношение интенсивностей флуоресценции полученных при двух длинах волн; $R_{\text{мин}}$ – полученное отношение интенсивностей флуоресценции в условиях минимальной концентрации кальция; $R_{\text{макс}}$ – полученное отношение интенсивностей флуоресценции при максимальной концентрации кальция; β – отношение интенсивностей флуоресценции красителя, свободного от кальция, при минимальной и максимальной концентрации кальция (Grynkiiewicz et al., 1985). Например, для красителя Fura-2 это отношение можно взять равным 1; K_D – его константа диссоциации; $R_{\text{макс}}$ и $R_{\text{мин}}$ фиксируется во время калибровки *in vivo*. Для этого формируются условия, при которых концентрация кальция в цитозоле возрастает до максимума. Такого результата можно достичь, за счет применения ионофоров. Для получения условий нулевого уровня внутриклеточного содержания кальция (свободной формы) в точке калибровки флуоресцентных индикаторов используется, в том числе хелаторы Ca^{2+} ВАРТА или ЕGТА, а препарат помещают в бескальциевую среду.

Недостаток этих красителей в том, что УФ-излучение обладает высоким показателем фототоксичности. В следствие чего нарушается кальциевый гомеостаз. Кроме того, не каждая фотометрическая установка пригодна для таких исследований, поскольку лазеры, излучающие в УФ-диапазоне достаточно громоздки и дорогостоящие.

Красители, возбуждаемые излучением видимого диапазона, обладают рядом преимуществ по сравнению с УФ-возбудимыми (<https://www.thermofisher.com>, access date : 2022-10-24):

1. Большая поглощательная способность, благодаря чему необходимая концентрация красителя существенно ниже, а соответственно ниже и фототоксический эффект.
2. Более заметное увеличение интенсивности свечения красителя при взаимодействии с Ca^{2+}

3. Эмиссия в области спектра, в которой автофлуоресценция клеток меньше и малое рассеянное фоновое свечение.
4. Совместимость с другими фотоактивируемыми индикаторами, что крайне важно при проведении многопараметрических измерений. Так, например, можно измерять одновременно кальциевый транзистент, рН и мембранный потенциал.

Кальциевый индикатор Fluo-3 был разработан Тсиеном и его коллегами для использования с источниками возбуждения видимого света в проточной цитометрии и конфокальной лазерной сканирующей микроскопии (Minta et al., 1989). Позднее области имиджинга с использованием Fluo-3 и его производных были расширены за счет применения методов двухфотонного возбуждения и микроскопии полного внутреннего отражения (TIRF). Fluo-3 практически не флуоресцирует, если не связан с Ca^{2+} , и демонстрирует квантовый выход при насыщении $Ca^{2+} \sim 0,14$ (и K_D для Ca^{2+} 390 нМ. Существует аналог Fluo-3, это индикатор Fluo-4 у которого два атома хлора, заменены атомами фтора, его K_D для Ca^{2+} 345 нМ (Miriel et al., 1999; Gee et al., 2000). Квантовые выходы флуоресценции Ca^{2+} -связанных Fluo-3 и Fluo-4 по существу идентичны. Однако, стоит отметить, что максимум поглощения Fluo-4 смещен в синюю область примерно на 12 нм по сравнению с Fluo-3, что приводит к усилению возбуждения флуоресценции на 488 нм и, следовательно, к более высоким уровням сигнала для конфокальной лазерной сканирующей микроскопии, для проточной цитометрии и скрининга микропланшетов.

Индикатор Oregon Green 488 BAPTA 1-калиевая соль возбуждается на длине волны 488 нм, его высокая поглощательная способность около 93% от своего максимума в отличие от fluo-3 и Calcium Green, поглощательная способность которых около 45% от своих максимумов (<https://www.thermofisher.com>, access date : 2022-10-24). Oregon Green 488 BAPTA 1 при насыщении кальцием флуоресцирует в 14 раз ярче, что позволяет применять низкие концентрации красителя. Зависимость

светимости красителя от его (Ca^{2+}) концентрации представлена на рисунке 3. Квантовые выходы Ca^{2+} комплексов Oregon Green 488 BAPTA-1 составляют $\sim 0,7$ по сравнению $\sim 0,14$ для Fluo-3. Oregon Green 488 BAPTA-1 имеет умеренную флюоресценцию в растворе без Ca^{2+} , и его флюоресценция увеличивается примерно в 14 раз при насыщении Ca^{2+} (рис. 3). В некоторых случаях может быть выгодно смешивать индикаторы Oregon Green 488 BAPTA-1 и Fluo-4 для получения кальциевого ответа, который в итоге сочетает базальный уровень сигнала и высокий уровень свечения в ответ на стимул (Kurtz et al., 2006). Oregon Green 488 BAPTA -1 имеет K_D для Ca^{2+} в отсутствие Mg^{2+} около 170 нМ. Oregon Green 488 BAPTA-2 аналогичен Calcium Green-2 тем, что он содержит две молекулы красителя на одну молекулу хелатора BAPTA, однако проявляет очень низкую флюоресценцию в отсутствие Ca^{2+} .

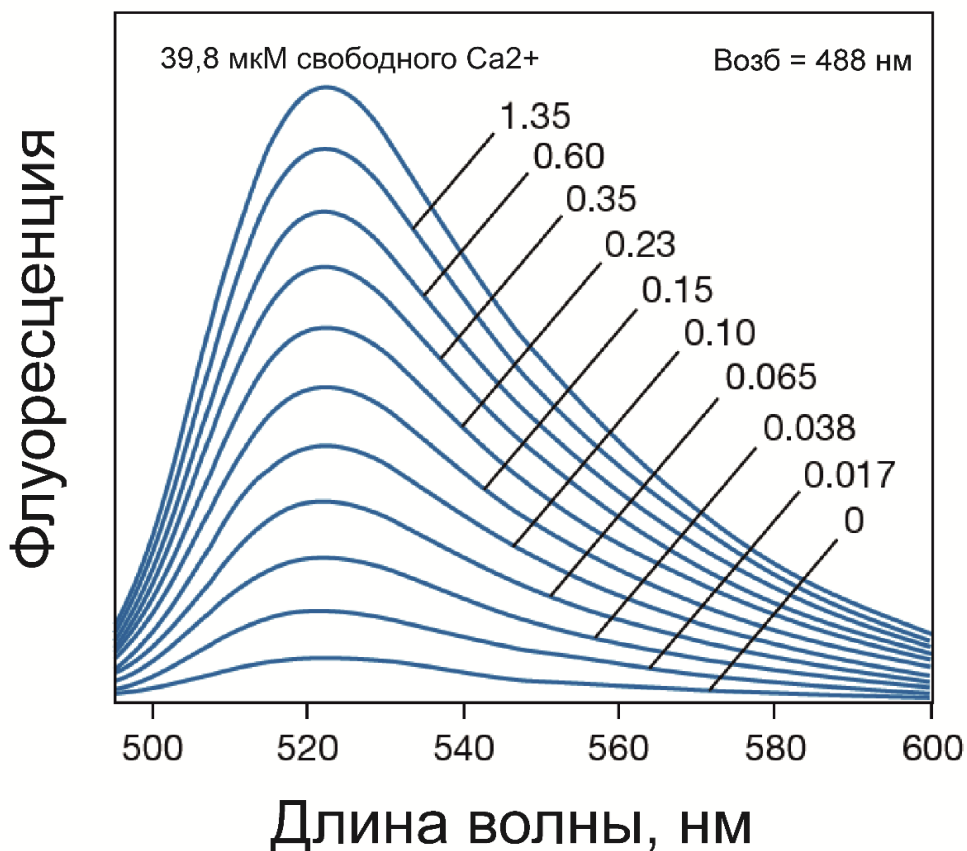


Рис. 3. Кальций-зависимый спектр излучения флуоресценции красителя Oregon Green 488 BAPTA-1.

1.8.2 Методы загрузки кальциевых индикаторов

Методы загрузки клеток можно разделить на две группы. Первая группа — это процедуры массовой загрузки, которые применимы к большим популяциям клеток и включают:

- загрузка ацетоксиметилового (АМ) эфира (Tsien, 1981; Hofer, 1999; Garaschuk et al., 2006; Reiner, 2009);
- АТФ-индуцированное проникновение (Steinberg et al., 1987);
- электропорация (Bonnot et al., 2005; Nagayama et al., 2007; Judkewitz et al., 2009);
- гипоосмотический шок (Pilas and Durack, 1997);
- пиноцитарный реагент для загрузки Influx™ (Doyle and Lee, 2002);
- связывание с проникающими в клетки пептидами (Pellegrino et al., 2004; Menéndez Pérez et al., 2008; Takayama et al., 2009);
- баллистическая доставка микрочастиц (Grutzendler et al., 2003; Benediktsson et al., 2005; Bothwell et al., 2006; Neely et al., 2009; Aseyev et al., 2013).

Среди перечисленных методов, наименьшим инвазивным эффектом и наиболее простым и доступным методом считается применение АМ-эфира. Карбоксилатные группы индикаторов для Ca^{2+} и других катионов, а также фенольные гидроксильные группы индикаторов рН являются производными ацетоксиметилового или ацетатных эфиров, соответственно, что делает индикатор проницаемым через мембраны и нечувствительным к ионам. Попав внутрь клетки, этот индикатор гидролизуеться внутриклеточными эстеразами, высвобождая ион-чувствительный полианионный индикатор.

Конечная концентрация гидролизованного Ca^{2+} -индикатора внутри клетки зависит от ряда факторов (типа и количества клеток, химических свойств красителя, времени и температуры загрузки, предварительные условия и др.) Конечная концентрация зонда в клетке может быть в несколько сот раз больше исходной концентрации эфира в растворе.

Обычно исходный сухой индикатор растворяют в безводном диметилсульфоксиде (ДМСО) до концентрации 1-10 мМ. АМ эфиры слабо растворимы в воде, поэтому в этой процедуре используются диспергирующие агенты, способствующие окрашиванию клеток. Pluronic F-127 – неионный диспергирующий агент, который помогает растворять большие молекулы красителя в физиологическом растворе. Клетки инкубируются с индикатором при температуре 20-37°C в течении 15-60 минут, для большинства красителей 40мин. После этого дважды отмываются буфером без красителя и инкубируются без красителя 10-20 минут для окончательной деэстерификации и отмывки оставшегося примембранного зонда снаружи клетки.

Методом загрузки АМ эфира можно прокрашивать клеточные культуры и суспензии, а также целые органы. В то же время, с загрузкой АМ эфиров связаны некоторые проблемы, например, компартментализация и неполный гидролиз эфира (Бережнов et al., 2007; Adams, 2010). Кроме того, в результате применения данного метода происходит окрашивание всех клеточных структур, в результате чего, его применение на препаратах со смешанными типами тканей не релевантно.

Конечная концентрация гидролизованного Ca^{2+} -индикатора внутри клетки зависит от ряда факторов (типа и количества клеток, химических свойств красителя, времени и температуры загрузки, предварительные условия и др.) Конечная концентрация индикатора в клетке может быть в несколько сот раз больше исходной концентрации эфира в растворе.

Вторая группа методик, позволяющих осуществлять загрузку красителей в клетки, инвазивные, это микроинъекция и инфузия из пипеток для пэтч-клэмп, однако при этом не окрашиваются ткани другого типа. Ca^{2+} -индикаторы в форме солей, являясь гидрофильными, не способны проникать в клетку посредством диффузии. А некоторые комплексы зондов с декстранами и полипептидные кальциевые индикаторы слишком громоздки, чтобы пересечь наружную мембрану клетки. Такие соединения вводятся

непосредственно в цитоплазму клеток посредством микроинъекций. Выброс содержимого микропипетки происходит либо при помощи пневмоинъектора, либо путем подачи электрического тока (электрофорез) направление будет зависеть от красителя. Для растворения кальциевого индикатора при этом используют внутриклеточные буферы. Одной из модификаций метода микроинъекций можно считать метод загрузки через патч-пипетку. Когда к раствору, заполняющему микроэлектрод для патч регистрации, добавляется кальциевый краситель и загрузка проходит автоматически при регистрации “whole cell”.

Существует также метод загрузки кальциевых красителей через культуру нерва. Это метод наиболее подходит для нервно-мышечных препаратов (Peng and Zucker, 1993; Wu and Betz, 1996; Tsang et al., 2000; Newman et al., 2007; Rossano and Macleod, 2007; Macleod, 2012; Samigullin et al., 2017)

Согласно этому методу, раствор красителя помещается на свежесрезанную культуру двигательного нерва, и препарат инкубируется с краской достаточно длительное время. В течение инкубации краситель за счет антероградного транспорта доставляется внутрь нервных окончаний.

При помощи этого метода выполняется окрашивание только пресинаптических клеток. За счет варьирования времени инкубации препарата с краской можно регулировать концентрацию красителя в клетках и количество окрашенных терминалей. В нашей лаборатории этот способ загрузки индикатора применялся для окрашивания нервных окончаний холоднокровных животных (Samigullin et al., 2010, 2015; Khaziev et al., 2012).

В данном исследовании мы представляем модификацию этого метода применительно к синапсам млекопитающих.

ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Объект исследования

Для исследования использовались мыши 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 и были одобрены этическим комитетом Казанского медицинского университета. Животные содержались группами по 10 особей, разделенных по половому признаку, в пластиковых клетках с большим количеством пищи (стандартный корм для мышей) и водой в не ограниченном количестве. В помещении поддерживалась постоянная температура (22°C) и устанавливался регулярный 12 часовой цикл свет (8.00-20.00)-темнота (20.00-8.00). Исследования на животных представлены в соответствии с рекомендациями ARRIVE (Percie du Sert et al., 2020) и рекомендациями Британского журнала фармакологии (Lilley et al., 2020).

Эвтаназия животных проводилась путем смещения шейных позвонков в соответствии с утвержденным протоколом проекта. 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, в состав которого входили следующие соединения (мМ): NaCl — 135, KCl — 5, MgCl₂ — 1, NaH₂PO₄ — 1, NaHCO₃ — 12, глюкоза — 11, CaCl₂ — 2. Раствор аэрировался карбогеном. pH раствора поддерживался в диапазоне 7.2—7.4. Выделенная мышца размещалась в экспериментальной камере, дно которой залито смолой Silgard, и крепилась при помощи микроиглол из нержавеющей стали. Температура в экспериментальной камере стабилизировалась на уровне 20 °C при помощи термостабилизатора на элементах Пельтье. Блокада мышечных сокращений осуществлялась путем добавления в раствор мю-конотоксина G11В в концентрации 2 мкМ (Hill et al., 1996).

Нерв стимулировался прямоугольными сверхпороговыми стимулами длительностью 0,2 мс, с частотой 0,5 Гц через специальный всасывающий

электрод (Казаков et al., 2015), подключенный к изолированному импульсному стимулятору модели 2100 (A-M Systems, США). Вещества подавались в камеру при помощи перфузионной системы проточного типа.

2.2 Электрофизиологические исследования

Для регистрации изменений вызванных потенциалов концевой пластинки (ПКП) и миниатюрных потенциалов концевой пластинки (мПКП) применялась внутриклеточная микроэлектродная техника. Электроды изготавливались из толстостенных заготовок (Clark Electromedical Instruments, Великобритания), при помощи микроэлектродной кузницы Р-97. Для соединения электродов с усилителем использовалась хлорированная серебряная проволока. Стеклообразные микроэлектроды заполнялись раствором КС1 3М. Сопротивление электродов было в диапазоне 20-30 МОм. Управление микроэлектродами осуществлялось при помощи микроманипулятора MPC-200 (Sutter instruments, США). Регистрация сигналов (рис.4) осуществлялась при помощи усилителя Axoclamp 900A (Molecular Devices, США) и аналого-цифровой преобразователь (АЦП) Axopatch Digidata 1550 (Molecular Devices, США).

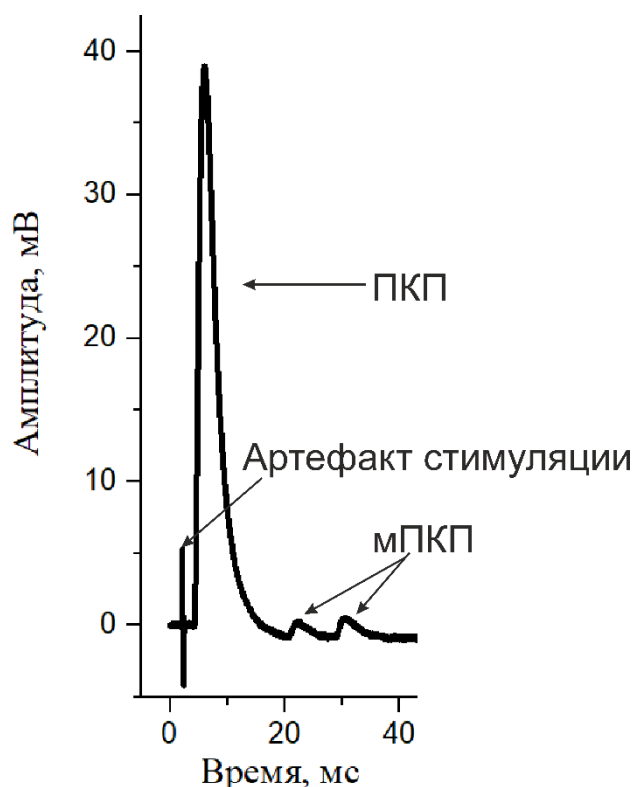


Рис. 4. Электрофизиологические сигналы, вызванные и миниатюрные потенциалы концевой пластинки (ПКП и мПКП соответственно).

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. Квантовый состав оценивался путем деления средних амплитуд ПКП на средние амплитуды мПКП.

2.3 Флуоресцентные красители и методика их загрузки

Для регистрации пресинаптического уровня кальция при низкой частоте стимуляции нерва применялся флуоресцентный кальций-чувствительный краситель гексакалиевая соль Oregon Green 488 BAPTA-1. Загрузка кальций-чувствительного флуоресцентного красителя осуществлялась через культуру нерва, при помощи разработанного метода (Samigullin et al., 2017; Zhilyakov et al., 2021). Чашка Петри с выделенным нервно-мышечным препаратом,

размещалась и закреплялась на стеклянной подложке, при помощи воска. После чего, устанавливалась специально изготовленная стеклянная микропипетка для загрузки красителя (рис. 5).

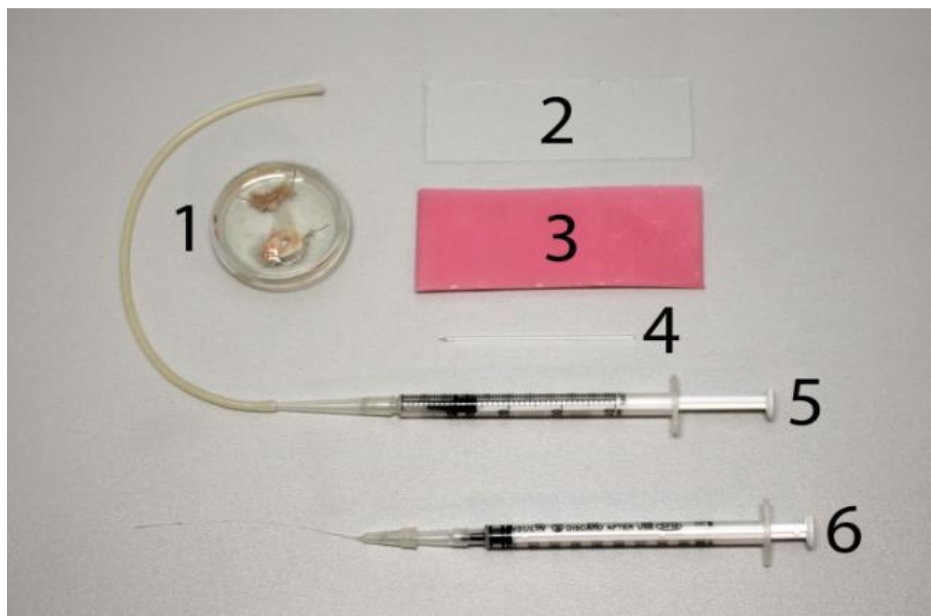


Рис. 5. Фотография препарата в чашке Петри, необходимых материалов и оборудования. 1 - выделенный препарат, помещенный в чашку Петри; 2 – предметное стекло; 3 – стоматологический воск; 4 – стеклянная микропипетка; 5 - шприц с силиконовой трубкой; 6 – шприц с микронаконечником.

Микропипетки изготавливались из толстостенных заготовок для микроэлектродов без внутренних микрокапилляров, при помощи микроэлектродной кузницы. После изготовления микропипетки на микрокузнице ее кончик обламывался, при помощи абразивного материала, а затем оплавлялся на кузнице до диаметра около 10 мкм. Затем микропипетка, с закрепленной на ней силиконовой трубкой и шприцем, подводилась к нервному стволу (рис. 6).

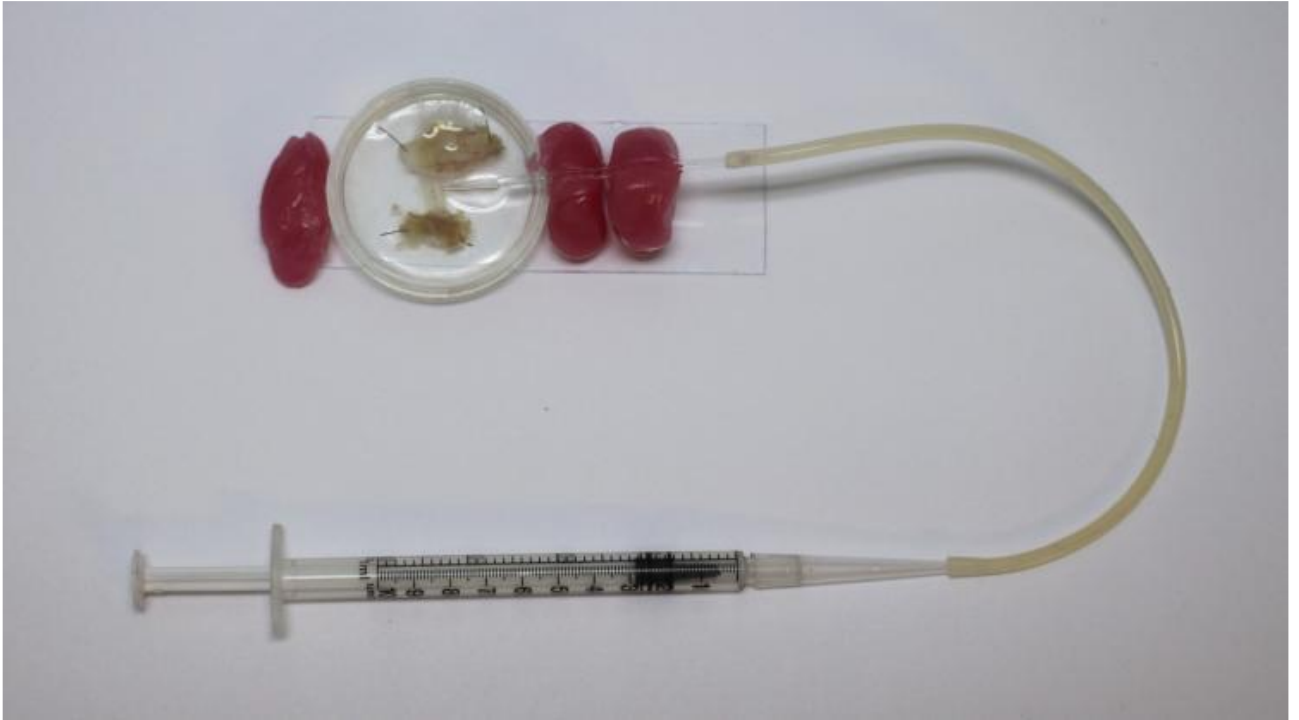


Рис. 6. Фотография препарата с закрепленной воском микропипеткой и шприцом для засасывания культуры нерва.

При помощи острых микроножниц аккуратно перерезался ствол нерва, и при помощи шприца нерв засасывался в микропипетку. Затем при помощи микрофиламента и шприца на культуру нерва наносилась капля красителя объемом примерно 0.5 мкл в концентрации 1 мМ.

После этого, стеклянная подложка с чашкой Петри помещались в темное место на 40 минут. После инкубации препарата с красителем микропипетка удалялась, и препарат помещался в емкость с раствором Рингера 50-100 мл. Препарат инкубировался в термостате в течение 2 часов при 25 °С. За это время краситель за счет диффузии и антероградного транспорта доставляется по нерву в область нервных терминалей (рис.7).

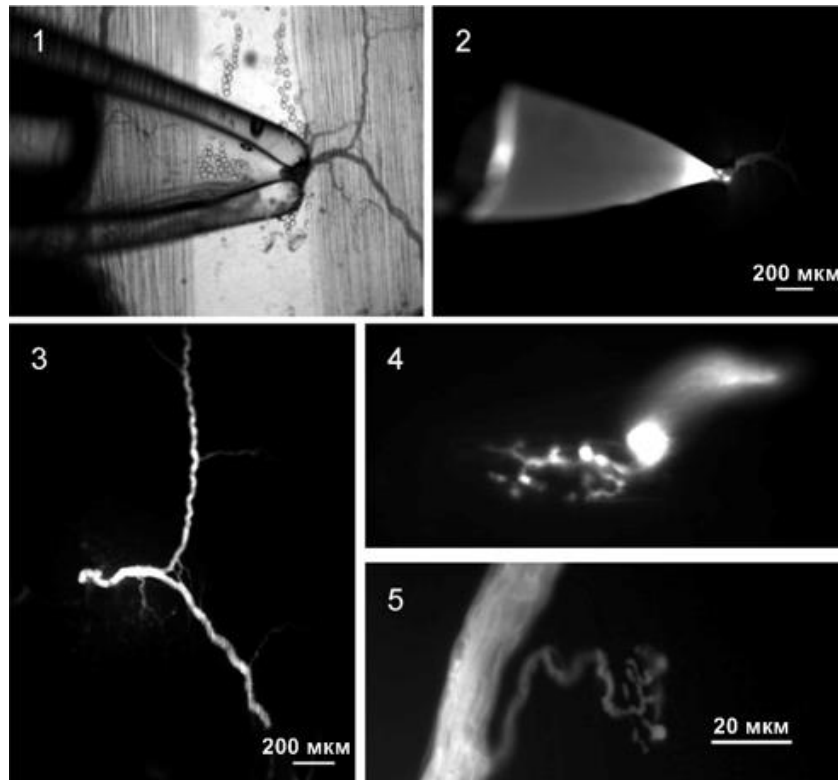


Рис. 7. Микрофотографии загрузки нервных окончаний красителем Oregon Green 488 BAPTA-1. 1 – микропипетка с культурой нерва и красителем в режиме освещения «светлое поле», 2 – та же область препарата, что и на 1 вкладке в режиме «флуоресценция», размерность шкалы 200мкм; 3 – сегмент нерва, загруженный красителем после трехчасовой инкубации, режим освещения «флуоресценция»; 4, 5 – нервные окончания, загруженные красителем в режиме освещения «флуоресценция».

Данная методика с успехом используется для загрузки кальциевых красителей в нервные окончания холоднокровных (Peng and Zucker, 1993; Wu and Betz, 1996) и нервные окончания дрозофилы (Macleod, 2012). В нашей лаборатории мы использовали данный тип загрузки для изучения входа кальция в нервные окончания лягушки. Одним из основных недостатков данной методики являлась необходимость длительной экспозиции препарата с красителем. Длительность инкубации препарата определяется скоростью перемещения красителя внутри аксона и расстоянием между нервными

окончаниями и местом аппликации красителя. В некоторых случаях инкубация может происходить в течение нескольких дней. При работе с нервно-мышечным препаратом кожно-грудинной мышцы лягушки в нашей лаборатории инкубация составляла около 24 ч. Нервно-мышечный препарат лягушки хорошо переносит такую длительную инкубацию. В случае работы с препаратами теплокровных животных такая длительная инкубация неприемлема, поскольку необходимо обеспечивать жизнедеятельность препарата, постоянную смену раствора, аэрацию и все процедуры проводить в стерильных условиях для исключения микробной контаминации препарата и т.д. В данной работе мы описали методику, позволяющую снизить время инкубации с красителем до 3 часов за счет уменьшения дистанции между отрезком культи нерва и терминальными ответвлениями. Выживаемость препарата при данном методе окрашивания является достаточной для нормальной экспериментальной работы. После загрузки, проведенной данным способом, нервные окончания, находящиеся в проксимальной части препарата (ближе к культе нерва), равномерно окрашиваются красителем. Это позволяет проводить регистрацию флуоресцентных кальциевых сигналов от одного или нескольких нервных окончаний по выбору исследователя (рис. 7). При данном способе загрузки краситель проникает только в цитозоль пресинаптической клетки, что исключает ошибки при регистрации сигналов, связанные с влиянием кальциевых сигналов от постсинаптической клетки или от внутриклеточных органелл, возникающие при других способах загрузки.

2.4 Регистрация и обработка кальциевых сигналов

Регистрация изменений интенсивности флуоресцентных сигналов в области нервных окончаний производилась при помощи фотометрической установки на базе микроскопа Olympus BX-51 с водноиммерсионным объективом x40 и высокоскоростной камеры Neuro CCD SMQ (Redshirt Imaging), характеристики которой указаны в Таблице 1.

Таблица 1. Характеристики камеры Neuro CCD SMQ (Redshirt Imaging)

| Камера | Чип | Скважность | Размерность | Площадь пикселя | Площадь чипа | Биннинг | Макс. частота кадров |
|--------------------------------------|--------|------------|-------------|------------------|-----------------|---------|----------------------|
| SciMeasure CCD камера Neuro CCD -SMQ | | (-e) | | мкм ² | мм ² | | Кадры/с |
| | CCD 39 | 215,000 | 80x80 | 24 | 1.92x1.92 | 1x1 | 2000 |
| | | | 40x40 | | | 2x2 | 3000 |
| | | | 26x26 | | | 3x3 | 5000 |
| 80x12 | | | | | 1x1 | 10000 | |

Для регистрации кальциевого сигнала препарат освещался видимым светом длиной волны 488нм. В качестве источника света использовался монохроматор PolychromeV (Till Photonics, Германия). При стимуляции нерва электрическим прямоугольным импульсом с характеристиками, указанными в главе 2.1, регистрировалось изменение интенсивности флуоресценции красителя, с частотой 500 кадров в секунду и окном регистрации в 1 секунду. Регистрация велась с пространственным разрешением 80x80 пикселей. Момент записи сигнала был синхронизирован со стимуляцией нерва. Для минимизации эффекта фототоксичности препарат освещался только во время записи сигналов. Регистрацию свечения красителя в покое оценивали непосредственно перед стимуляцией. Для вычисления средних параметров кальциевого транзientа усреднялись 8 сигналов.

Дальнейшая обработка данных осуществлялась в программе Fiji (University of Wisconsin–Madison, Wisconsin, США). В ней осуществлялось вычитание значения фонового свечения, а также сбор данных об изменении свечения в области нервной терминали (рис. 8, 9). Полученные данные загружались в программу OriginLab 8.1 где рассчитывались изменения амплитуды кальциевого транзientа по формуле $\Delta F/F = \frac{(F-F_0)}{F_0}$, где F –

интенсивность флуоресценции во время стимуляции, F_0 – интенсивность флуоресценции в покое (Sinha and Saggau, 1999; Shahrezaei et al., 2006).

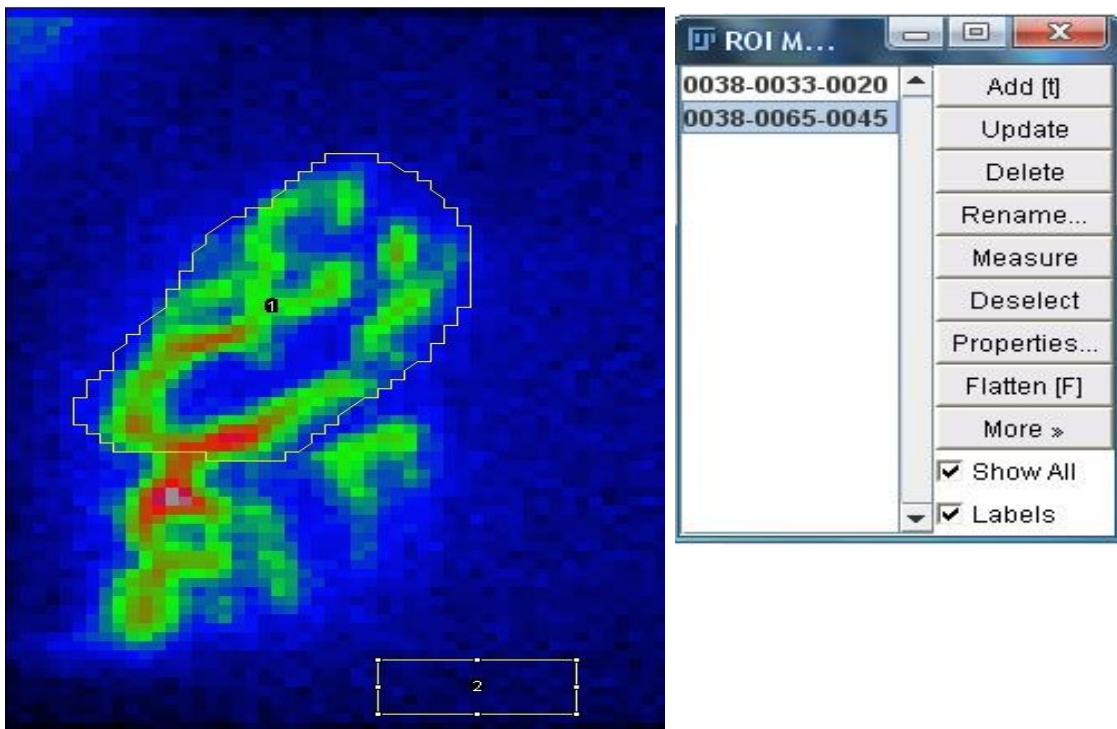


Рис. 8. Выбор области интереса. В левой части рисунка нервная терминаль обозначена как область 1, темный участок (фон) возле нее обозначен как область 2. В правой части рисунка список из созданных областей (1 и 2) и меню для манипуляций с выделенными областями.

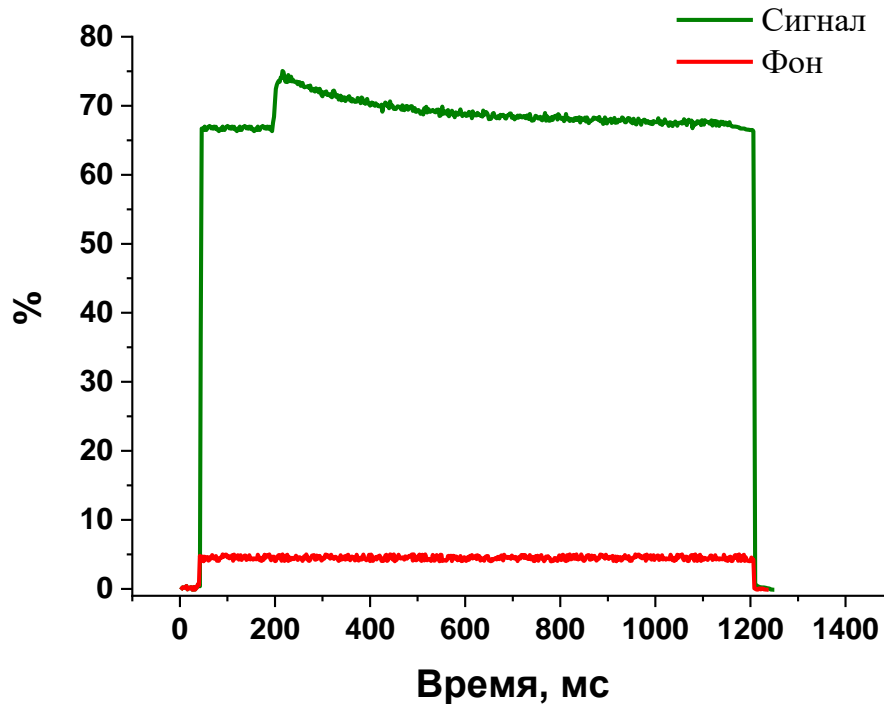


Рис. 9. Репрезентативный сигнал изменения интенсивности регистрируемого фонового свечения и в области нервной терминали, загруженной высокоаффинным кальциевым красителем Oregon Green 488 BAPTA-1, в условных единицах.

2.5 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 G11В (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.

2.6 Статистическая обработка данных

Сбор данных и статистический анализ осуществлялись в соответствии с рекомендациями Британского журнала фармакологии по дизайну и анализу экспериментов (Curtis et al., 2018). Количество экспериментов в каждой экспериментальной серии было выбрано на основе наблюдения статистически значимого эффекта с использованием минимального количества животных (принципы 3R). Животные случайным образом распределялись в разные экспериментальные группы.

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 односторонний дисперсионный анализ с последующим тестом Даннета, Тьюки для множественного сравнения и t-критерий Стьюдента. Данные представлены как среднее \pm стандартная ошибка среднего. Значения $p < 0.05$ считались статистически значимыми.

ГЛАВА 3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Оценка влияния красителя на процесс выброса нейромедиатора

В основной части экспериментов использовался кальциевый краситель, связывающийся с кальцием. Поскольку кальциевый краситель создан на основе хелатора кальция, нахождение его в терминали потенциально может влиять на процесс выброса нейромедиатора.

Для проверки этого предположения было проведено исследование, в котором оценивались параметры секреции нейромедиатора синапсов, в которые был загружен кальций-чувствительный краситель, через культуру нерва (см. раздел Методы), а затем сравнивались с их контрольными значениями, т.е. в случае, когда препараты не подвергались процессу загрузки красителем. Результаты проведенного исследования показали, что процедура загрузки красителя в НО, выполненная согласно нашему протоколу, не влияет на параметры вызванной и спонтанной секреции медиатора (табл.2). Таким образом, можно сделать заключение, что применяемая методика регистрации кальциевого транзientа позволяет объективно оценивать пресинаптический уровень кальция в НО при действии активных соединений и сопоставлять его изменение с изменением электрофизиологических параметров секреции медиатора.

Таблица 2. Средние значения некоторых электрофизиологических параметров в контроле и после загрузки красителя Oregon Green Bapta 1 (OGB1) в двигательные терминали через культю нерва.

| | ПКП, мВ | мПКП, мВ | Квантовый состав | Частота мПКП, Гц | Мембранный потенциал, мВ | n= |
|---------------------------|-----------------|----------------|---------------------|------------------------|-----------------------------|----|
| Контроль | 32,80 ± 1,02 | 0,88 ± 0,05 | 40,11 ± 1,98 | 1,57 ± 0,14 | -71,48 ± 0,77 | 37 |
| После загрузки OGB1 | 35,64 ± 1,41 | 1,07 ± 0,08 | 38,34 ± 2,60 | 1,81 ± 0,16 | -70,72 ± 1,23 | 37 |

3.2 Параметры зарегистрированного кальциевого транзиента

В результате загрузки кальциевого красителя наблюдалось флуоресцентное свечение в области концевых пластинок. После раздражения нерва электрическим стимулом регистрировалось увеличение интенсивности свечения красителя за счет его связывания с ионами кальция, входящими в клетку во время ПД. На рисунке 10 приведен пример зарегистрированного кальциевого сигнала, где стрелкой указан момент начала стимуляции.

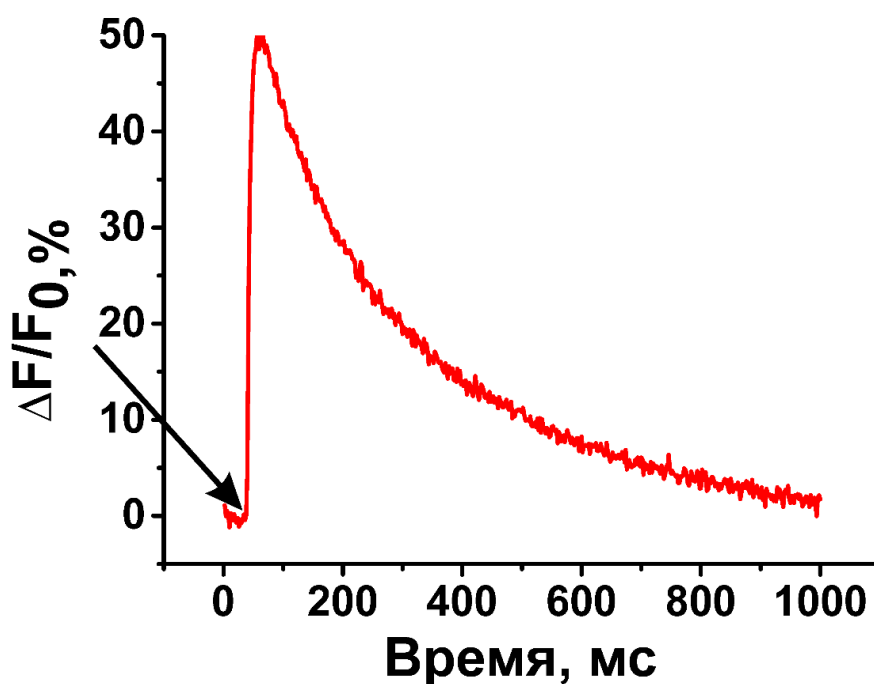


Рис. 10. Временной ход кальциевого транзientа, полученный от нервного окончания после загрузки высокоаффинного красителя Oregon Green BAPTA 1 в ответ на один электрической стимул.

Таблица 3. Амплитудно-временные параметры регистрируемого кальциевого сигнала при загрузке нервных окончаний кальций-чувствительным красителем Oregon Green BAPTA 1.

| | Пик $\Delta F/F_0$, % | Время Нарастания 20-80%, мс | τ , мс |
|----------------------|---------------------------|-----------------------------------|----------------------------|
| Oregon Green BAPTA 1 | 30.7 ± 2.5 (n=10) | 4.69 ± 0.36 (n=10) | 302.2 ± 7.34 (n=10) |

Время нарастания сигнала определяется притоком кальция, связыванием его с молекулами красителя, а также количеством эндогенных кальций-связывающих буферов (Ahmed and Connor, 1988; Burnashev and Rozov, 2005). Флуоресцентный кальциевый сигнал нарастает медленнее по сравнению с постсинаптическим ответом и кальциевым током (Samigullin et

al., 2015). Аналогичные наблюдения были сделаны в нервно-мышечных синапсах ящериц и лягушек (David et al., 1997; DiGregorio and Vergara, 1997). Предполагается, что флуоресцентный транзиент отражает изменение концентрации кальция в терминали, а его первая производная отражает кальциевый ток (Sabatini and Regehr, 1998). Наблюдаемое отставание от постсинаптических ответов интерпретируется как следствие присутствия высокой концентрации фиксированного буфера, что приводит к медленной диффузии кальция в терминали (Samigullin et al., 2015). В этом случае кальций, поступающий в терминаль, взаимодействует непосредственно с белками аппарата экзоцитоза, вызывая высвобождение нейротрансмиттера, и только впоследствии медленная диффузия кальция вызывает образование комплексов кальций-краситель и заметный сигнал флуоресценции. Поскольку мы регистрировали флуоресценцию всего объема терминали, медленная кинетика сигнала, вероятно, отражает процесс медленного распределения кальция. Методы математического моделирования позволяют восстановить форму реального кальциевого тока и определить концентрации подвижных и фиксированных кальциевых буферов вблизи мембраны нервного окончания, где происходит взаимодействие белков экзоцитоза с кальцием (Samigullin et al., 2015).

Задний фронт сигнала (спад) определяется процессом диссоциации красителя с ионами кальция, который зависит от свойств красителя, в частности, его сродством к кальцию. Кроме того, скорость спада определяется процессом откачки кальция из клетки. Соответственно, временные параметры флуоресцентных ответов зависят от скорости образования комплекса красителя с кальцием и времени их нахождения в связанном состоянии (табл. 3). В связи с этим в данном исследовании мы сосредоточились на изучении амплитуды флуоресцентного кальциевого транзиента и не оценивали временные параметры кальциевых сигналов. Анализ амплитуды кальциевого транзиента позволяет выявлять участие пресинаптического кальция в

реализации действия физиологически активных модуляторов синаптической передачи (Khaziev et al., 2016).

Поскольку загрузка красителя процесс динамический, то необходимо было подобрать необходимую концентрацию красителя, температуру при которой осуществляется загрузка, а самое главное время, за которое данный процесс выйдет на стационарный уровень, то есть время, по прошествии которого, интенсивность свечения (количество красителя) моторных нервных окончаний достигнет стабильного уровня.

Чтобы доказать, что выбранный протокол полностью удовлетворяет необходимым условиям, была проведена серия экспериментов, в которой регистрировался кальциевый транзистент каждые 30 минут в течение 1,5 часов.

В результате проведенного исследования, было показано, что при загрузке двигательных нервных окончаний кальций-чувствительным красителем Oregon Green BAPTA 1 через культуру нерва по предложенной нами методике, амплитудно-временные параметры кальциевого сигнала не изменяются с течением времени (1,5 ч) (рис. 11). Этот факт учитывался при выполнении всех последующих серий экспериментов.

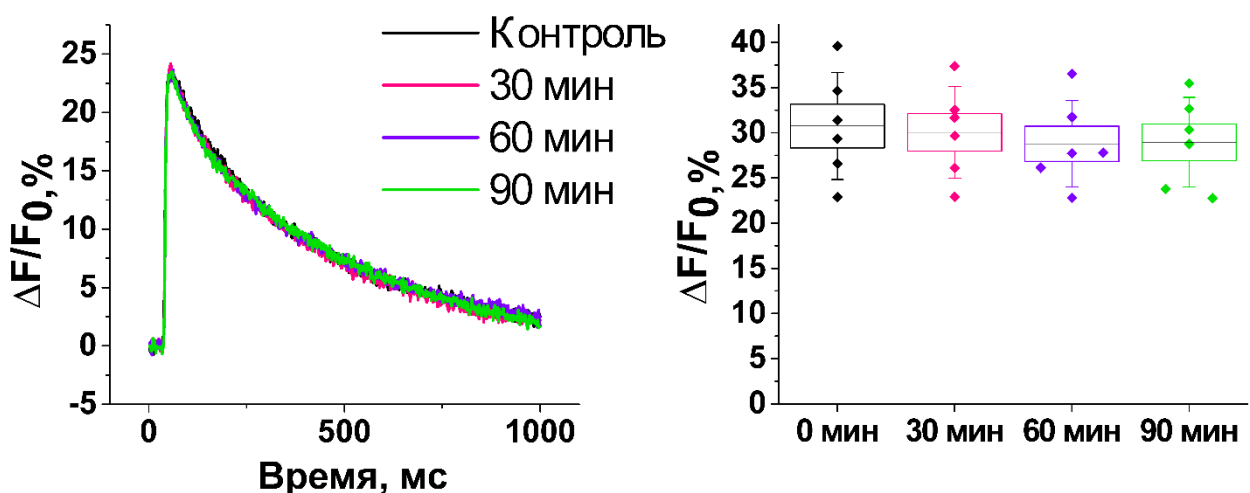


Рис. 11. Временной контроль для амплитуды кальциевого транзистента.

Амплитуда кальциевого транзистента не претерпевает изменений в течение 90 минут.

3.3 Оценка изменения кальциевого транзientа и квантового выброса нейромедиатора при изменении внеклеточной концентрации ионов кальция

На первом этапе исследования необходимо было сопоставить 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 изменения амплитуды Ca^{2+} -транзientа и квантового состава ПКП в нервно-мышечном синапсе мыши при варьировании внеклеточной концентрации Ca^{2+} от 0,3 до 2 мМ (полученные значения см. табл. 4). Таким образом, было показано, что даже небольшие изменения входа кальция в нервную клетку, приводят к значительным изменениям количества выброшенных квантов АХ. Для наглядности, кривые концентрационной зависимости были построены на одной графической плоскости (рис.12), а затем зависимость квантового состава от изменения кальциевого транзientа при варьировании концентрации кальция во внеклеточной среде представлена в логарифмических шкалах, для определения коэффициента биохимической кооперативности (Хилла), который может быть вычислен по углу наклона и соответствует количеству ионов кальция, которым необходимо связаться с комплексом, чтобы вызвать высвобождение одного синаптического пузырька (везикулы). Коэффициент для полученной прямой составил $k_{\text{Хилла}}=2.86\pm 0.55$ (рис. 12). Полученное значение $k_{\text{Хилла}}$ совпадает со значением, полученным другими исследователями ранее для нервно-мышечного синапса крысы и других синапсов электрофизиологическим методом. Например, в нервно-мышечном синапсе крысы это значение составляло 2.7 (Hubbard et al., 1968); в синапсах лягушки коэффициент биохимической кооперативности составлял 3.8 (Dodge and Rahamimoff, 1967); в работе Shahrezaei (Shahrezaei et al., 2006), он был равен 4.16.

Таблица 4. Амплитуда кальциевого транзientа и квантовый состав при различных концентрациях Ca^{2+} . Данные нормированы на значения, полученные при $[\text{Ca}^{2+}]$, равном 2.0 мМ.

| Концентрация Ca^{2+} (мМ) | Амплитуда кальциевого транзientа $\Delta F/F_0$ (в долях от 1) | Квантовый состав (в долях от 1) |
|---------------------------------------|--|------------------------------------|
| 0.3 | 0.46 ± 0.03 | 0.10 ± 0.02 |
| 0.6 | 0.55 ± 0.03 | 0.24 ± 0.02 |
| 0.9 | 0.67 ± 0.03 | 0.52 ± 0.04 |
| 2.0 | 1 | 1 |

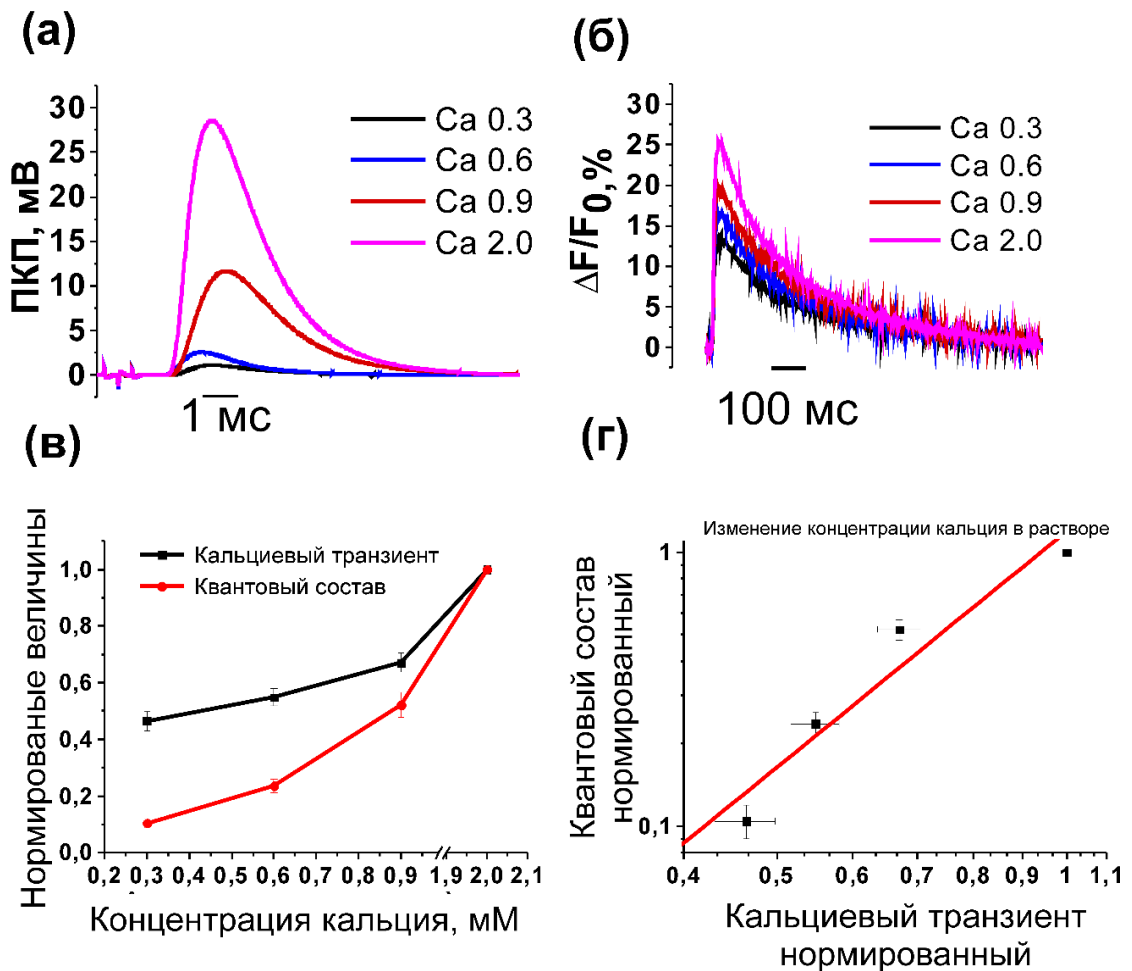


Рис. 12. Сопоставление изменений кальциевого транзientа и квантового состава при различной внеклеточной концентрации кальция. а) амплитуда вызванных ПКП при варьировании концентрации кальция в

растворе б) амплитуда кальциевого транзientа при варьировании концентрации кальция в растворе; в) концентрационные кривые (нормированные данные) квантового состава и кальциевого транзientа в зависимости от содержания кальция в растворе; г) зависимость квантового состава от изменения кальциевого транзientа при варьировании концентрации кальция во внеклеточной среде.

Исходя из полученных данных, для выделения одного кванта нейромедиатора в синапсе мышцы необходимо взаимодействие по крайней мере 3 ионов кальция с белками экзоцитоза. Полученное значение согласуется с коэффициентом биохимической кооперативности (3.01), рассчитанным ранее при помощи электрофизиологических исследований на синапсах мышцы, когда анализировалось изменение квантового состава в ответ на изменение концентрации внеклеточного Ca^{2+} (Tsentssevitsky et al., 2015).

Нелинейная зависимость квантового состава ПКП от входа Ca^{2+} в терминаль как в синапсах холоднокровных, так и у теплокровных приводит к тому, что даже незначительные изменения кальциевого транзientа, в нервном окончании, оказывают существенное воздействие на выброс нейромедиатора, тем самым модулируя синаптическую передачу. Это необходимо учитывать при анализе эффектов физиологически активных веществ, оказывающих влияние на функции синапса за счет изменения пресинаптического уровня Ca^{2+} в двигательном синапсе.

3.4 Эффекты блокады всех типов потенциал-чувствительных кальциевых каналов на кальциевый транзient путем аппликации хлорида кадмия

Основной вход кальция во время стимуляции двигательного нерва в периферические нервные окончания осуществляется через потенциал чувствительные кальциевые каналы. Для того, чтобы доказать, что регистрируемое изменение свечения красителя действительно отражает вход

ионов кальция через кальциевые каналы плазматической мембраны, было проведено исследование с применением неселективного блокатора кальциевых каналов хлорида кадмия в различных концентрациях (5, 100 и 500 мкМ). Аппликация хлорида кадмия приводила к значительному дозозависимому понижению амплитуды кальциевого транзientа (рис. 13).

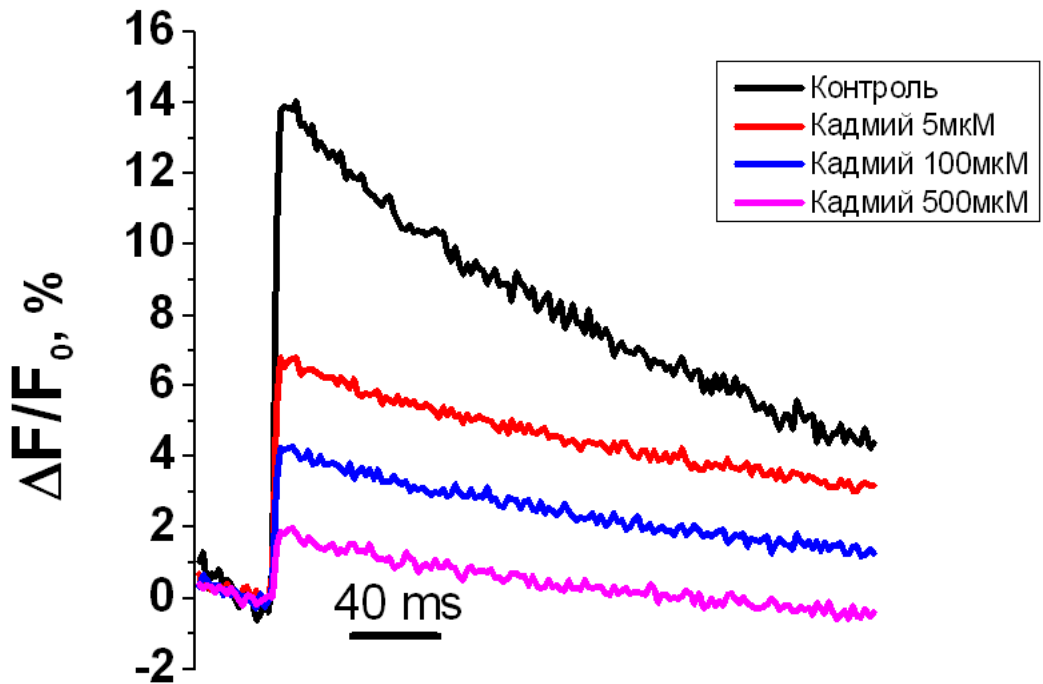


Рис. 13. Дозозависимое понижение амплитуды кальциевого транзientа под действием хлорида кадмия в различных концентрациях.

Несмотря на то, что после аппликации хлорида кадмия в концентрации 500 мкМ амплитуда кальциевого ответа на стимуляцию драматически уменьшается, кальциевые ответы все еще регистрировались. Хочется отметить что в такой концентрации кадмий полностью блокирует выброс нейромедиатора (Penner and Dreyer, 1986; Wiegand et al., 1990). Это указывает на то, что даже не смотря на практически полную блокаду потенциал чувствительных кальциевых каналов имеется иной источник входа кальция в нервное окончание во время распространяющегося потенциала действия, не чувствительный к хлориду кадмия. Хотя в литературе есть данные о том, что

кроме блокады потенциал - чувствительных кальциевых каналов хлорид кадмия может влиять и на другие синаптические функции (Sugiura and Ko, 1997), мы считаем, что в нашем случае в таких больших концентрациях превалирует его основное свойство – блокада потенциал чувствительных кальциевых каналов (Tsentssevitsky and Petrov, 2021).

3.5 Участие кальциевых каналов и рианодиновых рецепторов в формировании кальциевого транзientа. Роль L-типа кальциевых каналов в процессе выделения нейромедиатора

Для установления источника(-ов) повышения кальциевого сигнала был проведён скрининг потенциал-чувствительных кальциевых каналов, принимающих участие в формировании амплитуды кальциевого транзientа, путем их поочередной и совместной блокады. Известно, что на периферических синапсах теплокровных животных представлены Ca_v каналы как минимум трех типов: L-, P/ Q- и N- (Westenbroek et al., 1995; Day et al., 1997; Urbano et al., 2002; Paganì et al., 2004) , среди которых P/ Q-тип является основным (Protti and Uchitel, 1993; Katz et al., 1996). Так, в работе Uchitel с соавторами, было показано на синапсах мышцы, что при блокаде Ca_v P/ Q-типа при помощи ω -агатоксина в концентрации 40нМ, полностью пропадали вызванные ПКП (Protti and Uchitel, 1993). Однако, данные настоящего исследования показали, что применение ω -агатоксина в той же концентрации, приводило к уменьшению входа кальция только лишь на $67 \pm 4.4\%$ ($n= 5$; $p < 0.05$) (рис. 14), в связи с этим было принято решение увеличить концентрацию данного блокатора до 500 нМ. В результате наблюдалось понижение амплитуды кальциевого транзientа на $79 \pm 3.9\%$ ($n=8$; $p < 0.05$; рис. 14).

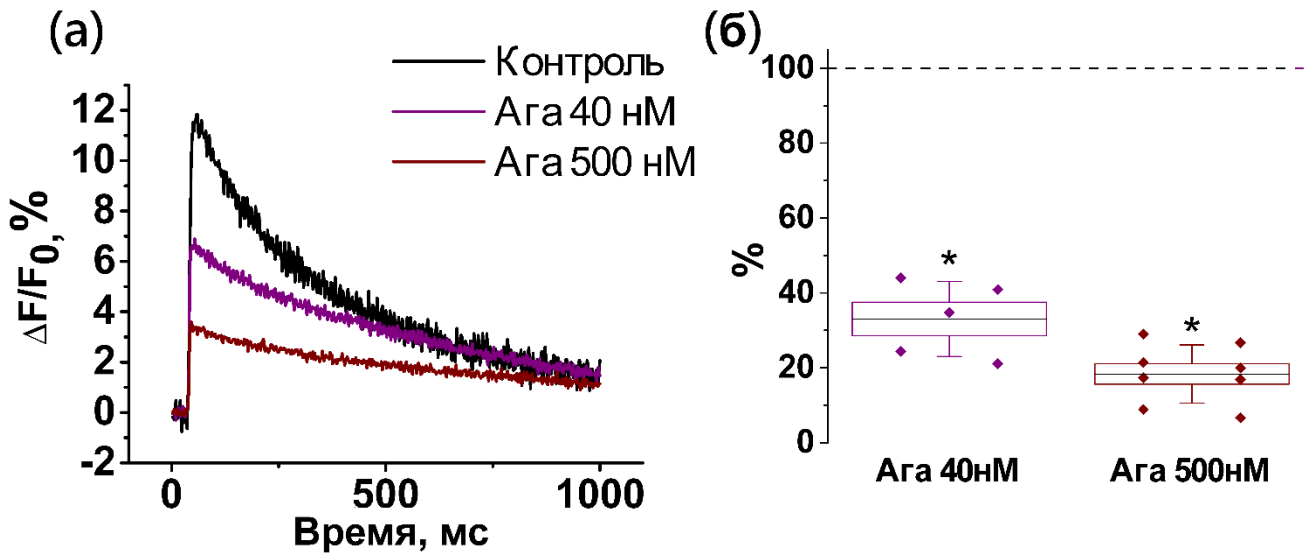


Рис. 14. Снижение амплитуды кальциевого транзientа после блокады каналов P/Q-типа: а) репрезентативные сигналы кальциевых транзientов в контроле и после аппликации ω -агатоксина (Ага) в концентрациях 40 нМ и 500 нМ, б) СРЗНАЧ \pm ошибка среднего и СКО амплитуд кальциевых сигналов, полученные в вышеуказанных сериях и выраженные в процентах от контроля. Звёздочкой (*) отмечены достоверные изменения ($p < 0,05$; попарно-связанный one-way ANOVA тест с критерием Тьюки).

Полученный результат свидетельствует о том, что Ca_v P/ Q-типа, действительно, вносят основной вклад в формирование входа кальция в клетку. Но несмотря на применение достаточно больших концентраций специфического блокатора (500 нМ) при которых гарантированно блокируется вызванная секреция квантов медиатора мы наблюдали не полное устранение кальциевого транзientа, что может свидетельствовать о том, что в формировании кальциевого транзientа могут участвовать и другие типы кальциевых каналов.

Существуют данные литературы о том, что низкопороговые Ca_v L-типа могут вносить существенный вклад в регуляцию вызванного освобождения медиатора и могут участвовать в реализации эффектов ряда физиологически

активных соединений (Prior and Singh, 2000; Flink et al., 2003; Perissinotti et al., 2008). В соответствии с этим мы исследовали их участие в формировании кальциевого входа, при помощи селективных блокаторов нитрендипина и верапамила в концентрации 25 мкМ и 50 мкМ, соответственно (Cia et al., 2005; Uribe et al., 2013; Gu et al., 2020). Применение нитрендипина приводило к уменьшению входа кальция в моторное нервное окончание на $18.8 \pm 1.1\%$ ($n=17$; $p<0.05$; рис. 15). Аппликация верапамила также приводила к снижению амплитуды кальциевого транзientа на $25 \pm 4.4\%$ ($n=9$; $p<0.05$; рис. 15).

Известно, что Ca_v L-типа играют важную роль в регуляции выброса нейромедиатора в периферических синапсах теплокровных на ранней стадии онтогенеза (Sugiura and Ko, 1997). Так же есть данные показывающие участие каналов L-типа в регуляции вызванного освобождения в периферических синапсах при реализации эффектов различных физиологически активных соединений и при определенных состояниях синапса (Flink et al., 2003; Yang et al., 2007; Perissinotti et al., 2008). Поскольку в рамках данного исследования мы показали, что каналы L-типа участвуют в формировании кальциевого транзientа в нормальных условиях при низкой частоте стимуляции в следующей серии экспериментов мы решили выяснить участвуют ли каналы L-типа в регуляции вызванного освобождения. По результатам данной серии экспериментов наблюдалось снижение квантового состава на $11.2 \pm 2.9\%$ ($n=6$; $p<0.05$) и на $14.2 \pm 3.2\%$ ($n=6$; $p<0.05$) после аппликации нитрендипина и верапамила, соответственно (рис. 16). Из этого следует, что низкопороговые потенциал-чувствительные кальциевые каналы L-типа определенно вносят вклад в изменение кальциевого транзientа и могут влиять на процессы выделения нейромедиатора.

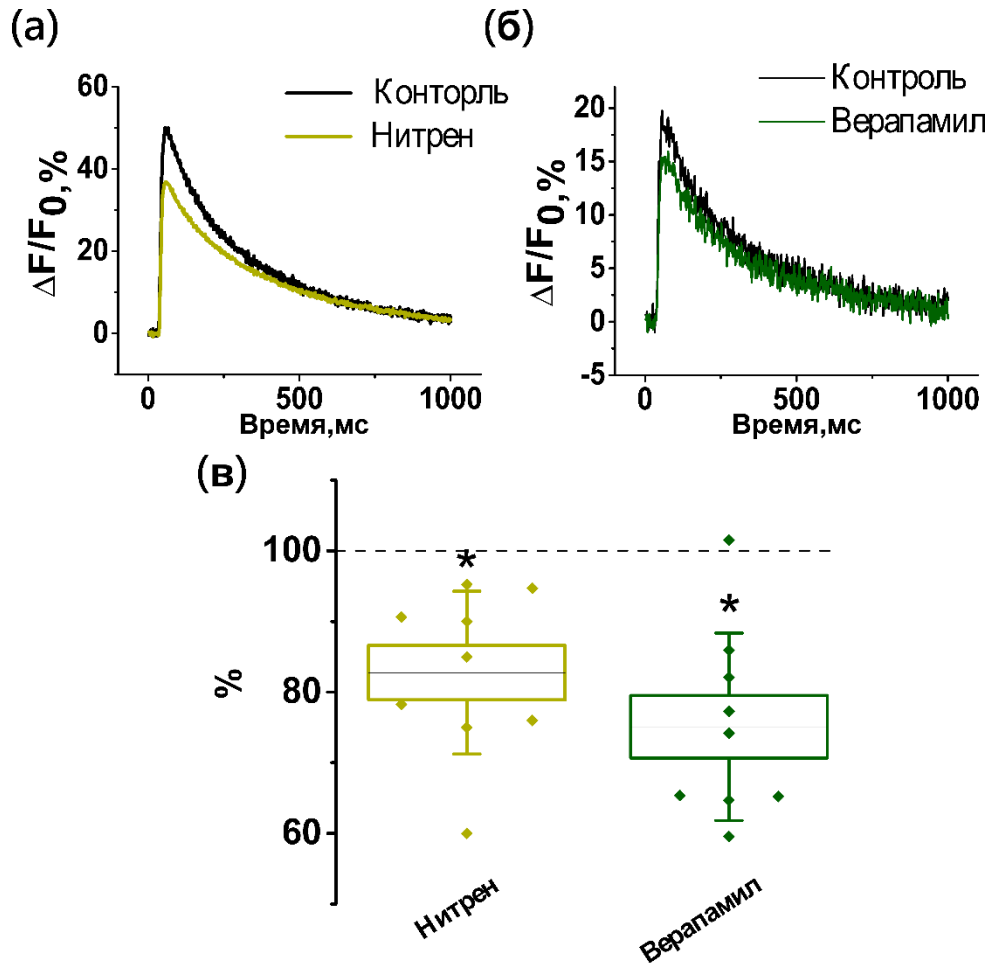


Рис. 15. Снижение амплитуды кальциевого транзientа после блокады каналов L-типа: а) репрезентативные сигналы кальциевых транзientов в контроле и после аппликации нитрендипина (Нитрен) и б) верапамила в концентрациях 25 мкМ и 50 мкМ соответственно, в) СРЗНАЧ \pm ошибка среднего и СКО амплитуд кальциевых сигналов, полученные в вышеуказанных сериях и выраженные в процентах от контроля. Звёздочкой (*) отмечены достоверные изменения ($p < 0,05$; попарно-связанный t-критерий Стьюдента).

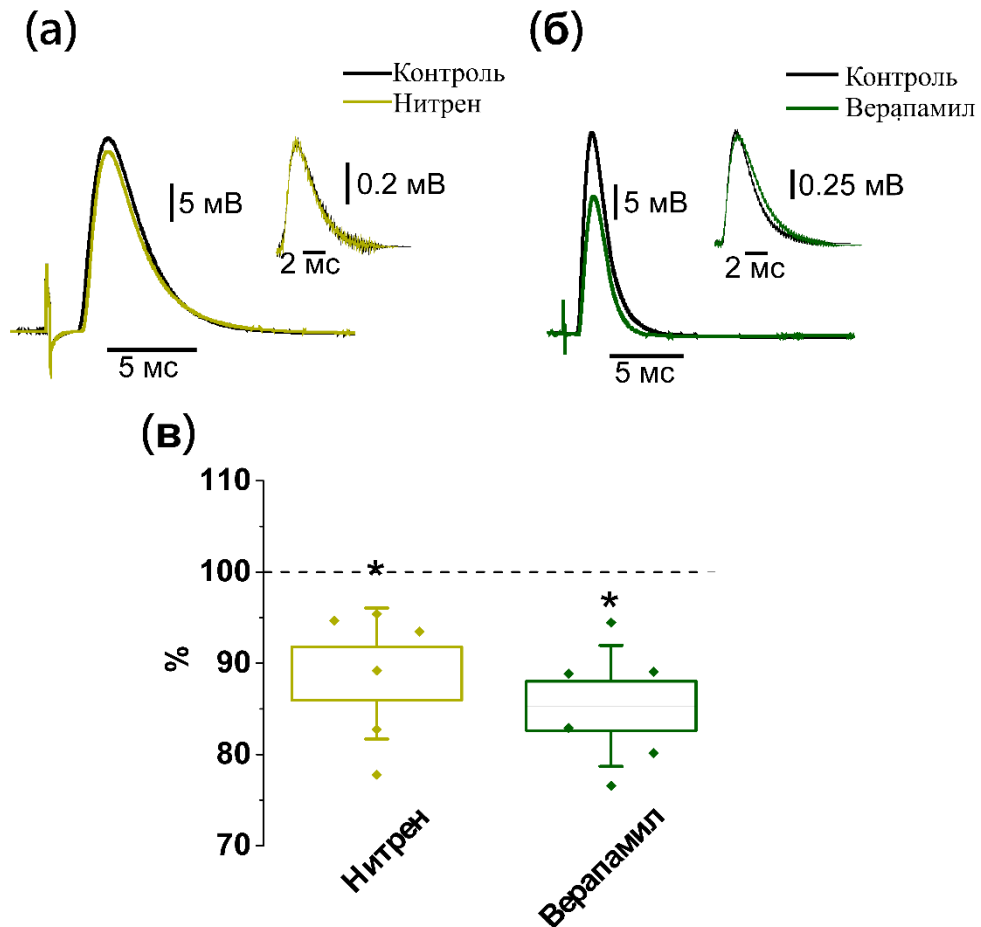


Рис. 16. Снижение квантового состава после блокады каналов L-типа: а) репрезентативные сигналы вызванных ПКП и мПКП в контроле и после аппликации нитрендипина (Нитрен) и б) верапамила в концентрациях 25 мкМ и 50 мкМ соответственно, в) СРЗНАЧ \pm ошибка среднего и СКО квантового состава, полученные в вышеуказанных сериях и выраженные в процентах от контроля. Звёздочкой (*) отмечены достоверные изменения ($p < 0,05$; попарно-связанный t-критерий Стьюдента).

Стоит особо заострить внимание на том, что ранее было показано, что Ca_v L-типа в периферических синапсах млекопитающих участвуют в регуляции секреции только в специальных условиях, к ним относятся: высокочастотная активность, сильная деполяризация или при действии форболовых эфиров, дефиците APP (Arenson and Evans, 2001; Flink et al., 2003; Yang et al., 2007; Perissinotti et al., 2008). Также они могут быть задействованы в процессе онтогенеза и при реализации действия физиологически активных соединений (Gaydukov et al., 2009; Garcia et al., 2022). Однако в данной работе нами показано, что Ca_v L-типа даже в нормальных условиях при низкочастотной стимуляции нерва способны модулировать вход кальция в НО и влиять на процесс вызванной секреции квантов медиатора.

Поскольку есть данные литературы, свидетельствующие о том, что в периферических нервных окончаниях могут экспрессироваться Ca_v N-типа (Garcia et al., 2022) была проведена серия экспериментов с применением блокатора ω -конотоксина GVIA в концентрации 10 мкМ (Protti et al., 1991). Амплитуда кальциевого транзientа после аппликации ω -конотоксина GVIA не претерпевала достоверных изменений $1.1 \pm 2.8\%$ ($n = 7$, $p < 0.05$) (рис. 17).

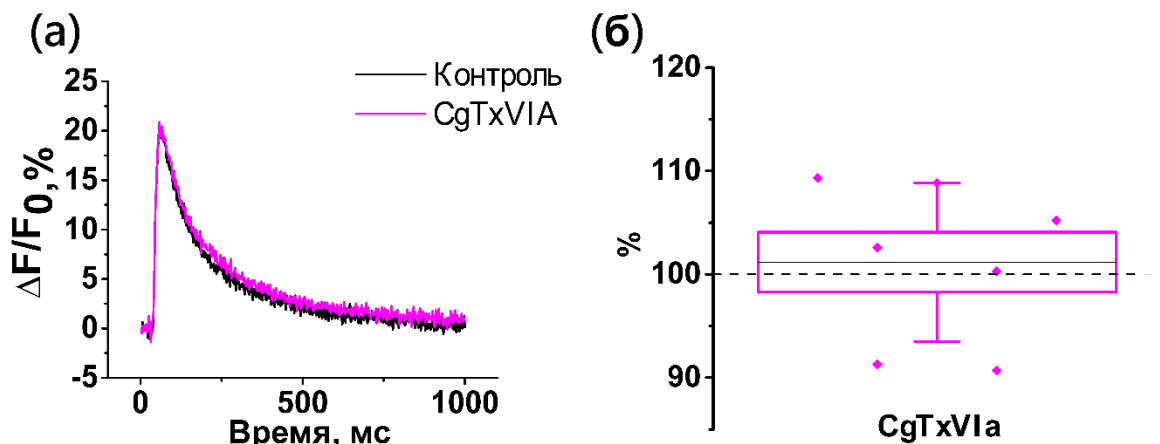


Рис. 17. Отсутствие изменений амплитуды кальциевого транзientа после блокады каналов N-типа: а) репрезентативный сигнал кальциевого транзientа в контроле и после аппликации ω -конотоксинаGVIA (CgTxVIA) в концентрации 10 мкМ, б) СРЗНАЧ \pm ошибка среднего и СКО амплитуд

кальциевых сигналов, полученные в вышеуказанной серии и выраженные в процентах от контроля. Звёздочкой (*) отмечены достоверные изменения ($p < 0.05$; попарно-связанный t-критерий Стьюдента).

Согласно недавней работе (García 2022), экспрессия N-типа каналов в двигательных синапсах мыши по мере взросления животного в период от P7 до P30 резко сокращается. Этот факт хорошо согласуется с данными, полученными в ходе настоящего исследования. В соответствии с вышесказанным можно заключить, что Ca_v N-типа не принимают участия в процессе регуляции входа кальция в двигательные синапсы мыши или их вклад крайне мал.

Совместное применение блокаторов нитрендипина 25 мкМ и ω -агатоксина 500 мкМ к драматическому уменьшению амплитуды кальциевого транзientа на $93.4 \pm 0.8\%$ ($n=10$, $p < 0.05$; рис. 18), однако, небольшие изменения, как и в случае применения неизбирательного блокатора хлорида кадмия (500 мкМ), все еще могли быть зарегистрированы. Это может свидетельствовать о том, что в формировании кальциевого транзientа могут участвовать другие источники кальция кроме исследованных потенциал-чувствительных кальциевых каналов. Существуют данные литературы, свидетельствующие о том, что выброс кальция из рианодин-чувствительных рецепторов может участвовать в регуляции вызванного освобождения медиатора при определенных условиях, например, при высокочастотной стимуляции двигательного нерва (Liu et al., 2005; Khuzakhmetova et al., 2014). Но данных об участии рианодин-чувствительных рецепторов в формировании кальциевого транзientа в периферических синапсах теплокровных при низкочастотной стимуляции нерва нет.

Для проверки предположения об участии рианодин-чувствительных рецепторов в формировании кальциевого транзientа, был применен модулятор рианодиновых рецепторов – рианодин. В литературе есть данные о

том, что рианодин в концентрации 10 мкМ блокирует выброс кальция из эндоплазматического ретикула через рианодиновые рецепторы (Cheek et al., 1994; Khuzakhmetova et al., 2014). В результате применения рианоидина в концентрации 10 мкМ, наблюдалось снижение амплитуды кальциевого транзientа на $6.5 \pm 2.3\%$ ($n = 14$; $p < 0.05$; рис. 19), свидетельствуя о том, что ЭПС вносит вклад в изменение пресинаптического уровня кальция в двигательных синапсах теплокровных животных при редкой стимуляции.

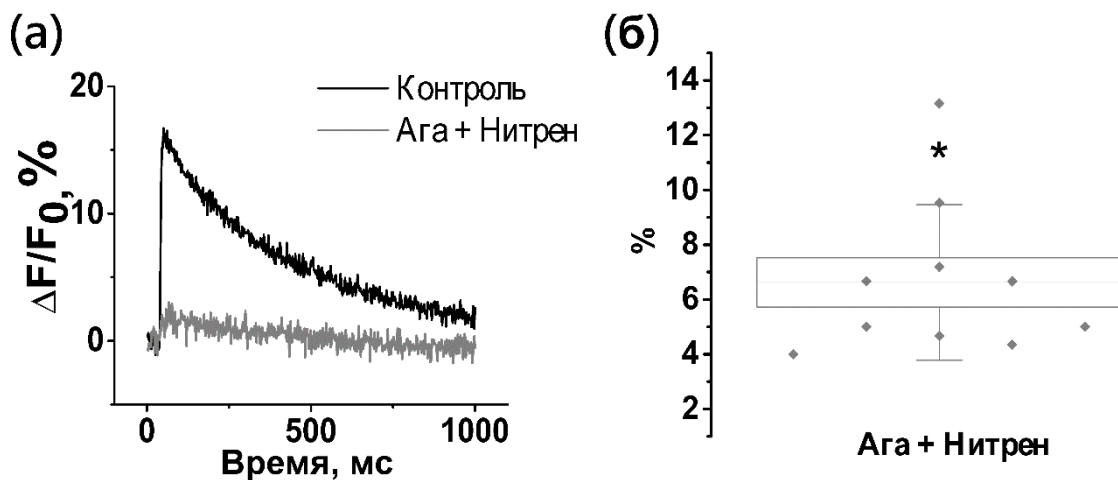


Рис. 18. Драматическое уменьшение амплитуды кальциевого транзientа после одновременной блокады каналов P/Q-типа и каналов L-типа: а) репрезентативный сигнал кальциевого транзientа в контроле и после аппликации ω -агатоксина (Ага) в концентрациях 500нМ и нитрендипина (Нитрен) в концентрации 25 мкМ, б) СРЗНАЧ \pm ошибка среднего и СКО амплитуд кальциевых сигналов, полученные в вышеуказанной серии и выраженные в процентах от контроля. Звёздочкой (*) отмечены достоверные изменения ($p < 0.05$; попарно-связанный t-критерий Стьюдента).

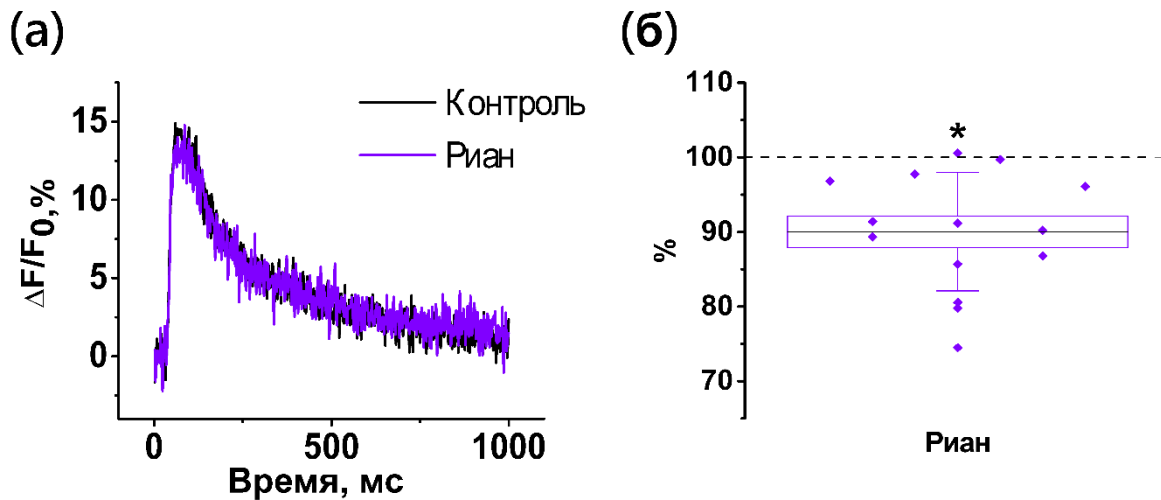


Рис. 19. Снижение амплитуды кальциевого транзientа после блокады рианодиновых рецепторов: а) репрезентативные сигналы кальциевых транзientов в контроле и после аппликации рианодина (Риан) в блокирующей концентрации 10 мкМ, б) СРЗНАЧ \pm ошибка среднего и СКО амплитуд кальциевых сигналов, полученные в вышеуказанных сериях и выраженные в процентах от контроля. Звёздочкой (*) отмечены достоверные изменения ($p < 0,05$; попарно-связанный t-критерий Стьюдента).

Исходя из полученных данных можно предположить, что если модуляция работы холинорецепторов может вызывать изменения пресинаптического уровня кальция в двигательных нервных окончаниях, то скорее всего они ассоциированы с работой рианодиновых рецепторов или P/Q-типа и L-типа каналов.

Имея в арсенале валидный метод оценки изменений кальциевого транзientа, а также информацию об источниках его формирующих, можно перейти к основной цели исследования, а именно изучению влияния холинорецепторов на изменения пресинаптического уровня кальция в НО.

3.6 Роль никотиновых рецепторов в регуляции пресинаптического уровня кальция и выделения нейромедиатора

Как было сказано ранее, АХ, выделяющийся в синаптическую щель, активирует мускариновые и никотиновые рецепторы на пресинаптической мембране. Эти рецепторы могут запускать регуляторные каскады, которые в свою очередь могут пересекаться и взаимно влиять друг на друга. В связи с этим изучение их роли в процессах изменения пресинаптического уровня кальция и механизмах регуляции выделения нейромедиатора проводилось по отдельности, при помощи их селективных агонистов/антагонистов. На начальном этапе исследования была изучена цепочка регуляции, запускаемая ионотропными никотиновыми рецепторами.

3.6.1 Влияние никотина на электрофизиологические параметры нервно-мышечного синапса.

На первом этапе данного исследования важно было оценить влияние никотина как на пре-, так и на постсинаптическом уровне, поскольку большая популяция нХР располагается на постсинаптической мембране. Для этого регистрировались следующие электрофизиологические параметры нервно-мышечной передачи: мембранный потенциал покоя (МПП) мышечного волокна, амплитуда мПКП, частота мПКП и амплитуда ПКП. Строились дозозависимые кривые зарегистрированных параметров и, исходя из полученных данных, определяли оптимальную действующую концентрацию никотина для исследования процессов ауторегуляции. Изменения МПП и амплитуды мПКП свидетельствуют о проявлении постсинаптического действия фармакологического агента, тогда как изменения в частоту мПКП позволяют судить о наличии пресинаптического эффекта препарата. Амплитуда ПКП, в свою очередь, может варьироваться вследствие изменений как на пре-, так и на постсинаптическом уровне.

Контрольное значение МПП мышечных волокон *m. LAL*, как уже было указано в табл. 2, составляло -71.48 ± 0.77 мВ ($n = 30$). Аппликация никотина в концентрациях 0.1 мкМ, 1 и 5 мкМ не влияла на среднее значение регистрируемого параметра, величина которого составила -69.72 ± 0.9 мВ ($n = 30, p > 0.05$), -70.91 ± 0.78 мВ ($n = 30, p > 0.05$) и -70.85 ± 0.87 мВ ($n = 30, p > 0.05$), соответственно (рис. 20а). Небольшая деполяризация отмечалась при использовании никотина в концентрации 10 мкМ (-67.04 ± 0.79 мВ; $n = 30, p < 0.05$); при аппликации же агониста холинорецепторов в концентрации 50 мкМ развивалась намного более выраженная деполяризация и среднее значение МПП снизилось до -56.94 ± 1.29 мВ ($n = 30, p < 0.05$; рис. 20а).

Анализируя другой параметр, позволяющий оценивать наличие постсинаптического действия никотина, а именно, амплитуду мПКП были получены следующие данные. Среднее значение амплитуды спонтанного сигнала в контроле составило 0.88 ± 0.05 мВ ($n = 30$). Аппликация агониста холинорецепторов вплоть до концентрации 10 мкМ никак не влияла на регистрируемый параметр, величина которого составила: 0.83 ± 0.04 мВ ($n = 30, p > 0.05$) для 0.1 мкМ; 0.84 ± 0.05 мВ ($n = 30, p > 0.05$) для 1 мкМ; 0.96 ± 0.06 мВ $n = 30, p > 0.05$) для 5 мкМ и 0.83 ± 0.05 мВ ($n = 30, p > 0.05$) для 10 мкМ (рис. 20б). Достоверное падение амплитуды мПКП до 0.55 ± 0.04 мВ ($n = 30, p < 0.05$) наблюдалось при использовании никотина в концентрации 50 мкМ (рис. 20б).

В отличие от действия холиномиметика на амплитуду мПКП, эффект никотина на частоту спонтанных сигналов начинал проявляться при использовании на порядок более низкой концентрации. Так, среднее значение частоты мПКП при аппликации 0.1 и 1 мкМ никотина составило 1.64 ± 0.15 Гц ($n = 30, p > 0.05$) и 1.22 ± 0.12 Гц ($n = 30, p > 0.05$), соответственно, и не отличалось от контрольного значения, полученного в отсутствии агониста холинорецепторов (1.57 ± 0.14 Гц; $n = 30$; рис. 20в). При добавлении 5 мкМ агониста частота снижалась до 1.07 ± 0.08 Гц ($n = 30, p < 0.05$) и данный угнетающий эффект никотина усиливался с увеличением концентрации (0.98

± 0.07 Гц, $n = 30, p < 0.05$, для 10 мкМ; 0.57 ± 0.06 Гц, $n = 30, p < 0.05$, для 50 мкМ; рис. 20в).

Амплитуда ПКП, отражающая уровень вызванной квантовой секреции АХ и зависящая от изменений чувствительности постсинаптической мембраны в области нервно-мышечного контакта, в контроле составила 32.8 ± 1.02 мВ ($n = 30$). Аппликация никотина в концентрациях 0.1 мкМ, 1 и 5 мкМ не изменяла среднюю амплитуду ПКП, которая составила 31.93 ± 1.21 мВ ($n = 30, p > 0.05$), 32.43 ± 1.11 мВ ($n = 30, p > 0.05$) и 32.33 ± 1.18 мВ ($n = 30, p > 0.05$), соответственно (рис. 20г). Добавление никотина приводило к снижению ПКП, начиная с концентрации 10 мкМ (28.36 ± 1.27 мВ, $n = 30, p < 0.05$); при 50 мкМ агониста холинорецепторов амплитуда падала почти в 2 раза и составила 16.89 ± 1.09 мВ ($n = 30, p < 0.05$; рис. 20г).

Таким образом, результаты настоящего исследования демонстрируют, что в нервно-мышечном препарате *m.LAL* мышцы никотин в концентрациях до 1 мкМ не оказывает никакого влияния ни на процессы выделения АХ из нервной терминали, ни на процессы его рецепции на постсинаптической мембране. В концентрации 5 мкМ начинает проявляться пресинаптическое влияние никотина (угнетение процесса спонтанной секреции АХ вследствие активации пресинаптических холинорецепторов). Повышение концентрации до 10 мкМ усиливало пресинаптическое действие алкалоида (подавление не только спонтанного, но и вызванного выделения АХ) и приводило к появлению слабого постсинаптического влияния (снижение МПП вследствие активации постсинаптических холинорецепторов). При повышении концентрации никотина до 50 мкМ наблюдались уже драматические изменения во всех регистрируемых нами параметрах нейротрансмиссии.

Таким образом, никотин в концентрации 10 мкМ уже оказывает как постсинаптическое, так и пресинаптическое угнетающее влияние на функционирование нервно-мышечного синапса, которое, в частности, заключается в снижении количества квантов АХ, выделившегося в ответ на ПД. Подобный уровень падения квантового состава при активации

холинорецепторов был отмечен неоднократно и ранее (Van der Kloot, 1993; Tian et al., 1994; Prior and Singh, 2000; Balezina et al., 2006; Khaziev et al., 2016) однако эти результаты были получены на других препаратах и в условиях изначально сниженного квантового состава, либо на «рассеченном» препарате. Исходя из вышесказанного в дальнейшем исследовании мы применяли холиномиметик в концентрации 10 мкМ.

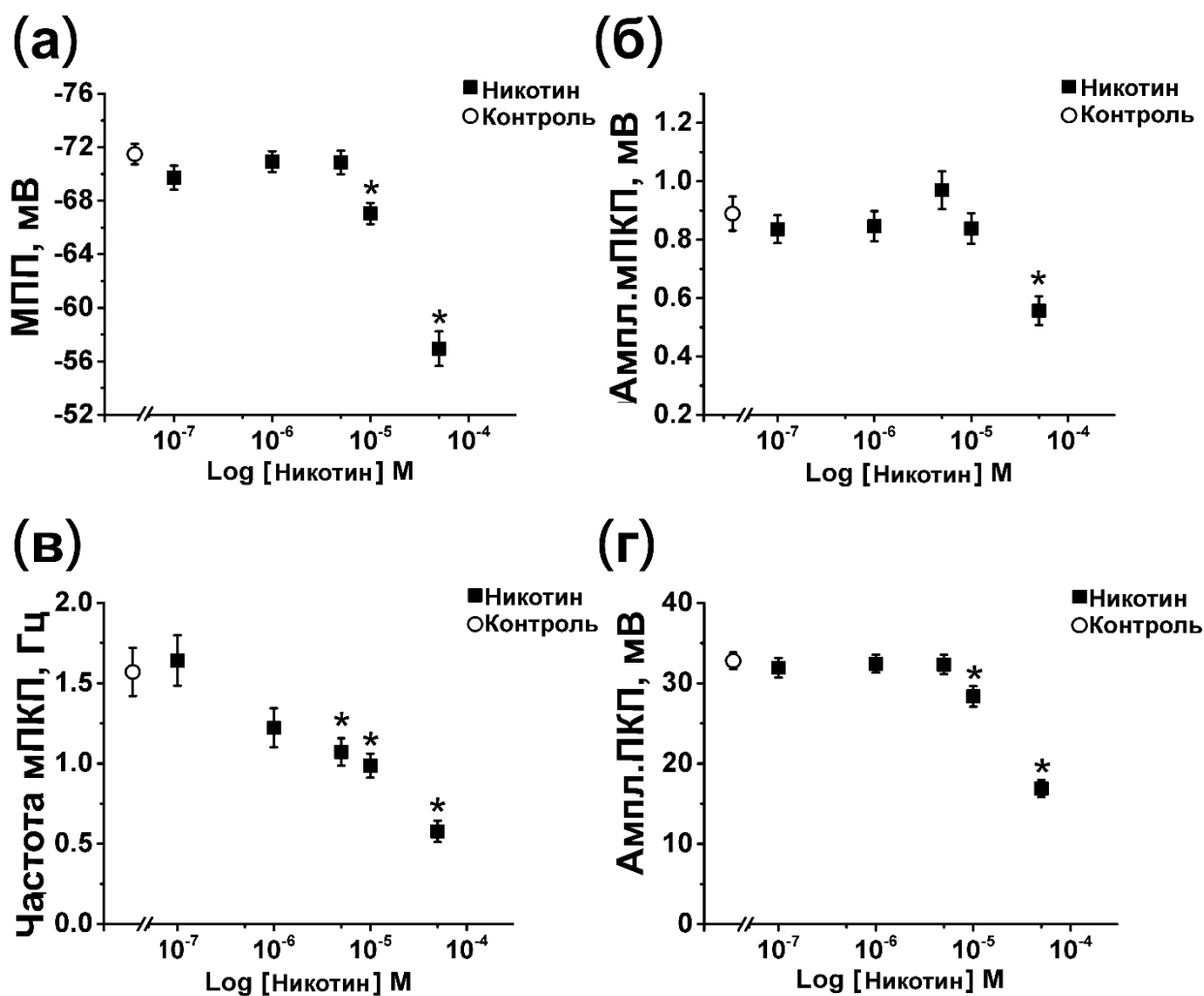


Рис. 20. Эффекты никотина на электрофизиологические параметры, зарегистрированные на нервно-мышечном препарате. Представлены абсолютные значения (а) мембранного потенциала покоя (МПП) мышечных волокон, (б) амплитуды мПКП, (в) частоты мПКП и (г) амплитуды вызванных ПКП в контроле и через 15 минут после аппликации никотина (0.1 до 50 мкМ). Звездочка указывает $P < 0.05$, достоверный эффект никотина попарно-связанный тест one-way ANOVA тест с критерием Даннета.

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

Активация никотиновых рецепторов никотином в концентрации 10мкМ, действительно, приводила к угнетению выброса нейромедиатора $12.0 \pm 4.4\%$ ($n = 7, p < 0.05$, рис.21), по сравнению с контрольными условиями.

Данные об активации никотиновых рецепторов, полученные электрофизиологическим методом, полностью коррелируют с результатами, полученными другими исследователями (Prior and Singh, 2000) . Поскольку процесс вызванного освобождения нейромедиатора запускается входом ионов кальция в нервное окончание (Katz В., 1969; Crawford, 1974), то было высказано предположение, что никотин-индуцированное уменьшение квантового состава может быть связано со снижением входа Ca^{2+} , как это было показано на синапсах холоднокровных (Khaziev et al., 2016).

Но аппликация никотина приводила не к снижению, как ожидалось, а к увеличению амплитуды кальциевого транзientа на $13.7 \pm 4.3\%$ ($n = 8, p < 0.05$; рис. 21).

Таким образом, в присутствии агониста никотиновых рецепторов пресинаптический уровень кальция в ответ на раздражение нерва возрастает сильнее, чем при его отсутствии. Действительно ли это увеличение связано с активацией пресинаптических nXP и приводит к снижению последующих квантов АХ? Для ответа на этот вопрос были проведены следующая серия экспериментов.

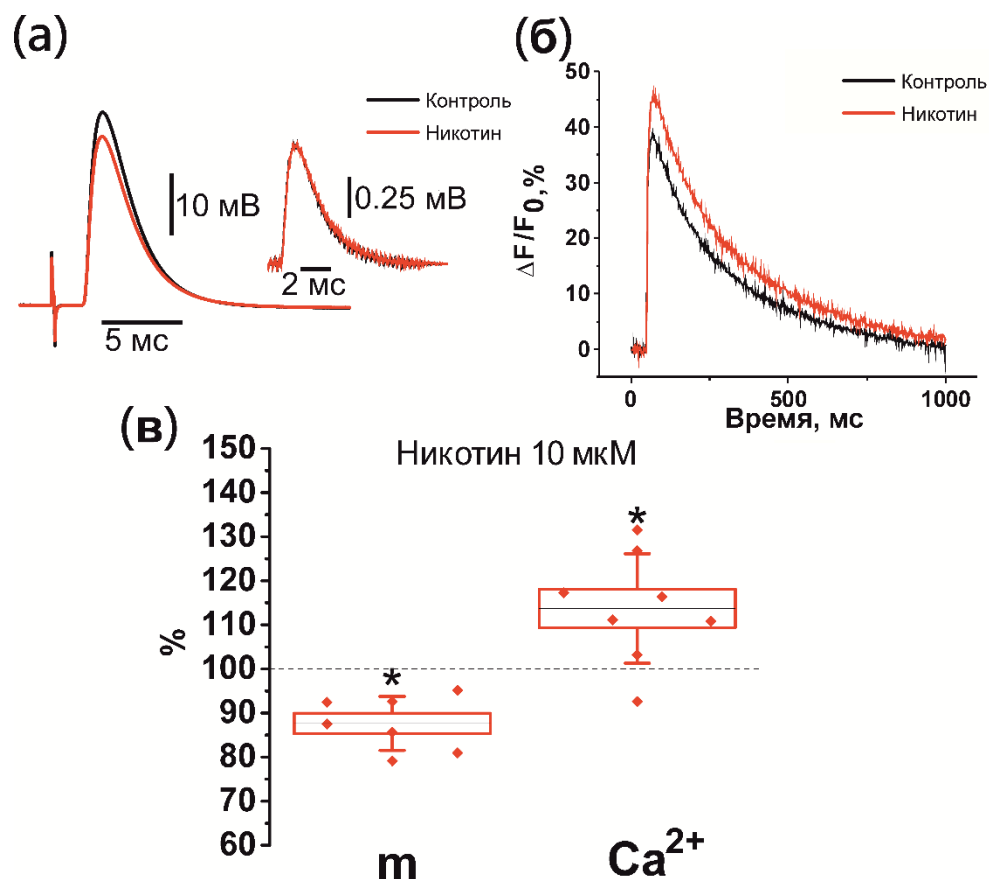


Рис. 21 Эффекты активации никотиновых рецепторов на квантовый состав и амплитуду кальциевого транзientа: а) репрезентативные сигналы вызванных ПКП и мПКП в контроле и после аппликации никотина 10 μM б) репрезентативные сигналы кальциевых транзientов в контроле и после аппликации никотина 10 μM в) СРЗНАЧ \pm ошибка среднего и СКО квантового состава (m) и амплитуд кальциевых сигналов (Ca^{2+}), полученные в вышеуказанных сериях и выраженные в процентах от контроля. Звёздочкой (*) отмечены достоверные изменения ($p < 0,05$; попарно-связанный t-критерий Стьюдента).

Наибольшим представительством в мозге обладают $\beta 2$ -содержащие субъединицу nXP, и согласно исследованиям эти рецепторы располагаются на пресинаптической части (Karadsheh et al., 2004). Следовательно, можно предположить, что в нервно-мышечном синапсе мы имеем дело с нейрональными холинорецепторами содержащими $\beta 2$ субъединицу. Существуют данные о том, что антагонист ДН β Е в концентрации 1 мкМ блокирует мышечные рецепторы $\alpha 4\beta 2$ почти полностью, тогда как на функционировании рецепторов субъединичного состава $\alpha 3\beta 4$ никакого эффекта антагонист ещё не оказывает (Parke et al., 2010).

Добавление блокатора холинорецепторов нейронального типа, ДН β Е, приводило к уменьшению кальциевого транзientа на $12.9 \pm 1.5\%$ ($n = 15$; $p < 0.05$, рис. 22). Однако на фоне действия этого антагониста, усиливающий кальциевый сигнал эффект никотина полностью отсутствовал ($100.0 \pm 0.8\%$; $n = 15$; $p < 0.05$, рис. 22). Следовательно, наблюдаемое увеличение внутриклеточного содержания кальция, в случае применения никотина, ассоциировано с активацией нейрональных холинорецепторов.

При блокаде nXP содержащих $\beta 2$ субъединицу, при помощи блокатора ДН β Е квантовый состав не изменялся $99.2 \pm 2.4\%$ ($n = 11$, $p > 0.05$; рис. 22), однако эффекты никотина при их блокаде полностью снимались $97.4 \pm 4.1\%$ ($n = 10$, $p > 0.05$; рис. 22). Отсутствие эффекта блокатора на квантовый выброс может свидетельствовать о том, что эндогенная активация данного подтипа никотиновых рецепторов ацетилхолином не вносит достоверных изменений в процесс нейросекреции. Однако, тот факт, что никотин не влияет на квантовый выброс указывает на то, что его эффекты в нормальных условиях опосредуются именно пресинаптическими никотиновыми холинергическими рецепторами нейронального типа содержащих $\beta 2$ субъединицу.

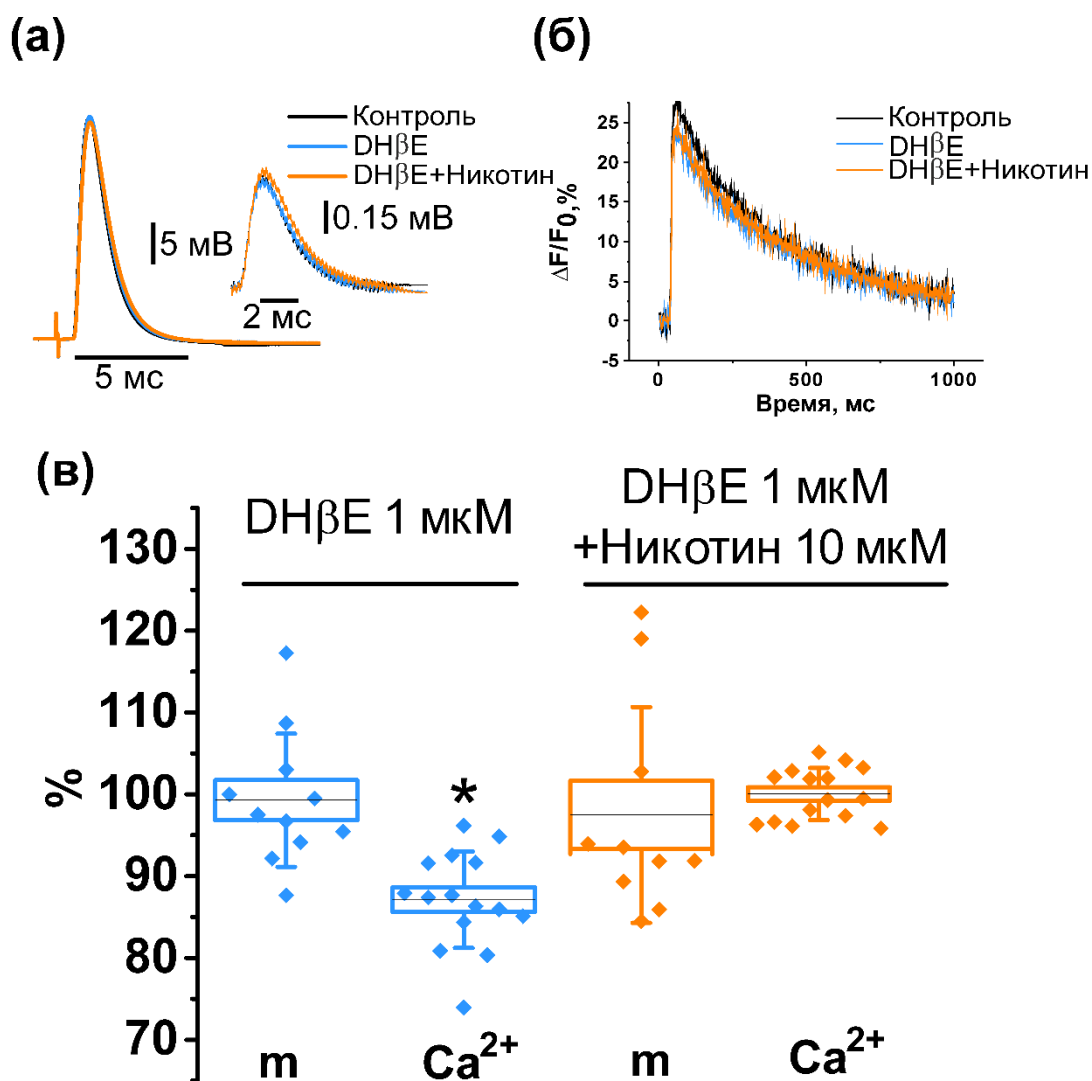


Рис. 22. Эффекты блокады $\beta 2$ -содержащих субъединицу никотиновых рецепторов на квантовый состав и амплитуду кальциевого транзientа: а) репрезентативные сигналы вызванных ПКП и мПКП в контроле и после аппликации DH β E 1 мкМ. б) репрезентативные сигналы кальциевых транзientов в контроле и после аппликации DH β E 1 мкМ, 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 и после антагониста. Звездочкой (*) отмечены достоверные изменения ($p < 0,05$; попарно-связанный one-way ANOVA тест с критерием Тьюки).

3.6.3 Нейрональные никотиновые рецепторы изменяют уровень кальция в пресинаптических окончаниях, открывая кальциевые каналы L-типа

Основным источником повышения пресинаптического уровня кальция при активации пресинаптических холинорецепторов могут быть потенциал-чувствительные кальциевые каналы (Khaziev et al., 2016). Для установления источника повышения кальциевого сигнала при активации пресинаптических холинорецепторов в первую очередь 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 транзientа на $54.5 \pm 2.7\%$ ($n = 9$, $p < 0.05$; рис. 23). При этом эффект никотина на изменение уровня кальция полностью отсутствовал ($94.0 \pm 5.1\%$; $n = 9$, $p > 0.05$; рис. 23). Следовательно, регистрируемое повышение пресинаптического уровня кальция при активации нейрональных никотиновых рецепторов может быть опосредовано воздействием на потенциал-чувствительные кальциевые каналы.

В связи с этим, далее проводили эксперименты с целью установить какой именно тип потенциал-чувствительных кальциевых каналов способен участвовать в никотин-индуцированном повышении уровня кальция.

На фоне частичной блокады основного типа Ca_v – P/ Q-типа, при помощи ω -агатоксина в концентрации 40 нМ, аппликация никотина (10 мкМ) приводила к повышению амплитуды кальциевого транзientа на $29.9 \pm 3.8\%$ ($n = 7$, $p < 0.05$; рис. 23). Следовательно, эффект активации пресинаптических никотиновых рецепторов на уровень внутриклеточного кальция реализуется не через каналы P/ Q-типа.

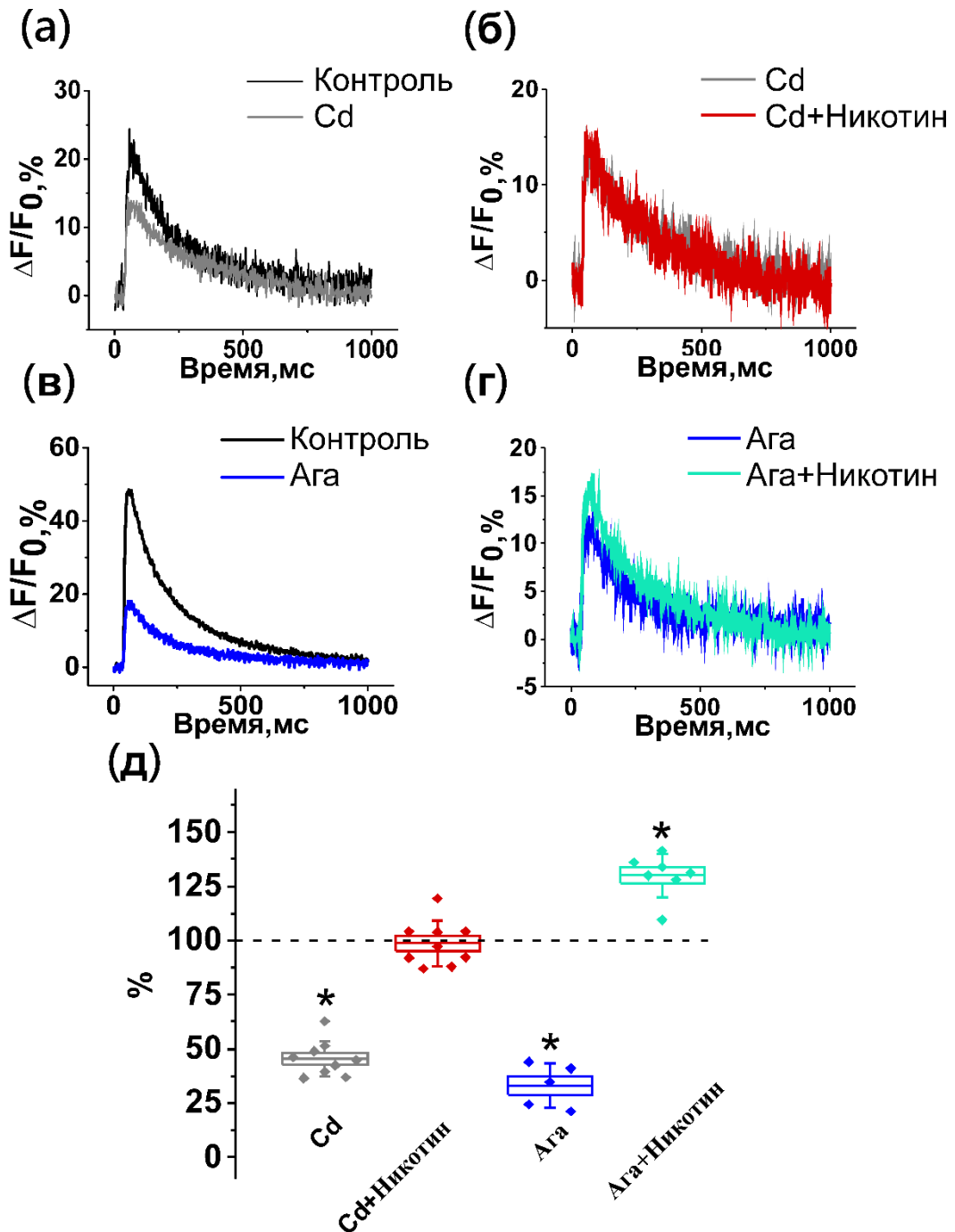


Рис. 23. Усиливающий кальциевый транзистент эффект никотина отсутствует на фоне неспецифической блокады кальциевых каналов, но остается без изменений при значительной инактивации кальциевых каналов P/Q-типа. Верхние панели представляют репрезентативные сигналы кальциевого транзистента в отдельно взятых экспериментах: (а) влияние неспецифического блокатора кальциевых каналов CdCl_2 (10 мкМ); (б)

отсутствие влияния никотина (10 мкМ) после предварительной аппликации CdCl₂; (в) влияние блокатора потенциал-чувствительных кальциевых каналов P/Q-типа ω-агатоксина (Ага, 40 нМ) и (г) наличие эффекта никотина (10 мкМ) на кальциевый транзиент после предварительной аппликации типа ω-агатоксина (Ага). (д) СРЗНАЧ ± ошибка среднего и СКО амплитуды кальциевого сигнала, полученные в вышеперечисленных сериях и выраженные в процентах от контроля или от значения после аппликации антагониста. Звёздочкой (*) отмечены достоверные изменения (p < 0,05; попарно-связанный one-way ANOVA тест с критерием Тьюки).

Поскольку ранее в ходе исследования было установлено, что кальциевые каналы L-типа участвуют в формировании амплитуды кальциевого транзиента, то было выдвинуто предположение о наличии функционального взаимодействия между нХР нейронального типа и L-типа кальциевых каналов. 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 ± 1.5% (n = 9, p > 0.05) и 100.7 ± 1.2% (n = 17, p > 0.05), соответственно (рис.24). Эти данные позволяют заключить, что повышение уровня кальция в нервном окончании при активации нейрональных холинорецепторов экзогенным агонистом обусловлено участием Ca_v L-типа. Следовательно, и обнаруженный в ходе настоящего исследования феномен эндогенной активации пресинаптических холинорецепторов также должен реализовываться при участии кальциевых каналов данного типа. И действительно, снижающий кальциевый транзиент эффект ДНВЕ на фоне заблокированных каналов L-типа нитрендипином полностью отсутствовал (100.0 ± 0.8%; n = 10, p > 0.05; рис.24).

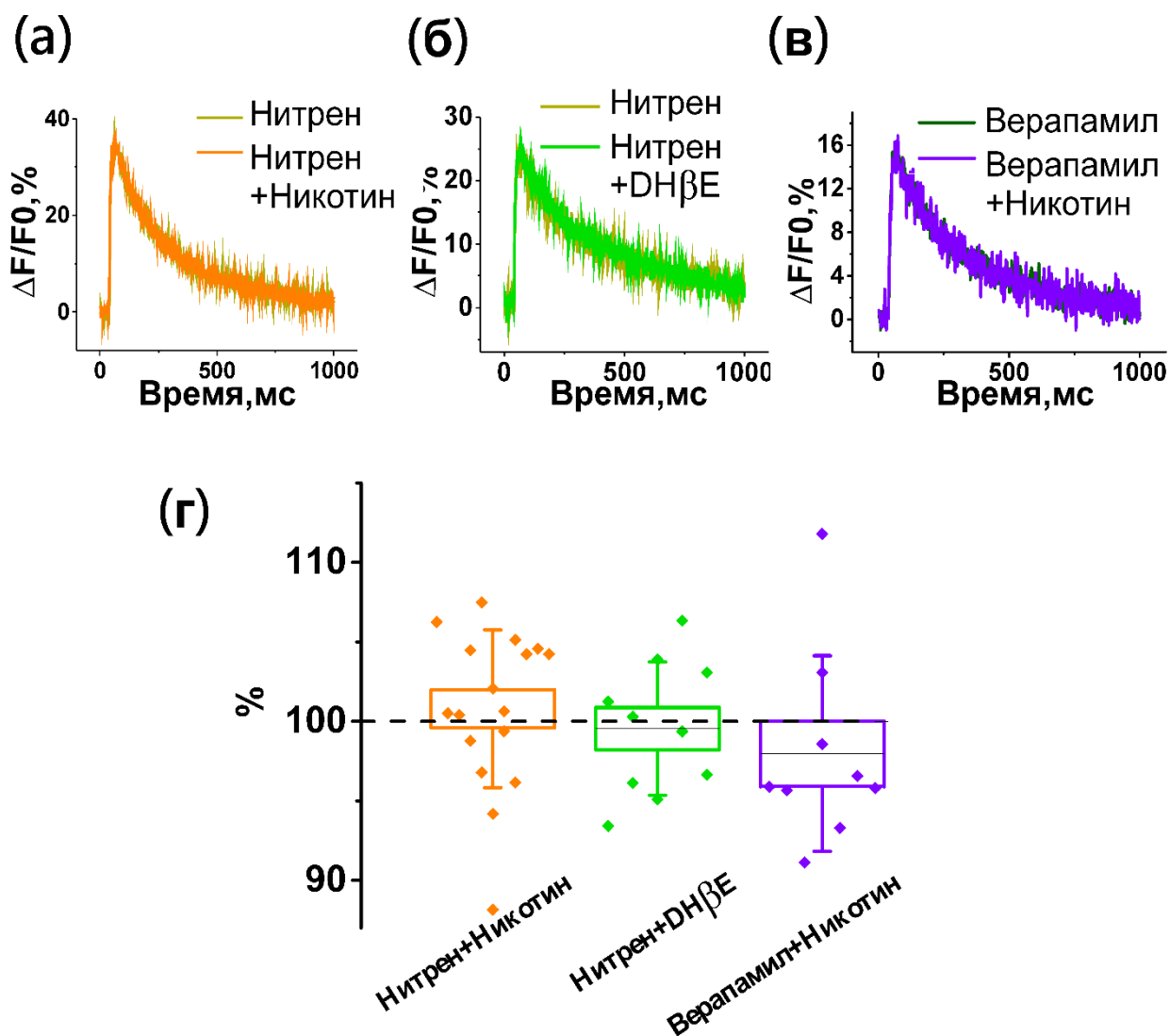


Рис. 24. Отсутствие эффекта никотина (повышение амплитуды кальциевого транзientа) и ДН β Е (снижение амплитуды кальциевого транзientа) на фоне блокады L-типа каналов. Верхние панели представляют репрезентативные сигналы кальциевого транзientа в отдельно взятых экспериментах: (а) отсутствие влияния никотина после предварительной аппликации нитрендипина (Нитрен); (б) отсутствие влияния ДН β Е (1 мкМ) после предварительной аппликации нитрендипина; (в) отсутствие влияния никотина после предварительной аппликации верапамила. (г) СРЗНАЧ \pm ошибка среднего и СКО амплитуды кальциевого сигнала, полученные в вышеперечисленных сериях и выраженные в процентах от значения после

аппликации блокатора. Звёздочкой (*) отмечены достоверные изменения ($p < 0,05$; попарно-связанный one-way ANOVA тест с критерием Тьюки).

Таким образом, полученные результаты позволяют заключить, что активация нейрональных никотиновых холинергических рецепторов приводит к дополнительному увеличению входа ионов кальция в клетку через Ca_v L-типа. Однако, возникает вопрос – какой механизм лежит в основе этого взаимодействия?

Нейрональные никотиновые рецепторы обладают хорошей проницаемостью для ионов кальция (Gotti & Clementi, 2004), которая не отражается на кальциевом транзiente напрямую. Однако, этот кальций, может приводить к следующим возможным вариантам, вследствие чего мы наблюдаем увеличение амплитуды кальциевого транзientа: 1) запускается процесс CDF (calcium dependent facilitation) L-типа кальциевых каналов (Kim et al., 2008); 2) нарушается процесс CDI (calcium dependent inactivation) L-типа кальциевых каналов, опосредованный взаимодействием между Ca_M и Ca_V , за счет повышения активности $CaMKII$ (Abiria & Colbran, 2010; Hofmann et al., 2014). Однако, согласно данным (Prior & Singh, 2000), снижение квантового высвобождения, вызванного активацией пресинаптических nXP, не связано с Ca_M и 3) активация nXP может вызывать небольшую локальную деполяризацию НО, в результате чего снижается порог активации L-типа каналов.

Наличие функциональной связи никотиновых холинорецепторов L-типа каналов было продемонстрировано на первичных культурах нейронов головного мозга мыши (Katsura et al., 2002). Необходимо отметить, что в данной работе выявлено взаимодействие кальциевых каналов именно с $\alpha 4\beta 2$ nXP. Вероятно, подобная картина наблюдается и в двигательной нервной терминали. При этом, авторы полагают, что активация пресинаптических никотиновых рецепторов приводит к деполяризации, достаточной для

открытия кальциевых каналов L-типа и входу кальция внутрь нейрона (Katsura et al., 2002).

Важно также упомянуть об имеющихся литературных данных, свидетельствующих о том, что классы блокаторов L-типа каналов фенилалкиламиновые (верапамил) и дигидропиридиновые (нитрендипин) и бензотиазепиновые способны блокировать нейрональные нХР (Edeson et al., 1988; Houlihan et al., 2000; Wheeler et al., 2006). В связи с этим, отсутствие эффектов никотина после аппликации верапамила и нитрендипина можно связать с блокадой нейрональных холинорецепторов, чувствительных к ДНβЕ и способных пропускать ионы кальция. Действительно, и ДНβЕ, и верапамил, и нитрендипин, все приводят к снижению транзientа. При этом, на фоне всех трёх фармакологических агентов пропадает эффект никотина.

Но, даже если и имеет место блокада верапамиллом и нитрендипином нейрональных нХР, то отсутствие эффекта никотина на кальциевый транзient при аппликации кадмия, который не влияет на функционирование нейрональных нХР (в том числе $\alpha 4\beta 2$ нХР) или даже потенцирует их (Hsiao et al., 2001; Wheeler et al., 2006; Garduño et al., 2012), свидетельствует о том, что в нашем случае имеет место фармакологическое воздействие на две различные мишени. Кроме того, в качестве дополнительного доказательства наличия функциональной связи между нейрональными нХР и Cav L-типа была проведена серия экспериментов, в которой оценивались эффекты никотина на фоне активированных L-тип каналов, где в качестве агониста применялся (\pm)-Bay K 8644 в концентрации 5 мкМ. По результатам исследования было показано, что активация каналов L-типа вызывает увеличение амплитуды кальциевого транзientа на $20.6 \pm 5.0\%$ ($n = 8$, $p < 0.05$; рис. 25), а последующая аппликация никотина не приводила к каким-либо ее изменениям ($101.5 \pm 1.3\%$; $n = 8$, $p < 0.05$; рис. 25). Следовательно, в условиях, когда каналы L-типа активированы, активация нейрональных нХР не может приводить к

дополнительному входу Ca^{2+} через этот тип потенциал-чувствительных кальциевых каналов.

На основании данных, указывающих на способность никотиновых рецепторов нейронального типа усиливать вход Ca^{2+} через каналы L-типа, было выдвинуто предположение, что следствием именно этого феномена является снижение квантового состава при активации данного типа холинорецепторов. Таким образом, следует ожидать, что блокада Ca_v L-типа устранил никотин-индуцированное снижение количества выделяемых квантов АХ. Проверка этого предположения стала целью следующего этапа исследования.

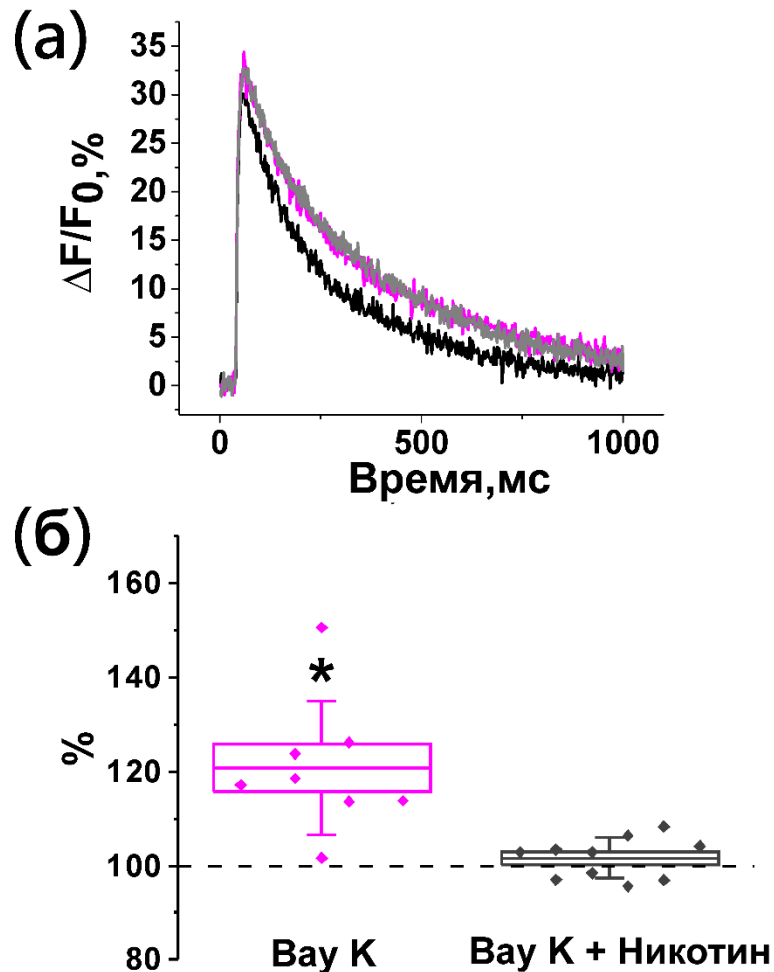


Рис. 25. Увеличение амплитуды кальциевого транзientа после аппликации (\pm)-Bay K 8644, а эффекты никотина (повышение амплитуды кальциевого транзientа) устраниются на фоне активации L-типа каналов.

Верхние панели представляют репрезентативные сигналы кальциевого транзientа в отдельно взятом эксперименте: (а) увеличение амплитуды кальциевого транзientа на фоне применения (\pm)-Bay K 8644 (Bay K) и отсутствие влияния никотина после предварительной аппликации Bay K; (б) СРЗНАЧ \pm ошибка среднего и СКО амплитуды кальциевого сигнала, полученные в вышеперечисленных сериях и выраженные в процентах от значения после аппликации блокатора. Звёздочкой (*) отмечены достоверные изменения ($p < 0,05$; попарно-связанный one-way ANOVA тест с критерием Тьюки).

3.6.4 Никотин-индуцированное снижение высвобождения ацетилхолина опосредовано кальциевыми каналами L-типа

Для оценки возможной роли кальциевых каналов L-типа в реализации механизма никотин-индуцированного снижения вызванного выделения АХ использовали верапамил и нитрендипин в тех же концентрациях, что и в экспериментах по регистрации кальциевого транзientа. Аппликация никотина на фоне заблокированных каналов L-типа не вызывала 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. 26).

Таким образом, действительно никотин-зависимое уменьшение квантового выброса нейромедиатора связано с модуляцией работы Cav L-типа.

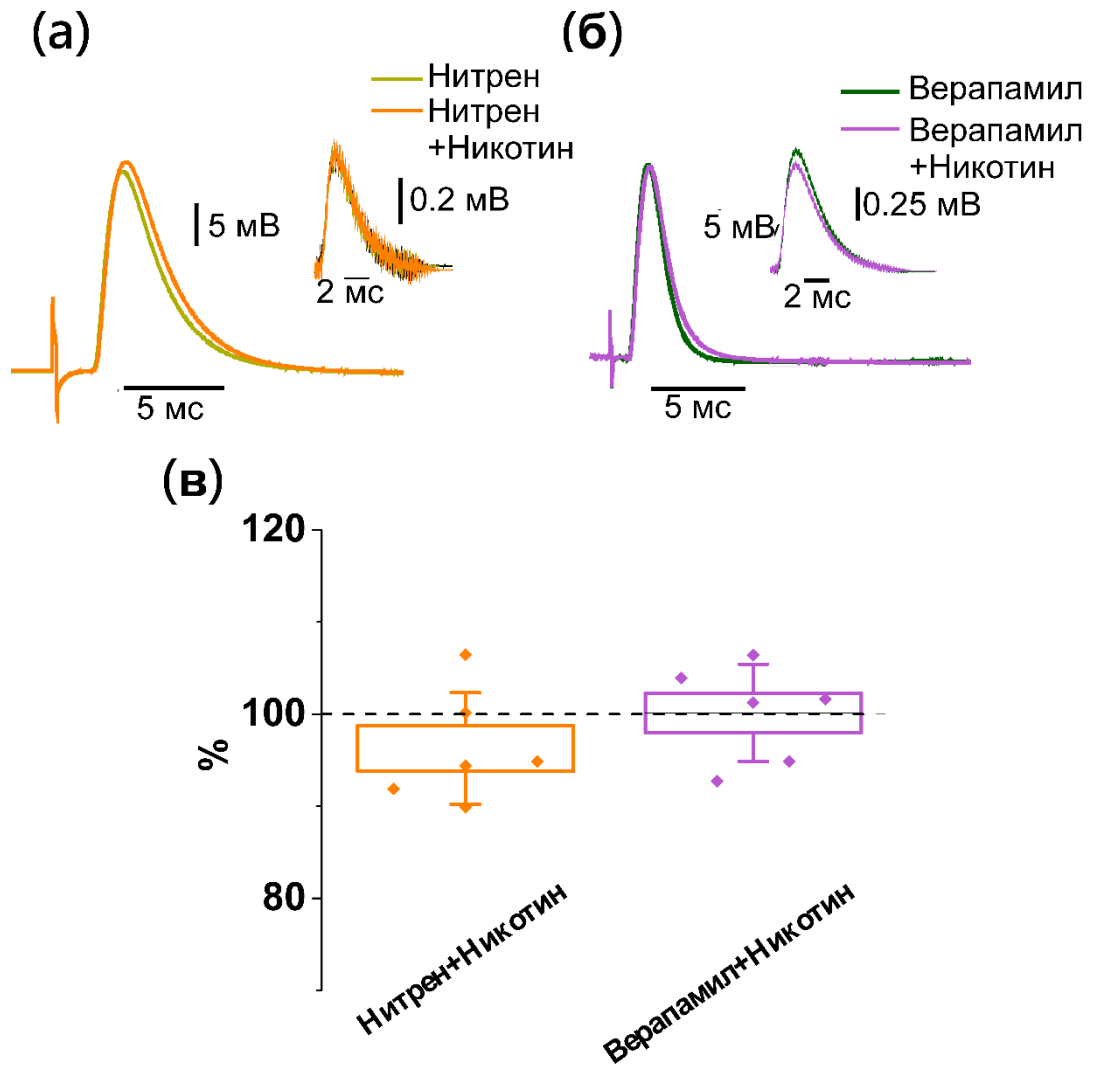


Рис.26. В механизме никотин-индуцированного снижения выделения квантов АХ (квантовый состав) задействованы L-тип кальциевые каналы. На панели сверху представлены репрезентативные сигналы ПКП и мПКП в отдельно взятых экспериментах: (а и б) отсутствие влияния никотина после предварительной аппликации блокаторов потенциал-чувствительных L-тип кальциевых каналов нитрендипина (Нитрен, 25 мкМ) и верапамила (50 мкМ); в) SRЗНАЧ ± ошибка среднего и СКО амплитуды кальциевого сигнала, полученные в вышеперечисленных сериях и выраженные в процентах от значения после аппликации блокатора. Звёздочкой (*) отмечены достоверные изменения ($p < 0,05$; попарно-связанный one-way ANOVA тест с критерием Тьюки).

3.6.5 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). Чтобы изучить потенциально возможное участие этого канала в никотин-индуцированном снижении высвобождения АХ из двигательного нервного окончания, были проведены эксперименты с блокатором K_{Ca} апаминном.

Применение этого блокатора только к Ca^{2+} -активируемым калиевым каналам малой проводимости в концентрации 100 нМ не изменяло квантовый состав ПКП ($95.9 \pm 1.8\%$; $n = 6$, $p > 0.05$; рис. 27). В присутствии апамина влияние никотина на квантовый состав сохранялось ($10.5 \pm 1.4\%$; $n = 6$, $p < 0.05$; рис. 27). Следовательно, эффект активации нейрональных никотиновых рецепторов на квантовое высвобождение АХ опосредуется каналами L-типа и не связан с апамин-чувствительными каналами K_{Ca} .

Поскольку кальцинейрин может ингибировать активность аденилатциклазы, которая положительно влияет на освобождение нейромедиатора (Antoni et al., 1998), то было высказано предположение о том, что никотин-индуцированное усиление входа кальция через каналы L-типа приводит к активации этой цепочки и как следствие снижение количества выброшенных квантов нейромедиатора. Для проверки данного предположения применялся блокатор кальцинейрина циклоспорин А в концентрации 10 мкМ, в результате чего, не наблюдалось изменений квантового состава ($97.5 \pm 2.9\%$; $n = 7$, $p > 0.05$; рис. 28), однако никотин на фоне его действия продолжал снижать количество выделяемых квантов АХ на $9 \pm 2.9\%$ ($n = 8$, $p < 0.05$; рис. 28).

Таким образом, на основании проведенного исследования можно заключить, что в условиях активации нейрональных никотиновых рецепторов вход кальция, опосредованный каналами Ca_v L-типа, приводит к снижению

квантового высвобождения АХ за счет механизмов, не связанных с кальцинеирином. На двигательных синапсах новорожденных мышей было показано, что вход Ca^{2+} через каналы L-типа может приводить к активации коклюш-токсин чувствительных G-белков, в результате чего наблюдается уменьшение количества высвобождаемых квантов (Sugiura and Ko, 1997). Можно сделать предположение, что вполне возможно этот механизм лежит в основе никотин-индуцированного механизма угнетения квантового освобождения АХ.

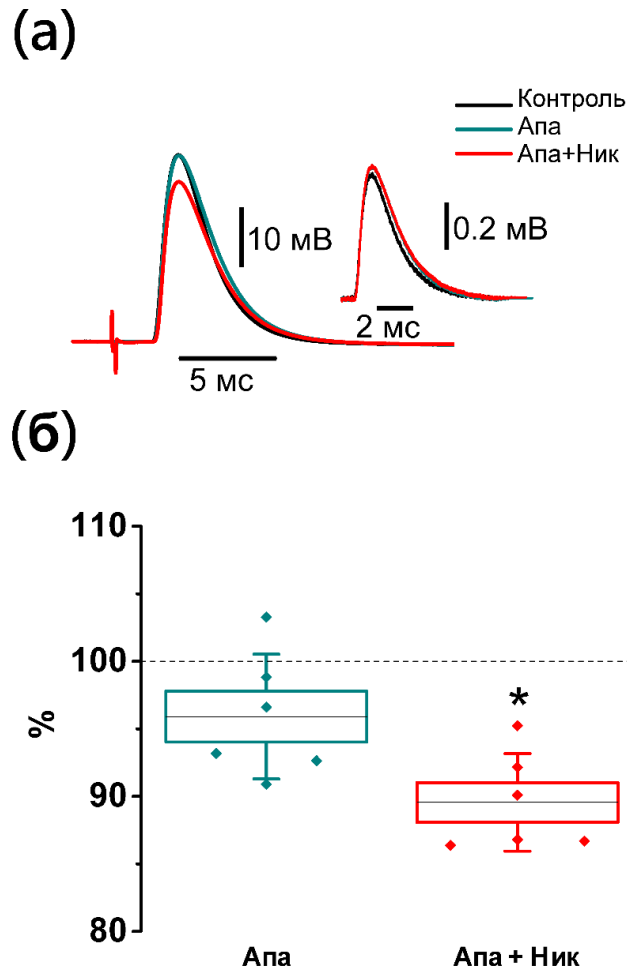


Рис. 27. Вызванное никотином снижение высвобождения АХ (квантового состава) наблюдается в присутствии апамина (Апа) – блокатора Ca^{2+} -активируемых K^{+} -каналов малой проводимости. На панели сверху представлены репрезентативные сигналы ПКП и мПКП в отдельно взятом эксперименте (а) применение апамина (100 нМ) и с применением никотина (Ник, 10 мкМ) после предварительной обработки апамином; (б) СРЗНАЧ \pm ошибка среднего и СКО амплитуды кальциевого сигнала, полученные в вышеперечисленных сериях и выраженные в процентах от значения после аппликации блокатора. Звёздочкой (*) отмечены достоверные изменения ($p < 0.05$; попарно-связанный one-way ANOVA тест с критерием Тьюки).

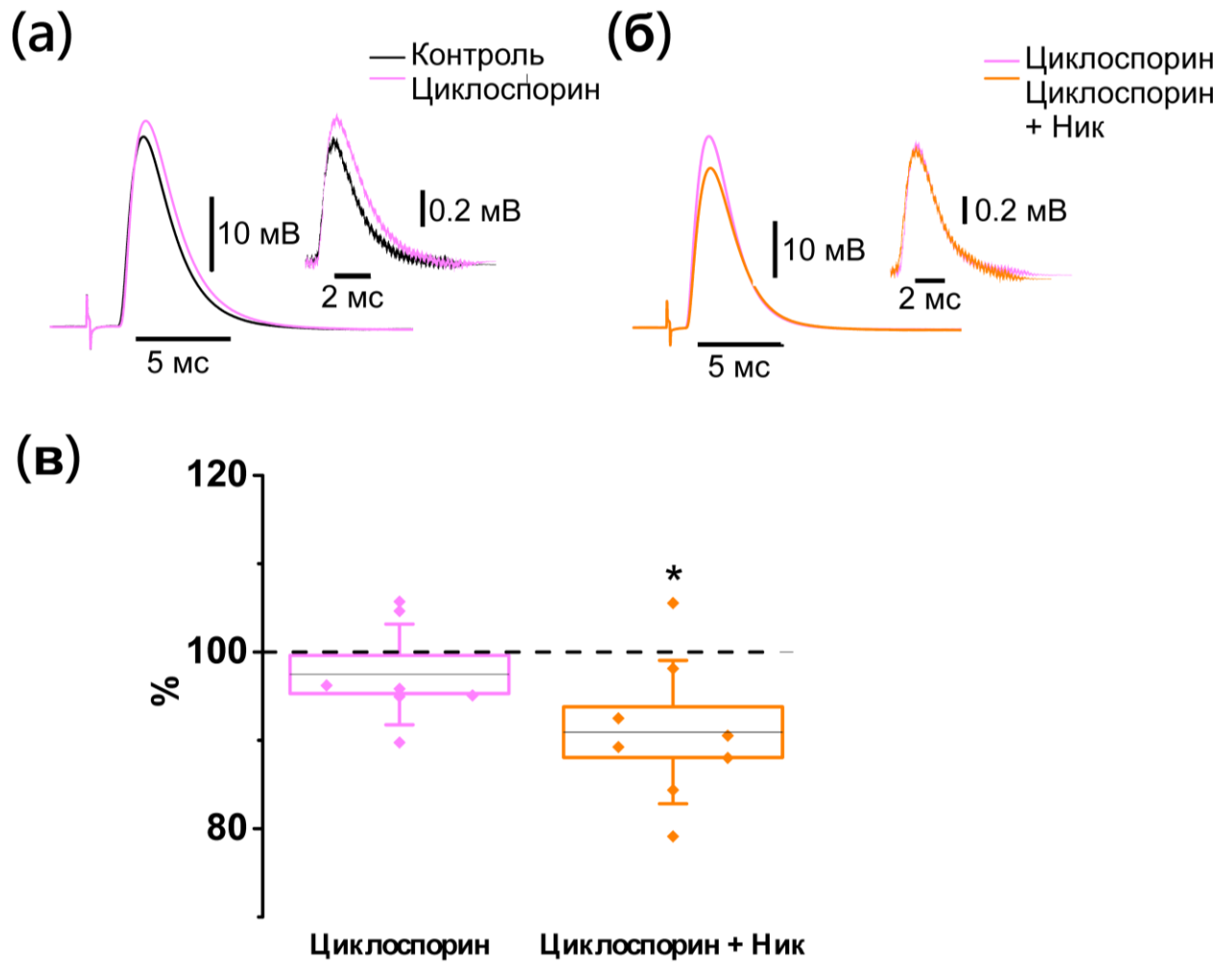


Рис. 28. Вызванное никотином снижение высвобождения АХ (квантового содержания) наблюдается в присутствии циклоспорина А (Циклоспорин) – блокатора кальцинеина. На панели сверху представлены репрезентативные сигналы ПКП и мПКП в отдельно взятом эксперименте (а) применение циклоспорина (10 мкМ) и с применением никотина (Ник, 10 мкМ) после предварительной обработки циклоспорином; (б) СРЗНАЧ ± ошибка среднего и СКО амплитуды кальциевого сигнала, полученные в вышеперечисленных сериях и выраженные в процентах от значения после аппликации блокатора. Звёздочкой (*) отмечены достоверные изменения ($p < 0,05$; попарно-связанный one-way ANOVA тест с критерием Тьюки).

3.7 Роль мускариновых рецепторов в регуляции пресинаптического уровня кальция и выделения нейромедиатора

Наряду с активацией пресинаптических ионотропных никотиновых рецепторов ацетилхолин, выделяющийся в синаптическую щель, активирует и метаботропные мускариновые рецепторы. Их активация может приводить к изменению интенсивности кальций-зависимого квантового выделения ацетилхолина (Slutsky et al., 1999; Santafé et al., 2004, 2007). Целью следующего этапа исследования стало показать, как изменяется квантовый выброс нейромедиатора и вход кальция в двигательное нервное окончание мышцы, при активации мускариновых рецепторов.

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

В качестве агониста мускариновых рецепторов применялся мускарин. Его аппликация в концентрации 10 мкМ, приводила к достоверному уменьшению количества выбрасываемых квантов выброса нейромедиатора $4.7 \pm 2.7\%$ ($n=8$, $p<0.05$, рис. 29), а частота мПКП не изменялась $13.6 \pm 6\%$ ($n=8$, $p<0.05$). Однако, кальциевый транзиент после аппликации мускарина 10мкМ уменьшался на $18.5 \pm 2.9\%$ ($n=13$, $p<0.05$, рис. 29). Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что при активации пресинаптических мускариновых холинорецепторов уменьшается поступление ионов кальция в нервную терминаль и снижается количество выделяемого ацетилхолина. В результате применения неселективного блокатора мускариновых рецепторов атропина 10 мкМ, наблюдалось увеличение количества выброшенных квантов медиатора на $45.94 \pm 2.83\%$ ($n=8$, $p<0.05$, рис. 30). Амплитуда кальциевого транзиента так же претерпевала рост на $20.0 \pm 2.3\%$ ($n=27$, $p<0.05$, рис. 31) в результате применения атропина 10 мкМ. Эффект мускарина, снижающий амплитуду кальциевого транзиента, в условиях, заблокированных мускариновых рецепторов, полностью отсутствовал.

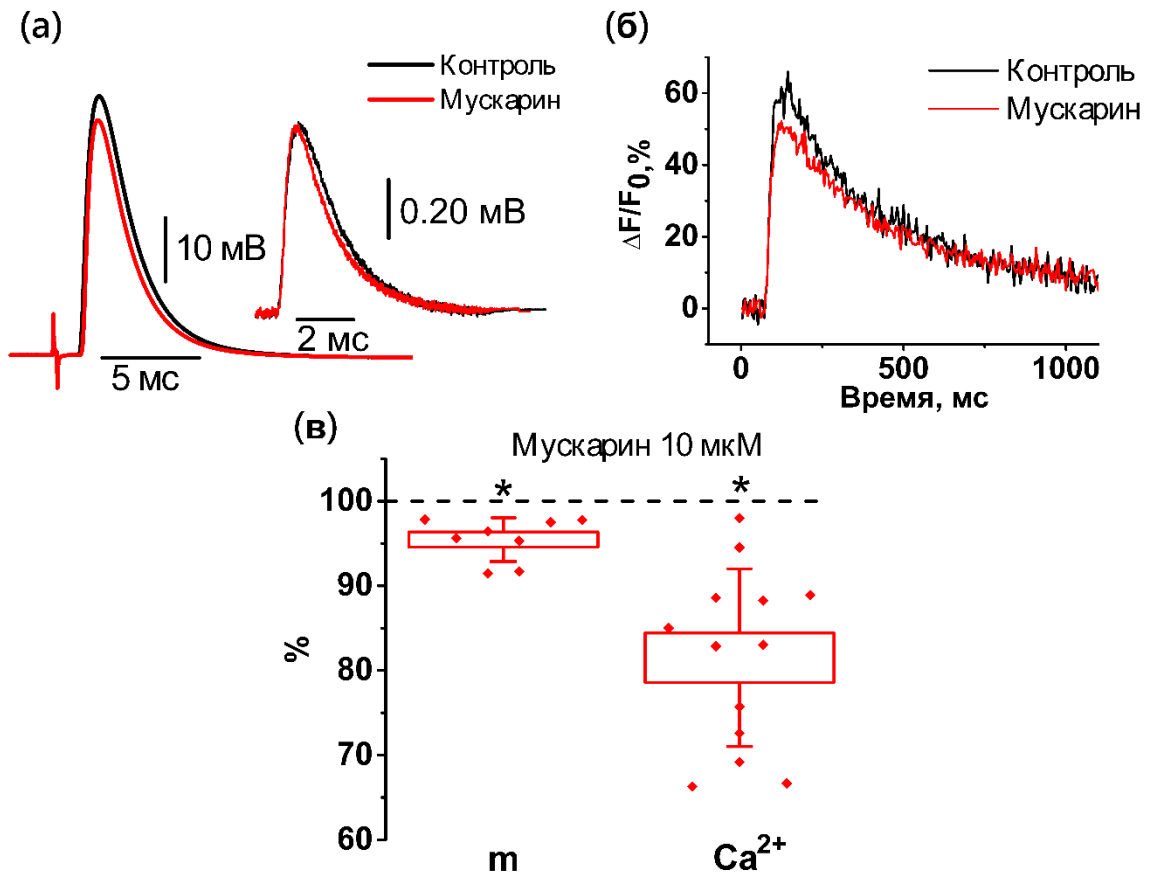


Рис. 29. Эффекты активации мускариновых рецепторов на квантовый состав и амплитуду кальциевого транзientа: а) репрезентативные сигналы вызванных ПКП и мПКП в контроле и после аппликации мускарина 10 мкМ б) репрезентативные сигналы кальциевых транзientов в контроле и после аппликации мускарина 10 мкМ в) СРЗНАЧ \pm ошибка среднего и СКО квантового состава (m) и амплитуда кальциевых сигналов (Ca^{2+}), полученные в вышеуказанных сериях и выраженные в процентах от контроля. Звёздочкой (*) отмечены достоверные изменения ($p < 0.05$; попарно-связанный t-критерий Стьюдента).

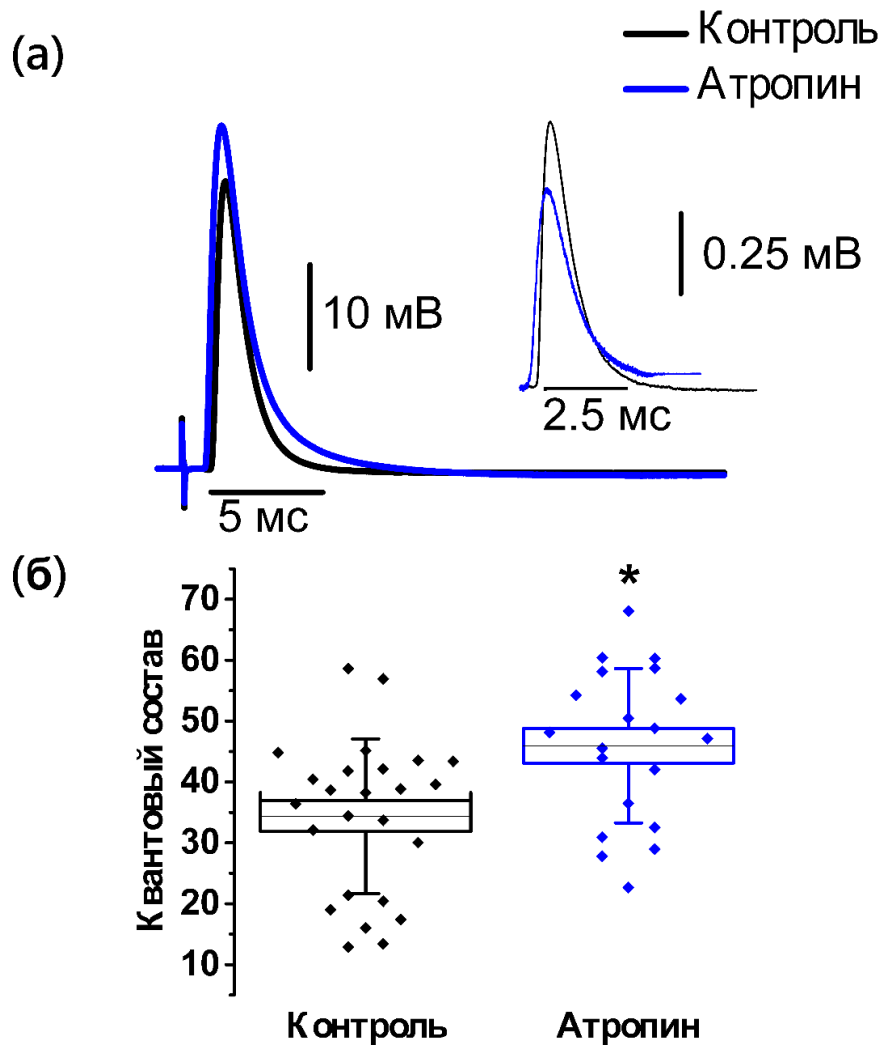


Рис. 30. Эффекты активации мускариновых рецепторов на квантовый состав и амплитуду кальциевого транзientа: а) репрезентативные сигналы вызванных ПКП и мПКП в контроле и после аппликации мускарина 10 мкМ б) СРЗНАЧ \pm ошибка среднего и СКО квантового состава, полученные в вышеуказанных сериях и выраженные в абсолютных величинах. Звёздочкой (*) отмечены достоверные изменения ($p < 0.05$; t-критерий Стьюдента).

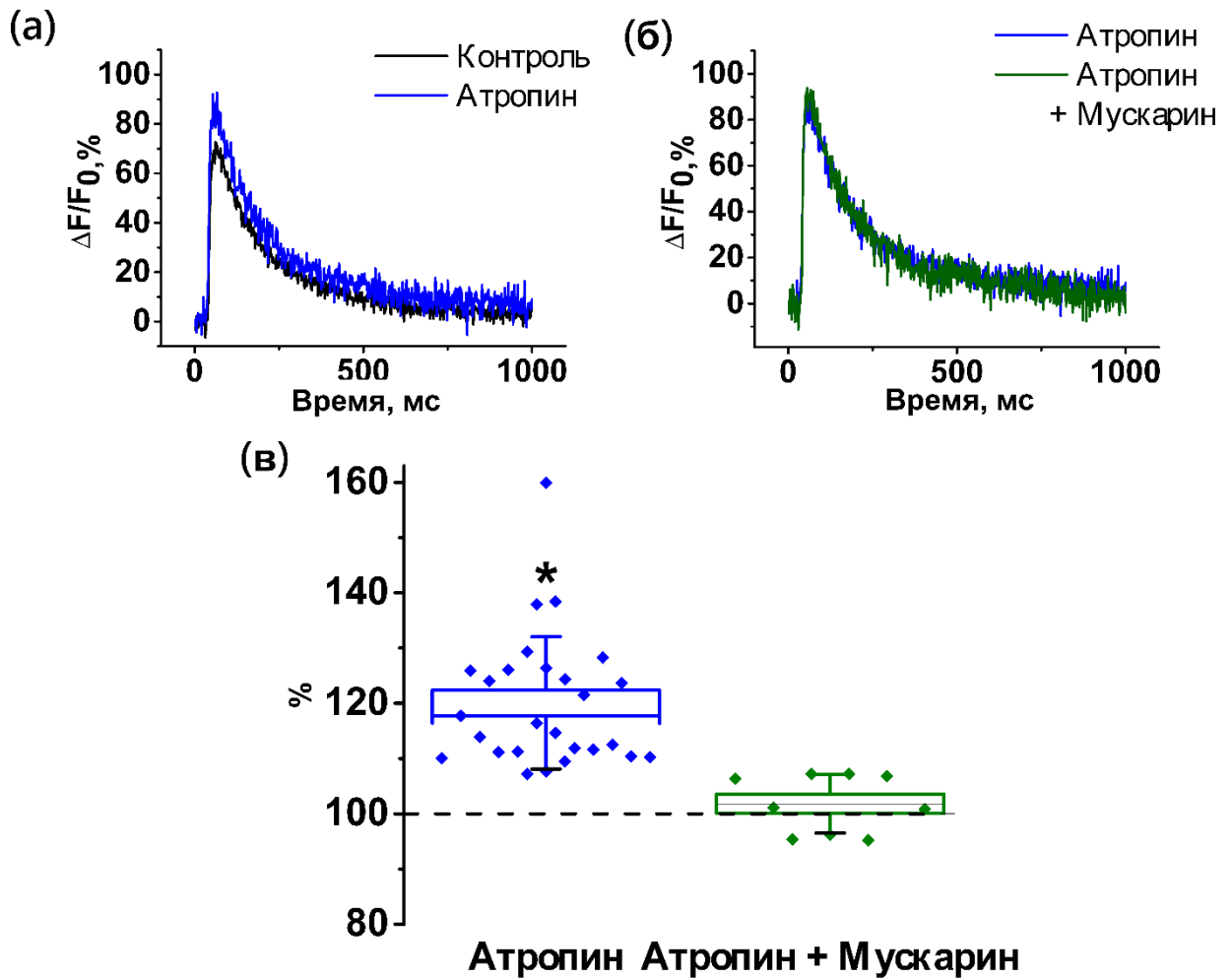


Рис. 31. Повышение амплитуды кальциевого транзientа на фоне блокады мускариновых рецепторов неселективным блокатором атропином.

Верхние панели представляют репрезентативные сигналы кальциевого транзientа в отдельно взятых экспериментах: (а) репрезентативные сигналы кальциевых транзientов в контроле и после аппликации атропина 10 мкМ;

(б) отсутствие влияния мускарина (10 мкМ) после предварительной 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 ($p < 0,05$; попарно-связанный one-way ANOVA тест с критерием Тьюки).

Это является доказательством того, что эффекты мускарина на кальциевый транзист обусловлены именно модуляцией работы мускариновых холинергических рецепторов.

Исходя из полученных результатов, можно заключить, что модуляция работы мускариновых рецепторов приводит к изменению амплитуды кальциевого транзиста и, как следствие изменению количества выброшенных квантов нейромедиатора. Особого внимания заслуживают данные, полученные в экспериментах с атропином, которые доказывают, что мускариновые холинорецепторы активируются тонически, эндогенно выделяемым ацетилхолином.

Следующим этапом работы стало определить, какие подтипы мускариновых рецепторов ответственны за изменение входа кальция в моторное нервное окончание.

3.7.2 Определение подтипов мускариновых рецепторов, участвующих в регуляции пресинаптического уровня кальция

Впервые наличие четырех подтипов мускариновых рецепторов M1, M2, M3, M4 на нервно-мышечном синапсе мышцы (m. LAL) было показано методом Western-blott (Minic et al., 2002). Кроме того, в той же работе было продемонстрировано, что в большей степени M1 и M2 подтипы мускариновых рецепторов участвуют в регуляции выброса нейромедиатора, путем применения соответствующих блокаторов (Minic et al., 2002). Этот факт был подтвержден и на двигательных синапсах крысы (Garcia et al., 2005). В соответствии с этими данными, было принято решение исследовать возможную роль именно этих подтипов мускариновых рецепторов в регуляции входа кальция в НО.

Для того, чтобы определить подтип мускариновых рецепторов, активация которых, вызывает увеличение уровня кальция в клетке, применялись селективные блокаторы M1 и M2 подтипов пирензепин 10 мкМ (Garcia et al., 2005; Santafé et al., 2007) и метоктрамин 1 мкМ (Garcia et al., 2005;

Santafé et al., 2007) соответственно. В результате блокады M1 подтипа рецепторов наблюдалось увеличение амплитуды кальциевого транзientа на $7.8 \pm 2.9\%$ ($n=7$, $p < 0.05$, рис.32), а в случае блокады M2 подтипа на $19 \pm 3.9\%$ ($n=8$, $p < 0.05$, рис.33). Аппликация мускарина 10 мкМ после блокады каждого из подтипов мускариновых рецепторов (M1 и M2) не вызывала каких-либо изменений пресинаптического уровня кальция. Полное, а не частичное отсутствие эффектов мускарина на фоне действия каждого из блокаторов мХР может быть обусловлено неизбирательным действием антагонистов или возможным пересечением сигнальных путей подтипов мХР. Действительно, в подтверждение второго предположения могут выступать данные недавнего исследования (Cilleros-Mañé et al., 2021), свидетельствующие о том, что M1 и M2 подтипы мускариновых рецепторов имеют общие мишени в своих регуляторных цепочках.

Исходя из полученных результатов, можно заключить, что эндогенная активация как M1, так и M2 подтипа мускариновых рецепторов приводит к уменьшению кальциевого транзientа в нервно-мышечном моторном синапсе. Однако остается невыясненным вопрос: каким образом активация мускариновых рецепторов вызывает изменения кальциевого транзientа? Вероятнее всего это происходит вследствие взаимодействия метаботропных холинорецепторов с кальциевыми каналами плазматической мембраны (Brown, 2018). В поиске ответа на поставленный вопрос была проведена следующая серия экспериментов.

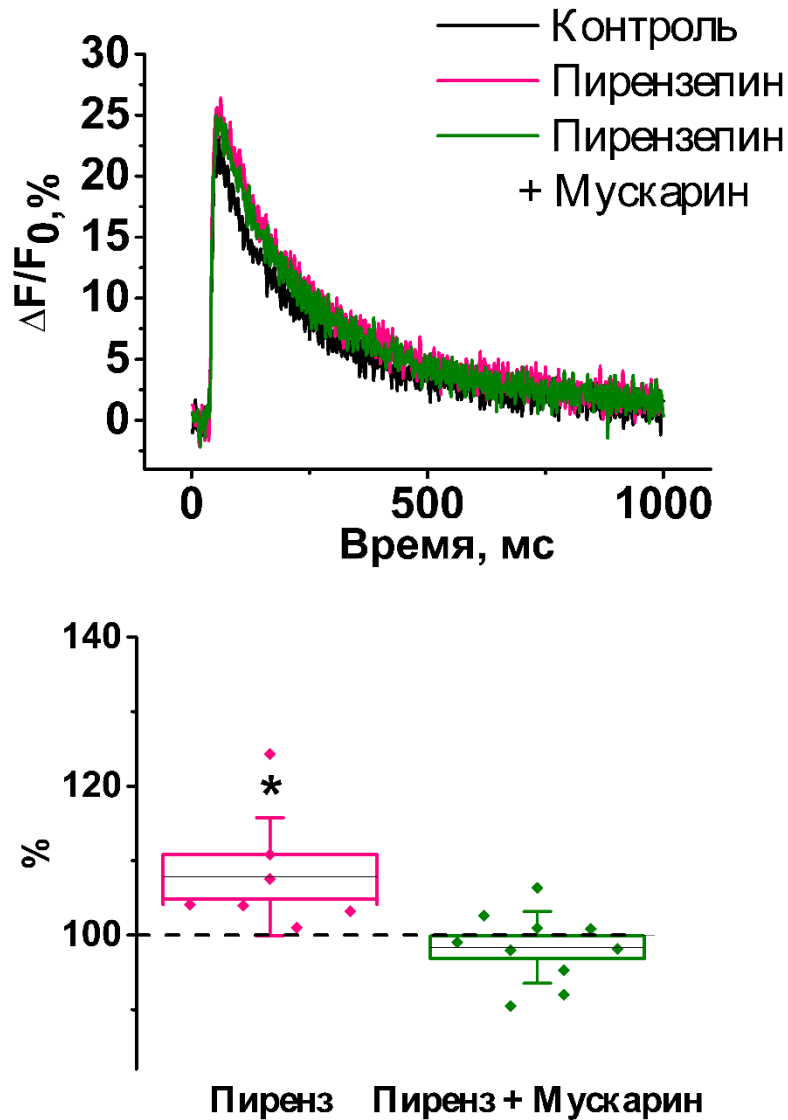


Рис. 32. Повышение амплитуды кальциевого транзientа на фоне блокады мускариновых рецепторов M1 подтипа. Сверху представлены репрезентативные сигналы кальциевого транзientа в отдельно взятых экспериментах: (а) репрезентативные сигналы кальциевых транзientов в контроле и после аппликации пирензепина (Пиренз) 10 мкМ, и на фоне его действия отсутствие влияния мускарина (10 мкМ); (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 ($p < 0.05$; попарно-связанный one-way ANOVA тест с критерием Тьюки).

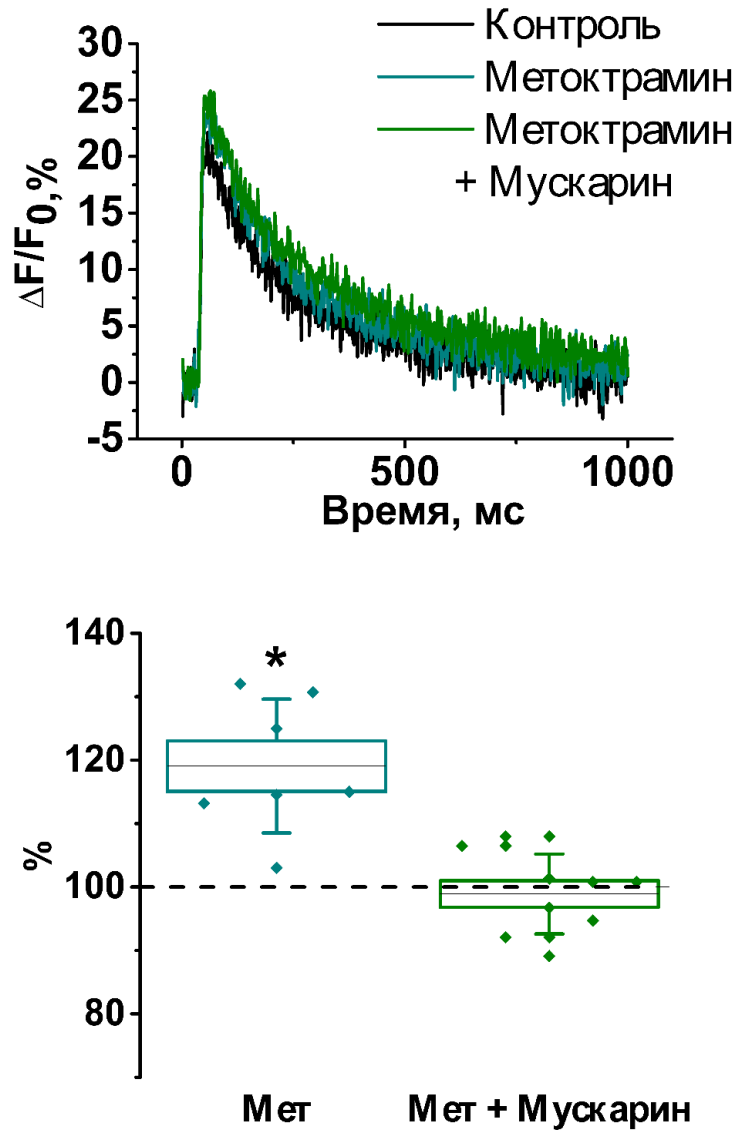
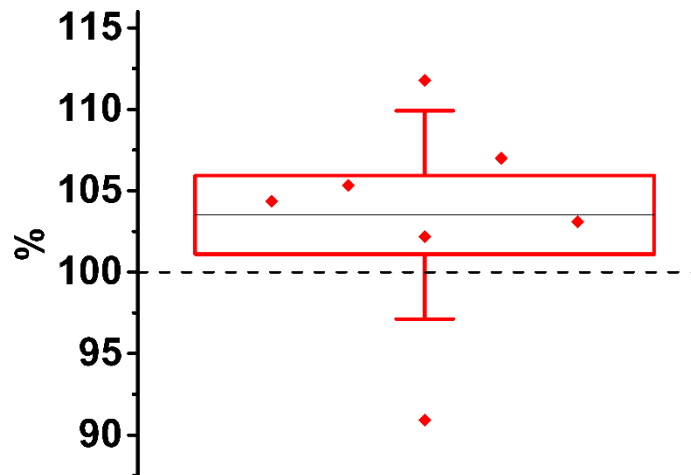
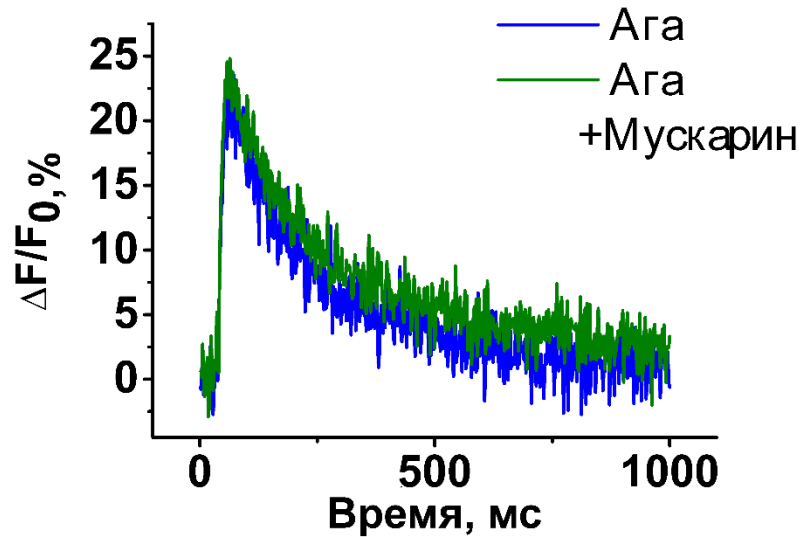


Рис. 33. Повышение амплитуды кальциевого транзientа на фоне блокады мускариновых рецепторов M2 подтипа. Сверху представлены репрезентативные сигналы кальциевого транзientа в отдельно взятых экспериментах: (а) репрезентативные сигналы кальциевых транзientов в контроле и после аппликации метактрамина (Met) 1 мкМ, и на фоне его действия отсутствие влияния мускарина (10 мкМ); (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 ($p < 0.05$; попарно-связанный one-way ANOVA тест с критерием Тьюки).

3.7.3 Мускариновые рецепторы изменяют уровень кальция в пресинаптических окончаниях мышцы, модулируя работу кальциевых каналов P/Q-типа

Поскольку, как и в случае никотиновых рецепторов, наблюдаемые изменения кальциевого транзientа, при активации мускариновых рецепторов, могут быть связаны с изменением работы потенциал-чувствительных кальциевых каналов, то необходимо было изучить эту возможную взаимосвязь. Для этого, на фоне заблокированных потенциал-чувствительных кальциевых каналов апплицировался мускарин 10мкМ. В результате блокады кальциевых каналов P/ Q-типа, ω -агатоксином (40нМ), эффекты последующей аппликации мускарина полностью отсутствовали $103.5 \pm 2.5\%$ (n=7, p> 0.05; рис. 34).

Полученный результат указывает на то, что мускариновые рецепторы могут модулировать вход кальция в двигательные нервные окончания через основной тип Cav P/ Q-типа. Этот результат хорошо согласуется с данными литературы, которые свидетельствуют об отсутствии эффектов мускариновых агентов на вызванную секрецию АХ при блокаде именно каналов P/ Q-типа (Santafé et al., 2004).



Ага + Мускарин

Рис. 34. Отсутствие эффекта мускарина (снижение амплитуды кальциевого транзientа) на фоне блокады P/Q-типа каналов. Сверху представлены репрезентативные сигналы кальциевого транзientа в отдельно взятых экспериментах: а) репрезентативные сигналы кальциевых транзientов при заблокированных кальциевых каналах P/Q-типа при помощи ω -агатоксином (40нМ; Ага) и на фоне его действия отсутствие влияния мускарина (10 мкМ); в) СРЗНАЧ \pm ошибка среднего и СКО амплитуды кальциевого сигнала, полученные в вышеперечисленных сериях и выраженные в процентах от значения после аппликации блокатора. Звёздочкой (*) отмечены достоверные изменения ($p < 0.05$; попарно-связанный one-way ANOVA тест с критерием Стьюдента).

3.7.4 Влияние активации мускариновых рецепторов на кальциевый транзист при модуляции рианодин-чувствительных рецепторов

Поскольку, как уже было сказано ранее, мускариновые рецепторы являются G-белок ассоциированными рецепторами, в частности они связаны с семейством белков Gi/o, которые способны регулировать выброс кальция из ЭПС (Unni et al., 2004; Khuzakhmetova et al., 2014; Futagi and Kitano, 2015; Johenning et al., 2015), то есть основания предполагать, что в эффектах вызванных активацией мускариновых рецепторов могут участвовать рианодин-чувствительные рецепторы ЭПС. В следующей серии экспериментов мы выясняли возможное влияние активации мускариновых рецепторов на кальциевый транзист при модуляции рианодин-чувствительных рецепторов.

Для этого на фоне модуляции работы рианодиновых рецепторов, при помощи рианофина 10 мкМ, был апплицирован мускарин (10 мкМ). В результате чего, в данных условиях наблюдалось уменьшение амплитуды кальциевого транзиста лишь $10.0 \pm 3.4\%$ ($n=9$, $p < 0.05$), вместо 18.5% в контроле (рис. 35). Достоверность различий эффектов была показана при помощи двустороннего критерия Стьюдента для несвязанных выборок. Благодаря полученным результатам, можно сделать вывод, что активация мускариновых рецепторов приводит к уменьшению внутриклеточного уровня кальция не только за счет угнетения работы Ca_v P/ Q-типа, но и уменьшения выброса кальция из ЭПС. Вероятно, полное отсутствие эффекта мускарина в условиях заблокированных P/ Q-типа каналов связано с нарушением процесса кальций-зависимого освобождения Ca^{2+} из ЭПС. Действительно, кальций-зависимое освобождение Ca^{2+} сильно зависит от входа, кальция через каналы P/ Q-типа, однако также нельзя отрицать того, что мускариновые рецепторы могут уменьшать выброс кальция из ЭПС посредством активации G-белков. Так, например, Gi-белки способны угнетать активность ПКА (Caulfield and

Birdsall, 1998), которая в свою очередь может фосфорилируя рианодиновые рецепторы, увеличивает выброс Ca^{2+} через них (Ozawa, 2010).

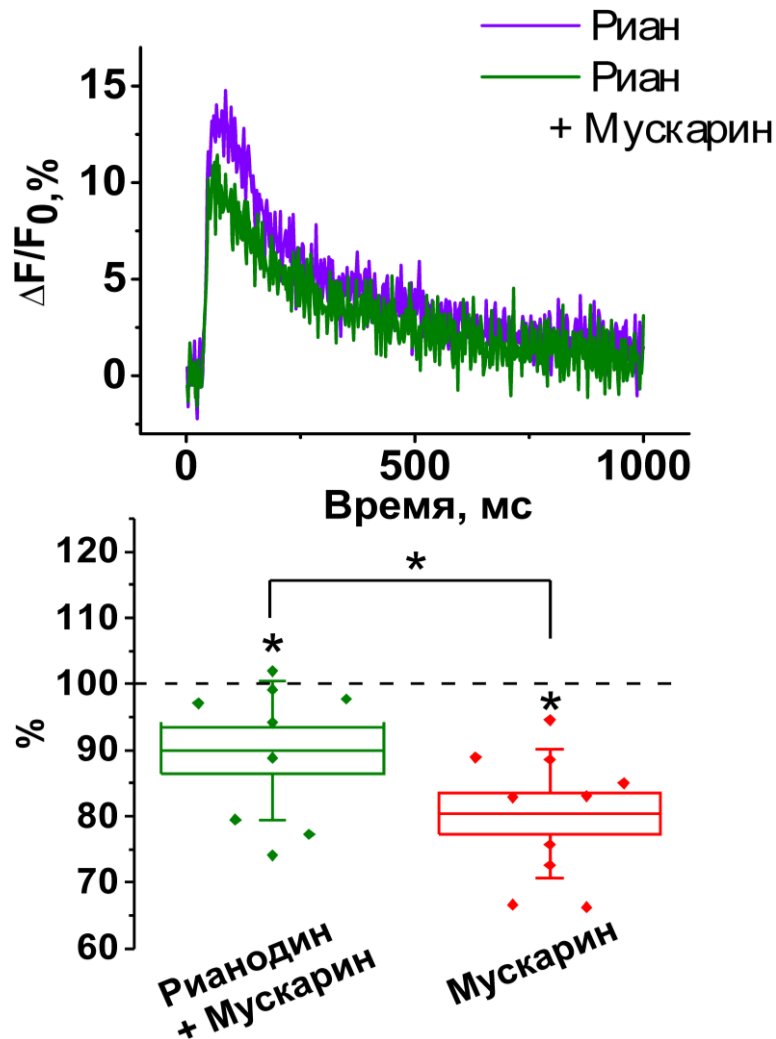


Рис. 35. Снижение эффекта мускарина (снижение амплитуды кальциевого транзientа) на фоне блокады рианодиновых каналов. Сверху представлены репрезентативные сигналы кальциевого транзientа в отдельно взятых экспериментах: а) репрезентативные сигналы кальциевых транзientов при заблокированных рианодиновых рецепторов при помощи рианодина (10 мкМ) и на фоне его действия уменьшение влияния мускарина (10 мкМ); в) СРЗНАЧ \pm ошибка среднего и СКО амплитуды кальциевого сигнала, полученные в вышеперечисленных сериях и выраженные в процентах от значения после аппликации блокатора. Звёздочкой (*) отмечены достоверные изменения ($p < 0.05$; t-критерий Стьюдента).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящем исследовании был осуществлен анализ кальциевых транзиентов и количества выделяющихся квантов нейромедиатора в двигательных синапсах мышцы, в условиях модуляции работы холинергических рецепторов. Основная цель исследования состояла в том, чтобы оценить роль мускариновых и никотиновых рецепторов в регуляции пресинаптического уровня кальция и модуляции количества выделяющихся квантов нейромедиатора. Полученные результаты свидетельствуют, что активация каждого из типов холинорецепторов угнетает выделение нейромедиатора, что 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 до настоящего момента получено не было.

Для оценки Ca^{2+} входящего в клетку было решено использовать методы флуоресцентной микроскопии с использованием Ca^{2+} -чувствительного красителя и регистрации кальциевого транзиента. В связи с этим возникла необходимость в разработке методики избирательной загрузки флуоресцентного кальций-чувствительного красителя в нервные терминалы мышцы. На начальном этапе исследования было показано, что флуоресцентный кальциевый сигнал отражает изменение уровня ионов кальция в нервном окончании при модулирующих воздействиях, которые приводят к изменению квантового выброса нейромедиатора. Это было показано в экспериментах с градуальным ограничением входа Ca^{2+} в НО при помощи блокатора кадмия, а также путем варьирования концентрации Ca^{2+} в омывающем растворе с последующим вычислением коэффициента биохимической кооперативности, величина которого совпала со значением, полученным другими

исследователями ранее для нервно-мышечного синапса мышцы электрофизиологическим методом (Tsentssevitsky et al., 2015).

Исходя из основной цели исследования в первую очередь было необходимо выяснить, какими источниками Ca^{2+} обуславливается кальциевый транзист, а затем уже на какие из них возможно влияние изменения активности холинорецепторов. Поочередно «выключая» возможные источники Ca^{2+} при помощи селективных блокаторов, оценивался вклад последних в формирование Ca^{2+} транзиста. Было установлено, что наибольший вклад в формирование амплитуды Ca^{2+} транзиста вносят потенциал-чувствительные каналы P/Q-типа, в меньшей степени каналы L-типа и лишь малая часть определена кальцием, выбрасываемым из ЭПР через рианодинорые рецепторы.

Кроме того, важным результатом настоящего исследования являются данные, указывающие на участие каналов L-типа в процессе вызванного освобождения нейромедиатора при низкочастотной стимуляции.

На основании результата, полученного в условиях заблокированных в Ca_v N-типа, можно сделать заключение о том, что данный тип каналов не оказывает влияние на изменение пресинаптического уровня кальция в двигательных синапсах мышцы. Эти данные хорошо согласуются с результатами полученными другими исследователями, в которых был установлен факт того, что каналы Ca_v N-типа не влияют на квантовый выброс нейромедиатора в периферических синапсах теплокровных животных (Katz et al., 1997; Pardo et al., 2006).

После установления источников, формирующих изменения пресинаптического уровня кальция, было выдвинуто предположение о том, что изменение их работы лежит в основе ауторегуляции вызванного выделения АХ. Данные механизмы модуляции нейросекреции активируются как ионотропными никотиновыми, так и метаботропными мускариновыми холинорецепторами.

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. Известно, что ДНβЕ связывается с β_2 субъединицами нейрональных рецепторов и является селективным антагонистом для никотиновых рецепторов, кроме α_7 (Alkondon et al., 1992; Stauderman et al., 2000). В гетеромерных рецепторах ганглионарных нейронов основной α субъединицей является α_3 , в то время как в ЦНС грызунов основной α субъединицей является α_4 (Parke et al., 2010). Никотиновые рецепторы $\alpha_4\beta_2$ подтипа в наиболее изобилующий в мозге и как показывают исследования локализуется на пресинаптической части (Karadsheh et al., 2004). Следовательно, можно предположить, что в нервно-мышечном синапсе мы имеем дело с нейрональными холинорецепторами состава $\alpha_4\beta_2$. В пользу этого предположения свидетельствуют данные о том, что в используемой концентрации ДНβЕ (1 мкМ) мышечные рецепторы $\alpha_4\beta_2$ блокируются почти полностью, тогда как на функционировании рецепторов субъединичного состава $\alpha_3\beta_4$ никакого эффекта антагонист ещё не оказывает (Parke et al., 2010).

Особый интерес имеют результаты настоящего исследования демонстрирующие, что активация именно нейрональных холинорецепторов (чувствительных к ДНβЕ), приводящая к снижению выброса АХ, сопровождается увеличением входа кальция в нервную терминаль. При этом отмечен весьма важный момент, а именно, собственный эффект ДНβЕ на амплитуду кальциевого 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 кальция опосредуется работой Ca_v L-типа. Это само по себе является важным результатом, демонстрирующим

функциональное взаимодействие между нейрональными холинорецепторами и каналами L-типа.

В рамках настоящего исследования была проверена гипотеза о том, что аутоингибирование выделения АХ при активации нХР, обусловлено гиперполяризацией, вызванной активацией K_{Ca} каналов за счет повышения пресинаптического уровня кальция. Данная гипотеза не получила подтверждения, поскольку блокада K_{Ca} каналов не отменяла эффект аппликации никотина, приводящий к угнетению квантового состава. Следующая гипотеза, которая проверялась в данном исследовании, была выдвинута на основании сведений литературы, свидетельствующих о том, что кальцинейрин может уменьшать уровень цАМФ за счет взаимодействия с аденилатциклазой (Antoni et al., 1998). Было выдвинуто предложение о том, что вход кальция через каналы L-типа может запускать вышеупомянутый каскад, приводя к уменьшению количества выделяющихся квантов нейромедиатора. В результате проведенного исследования была опровергнута гипотеза о возможном участии кальцинейрина в механизме никотин-индуцированного уменьшения количества выбрасываемых квантов АХ, так как на фоне действия его блокатора эффект никотина сохранялся. Таким образом, можно заключить, что наблюдаемое уменьшение квантового состава при активации нХР нейронального типа не связано с апамин-чувствительными K_{Ca} каналами и с кальций-зависимым белком кальцинейрином. Вполне возможно, что в реализации этого механизма могут быть задействованы G-белки чувствительные к коклюш-токсину, активируемые за счет входа кальция через каналы L-типа, что было показано на синапсах новорожденных (Sugiura and Ko, 1997)

Активация мХР, в отличие от нХР, 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. Ряд работ (Minic et al., 2002; Santafé et al., 2003, 2004; Dudel, 2007) демонстрирует что активация M1 и M2 подтипов оказывает разнонаправленный эффект на секрецию медиатора (активация M1 облегчает, а в случае M2 ингибирует). Однако, результаты настоящей работы свидетельствуют, что активация M1 и M2 рецепторов однонаправленно влияет на изменение пресинаптического уровня кальция, а именно угнетает его. Аппликация мускарина в условиях блокады обоих типов рецепторов отдельно никак не изменяла пресинаптический уровень кальция, что может указывать на пересечение сигнальных путей рецепторов.

Кроме того, 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 ЭПС. 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 кальциевых каналов P/Q-типа. Также на культуре клеток НЕК-293 было показано, что мускариновые рецепторы при их активации при помощи 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 изменения выброса из Ca^{2+} ЭПС. Однако, и в том, и в другом случае это приводит к угнетению выделения нейромедиатора.

Поскольку холинергическая сигнализация (помимо нервно-мышечной передачи и синаптической трансмиссии в ганглиях) участвует во множестве физиологических процессов таких как тревожность, возбуждение, обучение и память (синаптическая пластичность) (Hogg et al., 2003; Picciotto, 2003), то понимание механизмов влияния АХ (холиномиметиков) на нервные окончания, на которых экспрессированы никотиновые и мускариновые рецепторы (и это далеко не только холинергические синапсы (Seth et al., 2002; Garduño et al., 2012), имеет большую научную и клиническую значимость.

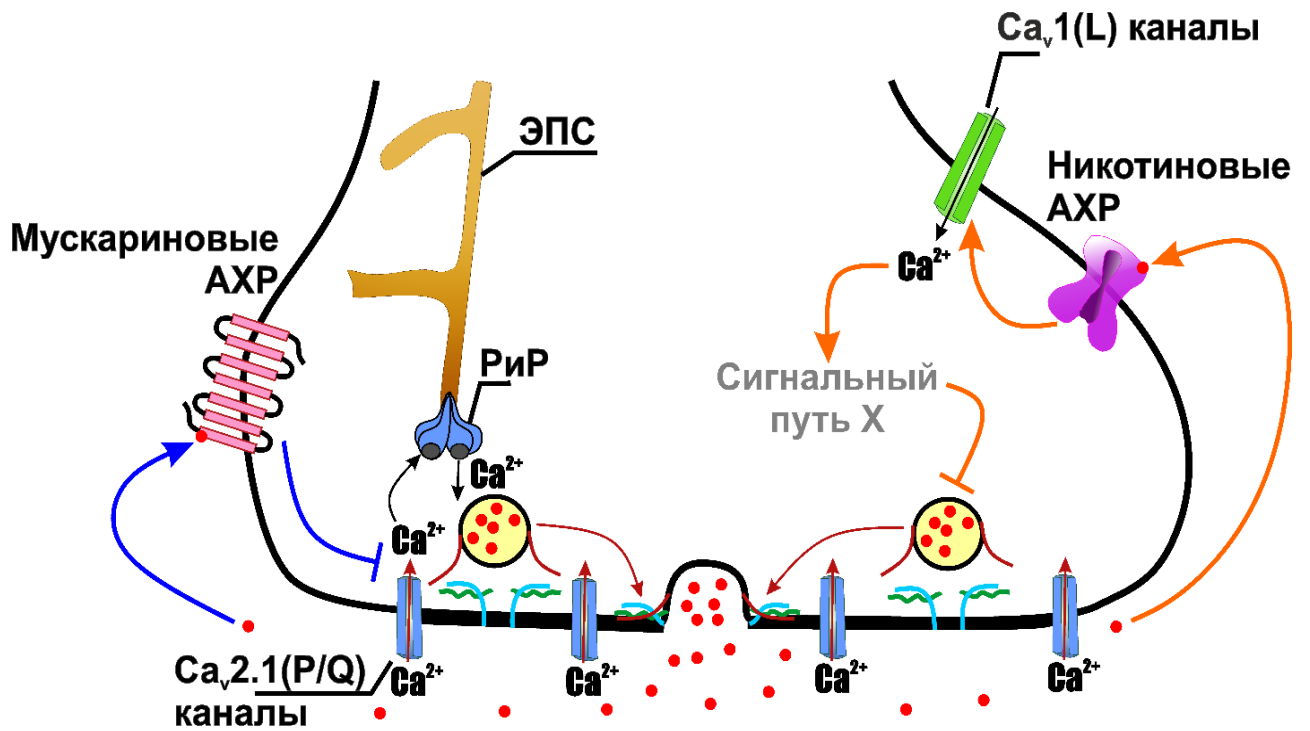


Рис. 36. Схема осуществления ауторегуляции выброса ацетилхолина(АХ) при активации пресинаптических холинорецепторов. АХ активирует мускариновые рецепторы, которые посредством G-белков ингибируют потенциал-чувствительные кальциевые каналы P/ Q-типа (отображено синими линиями слева). Также АХ активирует нейрональные никотиновые рецепторы, которые неизвестным путем потенцируют вход кальция через каналы L-типа, в результате чего запускается неидентифицированная сигнальная цепочка (обозначена буквой X), приводящая к угнетению квантового освобождения АХ (отображено оранжевыми линиями справа).

ВЫВОДЫ

1. Разработан метод оценки кальциевого транзиента в двигательных нервных окончаниях мышцы с помощью флуоресцентного красителя. Применение данного метода позволило выявить, что формирование пресинаптического кальциевого транзиента 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 транзиента, возникающего при низкочастотном раздражении двигательного нерва.
3. Активация никотиновых рецепторов, содержащих $\beta 2$ -субъединицу, приводит к увеличению амплитуды кальциевого транзиента за счет входа ионов кальция через потенциал чувствительные кальциевые каналы L-типа.
4. Активация никотиновых рецепторов, содержащих $\beta 2$ -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 транзиента в присутствии антагонистов мускариновых холинорецепторов свидетельствует о вовлечении этого типа рецепторов в эндогенную регуляцию кальциевого входа в двигательное нервное окончание.
7. Уменьшение кальциевого транзиента в присутствии специфического антагониста никотиновых рецепторов, содержащих $\beta 2$ -субъединицу, свидетельствует о наличии эндогенной регуляции пресинаптического кальциевого входа в двигательном нервном окончании через этот тип рецепторов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бережнов, А.В. Применение флуоресцентной микроскопии в исследованиях динамики Ca^{2+} в клетках / В.П. Зинченко, Е.И. Федотова, В.А. Яшин // г. Пущино. - 2007. – С. 42-62.
2. Казаков, А. Простой всасывающий электрод для электрической стимуляции биологических объектов / М. Александров, Н.В. Жилияков, Э.Ф. Хазиев, Д.В. Самигуллин // Международный научно - исследовательский журнал. - 2015. - Т. 9. - С. 13–16.
3. Самигуллин, Д.В. Регуляция мускариновыми рецепторами кальциевого транзientа и синаптической передачи в нервно-мышечном соединении лягушки / Э.Ф. Хазиев, И.В. Ковязина, Э.А. Бухараева, Е.Е. Никольский // гены клетки. - 2014. - Т. 9. - С. 242–247.
4. Adams, S.R. How calcium indicators work / Cold Spring Harb. Protoc. - 2010. - V. 2010
5. Ahmed, Z. Calcium regulation by and buffer capacity of molluscan neurons during calcium transients / J.A. Connor // Cell Calcium. - 1988. - V. 9. - P. 57–69.
6. Alkondon, M. Blockade of nicotinic currents in hippocampal neurons defines methyllycaconitine as a potent and specific receptor antagonist. / E.F. Pereira, S. Wonnacott, E.X. Albuquerque // Mol. Pharmacol. - 1992. - V. 41
7. Amaral, M.D. Intracellular Ca^{2+} stores and Ca^{2+} influx are both required for BDNF to rapidly increase quantal vesicular transmitter release / L. Pozzo-Miller // Neural Plast. - 2012. - V. 2012
8. Andersen, N. Stoichiometry for activation of neuronal $\alpha 7$ nicotinic receptors / J. Corradi, S.M. Sine, C. Bouzat // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. - 2013. - V. 110. - P. 20819–20824.
9. Anderson, D. The Cav3-Kv4 complex acts as a calcium sensor to maintain inhibitory charge transfer during extracellular calcium fluctuations / J.D.T.

- Engbers, N.C. Heath, T.M. Bartoletti, W.H. Mehaffey, G.W. Zamponi, R.W. Turner // *J. Neurosci.* - 2013. - V. 33. - P. 7811–7824.
10. Anderson, D. Regulation of neuronal activity by Cav3-Kv4 channel signaling complexes / W.H. Mehaffey, M. Iftinca, R. Rehak, J.D.T. Engbers, S. Hameed, G.W. Zamponi, R.W. Turner // *Nat. Neurosci.* - 2010. - V. 13. - P. 333–337.
11. Angaut-Petit, D. The levator auris longus muscle of the mouse: A convenient preparation for studies of short- and long-term presynaptic effects of drugs or toxins / J. Molgo, A.L. Connold, L. Faille // *Neurosci. Lett.* - 1987. - V. 82. - P. 83–88.
12. Antoni, F.A. Ca²⁺/calcineurin-inhibited adenylyl cyclase, highly abundant in forebrain regions, is important for learning and memory / M. Palkovits, J. Simpson, S.M. Smith, A.L. Leitch, R. Rosie, G. Fink, J.M. Paterson // *J. Neurosci.* - 1998. - V. 18. - P. 9650–9661.
13. Arenson, M.S. Activation of protein kinase C increases acetylcholine release from frog motor nerves by a direct action on L-type Ca(2+) channels and apparently not by depolarisation of the terminal / S.C. Evans // *Neuroscience.* - 2001. - V. 104. - P. 1157–1164.
14. Arenson, M.S. Differential Effects of an L-type Ca²⁺ Channel Antagonist on Activity- and Phosphorylation-enhanced Release of Acetylcholine at the Neuromuscular Junction of the Frog In Vitro / D.S. Gill // *Eur. J. Neurosci.* - 1996. - V. 8. - P. 437–445.
15. Arnot, M.I. Differential modulation of N-type 1B and P/Q-type 1A calcium channels by different G protein subunit isoforms / S.C. Stotz, S.E. Jarvis, G.W. Zamponi // *J. Physiol.* - 2000. - V. 527 Pt 2. - P. 203–212.
16. Aseyev, N. Biolistic delivery of voltage-sensitive dyes for fast recording of membrane potential changes in individual neurons in rat brain slices / M. Roshchin, V.N. Ierusalimsky, P.M. Balaban, E.S. Nikitin // *J. Neurosci. Methods.* - 2013. - V. 212. - P. 17–27.
17. Atchison, W.D. Dihydropyridine-sensitive and -insensitive components of

- acetylcholine release from rat motor nerve terminals / J. Pharmacol. Exp. Ther. - 1989. - V. 251. - P. 672–678.
18. Balezina, O.P. Effect of nicotine on neuromuscular transmission in mouse motor synapses / V. V. Fedorin, A.E. Gaidukov // Bull. Exp. Biol. Med. - 2006. - V. 142. - P. 17–21.
19. Bannister, R.A. Ca(V)1.1: The atypical prototypical voltage-gated Ca²⁺ channel / K.G. Beam // Biochim. Biophys. Acta. - 2013. - V. 1828. - P. 1587–1597.
20. Barreto-Chang, O.L. Calcium Imaging of Cortical Neurons using Fura-2 AM / R.E. Dolmetsch // JoVE (Journal Vis. Exp. - 2009. - . - P. e1067.
21. Bean, B.P. Two kinds of calcium channels in canine atrial cells. Differences in kinetics, selectivity, and pharmacology / J. Gen. Physiol. - 1985. - V. 86. - P. 1–30.
22. Bech-Hansen, T.N. Loss-of-function mutations in a calcium-channel alpha1-subunit gene in Xp11.23 cause incomplete X-linked congenital stationary night blindness / M.J. Naylor, T.A. Maybaum, W.G. Pearce, B. Koop, G.A. Fishman, M. Mets, M.A. Musarella, K.M. Boycott // Nat. Genet. - 1998. - V. 19. - P. 264–267.
23. Benediktsson, A.M. Ballistic labeling and dynamic imaging of astrocytes in organotypic hippocampal slice cultures / S.J. Schachtele, S.H. Green, M.E. Dailey // J. Neurosci. Methods. - 2005. - V. 141. - P. 41–53.
24. Berkefeld, H. Repolarizing Responses of BKCa–Cav Complexes Are Distinctly Shaped by Their Cav Subunits / B. Fakler // J. Neurosci. - 2008. - V. 28. - P. 8238.
25. Berkefeld, H. BKCa-Cav channel complexes mediate rapid and localized Ca²⁺-activated K⁺ signaling / C.A. Sailer, W. Bildl, V. Rohde, J.O. Thumfart, S. Eble, N. Klugbauer, E. Reisinger, J. Bischofberger, D. Oliver, H.G. Knaus, U. Schultes, B. Fakler // Science. - 2006. - V. 314. - P. 615–620.
26. Berkeley, J.L. M1 muscarinic acetylcholine receptors activate extracellular

- signal-regulated kinase in CA1 pyramidal neurons in mouse hippocampal slices / J. Gomeza, J. Wess, S.E. Hamilton, N.M. Nathanson, A.I. Levey // *Mol. Cell. Neurosci.* - 2001. - V. 18. - P. 512–524.
27. Bezprozvanny, I. Functional impact of syntaxin on gating of N-type and Q-type calcium channels / R.H. Scheller, R.W. Tsien // *Nat.* 1995 3786557. - 1995. - V. 378. - P. 623–626.
28. Bezprozvanny, I. Neuronal calcium mishandling and the pathogenesis of Alzheimer's disease / M.P. Mattson // *Trends Neurosci.* - 2008. - V. 31. - P. 454–463.
29. Blaustein, M.P. Calcium transport and buffering in neurons / *Trends Neurosci.* - 1988. - V. 11. - P. 438–443.
30. Blaustein, M.P. Physiological Roles of the Sodium-Calcium Exchanger in Nerve and Muscles / W.F. Goldman, G. Fontana, B.K. Krueger, E.M. Santiago, T.D. Steele, D.N. Weiss, P.J. Yarowsky // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* - 1991. - V. 639. - P. 254–274.
31. Boehm, S. Fine tuning of sympathetic transmitter release via ionotropic and metabotropic presynaptic receptors / H. Kubista // *Pharmacol. Rev.* - 2002. - V. 54. - P. 43–99.
32. Bonnot, A. Electroporation Loading of Calcium-Sensitive Dyes Into the CNS / G.Z. Mentis, J. Skoch, M.J. O // *J Neurophysiol.* - 2005. - V. 93. - P. 1793–1808.
33. Bootman, M.D. Ca²⁺-sensitive fluorescent dyes and intracellular Ca²⁺ imaging / K. Rietdorf, T. Collins, S. Walker, M. Sanderson // *Cold Spring Harb. Protoc.* - 2013. - V. 8. - P. 83–99.
34. Borst, A. In vivo imaging of calcium accumulation in fly interneurons as elicited by visual motion stimulation. / M.E. the N.A. of Sciences, undefined 1992 // *Natl. Acad Sci.* - 1992. - V. 89. - P. 4139–4143.
35. Borst, J.G. Calcium influx and transmitter release in a fast CNS synapse. / B. Sakmann // *Nature.* - 1996. - V. 383. - P. 431–4.
36. Bortolato, M. GABAB receptor activation exacerbates spontaneous spike-

- and-wave discharges in DBA/2J mice / R. Frau, M. Orrù, M. Fà, C. Dessì, M. Puligheddu, L. Barberini, G. Pillolla, L. Polizzi, F. Santoni, G. Mereu, F. Marrosu // *Seizure*. - 2010. - V. 19. - P. 226–231.
37. Bothwell, J.H.F. Biolistic delivery of Ca²⁺ dyes into plant and algal cells / C. Brownlee, A.M. Hetherington, C.K.Y. Ng, G.L. Wheeler, M.R. McAinsh // *Plant J*. - 2006. - V. 46. - P. 327–335.
38. Bourinet, E. Silencing of the Cav3.2 T-type calcium channel gene in sensory neurons demonstrates its major role in nociception / A. Alloui, A. Monteil, C. Barrère, B. Couette, O. Poirot, A. Pages, J. McRory, T.P. Snutch, A. Eschalier, J. Nargeot // *EMBO J*. - 2005. - V. 24. - P. 315–324.
39. Bourinet, E. Splicing of alpha 1A subunit gene generates phenotypic variants of P- and Q-type calcium channels / T.W. Soong, K. Sutton, S. Slaymaker, E. Mathews, A. Monteil, G.W. Zamponi, J. Nargeot, T.P. Snutch // *Nat. Neurosci*. - 1999. - V. 2. - P. 407–415.
40. Bowman, W.C. Presynaptic Receptors in the Neuromuscular Junction / C. Prior, I.G. Marshall // *Ann. N. Y. Acad. Sci*. - 1990. - V. 604. - P. 69–81.
41. Brann, M.R. Structure/function relationships of muscarinic acetylcholine receptors / V.J. Klimkowski, J. Ellis // *Life Sci*. - 1993. - V. 52. - P. 405–412.
42. Brini, M. Transfected Aequorin in the Measurement of Cytosolic Ca²⁺ Concentration (c): A CRITICAL EVALUATION (*) / R. Marsault, C. Bastianutto, ... J.A.-J. of B., undefined 1995 // *ASBMB*. -
43. Brini, M. The plasma membrane Ca²⁺ ATPase and the plasma membrane sodium calcium exchanger cooperate in the regulation of cell calcium / E. Carafoli // *Cold Spring Harb. Perspect. Biol*. - 2011. - V. 3. - P. 1–15.
44. Brown, D.A. Regulation of neural ion channels by muscarinic receptors / *Neuropharmacology*. - 2018. - V. 136. - P. 383–400.
45. Bruton, J.D. Methods to Detect Ca²⁺ in Living Cells / A.J. Cheng, H. Westerblad // *Adv. Exp. Med. Biol*. - 2012. - V. 740. - P. 27–43.

46. Bukharaeva, E.A. Modulation of the kinetics of evoked quantal release at mouse neuromuscular junctions by calcium and strontium / D. Samigullin, E.E. Nikolsky, L.G. Magazanik // *J. Neurochem.* - 2007. - V. 100. - P. 939–949.
47. Bukharaeva, E. Presynaptic Acetylcholine Receptors Modulate the Time Course of Action Potential-Evoked Acetylcholine Quanta Secretion at Neuromuscular Junctions / A. Skorinkin, D. Samigullin, A. Petrov // *Biomedicines.* - 2022. - V. 10. - P. 1771.
48. Burnashev, N. Presynaptic Ca²⁺ dynamics, Ca²⁺ buffers and synaptic efficacy / A. Rozov // *Cell Calcium.* - 2005. - V. 37. - P. 489–495.
49. Butcher, A.J. Physiological role of G-protein coupled receptor phosphorylation / K.C. Kong, R. Prihandoko, A.B. Tobin // *Handb. Exp. Pharmacol.* - 2012. - V. 208. - P. 79–94.
50. Bymaster, F.P. Role of specific muscarinic receptor subtypes in cholinergic parasympathomimetic responses, in vivo phosphoinositide hydrolysis, and pilocarpine-induced seizure / P.A. Carter, M. Yamada, J. Gomeza, J. Rgen Wess, S.E. Hamilton, N.M. Nathanson, D.L. Mckinzie, C.C. Felder // *Wiley Online Libr.* - 2003. - V. 17. - P. 1403–1410.
51. Cai, Q. Regulation of axonal mitochondrial transport and its impact on synaptic transmission / M.L. Davis, Z.H. Sheng // *Neurosci. Res.* - 2011. - V. 70. - P. 9–15.
52. Caillard, O. Role of the calcium-binding protein parvalbumin in short-term synaptic plasticity / H. Moreno, B. Schwaller, I. Llano, M.R. Celio, A. Marty // *Proc. Natl. Acad. Sci.* - 2000. - V. 97. - P. 13372–13377.
53. Cao, Z. Pathogenesis of diabetic nephropathy / M.E. Cooper // *J. Diabetes Investig.* - 2011. - V. 2. - P. 243–247.
54. Carafoli, E. The calcium pumping ATPase of the plasma membrane / *Annu. Rev. Physiol.* - 1991. - V. 53. - P. 531–547.
55. Carbone, E. A low voltage-activated, fully inactivating Ca channel in vertebrate sensory neurones / H.D. Lux // 1984. - V. 310. - P. 501–502.

56. Carlson, A.B. Physiology, Cholinergic Receptors / G.P. Kraus // StatPearls. - 2021. -
57. Catterall, W.A. Voltage-gated calcium channels / Cold Spring Harb. Perspect. Biol. - 2011. - V. 3. - P. 1–23.
58. Catterall, W.A. Calcium channels and short-term synaptic plasticity / K. Leal, E. Nanou // J. Biol. Chem. - 2013. - V. 288. - P. 10742–10749.
59. Catterall, W.A. International Union of Pharmacology. XLVIII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated calcium channels / E. Perez-Reyes, T.P. Snutch, J. Striessnig // Pharmacol. Rev. - 2005. - V. 57. - P. 411–425.
60. Caulfield, M.P. International union of pharmacology. XVII. Classification of muscarinic acetylcholine receptors / N.J.M. Birdsall // Pharmacol. Rev. - 1998. - V. 50. - P. 279–290.
61. Caulfield, M.P. International Union of Pharmacology. XVII. Classification of muscarinic acetylcholine receptors. / N.J.M. Birdsall // Pharmacol. Rev. - 1998. - V. 50. - P. 279–90.
62. Changeux, J.P. Allosteric mechanisms in normal and pathological nicotinic acetylcholine receptors / S.J. Edelstein // Curr. Opin. Neurobiol. - 2001. - V. 11. - P. 369–377.
63. Changeux, J.P. Allosteric receptors after 30 years / S.J. Edelstein // Neuron. - 1998. - V. 21. - P. 959–980.
64. Cheek, T.R. Quantal Ca²⁺ mobilization by ryanodine receptors is due to all-or-none release from functionally discrete intracellular stores / M.J. Berridge, R.B. Moreton, K.A. Stauderman, M.M. Murawsky, M.D. Bootman // Biochem. J. - 1994. - V. 301 (Pt 3). - P. 879–883.
65. Chen, T.W. Ultrasensitive fluorescent proteins for imaging neuronal activity / T.J. Wardill, Y. Sun, S.R. Pulver, S.L. Renninger, A. Baohan, E.R. Schreiter, R.A. Kerr, M.B. Orger, V. Jayaraman, L.L. Looger, K. Svoboda, D.S. Kim // Nat. 2013 4997458. - 2013. - V. 499. - P. 295–300.
66. Christel, C. Ca²⁺-dependent modulation of voltage-gated Ca²⁺ channels /

- A. Lee // *Biochim. Biophys. Acta.* - 2012. - V. 1820. - P. 1243–1252.
67. Cia, D. Voltage-gated channels and calcium homeostasis in mammalian rod photoreceptors / A. Bordais, C. Varela, V. Forster, J.A. Sahel, A. Rendon, S. Picaud // *J. Neurophysiol.* - 2005. - V. 93. - P. 1468–1475.
68. Ciani, S. The effect of acetylcholine on neuromuscular transmission in the frog. / C. Edwards // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* - 1963. - V. 142. - P. 21–3.
69. Cilleros-Mañé, V. M1 and M2 mAChRs activate PDK1 and regulate PKC β I and ϵ and the exocytotic apparatus at the NMJ / L. Just-Borràs, A. Polishchuk, M. Durán, M. Tomàs, N. Garcia, J.M. Tomàs, M.A. Lanuza // *FASEB J.* - 2021. - V. 35. - P. 1–23.
70. Cilleros-Mañé, V. M 1 and M 2 mAChRs activate PDK1 and regulate PKC β I and ϵ and the exocytotic apparatus at the NMJ / L. Just-Borràs, A. Polishchuk, M. Durán, M. Tomàs, N. Garcia, J.M. Tomàs, M.A. Lanuza // *FASEB J.* - 2021. - V. 35
71. Cohen-Cory, S. The developing synapse: construction and modulation of synaptic structures and circuits / *Science.* - 2002. - V. 298. - P. 770–776.
72. Coulter, D.A. Characterization of ethosuximide reduction of low-threshold calcium current in thalamic neurons / J.R. Huguenard, D.A. Prince // *Ann. Neurol.* - 1989. - V. 25. - P. 582–593.
73. Crawford, A.C. The dependence of evoked transmitter release on external calcium ions at very low mean quantal contents / *J. Physiol.* - 1974. - V. 240. - P. 255–278.
74. Cribbs, L.L. Cloning and characterization of α 1H from human heart, a member of the T-type Ca^{2+} channel gene family / J.H. Lee, J. Yang, J. Satin, Y. Zhang, A. Daud, J. Barclay, M.P. Williamson, M. Fox, M. Rees, E. Perez-Reyes // *Circ. Res.* - 1998. - V. 83. - P. 103–109.
75. Curtis, M.J. Experimental design and analysis and their reporting II: updated and simplified guidance for authors and peer reviewers / S. Alexander, G. Cirino, J.R. Docherty, C.H. George, M.A. Giembycz, D. Hoyer, P.A. Insel, A.A. Izzo, Y. Ji, D.J. MacEwan, C.G. Sobey, S.C. Stanford, M.M. Teixeira,

- S. Wonnacott, A. Ahluwalia // *Br. J. Pharmacol.* - 2018. - V. 175. - P. 987–993.
76. Dani, J.A. Neuronal Nicotinic Acetylcholine Receptor Structure and Function and Response to Nicotine / *Int. Rev. Neurobiol.* - 2015. - V. 124. - P. 3–19.
77. David, G. Stimulation-induced changes in $[Ca^{2+}]$ in lizard motor nerve terminals / J.N. Barrett, E.F. Barrett // *J. Physiol.* - 1997. - V. 504. - P. 83–96.
78. Day, N.C. Differential Localization of Voltage-Dependent Calcium Channel $\alpha 1$ Subunits at the Human and Rat Neuromuscular Junction / S.J. Wood, P.G. Ince, S.G. Volsen, W. Smith, C.R. Slater, P.J. Shaw // *J. Neurosci.* - 1997. - V. 17. - P. 6226.
79. de Juan-Sanz, J. Axonal Endoplasmic Reticulum Ca^{2+} Content Controls Release Probability in CNS Nerve Terminals / G.T. Holt, E.R. Schreier, F. de Juan, D.S. Kim, T.A. Ryan // *Neuron.* - 2017. - V. 93. - P. 867-881.e6.
80. Deitmer, J.W. Calcium signalling in glial cells / A.J. Verkhratsky, C. Lohr // *Cell Calcium.* - 1998. - V. 24. - P. 405–416.
81. Del Castillo, J. Interaction at end-plate receptors between different choline derivatives. / B. Katz // *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* - 1957. - V. 146. - P. 369–381.
82. Delbaere, L.T.J. Crystallization of the calcium-activated phosphoenolpyruvate carboxykinase from *Escherichia coli* K12 / M. Vandonselaar, D. Glaeske, C. Jabs, H. Goldie // *J. Mol. Biol.* - 1991. - V. 219. - P. 593–594.
83. Di Biase, V. Stable membrane expression of postsynaptic CaV1.2 calcium channel clusters is independent of interactions with AKAP79/150 and PDZ proteins / G.J. Obermair, Z. Szabo, C. Altier, J. Sanguesa, E. Bourinet, B.E. Flucher // *J. Neurosci.* - 2008. - V. 28. - P. 13845–13855.
84. DiGregorio, D.A. Localized detection of action potential-induced presynaptic calcium transients at a *Xenopus* neuromuscular junction / J.L.

- Vergara // *J. Physiol.* - 1997. - V. 505. - P. 585–592.
85. Dodge, F.A. Co-operative action a calcium ions in transmitter release at the neuromuscular junction. / R. Rahamimoff // *J. Physiol.* - 1967. - V. 193. - P. 419–32.
86. Dolphin, A.C. A short history of voltage-gated calcium channels / *Br. J. Pharmacol.* - 2006. - V. 147 Suppl 1
87. Dolphin, A.C. G protein modulation of voltage-gated calcium channels / *Pharmacol. Rev.* - 2003. - V. 55. - P. 607–627.
88. Doyle, A.D. Simultaneous, real-time imaging of intracellular calcium and cellular traction force production / J. Lee // *Biotechniques.* - 2002. - V. 33. - P. 358–364.
89. Dror, R.O. Structural basis for modulation of a G-protein-coupled receptor by allosteric drugs / H.F. Green, C. Valant, D.W. Borhani, J.R. Valcourt, A.C. Pan, D.H. Arlow, M. Canals, J.R. Lane, R. Rahmani, J.B. Baell, P.M. Sexton, A. Christopoulos, D.E. Shaw // *Nature.* - 2013. - V. 503. - P. 295–299.
90. Dubel, S.J. Molecular cloning of the alpha-1 subunit of an omega-conotoxin-sensitive calcium channel / T.V.B. Starr, J. Hell, M.K. Ahlijanian, J.J. Enyeart, W.A. Catterall, T.P. Snutch // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* - 1992. - V. 89. - P. 5058–5062.
91. Dudel, J. The time course of transmitter release in mouse motor nerve terminals is differentially affected by activation of muscarinic M1 or M2 receptors / *Eur. J. Neurosci.* - 2007. - V. 26. - P. 2160–2168.
92. Edeson, R.O. Verapamil, neuromuscular transmission and the nicotinic receptor / B.W. Madsen, R.K. Milne, A.C. Le Dain // *Eur. J. Pharmacol.* - 1988. - V. 151. - P. 301–306.
93. Eglen, R.M. Muscarinic receptor subtypes in neuronal and non-neuronal cholinergic function / *Auton. Autacoid Pharmacol.* - 2006. - V. 26. - P. 219–233.
94. Eglen, R.M. The muscarinic M(5) receptor: a silent or emerging subtype? /

- S.R. Nahorski // *Br. J. Pharmacol.* - 2000. - V. 130. - P. 13–21.
95. El Idrissi, A. Taurine increases mitochondrial buffering of calcium: role in neuroprotection / *Amin. Acids* 2006 342. - 2006. - V. 34. - P. 321–328.
96. Engbers, J.D.T. Modeling interactions between voltage-gated Ca (2+) channels and KCa1.1 channels / G.W. Zamponi, R.W. Turner // *Channels (Austin)*. - 2013. - V. 7
97. Engbers, J.D. Cav3-KCa3.1 complex enhances detection of facilitating parallel fiber inputs in cerebellar Purkinje cells / R.W. Turner // *BMC Neurosci.* - 2012. - V. 13
98. Fillenz, M. Acetylcholine and neuro-muscular transmission / M. Hanafin // *J. Neurophysiol.* - 1947. - V. 10. - P. 189–195.
99. Flink, M.T. Iberiotoxin-induced block of Ca²⁺-activated K⁺ channels induces dihydropyridine sensitivity of ACh release from mammalian motor nerve terminals / W.D. Atchison, B. Atchison // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* - 2003. - V. 305. - P. 646–652.
100. Foust, K.D. Intravascular AAV9 preferentially targets neonatal neurons and adult astrocytes / E. Nurre, C.L. Montgomery, A. Hernandez, C.M. Chan, B.K. Kaspar // *Nat. Biotechnol.* - 2009. - V. 27. - P. 59–65.
101. François, A. The Low-Threshold Calcium Channel Cav3.2 Determines Low-Threshold Mechanoreceptor Function / N. Schüetter, S. Laffray, J. Sanguesa, A. Pizzoccaro, S. Dubel, A. Mantilleri, J. Nargeot, J. Noël, J.N. Wood, A. Moqrich, O. Pongs, E. Bourinet // *Cell Rep.* - 2015. - V. 10. - P. 370–382.
102. Fredriksson, R. The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints / M.C. Lagerström, L.G. Lundin, H.B. Schiöth // *Mol. Pharmacol.* - 2003. - V. 63. - P. 1256–1272.
103. Fucile, S. Ca²⁺ permeability of nicotinic acetylcholine receptors / *Cell Calcium*. - 2004. - V. 35. - P. 1–8.
104. Fucile, S. Fractional Ca²⁺ current through human neuronal $\alpha 7$

- nicotinic acetylcholine receptors / M. Renzi, P. Lax, F. Eusebi // *Cell Calcium*. - 2003. - V. 34. - P. 205–209.
105. Futagi, D. Ryanodine-receptor-driven intracellular calcium dynamics underlying spatial association of synaptic plasticity / K. Kitano // *J. Comput. Neurosci.* - 2015. - V. 39. - P. 329–347.
106. Gackière, F. Functional coupling between large-conductance potassium channels and Cav3.2 voltage-dependent calcium channels participates in prostate cancer cell growth / M. Warnier, M. Katsogiannou, S. Derouiche, P. Delcourt, E. Dewailly, C. Slomianny, S. Humez, N. Prevarskaya, M. Roudbaraki, P. Mariot // *Biol. Open*. - 2013. - V. 2. - P. 941–951.
107. Gadotti, V.M. Small organic molecule disruptors of Cav3.2 - USP5 interactions reverse inflammatory and neuropathic pain / A.G. Caballero, N.D. Berger, C.M. Gladding, L. Chen, T.A. Pfeifer, G.W. Zamponi // *Mol. Pain*. - 2015. - V. 11
108. Garaschuk, O. Targeted bulk-loading of fluorescent indicators for two-photon brain imaging in vivo / R.I. Milos, A. Konnerth // *Nat. Protoc.* - 2006. - V. 1. - P. 380–386.
109. García-Caballero, A. The deubiquitinating enzyme USP5 modulates neuropathic and inflammatory pain by enhancing Cav3.2 channel activity / V.M. Gadotti, P. Stemkowski, N. Weiss, I.A. Souza, V. Hodgkinson, C. Bladen, L. Chen, J. Hamid, A. Pizzoccaro, M. Deage, A. François, E. Bourinet, G.W. Zamponi // *Neuron*. - 2014. - V. 83. - P. 1144–1158.
110. Garcia, N. Involvement of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in the functional elimination of synaptic contacts at polyinnervated neuromuscular synapses during development / M.M. Santafe, M. Tomàs, M.A. Lanuza, N. Besalduch, J. Tomàs // *J. Neurosci. Res.* - 2010. - V. 88. - P. 1406–1419.
111. Garcia, N. Expression of muscarinic acetylcholine receptors (M1-, M2-, M3- and M4-type) in the neuromuscular junction of the newborn and

- adult rat / M.M. Santafé, I. Salon, M.A. Lanuza, J. Tomàs // *Histol. Histopathol.* - 2005. - V. 20. - P. 733–743.
112. Garcia, N. Involvement of the Voltage-Gated Calcium Channels L-P/Q- and N-Types in Synapse Elimination During Neuromuscular Junction Development / P. Hernández, M.A. Lanuza, M. Tomàs, V. Cilleros-Mañé, L. Just-Borràs, M. Duran-Vigara, A. Polishchuk, M. Balanyà-Segura, J. Tomàs // *Mol. Neurobiol.* - 2022. -
113. Garcia, N. Adenosine A1 and A2A receptor-mediated modulation of acetylcholine release in the mice neuromuscular junction / M. Priego, T. Obis, M.M. Santafe, M. Tomàs, N. Besalduch, Ma. Lanuza, J. Tomàs // *Eur. J. Neurosci.* - 2013. - V. 38. - P. 2229–2241.
114. Garcia, N. The Interaction between Tropomyosin-Related Kinase B Receptors and Presynaptic Muscarinic Receptors Modulates Transmitter Release in Adult Rodent Motor Nerve Terminals / M. Tomas, M.M. Santafe, N. Besalduch, M.A. Lanuza, J. Tomas // *J. Neurosci.* - 2010. - V. 30. - P. 16514–16522.
115. Garduño, J. Presynaptic $\alpha 4\beta 2$ nicotinic acetylcholine receptors increase glutamate release and serotonin neuron excitability in the dorsal raphe nucleus / L. Galindo-Charles, J. Jiménez-Rodríguez, E. Galarraga, D. Tapia, S. Mihailescu, S. Hernandez-Lopez // *J. Neurosci.* - 2012. - V. 32. - P. 15148–15157.
116. Gaydukov, A.E. Facilitation of acetylcholine secretion in mouse motor synapses caused by calcium release from depots upon activation of L-type calcium channels / S.N. Melnikova, O.P. Balezina // *Bull. Exp. Biol. Med.* - 2009. - V. 148. - P. 163–166.
117. Gee, K.R. Chemical and physiological characterization of fluo-4 Ca(2+)-indicator dyes / K.A. Brown, W.N.U. Chen, J. Bishop-Stewart, D. Gray, I. Johnson // *Cell Calcium.* - 2000. - V. 27. - P. 97–106.
118. Goldey, G.J. Removable cranial windows for long-term imaging in awake mice / D.K. Roumis, L.L. Glickfeld, A.M. Kerlin, R.C. Reid, V.

- Bonin, D.P. Schafer, M.L. Andermann // *Nat. Protoc.* - 2014. - V. 9. - P. 2515–2538.
119. Gotti, C. Neuronal nicotinic receptors: From structure to pathology / F. Clementi // *Prog. Neurobiol.* - 2004. - V. 74. - P. 363–396.
120. Gotti, C. Human neuronal nicotinic receptors / D. Fornasari, F. Clementi // *Prog. Neurobiol.* - 1997. - V. 53. - P. 199–237.
121. Gotti, C. Brain nicotinic acetylcholine receptors: native subtypes and their relevance / M. Zoli, F. Clementi // *Trends Pharmacol. Sci.* - 2006. - V. 27. - P. 482–491.
122. Granatiero, V. The use of aequorin and its variants for Ca²⁺ measurements / M. Patron, A. Tosatto, G. Merli, R. Rizzuto // *Cold Spring Harb. Protoc.* - 2014. - V. 2014. - P. 9–16.
123. Gray, A.C. Neuronal calcium channels: Splicing for optimal performance / J. Raingo, D. Lipscombe // *Cell Calcium.* - 2007. - V. 42. - P. 409.
124. Grishin, S.N. Transmembrane calcium current: Mechanism, registration procedures, Ca²⁺-mediated modulators of synaptic transmission / *Biol. Membr.* - 2014. - V. 31. - P. 155–167.
125. Grødem, S. An updated suite of viral vectors for in vivo calcium imaging using local and retro-orbital injections / I. Nymo, G.H. Vatne, V. Bjørnsdottir, K.K. Lensjø, M. Fyhn // *bioRxiv.* - 2021. - . - P. 2021.05.14.443815.
126. Grutzendler, J. Rapid labeling of neuronal populations by ballistic delivery of fluorescent dyes / J. Tsai, W.B. Gan // *Methods.* - 2003. - V. 30. - P. 79–85.
127. Grynkiewicz, G. A new generation of ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties / M. Poenie, R.Y. Tsien // *J. Biol. Chem.* - 1985. - V. 260. - P. 3440–3450.
128. Gu, Q. N-acetylcysteine prevents verapamil-induced cardiotoxicity with no effect on the noradrenergic arch-associated neurons in zebrafish / J.

- Rodgers, B. Robinson, J. Kanungo // *Food Chem. Toxicol.* - 2020. - V. 144
129. Hagiwara, S. Voltage clamp analysis of two inward current mechanisms in the egg cell membrane of a starfish / S. Ozawa, O. Sand // *J. Gen. Physiol.* - 1975. - V. 65. - P. 617–644.
130. Hamodi, A.S. Transverse sinus injections drive robust whole-brain expression of transgenes / A.M. Sabino, N.D. Fitzgerald, D. Moschou, M.C. Crair // *Elife.* - 2020. - V. 9. - P. 1–16.
131. Heidelberger, R. Calcium dependence of the rate of exocytosis in a synaptic terminal / C. Heinemann, E. Neher, G. Matthews // *Nat.* 1994 3716497. - 1994. - V. 371. - P. 513–515.
132. Helton, T.D. Neuronal L-type calcium channels open quickly and are inhibited slowly / W. Xu, D. Lipscombe // *J. Neurosci.* - 2005. - V. 25. - P. 10247–10251.
133. Herlitze, S. Modulation of Ca²⁺ channels by G-protein beta gamma subunits / D.E. Garcla, K. Mackle, B. Hille, T. Scheuer, W.A. Catterall // *Nature.* - 1996. - V. 380. - P. 258–262.
134. Hernández-Ochoa, E.O. Ca²⁺ signal summation and NFATc1 nuclear translocation in sympathetic ganglion neurons during repetitive action potentials / M. Contreras, Z. Cseresnyés, M.F. Schneider // *Cell Calcium.* - 2007. - V. 41. - P. 559–571.
135. Hill, J.M. Three-dimensional solution structure of μ -conotoxin GIIB, a specific blocker of skeletal muscle sodium channels / P.F. Alewood, D.J. Craik // *Biochemistry.* - 1996. - V. 35. - P. 8824–8835.
136. Hofer, A.M. Measurement of free [Ca²⁺] changes in agonist-sensitive internal stores using compartmentalized fluorescent indicators. / *Methods Mol. Biol.* - 1999. - V. 114. - P. 249–265.
137. Hogan, P.G. Store-operated calcium entry: Mechanisms and modulation / A. Rao // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* - 2015. - V. 460. - P. 40–49.
138. Hogg, R.C. Nicotinic acetylcholine receptors: from structure to brain

- function / M. Raggenbass, D. Bertrand // *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* - 2003. - V. 147. - P. 1–46.
139. Hogg, R.C. Nicotinic acetylcholine receptors: from structure to brain function. / M. Raggenbass, D. Bertrand // *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* - 2003. - V. 147. - P. 1–46.
140. Houlihan, L.M. Effects of diltiazem on human nicotinic acetylcholine and GABA(A) receptors / E.Y. Slater, D.J. Beadle, R.J. Lukas, I. Bermudez // *Neuropharmacology.* - 2000. - V. 39. - P. 2533–2542.
141. Hsiao, B. Subunit-dependent modulation of neuronal nicotinic receptors by zinc / D. Dweck, C.W. Luetje // *J. Neurosci.* - 2001. - V. 21. - P. 1848–1856.
142. Huang, W. Structural insights into μ -opioid receptor activation / A. Manglik, A.J. Venkatakrisnan, T. Laeremans, E.N. Feinberg, A.L. Sanborn, H.E. Kato, K.E. Livingston, T.S. Thorsen, R.C. Kling, S. Granier, P. Gmeiner, S.M. Husbands, J.R. Traynor, W.I. Weis, J. Steyaert, R.O. Dror, B.K. Kobilka // *Nature.* - 2015. - V. 524. - P. 315–321.
143. Hubbard, J.I. On the mechanism by which calcium and magnesium affect the release of transmitter by nerve impulses / S.F. Jones, E.M. Landau // *J. Physiol.* - 1968. - V. 196. - P. 75.
144. Huguenard, J.R. A novel T-type current underlies prolonged $\text{Ca}(2+)$ -dependent burst firing in GABAergic neurons of rat thalamic reticular nucleus / D.A. Prince // *J. Neurosci.* - 1992. - V. 12. - P. 3804–3817.
145. Ikeda, S.R. Voltage-dependent modulation of N-type calcium channels by G-protein beta gamma subunits / *Nature.* - 1996. - V. 380. - P. 255–258.
146. Jacus, M.O. Presynaptic $\text{CaV}3.2$ Channels Regulate Excitatory Neurotransmission in Nociceptive Dorsal Horn Neurons / V.N. Uebele, J.J. Renger, S.M. Todorovic // *J. Neurosci.* - 2012. - V. 32. - P. 9374–9382.
147. Jagodic, M.M. Cell-specific alterations of T-type calcium current in painful diabetic neuropathy enhance excitability of sensory neurons / S.

- Pathirathna, M.T. Nelson, S. Mancuso, P.M. Joksovic, E.R. Rosenberg, D.A. Bayliss, V. Jevtovic-Todorovic, S.M. Todorovic // *J. Neurosci.* - 2007. - V. 27. - P. 3305–3316.
148. Jarvis, S.E. Distinct molecular determinants govern syntaxin 1A-mediated inactivation and G-protein inhibition of N-type calcium channels / G.W. Zamponi // *J. Neurosci.* - 2001. - V. 21. - P. 2939–2948.
149. Jarvis, S.E. G protein modulation of N-type calcium channels is facilitated by physical interactions between syntaxin 1A and Gbetagamma / J.M. Magga, A.M. Beedle, J.E.A. Braun, G.W. Zamponi // *J. Biol. Chem.* - 2000. - V. 275. - P. 6388–6394.
150. Jenkins, M.A. Ca²⁺-Dependent facilitation of cav1.3 ca²⁺ channels by densin and ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II / C.J. Christel, Y. Jiao, S. Abiria, K.Y. Kim, Y.M. Usachev, G.J. Obermair, R.J. Colbran, A. Lee // *J. Neurosci.* - 2010. - V. 30. - P. 5125–5135.
151. Jochenning, F.W. Ryanodine Receptor Activation Induces Long-Term Plasticity of Spine Calcium Dynamics / A.K. Theis, U. Pannasch, M. Rückl, S. Rüdiger, D. Schmitz // *PLOS Biol.* - 2015. - V. 13. - P. e1002181.
152. Jones, L.P. G-protein modulation of N-type calcium channel gating current in human embryonic kidney cells (HEK 293) / P.G. Patil, T.P. Snutch, D.T. Yue // *J. Physiol.* - 1997. - V. 498 (Pt 3). - P. 601–610.
153. Judkewitz, B. Targeted single-cell electroporation of mammalian neurons in vivo / M. Rizzi, K. Kitamura, M. Häusser // *Nat. Protoc.* - 2009. - V. 4. - P. 862–869.
154. Juhaszova, M. Location of calcium transporters at presynaptic terminals / P. Church, M.P. Blaustein, E.F. Stanley // *Eur. J. Neurosci.* - 2000. - V. 12. - P. 839–846.
155. Kang, J.S. Docking of Axonal Mitochondria by Syntaphilin Controls Their Mobility and Affects Short-Term Facilitation / J.H. Tian, P.Y. Pan, P. Zald, C. Li, C. Deng, Z.H. Sheng // *Cell.* - 2008. - V. 132. - P. 137–148.
156. Karadsheh, M.S. Functional characterization of mouse $\alpha 4\beta 2$ nicotinic

- acetylcholine receptors stably expressed in HEK293T cells / M.S. Shah, X. Tang, R.L. Macdonald, J.A. Stitzel // *J. Neurochem.* - 2004. - V. 91. - P. 1138–1150.
157. Katz B. The release of neural transmitter substances / Liverpool Univ. Press. - 1969. - . - P. 5–39.
158. Katz, B. The effect of calcium on acetylcholine release from motor nerve terminals / R. Miledi // *Proc. R. Soc. London. Ser. B, Biol. Sci.* - 1965. - V. 161. - P. 496–503.
159. Katz, B. Spontaneous and evoked activity of motor nerve endings in calcium ringer / R. Miledi // *J. Physiol.* - 1969. - V. 203. - P. 689–706.
160. Katz, E. Calcium channels involved in synaptic transmission at the mature and regenerating mouse neuromuscular junction / P.A. Ferro, G. Weisz, O.D. Uchitel // *J. Physiol.* - 1996. - V. 497. - P. 687–697.
161. Katz, E. Effects of Ca²⁺ channel blocker neurotoxins on transmitter release and presynaptic currents at the mouse neuromuscular junction / D.A. Protti, P.A. Ferro, M.D. Rosato Siri, O.D. Uchitel // *Br. J. Pharmacol.* - 1997. - V. 121. - P. 1531–1540.
162. Khaziev, E.F. Decreased entry of calcium into motor nerve endings upon activation of presynaptic cholinergic receptors / N.F. Fatikhov, D. V. Samigullin, G.L. Barrett, E.A. Bukharaeva, E.E. Nikolsky // *Dokl. Biol. Sci.* 2012 4461. - 2012. - V. 446. - P. 283–285.
163. Khaziev, E.F. ATP reduces the entry of calcium ions into the nerve ending by Blocking L-type calcium channels / D. V. Samigullin, A.N. Tsentsevitsky, E.A. Bukharaeva, E.E. Nikolsky // *Acta Naturae.* - 2018. - V. 10. - P. 93–96.
164. Khaziev, E. Acetylcholine-induced inhibition of presynaptic calcium signals and transmitter release in the frog neuromuscular junction / D. Samigullin, N. Zhilyakov, N. Fatikhov, E. Bukharaeva, A. Verkhratsky, E. Nikolsky // *Front. Physiol.* - 2016. - V. 7. - P. 1–10.
165. Khosravani, H. Voltage-gated calcium channels and idiopathic

- generalized epilepsies / G.W. Zamponi // *Physiol. Rev.* - 2006. - V. 86. - P. 941–966.
166. Khuzakhmetova, V.F. The role of presynaptic ryanodine receptors in regulation of the kinetics of the acetylcholine quantal release in the mouse neuromuscular junction / D. V. Samigullin, E.A. Bukharaeva // *Biochem. Suppl. Ser. A Membr. Cell Biol.* - 2014. - V. 8. - P. 144–152.
167. Khuzakhmetova, V. Kinetics of neurotransmitter release in neuromuscular synapses of newborn and adult rats / D. Samigullin, L. Nurullin, F. Vyskočil, E. Nikolsky, E. Bukharaeva // *Int. J. Dev. Neurosci.* - 2014. - V. 34. - P. 9–18.
168. Kim, J.Y. Intracerebroventricular viral injection of the neonatal mouse brain for persistent and widespread neuronal transduction / S.D. Grunke, Y. Levites, T.E. Golde, J.L. Jankowsky // *J. Vis. Exp.* - 2014. -
169. Kim, M.H. Interplay between Na⁺/Ca²⁺ Exchangers and Mitochondria in Ca²⁺ Clearance at the Calyx of Held / N. Korogod, R. Schneggenburger, W.K. Ho, S.H. Lee // *J. Neurosci.* - 2005. - V. 25. - P. 6057.
170. Kirichok, Y. The mitochondrial calcium uniporter is a highly selective ion channel / G. Krapivinsky, D.E. Clapham // *Nature.* - 2004. - V. 427. - P. 360–364.
171. Kisilevsky, A.E. D1 receptors physically interact with N-type calcium channels to regulate channel distribution and dendritic calcium entry / S.J. Mulligan, C. Altier, M.C. Iftinca, D. Varela, C. Tai, L. Chen, S. Hameed, J. Hamid, B.A. MacVicar, G.W. Zamponi // *Neuron.* - 2008. - V. 58. - P. 557–570.
172. Kostyuk, P.G. Effect of internal fluoride and phosphate on membrane currents during intracellular dialysis of nerve cells / O.A. Krishtal, V.I. Pidoplichko // *Nature.* - 1975. - V. 257. - P. 691–693.
173. Kostyuk, P.G. Separation of sodium and calcium currents in the somatic membrane of mollusc neurones. With an Appendix by Yu A.

- Shakhovalov / O.A. Krishtal, Y.A. Shakhovalov // *J. Physiol.* - 1977. - V. 270. - P. 545.
174. Kruse, A.C. Activation and allosteric modulation of a muscarinic acetylcholine receptor / A.M. Ring, A. Manglik, J. Hu, K. Hu, K. Eitel, H. Hübner, E. Pardon, C. Valant, P.M. Sexton, A. Christopoulos, C.C. Felder, P. Gmeiner, J. Steyaert, W.I. Weis, K.C. Garcia, J. Wess, B.K. Kobilka // *Nature.* - 2013. - V. 504. - P. 101–106.
175. Kubista, H. Molecular mechanisms underlying the modulation of exocytotic noradrenaline release via presynaptic receptors / S. Boehm // *Pharmacol. Ther.* - 2006. - V. 112. - P. 213–242.
176. Kurtz, R. Application of multiline two-photon microscopy to functional in vivo imaging / M. Fricke, J. Kalb, P. Tinnefeld, M. Sauer // *J. Neurosci. Methods.* - 2006. - V. 151. - P. 276–286.
177. Kwon, S.K. Effects of shallow trench isolation on low frequency noise characteristics of source-follower transistors in CMOS image sensors / H.M. Kwon, W. Il Choi, H.S. Song, H.D. Lee // *Solid. State. Electron.* - 2016. - V. 119. - P. 29–32.
178. Lagerström, M.C. Structural diversity of G protein-coupled receptors and significance for drug discovery / H.B. Schiöth // *Nat. Rev. Drug Discov.* 2008 74. - 2008. - V. 7. - P. 339–357.
179. Lampe, S.E.G. Intravenous injections in neonatal mice / B.K. Kaspar, K.D. Foust // *J. Vis. Exp.* - 2014. -
180. Lazniewska, J. Cooperative roles of glucose and asparagine-linked glycosylation in T-type calcium channel expression / Y. Rzhepetsky, F.X. Zhang, G.W. Zamponi, N. Weiss // *Pflugers Arch.* - 2016. - V. 468. - P. 1837–1851.
181. Le Novere, N. Molecular evolution of the nicotinic acetylcholine receptor: an example of multigene family in excitable cells / J.P. Changeux // *J. Mol. Evol.* - 1995. - V. 40. - P. 155–172.
182. Lee, J.H. Cloning and expression of a novel member of the low

- voltage-activated T-type calcium channel family / A.N. Daud, L.L. Cribbs, A.E. Lacerda, A. Pereverzev, U. Klöckner, T. Schneider, E. Perez-Reyes // *J. Neurosci.* - 1999. - V. 19. - P. 1912–1921.
183. Lee, S.H. Na⁺/Ca²⁺ Exchange and Ca²⁺ Homeostasis in Axon Terminals of Mammalian Central Neurons / M.H. Kim, J.Y. Lee, H.L. Sang, D. Lee, H.P. Kyeong, W.K. Ho // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* - 2007. - V. 1099. - P. 396–412.
184. Lendvai, B. Nonsynaptic chemical transmission through nicotinic acetylcholine receptors / E.S. Vizi // *Physiol. Rev.* - 2008. - V. 88. - P. 333–349.
185. Levey, A.I. Localization of muscarinic m3 receptor protein and M3 receptor binding in rat brain / S.M. Edmunds, C.J. Heilman, T.J. Desmond, K.A. Frey // *Neuroscience.* - 1994. - V. 63. - P. 207–221.
186. Levey, A.I. Immunological localization of m1-m5 muscarinic acetylcholine receptors in peripheral tissues and brain / *Life Sci.* - 1993. - V. 52. - P. 441–448.
187. Liao, P. Alternative splicing of voltage-gated calcium channels: from molecular biology to disease / H.Y. Zhang, T.W. Soong // *Pflugers Arch.* - 2009. - V. 458. - P. 481–487.
188. Lilley, E. ARRIVE 2.0 and the British Journal of Pharmacology: Updated guidance for 2020 / S.C. Stanford, D.E. Kendall, S.P.H. Alexander, G. Cirino, J.R. Docherty, C.H. George, P.A. Insel, A.A. Izzo, Y. Ji, R.A. Panettieri, C.G. Sobey, B. Stefanska, G. Stephens, M. Teixeira, A. Ahluwalia // *Br. J. Pharmacol.* - 2020. - V. 177. - P. 3611–3616.
189. Lindstrom, J. The Structures of Neuronal Nicotinic Receptors / 2000. - . - P. 101–162.
190. Lindstrom, J. Nicotinic acetylcholine receptors in health and disease / *Mol. Neurobiol.* - 1997. - V. 15. - P. 193–222.
191. Lipscombe, D. L-type calcium channels: The low down / T.D. Helton, W. Xu // *J. Neurophysiol.* - 2004. - V. 92. - P. 2633–2641.

192. Liu, Q. Presynaptic Ryanodine Receptors Are Required for Normal Quantal Size at the *Caenorhabditis elegans* Neuromuscular Junction / B. Chen, M. Yankova, D.K. Morest, E. Maryon, A.R. Hand, M.L. Nonet, Z.W. Wang // *J. Neurosci.* - 2005. - V. 25. - P. 6745.
193. Loane, D.J. Co-assembly of N-type Ca²⁺ and BK channels underlies functional coupling in rat brain / P.A. Lima, N. V. Marrion // *J. Cell Sci.* - 2007. - V. 120. - P. 985–995.
194. Luetje, C.W. Both alpha- and beta-subunits contribute to the agonist sensitivity of neuronal nicotinic acetylcholine receptors / J. Patrick // *J. Neurosci.* - 1991. - V. 11. - P. 837–845.
195. Ma, H. Exploring the dominant role of Cav1 channels in signalling to the nucleus / S. Cohen, B. Li, R.W. Tsien // *Biosci. Rep.* - 2013. - V. 33. - P. 97–101.
196. Ma, T. Molecular mechanism of the allosteric regulation of the $\alpha\gamma$ heterodimer of human NAD-dependent isocitrate dehydrogenase / Y. Peng, W. Huang, J. Ding // *Sci. Reports* 2017 71. - 2017. - V. 7. - P. 1–17.
197. MacAskill, A.F. Miro1 Is a Calcium Sensor for Glutamate Receptor-Dependent Localization of Mitochondria at Synapses / J.E. Rinholm, A.E. Twelvetrees, I.L. Arancibia-Carcamo, J. Muir, A. Fransson, P. Aspenstrom, D. Attwell, J.T. Kittler // *Neuron.* - 2009. - V. 61. - P. 541–555.
198. MacDermott, A.B. Presynaptic ionotropic receptors and the control of transmitter release. / L.W. Role, S.A. Siegelbaum // *Annu. Rev. Neurosci.* - 1999. - V. 22. - P. 443–85.
199. Macleod, G.T. Forward-Filling of Dextran-Conjugated Indicators for Calcium Imaging at the *Drosophila* Larval Neuromuscular Junction / *Cold Spring Harb. Protoc.* - 2012. - V. 2012. - P. [pdb.prot070094](#).
200. Madisen, L. Transgenic mice for intersectional targeting of neural sensors and effectors with high specificity and performance / A.R. Garner, D. Shimaoka, A.S. Chuong, N.C. Klapoetke, L. Li, A. van der Bourg, Y. Niino, L. Egolf, C. Monetti, H. Gu, M. Mills, A. Cheng, B. Tasic, T.N.

- Nguyen, S.M. Sunkin, A. Benucci, A. Nagy, A. Miyawaki, F. Helmchen, R.M. Empson, T. Knöpfel, E.S. Boyden, R.C. Reid, M. Carandini, H. Zeng // *Neuron*. - 2015. - V. 85. - P. 942–958.
201. Mallart, A. Electric current flow inside perineurial sheaths of mouse motor nerves. / 1985. - V. 368
202. Mangialavori, I. Determination of the Dissociation Constants for Ca²⁺ and Calmodulin from the Plasma Membrane Ca²⁺ Pump by a Lipid Probe That Senses Membrane Domain Changes / M. Ferreira-Gomes, M.F. Pignataro, E.E. Strehler, J.P.F.C. Rossi // *J. Biol. Chem.* - 2010. - V. 285. - P. 123–130.
203. Manglik, A. Structural Insights into the Dynamic Process of β 2-Adrenergic Receptor Signaling / T.H. Kim, M. Masureel, C. Altenbach, Z. Yang, D. Hilger, M.T. Lerch, T.S. Kobilka, F.S. Thian, W.L. Hubbell, R.S. Prosser, B.K. Kobilka // *Cell*. - 2015. - V. 161. - P. 1101–1111.
204. McGehee, D.S. Physiological diversity of nicotinic acetylcholine receptors expressed by vertebrate neurons / L.W. Role // *Annu. Rev. Physiol.* - 1995. - V. 57. - P. 521–546.
205. McKay, K.M. Psychiatrist effects in the psychopharmacological treatment of depression / Z.E. Imel, B.E. Wampold // *J. Affect. Disord.* - 2006. - V. 92. - P. 287–290.
206. Menéndez Pérez, B. Activation of molecular oxygen and its use in stereoselective tetrahydrofuran-syntheses from δ,ϵ -unsaturated alcohols / D. Schuch, J. Hartung // *Org. Biomol. Chem.* - 2008. - V. 6. - P. 3532–3541.
207. Meriney, S.D. Ionotropic receptors / E.E. Faselow // *Synaptic Transm.* - 2019. - . - P. 215–243.
208. Meriney, S.D. Calcium homeostasis, calcium channels, and transmitter release / E.E. Faselow // *Synaptic Transm.* - 2019. -
209. Miller, P.S. Binding, activation and modulation of Cys-loop receptors / T.G. Smart // *Trends Pharmacol. Sci.* - 2010. - V. 31. - P. 161–174.
210. Miller, R.J. Presynaptic receptors. / *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* -

1998. - V. 38. - P. 201–27.
211. Miller, R.J. Receptor-mediated regulation of calcium channels and neurotransmitter release. / *FASEB J.* - 1990. - V. 4. - P. 3291–9.
212. Minenko, M.L. [Phenomenon of asynchrony of induced mediator release at the neuromuscular junction of the frog]. / L.G. Magazanik // *Neirofiziologija = Neurophysiol.* - 1986. - V. 18. - P. 346–54.
213. Minic, J. Regulation of acetylcholine release by muscarinic receptors at the mouse neuromuscular junction depends on the activity of acetylcholinesterase / J. Molgó, E. Karlsson, E. Krejci // *Eur. J. Neurosci.* - 2002. - V. 15. - P. 439–448.
214. Minta, A. Fluorescent indicators for cytosolic calcium based on rhodamine and fluorescein chromophores / J.P.Y. Kao, R.Y. Tsien // *J. Biol. Chem.* - 1989. - V. 264. - P. 8171–8178.
215. Miriel, V.A. Local and cellular Ca²⁺ transients in smooth muscle of pressurized rat resistance arteries during myogenic and agonist stimulation / J.R.H. Mauban, M.P. Blaustein, W.G. Wier // *J. Physiol.* - 1999. - V. 518 (Pt 3). - P. 815–824.
216. Miyamoto, M.D. The actions of cholinergic drugs on motor nerve terminals. / *Pharmacol. Rev.* - 1977. - V. 29. - P. 221–47.
217. Mochida, S. Inhibition of neurotransmission by peptides containing the synaptic protein interaction site of N-type Ca²⁺ channels / Z.H. Sheng, C. Baker, H. Kobayashi, W.A. Catterall // *Neuron.* - 1996. - V. 17. - P. 781–788.
218. Mori, Y. Primary structure and functional expression from complementary DNA of a brain calcium channel / T. Friedrich, M.S. Kim, A. Mikami, J. Nakai, P. Ruth, E. Bosse, F. Hofmann, V. Flockerzi, T. Furuichi, K. Mikoshiba, K. Imoto, T. Tanabe, S. Numa // *Nature.* - 1991. - V. 350. - P. 398–402.
219. Moroni, M. Stoichiometry and pharmacology of two human alpha4beta2 nicotinic receptor types / I. Bermudez // *J. Mol. Neurosci.* -

2006. - V. 30. - P. 95–96.
220. Nadler, L.S. Molecular analysis of the regulation of muscarinic receptor expression and function / M.L. Rosoff, S.E. Hamilton, A.E. Kalaydjian, L.A. McKinnon, N.M. Nathanson // *Life Sci.* - 1999. - V. 64. - P. 375–379.
221. Nagayama, S. In vivo simultaneous tracing and Ca(2+) imaging of local neuronal circuits / S. Zeng, W. Xiong, M.L. Fletcher, A. V. Masurkar, D.J. Davis, V.A. Pieribone, W.R. Chen // *Neuron.* - 2007. - V. 53. - P. 789–803.
222. Nakai, J. A high signal-to-noise Ca²⁺ probe composed of a single green fluorescent protein / M. Ohkura, K. Imoto // *Nat. Biotechnol.* 2001 192. - 2001. - V. 19. - P. 137–141.
223. Neely, M.D. Combination of DiOlistic Labeling with Retrograde Tract Tracing and Immunohistochemistry / G.D. Stanwood, A.Y. Deutch // *J. Neurosci. Methods.* - 2009. - V. 184. - P. 332.
224. Neher, E. Multiple roles of calcium ions in the regulation of neurotransmitter release / T. Sakaba // *Neuron.* - 2008. - V. 59. - P. 861–872.
225. Nelson, M.E. Alternate stoichiometries of alpha4beta2 nicotinic acetylcholine receptors / A. Kuryatov, C.H. Choi, Y. Zhou, J. Lindstrom // *Mol. Pharmacol.* - 2003. - V. 63. - P. 332–341.
226. Newman, Z. Endocannabinoids mediate muscarine-induced synaptic depression at the vertebrate neuromuscular junction. / P. Malik, T.-Y. Wu, C. Ochoa, N. Watsa, C. Lindgren // *Eur. J. Neurosci.* - 2007. - V. 25. - P. 1619–30.
227. Nikolsky, E.E. Cholinergic regulation of the evoked quantal release at frog neuromuscular junction. / F. Vyskocil, E.A. Bukharaeva, D. Samigullin, L.G. Magazanik // *J. Physiol.* - 2004. - V. 560. - P. 77–88.
228. Nilius, B. Possible functional significance of a novel type of cardiac Ca channel / *Biomed. Biochim. Acta.* - 1986. - V. 45
229. Nowycky, M.C. Three types of neuronal calcium channel with

- different calcium agonist sensitivity / A.P. Fox, R.W. Tsien // *Nat.* 1985 3166027. - 1985. - V. 316. - P. 440–443.
230. Nurullin, L.F. Voltage-dependent P/Q-type calcium channels at the frog: Neuromuscular junction / A.R. Mukhitov, A.N. Tsentsevitsky, N. V. Petrova, D. V. Samigullin, A.I. Malomouzh, E.A. Bukharaeva, F. Vyskočil, E.E. Nikolsky // *Physiol. Res.* - 2011. - V. 60. - P. 815–823.
231. Nygaard, R. The dynamic process of $\beta(2)$ -adrenergic receptor activation / Y. Zou, R.O. Dror, T.J. Mildorf, D.H. Arlow, A. Manglik, A.C. Pan, C.W. Liu, J.J. Fung, M.P. Bokoch, F.S. Thian, T.S. Kobilka, D.E. Shaw, L. Mueller, R.S. Prosser, B.K. Kobilka // *Cell.* - 2013. - V. 152. - P. 532–542.
232. O'Connor, N. Ratio imaging: practical considerations for measuring intracellular Ca^{2+} and pH in living cells / R.B. Silver // *Methods Cell Biol.* - 2013. - V. 114. - P. 387–406.
233. Oliveira, L. Negative crosstalk between M1 and M2 muscarinic autoreceptors involves endogenous adenosine activating A1 receptors at the rat motor endplate / M.A. Timóteo, P. Correia-de-Sá // *Neurosci. Lett.* - 2009. - V. 459. - P. 127–131.
234. Orestes, P. Reversal of neuropathic pain in diabetes by targeting glycosylation of $\text{Ca}(\text{V})_{3.2}$ T-type calcium channels / H.P. Osuru, W.E. McIntire, M.O. Jacus, R. Salajegheh, M.M. Jagodic, W.J. Choe, J.H. Lee, S.S. Lee, K.E. Rose, N. Pairo, M.R. DiGrucchio, K. Krishnan, D.F. Covey, J.H. Lee, P.Q. Barrett, V. Jevtovic-Todorovic, S.M. Todorovic // *Diabetes.* - 2013. - V. 62. - P. 3828–3838.
235. Ozawa, T. Modulation of ryanodine receptor Ca^{2+} channels / *Mol. Med. Rep.* - 2010. - V. 3. - P. 199–204.
236. Pagani, R. Differential expression of $\alpha 1$ and β subunits of voltage dependent Ca^{2+} channel at the neuromuscular junction of normal and P/Q Ca^{2+} channel knockout mouse / M. Song, M. Mcenery, N. Qin, R.W. Tsien, L. Toro, E. Stefani, O.D. Uchitel // *Neuroscience.* - 2004. - V. 123. - P. 75–

- 85.
237. Palmer, A.A.E. Measuring calcium signaling using genetically targetable fluorescent indicators / R.T.-N. protocols, undefined 2006, R.Y. Tsien // 2006. - V. 1. - P. 1057–1065.
238. Palmer, A.E. Measuring calcium signaling using genetically targetable fluorescent indicators / R.Y. Tsien // Nat. Protoc. - 2006. - V. 1. - P. 1057–1065.
239. Palmgren, M.G. P-type ATPases / P. Nissen // Annu. Rev. Biophys. - 2011. - V. 40. - P. 243–266.
240. Palty, R. The mitochondrial Na⁺/Ca²⁺ exchanger / I. Sekler // Cell Calcium. - 2012. - V. 52. - P. 9–15.
241. Papke, R.L. Activation and inhibition of mouse muscle and neuronal nicotinic acetylcholine receptors expressed in xenopus oocytes / L. Wecker, J.A. Stitzel // J. Pharmacol. Exp. Ther. - 2010. - V. 333. - P. 501–518.
242. Pardo, N.E. Acetylcholine Release at Neuromuscular Junctions of Adult Tottering Mice Is Controlled by N-(Ca v 2.2) and R-Type (Ca v 2.3) but Not L-Type (Ca v 1.2) Ca²⁺ Channels / R.K. Hajela, W.D. Atchison // 2006. -
243. Paredes, R.M. Chemical calcium indicators / J.C. Etzler, L.T. Watts, W. Zheng, J.D. Lechleiter // Methods. - 2008. - V. 46. - P. 143–151.
244. Parnas, H. Autoreceptors, membrane potential and the regulation of transmitter release. / L. Segel, J. Dudel, I. Parnas // Trends Neurosci. - 2000. - V. 23. - P. 60–8.
245. Pellegrino, T. Hydrophobic nanocrystals coated with an amphiphilic polymer shell: A general route to water soluble nanocrystals / L. Manna, S. Kudera, T. Liedl, D. Koktysh, A.L. Rogach, S. Keller, J. Rädler, G. Natile, W.J. Parak // Nano Lett. - 2004. - V. 4. - P. 703–707.
246. Peng, Y. yi Release of LHRH is linearly related to the time integral of presynaptic Ca⁺ elevation above a threshold level in bullfrog sympathetic ganglia / R.S. Zucker // Neuron. - 1993. - V. 10. - P. 465–473.

247. Peng, Y. yi Release of LHRH is linearly related to the time integral of presynaptic Ca²⁺ elevation above a threshold level in bullfrog sympathetic ganglia / R.S. Zucker // *Neuron*. - 1993. - V. 10. - P. 465–473.
248. Penner, R. Two different presynaptic calcium currents in mouse motor nerve terminals / F. Dreyer // *Pflügers Arch. Eur. J. Physiol.* - 1986. - V. 406. - P. 190–197.
249. Percie du Sert, N. The arrive guidelines 2.0: Updated guidelines for reporting animal research / V. Hurst, A. Ahluwalia, S. Alam, M.T. Avey, M. Baker, W.J. Browne, A. Clark, I.C. Cuthill, U. Dirnagl, M. Emerson, P. Garner, S.T. Holgate, D.W. Howells, N.A. Karp, S.E. Lazic, K. Lidster, C.J. MacCallum, M. Macleod, E.J. Pearl, O.H. Petersen, F. Rawle, P. Reynolds, K. Rooney, E.S. Sena, S.D. Silberberg, T. Steckler, H. Würbel // *PLoS Biol.* - 2020. - V. 18
250. Perez-Reyes, E. Molecular characterization of a neuronal low-voltage-activated T-type calcium channel / L.L. Cribbs, A. Daud, A.E. Lacerda, J. Barclays, M.P. Williamson, M. Fox, M. Rees, J.H. Lee // *Nature*. - 1998. - V. 391. - P. 896–900.
251. Perez-Reyes, E. Molecular physiology of low-voltage-activated t-type calcium channels / *Physiol. Rev.* - 2003. - V. 83. - P. 117–161.
252. Pérez Koldenkova, V. Genetically encoded Ca(2+) indicators: properties and evaluation / T. Nagai // *Biochim. Biophys. Acta.* - 2013. - V. 1833. - P. 1787–1797.
253. Perissinotti, P.P. L-type calcium channels are involved in fast endocytosis at the mouse neuromuscular junction / B.G. Tropper, O.D. Uchitel // *Eur. J. Neurosci.* - 2008. - V. 27. - P. 1333–1344.
254. Petrov, K.A. Schwann cells sense and control acetylcholine spillover at the neuromuscular junction by $\alpha 7$ nicotinic receptors and butyrylcholinesterase / E. Girard, A.D. Nikitashina, C. Colasante, V. Bernard, L. Nurullin, J. Leroy, D. Samigullin, O. Colak, E. Nikolsky, B. Plaud, E. Krejci // *J. Neurosci.* - 2014. - V. 34. - P. 11870–11883.

255. Petrov, K.A. Autoregulation of acetylcholine release and micro-pharmacodynamic mechanisms at neuromuscular junction: Selective acetylcholinesterase inhibitors for therapy of myasthenic syndromes / E.E. Nikolsky, P. Masson // *Front. Pharmacol.* - 2018. - V. 9. - P. 766.
256. Picciotto, M.R. Nicotine as a modulator of behavior: Beyond the inverted U / *Trends Pharmacol. Sci.* - 2003. - V. 24. - P. 493–499.
257. Pilas, B. A flow cytometric method for measurement of intracellular chloride concentration in lymphocytes using the halide-specific probe 6-methoxy-N-(3-sulfopropyl) quinolinium (SPQ). / G. Durack // *Cytometry.* - 1997. - V. 28. - P. 316–322.
258. Pongs, O. Frequentin—A novel calcium-binding protein that modulates synaptic efficacy in the drosophila nervous system / J. Lindemeier, X.R. Zhu, T. Theil, D. Engelkamp, I. Krah-Jentgens, H. Lambrecht, K.W. Koch, J. Schwemer, R. Rivosecchi, A. Mallart, J. Galceran, I. Canal, J.A. Barbas, A. Ferrús // *Neuron.* - 1993. - V. 11. - P. 15–28.
259. Porter, A.C. M1 muscarinic receptor signaling in mouse hippocampus and cortex / F.P. Bymaster, N.W. DeLapp, M. Yamada, J. Wess, S.E. Hamilton, N.M. Nathanson, C.C. Felder // *Brain Res.* - 2002. - V. 944. - P. 82–89.
260. Prakriya, M. Store-Operated Orai Channels: Structure and Function / *Curr. Top. Membr.* - 2013. - V. 71. - P. 1–32.
261. Prior, C. Factors influencing the low-frequency associated nicotinic ACh autoreceptor-mediated depression of ACh release from rat motor nerve terminals / S. Singh // *Br. J. Pharmacol.* - 2000. - V. 129. - P. 1067–1074.
262. Prior, C. Prejunctional actions of muscle relaxants: Synaptic vesicles and transmitter mobilization as sites of action / L. Tian, J. Dempster, I.G. Marshall // *Gen. Pharmacol.* - 1995. - V. 26. - P. 659–666.
263. Protti, D.A. Effect of ω -conotoxin GVIA on neurotransmitter release at the mouse neuromuscular junction / L. Szczupak, F.S. Scornik, O.D.

- Uchitel // *Brain Res.* - 1991. - V. 557. - P. 336–339.
264. Protti, D.A. Transmitter release and presynaptic Ca^{2+} currents blocked by the spider toxin ω -aga-IVA / O.D. Uchitel // *Neuroreport.* - 1993. - V. 5. - P. 333–336.
265. Purves, D. *Neuroscience*. 2nd edition / S.M. Williams // 2001. -
266. Rasmussen, S.G.F. Structure of a nanobody-stabilized active state of the $\beta(2)$ adrenoceptor / H.J. Choi, J.J. Fung, E. Pardon, P. Casarosa, P.S. Chae, B.T. Devree, D.M. Rosenbaum, F.S. Thian, T.S. Kobilka, A. Schnapp, I. Konetzki, R.K. Sunahara, S.H. Gellman, A. Pautsch, J. Steyaert, W.I. Weis, B.K. Kobilka // *Nature.* - 2011. - V. 469. - P. 175–181.
267. Rasmussen, S.G.F. Crystal structure of the β_2 adrenergic receptor-Gs protein complex / B.T. Devree, Y. Zou, A.C. Kruse, K.Y. Chung, T.S. Kobilka, F.S. Thian, P.S. Chae, E. Pardon, D. Calinski, J.M. Mathiesen, S.T.A. Shah, J.A. Lyons, M. Caffrey, S.H. Gellman, J. Steyaert, G. Skiniotis, W.I. Weis, R.K. Sunahara, B.K. Kobilka // *Nature.* - 2011. - V. 477. - P. 549–557.
268. Rehak, R. Low Voltage Activation of KCa1.1 Current by Cav3-KCa1.1 Complexes / T.M. Bartoletti, J.D.T. Engbers, G. Berecki, R.W. Turner, G.W. Zamponi // *PLoS One.* - 2013. - V. 8. - P. e61844.
269. Reiner, N.E. *Methods in molecular biology. Macrophages and dendritic cells. Methods and protocols. Preface* / *Methods Mol. Biol.* - 2009. - V. 531
270. Rettig, J. Isoform-specific interaction of the α_1A subunits of brain Ca^{2+} channels with the presynaptic proteins syntaxin and SNAP-25. / Z.H. Sheng, D.K. Kim, C.D. Hodson, T.P. Snutch, W.A. Catterall // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* - 1996. - V. 93. - P. 7363.
271. Richards, K.S. Novel CaV2.1 clone replicates many properties of Purkinje cell CaV2.1 current / A.M. Swensen, D. Lipscombe, K. Bommert // *Eur. J. Neurosci.* - 2007. - V. 26. - P. 2950–2961.
272. Role, L.W. Nicotinic receptors in the development and modulation of

- CNS synapses / D.K. Berg // *Neuron*. - 1996. - V. 16. - P. 1077–1085.
273. Rosenbaum, D.M. The structure and function of G-protein-coupled receptors / S.G.F. Rasmussen, B.K. Kobilka // *Nat.* 2009 4597245. - 2009. - V. 459. - P. 356–363.
274. Rossano, A.J. Loading *Drosophila* Nerve Terminals with Calcium Indicators / G.T. Macleod // *J. Vis. Exp.* - 2007. - . - P. e250.
275. Rudolf, R. Looking forward to seeing calcium / M. Mongillo, R. Rizzuto, T. Pozzan // 2003. - V. 4. - P. 579–586.
276. Sabatini, B.L. Optical measurement of presynaptic calcium currents. / W.G. Regehr // *Biophys. J.* - 1998. - V. 74. - P. 1549–63.
277. Sabatini, B.L. Optical measurement of presynaptic calcium currents / W.G. Regehr // *Biophys. J.* - 1998. - V. 74. - P. 1549–1563.
278. Samigullin, D. Estimation of presynaptic calcium currents and endogenous calcium buffers at the frog neuromuscular junction with two different calcium fluorescent dyes / N. Fatikhov, E. Khaziev, A. Skorinkin, E. Nikolsky, E. Bukharaeva // *Front. Synaptic Neurosci.* - 2015. - V. 6
279. Samigullin, D. V. Characteristics of calcium transient in different parts of frog nerve terminal in response to nerve impulse / A.L. Vasin, E.A. Bukharaeva, E.E. Nikolsky // *Dokl. Biol. Sci.* 2010 4311. - 2010. - V. 431. - P. 83–85.
280. Samigullin, D. V. Loading a calcium dye into frog nerve endings through the nerve stump: calcium transient registration in the frog neuromuscular junction / E.F. Khaziev, N. V. Zhilyakov, E.A. Bukharaeva, E.E. Nikolsky // *J. Vis. Exp.* - 2017. -
281. Santafe, M.M. Adenosine receptors and muscarinic receptors cooperate in acetylcholine release modulation in the neuromuscular synapse / M. Priego, T. Obis, N. Garcia, M. Tomàs, M.A. Lanuza, J. Tomàs // *Eur. J. Neurosci.* - 2015. - V. 42. - P. 1775–1787.
282. Santafé, M.M. Muscarinic autoreceptors related with calcium channels in the strong and weak inputs at polyinnervated developing rat

- neuromuscular junctions / I. Salon, N. Garcia, M.A. Lanuza, O.D. Uchitel, J. Tomàs // *Neuroscience*. - 2004. - V. 123. - P. 61–73.
283. Santafé, M.M. Coupling of presynaptic muscarinic autoreceptors to serine kinases in low and high release conditions on the rat motor nerve terminal / M.A. Lanuza, N. Garcia, M. Tomàs, J. Tomàs // *Neuroscience*. - 2007. - V. 148. - P. 432–440.
284. Santafé, M.M. Modulation of ACh release by presynaptic muscarinic autoreceptors in the neuromuscular junction of the newborn and adult rat / I. Salon, N. Garcia, M.A. Lanuza, O.D. Uchitel, J. Tomàs // *Eur. J. Neurosci.* - 2003. - V. 17. - P. 119–127.
285. Santafé, M.M. Muscarinic autoreceptors modulate transmitter release through protein kinase C and protein kinase A in the rat motor nerve terminal / M.A. Lanuza, N. Garcia, J. Tomàs // *Eur. J. Neurosci.* - 2006. - V. 23. - P. 2048–2056.
286. Sargent, P.B. The diversity of neuronal nicotinic acetylcholine receptors / *Annu. Rev. Neurosci.* - 1993. - V. 16. - P. 403–443.
287. Schneggenburger, R. Intracellular calcium dependence of transmitter release rates at a fast central synapse / E. Neher // *Nat.* 2000 4066798. - 2000. - V. 406. - P. 889–893.
288. Schuele, S.U. Incidence of seizures in patients with multiple sclerosis treated with intrathecal baclofen / C. Kellinghaus, S.J. Shook, N. Boulis, F.A. Bethoux, T. Loddenkemper // *Neurology*. - 2005. - V. 64. - P. 1086–1087.
289. Schuetze, S.M. Developmental Regulation of Nicotinic Acetylcholine Receptors / L.W. Role // <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.ne.10.030187.002155>. - 2003. - V. Vol. 10. - P. 403–457.
290. Schwaller, B. Cytosolic Ca²⁺ buffers are inherently Ca²⁺ signal modulators / *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* - 2020. - V. 12
291. Schwaller, B. “New” functions for “old” proteins: the role of the

- calcium-binding proteins calbindin D-28k, calretinin and parvalbumin, in cerebellar physiology. Studies with knockout mice / M. Meyer, S. Schiffmann // *Cerebellum*. - 2002. - V. 1. - P. 241–258.
292. Seth, P. Nicotinic-serotonergic interactions in brain and behaviour / S. Cheeta, S. Tucci, S.E. File // *Pharmacol. Biochem. Behav.* - 2002. - V. 71. - P. 795–805.
293. Shahrezaei, V. Ca²⁺ from one or two channels controls fusion of a single vesicle at the frog neuromuscular junction. / A. Cao, K.R. Delaney // *J. Neurosci.* - 2006. - V. 26. - P. 13240–9.
294. Sheng, Z.H. Calcium-dependent interaction of N-type calcium channels with the synaptic core complex / J. Rettig, T. Cook, W.A. Catterall // *Nat.* 1996 3796564. - 1996. - V. 379. - P. 451–454.
295. Sheng, Z.H. Identification of a syntaxin-binding site on N-type calcium channels / J. Rettig, M. Takahashi, W.A. Catterall // *Neuron*. - 1994. - V. 13. - P. 1303–1313.
296. Shoshan-Barmatz, V. The mitochondrial voltage-dependent anion channel 1, Ca²⁺ transport, apoptosis, and their regulation / S. De, A. Meir // *Front. Oncol.* - 2017. - V. 7. - P. 60.
297. Sinha, S.R. Optical Recording from Populations of Neurons in Brain Slices / P. Saggau // *Mod. Tech. Neurosci. Res.* - 1999. - . - P. 459–486.
298. Slonimski, M. Intrathecal baclofen in pain management / S.E. Abram, R.E. Zuniga // *Reg. Anesth. Pain Med.* - 2004. - V. 29. - P. 269–276.
299. Slutsky, I. Presynaptic effects of muscarine on ACh release at the frog neuromuscular junction / H. Parnas, I. Parnas // *J. Physiol.* - 1999. - V. 514. - P. 769–782.
300. Slutsky, I. Use of knockout mice reveals involvement of M2-muscarinic receptors in control of the kinetics of acetylcholine release / J. Wess, J. Gomeza, J. Dudel, I. Parnas, H. Parnas // *J. Neurophysiol.* - 2003. - V. 89. - P. 1954–1967.
301. Slutsky, I. Ca²⁺-independent feedback inhibition of acetylcholine

- release in frog neuromuscular junction / G. Rashkovan, H. Parnas, I. Parnas // *J. Neurosci.* - 2002. - V. 22. - P. 3426–3433.
302. Sobel, E.C. In Vivo Ca²⁺ Dynamics in a Cricket Auditory Neuron: An Example of Chemical Computation / D.W. Tank // *Science* (80-.). - 1994. - V. 263. - P. 823–826.
303. Starke, K. Modulation of neurotransmitter release by presynaptic autoreceptors. / M. Göthert, H. Kilbinger // *Physiol. Rev.* - 1989. - V. 69. - P. 864–989.
304. Stauderman, K.A. Characterization of the recombinant human neuronal nicotinic acetylcholine receptors $\alpha 3\beta 2$ and $\alpha 4\beta 2$ stably expressed in HEK293 cells / L.S. Mashaffi, A. M, G. Veliçelebi, L.E. Chavez-Noriega, J.H. Crona, E.C. Johnson, K.J. Elliott, A. Gillespie, R.T. Reid, P. Adams, M.M. Harpold, J. Corey-Naevé // *Neuropharmacology.* - 2000. - V. 39. - P. 2543–2560.
305. Staus, D.P. Allosteric nanobodies reveal the dynamic range and diverse mechanisms of G-protein-coupled receptor activation / R.T. Strachan, A. Manglik, B. Pani, A.W. Kahsai, T.H. Kim, L.M. Wingler, S. Ahn, A. Chatterjee, A. Masoudi, A.C. Kruse, E. Pardon, J. Steyaert, W.I. Weis, R.S. Prosser, B.K. Kobilka, T. Costa, R.J. Lefkowitz // *Nature.* - 2016. - V. 535. - P. 448–452.
306. Steinberg, T.H. ATP4-Permeabilizes the Plasma Membrane of Mouse Macrophages to Fluorescent Dyes / A.S. Newman, J.A. Swanson, S.C. Silverstein // *J. Biol. Chem.* - 1987. - V. 262. - P. 8884–8888.
307. Steinmetz, N.A. Aberrant Cortical Activity in Multiple GCaMP6-Expressing Transgenic Mouse Lines / C. Buetfering, J. Lecoq, C.R. Lee, A.J. Peters, E.A.K. Jacobs, P. Coen, D.R. Ollerenshaw, M.T. Valley, S.E.J. De Vries, M. Garrett, J. Zhuang, P.A. Groblewski, S. Manavi, J. Miles, C. White, E. Lee, F. Griffin, J.D. Larkin, K. Roll, S. Cross, T. V. Nguyen, R. Larsen, J. Pendergraft, T. Daigle, B. Tasic, C.L. Thompson, J. Waters, S. Olsen, D.J. Margolis, H. Zeng, M. Hausser, M. Carandini, K.D. Harris //

- eNeuro. - 2017. - V. 4
308. Stemkowski, P. TRPV1 Nociceptor Activity Initiates USP5/T-type Channel-Mediated Plasticity / A. García-Caballero, V.D.M. Gadotti, S. M'Dahoma, S. Huang, S.A.G. Black, L. Chen, I.A. Souza, Z. Zhang, G.W. Zamponi // *Cell Rep.* - 2016. - V. 17. - P. 2901–2912.
309. Sternfeld, L. Activation of muscarinic receptors reduces store-operated Ca²⁺ entry in HEK293 cells / M. Dudenhöffer, A. Ludes, D. Heinze, I. Anderie, E. Krause // 2007. -
310. Stosiek, C. In vivo two-photon calcium imaging of neuronal networks / O. Garaschuk, K. Holthoff, A. Konnerth // *Proc. Natl. Acad. Sci.* - 2003. - V. 100. - P. 7319–7324.
311. Striessnig, J. L-type Ca²⁺ channels in heart and brain / A. Pinggera, G. Kaur, G. Bock, P. Tuluc // *Wiley Interdiscip. Rev. Membr. Transp. Signal.* - 2014. - V. 3. - P. 15–38.
312. Strom, T.M. An L-type calcium-channel gene mutated in incomplete X-linked congenital stationary night blindness / G. Nyakatura, E. Apfelstedt-Sylla, H. Hellebrand, B. Lorenz, B.H.F. Weber, K. Wutz, N. Gutwillinger, K. Rütther, B. Drescher, C. Sauer, E. Zrenner, T. Meitinger, A. Rosenthal, A. Meindl // *Nat. Genet.* - 1998. - V. 19. - P. 260–263.
313. Sugiura, Y. Novel modulatory effect of L-type calcium channels at newly formed neuromuscular junctions / C.P. Ko // *J. Neurosci.* - 1997. - V. 17. - P. 1101–1111.
314. Sugiura, Y. Novel Modulatory Effect of L-Type Calcium Channels at Newly Formed Neuromuscular Junctions / C.P. Ko // *J. Neurosci.* - 1997. - V. 17. - P. 1101–1111.
315. Sutton, K.G. P/Q-type calcium channels mediate the activity-dependent feedback of syntaxin-1A / J.E. McRory, H. Guthrie, T.H. Murphy, T.P. Snutch // *Nature.* - 1999. - V. 401. - P. 800–804.
316. Takayama, K. Novel system to achieve one-pot modification of cargo molecules with oligoarginine vectors for intracellular delivery / A.

- Tadokoro, S. Pujals, I. Nakase, E. Giralt, S. Futaki // *Bioconjug. Chem.* - 2009. - V. 20. - P. 249–257.
317. Tang, Y.G. Mitochondrial Involvement in Post-Tetanic Potentiation of Synaptic Transmission / R.S. Zucker // *Neuron.* - 1997. - V. 18. - P. 483–491.
318. Tapia, L. Ca²⁺ permeability of the (α₄)₃(β₂)₂ stoichiometry greatly exceeds that of (α₄)₂(β₂)₃ human acetylcholine receptors / A. Kuryatov, J. Lindstrom // *Mol. Pharmacol.* - 2007. - V. 71. - P. 769–776.
319. Tarasov, A.I. The Mitochondrial Ca²⁺ Uniporter MCU Is Essential for Glucose-Induced ATP Increases in Pancreatic β-Cells / F. Semplici, M.A. Ravier, E.A. Bellomo, T.J. Pullen, P. Gilon, I. Sekler, R. Rizzuto, G.A. Rutter // *PLoS One.* - 2012. - V. 7. - P. 39722.
320. Taylor, P. Synthesis, Storage and Release of Acetylcholine / J.H. Brown // 1999. -
321. Tedford, H.W. Direct G protein modulation of Cav2 calcium channels / G.W. Zamponi // *Pharmacol. Rev.* - 2006. - V. 58. - P. 837–862.
322. Terrence, C.F. Baclofen as an analgesic in chronic peripheral nerve disease / G.H. Fromm, R. Tenicela // *Eur. Neurol.* - 1985. - V. 24. - P. 380–385.
323. Thermo Fisher Scientific Indicators for Ca²⁺, Mg²⁺, Zn²⁺ and Other Metal Ions /// *Mol. Probes Handb.*2010. URL: <https://www.thermofisher.com/ru/ru/home/references/molecular-probes-the-handbook/indicators-for-ca2-mg2-zn2-and-other-metal-ions.html>. (access date : 2022-10-24).)
324. Thompson, A.J. The structural basis of function in Cys-loop receptors / H.A. Lester, S.C.R. Lummis // *Q. Rev. Biophys.* - 2010. - V. 43. - P. 449–499.
325. Tian, L. Nicotinic antagonist-produced frequency-dependent changes in acetylcholine release from rat motor nerve terminals. / C. Prior, J. Dempster, I.G. Marshall // *J. Physiol.* - 1994. - V. 476. - P. 517–529.

326. Todorovic, S.M. Pharmacological properties of T-type Ca²⁺ current in adult rat sensory neurons: effects of anticonvulsant and anesthetic agents / C.J. Lingle // *J. Neurophysiol.* - 1998. - V. 79. - P. 240–252.
327. Tomàs, J. Presynaptic membrane receptors modulate ACh release, axonal competition and synapse elimination during neuromuscular junction development / N. Garcia, M.A. Lanuza, M.M. Santafé, M. Tomàs, L. Nadal, E. Hurtado, A. Simó, V. Cilleros // *Front. Mol. Neurosci.* - 2017. - V. 10. - P. 1–12.
328. Tomàs, J. Presynaptic membrane receptors in acetylcholine release modulation in the neuromuscular synapse / M.M. Santafé, N. Garcia, M.A. Lanuza, M. Tomàs, N. Besalduch, T. Obis, M. Priego, E. Hurtado // *J. Neurosci. Res.* - 2014. - V. 92. - P. 543–554.
329. Tosatto, A. Ca²⁺ measurements in mammalian cells with aequorin-based probes / R. Rizzuto, C.M. - Bio-protocol, undefined 2017 // [ncbi.nlm.nih.gov](https://www.ncbi.nlm.nih.gov). -
330. Tosatto, A. Ca²⁺ Measurements in Mammalian Cells with Aequorin-based Probes / R. Rizzuto, C. Mammucari // *Bio-protocol.* - 2017. - V. 7
331. Trendelenburg, A.-U. Heterogeneity of presynaptic muscarinic receptors mediating inhibition of sympathetic transmitter release: a study with M2- and M4-receptor-deficient mice / J. Gomeza, W. Klebrock, H. Zhou, J. Rgen Wess // *Wiley Online Libr.* - 2003. - V. 138. - P. 469–480.
332. Tsang, C.W. α -Latrotoxin Releases Calcium in Frog Motor Nerve Terminals / D.B. Elrick, M.P. Charlton // *J. Neurosci.* - 2000. - V. 20. - P. 8685–8692.
333. Tsentsevitsky, A.N. Calcium modulation of the kinetics of evoked quantum secretion in neuromuscular synapses of cold- and warm-blooded animals / V.F. Khuzakhmetova, A.L. Vasin, D. V. Samigullin, E.A. Bukharaeva // *Biochem. Suppl. Ser. A Membr. Cell Biol.* 2015 94. - 2015. - V. 9. - P. 270–277.
334. Tsentsevitsky, A.N. GIRK channel as a versatile regulator of

- neurotransmitter release via L-type Ca^{2+} channel-dependent mechanism in the neuromuscular junction / E.F. Khaziev, I. V. Kovyazina, A.M. Petrov // *Neuropharmacology*. - 2022. - V. 209. - P. 109021.
335. Tsentsevitsky, A.N. Synaptic mechanisms of cadmium neurotoxicity / A.M. Petrov // *Neural Regen. Res.* - 2021. - V. 16. - P. 1762.
336. Tsien, R.Y. A non-disruptive technique for loading calcium buffers and indicators into cells / *Nat.* 1981 2905806. - 1981. - V. 290. - P. 527–528.
337. Tsien, R.Y. Calcium homeostasis in intact lymphocytes: cytoplasmic free calcium monitored with a new, intracellularly trapped fluorescent indicator. / T. Pozzan, T.J. Rink // *J. Cell Biol.* - 1982. - V. 94. - P. 325–334.
338. Tsien, R.Y. Fluorescent indicators of ion concentrations. / *Methods Cell Biol.* - 1989. - V. 30. - P. 127–56.
339. Tsien, R.Y. New calcium indicators and buffers with high selectivity against magnesium and protons: design, synthesis, and properties of prototype structures / *Biochemistry*. - 2002. - V. 19. - P. 2396–2404.
340. Tuluc, P. A $\text{CaV}1.1$ Ca^{2+} channel splice variant with high conductance and voltage-sensitivity alters EC coupling in developing skeletal muscle / N. Molenda, B. Schlick, G.J. Obermair, B.E. Flucher, K. Jurkat-Rott // *Biophys. J.* - 2009. - V. 96. - P. 35–44.
341. Unni, V.K. Calcium Release from Presynaptic Ryanodine-Sensitive Stores Is Required for Long-Term Depression at Hippocampal CA3-CA3 Pyramidal Neuron Synapses / S.S. Zakharenko, L. Zablow, A.J. DeCostanzo, S.A. Siegelbaum // *J. Neurosci.* - 2004. - V. 24. - P. 9612.
342. Urbano, F.J. Calcium channels involved in neurotransmitter release at adult, neonatal and P/Q-type deficient neuromuscular junctions / M.D. Rosato-Siri, O.D. Uchitel // *Mol. Membr. Biol.* - 2002. - V. 19. - P. 293–300.
343. Urbano, F.J. L-type calcium channels unmasked by cell-permeant Ca^{2+} buffer at mouse motor nerve terminals / O.D. Uchitel // *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.* - 1999. - V. 437. - P. 523–528.

344. Uribe, K.B. Calpain-Mediated Processing of Adenylate Cyclase Toxin Generates a Cytosolic Soluble Catalytically Active N-Terminal Domain / A. Etxebarria, C. Martín, H. Ostolaza // *PLoS One*. - 2013. - V. 8. - P. e67648.
345. Van der Kloot, W. Nicotinic agonists antagonize quantal size increases and evoked release at frog neuromuscular junction. / *J. Physiol.* - 1993. - V. 468. - P. 567–589.
346. Venkatakrisnan, A.J. Molecular signatures of G-protein-coupled receptors / X. Deupi, G. Lebon, C.G. Tate, G.F. Schertler, M. Madan Babu // *Nature*. - 2013. - V. 494. - P. 185–194.
347. Venkatakrisnan, A.J. Structured and disordered facets of the GPCR fold / T. Flock, D.E. Prado, M.E. Oates, J. Gough, M. Madan Babu // *Curr. Opin. Struct. Biol.* - 2014. - V. 27. - P. 129–137.
348. Wang, X. Muscle nicotinic acetylcholine receptors may mediate trans-synaptic signaling at the mouse neuromuscular junction / J. Michael McIntosh, M.M. Rich // *J. Neurosci.* - 2018. - V. 38. - P. 1725–1736.
349. Wang, X. Reversible Recruitment of a Homeostatic Reserve Pool of Synaptic Vesicles Underlies Rapid Homeostatic Plasticity of Quantal Content / M.J. Pinter, M.M. Rich // *J. Neurosci.* - 2016. - V. 36. - P. 828–836.
350. Weiss, N. Surface expression and function of Cav3.2 T-type calcium channels are controlled by asparagine-linked glycosylation / S.A.G. Black, C. Bladen, L. Chen, G.W. Zamponi // *Pflugers Arch.* - 2013. - V. 465. - P. 1159–1170.
351. Wen, P.Y. Updated response assessment criteria for high-grade gliomas: response assessment in neuro-oncology working group / D.R. Macdonald, D.A. Reardon, T.F. Cloughesy, A.G. Sorensen, E. Galanis, J. DeGroot, W. Wick, M.R. Gilbert, A.B. Lassman, C. Tsien, T. Mikkelsen, E.T. Wong, M.C. Chamberlain, R. Stupp, K.R. Lamborn, M.A. Vogelbaum, M.J. Van Den Bent, S.M. Chang // *J. Clin. Oncol.* - 2010. - V. 28. - P. 1963–1972.

352. Werth, J.L. Mitochondria buffer physiological calcium loads in cultured rat dorsal root ganglion neurons / S.A. Thayer // *J. Neurosci.* - 1994. - V. 14. - P. 348–356.
353. Wess, J. Molecular biology of muscarinic acetylcholine receptors / *Crit. Rev. Neurobiol.* - 1996. - V. 10. - P. 69–99.
354. Wess, J. Muscarinic Acetylcholine Receptor Knockout Mice: Novel Phenotypes and Clinical Implications / *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* - 2004. - V. 44. - P. 423–450.
355. Wess, J. Molecular basis of muscarinic acetylcholine receptor function. / *Trends Pharmacol. Sci.* - 1993. - V. 14. - P. 308–13.
356. Westenbroek, R.E. Immunochemical identification and subcellular distribution of the alpha 1A subunits of brain calcium channels / T. Sakurai, E.M. Elliott, J.W. Hell, T.V.B. Starr, T.P. Snutch, W.A. Catterall // *J. Neurosci.* - 1995. - V. 15. - P. 6403–6418.
357. Westenbroek, R.E. Biochemical properties and subcellular distribution of an N-type calcium channel alpha 1 subunit / J.W. Hell, C. Warner, S.J. Dubel, T.P. Snutch, W.A. Catterall // *Neuron.* - 1992. - V. 9. - P. 1099–1115.
358. Wheatley, M. Lifting the lid on GPCRs: the role of extracellular loops / D. Wootten, M.T. Conner, J. Simms, R. Kendrick, R.T. Logan, D.R. Poyner, J. Barwell // *Br. J. Pharmacol.* - 2012. - V. 165. - P. 1688–1703.
359. Wheeler, D.G. CaMKII locally encodes L-type channel activity to signal to nuclear CREB in excitation-transcription coupling / C.F. Barrett, R.D. Groth, P. Safa, R.W. Tsien // *J. Cell Biol.* - 2008. - V. 183. - P. 849–863.
360. Wheeler, D.G. L-type calcium channel ligands block nicotine-induced signaling to CREB by inhibiting nicotinic receptors / C.F. Barrett, R.W. Tsien // *Neuropharmacology.* - 2006. - V. 51. - P. 27–36.
361. Wheeler, D.G. Ca(V)1 and Ca(V)2 channels engage distinct modes of Ca(2+) signaling to control CREB-dependent gene expression / R.D. Groth, H. Ma, C.F. Barrett, S.F. Owen, P. Safa, R.W. Tsien // *Cell.* - 2012. - V. 149.

- P. 1112–1124.
362. Wheeler, D.B. Roles of N-type and Q-type Ca²⁺ channels in supporting hippocampal synaptic transmission / A. Randall, R.W. Tsien // *Science*. - 1994. - V. 264. - P. 107–111.
363. Wiegand, H. The action of cobalt, cadmium and thallium on presynaptic currents in mouse motor nerve endings / S. Uhlig, U. Gotzsch, H. Lohmann // *Neurotoxicol. Teratol.* - 1990. - V. 12. - P. 313–318.
364. Williams, M.E. Structure and functional expression of alpha 1, alpha 2, and beta subunits of a novel human neuronal calcium channel subtype / D.H. Feldman, A.F. McCue, R. Brenner, G. Velicelebi, S.B. Ellis, M.M. Harpold // *Neuron*. - 1992. - V. 8. - P. 71–84.
365. Wolfe, B.B. Development of selective antisera for muscarinic cholinergic receptor subtypes / R.P. Yasuda // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* - 1995. - V. 757. - P. 186–193.
366. Wootten, D. Emerging paradigms in GPCR allostery: implications for drug discovery / A. Christopoulos, P.M. Sexton // *Nat. Rev. Drug Discov.* - 2013. - V. 12. - P. 630–644.
367. Wu, L.G. Nerve activity but not intracellular calcium determines the time course of endocytosis at the frog neuromuscular junction / W.J. Betz // *Neuron*. - 1996. - V. 17. - P. 769–779.
368. Wu, L.G. Nerve activity but not intracellular calcium determines the time course of endocytosis at the frog neuromuscular junction. / W.J. Betz // *Neuron*. - 1996. - V. 17. - P. 769–79.
369. Wu, L.G. Presynaptic inhibition of elicited neurotransmitter release. / P. Saggau // *Trends Neurosci.* - 1997. - V. 20. - P. 204–12.
370. Yang, L. Increased Asynchronous Release and Aberrant Calcium Channel Activation in Amyloid Precursor Protein Deficient Neuromuscular Synapses / B. Wang, C. Long, G. Wu, H. Zheng // *Neuroscience*. - 2007. - V. 149. - P. 768.
371. Yang, Y. Improved calcium sensor GCaMP-X overcomes the calcium

- channel perturbations induced by the calmodulin in GCaMP / N. Liu, Y. He, Y. Liu, L. Ge, L. Zou, S. Song, W. Xiong, X. Liu // *Nat. Commun.* - 2018. - V. 9
372. Yasuda, R.P. Development of antisera selective for m4 and m5 muscarinic cholinergic receptors: distribution of m4 and m5 receptors in rat brain. / W. Ciesla, L.R. Flores, S.J. Wall, M. Li, S.A. Satkus, J.S. Weisstein, B. V Spagnola, B.B. Wolfe // *Mol. Pharmacol.* - 1993. - V. 43. - P. 149 LP – 157.
373. Yohannan, S. The evolution of transmembrane helix kinks and the structural diversity of G protein-coupled receptors / S. Faham, D. Yang, J.P. Whitelegge, J.U. Bowie // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* - 2004. - V. 101. - P. 959–963.
374. Yu, R. Rapid Turnover of Calcium in the Endoplasmic Reticulum during Signaling: STUDIES WITH CAMELEON CALCIUM INDICATORS / P.M. Hinkle // *J. Biol. Chem.* - 2000. - V. 275. - P. 23648–23653.
375. Yuan, S. Activation of G-protein-coupled receptors correlates with the formation of a continuous internal water pathway / S. Filipek, K. Palczewski, H. Vogel // *Nat. Commun.* 2014 51. - 2014. - V. 5. - P. 1–10.
376. Yue, J. Upregulation of T-type Ca²⁺ channels in primary sensory neurons in spinal nerve injury / L. Liu, Z. Liu, B. Shu, Y. Zhang // *Spine (Phila. Pa. 1976)*. - 2013. - V. 38. - P. 463–470.
377. Zamponi, G.W. Regulation of presynaptic calcium channels by synaptic proteins / *J. Pharmacol. Sci.* - 2003. - V. 92. - P. 79–83.
378. Zhang, W. Characterization of central inhibitory muscarinic autoreceptors by the use of muscarinic acetylcholine receptor knock-out mice / A.S. Basile, J. Gomeza, L.A. Volpicelli, A.I. Levey, J. Rgen Wess // *Soc Neurosci.* - 2002. -
379. Zhang, W. Multiple muscarinic acetylcholine receptor subtypes modulate striatal dopamine release, as studied with M1–M5 muscarinic

- receptor knock-out mice / M. Yamada, J. Gomeza, A.S. Basile, J. Rgen Wess // Soc Neurosci. - 2002. -
380. 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. -
381. Zhou, H. Heterogeneity of release-inhibiting muscarinic autoreceptors in heart atria and urinary bladder: a study with M₂ - and M₄ -receptor-deficient mice / A. Meyer, K. Starke, J. Gomeza, J. Wess, A.-U. Trendelenburg // Naunyn. Schmiedebergs. Arch. Pharmacol. - 2002. - V. 365. - P. 112–122.