

**МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ  
имени М.В. ЛОМОНОСОВА**

*На правах рукописи*



**Гайдуков Александр Евгеньевич**

**УЧАСТИЕ ПРЕСИНАПТИЧЕСКИХ ВХОДОВ ИОНОВ КАЛЬЦИЯ В  
МЕХАНИЗМАХ РЕГУЛЯЦИИ КВАНТОВОЙ СЕКРЕЦИИ  
НЕЙРОТРАНСМИТТЕРА**

Специальность – 1.5.5 – Физиология

Диссертация на соискание ученой степени  
доктора биологических наук

Москва - 2023

## ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	9
Актуальность темы исследования	9
Цели и задачи исследования	11
Научная новизна исследования	12
Теоретическая и практическая значимость работы	14
Положения, выносимые на защиту	15
Личный вклад автора	16
Апробация материалов диссертации	16
Публикации	17
Структура и объем диссертации	17
1.ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	18
1.1.Потенциал-зависимые $Ca^{2+}$ -каналы	18
1.1.1.Классификация $Ca_v$ -каналов нервной системы	19
1.1.2. Молекулярная структура $Ca_v$ -каналов	20
1.1.2.1. Основная каналообразующая $\alpha 1$ -субъединица $Ca_v$ -каналов	20
1.1.2.2. Вспомогательные субъединицы $Ca_v$ -каналов	22
1.1.3. $Ca_v$ -каналы в нервных окончаниях и их роль в экзоцитозе синаптических везикул	23
1.1.3.1. Локализация $Ca_v$ -каналов в активных зонах моторных нервных терминалей	23
1.1.3.2. Потенциал-зависимые $Ca^{2+}$ -каналы P/Q-типа ( $Ca_v2.1$ ) и их роль в нервных терминалях	24

1.1.3.2.1. Роль субъединицы $\alpha 1A$ $Ca^{2+}$ -каналов P/Q-типа в их активности	25
1.1.3.2.2. Связь $Ca^{2+}$ -каналов P/Q-типа с белками докинга и прайминга синаптических везикул	26
1.1.3.2.3. Регуляция $Ca^{2+}$ -каналов P/Q-типа в нервных терминалях	28
1.1.3.2.3.1. Synprint-сайт $Ca_v2$ -каналов и его регуляторная роль	28
1.1.3.2.3.2. Регуляторная роль ионов $Ca^{2+}$ и кальмодулина (CaM)	29
1.1.3.2.3.3. Регуляция пресинаптическими метаботропными рецепторами и G-белками	30
1.1.3.2.3.4. Регуляция пресинаптическими ферментами	31
1.1.3.2.4. Пресинаптические $Ca^{2+}$ -каналы P/Q-типа и создание в активных зонах $Ca^{2+}$ -доменов	32
1.1.3.2.5. Гетерогенность $Ca^{2+}$ -зависимости вероятности выброса синаптических везикул и её связь с локализацией пресинаптических $Ca^{2+}$ -каналов P/Q-типа	35
1.1.3.2.6. Роль $Ca^{2+}$ -активируемых $K^+$ -каналов в регуляции экзоцитоза синаптических везикул в моторных синапсах	38
1.1.3.3. Потенциал-зависимые $Ca^{2+}$ -каналы N- и R-типов ( $Ca_v2.2$ и $Ca_v2.3$ ) и их роль в нервных терминалях	40
1.1.3.4. Потенциал-зависимые $Ca^{2+}$ -каналы L-типа ( $Ca_v1.2$ и $Ca_v1.3$ ) нейронов и их свойства	41
1.1.3.4.1. Потенциал-зависимые $Ca^{2+}$ -каналы L-типа в пост- и пресинаптических структурах синапсов ЦНС	45
1.1.3.4.2. Потенциал-зависимые $Ca^{2+}$ -каналы L-типа ( $Ca_v1.2$ и $Ca_v1.3$ ) в нервных терминалях моторных синапсов млекопитающих	47
1.1.3.4.2.1. Обнаружение $Ca^{2+}$ -каналов L-типа в моторных синапсах	47
1.1.3.4.2.2. $Ca^{2+}$ -каналы L-типа в нервных терминалях развивающихся, новообразованных при реинервации и находящихся в патологических условиях моторных синапсов	49
1.1.3.4.2.3. Регуляция активности $Ca^{2+}$ -каналов L-типа в моторных терминалях млекопитающих	50

1.2.Рианодиновые рецепторы (РиР)	56
1.2.1. Структурные особенности РиР	57
1.2.2. Внутриклеточные регуляторы активности РиР	60
1.2.3. РиР и выброс депонированного $Ca^{2+}$ в постсинаптических структурах	61
1.2.4. Роль пресинаптических РиР в синапсах ЦНС	62
1.2.5. Роль пресинаптических РиР в нервно-мышечных синапсах	64
1.3.Р2Х7–рецепторы	68
1.3.1. Структурные особенности подсемейства Р2Х-рецепторов	68
1.3.2. Особенности строения Р2Х7-рецепторов	70
1.3.3. Функциональные особенности Р2Х7-рецепторов	71
1.3.4. Р2Х7-рецепторы как регуляторы работы синапсов	74
1.4.Никотиновые холинорецепторы альфа7-типа ( $\alpha 7$ -нХР)	77
1.4.1. Краткая общая характеристика нХР	78
1.4.2. Особенности нейрональных $\alpha 7$ -нХР	80
1.4.2.1. $\alpha 7$ -нХР как $Ca^{2+}$ -вход	80
1.4.2.2. Десенситизация $\alpha 7$ -нХР	82
1.4.2.3. Специфический фармакологический профиль $\alpha 7$ -нХР	83
1.4.2.4. Метаботропная активность $\alpha 7$ -нХР	84
1.4.2.5. $Ca^{2+}$ -зависимые процессы, индуцируемые $\alpha 7$ -нХР в нейронах	85
1.4.3. Пресинаптические $\alpha 7$ -нХР в моторных синапсах	87
1.5. $Ca^{2+}$ -зависимые механизмы регуляции квантовой секреции АХ при ритмической активности синапсов	89
2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	96
2.1.Животные	96
2.2.Экспериментальная модель зрелых нервно-мышечных синапсов	96

2.3. Электрофизиология	96
2.3.1. Регистрация спонтанной активности моторных синапсов	98
2.3.2. Рассеченный нервно-мышечный препарат диафрагмы мышцы	98
2.3.3. Регистрация одиночной вызванной синаптической активности моторных синапсов	100
2.3.4. Регистрация кратковременной ритмической синаптической активности моторных синапсов	100
2.3.5. Регистрация длительной тетанической синаптической активности моторных синапсов	100
2.3.6. Определение входного сопротивления мышечных волокон	101
2.3.7. Загрузка $\text{Ca}^{2+}$ -буферов	101
2.4. Анализ данных	102
2.4.1. Расчет квантовых параметров секреции АХ	102
2.5. Статистическая обработка результатов	104
3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	106
3.1. Роль $\text{Ca}^{2+}$ -входа по $\text{Ca}^{2+}$ -каналам L-типа в регуляции квантовой секреции АХ в моторных синапсах	106
3.1.1. Блокирование $\text{Ca}^{2+}$ -каналов L-типа и его последствия при ритмической активности моторных синапсов	107
3.1.2. Растормаживание $\text{Ca}^{2+}$ -каналов L-типа и его последствия при ритмической активности моторных синапсов	108
3.1.2.1. Эффекты активатора L-типа $\text{Ca}^{2+}$ -каналов S(-) Bay K8644	108
3.1.2.2. Эффекты блокирования ВК-каналов ( $\text{Ca}^{2+}$ -активируемых $\text{K}^{+}$ -каналов большой проводимости)	110
3.1.2.3. Эффекты блокирования потенциал-зависимых $\text{K}_V$ -каналов	113
3.1.2.3.1. Влияние ТЭА на параметры одиночных ПКП.	113
3.1.2.3.2. Влияние 4-АР на параметры одиночных ПКП	114
3.1.2.3.3. Влияние 4-АР на параметры ПКП в коротких залпах	115

3.1.3.	Вклад $\text{Ca}^{2+}$ -зависимых ферментов в регуляцию квантовой секреции АХ при входе ионов $\text{Ca}^{2+}$ по L-типу $\text{Ca}^{2+}$ -каналов	118
3.1.3.1.	Эффекты ингибиторов РКС на вызванную активность моторных синапсов	119
3.1.3.2.	Эффекты ингибитора РКС на фоне растормаживания L-типа $\text{Ca}^{2+}$ -каналов	120
3.1.3.3.	Эффекты ингибитора РКС на фоне растормаживания или частичного блокирования $\text{Ca}^{2+}$ -каналов P/Q-типа	121
3.1.3.4.	Эффекты пан-активатора РКС форбол 12-миристат 13-ацетата (РМА)	124
3.1.3.5.	Эффекты ингибиторов СаМКП	127
3.1.4.	Эндогенные регуляторные контуры, контролирующие активность L-типа $\text{Ca}^{2+}$ -каналов в моторных синапсах мышцы	131
3.1.4.1.	Регуляторные контуры, подавляющие активность $\text{Ca}^{2+}$ -каналов L-типа в моторных синапсах мышцы	132
3.1.4.1.1.	Роль аденозиновых $A_1$ - рецепторов в подавлении активности $\text{Ca}^{2+}$ -каналов L-типа	132
3.1.4.1.2.	Роль P2Y <sub>13</sub> -рецепторов АТФ в подавлении активности $\text{Ca}^{2+}$ -каналов L-типа	134
3.1.4.1.3.	Роль $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой фосфатазы кальцинейрина (CaN) в подавлении активности L-типа $\text{Ca}^{2+}$ -каналов	135
3.1.4.2.	Регуляторные контуры, облегчающие активность $\text{Ca}^{2+}$ -каналов L-типа в моторных синапсах мышцы	138
3.1.4.2.1.	Роль $A_{2A}$ -аденозиновых рецепторов в усилении активности $\text{Ca}^{2+}$ -каналов L-типа	140
3.2.	Роль пресинаптических рианодиновых рецепторов (РиР) и выброса депонированного $\text{Ca}^{2+}$ в регуляции квантовой секреции АХ в моторных синапсах	144

3.2.1.	Блокирование РнР Са <sup>2+</sup> -депо рианодином и его последствия для квантовой секреции АХ	145
3.2.2.	Активация РнР Са <sup>2+</sup> -депо рианодином и его последствия для квантовой секреции АХ	147
3.2.3.	Вовлечение РнР в регуляцию квантовой секреции АХ при активации Са <sup>2+</sup> -каналов L-типа	162
3.3.	Роль Са <sup>2+</sup> -входа по каналам Р2Х7-рецепторов в регуляции квантовой секреции АХ	172
3.3.1.	Квантовая секреция АХ в моторных синапсах мышцы при блокировании или активации Р2Х7-рецепторов	174
3.3.2.	Доказательства возможности входа ионов Са <sup>2+</sup> по каналам Р2Х7-рецепторов в присутствии Са <sup>2+</sup> -буферов в моторных синапсах мышцы	178
3.3.3.	Выявление эндогенной активности пресинаптических Р2Х7-рецепторов, направленной на потенцирование квантовой секреции АХ, при блокировании Р2У13-рецепторов	184
3.3.4.	Механизм потенцирующего влияния на квантовую секрецию АХ пресинаптических Р2Х7-рецепторов	185
3.4.	Роль Са <sup>2+</sup> -входа по каналам никотиновых холинорецепторов альфа7-типа (α7-нХР) в регуляции квантовой секреции АХ	190
3.4.1.	Эффекты холина как агониста α7-нХР при одиночной вызванной квантовой секреции АХ	191
3.4.2.	Механизм действия холина как агониста α7-нХР при короткой высокочастотной стимуляции моторных синапсов мышцы	193
3.4.3.	Роль α7-нХР при длительной ритмической активности моторных синапсов мышцы	202
4.	ЗАКЛЮЧЕНИЕ	217
4.1.	Роль Са <sup>2+</sup> -каналов L-типа	218

4.2. Роль РнР и депонированного $\text{Ca}^{2+}$	222
4.3. Роль P2X7-рецепторов	225
4.4. Роль $\alpha 7$ -нХР	226
ВЫВОДЫ	232
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	234
СПИСОК ЦИТИРОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ	236



## ВВЕДЕНИЕ

### Актуальность темы исследования

Роль ионов кальция ( $\text{Ca}^{2+}$ ), входящих снаружи в нервные терминалы синапсов и приводящих к выбросу нейротрансмиттера, впервые был обнаружена в нервно-мышечных синапсах скелетных мышц [Katz, Miledi, 1965, 1967]. В настоящее время вход ионов  $\text{Ca}^{2+}$  по определенным пресинаптическим потенциал-зависимым  $\text{Ca}^{2+}$ -каналам известен как специфический триггерный сигнал, запускающий процесс экзоцитоза синаптических везикул во всех типах химических синапсов [Augustine et al., 2003; Dolphin, 2018; Dolphin, Lee, 2020]. К концу XX века стало очевидным, что набор источников и спектр внутриклеточных  $\text{Ca}^{2+}$ -сигналов в нейронах и других клетках весьма разнообразен. В постсинаптических структурах синапсов ЦНС подробно описана пространственно-временная организация  $\text{Ca}^{2+}$ -сигналов, их мишени и влияния на разные режимы синаптической передачи [Jurado et al., 2010; Padamsey et al., 2018; Rozov et al., 2018]. В то же время, в пресинаптических нервных окончаниях подобные явления до сих пор остаются малоизученными.

В настоящее время известны примеры  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой пресинаптической пластичности, такие как  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимое облегчение, депрессия, посттетаническая потенция [Foster, McNaughton, 1991; Korogod et al., 2007; Quinlan, Hirasawa, 2013; Xu et al., 2007]. Однако, источники регуляторного  $\text{Ca}^{2+}$  в таких случаях часто остаются неясными, либо – по умолчанию – приписываются  $\text{Ca}^{2+}$ , входящему в нервные терминалы по основному, триггерному  $\text{Ca}^{2+}$ -входу [Catterall, Few, 2008]. Между тем, в последние годы идентифицирован целый ряд других путей и возможностей локального повышения уровня  $\text{Ca}^{2+}$  в нервных терминалах. Это и активность разнообразных пресинаптических потенциал-зависимых  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов, отличных от триггерного  $\text{Ca}^{2+}$ -входа [Brimblecombe et al., 2015; Striessnig et al., 2014], и пресинаптические  $\text{Ca}^{2+}$ -проводящие ионотропные хеморецепторы

[Moores et al., 2005; Yakel, 2014], и выброс  $\text{Ca}^{2+}$  из внутриклеточных  $\text{Ca}^{2+}$ -депо по каналам рианодиновых (РиР) или  $\text{IP}_3$ -рецепторов [Bouchard et al., 2003; de Juan-Sanz et al., 2017]. Как правило, такие  $\text{Ca}^{2+}$ -входы рассматривают как вспомогательный источник ионов  $\text{Ca}^{2+}$  для усиления триггерного  $\text{Ca}^{2+}$ -сигнала в терминалях. Способны ли такие  $\text{Ca}^{2+}$ -входы обеспечивать дифференцированную регулировку параметров квантовой секреции нейротрансмиттера как в сторону ее усиления, так и торможения – остается малоизученным. Решение этих вопросов - выявление спектра регуляторных  $\text{Ca}^{2+}$ -входов, работающих в комплексе с соответствующими им мишенями, описание их вклада в механизмы, управляющие квантовой секрецией нейротрансмиттера, представляет собой актуальное направление современной синаптической физиологии.

Несмотря на имеющиеся попытки описания ряда пресинаптических  $\text{Ca}^{2+}$ -входов и мишеней ионов  $\text{Ca}^{2+}$  в нервных терминалях синапсов в ЦНС [Castillo et al., 2012; Jeans et al., 2017; de Jong, Verhage, 2009], наиболее удобной моделью для решения проблемы являются периферические нервно-мышечные синапсы – одиночные концевые пластинки скелетных мышечных волокон – благодаря их крупным размерам, изолированной локализации на мышечных волокнах и доступности пресинаптических процессов для электрофизиологических экспериментов [Slater, 2015].

В настоящее время в моторных нервных терминалях млекопитающих наряду с триггерным для экзоцитоза синаптических везикул  $\text{Ca}^{2+}$ -входом (по потенциал-зависимым  $\text{Ca}^{2+}$ -каналам P/Q-типа), описан ряд других потенциал-зависимых  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов [Kaja et al., 2006; Nishimune, 2012; Nudler et al., 2003; Paganì et al., 2004; Pardo et al., 2006]. Среди них особый интерес представляют «медленные»  $\text{Ca}^{2+}$ -каналы L-типа, роль и условия активации которых в нервно-мышечных синапсах - малоизучены. Не ясен спектр регуляторных возможностей ионов  $\text{Ca}^{2+}$ , поступающего из пресинаптических  $\text{Ca}^{2+}$ -депо по каналам РиР. Нуждается в исследовании и регуляторная активность ионов  $\text{Ca}^{2+}$ , поступающего по  $\text{Ca}^{2+}$ -проводящим хемоактивируемым каналам

пресинаптических никотиновых холинорецепторов альфа7-типа ( $\alpha 7$ -нХР) и P2X7-рецепторов АТФ. В качестве потенциальных мишеней разных  $\text{Ca}^{2+}$ -сигналов обсуждаются имеющиеся здесь многочисленные  $\text{Ca}^{2+}$ -регулируемые канальные и другие белки, а также  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимые ферменты – киназы и фосфатазы [Балезина, 2002; Lanuza et al., 2014; Mukhamedyarov et al., 2010; Tarasova et al., 2018; Бухараева, Скоринкин, 2021]. Таким образом, есть основание говорить о наличии в терминалях моторных синапсов многоуровневой  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой системы тонкой настройки параметров секреции ацетилхолина (АХ), однако детали ее функционирования не раскрыты.

### **Цели и задачи исследования**

**Целью** данной работы стало выявление специфических пресинаптических  $\text{Ca}^{2+}$ -входов, их функционального сопряжения с определенными  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимыми ферментами, канальными и другими белками в моторных нервных терминалях нервно-мышечных синапсов мышцы, осмысление места этих регуляторных контуров в управлении параметрами квантовой секреции АХ при разных формах активности моторных синапсов. Для достижения поставленной цели в работе решались следующие конкретные **задачи**:

1. Сопоставить роль двух потенциал-зависимых  $\text{Ca}^{2+}$ -входов – по быстрым  $\text{Ca}^{2+}$ -каналам P/Q-типа и медленным  $\text{Ca}^{2+}$ -каналам L-типа в регуляции параметров квантовой секреции АХ в моторных синапсах мышцы.
2. Выявить способы регуляции  $\text{Ca}^{2+}$ -входа по потенциал-зависимым  $\text{Ca}^{2+}$ -каналам L-типа
3. Выявить роль  $\text{Ca}^{2+}$ , внутритерминально высвобождаемого из рианодин-чувствительных  $\text{Ca}^{2+}$ -депо в регуляции вызванной секреции АХ и спонтанной одноквантовой секреции АХ и размера одиночных квантов АХ.

4. Выявить роль  $\text{Ca}^{2+}$ -сигналов, поступающих по хемоактивируемым  $\text{Ca}^{2+}$ -проводящим ионотропным каналам – P2X7-рецепторам АТФ и  $\alpha 7$ -нХР – в регуляции параметров квантовой секреции АХ в моторных синапсах мышцы.
5. Выявить роль ферментов и каналов, избирательно активируемых ионами  $\text{Ca}^{2+}$ , поступающими в нервную терминаль по определенным  $\text{Ca}^{2+}$ -входам:
  - а) протеинкиназы С (PKC), кальций/кальмодулин-зависимой киназы II типа (CaMKII), кальций-зависимой фосфатазы кальцинейрина (CaN); б)  $\text{Ca}^{2+}$ -активируемым  $\text{K}^+$ -каналам высокой (BK-типа) и низкой (SK-типа) проводимости.
6. Описать сопряжение определенных пресинаптических  $\text{Ca}^{2+}$ -входов и их мишеней в комплексной регуляции процессов квантовой секреции АХ в моторных синапсах мышцы.

### **Научная новизна исследования**

В данной работе впервые в моторных нервных терминалях мышцы раскрыты ранее неизвестные способы растормаживания и роль медленных потенциал-зависимых  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов L-типа; описан баланс воздействий, контролирующих статус L-типа  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов: активирующих - со стороны аденозиновых рецепторов  $A_{2A}$ -типа, протеинкиназы А (PKA), PKC; и тормозных – со стороны аденозиновых  $A_1$ -рецепторов, P2Y13-рецепторов АТФ, CaN и BK-каналов. Впервые выявлены сигнальные каскады, следующие за входом ионов  $\text{Ca}^{2+}$  по L-типу  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов, и облегчающие секрецию АХ с участием PKC и CaMKII.

Впервые установлено, что вовлечение  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов L-типа в регуляцию секреции АХ облегчает вызванный выброс квантов АХ по механизму, отличному от лежащего в основе потенцирования секреции АХ при усилении  $\text{Ca}^{2+}$ -входа по триггерным  $\text{Ca}^{2+}$ -каналам P/Q-типа - вход ионов  $\text{Ca}^{2+}$  по L-типу  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов обеспечивает возрастание размера пула синаптических везикул, готовых к высвобождению АХ, а не вероятности выброса АХ.

Впервые в моторных синапсах мышцы описана роль пресинаптической  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой фосфатазы CaN, ее способность контролировать работу L-типа  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов во взаимодействии с аденозиновыми  $\text{A}_2$ -рецепторами и РКА.

Впервые описана возможность двунаправленных регуляторных воздействий на секрецию АХ при выбросе депонированного  $\text{Ca}^{2+}$  через РиР: направленность действия зависит от способов активации этих рецепторов со стороны разных  $\text{Ca}^{2+}$ -входов - по P/Q- и L-типам  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов или каналов  $\alpha 7$ -нХР.

Впервые показано обязательное участие РиР/депонированный  $\text{Ca}^{2+}$ /СаМКII в секреции кальцитонин ген-родственного пептида (КГРП) для последующего потенцирования размера квантов АХ.

Впервые описаны условия активации пресинаптических  $\alpha 7$ -нХР экзогенным и эндогенным АХ/холином. Раскрыта роль пресинаптических  $\alpha 7$ -нХР в аутоингибировании вызванной квантовой секреции АХ по механизму отрицательной обратной связи с участием РиР, СаМКII и  $\text{Ca}^{2+}$ -активируемых калиевых каналов SK-типа. Впервые показана возможность значительно ослабить тетаническую депрессию синаптической передачи в нервно-мышечных синапсах путем блокирования  $\alpha 7$ -нХР, РиР и SK-каналов.

Впервые описаны условия растормаживания P2X7-рецепторов АТФ и роль ионов  $\text{Ca}^{2+}$ , поступающего по ним, в активации СаМКII и растормаживании  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов L-типа с последующим усилением вызванной секреции АХ.

Впервые показана возможность избирательного вовлечения СаМКII при активации этой протеинкиназы со стороны различных  $\text{Ca}^{2+}$ -входов в разные, противоположно направленные воздействия на секрецию АХ: а) в усиление вызванного выброса АХ при растормаживании L-типа  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов; б) в торможение вызванного выброса АХ при активации  $\alpha 7$ -нХР; в) в осуществление РиР-зависимой секреции эндогенного КГРП; г) в

опосредованное активацией P2X7 рецепторов растормаживание L-типа  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов с последующим потенцированием вызванного выброса АХ.

### **Теоретическая и практическая значимость работы**

Результаты работы открывают новые направления в исследованиях  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимых регуляторных контуров, управляющих квантовой секрецией АХ в моторных синапсах. Наряду с общеизвестным триггерным  $\text{Ca}^{2+}$ -входом (по P/Q-типу  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов), описан вклад четырех других источников повышения пресинаптического  $\text{Ca}^{2+}$  – за счет входа  $\text{Ca}^{2+}$  по потенциал-зависимым  $\text{Ca}^{2+}$ -каналам L-типа, РиР, P2X7-рецепторам и  $\alpha 7$ -нХР. Раскрыта индивидуальная роль каждого  $\text{Ca}^{2+}$ -входа в регуляции определенных  $\text{Ca}^{2+}$ -регулируемых пресинаптических мишеней и параметров секреции АХ (квантового состава потенциалов концевой пластинки (ПКП) и его изменения по ходу ритмического залпа ПКП, длительной тетанической активности моторных синапсов, размера одиночных квантов АХ). Выявлены специфические условия, необходимые для вовлечения в активность каждого  $\text{Ca}^{2+}$ -входа.

Полученные данные представляют большую научную ценность как основа для модели комплексной  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой регуляции синаптических процессов на пресинаптическом уровне, в связи с дефицитом подобной информации в других типах синапсов. Сформулировано представление о пространственно-временном разобщении определенных  $\text{Ca}^{2+}$ -входов и их мишеней, позволяющем обеспечить избирательность  $\text{Ca}^{2+}$ -регуляции отдельных процессов и функций моторной нервной терминали. Представлены доказательства в пользу специфической локализации и функционирования потенциал-зависимых  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов L-типа,  $\text{Ca}^{2+}$ -активируемых  $\text{K}^{+}$ -каналов ВК- и СК-типов, вероятной компарментализации  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимых ферментов – РКС, СаМКП, СаN, сопряженных функционально с определенными пресинаптическими  $\text{Ca}^{2+}$ -входами. Кроме того, научная ценность данной работы заключается в раскрытии новых ауторегуляторных механизмов, контролирующих активность моторных синапсов (с участием  $\alpha 7$ -нХР, СК-

каналов, РиР,  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов L-типа, СаМКП и др.). Представлена модель избирательного вовлечения одного и того же фермента – СаМКП – в разные, зачастую противоположно направленные воздействия на квантовую секрецию АХ в моторных синапсах при активации со стороны разных источников ионов  $\text{Ca}^{2+}$ .

Результаты данной работы могут быть использованы при разработке новых подходов фармакологической коррекции работы моторных синапсов во время депрессии синаптической передачи или ее ослабления при патологиях различного генеза и двигательных расстройствах. Среди выявленных в работе, заслуживающих внимания и дальнейшей разработки – пептидные препараты из числа аналогов КГРП, блокаторы SK-каналов, агонисты  $A_{2A}$ -рецепторов аденозина, ингибиторы СаN и др.

### **Положения, выносимые на защиту**

1. В нервно-мышечных синапсах мышцы существует система разнонаправленной регуляции потенциал-зависимых  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов L-типа, обеспечиваемая функционированием пресинаптических метаботропных рецепторов, ферментов и ионных каналов. В случае растормаживания L-типа  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов (независимо от способа), их активность сопряжена с активацией РиР, выбросом депонированного  $\text{Ca}^{2+}$  и вовлечением  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимых ферментов в усиление квантовой секреции АХ.
2. В моторных синапсах мышцы обязательно участие РиР и депонированного  $\text{Ca}^{2+}$  в СаМКП-опосредованном выбросе КГРП для дальнейшего потенцирования пептидом размера квантов АХ на пресинаптическом уровне.
3. В моторных синапсах мышцы присутствует конститутивная активность кальций-зависимой пресинаптической фосфатазы СаN. Эта активность направлена на подавление работы L-типа  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов.
4. В ритмически активных моторных синапсах имеет место активация ионотропных P2X7-рецепторов АТФ и вход ионов  $\text{Ca}^{2+}$  по каналам этих

рецепторов. В условиях ослабления тормозных пресинаптических пуринергических воздействий активация P2X7-рецепторов может приводить к активации CaMKII и L-типа Ca<sup>2+</sup>-каналов, потенцирующих квантовую секрецию АХ.

5. Утомление (депрессия) синаптической передачи в моторных синапсах при их длительной залповой активности – в значительной степени результат аутоингибирования квантовой секреции АХ с участием АХ/холина, пресинаптических α7-нХР во взаимодействии с РиР, CaMKII и SK-каналами. Долговременная тетаническая депрессия синаптической передачи практически наполовину снижается путем избирательного ингибирования α7-нХР, РиР или SK-каналов.
6. В моторных синапсах мышцы возможен запуск активности пресинаптической CaMKII и ее противоположно направленных воздействий (усиливающих либо подавляющих) на квантовую секрецию АХ, в зависимости от условий активации этой протеинкиназы со стороны трех разных источников поступления ионов Ca<sup>2+</sup> в нервную терминаль.

### **Личный вклад автора**

Личный вклад соискателя Гайдукова А.Е. присутствует на каждом этапе выполнения диссертационной работы и заключается в разработке направлений исследований, анализе литературных данных, проведении электрофизиологических экспериментов, статистической обработке и анализе полученных экспериментальных данных, написании тезисов и статей, представлении результатов работы на международных и российских научных конференциях.

### **Апробация материалов диссертации**

Основные результаты диссертационной работы были представлены на Съезде физиологического общества (Дублин, Ирландия, 2009), на Международных конференциях «Рецепторы и внутриклеточная сигнализация» (Пушино, Россия, 2009, 2011, 2013, 2015, 2017), на XXII и XIII



Съездах Физиологического общества им. И.П. Павлова (Волгоград, 2013; Воронеж, 2017); на международных форумах федерации европейских обществ нейронаук FENS (Женева, Швейцария; 2008; Амстердам, Нидерланды, 2010; Барселона, Испания, 2012; Милан, Италия, 2014; Копенгаген, Дания, 2016), на II, III, V Съездах физиологов СНГ (Кишинев, Молдова, 2008; Ялта, Украина, 2011; Сочи, Россия, 2016), на ежегодном Съезде Society for Neuroscience (Вашингтон, США, 2014), на международной конференции «Актуальные проблемы нейробиологии» (Казань, Россия, 2019)

Материалы диссертации прошли апробацию на заседании кафедры физиологии человека и животных Биологического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова 30 января 2023 года.

### **Публикации**

По материалам диссертации опубликовано 18 статей (из них 15 в рецензируемых журналах, индексируемых аналитической базой Web of Science) и 27 тезисов в сборниках докладов научных конференций.

### **Структура и объем диссертации**

Диссертация изложена на 309 страницах, состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов и их обсуждения, заключения и выводов. Список литературы включает 650 источников. Работа иллюстрирована 45 рисунками.

## 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

В настоящем обзоре суммированы данные современной литературы о специфических свойствах четырех разных путей поступления ионов  $\text{Ca}^{2+}$  в аксоплазму нервных терминалей ( $\text{Ca}^{2+}$ -входов) и их избирательном участии в регуляции секреции нейротрансмиттеров в центральных и периферических синапсах.

В обзоре рассмотрены следующие пресинаптические  $\text{Ca}^{2+}$ -входы:

1. Потенциалзависимые  $\text{Ca}^{2+}$ -каналы (P/Q-, L-типов и др.);
2.  $\text{Ca}^{2+}$ -каналы рианодиновых рецепторов (РиР) эндоплазматического ретикулума (ЭР);
3.  $\text{Ca}^{2+}$ -проводящие катионные каналы P2X7-рецепторов АТФ;
4.  $\text{Ca}^{2+}$ -проводящие каналы ионотропных никотиновых холинорецепторов альфа7-типа ( $\alpha 7$ -нХР).

### 1.1. Потенциал-зависимые $\text{Ca}^{2+}$ -каналы

Начиная с первых работ основоположников синаптической физиологии – Бернарда Катца, Рикардо Миледи, Пола Фэтта и Хосе дель Кастилло, было установлено, что  $\text{Ca}^{2+}$ -каналы в составе нервных терминалей синапсов активируются в ответ на деполяризацию пресинаптической мембраны распространяющимся по аксону потенциалом действия (ПД) [del Castillo, Katz, 1954; Fatt, Katz, 1951; Katz, Miledi, 1965, 1967, 1968]. Такие каналы относятся к многочисленному семейству потенциал-зависимых  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов ( $\text{Ca}_v$ ).

Сегодня в нервных терминалях синапсов в ЦНС и на периферии описана экспрессия нескольких типов каналов  $\text{Ca}_v$ , которые отличаются по молекулярной структуре, функциональным свойствам и влиянием на секрецию нейротрансмиттеров.

### 1.1.1. Классификация $Ca_v$ -каналов нервной системы

Если рассматривать  $Ca_v$ -каналы безотносительно паттерна экспрессии и локализации именно в пресинаптической мембране нервных окончаний, то их традиционно делят на 2 группы.

Первую группу составляют высокопороговые  $Ca_v$ -каналы, активирующихся (переходящие в открытое состояние) при низких значениях мембранного потенциала (МП) (HVA—от англ. *high voltage activated*), которым требуется значительная деполяризация мембраны по сравнению с потенциалом покоя (ПП) для их активации. К ним относят L-тип ( $Ca_v1.1-1.4$ ), P/Q-тип ( $Ca_v2.1$ ), N-тип ( $Ca_v2.2$ ) и R-тип ( $Ca_v2.3$ ) потенциал-зависимых  $Ca^{2+}$ -каналов [Catterall, 2000, 2011; Dolphin, Lee, 2020; Lacinová, 2005; Zamponi et al., 2015].

В состав второй группы входит единственный T-тип  $Ca^{2+}$ -каналов ( $Ca_v3.1-3.3$ ) - низкопороговый (LVA—от англ. *low voltage activated*). Он активируется при незначительных деполяризующих сдвигах МП, близких к ПП. При этом T-тип  $Ca^{2+}$ -каналов демонстрирует быструю кинетику срабатывания воротного механизма и обладает малой унитарной проводимостью. LVA-каналы играют главную роль в реализации нейрональной пейсмейкерной активности, развития эпилепсии и проведения боли [Nelson et al., 2006; Weiss, Zamponi, 2019].

На рубеже XX-XXI веков было установлено, что у млекопитающих  $\alpha 1$ -субъединицы  $Ca_v$ -каналов кодируются 10 отдельными генами, разделяемыми на 3 отдельных подсемейства по сходству последовательностей. Основываясь на генетических данных, в современной физиологии  $Ca_v$ -каналы также делят на 3 группы –  $Ca_v1$ ,  $Ca_v2$  и  $Ca_v3$  [Catterall, 2000, 2011; Dolphin, Lee, 2020].

Исследование потенциал-активируемых  $Ca^{2+}$ -токов и опосредующих их каналов на многочисленных объектах показало, что простое разделение потенциал-зависимых  $Ca^{2+}$ -каналов на LVA и HVA – достаточно искусственно и в малой степени отражает фактическое положение дел.

Реально существует континуум порогов активации среди различных подтипов  $Ca_v$ , который меняется в зависимости от результата альтернативного сплайсинга основной каналообразующей  $\alpha 1$ -субъединицы в конкретных клетках, и дополнительно модифицируется в результате комбинирования изоформ вспомогательных субъединиц  $\beta$ ,  $\alpha 2\delta$  и  $\gamma$ , взаимодействующих с  $\alpha 1$ . Это, в конечном итоге, способно приводить к различным физиологическим проявлениям, включая модулирование синаптической передачи [Brockhaus et al., 2018; Heck et al., 2019; Lipscombe et al., 2013; Thalhammer et al., 2017].

Несмотря на такую новую общепринятую классификацию, старые буквенные варианты обозначений каналов  $Ca_v$  до сих пор продолжают употребляться для подчеркивания функциональной специфики: L-тип -  $Ca_v1$ ; P/Q-, N-, R-типы -  $Ca_v2$  и T-тип -  $Ca_v3$ .

Согласно современным данным, на пресинаптической мембране могут быть представлены разные типы  $Ca_v$ -каналов, при этом в разных синапсах плотность и степень их участия в определенных режимах функционирования нервных терминалей - выражены по-разному. Наиболее типичными для центральных синапсов в качестве триггеров экзоцитоза синаптических везикул являются HVA-каналы N- и P/Q-типов, тогда как у периферических синапсов амфибий в качестве такого триггера задействован N-тип, а у млекопитающих - P/Q-тип  $Ca^{2+}$ -каналов [Dolphin, Lee, 2020; Laghaei et al., 2018; Urbano et al., 2002].

## **1.1.2. Молекулярная структура $Ca_v$ -каналов**

### **1.1.2.1. Основная каналообразующая $\alpha 1$ -субъединица $Ca_v$ -каналов**

Потенциал-зависимые  $Ca^{2+}$ -каналы представляют собой мультисубъединичный комплекс, состоящий из основной каналообразующей субъединицы  $\alpha 1$  с дополнительными субъединицами (за исключением  $Ca_v3$ , образующих канал без участия дополнительных субъединиц) [Catterall, 2011; Dolphin, Lee, 2020]. Субъединица  $\alpha 1$  (190-250 кДа) является самой большой и

включает в себя структуры, образующие проводящую ионы  $\text{Ca}^{2+}$  пору, сенсоры напряжения и воротные механизмы, а также большинство специфических участков, обеспечивающих широкий спектр регуляторных влияний на работу канала со стороны вторичных посредников, фармакологических агентов и токсинов.

Топологическая организация субъединицы  $\alpha 1$ , состоящей из примерно 2000 аминокислотных остатков, представляет собой 4 гомологичных домена (I-IV). Каждый такой домен состоит из 6 трансмембранных  $\alpha$ -спиралей (S1-S6) и неспирализованной P-петли между S5 и S6. Сенсором потенциала служит S4, содержащий последовательности из 4-5 положительно заряженных аминокислотных остатков аргинина или лизина, разделенных трехааминокислотными интервалами. Положительные заряды в составе S4 находятся во взаимодействии с «противозарядами» (негативно заряженные и полярные аминокислотные остатки) в составе S1-S3, образуя совместно потенциал-чувствительный домен [Groome, Bayless-Edwards, 2020; Tuluc et al., 2016]. Соединяющие S5 и S6 всех 4-х доменов P-петли выстилают пору и содержат в определенных местах негативно заряженные аминокислотные остатки (в основном, глутамат), формирующие ионоселективный фильтр канала.

Конформационные изменения S5 и S6, индуцированные (в ответ на деполяризацию мембраны) транслокацией в экстраклеточную часть плазмалеммы S4 в составе потенциал-чувствительного домена, обеспечивают непосредственное функционирование воротного механизма  $\text{Ca}_v$ -каналов [Catterall, 2011; Tuluc et al., 2016]. Обширные внутриклеточные неспирализованные участки молекулы  $\alpha 1$ -субъединицы - направленные в цитоплазму N- и C-концы, междоменные петли - служат своеобразной сигнальной платформой для модулирования  $\text{Ca}^{2+}$ -токов и  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой регуляции синаптической передачи.

### 1.1.2.2. Вспомогательные субъединицы $Ca_v$ -каналов

Свойства каналов  $Ca_v1$  и  $Ca_v2$  модулируются вспомогательными субъединицами, зачастую обеспечивая различные роли этих типов каналов в секреции нейротрансмиттеров.  $\beta$ -субъединицы  $Ca^{2+}$ -каналов – результат экспрессии 4-х отдельных генов. Они являются цитоплазматическими модуляторами их функций, регулируя как количество каналов на мембране клетки, так и их потенциал-зависимую активацию и инактивацию [Ferron et al., 2022; Tran-Van-Minh et al., 2022].  $\beta$ -субъединицы взаимодействуют с  $\alpha1$ -субъединицами за счет наличия у последних специального участка на внутриклеточной петле между I и II доменами.

Субъединицы  $\alpha2\delta$  - результат посттрансляционного процессинга продукта одного из 4-х генов, кодирующих препробелок. В результате протеолиза из препробелка образуются  $\alpha2$  и  $\delta$ , соединенные дисульфидным мостиком. За счет гликозилфосфатидилинозитольного якоря  $\alpha2\delta$  взаимодействуют с внешним листом плазмалеммы и одновременно связываются с первой внеклеточной петлей домена I  $\alpha1$ -субъединиц  $Ca_v1$  и  $Ca_v2$ . Они могут регулировать активацию и инактивацию каналов, а также не просто уровень их экспрессии на поверхности клеток (вместе с  $\beta$ -субъединицами), но и направление (траффик) этих каналов в специфические мембранные домены нейронов, включая пресинаптическую мембрану [Risher, Eroglu, 2020]. Помимо этого, показано, что  $\alpha2\delta$  могут обеспечивать трансинаптические взаимодействия с белками постсинаптической мембраны, включая рецепторы к нейротрансмиттерам [Chen et al., 2018; Geisler et al., 2019], и определять уровень вероятности выброса нейротрансмиттера в центральных синапсах [Норра et al., 2012].

Наконец,  $\gamma$ -субъединица - неотъемлемый компонент  $Ca^{2+}$ -каналов скелетных мышечных волокон ( $Ca_v1.1$ ), но не пресинаптических  $Ca_v2.1$  и  $Ca_v2.2$  [Zamponi et al., 2015].

Таким образом, ансамбль дополнительных субъединиц  $Ca_v$ -каналов, хотя и модулирует функциональные характеристики  $Ca^{2+}$ -каналов, но ключевые

фармакологические и физиологические различия  $Ca_v$ -каналов обусловлены преимущественно различиями в структуре изоформ их  $\alpha 1$ -субъединиц.

### **1.1.3. $Ca_v$ -каналы в нервных окончаниях и их роль в экзоцитозе синаптических везикул**

#### **1.1.3.1. Локализация $Ca_v$ -каналов в активных зонах моторных нервных терминалей**

Начиная с 60-х годов XX столетия стало известно, что в нервно-мышечных и всех других химических синапсах, секреция нейротрансмиттера из терминалей происходит в специализированных регионах пресинаптической мембраны – активных зонах [Badawi, Nishimune, 2018]. Набор специфически взаимодействующих белков активных зон обеспечивает не только рекрутирование, докинг, прайминг синаптических везикул и их последующий экзоцитоз, но и правильное позиционирование  $Ca_v$ -каналов в непосредственной близости от везикул и точное расположение пре- и постсинаптических структур строго друг напротив друга, а также участвует в реализации пресинаптической пластичности [Dittrich et al., 2018; Homan, Meriney, 2018].

Активные зоны моторных синапсов млекопитающих организованы в виде коротких (80-100 нм) линейных рядов, образованных синаптическими везикулами и внутримембранными частицами (ионными каналами и др.). В каждой активной зоне экзоцитоз синаптических везикул происходит в местах их докинга, а по бокам от них расположены ряды из примерно 20 трансмембранных частиц, часть из которых считается потенциал-зависимыми  $Ca^{2+}$ -каналами [Nagwaney et al., 2009]. Таким образом, в активных зонах моторных синапсов млекопитающих  $Ca^{2+}$ -каналы расположены по обеим сторонам докированных синаптических везикул, в отличие от нервно-мышечного синапса лягушки, где ряды частиц в активных зонах значительно длиннее (1-2 мкм), а  $Ca^{2+}$ -каналы располагаются только с одной стороны от синаптических везикул [Meriney, Dittrich, 2013]. Эксперименты с

использованием высокочастотной стимуляции моторных синапсов показали, что в моторных синапсах мышцы число докированных синаптических везикул, отражающих максимально возможный размер пула везикул, готовых к выбросу (англ. – *readily-releasable pool*, RRP), составляет около 1700 [Ruiz et al., 2011]. Учитывая, что зрелый моторный синапс мышцы содержит примерно 900 активных зон [Сапо и др., 2012; Laghaei и др., 2018], эти данные подтверждают предположения, полученные с помощью электронно-микроскопических методов, о наличии в каждой активной зоне моторных синапсов млекопитающих 2-х синаптических везикул, потенциально готовых к экзоцитозу.

Слияние синаптических везикул с пресинаптической мембраной может происходить и в отсутствие электрической стимуляции мембраны (спонтанная секреция), и в течение миллисекунд после достижения потенциала действия нервной терминали (быстрый синхронный выброс нейротрансмиттера) или, наконец, в течение десятков секунд после стимуляции (асинхронный выброс нейротрансмиттера). Все эти паттерны секреции нейротрансмиттеров по-разному зависят от изменения внутритерминальной концентрации ионов  $Ca^{2+}$  и функционирования определенных  $Ca^{2+}$ -входов [Bukharaeva, 2015; Chanaday, Kavalali, 2018; Kaeser, Regehr, 2014]. В подавляющем большинстве химических синапсов, включая нервно-мышечные, основными (триггерными)  $Ca^{2+}$ -входами, обеспечивающими быстрый синхронный выброс нейротрансмиттера, служат  $Ca^{2+}$ -каналы семейства  $Ca_v2$  –  $Ca_v2.1$  (P/Q-тип) и  $Ca_v2.2$  (N-тип) и в меньшей степени –  $Ca_v2.3$  (R-тип).

### **1.1.3.2. Потенциал-зависимые $Ca^{2+}$ -каналы P/Q-типа ( $Ca_v2.1$ ) и их роль в нервных терминалях**

Свое название  $Ca^{2+}$ -каналы P/Q-типа получили после описания специфических полиаминных или пептидных токсинов пауков, блокирующих  $Ca^{2+}$ -токи, опосредуемые  $Ca^{2+}$ -каналами в клетках Пуркинье (отсюда первоначальное классифицирование этого типа кальциевых каналов – P-тип)



или в гранулярных клетках мозжечка (Q-тип) [Llinas et al., 1989; Llinás et al., 1992; Randall, Tsien, 1995]. Вскоре было установлено, что  $Ca^{2+}$ -токи, чувствительные к этим токсинам, обеспечивают вызванную активность не только во многих центральных, но и в моторных синапсах млекопитающих. В них широко используемый до настоящего времени в качестве селективного блокатора  $Ca_v2.1$   $\omega$ -агатоксин IVA способен полностью прекратить быструю синхронную многоквантовую секрецию АХ [Hong, Chang, 1995; Protti, Uchitel, 1993; Uchitel et al., 1992]. Считается, что оба  $Ca^{2+}$ -тока - P- и Q- типа – развиваются при срабатывании  $Ca^{2+}$ -каналов с основной порообразующей субъединицей  $\alpha1A$ , кодируемой одним геном *CACNA1A*. Разделение токов (и каналов) на P- и Q-типы может быть результатом комбинирования  $\alpha1A$  субъединицы с различными изоформами  $Ca_v\beta$ -субъединиц [Richards et al., 2007]. В нервно-мышечных синапсах мышцы доминирующей изоформой  $\beta$ -субъединицы, взаимодействующей с  $\alpha1A$   $Ca_v2.1$ , является  $\beta4$  [Molina-Campos et al., 2015]. Еще одним фактором, обеспечивающим экспрессию широкого спектра  $Ca_v2.1$ -токов (которые сейчас называют P/Q-типом) с разными биофизическими и фармакологическими характеристиками, является альтернативный сплайсинг гена, кодирующего  $\alpha1A$ -субъединицу  $Ca_v2.1$ -каналов [Bourinet et al., 1999; Zamponi et al., 2015].

#### **1.1.3.2.1. Роль субъединицы $\alpha1A$ $Ca^{2+}$ -каналов P/Q-типа в их активности**

Об исключительной функциональной важности именно  $\alpha1A$ -субъединицы по сравнению с дополнительными в составе гетеромультимерных комплексов  $Ca^{2+}$ -каналов P/Q-типа для обеспечения нервно-мышечной передачи сигнала свидетельствуют данные о неврологических повреждениях (прогрессирующей атаксии и дистонии), сопровождающихся значительными нарушениями синаптической передачи, и смерти в течение нескольких недель после рождения мышей с нокаутом гена  $\alpha1A$ -субъединицы, несмотря на компенсаторное участие в поддержании

быстрой синхронной секреции АХ со стороны других типов  $Ca_v$  моторных нервных терминалей [DePetris et al., 2008; Jun et al., 1999].

$\alpha 1A$ -субъединицы P/Q-типа  $Ca^{2+}$ -каналов моторных синапсов являются ключевой мишенью аутоантител при миастеническом синдроме Ламберта-Итона. Характерной особенностью при патогенезе этого заболевания является не просто уменьшение поступления ионов  $Ca^{2+}$  в моторное нервное окончание, но и дезорганизация там активных зон, сопровождающееся изменением сопряжения триггерного  $Ca^{2+}$ -входа и синаптических везикул. Это, учитывая нелинейность  $Ca^{2+}$ -зависимости быстрой синхронной секреции нейротрансмиттеров в химических синапсах, крайне негативно сказывается на нервно-мышечной передаче [Meriney et al., 2018; Tarr et al., 2015].

Ключевая роль каналов  $Ca_v2.1$  в обеспечении секреции нейротрансмиттеров не только в качестве триггерного  $Ca^{2+}$ -входа, но и как участника формирования и функционирования активных зон показана не только при каналопатиях и аутоиммунных воздействиях на этот тип потенциал-зависимых  $Ca^{2+}$ -каналов, но и по результатам протеомного анализа. Количественная протеомика свидетельствует, что пресинаптический интерактом (паттерн взаимодействия белков)  $Ca_v2$ -каналов образует так называемое наноокружение и насчитывает около 200 белков, хотя не все из них связаны с  $Ca_v2$  напрямую [Müller et al., 2010].

Именно эволюционно консервативная тесная ассоциация  $Ca_v2$ -каналов с определенными структурными белками активных зон обеспечивает при открывании этих каналов в ответ на приход ПД быстроту экзоцитоза синаптических везикул, и ровно напротив соответствующих постсинаптических элементов.

#### **1.1.3.2.2. Связь $Ca^{2+}$ -каналов P/Q-типа с белками докинга и прайминга синаптических везикул**

Белки, взаимодействующие с везикулярными малыми ГТФазами Rab3 – RIMs (*англ. Rab3-interacting molecules*) - являются одними из ключевых

факторов активных зон, обеспечивающими не только докинг и прайминг синаптических везикул. Они также связываются посредством своих PDZ-доменов с консервативным аминокислотным мотивом на цитоплазматическом С-конце  $\alpha 1A$ -субъединицы  $Ca_v2.1$ -каналов [Kaeser et al., 2011; Mochida, 2019]. Такое взаимодействие является необходимым для рекрутирования в пресинаптические активные зоны  $Ca^{2+}$ -каналов и их правильного позиционирования, определяя там их плотность, наряду с осуществлением докинга синаптических везикул. Помимо прямого взаимодействия, RIMs также контактируют с каналами  $Ca_v2.1$  опосредованно, за счет взаимодействия с RIM-связывающими белками, которые связываются с богатыми пролином участками на С-конце субъединицы  $\alpha 1A$   $Ca_v2.1$ -каналов. Учитывая многочисленные связи RIMs и RIM-связывающих белков как с  $\beta$ -субъединицей  $Ca^{2+}$ -каналов, так и белками цитоматрикса активных зон CAST/ELKS и Bassoon, также взаимодействующими с  $\beta$ -субъединицей, можно говорить о наличии в активной зоне взаимосвязанной белковой сети. Основой такой сети служит тройной комплекс - RIMs, RIM-связывающие белки и С-концы  $Ca^{2+}$ -каналов – располагающий триггерные  $Ca^{2+}$ -каналы на определенном расстоянии от синаптических везикул (позиционный прайминг). Нарушение одной точки связи в такой сети может быть скомпенсировано за счет других молекулярных взаимодействий  $Ca_v2.1$ -каналов в активных зонах [Davydova et al., 2014; Dolphin, Lee, 2020; Hirano et al., 2017].

В синапсах ЦНС взаимодействие субъединиц  $Ca_v2.1$ -каналов с RIMs, белками цитоматрикса и белковыми регуляторами прайминга определяет не только собственно позиционный прайминг синаптических везикул по отношению к триггерному  $Ca^{2+}$ -входу, но и разнонаправленно контролирует время перехода самих  $Ca^{2+}$ -каналов из закрытого в открытое состояние и обратно в ответ на пресинаптический ПД (а также - потенциалозависимость инактивации  $Ca^{2+}$ -каналов). Это, в конечном итоге обуславливает динамику функционирования  $Ca^{2+}$ -каналов и  $Ca^{2+}$ -зависимого характера секреции

квантов нейротрансмиттера при ритмической нейрональной активности [Calloway et al., 2015; Kiyonaka et al., 2007; Mochida, 2019].

Учитывая высокую консервативность белков активных зон и машинерии экзоцитоза, а также доказанное наличие всех ключевых белков в активных зонах моторных нервных терминалей млекопитающих [Juraneck et al., 2006], можно с уверенностью предполагать, что такой же характер влияния белков позиционного прайминга на активность  $Ca_v2.1$ -каналов имеет место и в активных зонах нервно-мышечных синапсов млекопитающих.

### **1.1.3.2.3. Регуляция $Ca^{2+}$ -каналов P/Q-типа в нервных терминалях**

#### **1.1.3.2.3.1. Synprint-сайт $Ca_v2$ -каналов и его регуляторная роль**

В составе триггерных  $Ca_v2$ -каналов был идентифицирован synprint-сайт (англ. *synaptic protein interaction*). Это последовательность аминокислот в составе цитоплазматической петли между доменами II и III  $\alpha 1$ -субъединиц каналов  $Ca_v2.1$  и  $Ca_v2.2$ . Synprint обеспечивает  $Ca^{2+}$ -зависимое связывание несущих его  $Ca^{2+}$ -каналов с белками экзоцитоза SNARE-комплекса - синтаксином и SNAP-25, а также с главным везикулярным  $Ca^{2+}$ -сенсором – синаптотагмином [Rettig et al., 1996; Zhong et al., 1999]. Физиологическое значение такого прямого взаимодействия, в первую очередь, заключается в регуляции активности самих триггерных  $Ca^{2+}$ -каналов, а не в физической связи канала с синаптической везикулой и машинерией экзоцитоза. Встроенные в пресинаптическую мембрану t-SNAREs - синтаксин и SNAP-25 (еще вне собранных SNARE-комплексов при отсутствии докированной синаптической везикулы) - обеспечивают сдвиг потенциалозависимости инактивации  $Ca_v2.1$  в сторону более негативных значений МП, уменьшая доступность каналов для обеспечения экзоцитоза, но не препятствуя их активации [Bezprozvanny et al., 1995; Zhong et al., 1999]. Образование окончательно собранных SNARE-комплексов с участием синаптотагминов, и взаимодействие именно синаптотагминов с synprint обеспечивает отмену негативного влияния молекул t-SNARE на  $Ca_v2.1$ . Это способствует открытию

Ca<sup>2+</sup>-каналов, входу по ним ионов Ca<sup>2+</sup>, взаимодействию последних с синаптотагминами и, в конечном итоге увеличению вероятности выброса докированных вблизи этих Ca<sup>2+</sup>-каналов синаптических везикул [Djillani et al., 2022; Zhong et al., 1999].

Взаимодействие t-SNARE с сайтом synprint контролируется фосфорилированием synprint Ca<sup>2+</sup>-зависимыми ферментами – PKC и CaMKII [Jiang et al., 2008; Yokoyama et al., 2005]. Недавно показано, что не только synprint, но и другие участки в составе  $\alpha 1A$ -субъединицы Cav2.1 могут функционально взаимодействовать со SNARE-белками, расширяя, таким образом, возможности регуляторных воздействий со стороны Cav2.1 на процесс запуска нейротрансмиссии [Serra et al., 2018].

#### **1.1.3.2.3.2. Регуляторная роль ионов Ca<sup>2+</sup> и кальмодулина (CaM)**

Вход ионов Ca<sup>2+</sup>, изменяя их цитоплазматическую концентрацию около Cav2.1-каналов, влияет не только на экзоцитоз синаптических везикул, но и на активность самих Ca<sup>2+</sup>-каналов. Это происходит за счет стимулирования Ca<sup>2+</sup>-связывающих белков, и прежде всего CaM. Внутриклеточный C-конец  $\alpha 1A$ -субъединицы несет два функционально важных участка, обеспечивающих её взаимодействие Ca<sup>2+</sup>-связывающими белками – IQ-похожим мотивом (IM) и CaM-связывающим доменом (CBD). При увеличении локальной концентрации ионов Ca<sup>2+</sup>, чувствующие его белки сначала взаимодействуют с участком IM, инициируя Ca<sup>2+</sup>-зависимую фасилитацию канала (CDF), обеспечивая развитие кратковременного облегчения синаптической передачи в моторных синапсах мыши. В случае длительного (глобального) повышения концентрации ионов Ca<sup>2+</sup>, CaM, связывая больше ионов Ca<sup>2+</sup>, взаимодействует с CBD, индуцируя Ca<sup>2+</sup>-зависимую инактивацию (CDI) Cav2.1-каналов [Demaria и др., 2001; Lee и др., 1999; Mochida и др., 2008; Nanou и др., 2016]. Эти и другие данные свидетельствуют о том, что регулирование активности триггерных Cav2.1-каналов с помощью CaM и других Ca<sup>2+</sup>-связывающих

белков может играть одну из ключевых ролей в механизмах кратковременной пластичности в моторных синапсах.

### **1.1.3.2.3.3. Регуляция пресинаптическими метаботропными рецепторами и G-белками**

Модулирование активности Cav2.1-каналов не исчерпывается их взаимодействием с белками SNARE-комплекса и Ca<sup>2+</sup>-связывающими белками. Еще один путь регуляции работы каналов Cav2 – их ингибирование за счет активности близко расположенных к каналам G-белок-сцепленных рецепторов, связанных с G<sub>i</sub>/G<sub>o</sub>-белками. Такое ингибирование Cav<sub>v</sub> реализуется за счет замедления их активации и опосредуется непосредственным взаимодействием βγ-субъединиц G-белка с определенными участками на N- и C-концах канала, а также на цитоплазматической петле между I и II доменами α1-субъединиц Cav2-каналов при необходимом участии β-субъединицы [Zamponi, Currie, 2013; Zhang et al., 2008].

G<sub>βγ</sub>-опосредованное ингибирование Cav2-каналов является потенциал-зависимым, поскольку его влияние на работу Ca<sup>2+</sup>-каналов может быть значительно снижено при сильной и/или повторяющейся деполяризации мембраны, что вызывает уход G<sub>βγ</sub>-субъединиц от Ca<sup>2+</sup>-каналов [Zamponi, Currie, 2013]. Считается, что в нервно-мышечном синапсе млекопитающих такой способ регуляции прямым ингибированием βγ-субъединицами G<sub>i</sub>-белков активности триггерных Ca<sup>2+</sup>-каналов P/Q-типа и опосредуемых ими пресинаптических Ca<sup>2+</sup>-токов, запускающих быструю синхронную квантовую секрецию АХ, принципиально может функционировать в случае активации и запуска сигнальных путей со стороны пресинаптических метаботропных G<sub>i</sub>-белок-сцепленных аденозиновых A<sub>1</sub>- и A<sub>3</sub>-рецепторов [Cinalli et al., 2013; Silinsky, 2004], пуриновых P2Y<sub>13</sub>-рецепторов [Guarracino и др., 2016] и мускариновых M<sub>2</sub>-рецепторов [Santafé et al., 2003].

#### 1.1.3.2.3.4. Регуляция пресинаптическими ферментами

Существует еще один возможный способ модулирования активности в моторных синапсах  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов P/Q-типа - за счет их фосфорилирования различными  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимыми и  $\text{Ca}^{2+}$ -независимыми протеинкиназами, как это показано для ряда центральных синапсов и в гетерологичных экспрессирующих системах [Dai et al., 2009]. Среди потенциальных кандидатов, способных оказывать влияние на работу P/Q-типа  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов, можно рассматривать цАФМ-зависимую протеинкиназу А (РКА), различные пресинаптические изоформы РКС, СаМКII и циклин-зависимую киназу cdk-5.

Показано, что, в зависимости от результата альтернативного сплайсинга, получающиеся белковые продукты  $\alpha 1A$ -субъединицы  $\text{Ca}_v2.1$  могут дифференцированно фосфорилироваться РКА или РКС [Sakurai et al., 1995]. В ЦНС активация  $G_s$ -белок-сцепленных рецепторов, стимулирующих аденилатциклазу и РКА, обеспечивает усиление  $\text{Ca}_v2.1$ -опосредуемых  $\text{Ca}^{2+}$ -токов [Huang et al., 1998]. Предполагается, что РКА может модулировать активность  $\text{Ca}_v2.1$  не напрямую, а противодействуя негативному влиянию на канал мембранного липида фосфатидилинозитол-4,5-бифосфата ( $\text{PIP}_2$ ), сдвигающего потенциал-зависимость активации  $\text{Ca}_v2.1$  в сторону более деполяризованного МП [Rodríguez-Menchaca et al., 2012; Wu et al., 2002]. Активация РКС может приводить к фосфорилированию  $G_{\beta\gamma}$ -связывающего сайта в I-II линкерном участке  $\text{Ca}_v2.1$ , противодействуя, таким образом,  $G$ -белок-опосредованному торможению  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов [Zamponi et al., 1997]. В экспериментах на моторных синапсах крысы показано, что активация РКА и РКС и последующее потенцирование одиночной вызванной секреции АХ зависит от функционирования P/Q-типа  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов, что позволяет предполагать  $\text{Ca}_v2.1$ -каналы как возможную финальную мишень регуляторного действия этих протеинкиназ на секрецию АХ в моторных синапсах млекопитающих [Santafé et al., 2009, 2006].

Согласно данным, полученным при экспрессии  $\text{Ca}_v2.1$  в клеточных линиях и их активности в нервных терминалях пирамидальных нейронов

гиппокампа, потенцировать работу этого типа  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов, замедляя развитие их потенциал-зависимой инактивации, способна СаМКП. Причем оказалось, что в центральных синапсах модулирующая роль СаМКП обеспечивается самой ее посадкой на С-конец  $\alpha 1$ -субъединиц  $\text{Ca}_v2.1$ , а не её каталитической активностью [Jiang et al., 2008]. При этом связывание СаМКП с  $\text{Ca}_v2.1$  обеспечивает усиление активности самой СаМКП за счет увеличения её аутофосфорилирования  $\text{Ca}^{2+}$ -независимым способом [Mochida, 2018]. Такая связанная с  $\text{Ca}_v2.1$  СаМКП способна фосфорилировать синапсины, снижая, таким образом уровень связи синаптических везикул в резервном или рециклирующем пулах с актиновым цитоскелетом, что способствует восполнению RRP при высокочастотной и/или длительной активности синапса [Magupalli et al., 2013]. Необходимо отметить, что в современной литературе отсутствуют данные о подобной модулирующей роли СаМКП именно в моторных терминалях млекопитающих, хотя при этом показано её потенцирующее влияние на синаптическую передачу в нервно-мышечных синапсах лягушки [Mukhamedyarov et al., 2010].

#### **1.1.3.2.4. Пресинаптические $\text{Ca}^{2+}$ -каналы P/Q-типа и создание в активных зонах $\text{Ca}^{2+}$ -доменов**

Срабатывание в течение определенного (обычно – короткого) промежутка времени  $\text{Ca}^{2+}$ -входа вызывает появление в цитоплазме нервной терминали локализованного и достаточно короткоживущего увеличения концентрации ионов  $\text{Ca}^{2+}$  –  $\text{Ca}^{2+}$ -домена.

В настоящее время пресинаптические  $\text{Ca}^{2+}$ -домены разделяются на два типа. Первый – нанодомен, своеобразная «струя» ионов  $\text{Ca}^{2+}$  в высокой концентрации, возникающая в цитоплазме в результате открытия одиночного  $\text{Ca}^{2+}$ -канала (или иного источника ионов  $\text{Ca}^{2+}$  в нервной терминали). Нанодомен возникает и прекращается практически мгновенно при открытии и закрытии  $\text{Ca}^{2+}$ -канала (микросекунды) и имеет достаточно однородный концентрационный профиль с центром в устье канала. Данные  $\text{Ca}^{2+}$ -



имиджинга свидетельствуют, что концентрация ионов  $\text{Ca}^{2+}$  в таком нанодомене может достигать сотен микроМ [DiGregorio et al., 1999; Llinás et al., 1992], но только - в нескольких десятках нм от устья  $\text{Ca}^{2+}$ -канала, а на больших расстояниях - резко снижается до 1 мкМ [Oheim et al., 2006].

Второй тип  $\text{Ca}^{2+}$ -домена – микродомен - возникает в результате перекрывания отдельных нанодоменов кластера открывающихся вблизи друг от друга  $\text{Ca}^{2+}$ -входов. Данный  $\text{Ca}^{2+}$ -сигнал – его размер, продолжительность существования и концентрационный профиль – достаточно вариабелен, поскольку будет определяться количеством  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов в их кластере и их взаимном пространственном расположении, а также флуктуациями их перехода из открытого состояния в закрытое [Eggermann et al., 2012; Stanley, 2016].

Таким образом, в ситуации, когда быстрый запуск секреции медиатора осуществляется с использованием нанодомена, необходимо расположение одного (или небольшого количества)  $\text{Ca}^{2+}$ -входов в непосредственной близости от синаптической везикулы (на расстоянии порядка 10-20 нм) – тогда везикула будет практически «омываться» входящим потоком ионов  $\text{Ca}^{2+}$ . Разобщить такой  $\text{Ca}^{2+}$ -сигнал способен только  $\text{Ca}^{2+}$ -буфер с быстрой кинетикой связывания ионов  $\text{Ca}^{2+}$  – 1,2-бис(2-аминофенокси) этан-N,N,N',N'-тетрауксусная кислота (ВАРТА) [Meriney, Dittrich, 2013; Tarr et al., 2013]. При формировании  $\text{Ca}^{2+}$ -микродомена, когда расстояние от источников ионов  $\text{Ca}^{2+}$  до готовых к выбросу синаптических везикул превышает 20 нм (100 нм – 1 мкм), необходимо срабатывание большего числа  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов и подъем концентрации ионов  $\text{Ca}^{2+}$ , при котором возможен запуск экзоцитоза более удаленных везикул. При этом не только ВАРТА, но и  $\text{Ca}^{2+}$ -буфер с более медленной кинетикой связывания ионов  $\text{Ca}^{2+}$  - этиленгликоль-бис ( $\beta$ -аминоэтил) -N, N, N', N'-тетрауксусная кислота (EGTA) - способен эффективно конкурировать с везикулярным  $\text{Ca}^{2+}$ -сенсором синаптотагмином за свободные катионы  $\text{Ca}^{2+}$  [Dittman, Ryan, 2019; Dolphin, Lee, 2020; Eggermann et al., 2012]. Исследование сопряжения  $\text{Ca}^{2+}$ -сигнала в районе активных зон и

секреции нейротранмиттера в разных синапсах показало, что имеет место континуум разных расстояний и геометрии расположения  $\text{Ca}^{2+}$ -входов по отношению к синаптическим везикулам как в отдельных синапсах, так иногда и в пределах одного синапса [Baur et al., 2015; Bornschein, Schmidt, 2019; Fekete et al., 2019; Nakamura et al., 2018; Vyleta, Jonas, 2014; Wang, Augustine, 2015].

В настоящий момент считается, что сопряжение входа ионов  $\text{Ca}^{2+}$ -через P/Q-тип  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов и синаптотагмина в нервно-мышечном синапсе млекопитающих - очень тесное, то есть обеспечивается  $\text{Ca}^{2+}$ -нанодоменом протяженностью порядка 20 нм [Dittrich et al., 2018; Homan, Meriney, 2018; Laghaei et al., 2018].

В отличие от моторного синапса лягушки, где количество триггерных  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов N-типа ( $\text{Ca}_v2.2$ ) на везикулу, докированную в активной зоне, не превышает 2, в нервно-мышечном синапсе млекопитающих значение этого соотношения может достигать 4 [Homan, Meriney, 2018]. Кроме того, в моторном синапсе млекопитающих  $\text{Ca}^{2+}$ -каналы теснее сопряжены пространственно с синаптическими везикулами, что, по всей видимости, обеспечивает более высокую вероятность выброса АХ (и меняющийся характер синаптической пластичности при ритмической активности) в моторных синапсах млекопитающих по сравнению с нервно-мышечными синапсами холоднокровных [Fukuoka et al., 1987; Heuser et al., 1979]. При этом в нервно-мышечном синапсе млекопитающих, несмотря на высокое количество мест, откуда может осуществляться экзоцитоз синаптических везикул (500-900 активных зон, каждая содержит 2 везикулы – итого около 1000-1800 потенциальных мест выброса АХ), квантовый состав постсинаптических потенциалов составляет всего от 20 до 80, в зависимости от экспериментальных процедур, используемых при регистрации и анализе данных электрофизиологических сигналов, что свидетельствует о низкой вероятности выброса квантов АХ (порядка 3-5% на везикулу).

### **1.1.3.2.5. Гетерогенность $\text{Ca}^{2+}$ -зависимости вероятности выброса синаптических везикул и её связь с локализацией пресинаптических $\text{Ca}^{2+}$ -каналов P/Q-типа**

Биномиальный анализ секреции АХ в нервно-мышечном синапсе мыши показал, что вероятность выброса кванта АХ -достаточно высока (около 0.9), однако в этом же исследовании число мест секреции оказалось достаточно низким (около 70) [Wang et al., 2010]. Это резко противоречит вышеприведенным данным морфологического анализа о количестве активных зон в моторной нервной терминали и числе синаптических везикул, потенциально готовых к выбросу в них, если не допускать, что значительное большинство активных зон в составе моторного синапса «молчит», и лишь небольшое их количество (меньше 10-20%) принимает участие в вызванной приходом пресинаптического ПД быстрой квантовой секреции АХ. Такая гетерогенность вероятности выброса АХ между активными зонами может быть связана с разной чувствительностью машинерии экзоцитоза синаптических везикул к ионам  $\text{Ca}^{2+}$  в отдельных активных зонах, что, возможно, определяется разным положением  $\text{Ca}^{2+}$ -входов ( $\text{Ca}^{2+}$ -каналов P/Q-типа) по отношению к везикулам [Wang et al., 2010].

Косвенно о том, что вероятность выброса в моторных синапсах млекопитающих реально не приближена к 1, а гораздо ниже при небольшом числе функционирующих активных зон, говорят исследования кратковременной пластичности при ритмической активности нервно-мышечных синапсов. Если секреция АХ осуществляется из небольшого числа активных зон с очень высокой вероятностью выброса, следует ожидать сильную кратковременную депрессию передачи по ходу залпа за счет преобладания истощения RRP над рекрутированием синаптических везикул из других пулов к активным зонам, что, однако, не наблюдается в экспериментах. Наоборот, при короткой высокочастотной активности моторных синапсов сначала наблюдается выраженное облегчение синаптической передачи, и затем следует депрессия [Ruiz et al., 2011; Wang et al., 2010]. Таким образом,

либо вероятность выброса АХ из каждой отдельной активной зоны очень низка, либо после первого стимула в коротком залпе последующие ПД приводят к экзоцитозу синаптических везикул из «набора» активных зон, отличных от задействованных в выбросе АХ при первом ПД в залпе (последнее нуждается в строгом экспериментальном подтверждении).

Выявленное в терминалях моторных синапсов значительное число отдельно расположенных и независимых друг от друга активных зон неизбежно порождает вопрос о гомогенности их секреторной активности для обеспечения надежной и достаточноэффективной нервно-мышечной передачи. Имеется ли, и какова допустимая степеньгетерогенности вероятности выброса квантов АХ между активными зонами в нервно-мышечном синапсе?

В моторных синапсах дрозофилы при оптической регистрации экзоцитоза отдельных везикул была показана неоднородность активных зон в отношении вероятности секреции медиатора [Melom et al., 2013]. Однако, при использовании везикулярных оптических зондов слияния синаптических везикул в моторных синапсах мыши, было установлено, что при высокочастотной активности моторных терминалей экзоцитоз синаптических везикул по ходу ритмического залпа начинает преимущественно происходить в определенных кластерах активных зон, названных «горячими точками» [Gaffield et al., 2009; Tabares et al., 2007; Wyatt, Balice-Gordon, 2008]. Такие данные свидетельствуют в пользу гипотезы о том, что выброс АХ в моторной нервной терминали при физиологических режимах ее работы может преимущественно осуществляться в определенных местах (наборе активных зон), где происходит повышенное рекрутирование резервных везикул, в то время как оставшаяся часть активных зон остается функционально «молчащей» [Cano et al., 2012; Homan, Meriney, 2018; Ruiz et al., 2011].

Необходимо отметить, что число мест в моторной нервной терминали, где происходит вызванная пресинаптическими ПД секреция АХ, зависит от частоты стимуляции терминали [Gaffield et al., 2009]. Более того, оценка

размера RRP– общего числа докированных везикул, содержимое которых может выбрасываться при ритмической активности моторного синапса, выявила зависимость этого параметра от частоты стимуляции [Cano et al., 2012; Dittrich et al., 2018; Ruiz et al., 2011]. Это также свидетельствует в пользу того, что в нервно-мышечном синапсе млекопитающих, видимо, существуют «молчащие» активные зоны, часть из которых вовлекается в секрецию АХ при переходе от одиночной или низкочастотной активности к высокочастотной. Такое вовлечение недавно было показано в моторном синапсе дрозофилы [Newman et al., 2017].

Таким образом, моторный синапс млекопитающих с функциональной точки зрения представляет собой большой, одиночный и, самое главное - надежный в плане обеспечения передачи синаптический контакт, построенный из сотен «ненадежных» мест экзоцитоза (активных зон) с преимущественно низкой вероятностью выброса АХ [Cano et al., 2013; Laghaei et al., 2018; Tarr et al., 2013]. Низкая вероятность выброса АХ обеспечивает надежность синаптической передачи во время ритмической активности моторного синапса, поскольку в этом случае активные зоны не вовлекаются в секрецию слишком часто, предотвращая развитие мощной депрессии нервно-мышечной передачи за счет быстрого массивного истощения RRP, не компенсируемого восполнением за счет рекрутирования резервных синаптических везикул. Активно обсуждается вопрос - в чем причина такой низкой вероятности секреции медиатора в отдельных активных зонах моторного синапса млекопитающих?

Как уже упоминалось выше, количество триггерных кальциевых каналов  $Ca_v2.1$  в активных зонах нервно-мышечных синапсов млекопитающих – невелико, а вероятность их открытия, зависящая от пространственно-временных характеристик деполяризации пресинаптической мембраны, создаваемой коротким ( $\sim 1$ мс) пресинаптическим ПД, также, скорее всего, низка – около 0.2 [Meriney, Dittrich, 2013; Meriney et al., 2018]. Об этом свидетельствуют как данные о вероятности открытия триггерных  $Ca^{2+}$ -входов

в ответ на пресинаптический ПД в моторном синапсе лягушки [Luo et al., 2015, 2011] и в синапсе *Calyx of Held* [Scarnati и др., 2020], так и моделирование динамики квантовой секреции АХ в моторном синапсе мыши с учетом особенности архитектуры и взаиморасположения его активных зон [Laghaei et al., 2018; Laghaei, Meriney, 2022].

Таким образом, в ответ на генерацию пресинаптического ПД в каждой отдельной активной зоне возможно открытие одного (или совсем небольшого) числа потенциал-зависимых  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов, способных обеспечить вход ионов  $\text{Ca}^{2+}$ , достаточный для запуска слияния синаптической везикулы с пресинаптической мембраной. Однако реальные случаи экзоцитоза (исходя из вышеописанных условий срабатывания  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов и взаимодействия  $\text{Ca}^{2+}$ -сигнала с синаптической везикулой) будут возникать с очень низкой вероятностью.

#### **1.1.3.2.6. Роль $\text{Ca}^{2+}$ -активируемых $\text{K}^+$ -каналов в регуляции экзоцитоза синаптических везикул в моторных синапсах**

Поступление ионов  $\text{Ca}^{2+}$  в аксоплазму моторной нервной терминали в активных зонах не только служит триггером экзоцитоза готовых к выбросу синаптических везикул, но и обеспечивает модулирование пространственно-временных характеристик самого  $\text{Ca}^{2+}$ -сигнала. Его характеристики зависят, во-первых, от выраженности CDF/CDI самих  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов, и, во-вторых, от регулирования формы пресинаптического ПД. Особенно важную роль в последнем случае играет длительность фазы реполяризации ПД, в течение которой открытые  $\text{Ca}^{2+}$ -каналы испытывают быстро нарастающую движущую силу для входа ионов  $\text{Ca}^{2+}$ . Основное влияние на форму пресинаптического ПД оказывают выходящие  $\text{K}^+$ -токи, опосредуемые потенциал-зависимыми  $\text{K}^+$ -каналами ( $\text{K}_V$ ) и  $\text{Ca}^{2+}$ -активируемыми  $\text{K}^+$ -каналами ( $\text{K}_{Ca}$ ), которые формируют и фазу реполяризации ПД, и следовую гиперполяризацию [Berkefeld et al., 2010; Brooke et al., 2004; Ford, Davis, 2014; Robitaille, Charlton, 1992].

Одним из ключевых регуляторов формы пресинаптического ПД в синапсах являются  $K_{Ca1.1}$  или ВК-каналы, активирующиеся при деполяризации и возрастании внутриклеточной концентрации ионов  $Ca^{2+}$  и отличающиеся большой проводимостью, но относительно низкой чувствительностью к ионам  $Ca^{2+}$  [Berkefeld et al., 2006; Griguoli et al., 2016; Latorre et al., 2017; Sancho, Kyle, 2021].

В моторных синапсах мыши выходящий  $K^+$ -ток, опосредуемый ВК-каналами на спаде ПД, оказался зависим от входа ионов  $Ca^{2+}$  через расположенные в активных зонах  $Ca^{2+}$ -каналы P/Q-типа [Katz et al., 1997]. При этом с использованием быстрого и медленного кальциевых буферов было показано близкое расположение друг к другу  $Ca_v2.1$  и ВК-каналов [Protti, Uchitel, 1997]. Вклад ВК-каналов в формирование второй фазы пресинаптического ПД и, следовательно, в развитие входящего  $Ca^{2+}$ -тока, и непосредственная близость расположения ВК-каналов от активирующих их  $Ca_v$  свидетельствует о том, что ВК-каналы могут играть одну из ключевых ролей в регуляции высвобождения АХ в моторных синапсах [Pattillo et al., 2001].

В недавней работе с использованием нервно-мышечных препаратов мышей, нокаутных по гену, кодирующему каналообразующую субъединицу ВК-каналов, было выявлено угнетение нервно-мышечной передачи у этих мышей по сравнению с диким типом за счет снижения квантового состава постсинаптических токов - в результате уменьшения вероятности выброса АХ. Это может говорить о снижении входа ионов  $Ca^{2+}$  в отсутствие ВК-каналов [Wang et al., 2020]. При этом блокирование ВК-каналов с помощью селективных токсинов в моторных синапсах мыши приводит к увеличению квантового состава одиночной вызванной секреции. По мнению авторов, такая потенция имеет в основе усиливающуюся активацию  $Ca^{2+}$ -каналов и входа ионов  $Ca^{2+}$  в результате расширения пресинаптического ПД [Vatanpour, Harvey, 1995]. При этом предполагается, что усиление входа ионов  $Ca^{2+}$  в моторную терминаль при блокировании ВК-каналов происходит не с

участием триггерных  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов P/Q-типа, а за счет подключения в регуляцию секреции АХ потенциал-зависимых  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов L-типа [Flink, Atchison, 2003]. Как такое вовлечение дополнительного  $\text{Ca}^{2+}$ -входа отразится на секреции АХ и синаптической пластичности при ритмической вызванной активности моторных синапсов млекопитающих - осталось не исследованным.

### **1.1.3.3. Потенциал-зависимые $\text{Ca}^{2+}$ -каналы N- и R-типов ( $\text{Ca}_v2.2$ и $\text{Ca}_v2.3$ ) и их роль в нервных терминалях**

P/Q-тип  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов – ключевой, но не единственный потенциал-зависимый  $\text{Ca}^{2+}$ -вход в моторных нервных терминалях млекопитающих.

В неонатальных моторных синапсах крысы показано, что наряду с каналами  $\text{Ca}_v2.1$ , блокируемыми  $\omega$ -агатоксином IVA, участие в запуске выброса АХ принимает и блокируемый  $\omega$ -конотоксином GVIA N-тип  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов ( $\text{Ca}_v2.2$ ), хотя сопряжение этого  $\text{Ca}^{2+}$ -входа с секрецией АХ было слабее, чем у триггерных  $\text{Ca}_v2.1$ . Это связывают с более удаленным расположением  $\text{Ca}_v2.2$  от синаптических везикул [Nudler et al., 2003; Rosato-Siri et al., 2002; Rosato Siri, Uchitel, 1999].

Что касается зрелых моторных синапсов, то там вклад в регуляцию секреции АХ  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов, отличных от  $\text{Ca}_v2.1$ , проявляется либо при особых экспериментальных условиях, либо при патологиях, затрагивающих  $\text{Ca}_v2.1$  [Urbano et al., 2002]. Так, генетическая элиминация каналов  $\text{Ca}_v2.1$  у мышей приводила к быстро прогрессирующим неврологическим синдромам – атаксии, дистонии и мышечной слабости, приводящим к утрате способности передвигаться и гибели животных на самых ранних этапах постнатального развития. При этом возможность нервно-мышечной передачи сохранялась, однако в электрофизиологических экспериментах в моторных синапсах у таких мышей отмечались сильные нарушения быстрой мультиквантовой синхронной секреции АХ и кратковременной пластичности – сниженный по сравнению с диким типом квантовый состав, увеличенная вариабельность задержек синаптической передачи (что свидетельствует о десинхронизации



выброса АХ) и угнетение парной фасилитации. Функции отсутствующего P/Q-типа  $Ca^{2+}$ -каналов ( $Ca_v2.1$ ) в таких случаях берут на себя  $Ca^{2+}$ -каналы N- и R-типов ( $Ca_v2.2$  и  $Ca_v2.3$ ), но полностью компенсировать тотальную утрату основного триггерного  $Ca^{2+}$ -входа эти типы  $Ca^{2+}$ -каналов не могут [DePetris et al., 2008; Urbano et al., 2003]. Подобные компенсаторные «подключения» к контролю секреции АХ  $Ca^{2+}$ -каналов N- и R-типов в нервно-мышечных синапсах млекопитающих отмечены и при определенных мутациях, затрагивающих как каналообразующую  $\alpha 1A$ -субъединицу  $Ca^{2+}$ -каналов P/Q-типа [Kaja et al., 2006; Pardo et al., 2006], так и регуляторную  $\beta$ -субъединицу [Molina-Campos et al., 2015].

Кроме того, в моторных нервных терминалях млекопитающих, наряду с N- и R-типами потенциал-зависимых  $Ca^{2+}$ -каналов, показана экспрессия и «медленных»  $Ca^{2+}$ -каналов L-типа [Pagani et al., 2004].

#### **1.1.3.4. Потенциал-зависимые $Ca^{2+}$ -каналы L-типа ( $Ca_v1.2$ и $Ca_v1.3$ ) нейронов и их свойства**

Семейство потенциал-зависимых  $Ca^{2+}$ -каналов L-типа в настоящее время включает в себя 4 подтипа ( $Ca_v1.1-1.4$ ), имеющих около 70% идентичности каналообразующих  $\alpha 1S-F$  субъединиц. Представители данного семейства были первоначально названы  $Ca^{2+}$ -каналов L-типа по результатам ранних исследований на кардиомиоцитах и нейронах - благодаря опосредуемым этими  $Ca^{2+}$ -каналами при деполяризации мембраны долго длящимся входящим  $Ca^{2+}$ -токам с медленной кинетикой спада (англ. *long-lasting*), что позволило отделить их от короткоживущих (англ. *transient*)  $Ca^{2+}$ -токов, опосредованными быстро инактивирующимися каналами T-типа ( $Ca_v3$ ) [Nowusky et al., 1985; Tsien et al., 1986].

Особенностью L-типа  $Ca^{2+}$ -каналов, отличающей его от всех остальных  $Ca^{2+}$ -каналов, является его чувствительность к органическим модуляторам (преимущественно блокаторам) трех химически различающихся типов – дигидропиридинам, фенилалкиламинам и бензотиазепинам. Данные

соединения, такие как, соответственно, нитрендипин, верапамил и дилтиазем, а также их многочисленные структурные аналоги, не только являются излюбленным фармакологическим инструментом для работы с данными  $\text{Ca}^{2+}$ -каналами (и опосредуемыми ими  $\text{Ca}^{2+}$ -токами) *in vitro*, но и широко используются много лет в терапии сердечнососудистых заболеваний [Catterall et al., 2020; Godfraind, 2017]. Выделение, гомологичное клонирование и исследование биохимических характеристик субъединиц  $\text{Ca}_v1$  показало, что в скелетных мышцах экспрессируется изоформа каналообразующей  $\alpha 1$ -субъединицы  $\text{Ca}_v1.1$ , кодируемая геном *CACNA1S*. В нейронах, кардиомиоцитах, хромоаффинных клетках надпочечников были выявлены другие изоформы  $\alpha 1$ -субъединицы -  $\text{Ca}_v1.2$  (*CACNA1C*) и  $\text{Ca}_v1.3$  (*CACNA1D*), причем часто эти изоформы коэкспрессируются в одной и той же клетке. В сетчатке выявлена экспрессия отдельной изоформы  $\alpha 1$ -субъединицы -  $\text{Ca}_v1.4$  (*CACNA1F*) [Strom et al., 1998; Torben Bech-Hansen et al., 1998], которая, обладая ограниченной инактивацией, обеспечивает постоянную работу  $\text{Ca}^{2+}$ -канала и поддерживает пролонгированную секрецию глутамата в ленточных синапсах фоторецепторов.

Все 4 подтипа  $\text{Ca}_v1$  обладают сходной чувствительностью к фармакологическим агентам - до сих пор отсутствуют изоформ-специфические модуляторы их активности [Ortner et al., 2020; Zuccotti et al., 2011]. При этом подтипы  $\text{Ca}_v1$  различаются по представленности в тканях и биофизическим характеристикам.  $\text{Ca}_v1.1$  и  $\text{Ca}_v1.4$  имеют очень ограниченный паттерн экспрессии - скелетные мышечные волокна и сетчатка, соответственно.  $\text{Ca}_v1.2$  и/или  $\text{Ca}_v1.3$  экспрессируются в большинстве электровозбудимых клеток, и часто – совместно в одних и тех же клетках. Обе эти изоформы каналов необходимы для нормального функционирования мозга, и играют каждый определенную роль в сердечно-сосудистой и эндокринной системах [Striessnig et al., 2014; Zamponi et al., 2015].

Несмотря на высокую степень структурного сходства их каналообразующих  $\alpha 1$ -субъединиц и чувствительности к блокаторам,

изоформы Cav1.2 и Cav1.3 различаются по особенностям работы воротного механизма образуемых ими Ca<sup>2+</sup>-каналов L-типа, вовлеченности в различные белок-белковые регуляторные взаимодействия и по механизмам тонкой настройки их работы в результате альтернативного сплайсинга [Striessnig et al., 2014; Zuccotti et al., 2011]. Так, нейрональные каналы Cav1.3 активируются при более высоких (негативных) значениях МП (на 9-25 мВ), и медленнее инактивируются, чем Cav1.2 [Bock et al., 2011; Lieb et al., 2014; Lipscombe et al., 2004; Ху, Lipscombe, 2001].

Инактивация Ca<sup>2+</sup>-каналов L-типа – важнейший процесс, необходимый для тонкого регулирования входа ионов Ca<sup>2+</sup> в клетку. Специфической особенностью инактивации Ca<sup>2+</sup>-каналов L-типа является её очень медленная кинетика, приводящая к пролонгированному снижению Ca<sup>2+</sup>-тока в ответ на деполяризацию мембраны. Инактивация Ca<sup>2+</sup>-каналов L-типа может обеспечиваться за счет функционирования нескольких механизмов.

Потенциал-зависимая инактивация («в чистом виде» ее исследуют при экспрессии Ca<sup>2+</sup>-каналов L-типа в клеточных системах и замене Ca<sup>2+</sup> на Ba<sup>2+</sup>) включает в себя несколько процессов с разной кинетикой развития и участием нескольких сайтов в составе  $\alpha 1$ -субъединиц Cav1.2 и Cav1.3. Это цитозольные концы S6-сегментов, N- и C-концы, участок линкерной петли между доменами II и III, а также линкерная петля между I и II доменами, служащая инактивационной створкой [Cens et al., 2006; Soldatov, 2012; Stotz et al., 2004; Tadross et al., 2010]. Наряду с потенциал-зависимой инактивацией, у каналов, образованных Cav1.2 и Cav1.3 (также, как и у Cav2.1) ярко выражена CDI - Ca<sup>2+</sup>-зависимая инактивация [Budde et al., 2002; Tadross et al., 2010; Zühlke et al., 1999].

CDI Ca<sup>2+</sup>-каналов L-типа реализуется за счет конформационных перестроек, затрагивающих многие участки каналообразующих  $\alpha 1$ -субъединиц при взаимодействии определенных аминокислотных мотивов их C-концов с CaM, который служит Ca<sup>2+</sup>-сенсором [Abderemane-Ali et al., 2019; Hardie, Lee, 2016; Kuzmenkina et al., 2019; Liu et al., 2017; Soldatov, 2012].

Наличие CDI у L-типа  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов обеспечивает, таким образом, тонкий ауторегуляторный механизм лимитирования входа ионов  $\text{Ca}^{2+}$  по этим каналам [Simms, Zamponi, 2014].

Установлено, что  $\text{Ca}^{2+}$ -каналы L-типа располагают ещё одним  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимым механизмом регуляции – это CDF -  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимая фасилитация (облегчение). CDF проявляется в увеличении вероятности нахождения  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов L-типа в открытом состоянии при продолжительной или повторяющейся активности. Данное усиление  $\text{Ca}^{2+}$ -входа реализуется с участием CaM и CaMKII [Hudmon et al., 2005; Jenkins et al., 2010; Sahu et al., 2017; Simms et al., 2014; Zühlke et al., 1999].

Управление воротным механизмом (как активации, так и инактивации) каналов, образованных Cav1.2 и Cav1.3, контролируется белок-белковыми взаимодействиями между участками С-конца канала [Hulme et al., 2006; Koschak, 2010; Liu et al., 2017]. При этом конкретные электрофизиологические характеристики  $\text{Ca}^{2+}$ -токов L-типа в местах их функционирования в значительной степени будут определяться тканеспецифическим альтернативным сплайсингом, затрагивающим в результате многие важные структурные компоненты  $\alpha 1$ -субъединицы, участвующие как в активации и инактивации каналов, так и в различных механизмах регуляции этих процессов [Bartels et al., 2018; Bock et al., 2011; Lipscombe et al., 2013].

Важную регулирующую роль, определяющую характеристики  $\text{Ca}^{2+}$ -токов и  $\text{Ca}^{2+}$ -сигналов, обеспечиваемых Cav1.2 и Cav1.3-каналами, будут играть изоформы дополнительных субъединиц этих каналов –  $\beta$  и  $\alpha 2$ - $\delta$  [Abiria, Colbran, 2010; Andrade et al., 2009; Buraei, Yang, 2013; Hofmann et al., 2014; Savalli et al., 2016].

Недавно обнаружено, что  $\text{Ca}^{2+}$ -индуцированные физические взаимодействия между С-концами  $\alpha 1$ -субъединиц  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов L-типа, кластрированных в непосредственной близости друг от друга, потенцируют вход ионов  $\text{Ca}^{2+}$  за счет увеличения активности соседних каналов, усиливая,

кооперативным образом,  $\text{Ca}^{2+}$ -сигнал в возбудимых клетках [Moreno et al., 2016].

Таким образом, вход ионов  $\text{Ca}^{2+}$  по нейрональным  $\text{Ca}^{2+}$ -каналам L-типа подвержен разным типам регуляции с использованием сигнальных механизмов, устроенных по принципу прямой и обратной связи.

#### **1.1.3.4.1. Потенциал-зависимые $\text{Ca}^{2+}$ -каналы L-типа в пост- и пресинаптических структурах синапсов ЦНС**

Каналы  $\text{Cav}1.2$  и  $\text{Cav}1.3$  широко экспрессируются в мозге, причем тотальная оценка показывает доминирование экспрессии изоформы  $\text{Cav}1.2$  над  $\text{Cav}1.3$  (89% и 11%, соответственно) [Hell et al., 1993; Sinnegger-Brauns et al., 2009]. Для обеих изоформ характерна преимущественная постсинаптическая дифференцированная сомато-дендритная локализация в нейронах ЦНС, где обеспечиваемый L-типом  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов  $\text{Ca}^{2+}$ -вход является основополагающим для запуска электро-транскрипционного сопряжения с участием CaM, CaMKII и митоген-активируемых протеинкиназ [Deisseroth et al., 1998; Ma et al., 2013; Murphy et al., 2014; Wang et al., 2017]. Электро-транскрипционное сопряжение с ключевым участием именно  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов L-типа в постсинаптических структурах дендритов и сомы нейронов трансформирует паттерны синаптической активности в ремоделирование нейронов и их участков. Данный процесс лежит в основе нейронального развития, обучения, формирования разных типов памяти и привыкания к лекарственным и наркотическим веществам [Berger, Bartsch, 2014; Striessnig et al., 2014]. Регуляция транскрипционной активности обеспечивается счет формирования на C-конце  $\alpha 1$ -субъединицы  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов L-типа мультимолекулярного сигнального комплекса, включающего якорные и каркасные белки цитоскелета, например, АКАР (англ. *A-kinase anchoring protein*), а также ферменты, участвующие в сигнальных каскадах, такие как РКА и кальцинейрин (CaN), модулирующие входящий  $\text{Ca}^{2+}$ -ток по этим

каналам [Calin-Jageman, Lee, 2008; Murphy et al., 2019; Oliveria et al., 2007; Perfitt et al., 2020; Wang et al., 2017].

Хорошо известно участие постсинаптических  $Ca^{2+}$ -каналов L-типа в индукции, экспрессии и поддержании различных форм синаптической пластичности [Kim et al., 2015; Moosmang et al., 2005; Sridharan et al., 2020; Vandael et al., 2021] и регуляторного контроля спайковой и осцилляторной активности нейронов в разных отделах ЦНС [Gamelli et al., 2011; Hasreiter et al., 2014; Lacinová et al., 2008; Plumbly et al., 2019; Wang et al., 2013].

Долгое время считалось, что на пресинаптическом уровне  $Ca^{2+}$ -каналы L-типа ( $Ca_v1.2$  и  $Ca_v1.3$ ) или практически отсутствуют [Leitch et al., 2009], или, за редким исключением [Brimblecombe et al., 2015; Giugovaz-Tropper et al., 2011] не участвуют в запуске секреции нейротрансмиттеров (в ходе базальной активности) в синапсах ЦНС, где доминируют быстрые  $Ca^{2+}$ -каналы P/Q- и N-типов [Dolphin, 2020; Dunlap et al., 1995; Holmgaard et al., 2009]. Однако, необходимо отметить, что за последние 10-15 лет постепенно появляются свидетельства как о присутствии разных изоформ  $Ca^{2+}$ -каналов L-типа в нервных терминалях синапсов ЦНС [Subramanian, Morozov, 2011; Tirrens et al., 2008], так и о вовлечении этих каналов в реализацию разных форм пластичности во многих синапсах ЦНС именно на пресинаптическом уровне (в нормальных условиях и при патологиях) [Bartsch et al., 2014; Fourcaudot et al., 2009; Giansante et al., 2020; Rey et al., 2020; Shin et al., 2018; Zhang et al., 2015].

Тем удивительнее выглядят накопленные в литературе за последние десятилетия данные о присутствии и активности  $Ca^{2+}$ -каналов L-типа в моторных синапсах и их способность эффективно и специфически регулировать секрецию АХ при определенных режимах активности интактных синапсов.

#### **1.1.3.4.2. Потенциал-зависимые $\text{Ca}^{2+}$ -каналы L-типа ( $\text{Cav}1.2$ и $\text{Cav}1.3$ ) в нервных терминалях моторных синапсов млекопитающих**

##### **1.1.3.4.2.1. Обнаружение $\text{Ca}^{2+}$ -каналов L-типа в моторных синапсах**

Исследование L-типа  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов в моторных синапсах млекопитающих и их возможный вклад в регуляцию секреции АХ началось в конце 80-х годов XX века. Это стало возможным благодаря использованию в качестве агониста (активатора) этих каналов дигидропиридина S(-) Bay K8644 [Atchison, O'Leary, 1987]. S(-) Bay K8644 в субмикромольных концентрациях (до 1 мкМ) вызывал увеличение амплитуды и квантового состава одиночных многоквантовых ПКП в диафрагмальных синапсах крысы и мыши, что предотвращалось или реверсировалось блокатором L-типа  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов нимодипином, который сам не оказывал влияния на одиночную вызванную секрецию АХ. Кроме того, S(-) Bay K8644 увеличивал частоту спонтанных одноквантовых МПКП, причем данный эффект проявлялся как на фоне нимодипина [Atchison, 1989], так и в условиях снижения или отсутствия ионов  $\text{Ca}^{2+}$  в наружной среде [Pancrazio et al., 1989], что позволило авторам рассуждать о возможно дуальном действии Bay K 8644 –как активатора L-типа  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов и как агента, увеличивающего внутритерминальную концентрацию ионов  $\text{Ca}^{2+}$ .

Уже пионерские работы постулировали, во-первых, неучастие пресинаптических  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов L-типа в регуляции секреции АХ в нормальных условиях [Pancrazio et al., 1989; Protti et al., 1996; Uchitel et al., 1992], и во-вторых, наличие принципиальной способности у этого  $\text{Ca}^{2+}$ -входа при его принудительной прямой активации потенцировать выброс АХ в моторных синапсах млекопитающих [Beske et al., 2017].

Помимо фармакологических воздействий, предпринимались попытки доказать экспрессию L-типа  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов в моторных синапсах млекопитающих с использованием иммуоцитохимических методов. Ранние эксперименты продемонстрировали отсутствие связывания антител с

соответствующими каналообразующими  $\alpha 1$ -субъединицами [Day et al., 1997; Westenbroek et al., 1998]. Однако в 2004 году было представлено первое безусловное доказательство наличия в моторных терминалях млекопитающих – и в здоровых зрелых нервных терминалях, и в синапсах мышей с нокаутом Cav2.1 –  $\alpha 1D$ -субъединицы (Cav1.3), но не  $\alpha 1C$ -субъединиц (Cav1.2) [Pagani et al., 2004]. Наконец, в более поздней работе на диафрагме крыс была выявлена экспрессия и  $\alpha 1C$ -субъединицы (Cav1.2), причем значительная только у новорожденных и уменьшающаяся в ходе постнатального онтогенеза [Хузахметова и др., 2016]. Используемые иммуногистохимические методы не давали ответа на вопрос о точной локализации  $Ca^{2+}$ -каналов L-типа по отношению к активным зонам.

Учитывая низкий порог активации нейрональных изоформ, особенно у Cav1.3, и то, что эти каналы находятся в открытом состоянии дольше, чем триггерные  $Ca^{2+}$ -каналы P/Q-типа, принципиально можно было бы ожидать появления опосредуемого  $Ca^{2+}$ -каналами L-типа выраженного  $Ca^{2+}$ -сигнала при деполяризации моторных терминалей, потенциально способного влиять на секрецию квантов АХ. С таким предположением согласуются ранние данные электрофизиологических экспериментов о вовлечении L-типа  $Ca^{2+}$ -каналов в обеспечение уровня спонтанной секреции квантов АХ в моторных синапсах крысы. Нифедипин (дигидропиридиновый блокатор L-типа  $Ca^{2+}$ -каналов) вызывал уменьшение частоты МПКП при нормальных внеклеточных концентрациях ионов  $K^+$  и  $Ca^{2+}$ , но не в условиях  $K^+$ -деполяризации [Losavio, Muchnik, 1997].

При этом вклад L-типа  $Ca^{2+}$ -каналов в обеспечение быстрой синхронной многоквантовой секреции АХ в зрелых моторных синапсах млекопитающих обнаружить не удавалось. Поэтому оставался (и во многом остается до сих пор) нерешенными вопросы о причинах и механизмах подавленного состояния  $Ca^{2+}$ -каналов L-типа и об их физиологическом назначении в нормально функционирующих моторных синапсах.



#### **1.1.3.4.2.2. $\text{Ca}^{2+}$ -каналы L-типа в нервных терминалях развивающихся, новообразованных при реиннервации и находящихся в патологических условиях моторных синапсов**

Эксперименты на развивающихся и новообразованных моторных синапсах, формирующихся на мышечных волокнах в ходе их реиннервации, показали, что в нервных терминалях таких нервно-мышечных контактов, во-первых, имеет место активация L-типа  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов, а во-вторых, их вовлечение и в регуляцию секреции АХ, и в проведение потенциалов действия в таких моторных терминалях [Katz et al., 1996]. Однако данные о роли  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов L-типа в регуляции секреции АХ в развивающихся и новообразованных синапсах - неоднозначны. Отмечается как отсутствие влияния L-типа  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов на секрецию АХ в таких синапсах [Santafé et al., 2001], так и возможный позитивный вклад этого  $\text{Ca}^{2+}$ -входа в функционирование незрелых моторных синапсов [Katz et al., 1996; Santafé et al., 1999]. Описано и негативное воздействие активности L-типа  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов, тормозящее вызванную квантовую секрецию АХ [Balezina et al., 2007; Bogatcheva, Balezina, 2013; Rosato Siri, Uchitel, 1999], или десинхронизирующее её (в условиях сниженной по сравнению с нормой внеклеточной концентрации ионов  $\text{Ca}^{2+}$ ) [Хузахметова и др., 2016]. Последний способ – уменьшение пресинаптического триггерного входа ионов  $\text{Ca}^{2+}$  за счет уменьшения их наружной концентрации или частичного блокирования  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов P/Q-типа, а также угнетение опосредуемого этими каналами инициирующего быструю синхронную секрецию квантов АХ  $\text{Ca}^{2+}$ -сигнала за счет загрузки в нервные терминали «быстрого»  $\text{Ca}^{2+}$ -буфера в сочетании с ингибированием фосфатазы PP1 позволило выявить, во-первых, появление в таких условиях периневрального  $\text{Ca}^{2+}$ -тока, опосредуемого L-типом  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов [Urbano, Uchitel, 1999], а во вторых – демаскировать этот обычно «молчащий» тип  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов, зарегистрировав его участие в обеспечении квантовой секреции АХ в зрелых моторных синапсах млекопитающих [Urbano et al., 2001].

Снижение опосредованного P/Q-типом  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов входа ионов  $\text{Ca}^{2+}$ , наблюдаемое при экспериментальном моделировании развития синдрома Ламберта-Итона, также приводило к появлению в моторных нервных терминалях компоненты пресинаптических  $\text{Ca}^{2+}$ -токов, опосредуемых L-типом  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов, и выявило их вовлечение в регуляцию квантовой секреции АХ [Flink, Atchison, 2002; Giovannini et al., 2002; Xu et al., 1998].

Таким образом, совокупность современных данных о последствиях подавления основного (по P/Q-типу  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов)  $\text{Ca}^{2+}$ -входа в нервные терминали свидетельствуют о том, что при нормальном функционировании моторных синапсов млекопитающих (в нормокальциевой наружной среде) и сохраняющейся активности триггерных  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов P/Q-типа, пресинаптические  $\text{Ca}^{2+}$ -каналы L-типа, хотя и потенциально способны обеспечивать массиванный вход ионов  $\text{Ca}^{2+}$  в моторную терминаль, тем не менее, не активны - по крайней мере, в отношении их вклада в  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимую регуляцию синхронной многоквантовой секреции АХ.

#### **1.1.3.4.2.3. Регуляция активности $\text{Ca}^{2+}$ -каналов L-типа в моторных терминалях млекопитающих**

Отсутствие проявлений регуляторных влияний L-типа  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов на  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимую вызванную секрецию АХ у здоровых и зрелых моторных синапсов млекопитающих неизбежно породило вопрос, какие факторы и процессы тормозят там эти каналы, препятствуя их участию в контроле над секрецией АХ? В настоящее время таких факторов насчитывается несколько.

Во-первых, было установлено, что увеличение квантового состава одиночных ПКП в нервно-мышечных синапсах диафрагмы мышцы при блокировании ВК-каналов ( $\text{Ca}^{2+}$ -активируемых  $\text{K}^+$ -каналов большой проводимости), обеспечивается в значительной степени за счет активности демаскированных в таких условиях  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов L-типа - прирост квантового состава ПКП на фоне ВК-блокатора ибериотоксина частично предотвращался при блокировании  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов L-типа [Flink, Atchison, 2003; Vatanpour,

Harvey, 1995]. Такой механизм негативного влияния со стороны ВК-каналов на  $\text{Ca}^{2+}$ -каналы L-типа *in vivo* может быть связан с более медленной кинетикой активации этих каналов по сравнению с  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов P/Q-типа [Mermelstein et al., 2000], и, следовательно, зависимостью их активации от длительности пресинаптического ПД.

Считается, что расположенные в активных зонах в непосредственной близости от  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов P/Q-типа и активируемые за счет их  $\text{Ca}^{2+}$ -тока ВК-каналы, препятствуя пролонгированию пресинаптического ПД, осуществляют торможение P/Q-типа  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов по принципу обратной связи [Dittrich et al., 2018]. Заманчивой представляется гипотеза, что задержанное срабатывание (в конце реполяризации пресинаптического ПД) ВК-каналов способно, вызывая следовую гиперполяризацию пресинаптической мембраны, эффективно лимитировать вовлечение в регуляцию секреции АХ именно «медленных»  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов L-типа (которые позднее срабатывают на спаде ПД). Это должно препятствует излишнему расходу квантов АХ. Такое тормозное влияние на L-тип  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов со стороны ВК-каналов, очевидно, будет нивелироваться в условиях пониженного поступления ионов  $\text{Ca}^{2+}$  в моторную терминаль по P/Q-типу  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов.

Помимо ВК-каналов, длительность ПД в моторных нервных терминалях, а значит, и возможность активации  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов L-типа может контролироваться пресинаптическими потенциал-зависимыми  $\text{K}^+$ -каналами преимущественно  $\text{K}_v3$ -типа, опосредующими калиевый А-ток. Присутствие этих каналов в моторных терминалях и их функциональная активность давно выявлены в многочисленных исследованиях с использованием аминопиридинов в качестве селективных блокаторов этого типа  $\text{K}^+$ -каналов [Bradford et al., 2018; Brooke et al., 2004; Ojala et al., 2021; Tabti et al., 1989]. Блокаторы  $\text{K}_v3$ -каналов 4-аминопиридин и 3,4-диаминопиридин, вызывающие увеличение квантовой секреции АХ в моторных синапсах, рассматриваются в настоящее время как компоненты терапии, поддерживающей сниженную нервно-мышечную передачу при синдроме

Ламберта-Итона и ряде других неврологических расстройств [Giglio et al., 2020; Meriney et al., 2018; Simon et al., 2021; Tarr et al., 2015]. Считается, что это действие аминопиридинов связано с увеличением вероятности выброса квантов АХ за счет потенцирования входа ионов  $Ca^{2+}$  в моторную терминаль при снижении потенциал-зависимой  $K^+$ -проводимости [Beske et al., 2017; Ng et al., 2017; Thomsen, Wilson, 1983]. Исследование возможного растормаживания именно L-типа  $Ca^{2+}$ -каналов под действием близких к миллимолярным концентраций аминопиридинов привело к неожиданному результату – подверглась сомнению сама их способность блокировать развитие пресинаптических потенциал-зависимых  $K^+$ -токов. Вместо этого в качестве нового механизма действия аминопиридинов предлагалось их прямое потенцирующее влияние на  $Ca^{2+}$ -каналы N- и L-типов [Wu et al., 2009], опосредуемое через взаимодействие с  $Ca_v\beta$ -субъединицей [Li et al., 2014]. Такое непосредственное потенцирующее влияние аминопиридинов на активность дополнительных пресинаптических  $Ca^{2+}$ -входов, и в особенности клиническое значение такого влияния, в настоящее время подвергаются критике [Meriney, Lacomis, 2018; Ojala et al., 2021], оставляя пока открытым вопрос о способности L-типа  $Ca^{2+}$ -каналов вовлекаться в контролирование  $Ca^{2+}$ -зависимой квантовой секреции АХ в моторных синапсах млекопитающих при манипуляциях с потенциал-зависимой  $K^+$ -проводимостью.

Наконец, многочисленные литературные данные свидетельствуют, что функционирование L-типа  $Ca^{2+}$ -каналов, как и других потенциал-зависимых  $Ca^{2+}$ -каналов в моторных терминалях млекопитающих, может находиться под сильным управляющим контролем со стороны сигнальных путей, запускаемых при активации многочисленных пресинаптических метаботропных рецепторов в работающих синапсах.

По данным целого ряда работ, активность пресинаптических аденозиновых  $A_1$ -рецепторов, через торможение аденилатциклазы и фосфорилирующей активности РКА, может приводить к ослаблению регуляторного фосфорилирования  $Ca^{2+}$ -каналов L-типа и торможению их

функционирования. Это наблюдается при обычной залповой активности синапсов и образовании там соответствующих концентраций эндогенного аденозина [Correia-de-Sá et al., 2000, 2000; Correia-De-Sá et al., 1996]. При увеличении интенсивности и продолжительности синаптической активности (и возрастающей концентрации аденозина в синаптической щели) может происходить «растормаживание» L-типа  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов. Это реализуется вследствие сдвига баланса регуляторного действия аденозина от  $A_1$ -рецепторов в сторону преимущественной активации пресинаптических  $A_{2A}$ -рецепторов, стимулирующих аденилатциклазный сигнальный путь и облегчающих активацию L-типа  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов [Noronha-Matos et al., 2011; Oliveira, Correia-De-Sá, 2005; Oliveira et al., 2004]. Интересно, что подобный сдвиг баланса активности  $A_1/A_{2A}$ -рецепторов в сторону РКА-опосредованного усиления активности L-типа  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов проявляется в моторных синапсах не только в норме как отражение изменений уровня аденозина в синаптической щели и его влияний на разные типы аденозиновых рецепторов [Correia-de-Sá et al., 1991], но может возникать в моторных синапсах и на модели бокового амиотрофического склероза в пре-симптоматическую фазу [Nascimento et al., 2015; Sebastião et al., 2018].

Оказалось, что не только аденозиновые, но и пресинаптические мускариновые  $M_2$ -рецепторы, преимущественно активируемые эндогенным АХ в моторных синапсах при их обычной работе, также могут оказывать аналогичное  $A_1$ -рецепторам тормозное действие на L-тип  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов [García et al., 2005; Santafé et al., 2006]. С другой стороны, показана возможность функционального взаимодействия  $G_q$ -белок-сцепленных мускариновых  $M_1$ -рецепторов, стимулирующих активацию пресинаптической РКС, с  $A_{2A}$ -рецепторами в демаскировании L-типа  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов [Oliveira, Correia-De-Sá, 2005]. Подобное влияние  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой протеинкиназы (РКС) на развитие сигнальных каскадов с участием других протеинкиназ, в свою очередь, меняющих поступление ионов  $\text{Ca}^{2+}$  в клетку, давно рассматривается в литературе [Halls, Cooper, 2011; Kawabe et al., 1994; Lipp, Reither, 2011].

В последнее время обсуждается возможность комплексного взаимодействия пресинаптических мускариновых и аденозиновых рецепторов, направленного на тонкую регуляцию активности пресинаптических ферментов (РКА и РКС), способных потенциально менять функционирование пресинаптических  $\text{Ca}^{2+}$ -входов или компонентов машинерии экзоцитоза, регулируя, таким образом, квантовую секрецию АХ в моторных синапсах млекопитающих [Nadal et al., 2016; Santafe et al., 2015; Tomàs et al., 2017]. О возможности регулирования работы  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов L-типа в таких условиях комплексного контроля со стороны метаботропных рецепторов в нервно-мышечных синапсах говорит присутствие в моторных терминалях якорного белка AKAP150 [Cilleros-Mañé et al., 2020], необходимого для расположения в непосредственной близости от потенциальной мишени регуляторного воздействия протеинкиназ РКА и РКС и их функционального антагониста фосфатазы CaN [Sanderson, Dell'Acqua, 2011].

Следует отметить, что доказательства вовлечения пресинаптических аденозиновых и мускариновых рецепторов в регуляцию активности  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов L-типа были получены преимущественно косвенным путём – за счет анализа выделения меченого тритием АХ из моторных синапсов нервно-мышечного препарата (без использования электрофизиологических методов). Данный методический подход не дает ответа о характере синаптической пластичности непосредственно при ритмической стимуляции отдельных моторных синапсов и не позволяет четко разграничить изменения в спонтанной, асинхронной и быстрой синхронной квантовой секреции АХ.

Так же косвенно, за счет анализа изменений флуоресценции липофильного красителя мембраны синаптических везикул (FM2-10) было установлено, что в моторных синапсах быстрый эндоцитоз, поддерживающий размер пула синаптических везикул с высокой вероятностью секреции, предотвращается дигидропиридинами, что позволяет предполагать

подключение L-типа  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов в регуляцию эндоцитоза при пролонгированной активности моторных синапсов [Perissinotti et al., 2008].

К числу потенциальных регуляторов активности L-типа  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов в моторных синапсах, помимо аденозиновых и мускариновых рецепторов, можно отнести и метаботропные пуринорецепторы P2Y<sub>13</sub>, само присутствие и потенциально негативное влияние на секрецию АХ было недавно выявлено в моторных терминалях диафрагмы мыши [Guarracino et al., 2016, 2018].

Несмотря на уже выявленный список факторов, влияющих на активность пресинаптических  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов L-типа в моторных синапсах млекопитающих, он, по-видимому, не является окончательным. Об этом, в частности, свидетельствуют данные литературы о других потенциально возможных участниках регуляторных влияний на L-тип  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов в постсинаптических структурах центральных синапсов (CaMKII, CaN и др.) и которые еще ждут своего возможного выявления на уровне моторных терминалей.

Подводя итог рассмотрению во многом загадочной роли в работе моторных синапсов  $\text{Ca}^{2+}$ -входа, обеспечиваемого  $\text{Ca}^{2+}$ -каналами L-типа, необходимо отметить ряд остающихся нерешенными принципиально важных вопросов.

Во-первых, важно понять, как выражено влияние этого  $\text{Ca}^{2+}$ -входа на секрецию АХ при его демаскировании во время не одиночной, а более физиологически характерной для моторных синапсов ритмической активности. Остается неясным, изменений каких характеристик квантовой секреции (вероятности выброса квантов АХ, размера RRP, степени восполнения RRP) можно при этом ожидать?

Во-вторых, необходимо понять, происходит ли при демаскировании этих каналов формирование нового  $\text{Ca}^{2+}$ -сигнала самостоятельно, только за счет активности самих  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов L-типа, или, учитывая мощные негативные влияния на них и удаленность этих каналов от синаптических везикул, для вовлечения этого  $\text{Ca}^{2+}$ -входа в регуляцию секреции АХ требуется «усилитель

Ca<sup>2+</sup>-сигнала» (в лице, например, депонированного Ca<sup>2+</sup> или Ca<sup>2+</sup>-активируемых ферментов)?

В-третьих, с чем может быть связано сохранение этого «молчащего» Ca<sup>2+</sup>-входа в «оперативном резерве» функционирования моторных терминалей?

Решению этих актуальных вопросов и будет посвящен один из разделов данной работы.

## 1.2. Рианодиновые рецепторы (РиР)

Уровень ионов Ca<sup>2+</sup> в цитоплазме клеток может быть увеличен или за счет их входа снаружи через Ca<sup>2+</sup>-каналы, или за счет выброса из внутриклеточных Ca<sup>2+</sup>-депо, компонентами которых являются цистерны гладкого эндоплазматического ретикулума (ЭР) [Berridge, 2006; Berridge et al., 2003]. Выброс ионов Ca<sup>2+</sup> из ЭР обеспечивается наличием и функционированием в мембране ЭР внутриклеточных Ca<sup>2+</sup>-каналов – рецепторов инозитол-1,4,5-трифосфата (IP<sub>3</sub>-рецепторов) и рианодиновых рецепторов (РиР), имеющих около 40 % гомологии в соответствующих трансмембранных участках, что свидетельствует об общем происхождении этих Ca<sup>2+</sup>-каналов [Santulli et al., 2017; Woll, Van Petegem, 2022]. Несмотря на структурное родство, IP<sub>3</sub>-рецепторы и РиР обладают разными фармакологическими и физиологическими характеристиками. Принципиальной особенностью РиР является тот факт, что они являются уникальными внутриклеточными Ca<sup>2+</sup>-активируемыми (и регулируемые) Ca<sup>2+</sup>-каналами клеток. Первыми были открыты РиР, расположенные в мембране саркоплазматического ретикулума мышечных волокон и кардиомиоцитов. Именно РиР осуществляют электромеханическое сопряжение возбуждения (в виде ПД на сарколемме) и мышечного сокращения (за счет выброса ионов Ca<sup>2+</sup> из Ca<sup>2+</sup>-депо). В скелетных мышечных волокнах это достигается за счет прямого взаимодействия расположенных на терминальных цистернах саркоплазматического ретикулума РиР и находящихся в мембране Т-трубочек потенциал-зависимых Ca<sup>2+</sup>-каналов L-типа (Cav1.1) [Calderón et al., 2014;



Shishmarev, 2020]. В кардиомиоцитах электромеханическое сопряжения обеспечивается за счет входа ионов  $\text{Ca}^{2+}$  через потенциал-зависимые  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов L-типа ( $\text{Cav}1.2$ ) с последующей активацией  $\text{RiP}$ , реализуя, таким образом,  $\text{Ca}^{2+}$ -активируемый выброс ионов  $\text{Ca}^{2+}$  из  $\text{Ca}^{2+}$ -депо [Lu, Pu, 2020]. Помимо поперечнополосатой мускулатуры,  $\text{RiP}$  экспрессируются во многих типах клеток, включая нейрональные. Как нейроны, так и глия обладают хорошо развитым ЭР, который в нейронах простирается от сомы не только в область дендритов и дендритных шипиков [Segal, Korkotian, 2016], но также в аксоны и нервные терминалы, где в ЭР также представлены  $\text{RiP}$  [Wu et al., 2017].

### 1.2.1. Структурные особенности $\text{RiP}$

$\text{RiP}$  представляют собой семейство обладающих высокой проводимостью (для ионов  $\text{Ca}^{2+}$  - порядка 100 пС) катион-селективных гомотетрамерных ионных каналов с молекулярной массой, превышающей 2.2 МДа. Имея более 5000 аминокислотных остатков в каждом из протомеров,  $\text{RiP}$  являются наиболее крупными из известных на настоящий момент ионных каналов. Они получили свое название от одного из своих экзогенных лигандов – рианолина, алкалоидного токсина из растения *Ryania speciosa*. Рианолин, благодаря высокой аффинности к нему  $\text{RiP}$ , был использован для их мечения, очистки и выделения, и до сих пор используется в качестве селективного фармакологического агента для экспериментального воздействия на  $\text{RiP}$ . В низких ( $\leq 1$  мкМ) концентрациях рианолин, связываясь с открытым каналом  $\text{RiP}$ , запирает его в полуоткрытом состоянии, в результате чего может происходить опустошение  $\text{Ca}^{2+}$ -депо, а в более высоких концентрациях ( $\geq 1$ -10 мкМ) рианолин ингибирует работу каналов  $\text{RiP}$  [Ehrlich et al., 1994; des Georges et al., 2016; Mackrill, 2010; Nagasaki, Fleischer, 1988].

Семейство  $\text{RiP}$  у млекопитающих включает три изоформы –  $\text{RiP}1$ ,  $\text{RiP}2$ ,  $\text{RiP}3$  – кодируемые тремя разными генами в разных хромосомах [Fill, Copello, 2002], в результате чего образуются гомологичные белки с похожими

структурными мотивами. При этом ни одна из изоформ РиР не обладает строгой тканеспецифичностью. РиР1 был первоначально обнаружен в скелетных мышечных волокнах, а РиР2 – в кардиомиоцитах, но обе формы экспрессируются и в других клетках. РиР3 был выделен из ткани мозга [Nakamata et al., 1992; Nakashima et al., 1997]. В настоящее время в нейронах выявлено присутствие и возможная одновременная коэкспрессия всех трех изоформ РиР с преобладанием РиР2, а в астроцитах - преимущественно РиР3 [Baker et al., 2013; Hertle, Yeckel, 2007]. Все три изоформы РиР обладают около 65-70% гомологии и имеют определенные различия в функционировании (например,  $Ca^{2+}$ -зависимость вероятности открытия каналов, чувствительность к  $Ca^{2+}$ -зависимому ингибированию, выраженность спонтанного закрывания каналов).

Протомеры всех трех изоформ РиР обладают начинающимся с N-конца большим цитоплазматическим доменом, несущим значительное количество регуляторных сайтов, контролирующих активность каналов РиР. С-концевой участок РиР образует 6 трансмембранных доменов с порообразующей частью из внутренней и наружной спирали, и участка из 4-х спиралей, напоминающего сенсор потенциала у потенциал-зависимых ионных каналов. Благодаря улучшению технологий крио-электронной микроскопии, было показано, что открытие и закрытие РиР сопровождается не только изменениями расположения участков в трансмембранном регионе, но и значительными перемещениями участков цитоплазматического домена друг относительно друга [Williams et al., 2018].

Все изоформы РиР активируются при субмикромольной внутриклеточной концентрации ионов  $Ca^{2+}$  и ингибируются – при микромольной. При низкой цитозольной концентрации ионов  $Ca^{2+}$  (100-200 нМ) каналы РиР имеют очень низкое значение вероятности открытия и находятся в закрытом состоянии. Вероятность открытия РиР возрастает при увеличении концентрации ионов  $Ca^{2+}$  в цитоплазме и достигает максимума при её значении около 10 мкМ. При дальнейшем увеличении концентрации

ионов  $\text{Ca}^{2+}$  в цитоплазме происходит снижение вероятности открытия каналов РнР [Bezprozvanny et al., 1991]. Такой колоколообразный характер  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимости активации РнР указывает на наличие в составе РнР двух  $\text{Ca}^{2+}$ -связывающих сайтов с разной аффинностью – высокоаффинного ( $K_D$  порядка мкМ)  $\text{Ca}^{2+}$ -связывающего активационного и низкоаффинного ( $K_D$  около 100 мкМ)  $\text{Ca}^{2+}$ -связывающего ингибирующего сайта [des Georges et al., 2016]. Таким образом, РнР-опосредованный выброс ионов  $\text{Ca}^{2+}$  из депо может контролироваться концентрацией самих ионов  $\text{Ca}^{2+}$ , что обеспечивает возможность саморегуляции РнР, когда выходящие из ЭР через них в цитоплазму ионы  $\text{Ca}^{2+}$  регулируют работу РнР, причем не только тех, что выпускают эти ионы  $\text{Ca}^{2+}$ , но и близкорасположенных РнР. Кроме того, активность РнР регулируется не только в ответ на изменение цитозольной, но и люминальной (внутри ЭР) концентрации ионов  $\text{Ca}^{2+}$  [Jones et al., 2017; Laver, 2018].

Кроме ионов  $\text{Ca}^{2+}$ , эндогенным активатором РнР может выступать АТФ, имеющая собственный сайт связывания на этих каналах [Laver, 2018], и метаболит  $\text{NAD}^+$  - цАДФ-рибоза. Ионы  $\text{Ca}^{2+}$  могут управлять состоянием РнР не только напрямую, но и опосредованно, за счет связывания с СаМ. В зависимости от того, связан ли СаМ с ионами  $\text{Ca}^{2+}$ , он по-разному взаимодействует с сайтами связывания на РнР, аллостерически модулируя междоменное взаимодействие в составе их протомеров. Регуляция РнР СаМ является изоформ-специфической: СаМ в комплексе с кальцием ( $\text{Ca}^{2+}$ -СаМ) является ингибитором всех трех изоформ РнР, при этом СаМ, не связавший ионы  $\text{Ca}^{2+}$  (Аро-СаМ), при субмикромольной цитоплазматической концентрации ионов  $\text{Ca}^{2+}$  (в покое) активирует РнР1 и РнР3, и ингибирует РнР2 [Balshaw et al., 2001]. Таким образом, СаМ может обеспечивать тонкую настройку ответов разных изоформ РнР на меняющуюся внутриклеточную концентрацию ионов  $\text{Ca}^{2+}$ .

Помимо рианодина в низких концентрациях, классическим активатором РнР является кофеин, связывающийся в миллимолярном диапазоне

концентраций со своим особым сайтом в составе РнР [Gong et al., 2021]. При этом резко увеличивается вероятность открытия канала РнР за счет снижения его порога активации люминальными ионами  $Ca^{2+}$  [Kong et al., 2008; Meissner, 2017]. Уникальным свойством кофеин-индуцированного РнР-опосредованного выброса ионов  $Ca^{2+}$  является отсутствие десенситизации. При этом РнР не являются эксклюзивной мишенью для кофеина – он также является антагонистом аденозиновых рецепторов и ингибитором фосфодиэстераз, причем в более низких концентрациях, чем необходимые для активации РнР [Fredholm et al., 1999], что может затруднять трактование экспериментальных результатов при использовании кофеина.

Ингибитором РнР1 и РнР3, но не РнР2 является производное гидантоина – дантролен [Zhao et al., 2001]. Эндогенным ингибитором РнР, выступающим в качестве антагонистов ионов  $Ca^{2+}$ , являются также ионы  $Mg^{2+}$  [Laver, 2018].

### **1.2.2. Внутриклеточные регуляторы активности РнР**

РнР являются центральным звеном тонко регулируемого  $Ca^{2+}$ -зависимого выброса ионов  $Ca^{2+}$  из депо. Обширные цитоплазматические домены четырех протомеров РнР, несущие многочисленные сайты связывания, могут формировать макромолекулярные комплексы с близкой локализацией регуляторных молекул и мишеней их влияний в составе РнР.

Коиммунопреципитационные исследования выявили целый ряд молекул, тесно взаимодействующих с РнР и регулирующих их. Так, кальстабины рассматриваются как своеобразные дополнительные субъединицы РнР (аллостерические регуляторы), которые стабилизируют закрытое состояние каналов и предотвращают патологическую утечку из ЭР ионов  $Ca^{2+}$  [Kushnir et al., 2018; Steele, Samsó, 2019].

Помимо кальстабинов, в комплексе с РнР выделяются РКА (вместе с якорным белком), СаМКП, многочисленные фосфатазы (PP1, PP2A, СаN) и фосфодиэстераза [Kushnir et al., 2018; Meissner, 2017]. Известно, что РнР несут много потенциальных сайтов для фосфорилирования. Однако исследования

последствий такого фосфорилирования проведены, в основном, на  $\text{RiP2}$  кардиомиоцитов, где гиперфосфорилирование в условиях окислительного стресса вызывает диссоциацию кальстабинов от  $\text{RiP}$ , сопровождающуюся изменением  $\text{Ca}^{2+}$ -чувствительности вероятности перехода канала в открытое состояние, что в конечном итоге вызывает нарушение функционирования сердца [Kushnir et al., 2018; Marx et al., 2000; O'Brien et al., 2015].

### **1.2.3. $\text{RiP}$ и выброс депонированного $\text{Ca}^{2+}$ в постсинаптических структурах**

В синапсах ЦНС (в некоторых дендритных шипиках) выявлено непосредственное участие постсинаптического ЭР, несущего  $\text{RiP}$ , как источника ионов  $\text{Ca}^{2+}$  в развитии синаптической пластичности. При этом оказалось, что динамика и локализация ЭР в шипиках («шипиковый аппарат») зависит от синаптической активности, возрастая за счет работы NMDA-рецепторов и постсинаптических  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов L-типа, и снижаясь при активации метаботропных глутаматных рецепторов [Dittmer et al., 2017; Ng et al., 2014; Ng, Toresson, 2011]. Обсуждается возможность локализованного в дендритных шипиках  $\text{Ca}^{2+}$ -индуцированного  $\text{Ca}^{2+}$ -выброса через  $\text{RiP}$  ( $\text{Ca}^{2+}$ -спарка), за счет входа ионов  $\text{Ca}^{2+}$  через каналы NMDA-рецепторов и потенциал-зависимые  $\text{Ca}^{2+}$ -каналы (при высокой частоте стимуляции) [Emptage et al., 1999; Jochenning et al., 2015; Sabatini et al., 2002].

Постсинаптический (дендритный)  $\text{Ca}^{2+}$ -индуцированный  $\text{Ca}^{2+}$ -выброс через  $\text{RiP}$  может являться необходимым звеном в процессе индукции долговременной синаптической пластичности в синапсах гиппокампа и мозжечка, усиливая  $\text{Ca}^{2+}$ -сигнал, причем  $\text{RiP}$  могут принимать участие в развитии как долговременной потенциации, так и долговременной депрессии синаптической передачи [Padamsey et al., 2018; Raymond, Redman, 2002]. Вовлечение постсинаптических  $\text{RiP}$  в развитие долговременной пластичности и характер влияния на неё  $\text{RiP}$ -опосредованного  $\text{Ca}^{2+}$ -сигнала сильно зависит как от параметров стимуляции, так и от того, какой  $\text{Ca}^{2+}$ -вход обеспечивает

активацию РнР. Это может сопровождаться дифференцированной активацией  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимых мишеней, обеспечивающих развитие определенных форм синаптической пластичности [Futatsugi et al., 1999; Grigoryan et al., 2012; Harvey, Collingridge, 1992; Kohda et al., 1995; Reyes, Stanton, 1996; Wang et al., 1997; Welsby et al., 2006].

Интересно, что была выявлена как негативная взаимосвязь между опосредуемым постсинаптическими РнР  $\text{Ca}^{2+}$ -индуцированным выбросом ионов  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{Ca}^{2+}$ -каналами L-типа, реализуемая за счет  $\text{Ca}^{2+}$ -сенсора ЭР STIM1 [Dittmer et al., 2017; Futatsugi et al., 1999; Sather, Dittmer, 2019], так и позитивная, когда активность РнР стимулирует функционирование  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов L-типа [Chavis et al., 1996]. При этом в других работах именно L-тип  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов обеспечивает РнР-опосредованный  $\text{Ca}^{2+}$ -выброс из депо на пре- или постсинаптическом уровнях, причем предполагается прямая связь между  $\text{Ca}^{2+}$ -каналами L-типа и РнР, обеспечивающая срабатывание РнР в ответ на деполяризацию мембраны [Berrout, Isokawa, 2009; Crescenzo et al., 2006], как это происходит в триадах скелетных мышечных волокон.

#### **1.2.4. Роль пресинаптических РнР в синапсах ЦНС**

Идентификация ЭР, несущего РнР в нервных терминалях как центральных [Wu et al., 2017], так и периферических синапсов [Westrum, Gray, 1986], неизбежно породила вопрос о возможном участии депонированного  $\text{Ca}^{2+}$  в регуляции  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой секреции нейротрансмиттеров. Был продемонстрирован возможный вклад несущих РнР  $\text{Ca}^{2+}$ -депо в обеспечение пространственно-временной динамики внутритерминальной концентрации ионов  $\text{Ca}^{2+}$  как в покое [Ross, 2012], так и в ходе синаптической активности, за счет формирования, например, остаточного  $\text{Ca}^{2+}$  [Scullin, Partridge, 2010].

В ЦНС ЭР расположен в аксонах и пресинаптических терминалях, причем тут экспрессия РнР доминирует над  $\text{IP}_3$ -рецепторами [Sharp et al., 1993]. Установлено, что при низкочастотной стимуляции (5 Гц) пресинаптические РнР обеспечивают возрастание концентрации ионов  $\text{Ca}^{2+}$  внутри

пресинаптических бутонов [Unni et al., 2004], а при более высокочастотной и пролонгированной стимуляции - начинает превалировать загрузка ионов  $\text{Ca}^{2+}$  в пресинаптический ЭР [Juan-Sanz et al., 2017].

В отличие от дендритных, пресинаптические РиР способны срабатывать не только в ответ на одиночный ПД, обеспечивая  $\text{Ca}^{2+}$ -индуцированный  $\text{Ca}^{2+}$ -выброс, но и спонтанно, при этом контролируя как частоту спонтанной секреции нейротрансмиттера [Bardo et al., 2002; Emptage et al., 2001], так и даже амплитуду миниатюрных постсинаптических токов [Llano et al., 2000].

Оказалось, что пресинаптические РиР могут участвовать в регуляции не только спонтанной, и вызванной секреции нейротрансмиттеров в синапсах ЦНС, обеспечивая кратковременное облегчение передачи (за счет увеличения вероятности выброса) в условиях парной стимуляции при средних, но не низких частотах, а также развитие посттетанической потенциации [Cabezas, Buño, 2006; Emptage et al., 2001; Zhang et al., 2009]. Имеются данные о вовлечении пресинаптических РиР как в индукцию долговременной депрессии [Arias-Cavieres et al., 2018; Reyes, Stanton, 1996; Unni et al., 2004], так и в развитие долговременной потенциации синаптической передачи [Cheng et al., 2010; Martín, Buño, 2003], причем в качестве источника активирующих РиР ионов  $\text{Ca}^{2+}$  могут выступать не только потенциал-зависимые  $\text{Ca}^{2+}$ -каналы или NMDA-рецепторы, но и  $\text{Ca}^{2+}$ -проводящие  $\alpha 7$ -никотиновые холинорецепторы [Magueresse, Cherubini, 2007; Sharma, Vijayaraghavan, 2003].

Участие РиР в регуляции тонкой настройки секреции нейротрансмиттеров описано в сенсорных окончаниях [Huang et al., 2008], в варикозных синапсах постганглионарных симпатических нейронов [Smith, Cunnane, 1996; Williams et al., 2011], ганглионарных синапсах [Peng, 1996] и различных нервно-мышечных контактах [Балезина, 2002].

### 1.2.5. Роль пресинаптических РиР в нервно-мышечных синапсах

В пионерской работе на нервно-мышечном синапсе диафрагмы мыши в условиях сниженной наружной концентрации ионов  $\text{Ca}^{2+}$  (и повышенной –  $\text{Mg}^{2+}$ ) было выявлено возрастание квантового состава одиночных ПКП под действием рианодина в концентрациях, стимулирующих РиР, не сопровождавшееся при этом изменениями кратковременной пластичности передачи при парной стимуляции или частоты МПКП. На фоне  $\text{K}^{+}$ -деполяризации было выявлено РиР-зависимое увеличение частоты МПКП [Nishimura et al., 1990]. Похожее - облегчающее спонтанную и вызванную секрецию АХ - действие РиР-опосредованного выброса депонированного  $\text{Ca}^{2+}$ , запускаемого при продолжительной среднечастотной стимуляции моторных терминалей, было выявлено на нервно-мышечных синапсах лягушки в условиях сниженной наружной концентрации ионов  $\text{Ca}^{2+}$  [Narita et al., 2000, 1998]. Флуоресцентная регистрация динамики аксоплазматического  $\text{Ca}^{2+}$  при стимуляции моторных терминалей позволила выявить, что пресинаптические РиР, скорее всего, расположены достаточно близко к триггерным  $\text{Ca}^{2+}$ -каналам N-типа моторного синапса лягушки, чтобы реагировать на генерируемый этими каналами  $\text{Ca}^{2+}$ -сигнал, возникающий в ответ даже на одиночный ПД. При продолжительной стимуляции моторного синапса работа РиР сначала усиливается, а затем они инактивируются [Kubota et al., 2005; Soga-Sakakibara et al., 2010]. Вовлечение РиР в формирование  $\text{Ca}^{2+}$ -транзientа в ответ на одиночный пресинаптический ПД было в дальнейшем выявлено группой под руководством Е.Е. Никольского [Khaziev и др., 2016]. Однако на нервно-мышечных синапсах млекопитающих подобные эксперименты до сих пор не проводились в силу их большей компактности, затрудняющей оценку флуоресцентного  $\text{Ca}^{2+}$ -сигнала.

В ранней работе на рассеченном нервно-мышечном препарате диафрагмы крысы было выявлено, что фармакологическая стимуляция пресинаптических РиР не усиливает вызванную секрецию АХ при низко- (1 Гц) или среднечастотной (25 Гц) стимуляции нервных терминалей, а наоборот,



снижает амплитуду ПКП и провоцирует развитие депрессии ПКП по ходу стимуляции. По мнению авторов, это может свидетельствовать о РиР-опосредованной CDI  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов терминали [Schwartz et al., 1999], что и приводит к торможению нервно-мышечной синаптической передачи в моторных синапсах млекопитающих.

В работах группы под руководством О.П. Балезиной на рубеже XX и XXI веков на моторных синапсах мышцы было показано, что влияние РиР и выброса депонированного  $\text{Ca}^{2+}$  на спонтанную и вызванную секрецию АХ может быть противоположно направленным и зависеть от условий активации РиР со стороны разных  $\text{Ca}^{2+}$ -входов в терминали.

Негативное влияние на вызванную секрецию АХ со стороны РиР-опосредованного  $\text{Ca}^{2+}$ -выброса (запускаемого входом  $\text{Ca}^{2+}$  по L-типу  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов) было показано в экспериментах на новообразованных в ходе реиннервации *m.EDL* моторных синапсах мышцы [Balezina, Bogacheva, 2009; Balezina et al., 2007]. При этом в зрелых моторных синапсах характер участия РиР в регуляции спонтанной и вызванной секреции АХ сильно различается в зависимости от источника поступления  $\text{Ca}^{2+}$  в моторную терминаль вблизи РиР, характера деполяризации терминали, паттерна стимуляции синапса и т.п. Так, в условиях нормальной наружной концентрации ионов  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{K}^{+}$ -деполяризации (8 мМ) активация РиР рианодинном приводила к подавлению (до нормального уровня) возросшей при деполяризации частоты МПКП. Это может быть обусловлено активацией  $\text{Ca}^{2+}$ -активируемых  $\text{K}^{+}$ -каналов малой проводимости (SK-каналов) за счет РиР-опосредованного выброса депонированного  $\text{Ca}^{2+}$  [Balezina, Bukiia, Lapteva, 2005; Balezina, Ermishina, Lapteva, 2004; Balezina, Lapteva, 2007]. При большей деполяризации мембраны (под действием 16 мМ наружного  $\text{K}^{+}$ ) активация РиР рианодинном обеспечивала не подавление, а, напротив, дальнейший прирост частоты МПКП [Балезина и др., 2005]. Возможное участие РиР в качестве усилителя, а не ограничителя внутритерминального  $\text{Ca}^{2+}$ -сигнала, обеспечивающего возрастание частоты МПКП при мощной  $\text{K}^{+}$ -деполяризации, было затем

подтверждено другими исследователями [Palma et al., 2011]. При этом рассматривалась возможность прямой активации РиР пресинаптическими  $\text{Ca}^{2+}$ -каналами L-типа, стимулируемыми со стороны аденозиновых  $\text{A}_{2\text{A}}$ -рецепторов.

В условиях нормальной наружной концентрации ионов  $\text{K}^+$  и  $\text{Ca}^{2+}$  проявление эффектов фармакологической стимуляции РиР в отношении спонтанной секреции АХ в моторных синапсах зависело от типа используемого фармакологического стимулятора РиР. Рианодин в субмикромольной концентрации, запирающий РиР в полупроводящем состоянии, оказался неспособен увеличивать частоту МПКП [Balezina, Vukiya, 2001], в то время как кофеин и дигоксин, выступающие в роли активаторов РиР, вызывали значительный прирост частоты МПКП [Balezina, Lapteva, 2007; Балезина и др., 2001].

На кураризированных нервно-мышечных препаратах диафрагмы мыши было прослежено участие пресинаптических РиР в регуляции вызванной синхронной многоквантовой секреции АХ. Блокада РиР супрамикромольными дозами рианолина вызывала ускоренное наступление и усиление депрессии постсинаптических токов концевой пластинки в ритмическом залпе ТКП, при этом снижалось и проявление начального облегчения передачи в залпе [Balezina, Vukiya, 2003]. Стимулирование РиР субмикромольными дозами рианолина выявило дуальное частото-зависимое влияние такого способа активации РиР на квантовый состав ПКП. При низкой частоте стимуляции нерва (4 Гц) дополнительная активация РиР рианолином снижала уровень фазы плато в коротком залпе ПКП, а при высокой частоте (70-100 Гц) – повышала его [Балезина и др., 2005, 2001]. Интересно, что в нервно-мышечных синапсах лягушки эффект вовлечения РиР в регуляцию кратковременной синаптической пластичности при залповой стимуляции моторных синапсов с разной частотой обратен таковому для нервно-мышечных синапсов мыши [Silveira et al., 2015].

Оказалось, что пресинаптические РиР участвуют в реализации потенцирующего секрцию АХ модуляторного действия  $H_2S$  в моторных синапсах лягушки и мыши [Gerasimova et al., 2015, 2013]. Кроме того, показано, что РиР и выброс депонированного  $Ca^{2+}$  могут принимать участие в формировании задержанного асинхронного выброса квантов АХ в зрелых моторных синапсах млекопитающих. При этом физиологическое значение и само наличие такого РиР-зависимого паттерна секреции АХ в моторных синапсах млекопитающих вызывает сомнения, поскольку эксперименты были проведены в условиях сниженной наружной концентрацией ионов  $Ca^{2+}$  [Khuzakhmetova et al., 2014, 2014].

Наконец, нельзя не отметить обнаруженную, но пока малопонятную роль РиР в регуляции размера квантов АХ [Van der Kloot, 1991]. Возможная взаимосвязь между активностью РиР и размером квантов медиаторов, причем разнонаправленная, была выявлена в разных типах синапсов [Dunn, Syed, 2006; Lim et al., 2003; Liu et al., 2005; Llano et al., 2000]. Были получены экспериментальные свидетельства того, что стимуляция РиР способна  $Ca^{2+}$ -зависимым образом увеличивать на пресинаптическом уровне амплитуду одноквантовых сигналов в моторных синапсах мыши [Балезина и др., 2001; Skiteva et al., 2012]. Механизм такого проявления влияния депонированного  $Ca^{2+}$  на этот параметр квантовой секреции АХ, остается неизученным.

Подводя итог анализу литературы, освещающей вклад депонированных ионов  $Ca^{2+}$ , выбрасываемых через РиР, в регуляцию различных параметров квантовой секреции АХ, можно заключить, что именно характер активации РиР, то есть сопряжение РиР с определенными пресинаптическими  $Ca^{2+}$ - входами, а также реактивность и специфика срабатывания последующих сигнальных путей и конкретных мишеней, чувствительных к выбросу депонированного  $Ca^{2+}$  – будут определять конечный вклад РиР и депонированного  $Ca^{2+}$  в  $Ca^{2+}$ -зависимую секрецию АХ при разных условиях и режимах работы моторных синапсов.

Однако потенциал-зависимыми  $\text{Ca}^{2+}$ -каналами и  $\text{P}_2\text{U}$  набор возможных  $\text{Ca}^{2+}$ -входов в моторных нервных терминалях млекопитающих отнюдь не исчерпывается.

### 1.3. $\text{P}_2\text{X}$ –рецепторы

АТФ, обычно рассматриваемая в качестве внутриклеточной макроэргической молекулы, способна функционировать в роли котрансмиттера в нервной системе, причем как в ЦНС, так и на периферии [Burnstock, 2007]. Кроме того, в ЦНС рассматривается возможность существования и экзоцитоза отдельного пула только АТФ-содержащих синаптических везикул [Pankratov et al., 2006, 2007]. Внеклеточная АТФ, её метаболитические производные, а также уридиновые нуклеотиды способны обеспечивать пуринергическую сигнализацию, действуя на семейство  $\text{P}_2$ -рецепторов. На настоящий момент оно включает в себя 15 подтипов рецепторов, и это семейство делится на 2 группы – 8 метаботропных, сопряженных с G-белками рецепторов  $\text{P}_2\text{U}$ , и 7 ионотропных рецепторов  $\text{P}_2\text{X}$ , представляющих собой гомо- или гетеротримерные катион-селективные ионные каналы, которые, помимо  $\text{K}^+$  и  $\text{Na}^+$ , способны проводить еще и ионы  $\text{Ca}^{2+}$  [Burnstock, 2007; Köles et al., 2011].

#### 1.3.1. Структурные особенности подсемейства $\text{P}_2\text{X}$ -рецепторов

Каждая субъединица тримера  $\text{P}_2\text{X}$ -рецепторов имеет общее строение – С- и N-концы белковой молекулы расположены внутри клетки и соединены двумя  $\alpha$ -спиральными трансмембранными сегментами и большой внеклеточной петлей (эктодоменом), содержащей АТФ-связывающие сайты. Взаимное расположение этих сайтов во входящих в тример мономерах определяет наличие в составе  $\text{P}_2\text{X}$ -рецепторов трех участков посадки внеклеточной АТФ с сильной кооперативностью. Установлено, что минимум две, а чаще всего три молекулы АТФ требуется для активации воротного механизма  $\text{P}_2\text{X}$ -рецепторов [Habermacher et al., 2016; Martínez-Cuesta et al., 2020; Stelmashenko et al., 2012], при этом практически рядом с АТФ-

связывающими сайтами располагаются участки, предназначенные для взаимодействия P2X-рецепторов с ингибиторами или аллостерическими модуляторами [Coddou et al., 2011; Evans, 2009].

Данные рентгеноструктурного анализа кристаллических структур разных P2X-рецепторов и результаты их исследований с использованием атомной силовой и электронной микроскопии не только подтвердили стехиометрию и общую архитектуру этих рецепторов, но и позволили точно определить трехмерную организацию участков их субъединиц. По форме каждая субъединица напоминает дельфина, где голова, тело и плавники – это характерным образом структурированная внеклеточная петля, а хвост – трансмембранные домены, образующие пору этих ионотропных рецепторов [Habermacher et al., 2016; Jiang et al., 2021; Martínez-Cuesta et al., 2020].

В ответ на действие внеклеточной АТФ, эти рецепторы способны менять конформационное состояние. Начальное связывание агониста обеспечивает переход рецептора из закрытого состояния в открытое, обеспечивающее проведение катионных токов  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  и  $\text{Ca}^{2+}$  через мембрану [Egan, Khakh, 2004]. Пролонгированное воздействие АТФ вызывает временную инактивацию P2X-рецепторов – десенситизацию, при которой прекращается ток ионов через канал [Jiang et al., 2013; Kawate, 2017].

Кинетика десенситизации различна у разных подтипов P2X-рецепторов. Так, быстрой десенситизацией обладают P2X1 и P2X3, медленной – P2X2, P2X4 и P2X5. Отличительной (уникальной) особенностью P2X7-рецепторов является то, что они не проявляют десенситизации, и при действии экзогенных агонистов способны долгое время оставаться в открытом состоянии и обеспечивать протекание трансмембранных ионных токов [North, 2002].

При диссоциации АТФ от АТФ-связывающих сайтов происходит быстрая деактивация P2X-рецепторов. Диссоциация АТФ от рецептора в десенситизированном состоянии возвращает канал в исходное покоящееся, закрытое состояние, в котором он снова может быть активирован – происходит ресенситизация.

Для некоторых P2X-рецепторов, включая P2X7, описано особое проводящее состояние, изначально описанное как расширение (дилатация) поры канала до нескольких нанометров, при котором этот канальный рецептор становится проницаем для крупных органических катионов и анионов размером до 900 Да [Rokic, Stojilkovic, 2013; Virginio et al., 1999].

Необходимо отметить, что точный молекулярный механизм формирования этой большой поры недостаточно изучен и не везде проявляется [Alves et al., 2014]. В настоящее время рассматривается точка зрения, что большую пору образует не сам канал P2X-рецептора при его продолжительной активации внеклеточной АТФ, а это – результат взаимодействия рецептора с другими каналами, например, паннексинами, которые и образуют такую пору, активируясь за счет повышения концентрации ионов  $K^+$ , обеспечиваемого их выходом наружу через P2X-рецепторы [Pelegrin, Surprenant, 2006].

### **1.3.2. Особенности строения P2X7-рецепторов**

P2X7-рецепторы вызывают особый интерес в современной физиологии. Это связано с особенностями строения этого подтипа, чувствительности к АТФ и специфике функционирования в норме и при патологии [Andrejew et al., 2020]. Высокая проводимость для ионов  $Ca^{2+}$  в сочетании с отсутствием десенситизации позволяет рассматривать P2X7-рецепторы как возможных участников различных  $Ca^{2+}$ -зависимых сигнальных путей в клетках.

Характерной структурной особенностью субъединиц рецепторов P2X7 по сравнению с другими P2X-рецепторами является удлиненный на примерно 200 аминокислот С-конец, содержащий структурные мотивы, обеспечивающие взаимодействия с внутриклеточными белками, что может приводить к активации сигнальных путей и посттрансляционным модификациям рецептора [Costa-Junior et al., 2011]. Это делает С-конец необходимым структурным компонентом для проявления таких особенностей P2X7-рецепторов, как отсутствие у них десенситизации, высокая

проводимость для ионов  $\text{Ca}^{2+}$  и возможное формирование большой поры [Liang et al., 2021].

N-конец P2X7-рецепторов принимает участие в регуляции  $\text{Ca}^{2+}$ -тока через канал [Liang et al., 2015] и контролирует работу воротного механизма канала [Allsopp, Evans, 2015]. При этом P2X7-рецепторы отличаются как высоким полиморфизмом отдельных нуклеотидов, идентифицированных в районе внеклеточной петли и доменов С-конца, так и значительным количеством сплайс-вариантов, что отражается в различных проявлениях особенностей функционирования таких каналов, например, способности к формированию большой неселективной поры [Martínez-Cuesta et al., 2020].

### **1.3.3. Функциональные особенности P2X7-рецепторов**

Помимо структурных особенностей P2X7-рецепторы отличаются от всех остальных членов подсемейства P2X-рецепторов низкой чувствительностью к АТФ. Если для большинства P2X-рецепторов для их активации эффективной является внеклеточная концентрация АТФ порядка 1-10 мкМ, то для P2X7-рецепторов требуется не менее 100 микроМ внеклеточной АТФ [Surprenant et al., 1996]. Данный факт играет большую роль в понимании специфики активации эндогенной АТФ P2X7-рецепторов и условий их функционирования в норме и при патологиях. Согласно каноническим представлениям, P2X7-рецепторы, в силу их низкой чувствительности к АТФ и практически отсутствием десенситизации, взаимодействуют с АТФ, в основном в при патологических условиях, когда наблюдается появление аномально высоких концентраций внеклеточной АТФ в среде, и АТФ действует уже не как физиологический регулятор, а как молекула, ассоциированная с повреждением [Rodrigues et al., 2015].

Действительно, P2X7-рецепторы были первоначально обнаружены именно на мембранах клеток иммунной системы, активирующимися внеклеточной АТФ при различных патологических процессах и участвующими в реализации воспаления и клеточной гибели [Sekic, Linden,

2016; Di Virgilio et al., 2017]. Было установлено, что именно при активации высокими дозами АТФ P2X7-рецепторы способны образовывать на мембране клеток макропору с диаметром около 10Å, пропускающую большие органические молекулы, что сопровождается поступлением в клетки метаболитов с образованием инфламмосом и гибелью клетки [Khadra et al., 2013; Di Virgilio et al., 2017]. Наконец, с учетом того, что АТФ в наружной среде в норме находится обычно в концентрации нескольких наномоль [Falzoni et al., 2013], высказывалось мнение о P2X7-рецепторах как обычно «молчащих», срабатывающих лишь при патологиях [Bhattacharya, Viber, 2016]. Наряду с такими представлениями о роли P2X7-рецепторов в тканях, в настоящее время описано присутствие P2X7-рецепторов на самых разных типах клеток, включая нейроны [Miras-Portugal et al., 2021, 2017], где P2X7-рецепторы участвуют в нормальном функционировании клеток [Volonté et al., 2006].

Обнаружение везикулярного и других типов высвобождения АТФ из клеток и её роль сигнальной молекулы, мишенью которой могут быть P2X7-рецепторы, вынудило постулировать необходимость присутствия в этих случаях источников высвобождаемой АТФ вблизи от P2X7-рецепторов, особенно учитывая их избирательную, но низкую чувствительность к АТФ. Очевидно, что для эффективной активации P2X7-рецепторов в нормальных условиях работы клеток требуется тесная ассоциация на мембране этих рецепторов и путей поступления АТФ во внеклеточную среду. К числу таких путей в разных клетках и тканях относятся экзоцитозные гранулы, микровезикулы, модуляторные каналы кальциевого гомеостаза (CALHM), АТФ-связывающие кассетные транспортеры и мембранные каналы – коннексины и паннексины [Martínez-Cuesta et al., 2020]. Последние способны образовывать комплексы с P2X7-рецепторами, не только обеспечивая поступление большого количества АТФ во внеклеточную среду и продолжительную активацию P2X7-рецепторов, но и, по некоторым данным,



именно эти каналы, а не P2X7-рецепторы, формируют большую макропору [Locovei et al., 2007; Di Virgilio et al., 2018]

В настоящее время постулируется, что концентрационный профиль внеклеточной АТФ около участков мембран, содержащих P2X7-рецепторы, будет зависеть не только от источника АТФ и характера выхода АТФ из клеток, но и от уровня метаболизма АТФ во внеклеточной среде. Метаболизм АТФ обеспечивается двумя экто-энзимами – CD39 (экто-нуклеозид трифосфат дифосфогидролаза), расщепляющей АТФ до АДФ и АМФ, и CD73 (экто-5'-нуклеотидаза), катализирующей дефосфорилирование АМФ до аденозина [Regateiro et al., 2013; Robson et al., 2006]. Оба этих фермента обеспечивают постоянную деградацию внеклеточной АТФ.

Таким образом, колокализация P2X7-рецепторов рядом с источниками поступления АТФ во внешнюю среду и на достаточном расстоянии от метаболизирующих АТФ ферментов, потенциально способна обеспечить быстрое локальное наращивание внеклеточной концентрации АТФ, необходимой для активации P2X7-рецепторов, причем - не только при неконтролируемом увеличении внеклеточной АТФ при воспалении и гибели клеток, но и в норме.

Такая специфическая локализация рецепторов на мембране клеток может обеспечиваться модификацией аминокислотных остатков в доменах С-конца субъединиц [Sluyter, 2017]. Кроме того, несмотря на канонические представления о низкой чувствительности P2X7-рецепторов к внеклеточной АТФ, в настоящее время рассматривается возможность срабатывания P2X7-рецепторов в ответ на появление её в низких концентрациях, благодаря возможному модулирующему влиянию спектра как внутри-, так и внеклеточных аллостерических модуляторов этих рецепторов – например, мембранных фосфоинозитидов, или донора АДФ-рибозных остатков – никотинамид аденин динуклеотида (NAD) [Coddou et al., 2011; Martínez-Cuesta et al., 2020].

Несмотря на канальную природу P2X7-рецепторов, установлено, что их роль не исчерпывается функционированием как лиганд-активируемых катионных каналов, обеспечивающих вход в клетку  $\text{Na}^+$  и  $\text{Ca}^{2+}$  или выход  $\text{K}^+$ . Оказалось, что эти рецепторы напрямую могут взаимодействовать более чем с 50 молекулярными партнерами, в число которых входят периферические и интегральные белки, а также шапероны, белки цитоскелета и многочисленные участники сигнальных каскадов [Sluyter, 2017]. Так, с С-концом субъединиц P2X7-рецепторов может быть ассоциирован CaM, который принимает участие в  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимом увеличении чувствительности самого рецептора к повторному или продолжительному действию агониста [Roger et al., 2010]. Кроме того, CaM опосредует P2X7-зависимую активацию CaMKII в синапсах мозжечка, что приводит к потенцированию секреции глутамата [León et al., 2006, 2008]. Стимулирование P2X7-рецепторов может вызывать активацию фосфолипаз A2 и D, тирозин-фосфатазы- $\beta$  [Martínez-Cuesta et al., 2020], а также - митоген-активируемых протеинкиназ p38 [Armstrong et al., 2002] и Erk1/2 [Amstrup, Novak, 2003]. Кроме того, показана опосредуемая P2X7-рецепторами  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимая транслокация к мембране и активация определенных изоформ РКС [Tsao et al., 2013]. Все это расширяет возможность участия P2X7-рецепторов в регуляции множества физиологических процессов, в зависимости от того, в каких тканях и в каких клетках эти рецепторы экспрессируются.

#### **1.3.4. P2X7-рецепторы как регуляторы работы синапсов**

В нервной системе показана широкая экспрессия P2X7-рецепторов в нейронах и глиальных клетках [Armstrong et al., 2002; Deuchars et al., 2001; Metzger et al., 2017]. При этом, до сих пор ведутся дебаты в научной литературе о присутствии P2X7-рецепторов именно на нейрональных мембранах, и ряд исследователей считает, что синаптические эффекты, связанные со стимуляцией P2X7-рецепторов, обусловлены активацией глиальных

рецепторов, сопряженной с последующим выбросом глиотрансмиттеров [Шлес et al., 2017; Miras-Portugal et al., 2021, 2017; Zhao et al., 2021].

Вместе с тем, рядом авторов подчеркивается доминирование именно пресинаптической локализации P2X7-рецепторов в ЦНС – в коре, стриатуме, среднем мозге, мозжечке и особенно в гиппокампе, хотя P2X7-могут экспрессироваться и постсинаптически, в соматодендритных участках. В препаратах синапсом, полученных из разных отделов мозга, стимуляция экзогенным АТФ или высокоаффинным агонистом P2X7-рецепторов 2',3'-О-(4-бензоил-4-бензоил)-АТФ (BzATP) вызывала увеличение внутрисинапсосомальной концентрации ионов  $Ca^{2+}$ , которое было чувствительно к специфическим антагонистам P2X7-рецепторов [Miras-Portugal et al., 2017].

Поскольку везикулярный выброс нейротрансмиттеров является прямым следствием возрастания концентрации ионов  $Ca^{2+}$  в нервных терминалях, участие P2X7-рецепторов в обеспечении этого процесса интенсивно тестировалось на разных синапсах с использованием разнообразных подходов, включая электрофизиологические. Активация пресинаптических P2X7-рецепторов индуцировала выброс глутамата в коре, мозжечке и гиппокампе [León et al., 2008; Marcoli et al., 2008; Sperlágħ et al., 2002], причем P2X7-рецепторы, помимо функционирования в качестве пресинаптического  $Ca^{2+}$ -входа, участвовали и в  $Ca^{2+}$ -независимой невезикулярной секреции глутамата [Barros-Barbosa et al., 2018]. В гиппокампе P2X7-рецепторы оказались способны увеличивать секрецию не только глутамата, но и ГАМК [Sperlágħ et al., 2002; Wirkner et al., 2005], а также - продукцию газотрансмиттера NO [Patti et al., 2006], и обеспечивать развитие депрессии синаптической передачи в определенных гиппокампальных синапсах за счет активации MAPKиназного каскада с участием p38 [Armstrong et al., 2002].

Следует отметить, что активация именно нейрональных P2X7-рецепторов не приводит к формированию большой поры, делая невалидной гипотезу о массивном транспорте нейротрансмиттеров наружу через такую

макропору, по крайней мере, в непатологических условиях [Armstrong et al., 2002; Deuchars et al., 2001; León et al., 2008; Moores et al., 2005]. Интересно, что в глутаматергических корковых синапсах отмечена колокализация и функциональное взаимодействие P2X7-рецепторов с еще одним лиганд-управляемым Ca<sup>2+</sup>-входом – α7-нХР, направленное на потенцирование секреции глутамата [Patti et al., 2006]. Таким образом, в литературе имеются убедительные данные, что в синапсах ЦНС P2X7-рецепторы могут эффективно участвовать в регулировке синаптической передачи не только Ca<sup>2+</sup>-зависимым способом, связанным с поступлением через них ионов Ca<sup>2+</sup> в нейроны, но и метаболически опосредованным путем, через активацию Ca<sup>2+</sup>-зависимых сигнальных каскадов в нервных терминалях синапсов.

Моторные синапсы были одним из первых исследованных синаптических контактов, где с использованием целого комплекса методов была показана регуляторная роль эндогенной и экзогенной АТФ как самостоятельного, независимого от аденозина, регулятора пресинаптических пуринорецепторов и секреции АХ [Giniatullin, Sokolova, 1998; Ziganshin et al., 2020]. Облегчение вызванного выброса АХ в моторных синапсах мышцы при блокировании пресинаптических P2-рецепторов сурамином показало, что присутствующие на моторных терминалях рецепторы к АТФ оказывают преимущественно тормозное действие на секрецию АХ [Bogacheva, Balezina, 2015]. В настоящее время в качестве таких тормозных пуринорецепторов рассматривают, в первую очередь, метаботропные P2Y13-рецепторы, недавно выявленные на моторных терминалях мышцы [Guarracino et al., 2016]. Что касается ионотропных P2X7-рецепторов, то лишь в начале XXI века впервые была продемонстрирована их пресинаптическая локализация в моторных синапсах мышцы [Deuchars et al., 2001]. Несмотря на это, в нервно-мышечных синапсах роль P2X7-рецепторов остается практически неизученной. В моторных синапсах лягушки агонист P2X-рецепторов BzATP не вызвал какого-либо изменения параметров вызванной секреции АХ [Sokolova et al., 2003]. Единственной работой, показывающей возможное участие P2X7-рецепторов в

регуляции секреции АХ в моторных синапсах млекопитающих, является исследование скорости выгрузки липофильного красителя FM1-43 из везикул при тоническом действии VzАТР, продемонстрировавшее усиление спонтанной секреции квантов АХ при стимуляции P2X7-рецепторов [Mooges et al., 2005].

Остается открытым и вопрос об обеспечении достаточной для активации P2X7-рецепторов концентрации эндогенного АТФ в синаптической щели моторных синапсов, поскольку ингибирование экто-5'-эктонуклеотидазы в моторных синапсах мыши, сопровождающееся увеличением уровня эндогенного АТФ в синапсах, не приводило к облегчению секреции на пресинаптическом уровне, где локализованы P2X7-рецепторы. Отсутствие ожидаемого облегчающего действия P2X7-рецепторов в этих условиях могло быть связано не столько с недостатком эндогенного АТФ для их активации, сколько с доминированием одновременно активируемых со стороны АТФ (и аденозина), но противоположно действующих на секрецию АХ тормозных пресинаптических пуринорецепторов [Bogacheva, Balezina, 2015].

Доказанное присутствие P2X7-рецепторов в моторных синапсах, их потенциальная способность служить дополнительным  $Ca^{2+}$ -входом в моторную терминаль, и одновременно - вероятным активатором  $Ca^{2+}$ -зависимых сигнальных каскадов, а также возможность функционального взаимодействия с какими-либо из пресинаптических рецепторов и/или запускаемыми ими сигнальными путями – все это подразумевает возможное участие P2X7-рецепторов в регуляции квантовой секреции АХ при нервно-мышечной передаче. Механизмы и условия проявления модуляторной роли этих рецепторов в моторных синапсах, в том числе как особого пресинаптического  $Ca^{2+}$ -входа - безусловно, требуют изучения.

#### **1.4. Никотиновые холинорецепторы альфа7-типа ( $\alpha 7$ -нХР)**

Еще одним потенциально важным  $Ca^{2+}$ -входом в моторных нервных терминалях могут служить пресинаптические никотиновые холинорецепторы

$\alpha 7$ -типа. Они являются представителем подсемейства ионотропных пентамерных мембранных рецепторов, которые избирательно активируются, помимо эндогенного АХ, алкалоидом табака никотином, вызывая открытие ионного канала.

#### 1.4.1. Краткая общая характеристика нХР

Все нХР, хотя имеют разные функциональные и фармакологические особенности, являются пентамерами. Они образуются из 5 трансмембранных субъединиц из общего набора, состоящего из 17 гомологичных полипептидов ( $\alpha 1-10$ ,  $\beta 1-4$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ). Интенсивные исследования нХР у разных видов животных выявили, что каждая субъединица состоит из внеклеточного N-конца, несущего участок лиганд-связывающего домена для агонистов и конкурентных антагонистов, четырех гидрофобных трансмембранных сегментов, обозначаемых М1-М4, двух малых гидрофильных петель, соединяющих сегменты М1-М2 и М2-М3, более крупной внутриклеточной петли переменного размера, лежащей между сегментами М3 и М4, и где расположены сайты фосфорилирования, и внеклеточного С-конца [Kalamida et al., 2007]. Трансмембранные сегменты М1-М4 располагаются концентрическими кругами вокруг центральной поры канала. Сегмент М2 образует стенку поры, М1 и М3 прикрывают М2 от окружающих липидов мембраны, ближе всего к которым расположен М4 [Zoli et al., 2015].

В зависимости от того, из каких 5 субъединиц состоит такой АХ-управляемый ионный канал, он в разной степени проницаем для катионов  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  и  $\text{Ca}^{2+}$ . Первым нХР, и вообще первым рецептором для нейротрансмиттера, выделенным и описанным с точки зрения строения и функционирования был гетеропентамерный нХР из электрического органа ската *Torpedo* [Changeux, 2020]. Высокогомологичный ему мышечный тип нХР локализован на постсинаптической мембране моторных синапсов, Этот тоже гетеропентамер, который включает две  $\alpha 1$ -субъединицы, имеющих в составе внеклеточного N-конца так называемую Cys-петлю (это - общая структурная особенность  $\alpha$ -

субъединиц nXP), принимающую участие в связывании лиганда (АХ), и по одной субъединице  $\beta 1$ ,  $\gamma$ - и  $\varepsilon$  (или  $\delta$  у эмбриональных скелетных мышц до установления иннервации). Между  $\alpha 1$ - и прилегающими к ним  $\gamma$  или  $\varepsilon/\delta$ -субъединицами располагаются сайты посадки АХ, при оккупировании которых происходят конформационные изменения преимущественно в  $\alpha 1$ -субъединицах, что и приводит к открытию канала [Unwin et al., 2002].

В отличие от единственной комбинации субъединиц в составе nXP мышечного типа, 12 субъединиц – 9 вариантов  $\alpha$ -субъединиц ( $\alpha 2$  -  $\alpha 10$ ) и 3 варианта  $\beta$ -субъединиц ( $\beta 2$ ,  $\beta 3$ ,  $\beta 4$ ) - способны образовывать большое количество (до 30) различных подтипов нейрональных nXP. Нейрональные nXP имеют общую пентамерную структуру, но при этом сильно различаются между собой в отношении фармакологии, кинетики активации, десенситизации, сравнительной катионной проводимости, экспрессии и функционированию [Albuquerque et al., 2009; Dani, Bertrand, 2007; Jensen et al., 2005].

Антагонист nXP -  $\alpha$ -бунгаротоксин ( $\alpha$ -BgTx) связывается и блокирует некоторые, но не все подтипы нейрональных nXP, которые делятся по отношению к  $\alpha$ -BgTx на два класса.

Первый класс –  $\alpha$ -BgTx-чувствительные nXP, которые могут быть гомопентамерами  $\alpha 7$ ,  $\alpha 8$  и  $\alpha 9$  или гетеромерами  $\alpha 7/\alpha 8$  и  $\alpha 9/\alpha 10$  и  $\alpha 7/\beta 2$ , и обладают низкой аффинностью к агонистам (микроМ).

Второй класс – это  $\alpha$ -BgTx-нечувствительные гетеропентамерные nXP, состоящие из  $\alpha 2$ - $\alpha 6$  и  $\beta 2$ - $\beta 4$  субъединиц, с высокой аффинностью (нМ) связывающие никотиновые агонисты, но не  $\alpha$ -BgTx [Zoli et al., 2015, 2018].

Гетеропентамерные nXP обладают двумя АХ-связывающими сайтами, расположенными между  $\alpha$ - и  $\beta$ - субъединицами. Кроме различий в субъединичном составе,  $\alpha$ -BgTx-нечувствительные гетеромерные nXP могут иметь разную стехиометрию  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединиц при одинаковом субъединичном составе, что приводит к появлению дополнительных различий

в чувствительности к агонистам или антагонистам, проницаемости для ионов  $\text{Ca}^{2+}$  и проводимости и кинетике одиночных каналов [Zoli et al., 2015].

Гомопентамерные нейрональные нХР, в частности  $\alpha 7$ -нХР, несут 5 идентичных АХ-связывающих сайтов. Исследования показали, что для активации и развития максимального ответа  $\alpha 7$ -нХР (продолжительности пребывания канала этого рецептора в открытом состоянии) достаточно взаимодействия АХ только с одним из таких сайтов, при этом остальные сайты связывания АХ служат для увеличения чувствительности  $\alpha 7$ -нХР к агонисту, адаптируя их, таким образом, к экстрасинаптической объемной холинергической передаче в ЦНС и ненейрональных тканях [Andersen et al., 2013].

В ЦНС млекопитающих присутствует ансамбль гетеромерных нХР  $\alpha 4\beta 2$ - и  $\alpha 3\beta 4$ -подтипов, в состав которых могут входить дополнительные субъединицы  $\alpha 5$  или  $\beta 3$ . Эти субъединицы не принимают участия в связывании лигандов, но определяют различия в чувствительности содержащих их нХР к фармакологическим воздействиям [Grady et al., 2007; Scholze, Huck, 2020; Wu, Lukas, 2011].

Кроме гетеропентамерных нХР, в ЦНС широко представлены гомопентамерные нХР, содержащие  $\alpha 7$ -субъединицу [Albuquerque et al., 2009; Gotti et al., 2009; Millar, Gotti, 2009]. Среди этой большой палитры нейрональных нХР, помимо гомопентамерной композиции и паттернов экспрессии в клетках ЦНС и на периферии,  $\alpha 7$ -нХР обладают рядом характерных особенностей.

## **1.4.2. Особенности нейрональных $\alpha 7$ -нХР**

### **1.4.2.1. $\alpha 7$ -нХР как $\text{Ca}^{2+}$ -вход**

Среди нХР,  $\alpha 7$ -нХР обладают наиболее высокой проводимостью для ионов  $\text{Ca}^{2+}$ , сравниваемой с таковой для NMDA-рецепторов. Эта особенность дает возможность рассматривать этот подтип нХР как отдельный, функционально значимый  $\text{Ca}^{2+}$ -вход у нейронов и других клеток.



Многочисленные исследования  $\alpha 7$ -нХР, как экспрессированных в гетерологических системах, так и присутствующих в нейронах, выявили, что у этих нХР проводимость для ионов  $\text{Ca}^{2+}$  может превышать в 10-20 раз таковую для ионов  $\text{Na}^+$  [Castro, Albuquerque, 1995; Fayuk, Yakel, 2005; Fucile et al., 2003; Seguela et al., 1993], при этом для гетеромерных рецепторов отношение проводимостей для ионов  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{Na}^+$  не превышает 2 [Dani, Bertrand, 2007]. Ионы  $\text{Ca}^{2+}$  не только составляют значительный компонент тока через каналы  $\alpha 7$ -нХР, но и оказывают модулирующее влияние на их работу. При низкой концентрации АХ, поддержание активности  $\alpha 7$ -нХР может потенцироваться внеклеточными ионами  $\text{Ca}^{2+}$ , которые связываются с парой анионных остатков в области лиганд-связывающего кармана субъединиц  $\alpha 7$ -нХР, что увеличивает частоту открываний канала и длительность его открытого состояния [Natarajan et al., 2020]. Такая структурно-функциональная особенность, во-первых, расширяет диапазон концентраций агонистов, при котором низкоаффинные  $\alpha 7$ -нХР способны активироваться и работать, а во-вторых, позволяет  $\alpha 7$ -нХР играть роль своеобразных «детекторов совпадения» определенных внеклеточных концентраций АХ и ионов  $\text{Ca}^{2+}$ . В целом, такое свойство обеспечивает возможность многофакторной регуляции активности  $\alpha 7$ -нХР (и обеспечиваемого ими  $\text{Ca}^{2+}$ -входа) в зависимости от активности как их самих, так и экспрессирующих их клеток и тканей.

Необходимо отметить, что активация  $\alpha 7$ -нХР способна увеличить внутриклеточную концентрацию ионов  $\text{Ca}^{2+}$  не только напрямую, но и опосредованно. Функционируя как лиганд-управляемый катионный канал, пропускающий ионы  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{Na}^+$  при потенциале покоя или гиперполяризации,  $\alpha 7$ -нХР способны деполяризовать нейрональную мембрану, индуцируя последующий вход ионов  $\text{Ca}^{2+}$  через потенциал-зависимые  $\text{Ca}^{2+}$ -каналы, комплиментарно усиливая таким образом внутриклеточный  $\text{Ca}^{2+}$ -сигнал [Barrantes et al., 1995; Rathouz, Berg, 1994]. Кроме того, непосредственный вход ионов  $\text{Ca}^{2+}$  через  $\alpha 7$ -нХР или вышеупомянутая  $\alpha 7$ -нХР-опосредованная

активация потенциал-зависимых  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов способны запускать  $\text{Ca}^{2+}$ -индуцируемый выброс ионов  $\text{Ca}^{2+}$  из ЭР, благодаря  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой активации РнР, усиливая и пролонгируя  $\text{Ca}^{2+}$ -сигнал [Dajas-Bailador et al., 2002; Tsuneki et al., 2000].

Итак, существуют 3 главных пути, благодаря которым  $\alpha 7$ -нХР способны обеспечивать увеличение внутриклеточной концентрации ионов  $\text{Ca}^{2+}$ . Степень вовлеченности каждого из путей и степень их сопряжения между собой в реализации последствий активации  $\alpha 7$ -нХР будет определять пространственно-временные характеристики  $\text{Ca}^{2+}$ -сигнала, делая его ключевым звеном между  $\alpha 7$ -нХР и разными  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимыми участниками сигнальных путей, и обеспечивая их дифференцированное вовлечение в регуляцию нейрональных функций [Shen, Yakel, 2009; Xu et al., 2021].

#### 1.4.2.2. Десенситизация $\alpha 7$ -нХР

Вторая характерная особенность  $\alpha 7$ -нХР – их очень быстрая десенситизация в присутствии высоких концентраций агонистов. Данный процесс проявляется в быстром спаде  $\alpha 7$ -нХР-опосредуемых токов (с постоянной времени в доли мс) [Bouzat et al., 2008; Noviello et al., 2021]. Возврат из десенситизированного состояния зависит от концентрации агониста и времени его действия на  $\alpha 7$ -нХР, и занимает секунды.

Электрофизиологический анализ поведения одиночных каналов  $\alpha 7$ -нХР выявил, что они открываются на короткое время (0.1-0.3 мс) или работают в режиме последовательных коротких серий открываний-закрываний с последующим долгим пребыванием в закрытом состоянии. В совокупности такие данные свидетельствуют об очень низкой вероятности перехода каналов  $\alpha 7$ -нХР в открытое состояние, которое, по-видимому, энергетически нестабильно [Corradi, Bouzat, 2016]. При этом низкие концентрации агонистов способны вызывать продолжительные, но низкоамплитудные токи, обеспечивая более значительный трансмембранный перенос заряда, чем при действии высоких доз агониста, провоцирующих развитие десенситизации  $\alpha 7$ -

нХР [Papke, Porter Papke, 2002]. Короткое время пребывания в открытом состоянии и быстрая десенситизация (в отличие, например, от NMDA-рецепторов) могут служить своеобразным защитным механизмом для клеток, экспрессирующих  $\alpha 7$ -нХР, который препятствует развитию  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимых цитотоксических процессов при мощном воздействии агонистов на эти рецепторы.

#### **1.4.2.3. Специфический фармакологический профиль $\alpha 7$ -нХР**

Для  $\alpha 7$ -нХР характерна бóльшая чувствительность к никотину, чем к АХ, а также способность продукта гидролиза АХ - холина (в микромолярных концентрациях) выступать в качестве селективного полного агониста  $\alpha 7$ -нХР [Alkondon et al., 1997; Corradi, Bouzat, 2016; Papke et al., 1996].

Установлено, что концентрация эндогенного холина в плазме крови достигает 10-50 мкМ, а в цереброспинальной жидкости – 5-7 мкМ. Это значит, что  $\alpha 7$ -нХР в ЦНС и на периферии могут находиться под постоянным тоническим воздействием холина, легко поступающего из среды к рецепторам [Lockman, Allen, 2002; Sweet et al., 2001]. Считается, что даже в низкомолярных концентрациях, эндогенный холин способен, по-видимому, обеспечивать тоническую активацию  $\alpha 7$ -нХР или их предесенситизацию. В гиппокампе холин способен дозозависимым образом индуцировать выброс ГАМК из синапсов, образуемых тормозными интернейронами [Mielke et al., 2011] и, действуя через  $\alpha 7$ -нХР, модулировать определенные паттерны сетевой активности гиппокампа [Fischer et al., 2014].

Селективными антагонистами  $\alpha 7$ -нХР традиционно считаются  $\alpha$ -BgTx, флуоресцентная форма которого преимущественно используется для локализации  $\alpha 7$ -нХР в тканях, и метилликаконитин (MLA) в наномолярных концентрациях [Corradi, Bouzat, 2016].

В настоящее время  $\alpha 7$ -нХР рассматриваются как потенциальные терапевтические мишени в ЦНС как вследствие их способности активироваться эндогенными АХ и холином, а также никотином, так и в связи

с участием именно  $\alpha 7$ -нХР в развитии когнитивных дисфункций разного генеза [Letsinger et al., 2022]. Помимо связывающихся с ортостерическим сайтом агонистов и антагонистов, интенсивно изучаются модуляторы  $\alpha 7$ -нХР, реализующие свои эффекты за счет взаимодействия с аллостерическими сайтами субъединиц  $\alpha 7$ -нХР. Такие вещества могут работать как:

1. позитивные аллостерические модуляторы, потенцирующие пиковые токи только в присутствии агониста, пролонгирующие время пребывания каналов  $\alpha 7$ -нХР в открытом состоянии или реактивирующие десенситизированные рецепторы;
2. аллостерические агонисты, активирующие  $\alpha 7$ -нХР через неортостерические сайты;
3. негативные аллостерические модуляторы, функционирующие как блокаторы поры открытого канала или аллостерические блокаторы активации;
4. «молчащие» аллостерические модуляторы, не влияющие на действие ортостерического агониста, но блокирующие аллостерическую модуляцию.

Многочисленные исследования аллостерических модуляторов  $\alpha 7$ -нХР, проводимые в последнее время, открыли целый спектр ранее неизвестных молекулярных переходных состояний активации, проводимости и десенситизации этих рецепторов [Bouzat et al., 2018; Corradi, Bouzat, 2016; Papke, Horenstein, 2021; Papke, Lindstrom, 2020; Stokes et al., 2022; Yang et al., 2017].

#### **1.4.2.4. Метаботропная активность $\alpha 7$ -нХР**

Изучение функционирования  $\alpha 7$ -нХР и модулирования их активности в нейрональных и других тканях в настоящее время ведёт к пересмотру парадигмы, рассматривающей  $\alpha 7$ -нХР в качестве исключительно лиганд-управляемых ионных каналов [Kabbani et al., 2013; Nordman, Kabbani, 2012].

Оказалось, что при активации  $\alpha 7$ -нХР и переходе этих рецепторов в десенситизированное состояние ( $\text{Ca}^{2+}$ -непроводящее состояние) обеспечивает особый метаботропный статус этих рецепторов, обеспечивающий активацию  $G_q$ -белка и запуск фосфоинозитольного сигнального пути, сопровождающегося выбросом ионов  $\text{Ca}^{2+}$  из депо через  $\text{IP}_3$ -рецепторы с последующим влиянием на  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимые мишени. Это обеспечивает дополнительный вариант  $\alpha 7$ -нХР-опосредуемой  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой регуляции внутриклеточных процессов, которая будет отличаться по пространственно-временным характеристикам от тех вышеописанных сигнальных путей, которые связаны с функционированием  $\alpha 7$ -нХР именно как  $\text{Ca}^{2+}$ -проводящего канала [Kabbani, Nichols, 2018].

Возможность проявления метаботропной активности  $\alpha 7$ -нХР поддерживается данными структурного анализа о наличии G-белок-связывающего кластера в составе внутриклеточной петли между сегментами М3 и М4 субъединиц  $\alpha 7$ -нХР [King et al., 2015].

В настоящее время интенсивно изучаются молекулярные механизмы различных сигнальных путей, регулирующих проявления комплексной ионо/метаботропной активности  $\alpha 7$ -нХР [Chrestia et al., 2021; Papke, Horenstein, 2021; Papke, Lindstrom, 2020; Stokes et al., 2015].

#### **1.4.2.5. $\text{Ca}^{2+}$ -зависимые процессы, индуцируемые $\alpha 7$ -нХР в нейронах**

Как уже упоминалось выше,  $\alpha 7$ -нХР являются одним из наиболее распространенных подтипов нХР в ЦНС. Особенно высокий уровень экспрессии  $\alpha 7$ -нХР выявлен в тех регионах головного мозга, которые вовлечены в осуществлении когнитивных функций и формировании памяти (гиппокамп, кора и некоторые субкортикальные области, относящихся к лимбической системе) [Lendvai et al., 2013; Xu et al., 2021; Yakel, 2013].

В ЦНС, кроме локализации в различных участках нейронов [Picciotto et al., 2012],  $\alpha 7$ -нХР обнаружены в мембранах астроцитов и микроглии, где они принимают участие в опосредованных этими клетками развитии

нейровоспалительных процессов [Gamage et al., 2020; Piovesana et al., 2021], а также в эндотелиальных клетках сосудистого русла мозга, где они, по-видимому, контролируют проницаемость гематоэнцефалического барьера [Xu et al., 2021].

В нейронах  $\alpha 7$ -нХР могут располагаться пресинаптически, постсинаптически и экстра-(или пери-) синаптически [Borroni, Barrantes, 2021; Jones, Wonnacott, 2004; Zoli et al., 2018]. Активация нейрональных  $\alpha 7$ -нХР главным образом индуцирует развитие разнообразных  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимых процессов, приводящих к разным последствиям, в зависимости от локализации рецепторов.

Накоплено значительное число экспериментальных данных, свидетельствующих о том что,  $\alpha 7$ -нХР, выступая в роли пресинаптических ауто- или гетерорецепторов, вовлечены, прямо или опосредованно, в запуск и модулирование синаптической передачи. Так, оказалось, что в возбуждающих синапсах гиппокампа опосредованный пресинаптическими  $\alpha 7$ -нХР вход ионов  $\text{Ca}^{2+}$  в нервные терминалы возбуждающих синапсов усиливает секрецию глутамата напрямую [Gray et al., 1996], или в результате активации  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимых ферментов [Cheng, Yakel, 2015], либо за счет запуска выброса депонированного  $\text{Ca}^{2+}$  [Sharma, Vijayaraghavan, 2003; Zhong et al., 2013].  $\alpha 7$ -нХР способны усиливать работу и тормозных синапсов. В ядрах шва именно этот подтип нХР опосредует усиливающее влияние никотина на ГАМКергическую передачу за счет запуска  $\text{Ca}^{2+}$ -индуцируемого выброса ионов  $\text{Ca}^{2+}$  из пресинаптических депо [Hernández-Vázquez et al., 2014]. Кроме того, секреция нейротрансмиттеров может модулироваться не только за счет  $\alpha 7$ -нХР-опосредуемых изменений пресинаптической концентрации ионов  $\text{Ca}^{2+}$ , но и за счет запуска сигнальных каскадов, например, с участием РКС [Soliakov, Wonnacott, 2001]. Кроме непосредственного модулирующего эффекта на выброс медиатора, пре- и постсинаптические  $\alpha 7$ -нХР принимают участие в модулировании разных форм долговременной синаптической пластичности [Alkadhi, 2021; Koukouli, Maskos, 2015].

### 1.4.3. Пресинаптические $\alpha 7$ -нХР в моторных синапсах

В моторных синапсах присутствие и регуляторная роль нейрональных нХР, и, в частности,  $\alpha 7$ -нХР - изучена гораздо хуже, чем в ЦНС. Более 30 лет назад (с использованием меченого тритием холина в качестве предшественника АХ) была выявлена возможность активации пресинаптических никотиновых и мускариновых ауторецепторов эндогенным АХ при его накоплении в синаптической щели в ходе интенсивной работы нервно-мышечных синапсов. Активация пресинаптических нХР в таких условиях обеспечивала положительную обратную связь, вызывая усиление синаптической передачи [Vizi, Somogyi, 1989]. Учитывая чувствительность данного эффекта к действию d-тубокурарина, в моторных синапсах млекопитающих подразумевалось наличие мышечного типа нХР, способного CaM-опосредуемым образом потенцировать секрецию АХ [Tian et al., 1994]. Однако в настоящее время существование пресинаптических нХР мышечного типа подвергается критике, а возможные пресинаптические эффекты d-тубокурарина относят к проявлению транссинаптического ретроградного влияния гипотетических сигнализаторов, выделяющихся вследствие изменения активации постсинаптических мышечных нХР [Wang et al., 2018].

В настоящее время в моторных синапсах рассматривается существование разных подтипов пресинаптических нейрональных нХР [Бухараева, Скоринкин, 2021]. Ранние эксперименты с использованием широкой палитры антагонистов и агонистов нХР постулировали существование в моторных синапсах нескольких типов пресинаптических нХР, которые, в зависимости от частоты стимуляции терминалей, могут обеспечивать как потенцирование, так и угнетение квантовой секреции АХ в них [Prior, Singh, 2000; Tian et al., 1997]. В частности, на основе фармакологического анализа и регистрации тритиевой метки  $\alpha 3\beta 2$ -нХР рассматриваются как облегчающие секрецию АХ в моторных синапсах [Faria et al., 2003]. Совсем недавно было показано, что рецепторы не  $\alpha 7$ -нХР-типа (содержащие  $\beta 2$ -субъединицу) способны обеспечивать  $Ca^{2+}$ -

зависимым образом не только облегчение, но и торможение квантовой секреции АХ в моторных синапсах мышцы [Zhilyakov et al., 2021].

Данные об участии пресинаптических именно  $\alpha 7$ -нХР в модулировании квантовой секреции АХ в моторных синапсах млекопитающих - скудны и противоречивы. Была продемонстрирована возможность экспрессии  $\alpha 7$ -нХР мотонейронами, иннервирующими мышечные волокна диафрагмы [Dehkordi et al., 2004]. Ранние эксперименты с использованием антагониста  $\alpha 7$ -нХР MLA в условиях низкой – 0.5 Гц (но не высокой – 50 Гц и выше) частоты стимуляции диафрагмальных синапсов крысы выявили возможное  $Ca^{2+}$ -зависимое тормозное влияние со стороны этого типа рецепторов на быструю синхронную секрецию АХ [Tian et al., 1997]. При этом с использованием другого классического антагониста  $\alpha 7$ -нХР -  $\alpha$ -BgTx - было продемонстрировано вероятное участие пресинаптических нХР (без конкретизации подтипа) в торможении секреции АХ в начале высокочастотного ритмического залпа [Domet et al., 1995]. Никотин в концентрации 10 нМ снижал уровень вызванной секреции АХ на фазе плато в режиме коротких высокочастотных залпов активности диафрагмальных синапсов, и этот эффект предотвращался блокатором  $\alpha 7$ -нХР  $\alpha$ -кобротоксином [Balezina et al., 2006]. Однако механизм такого возможного тормозного влияния на секрецию АХ пресинаптических  $\alpha 7$ -нХР остается неизученным. При этом ряд авторов относят локализацию  $\alpha 7$ -нХР в моторных синапсах в район перисинаптических Шванновских клеток. Возможность стимулирования таких  $\alpha 7$ -нХР эндогенными лигандами проявляется лишь в условиях снижения активности АХЭ, когда передача сигнала за счет секреции АХ начинает приобретать объемный характер [Petrov et al., 2014]. При этом такие глиальные  $\alpha 7$ -нХР должны опосредовать выброс из Шванновских клеток сигнальной молекулы, вызывающей торможение секреции АХ за счет действия на пресинаптические рецепторы. В роли такого тормозного агента в настоящее время рассматривают аденозин [Noronha-Matos et al., 2020; Petrov et al., 2021].



Таким образом, в отличие от хорошо изученной активности пре- и постсинаптических  $\alpha 7$ -нХР в ЦНС, функционирование  $\alpha 7$ -нХР в моторных синапсах как дополнительного пресинаптического  $\text{Ca}^{2+}$ -входа, условия его возможного подключения к регуляции квантовой секреции АХ, характер  $\alpha 7$ -нХР-опосредуемых эффектов на нервно-мышечную передачу, а также сигнальные механизмы, лежащие в основе таких эффектов – вопросы, остающиеся открытыми и нуждающиеся в дальнейшем экспериментальном исследовании.

### **1.5. $\text{Ca}^{2+}$ -зависимые механизмы регуляции квантовой секреции АХ при ритмической активности синапсов**

В заключение обзора литературы, посвященного роли разных источников ионизированного  $\text{Ca}^{2+}$  в квантовой секреции нейротрансмиттеров, хотелось бы отдельно отметить, как сегодня выглядят представления о  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимых механизмах, регулирующих кратковременную ритмическую активность синапсов.

Как известно, первоначально механизмы  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой секреции нейротрансмиттера были изучены на одиночных нервно-мышечных синапсах лягушки при анализе постсинаптических ответов в результате спонтанной и одиночной вызванной секреции определенных «порций» АХ. В середине XX века была сформулирована квантово-везикулярная теория высвобождения нейротрансмиттера, остающаяся доминирующей для объяснения работы химических синапсов и по сей день [del Castillo, Katz, 1954; Fatt, Katz, 1951]. Она гласит, что секреция нейротрансмиттера есть зависимый от ионизированного  $\text{Ca}^{2+}$  процесс выброса его отдельных порций (квантов) в результате экзоцитоза синаптических везикул. Для расчета числа быстро и синхронно высвобождаемых квантов нейротрансмиттера в ответ на деполяризацию, создаваемую пресинаптическим ПД, была предложена формула  $m = p \times n$ , где  $m$  – квантовый состав, обуславливающий (вместе с размером кванта -  $q$ ) амплитуду одиночного постсинаптического потенциала

или тока, в ответ на пресинаптический ПД;  $p$  – зависящая от динамики внутриклеточной концентрации ионов  $Ca^{2+}$  около синаптических везикул вероятность выброса из  $n$  - числа мест, откуда могут выбрасываться кванты медиатора. Впоследствии  $n$  стали обозначать размер пула полностью готовых к выбросу синаптических везикул (RRP) [Cano et al., 2012, 2013].

Проведенный анализ изменений квантовой секреции АХ при ритмической высокочастотной стимуляции моторных синапсов у разных животных, в том числе – в нервно-мышечных синапсах мыши - выявил характерные изменения квантового состава ПКП, происходящие в ряду сигналов, разделенных определенными временными интервалами. В этих синапсах был описан характерный для них рисунок залповой активности, когда последовательно проявляется:

1. Облегчение (фасилитация) - начальный кратковременный прирост квантового состава ПКП;
2. Депрессия - кратковременное снижение квантового состава ПКП;
3. Плато - стабилизация квантового состава ПКП в залпе на постоянном, но сниженном по сравнению с первым ПКП уровне.

Эти закономерные изменения квантового состава ПКП по ходу ритмических залпов, продолжительность которых составляет от десятков до тысяч миллисекунд, получили названия кратковременной синаптической пластичности, и были вскоре описаны и в синапсах ЦНС [Blitz et al., 2004; Regehr, 2012; Zucker, Regehr, 2002]. Исследования проявления кратковременной синаптической пластичности в ЦНС показали, что проявления облегчения, депрессии и стабилизации амплитуд постсинаптических потенциалов могут быть по-разному выражены в разных типах синапсов. В любом случае, в настоящее время установлено, что феномен кратковременной синаптической пластичности - важная общая закономерность краткосрочной ритмической активности синапсов, имеющая преимущественно пресинаптическую и  $Ca^{2+}$ -зависимую природу [Kaeser, Regehr, 2017; Katz, Miledi, 1968; Zucker, Regehr, 2002]. В случае нервно-

мышечных синапсов уже в ранних работах было показано, что облегчение – процесс зависящий от межимпульсного интервала в ходе ритмической активности и накопления остаточного  $\text{Ca}^{2+}$  вблизи мест входа этих ионов по  $\text{Ca}^{2+}$ -каналам [Katz, Miledi, 1968].

Под остаточным  $\text{Ca}^{2+}$  понимают ионизированный  $\text{Ca}^{2+}$  (в повышенной по сравнению с покоем концентрации), остающийся вблизи синаптических везикул в активных зонах, вслед за его поступлением в нервную терминаль по  $\text{Ca}^{2+}$ -каналам P/Q- или N-типов (локальный  $\text{Ca}^{2+}$ , формирующий  $\text{Ca}^{2+}$ -нано- или микродомены). Остаточный  $\text{Ca}^{2+}$  не успевает полностью диффундировать или связаться с  $\text{Ca}^{2+}$ -буферами из активных зон к моменту прихода следующего пресинаптического ПД и возникновения индуцируемого им следующего локального  $\text{Ca}^{2+}$ -сигнала. При этом первоначально предполагалось, что накопление остаточного  $\text{Ca}^{2+}$  увеличивает вероятность выброса ( $p$ ), то есть вероятность экзоцитоза везикул, входящих в RRP, облегчая насыщение ионами  $\text{Ca}^{2+}$  везикулярного (низкоаффинного и быстрого)  $\text{Ca}^{2+}$ -сенсора - синаптоагмина 1 или 2 [Regehr, 2012; Zucker, Regehr, 2002]. В дальнейшем было предложено много других объяснений развития облегчения синаптической передачи, основанных на существовании остаточного  $\text{Ca}^{2+}$ : насыщение эндогенных  $\text{Ca}^{2+}$ -буферов во время развития локального  $\text{Ca}^{2+}$ -сигнала при первом ПД и увеличение за счет остаточного  $\text{Ca}^{2+}$  локального, возникающего при следующем ПД; соучастие в экзоцитозе синаптических везикул наряду с везикулярным синаптоагмином дополнительного (высокоаффинного и медленного)  $\text{Ca}^{2+}$ -сенсора - синаптоагмина 7; и за счет CDF потенциал-зависимых  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов [Jackman, Regehr, 2017].

В последние годы обсуждается и еще один вариант, когда облегчение синаптической передачи может быть следствием возрастания не вероятности выброса квантов нейротрансмиттера ( $p$ ), а  $n$  - вследствие быстрого приращения размера RRP уже к приходу второго пресинаптического ПД в залпе за счет активации остаточным  $\text{Ca}^{2+}$  особого пула предокированных

синаптических везикул, переходящих при этом в полностью докированное состояние и включающихся в RRP [Kaeser, Regehr, 2017; Tran et al., 2022].

Таким образом, до сих пор и конечные мишени, и источники самого остаточного  $Ca^{2+}$  или другого  $Ca^{2+}$ -сигнала, возникающего вблизи активной зоны при генерации ПД), обуславливающие облегчение, остаются до конца не выясненными.

Наряду с облегчением, процесс депрессии синаптической передачи (степень и скорость уменьшения квантового состава ПКП в залпе), протекающий независимо и параллельно с облегчением, также оказался зависимым и от частоты ритмической активности, и от вероятности выброса, и от интенсивности генерируемых в терминали  $Ca^{2+}$ -сигналов. Депрессия, как и облегчение, может быть обусловлена несколькими процессами, например временной инактивацией мест экзоцитоза (экзоцитоз одной синаптической везикулы ингибирует слияние другой в этом месте активной зоны на несколько секунд), или инактивацией (благодаря разным механизмам) пресинаптических потенциал-зависимых  $Ca^{2+}$ -каналов. Однако доминирующей причиной депрессии синаптической передачи считается процесс истощения RRP - за счет быстрого последовательного  $Ca^{2+}$ -зависимого экзоцитоза синаптических везикул из RRP, который не успевает полноценно пополняться новыми везикулами [Kaeser, Regehr, 2017; Zucker, Regehr, 2002]. При этом выраженность синаптической депрессии может контролироваться также за счет множественных петель отрицательной обратной связи, запускаемых при активации пресинаптических метаботропных рецепторов, притормаживающих квантовую секрецию нейротрансмиттеров. Это способствует лимитированию расхода RRP при продолжающейся интенсивной активности синапса [Kaeser, Regehr, 2017; Zucker, Regehr, 2002].

Фаза плато отражает достижение баланса между развивающимся процессом истощения RRP (в ходе продолжающегося экзоцитоза готовых к выбросу синаптических везикул) и усиливающегося по мере ритмической

активности  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимого восполнения RRP [Cano et al., 2012; Dittman, Ryan, 2019; Ruiz et al., 2011].

Если процесс неизбежного расходования RRP и уменьшения его размера (снижения  $n$ ) во время синаптической депрессии выглядит очевидным, то вопрос об источниках и скорости пополнения расходуемого RRP в ходе ритмической активности - остается в настоящее время нерешенным. Считается, что процесс рекрутирования синаптических везикул в истощающийся RRP, как правило, процесс более медленный, чем расходование RRP во время залповой активности синапсов. Поэтому именно механизмы и скорость рекрутирования везикул в RRP в первую очередь определяют характер кратковременной синаптической пластичности в ходе ритмической активности [Kaeser, Regehr, 2017; Lipstein et al., 2021].

Существуют многочисленные гипотезы относительно способов пополнения расходуемого RRP и увеличения его размеров. Допускается, что пополнение RRP может происходить или за счет ультрабыстрого эндоцитоза (снабжающего RRP новообразующимися везикулами), или благодаря переходу режима экзоцитоза синаптических везикул в составе RRP от полного слияния к kiss-and-run. Последний позволяет экономить расход нейротрансмиттера и удерживать его секрецию на сниженном, но относительно постоянном уровне [Chanaday et al., 2019; Ge et al., 2022; Petrov et al., 2022]. Недавно в синапсах ЦНС выявлен вклад  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимого связывания фосфолипидов пресинаптической мембраны белком активных зон Munc13-1, которое определяет скорость и интенсивность восполнения RRP [Lipstein et al., 2021]. Мобилизация везикул из пространственно отставленного резервного пула считается довольно медленным процессом, который может занимать десятки секунд, и обеспечивать пополнение RRP лишь при достаточно продолжительной активности синапсов.

Таким образом, в настоящее время вопрос об относительном вкладе двух параметров -  $r$  и RRP ( $n$ ) - в изменениях рисунка залповой активности, их зависимость от частоты и продолжительности стимуляции синапса,

пресинаптических  $\text{Ca}^{2+}$ -сигналов - нуждается в дальнейших прояснениях. Очевидно, что ответ на этот вопрос требует ясного понимания структуры RRP, детализации процессов докинга и прайминга синаптических везикул и их рециклизации, что будет обеспечивать пополнение RRP, а также выявления роли разных источников ионов  $\text{Ca}^{2+}$ , участвующих в регуляции кратковременной пластичности.

В настоящее время очевидно, что функционирование RRP в рахных синапсах может зависеть от размеров нервной терминали, взаиморасположения там активных зон, и от характера синаптической активности [Kaeser, Regehr, 2017; Kim et al., 2020; Lin et al., 2022] В моторном синапсе мыши насчитывается порядка 900 активных зон, в которых функционирует большой по размерам динамически изменяющийся RRP, содержащий максимум до 1700 синаптических везикул [Cano et al., 2013]. Возможное устройство RRP, его вероятная структурная и функциональная гетерогенность, а также роль ионов  $\text{Ca}^{2+}$  в такой гетерогенности в настоящее время интенсивно обсуждается [Kaeser, Regehr, 2017; Tran et al., 2022]. Рассматривается возможность существования в составе RRP как сильно, так и слабо докированных везикул. Последние могут быстро, обратимо и  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимым образом переходить в сильно докированное состояние, становясь (после прайминга) полностью готовыми к экзоцитозу [Silva et al., 2021].

Таким образом, хотя процессы кратковременной синаптической пластичности, проявляющиеся в моторных синапсах в виде облегчения, депрессии и фазы плато в залпе ПКП, были экспериментально выявлены почти сразу после открытия синаптической передачи в нервно-мышечных синапсах, прояснение их молекулярных механизмов, нюансов их  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимости остается до сих пор нерешенной и актуальной проблемой. Это отличает кратковременную синаптическую пластичность от долговременной, которая была открыта позднее в различных синапсах ЦНС, но чьи  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимые постсинаптические механизмы значительно полнее изучены. В случае же кратковременной пластичности синаптической передачи, имеющей

пресинаптическую  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимую природу, до сих пор остается не ясным, изменение каких именно параметров -  $r$  или RRP - в какой последовательности и степени определяет изменения величин квантового состава ПКП при облегчении, депрессии и плато в ходе короткого ритмического залпа, и какие пресинаптические источники ионов  $\text{Ca}^{2+}$  в этом могут участвовать и как.

В заключении отметим, что, наряду с использованием целого ряда новых методов, включая измерение флуоресценции везикулярных мембран или белков в зависимости от стадии везикулярного цикла, оптическое отслеживание везикул в нервных окончаниях, моделирование перестроек везикулярных пулов, одним из главных и информативных методов анализа физиологически значимого RRP остается электрофизиологический микроэлектродный метод регистрации многоквантовых ПКП и анализ изменений их амплитуд и квантового состава в ходе ритмической активности. Это позволяет непосредственно рассчитать изменения RRP [Kaeser, Regehr, 2017; Regehr, 2012; Ruiz et al., 2011]. Сопряжение анализа ультраструктуры, молекулярных механизмов и электрофизиологических данных при разных режимах работы синапсов - остается сложной и актуальной задачей современной синаптической физиологии.

Учитывая вышесказанное о современном состоянии проблемы кратковременной синаптической пластичности, дефиците сведений о вкладе разных пресинаптических  $\text{Ca}^{2+}$ -входов в этот процесс, в нашей работе была поставлена задача анализа механизмов  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимых изменений вызванного выброса АХ в коротких ритмических высокочастотных залпах ПКП в нервно-мышечных синапсах диафрагмы мышей методами электрофизиологии. При этом использовали последовательную модель [Ruiz et al., 2011], позволяющую рассчитывать параметры RRP и  $r$  в ритмическом залпе ПКП и оценивать их сравнительный вклад в изменения  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой секреции квантов АХ, причем при срабатывании разных  $\text{Ca}^{2+}$ - входов в нервных терминалях моторных синапсов диафрагмы мыши.

## 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 2.1. Животные

В экспериментах были использованы мыши обоих полов в возрасте 5-8 недель и весом 25-30 г линий BALB/C (из лаборатории экспериментальных животных Биологического факультета МГУ или питомника Учебно-научного центра по реабилитации диких животных Биологического факультета МГУ), 129/Sv (из лаборатории нейробиологии ФГБНУ "НИИ нормальной физиологии им. П.К.Анохина") и C57Bl/6 (из питомника лабораторных животных «Пушино»). Содержание животных и экспериментальные процедуры осуществлялось в соответствии с директивой 86/609/ЕЕС по обращению человека с лабораторными животными. Мыши содержались по несколько штук (с учетом половой принадлежности) в клетках с обогащенными условиями среды обитания при 12-часовом цикле свет/темнота чередования освещенности, корм и вода предоставлялись *ad libitum*.

### 2.2. Экспериментальная модель зрелых нервно-мышечных синапсов

Эксперименты проводили на изолированных нервно-мышечных препаратах диафрагмальной мышцы (*m. diaphragma - n. phrenicus*).

Мыши умерщвлялись посредством быстрого обезглавливания. Декапитированное животное помещали на препаровальном столике вентральной стороной вверх, аккуратно вскрывали брюшную и грудную полости. После этого отпрепаровывали веточку диафрагмального нерва (*n. phrenicus*). Далее делали разрез по дуге ниже уровня прикрепления диафрагмы, потом производили следующий разрез выше уровня прикрепления диафрагмы (вместе с ребром). Затем отрезали левую половину диафрагмы по средней линии.

### 2.3. Электрофизиология

Все эксперименты проводились при температуре 20-22°C. Необходимо отметить, что для регистрации спонтанного и вызванного выброса АХ (при разной частоте и длительности стимуляции) в нервно-мышечных синапсах



млекопитающих обычно используются именно условия такой «комнатной» температуры [Garcia et al., 2013; Guarracino et al., 2016]. Некоторые авторы четко заявляют, что они проводили эксперименты при комнатной температуре, «чтобы свести к минимуму электрические помехи и повысить биологическую жизнеспособность изолированного нервно-мышечного препарата, совместимую с длительными экспериментальными протоколами» [Pousinha et al., 2010].

Изолированный нервно-мышечный препарат левой половины диафрагмы с диафрагмальным нервом располагали в экспериментальной камере объемом 3 мл, растягивали с помощью энтомологических булавок на прозрачной полимерной подложке (Sylgard® 184) и перфузировали оксигенированным с помощью карбогена (95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>) физиологическим раствором Лайли (pH 7.2-7.4). Раствор Лайли содержит в mM: NaCl – 135, KCl – 4, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 0.9, CaCl<sub>2</sub> – 2, MgCl<sub>2</sub> – 1, NaHCO<sub>3</sub> – 16.3, глюкоза – 11.

Внутриклеточную регистрацию спонтанных миниатюрных потенциалов концевой пластинки (МПКП) и вызванных стимуляцией нерва мультиквантовых потенциалов концевой пластинки (ПКП) осуществляли с помощью стеклянных микроэлектродов, заполненных 2.5 М KCl (сопротивление кончиков микроэлектродов составляло 10–25 МΩ). Сигналы регистрировали при помощи усилителей Axoclamp 2B, Axoclamp 900A (Axon Instruments/Molecular Devices, США) или Neuroprobe Amplifier Model 1600 (A-M Systems, США) в режиме I-Clamp с использованием встроенного фильтра (3 кГц) и записывали их с помощью 12-разрядного аналого-цифрового преобразователя E-154 (L-Card, Россия) с интерфейсом PowerGraph 6.0 или с помощью 16-разрядного аналого-цифрового преобразователя Digidata-1440A (Molecular Devices, США) с интерфейсом Clampex 10 (пакет pCLAMP 10) на жесткий диск компьютера для последующего анализа. В ходе экспериментов регулярно проводилась балансировка моста (для компенсации электродного потенциала) и нейтрализация емкости микроэлектродов.

Критериями удачного введения микроэлектрода в зону концевой пластинки под визуальным контролем (стереомикроскоп Carl Zeiss Stemi 2000 или микроскоп Olympus BX51 с объективом PLN10X/0.25) служил стабильный мембранный потенциал (МП) и время нарастания МПКП (на участке 10-90 % амплитуды МПКП) < 1 мс. При снижении МП от исходного более чем на 5 мВ или времени нарастания МПКП > 1 мс в ходе регистрации - сигналы от данного синапса не включались в выборку для дальнейшего анализа.

В контроле регистрировали МПКП и/или ПКП от 5 и более разных синапсов, после чего в перфузионный раствор в определенном порядке добавляли исследуемые вещества, и далее регистрировали активность разных синапсов на протяжении необходимого времени. В каждой серии экспериментов использовали не менее 3 нервно-мышечных препаратов.

### **2.3.1. Регистрация спонтанной активности моторных синапсов**

При исследовании только спонтанной активности моторных синапсов мыши использовали интактные (нерассеченные) нервно-мышечные препараты. Спонтанную секрецию квантов АХ в виде МПКП регистрировали в течение 120-180 с.

### **2.3.2. Рассеченный нервно-мышечный препарат диафрагмы мыши**

При регистрации вызванной активности моторных синапсов предварительно проводили процедуру поперечного рассечения мышечных волокон, около ребер и около сухожилия, используя стандартный протокол, адаптированный для мышей [Flink, Atchison, 2003].

Для устранения мышечного сокращения (иммобилизации мышцы) в результате быстрого синхронного многоквантового выброса АХ при вызванной активности моторных синапсов, кроме рассечения мышечных волокон, используют следующие воздействия:

- Низкий  $\text{Ca}^{2+}$ /высокий  $\text{Mg}^{2+}$  - снижение внеклеточной концентрации ионов  $\text{Ca}^{2+}$  вместе с увеличением внеклеточной концентрации ионов  $\text{Mg}^{2+}$ , что

драматически снижает квантовый состав вызванной секреции АХ [Khuzakhmetova et al., 2014];

- Кураризация – частичное блокирование мышечных нХР d-тубокурарином в субмаксимальной концентрации (~1.5-2 мкМ), редуцирующее амплитуду постсинаптических потенциалов [González Sanabria et al., 2022; Guarracino et al., 2016];
- Блокирование мышечных потенциал-зависимых Na<sup>+</sup>-каналов (Na<sub>v</sub>1.4) μ-конотоксинами [Hong, Chang, 1995; Petrov et al., 2022].

Использованный в данной работе для изучения нервно-мышечной передачи протокол рассечения мышечных волокон применяется достаточно широко, и является адекватной альтернативой использованию μ-конотоксинов, особенно при изучении пресинаптических механизмов регуляции нервно-мышечной передачи. После рассечения изменения электрофизиологических свойств мышечных волокон - невелики (снижается входное сопротивление мышечных волокон), при этом потенциал реверсии, временные характеристики и квантовый состав постсинаптических потенциалов и токов, частота МПКП - практически не отличаются от таковых у зарегистрированных на интактных или обработанных μ-конотоксинами мышечных волокнах, немного снижается только амплитуда постсинаптических потенциалов [Glavinović, 1979; Santafé et al., 2009].

До начала регистрации синаптических ответов, сразу после поперечного рассечения мышечных волокон, нервно-мышечный препарат промывали значительным объемом раствора Лайли (более 150 мл) не менее 1 часа для предотвращения блокады проведения потенциала действия. В результате значение мембранного потенциала мышечных волокон устанавливалось на стабильно более низком уровне (< -50 мВ) по сравнению с нерассеченными волокнами, в итоге обеспечивая инактивацию мышечных потенциал-зависимых Na<sup>+</sup>-каналов и иммобилизуя, таким образом, диафрагму.

### **2.3.3. Регистрация одиночной вызванной синаптической активности моторных синапсов**

Одиночные ПКП регистрировали при раздражении диафрагмального нерва сверхпороговыми импульсами длительностью 0.08–0.1 мс с частотой 0.3 Гц (не менее 20-30 стимулов). При этом одновременно регистрировались МПКП, средняя амплитуда которых использовалась при расчете квантового состава ПКП.

### **2.3.4. Регистрация кратковременной ритмической синаптической активности моторных синапсов**

Кратковременную ритмическую активность моторных синапсов диафрагмы исследовали при стимуляции диафрагмального нерва короткими залпами сверхпороговых импульсов (50 стимулов с частотой 50 Гц).

При выборе режима высокочастотной стимуляции нерва исходили из данных литературы о паттерне разрядки дыхательных мотонейронов *in vivo*, который сопровождается характерными изменениями амплитуды и квантового состава ПКП по ходу залпа [Slater, 2015]. В ходе эксперимента между стимуляциями делали перерывы не менее 4-5 минут во избежание развития утомления синапса и уменьшения амплитуды и квантового состава ПКП, не связанного с действием исследуемых веществ. В каждом синапсе непосредственно перед стимуляцией нерва регистрировали МПКП в течение 60-100 с. Среднее значение амплитуд этих МПКП использовали для вычисления квантового состава ПКП в данном синапсе.

### **2.3.5. Регистрация длительной тетанической синаптической активности моторных синапсов**

В ходе этих экспериментов проводилась стимуляция диафрагмального нерва сверхпороговыми импульсами с частотой 50 Гц в течение 40 секунд (2000 стимулов), в этом случае перерывы между стимуляциями составляли не менее 10 минут для препятствия развития утомления синапса и уменьшения амплитуды и квантового состава ПКП, не связанного с действием

исследуемых веществ. Контролировали отсутствие значительного снижения МП по ходу и после окончания стимуляции нерва. До и после стимуляции нерва в каждом синапсе регистрировали МПКП в течение 1 минуты для оценки возможных проявлений развития десенситизации мышечных нХР.

### **2.3.6. Определение входного сопротивления мышечных волокон**

В район концевой пластинки мышечных волокон интактных нервно-мышечных препаратов под визуальным контролем вводили 2 микроэлектрода. Через один микроэлектрод инъецировали гиперполяризующие импульсы тока длительностью 100 мс и амплитудой 30 нА, с помощью второго микроэлектрода при этом регистрировали гиперполяризующие сдвиги МП. Значение входного сопротивления мышечных волокон вычисляли, используя закон Ома.

### **2.3.7. Загрузка $\text{Ca}^{2+}$ -буферов**

Использовали два мембранопроницаемых  $\text{Ca}^{2+}$ -буфера со сравнимой аффинностью, но с разной (быстрой и медленной) кинетикой связывания ионов  $\text{Ca}^{2+}$  [Eggermann et al., 2012]. В качестве быстрого мембранопроницаемого  $\text{Ca}^{2+}$ -буфера использовали тетраацетоксиметилловый эфир 1,2-бис (2-аминофенокси) этан-N,N,N',N'-тетрауксусной кислоты (ВАРТА-АМ), в качестве медленного - тетраацетоксиметилловый эфир этиленгликоль-бис ( $\beta$ -аминоэтил) -N,N,N',N'-тетрауксусной кислоты (ЕГТА-АМ).

Загрузка нервных терминалей мембранопроницаемыми  $\text{Ca}^{2+}$ -буферами осуществлялась по следующему протоколу. После регистрации синаптической активности в контроле нервно-мышечные препараты инкубировали в течение 60 минут в бескальциевом растворе, содержавшем 50 мкМ ВАРТА-АМ или 50 мкМ ЕГТА-АМ. Состав бескальциевого раствора был следующим (мМ): NaCl – 135, KCl – 4,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  – 0.9,  $\text{MgCl}_2$  – 3.2,  $\text{NaHCO}_3$  – 16.3, глюкоза – 11. Далее в течение 15 минут проводили отмывку нервно-мышечных препаратов в бескальциевом растворе, не содержащем  $\text{Ca}^{2+}$ -

буферов. Затем омывающий раствор заменяли на раствор Лайли с нормальной концентрацией ионов  $\text{Ca}^{2+}$  (2 мМ) и им отмывали нервно-мышечные препараты в течение еще 15 минут, после чего начинали регистрацию активности нервно-мышечных синапсов.

Оба  $\text{Ca}^{2+}$ -буфера использовались в одинаковой концентрации (50 мкМ), поскольку сравнительный анализ влияния эквимольных концентраций медленного и быстрого  $\text{Ca}^{2+}$ -буферов на секрецию медиатора позволяет оценить расстояние от  $\text{Ca}^{2+}$ -входа до его мишеней ( $\text{Ca}^{2+}$ -сенсоров) и динамику обеспечиваемого  $\text{Ca}^{2+}$ -входом  $\text{Ca}^{2+}$ -сигнала [Eggermann et al., 2012].

## **2.4. Анализ данных**

Первичный анализ регистрируемых сигналов осуществляли в программе MiniAnalysis (Synaptosoft, США) вручную, без использования встроенных программных фильтров и автоматического анализа данных.

Оценивали мембранный потенциал (МП) мышечных волокон, амплитуду и временной ход МПКП и ПКП, среднюю частоту МПКП.

Проводили стандартизацию амплитуд МПКП и ПКП к мембранному потенциалу -50 мВ (для нивелирования изменения движущей силы сдвига потенциала при изменениях МП) в случае регистрации на рассеченных нервно-мышечных препаратах и к -70 – -80 мВ при исследовании только спонтанной активности синапсов (МПКП) на интактных нервно-мышечных препаратах.

### **2.4.1. Расчет квантовых параметров секреции АХ**

Квантовый состав ПКП, зарегистрированных в режиме одиночной стимуляции нерва (0.3 Гц), короткой высокочастотной стимуляции (50 Гц, 1 с) или длительной высокочастотной стимуляции (50 Гц, 40 с), рассчитывали как отношение стандартизованной и скорректированной на нелинейную суммацию амплитуды ПКП к средней стандартизованной амплитуде МПКП. Коррекция на нелинейную суммацию (то есть вычисление, какова была бы амплитуда

ПКП, если бы входящие в его состав кванты АХ суммировались линейно при генерации ПКП) проводилась по следующей формуле:

$$A = V / (1 - (f \cdot V/E)),$$

где А — скорректированная амплитуда ПКП, V — зарегистрированная амплитуда ПКП, E — разница между зарегистрированным МП и потенциалом реверсии (его принимали равным 0 мВ), а f - фактор, зависящий от характеристик мышечного волокна (длины, диаметра и удельного мембранного и саркоплазматического сопротивления), равный для синапсов диафрагмы мыши 0.8 [Flink, Atchison, 2003; McLachlan, Martin, 1981].

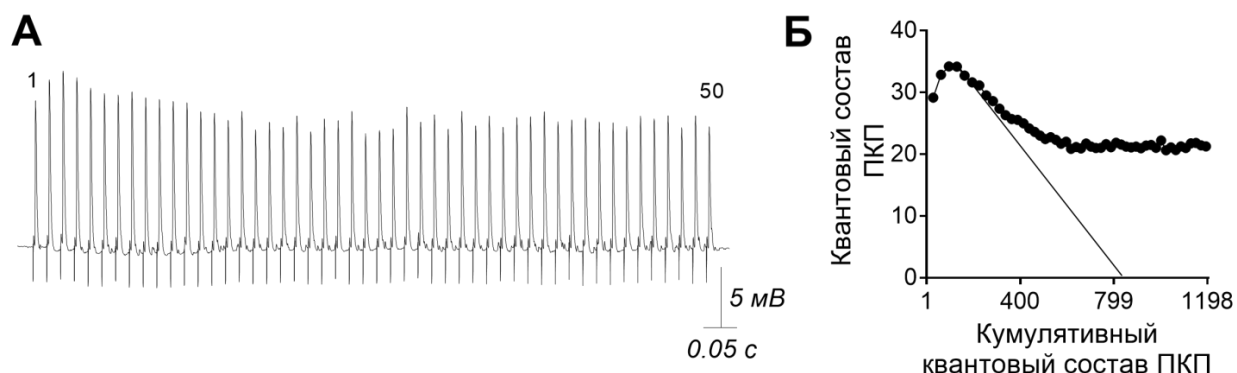
Размер пула готовых к выбросу везикул (RRP) оценивали, используя последовательную модель. Данная модель предполагает, что:

- 1) снижение квантового состава ПКП в начале ритмического залпа ПКП (депрессия) отражает непрерывное истощение RRP при высокочастотной ритмической активности моторных синапсов [Ruiz et al., 2011; Thanawala, Regehr, 2016].
- 2) возникновение фазы относительно стабильного уровня амплитуды и квантового состава ПКП (плато) в конце короткого залпа ПКП обеспечивается за счет компенсации истощения RRP рекрутированием в него синаптических везикул [Ruiz et al., 2011].
- 3) RRP – динамическая величина, размер которой зависит от частоты стимуляции синапса и характера возникающих в нем Ca<sup>2+</sup>-сигналов [Cano et al., 2012].

На начальном этапе депрессии синаптической передачи (6-10 ПКП), используя линейную регрессию, проводили пересечение с осью X (кумулятивный квантовый состав в коротком залпе ПКП). Точка пересечения линии регрессии с осью X отражала величину RRP в данном залпе (рис.1).

Первый и несколько последующих ПКП в самом начале залпа, где имеет место начальное облегчение синаптической передачи, не учитывались при расчете размера RRP. Вероятность выброса квантов АХ (p) рассчитывали как

отношение квантового состава первого ПКП в залпе к значению RRP [Ruiz et al., 2011].



**Рис. 1.** (А) Пример оригинальных записей ПКП в коротком высокочастотном залпе (50 Гц, 1 с). (Б) График квантового состава ПКП по ходу залпа в зависимости от кумулятивного квантового состава ПКП. Пересечение с осью X, экстраполированное из начальной фазы депрессии, отражает размер RRP.

В работе не использовали традиционный метод парной стимуляции для расчета возможных изменений вероятности выброса квантов АХ. Этот метод предполагает изменение амплитуды и квантового состава ПКП за счет изменения входа ионов  $\text{Ca}^{2+}$  по триггерным  $\text{Ca}^{2+}$ -каналам P/Q-типа, и, следовательно, предусматривает влияние входящего  $\text{Ca}^{2+}$  на один и тот же исходный RRP синаптических везикул, у которых (по умолчанию, за счет входящего  $\text{Ca}^{2+}$ ) может изменяться вероятность их выброса  $p$ .

## 2.5. Статистическая обработка результатов

Использовали программное обеспечение GraphPad Prism 6.0-7.0 (GraphPad Software, США). Нормальность распределения значений параметров оценивали с помощью теста Д'Агостино-Пирсона. Для оценки таких параметров как МП, амплитуда и частота МПКП, показателей временного хода постсинаптических потенциалов в случае нормально распределенных величин применяли t-критерий Стьюдента или, при сравнении больше двух групп, однофакторный дисперсионный анализ с апостериорным тестом Холм-Сидака. В случае распределения,



отличающегося от нормального в одной из выборок, использовали критерий Манна-Уитни или критерий Краскелла-Уоллеса с апостериорным тестом Данна. Критерий Колмогорова-Смирнова применяли при оценивании кумулятивной вероятности распределения амплитуд МПКП. Для анализа изменений амплитуды и квантового состава ПКП применяли двухфакторный дисперсионный анализ с последующим применением апостериорного критерия Бонферрони.

Данные представлены в работе в виде средних значений исследуемых параметров  $\pm$  стандартная ошибка среднего (за исключением кумулятивных вероятностей распределения амплитуд одноквантовых МПКП). Уровень значимости различий между выборками составлял 0.05 ( $n$  – количество исследованных синапсов).

### 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

#### 3.1. Роль $\text{Ca}^{2+}$ -входа по $\text{Ca}^{2+}$ -каналам L-типа в регуляции квантовой секреции АХ в моторных синапсах

Потенциал-зависимые  $\text{Ca}^{2+}$ -каналы L-типа обнаружены в составе функционально зрелых нервных терминалей моторных синапсов сравнительно недавно [Urbano, Uchitel, 1999]. Результаты иммуногистохимического анализа свидетельствуют о наличии в моторных синапсах млекопитающих как  $\text{Ca}_v1.2$ -, так и  $\text{Ca}_v1.3$ -изоформ этих каналов [Хузахметова и др., 2016; Paganì et al., 2004]. Доминирует точка зрения, что при обычных режимах вызванной активности моторных синапсов этот  $\text{Ca}^{2+}$ -вход находится в неактивном (заторможенном) состоянии [Giovannini et al., 2002]. Однако в случае растормаживания активности  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов L-типа (для этого применяют специальные процедуры и воздействия) и входа ионов  $\text{Ca}^{2+}$  по ним в моторные терминали, наблюдается прирост квантового состава одиночных ПКП в нервно-мышечных синапсах мыши [Atchison, O'Leary, 1987; Urbano et al., 2001]. При этом остаются неизвестными механизмы облегчения квантовой секреции АХ при подключении этого  $\text{Ca}^{2+}$ -входа по сравнению с действием хорошо известного основного триггерного входа  $\text{Ca}^{2+}$  по P/Q-типу  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов, запускающего конечный акт экзоцитоза готовых к выбросу синаптических везикул в моторных синапсах. Кроме того, остается не изученным важный вопрос, будет ли меняться, и каким образом, паттерн вызванной секреции квантов АХ, отражающийся в виде формы залпа ПКП при ритмической активности синапсов в случае подключения пресинаптических  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов L-типа в работу моторных синапсов мыши? В связи с этим, были подробно исследованы особенности торможения и последствия активации  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов L-типа при ритмической залповой активности моторных синапсов, выявлены неизвестные ранее регуляторные контуры, управляющие этими  $\text{Ca}^{2+}$ -каналами, и сделана попытка осмыслить функциональную роль этого  $\text{Ca}^{2+}$ -входа в моторных синапсах мыши.

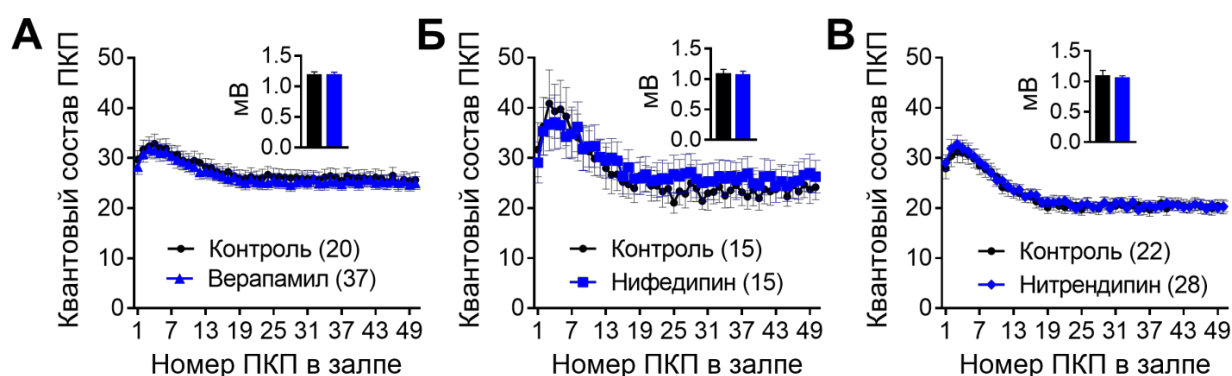
### 3.1.1. Блокирование $\text{Ca}^{2+}$ -каналов L-типа и его последствия при ритмической активности моторных синапсов

В предварительной серии экспериментов была проведена проверка того, действуют ли специфические блокаторы  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов L-типа на секреторную активность нервных терминалей моторных синапсов диафрагмы мыши.

Блокирование  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов L-типа с помощью:

- верапамила (5 мкМ),
- нифедипина (10 мкМ)
- или нитрендипина (1 или 10 мкМ)

не приводило к достоверным изменениям амплитуды и квантового состава ПКП в условиях одиночной стимуляции нерва (0.3 Гц), а также в условиях залпов ПКП по всему ходу короткого (1 с) высокочастотного (50 Гц) залпа ПКП (рис. 2).



**Рис. 2.** Изменение квантового состава ПКП по ходу короткого высокочастотного залпа в контроле и под действием блокаторов  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов L-типа: верапамила (5 мкМ) (А); нифедипина (10 мкМ) (Б) и нитрендипина (10 мкМ). На врезках – амплитуда МПКП. В скобках – количество синапсов в соответствующих группах.

Из этого следует, что действительно, видимо  $\text{Ca}^{2+}$ -каналы L-типа, чувствительные к действию соответствующих блокаторов, не участвуют в обычных механизмах  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой регуляции квантовой секреции АХ, поскольку находятся в неактивном состоянии. Это полностью соответствовало предыдущим данным литературы и общепринятым представлениям о «молчании» этого типа  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов при обычных режимах вызванной

активности синапсов. Поэтому для изучения свойств и роли  $\text{Ca}^{2+}$ -каналы L-типа в моторных нервных терминалях мышцы необходимо было найти условия и процедуры перевода этих  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов в активное состояние.

### **3.1.2. Растормаживание $\text{Ca}^{2+}$ -каналов L-типа и его последствия при ритмической активности моторных синапсов**

Для «растормаживания» (то есть вовлечения в активность) «молчащих»  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов L-типа в моторных нервных терминалях диафрагмы мышцы нами были использованы разные процедуры с последующим сравнением наблюдаемых при этом изменений в секреции АХ.

#### **3.1.2.1. Эффекты активатора L-типа $\text{Ca}^{2+}$ -каналов S(-) Bay K8644**

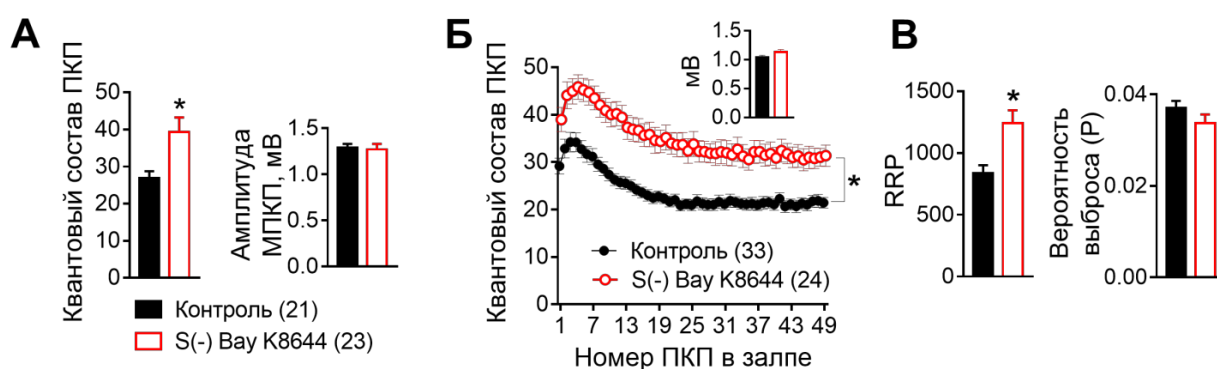
Аппликация S(-) Bay K8644 (1 мкМ) вызывала прирост амплитуды и квантового состава одиночных ПКП (рис. 3А), а также - увеличение амплитуды и квантового состава каждого ПКП по всему ходу залпа на 25-40% (рис. 3Б). При этом сохранялась неизменной выраженность всех трех фаз залпа ПКП (начального облегчения, депрессии и плато).

В нашей работе был использован общепринятый расчет размера пула готовых к высвобождению везикул (RRP) на основании последовательной модели, хорошо известной и применяемой при анализе причин тех или иных изменений квантовой секреции АХ именно в условиях высокочастотной ритмической активности моторных синапсов [Chand et al., 2017; Kaeser, Regehr, 2017; Ruiz et al., 2011; Slater, 2015; Xu et al., 2016].

Постепенное снижение вызванной секреции квантов АХ по ходу залпа ПКП (синаптическая депрессия) в данной модели рассматривается как прогрессирующее истощение RRP [Ruiz et al., 2011; Thanawala, Regehr, 2016]. Экстраполяция (линейная регрессия) такого спада на ось X (кумулятивный квантовый состав ПКП) дает для каждого синапса в выборке значение RRP. Выход амплитуд ПКП на относительно стабильный пониженный уровень (плато) в залпе ПКП - результат восполнения RRP при продолжающемся его истощении в ходе ритмической активности моторных терминалей. При этом

размер RRP динамически меняется в зависимости от частоты стимуляции синапса и характера возникающих в нем  $\text{Ca}^{2+}$ -сигналов [Cano et al., 2012].

Проведенные расчеты показали, что при растормаживании L-типа  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов и выбранной частоте стимуляции нерва (50 Гц) наблюдаемый единообразный прирост квантового состава ПКП по всему ходу залпа сопровождается увеличением размера пула готовых к выбросу везикул (RRP) в терминалях от  $835.9 \pm 65.3$  в контроле (n=33) до  $1241.4 \pm 104.0$  (n=24,  $p < 0.05$ ), при этом вероятность выброса везикул (p) –  $0.034 \pm 0.002$  не отличалась от контрольных значений –  $0.037 \pm 0.002$  ( $p > 0.05$ ) (рис. 3B)



**Рис. 3.** Активация L-типа  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов потенцирует вызванную секрецию АХ. Квантовый состав ПКП и амплитуда МПКП при одиночной стимуляции нерва (0.3 Гц) (А) и по ходу короткого высокочастотного залпа (50 Гц, 1 с) (Б) в контроле и под действием активатора  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов L-типа S(-) Bay K8644 (1 мкМ). (В) Активация L-типа  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов вызывает увеличение размера RRP без изменения вероятности выброса квантов АХ. На врезке – амплитуда МПКП. В скобках – количество синапсов в соответствующих группах. \*- $p < 0.05$ .

Правомочность использованного метода для оценки причин изменений квантового состава и амплитуд ПКП и валидность получаемых в нашей работе значений размера RRP и вероятности выброса (p) при использовании для расчетов последовательной модели хорошо согласуются с данными ультраструктурных и функциональных исследований везикул в активных зонах моторных синапсов млекопитающих. Они свидетельствуют о том, что нервные окончания зрелого моторного синапса мышцы содержат порядка 900

активных зон с двумя (редко тремя) везикулами в каждой [Badawi, Nishimune, 2018; Dittrich et al., 2018; Ginebaugh et al., 2022].

### **3.1.2.2. Эффекты блокирования ВК-каналов ( $\text{Ca}^{2+}$ -активируемых $\text{K}^+$ -каналов большой проводимости)**

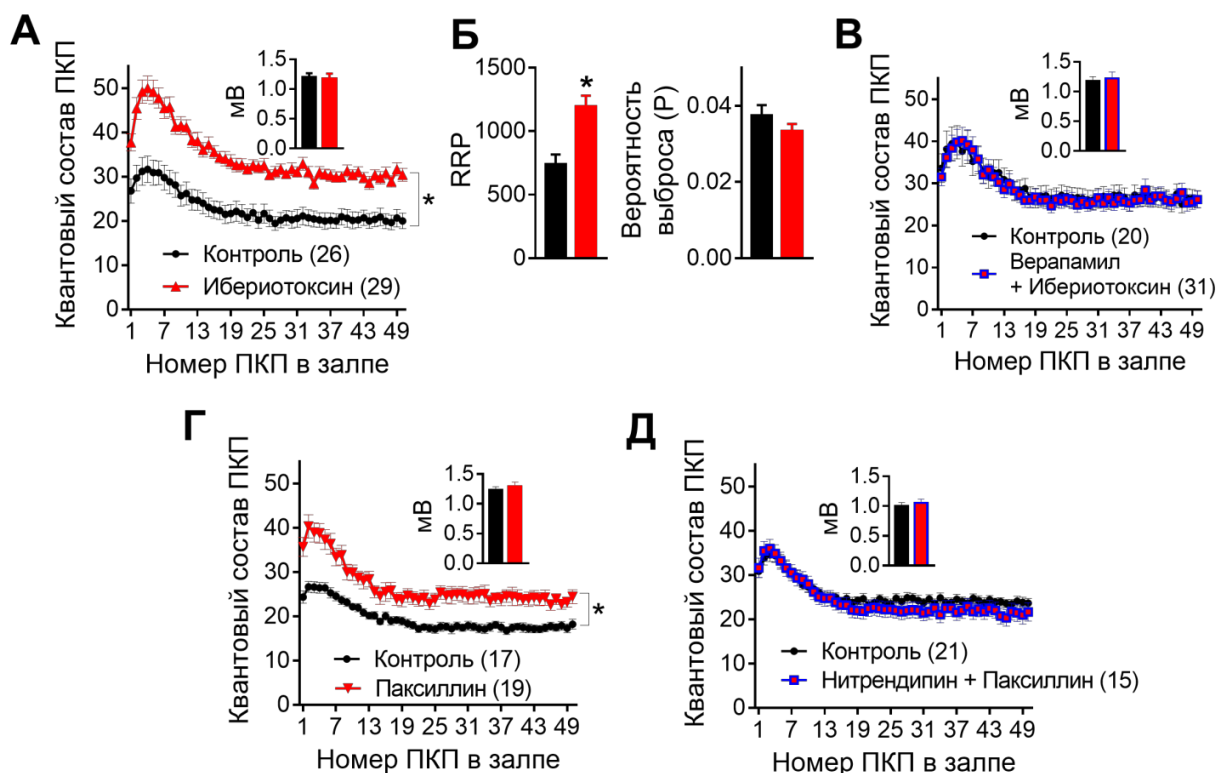
В моторных нервных терминалях  $\text{Ca}^{2+}$ -активируемые  $\text{K}^+$ -каналы высокой проводимости (ВК-каналы) локализованы в активных зонах в тесном контакте в  $\text{Ca}^{2+}$ -каналами P/Q-типа, запускающими секрецию АХ [Katz et al., 1997; Robitaille et al., 1993]. Существует мнение, что активация ВК-каналов входящим в моторную терминаль  $\text{Ca}^{2+}$ -током во время нервного импульса, вызывая гиперполяризацию мембраны, может ограничивать дальнейшее поступление ионов  $\text{Ca}^{2+}$  по потенциал-зависимым  $\text{Ca}^{2+}$ -каналам, реализуя, таким образом, своеобразный механизм отрицательной обратной связи [Dittrich et al., 2018]. Действительно, в моторных синапсах мышцы было показано, что ВК-каналы находятся в непосредственной близости от триггерных  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов P/Q-типа (входят в  $\text{Ca}^{2+}$ -нанодомен) в составе белкового кластера активных зон. Такой вывод был сделан в результате загрузки терминалей  $\text{Ca}^{2+}$ -буфером с быстрой кинетикой связывания ионов  $\text{Ca}^{2+}$  - ВАРТА. В присутствии ВАРТА не наблюдалось активации  $\text{K}^+$ -тока, опосредуемого ВК-каналами: блокаторы ВК-каналов на фоне ВАРТА теряли способность вызывать облегчение секреции АХ [Protti, Uchitel, 1997]. Если в моторных синапсах блокаду ВК-каналов проводили в отсутствие ВАРТА, то это сопровождалось увеличением  $\text{Ca}^{2+}$ -сигнала и уровня выброса квантов АХ в ответ на одиночный нервный импульс [Flink, Atchison, 2003; Vatanpour, Harvey, 1995]. При этом предполагается возможное участие ВК-каналов в регуляции не только P/Q-, а L-типа  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов, поскольку возросший на фоне селективного блокатора ВК-каналов ибериотоксина квантовый состав ПКП частично снижался в сторону контрольных значений под действием блокатора L-типа  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов нимодипина [Flink, Atchison, 2003]. Нельзя было исключить, что  $\text{K}^+$ -ток, ускоряя гиперполяризацию во время ПД, может

снижать вероятность перехода в открытое состояние более низкопороговых, чем P/Q-тип  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов, но обладающих более медленной кинетикой активации  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов L-типа, также имеющихся в области активных зон, что будет препятствовать вовлечению этого  $\text{Ca}^{2+}$ -входа в регуляцию секреции АХ [Flink, Atchison, 2003; Mermelstein et al., 2000].

В связи с этим, в наших экспериментах мы также проводили блокирование ВК-каналов с помощью ибериотоксина (100 нМ) или паксиллина (5 мкМ) в моторных синапсах диафрагмы мыши. При этом мы также наблюдали значительное увеличение амплитуды и квантового состава ПКП, причем не только одиночных ПКП, но и всех ПКП, начиная с первого, в составе короткого ритмического залпа. Оказалось, что такой прирост полностью предотвращался блокированием L-типа  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов верапамилом или нитрендипином (рис. 4).

Это означает, что роль ВК-каналов в активных зонах моторных нервных терминалей мыши действительно предназначена не для ограничения входящего  $\text{Ca}^{2+}$ -тока по триггерным  $\text{Ca}^{2+}$ -каналам P/Q-типа, а в удержании в «молчащем» состоянии L-типа  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов, которые, по-видимому, также достаточно сближены с ВК-каналами. Согласно выдвинутой нами гипотезе, в моторных синапсах мыши существуют реципрокные отношения между активностью двух потенциал-управляемых  $\text{Ca}^{2+}$ -входов моторных терминалей – по P/Q- и L-типам  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов, осуществляемые с участием ВК-каналов. Вход  $\text{Ca}^{2+}$  по P/Q-типу  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов в результате пресинаптического ПД, помимо запуска экзоцитоза синаптических везикул, активирует ВК-каналы. В свою очередь, срабатывание ВК-каналов и обеспечиваемый ими гиперполярирующий  $\text{K}^+$ -ток предназначены в основном для подавления активности более медленно активирующихся, но способных обеспечивать длительный вход ионов  $\text{Ca}^{2+}$  в терминаль  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов L-типа. На фоне блокады ВК-каналов мы впервые наблюдали стойкий прирост амплитуды и квантового состава ПКП по всему ходу ритмического залпа. Такая картина потенцирования залповой активности моторных синапсов качественно

совпадала с наблюдавшейся нами при действии активатора  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов L-типа S(-) Bay K8644. Как и в случае применения активатора  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов L-типа, при блокировании ВК-каналов мы выявили статистически значимое возрастание размера RRP до  $1196.2 \pm 84.3$  ( $n=29$ ) по сравнению с  $742.3 \pm 75.1$  в контроле ( $n=26$ ,  $p < 0.05$ ), при этом вероятность выброса ( $p$ )  $0.038 \pm 0.003$  – осталась на контрольном уровне –  $0.033 \pm 0.002$  ( $p > 0.05$ ) (рис. 4Б).



**Рис. 4.** Блокирование ВК-каналов растормаживает L-тип  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов и потенцирует вызванную секрецию АХ. (А) Изменение квантового состава ПКП по ходу залпа в контроле и под действием блокатора ВК-каналов ибериотоксина (100 нМ). (Б) Блокирование ВК-каналов ибериотоксином увеличивает размер RRP, но не вероятность выброса квантов АХ. (В) Верапамил (5 мкМ) предотвращает потенцирующее действие ибериотоксина на вызванную секрецию АХ. (Г) Паксиллин (5 мкМ) оказывает аналогичное ибериотоксину облегчающее действие на секрецию АХ в ходе коротких ритмических залпов ПКП. (Д) На фоне нитрендипина (1 мкМ) паксиллин утрачивает свое потенцирующее действие на вызванный выброс АХ. На врезке – амплитуда МПКП. В скобках – количество синапсов в соответствующих группах. \*- $p < 0.05$ .



Таким образом, использование именно не одиночной (частота стимулов  $\leq 0.5$  Гц) или парной стимуляции позволило не только выявить необычный паттерн облегчения синаптической передачи за счет равномерного увеличения амплитуды и квантового состава ПКП по всему ходу залпа, но и выяснить, за счет изменений какого именно из параметров квантовой секреции – вероятности выброса ( $p$ ) или числа срабатывающих активных зон, что отражается в размере RRP – происходит такое потенцирование квантовой секреции АХ в моторных синапсах мышцы при разных способах растормаживания  $Ca^{2+}$ -каналов L-типа.

Наряду с участием ВК-каналов в контроле активности пресинаптических  $Ca^{2+}$ -каналов L-типа, до сих пор ничего не было известно о возможной роли потенциал-зависимых  $K^+$ -каналов ( $K_V$ ) моторных терминалей в регуляции активности  $Ca^{2+}$ -каналов L-типа.

### **3.1.2.3. Эффекты блокирования потенциал-зависимых $K_V$ -каналов**

В следующих сериях экспериментов мы попытались установить, возможна ли активация (растормаживание) L-типа  $Ca^{2+}$ -каналов при блокировании потенциал-зависимых  $K_V$ -каналов с помощью тетраэтиламмония (ТЭА) (2 мМ) или 4-аминопиридина (4-АП) (100 мкМ), традиционно используемых для расширения второй реполяризационной фазы пресинаптического ПД и усиления за счет этого входящих потенциал-зависимых  $Ca^{2+}$ -токов в моторных нервных терминалях, генерируемых в основном во время второй фазы ПД [Brigant, Mallart, 1982].

#### **3.1.2.3.1. Влияние ТЭА на параметры одиночных ПКП.**

ТЭА вызывал значительный (более чем двухкратный) прирост амплитуды и квантового состава одиночных ПКП. Воздействие ТЭА на нервно-мышечный препарат сопровождалось статистически значимым снижением амплитуды МПКП до  $0.41 \pm 0.03$  ( $n=32$ ) по сравнению с контролем –  $0.93 \pm 0.05$  ( $n=41$ ,  $p < 0.05$ ), что связано с известной способностью ТЭА оказывать

тормозное каналоблокирующее воздействие на нХР мышечного типа [Adler et al., 1979; Nojima et al., 1993].

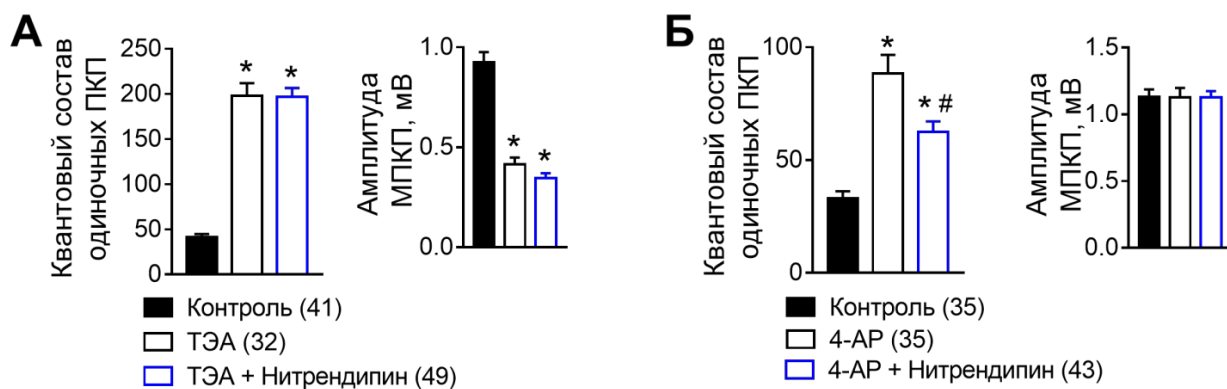
На фоне действия ТЭА блокатор  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов L-типа нитрендипин (1 мкМ) не приводил к снижению возросшего под действием ТЭА квантового состава ПКП (рис. 5А). Это свидетельствует о неучастии L-типа  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов в потенцировании вызванной квантовой секреции АХ под действием ТЭА, а наблюдаемый прирост квантового состава ПКП в этом случае, по-видимому, обеспечивается увеличением входа ионов  $\text{Ca}^{2+}$  в моторные терминалы по P/Q-типу  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов. Об этом говорит и сравнение полученных нами результатов с данными о возрастании поздней фазы перинейрональных токов на фоне действия ТЭА, соответствующих входящим в моторную терминаль потенциал-зависимым  $\text{Ca}^{2+}$ -токам [Dissanayake et al., 2021].

#### **3.1.2.3.2. Влияние 4-АР на параметры одиночных ПКП**

Мы установили, что 4-АР оказывает более сложное, чем ТЭА, действие на амплитуду и квантовый состав одиночных ПКП. Возрастание значений этих параметров на фоне действия 4-АР так же как и на фоне ТЭА, происходит преимущественно за счет увеличения активности P/Q-типа  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов, но здесь отчасти участвуют и  $\text{Ca}^{2+}$ -каналы L-типа, поскольку нитрендипин (1 мкМ) приводил к достоверному (на 25-30%) снижению более чем двухкратного прироста амплитуды и квантового состава ПКП под действием 4-АР (рис. 5Б).

Данный эффект объясняется, по-видимому, не только блокированием  $\text{K}^{+}$ -тока (по  $\text{K}_V$ -каналам) под действием 4-АР, что потенцирует работу  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов P/Q-типа, но и частичной активацией L-типа  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов. Такая «дополнительная» способность 4-АР вызывать не только блокаду потенциал-зависимых  $\text{K}^{+}$ -каналов, но и напрямую облегчать работу  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов L-типа за счет взаимодействия с дополнительной  $\beta$ -субъединицей канального комплекса действительно недавно выявлена в нейронах ЦНС и в нервно-мышечных синапсах [Li et al., 2014; Wu et al., 2009], хотя данная точка зрения

о прямом действии аминопиридинов на  $\text{Ca}^{2+}$ -каналы L-типа и особенно терапевтическом значении этого феномена в последнее время подвергается жесткой критике [Meriney, Lacomis, 2018; Ojala et al., 2021].



**Рис. 5.** (А) Квантовый состав ПКП и амплитуда МПКП при одиночной стимуляции нерва (0.3 Гц) в контроле, под действием ТЭА (2 мМ) и на фоне нитрендипина (1 мкМ) в присутствии ТЭА. (Б) Квантовый состав ПКП и амплитуда МПКП при одиночной стимуляции нерва в контроле, под действием 4-АР (100 мкМ) и на фоне нитрендипина (1 мкМ) в присутствии 4-АР. В скобках – количество синапсов в соответствующих группах. \*-р < 0.05 по сравнению с контролем, #-р < 0.05 сравнению с 4-АР.

### 3.1.2.3.3. Влияние 4-АР на параметры ПКП в коротких залпах

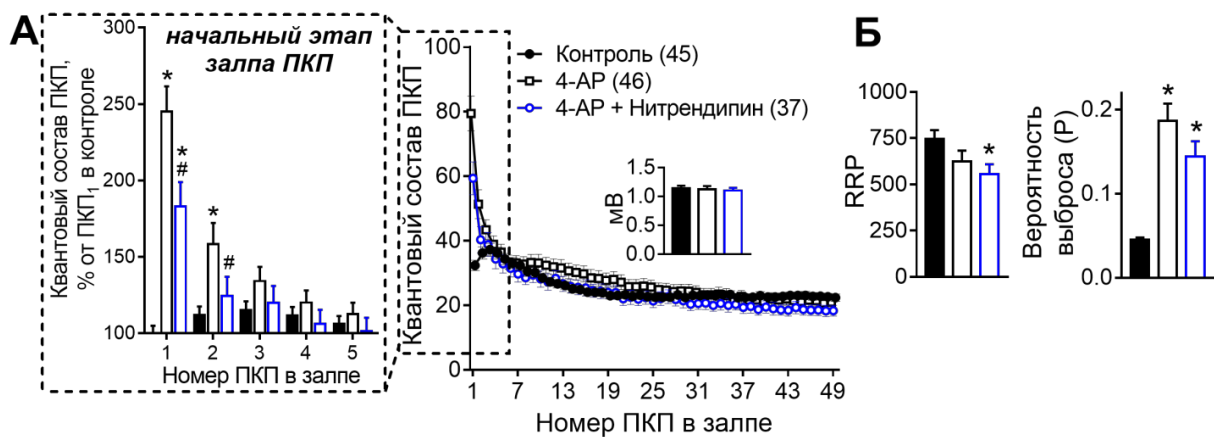
На фоне 4-АР (100 микроМ) наблюдали значительное изменение рисунка залпа ПКП. Выраженное увеличение амплитуды и квантового состава первого ПКП в залпе (как в случае одиночной активности синапсов) сопровождалось полным отсутствием начального облегчения и последующим быстрым развитием депрессии с выходом на стабильный уровень (плато) на уровне контроля (рис. 6А).

Такая картина изменений ПКП по ходу залпа совпадает с описанной другими авторами при действии 4-АР на нервно-мышечные синапсы [Brooke et al., 2004; Thomsen, Wilson, 1983]. Считается, что 4-АР действует во многом аналогично ТЭА, то есть преимущественно блокируя  $\text{K}_v$ -каналы и расширяя вторую фазу пресинаптического ПД [Thomsen, Wilson, 1983]. Соответственно, оба блокатора  $\text{K}_v$ -каналов вызывают сходный эффект - усиливают вход ионов  $\text{Ca}^{2+}$  по P/Q-типу  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов, что и приводит к возрастанию вероятности

выброса квантов ( $p$ ), приросту амплитуд и квантового состава одиночных ПКП, а также амплитуд и квантового состава первого ПКП в коротких высокочастотных залпах. Но далее, такой мощный выброс АХ в ответ на первый стимул в залпе приводит к быстрому и слабо компенсируемому истощению RRP.

Важно подчеркнуть, что такая картина изменений рисунка залповой активности моторных синапсов мышцы на фоне 4-AP, когда, несмотря на существенное увеличение первого ПКП, далее развивается резкая депрессия синаптической передачи и снижение амплитуд и квантового состава ПКП по ходу залпа, существенно отличается от паттерна залповой активности моторных синапсов, обнаруженного нами на фоне избирательного растормаживания  $Ca^{2+}$ -каналов L-типа при блокировании ВК-каналов.

Проведенные нами расчеты размера RRP и вероятности выброса ( $p$ ) в режиме коротких высокочастотных залпов показали, что под действием 4-AP размер RRP в терминалях статистически значимо не меняется, при этом значительно увеличивается вероятность выброса везикул ( $p$ ) – в основном за счет усиления работы триггерных для экзоцитоза синаптических везикул в активных зонах  $Ca^{2+}$ -каналов P/Q-типа (рис.6Б). Это и приводит к более массивному расходу синаптических везикул из исходно оккупирующего активные зоны RRP. Ускоренное истощение этого везикулярного пула в этих условиях не компенсируется в достаточной степени механизмами его восполнения в ходе ритмического залпа ПКП, что и проявляется в более выраженной депрессии синаптической передачи по ходу залпа. Блокирование L-типа  $Ca^{2+}$ -каналов нитрендипином на фоне 4-AP приводило к статистически значимому снижению квантового состава ПКП в самом начале залпа, в большей степени - за счет снижения RRP, чем вероятности выброса квантов АХ ( $p$ ) (рис. 6Б).



**Рис. 6.** (А) Изменение квантового состава ПКП по ходу залпа в контроле, под действием 4-АР (100 мкМ) и на фоне нитрендипина (1 мкМ) в присутствии 4-АР. На врезках: слева – квантовый состав первых 5 ПКП в залпе, нормированный к значению первого ПКП в залпе в контроле (ПКП<sub>1</sub> – принят за 100%); справа – амплитуда МПКП. (Б) Увеличение квантового состава ПКП в начале залпа под действием 4-АР обеспечивается за счет возрастания вероятности выброса квантов АХ, но не размера RRP. Нитрендипин на фоне действия 4-АР снижает размер RRP, но не вероятность выброса квантов АХ. В скобках – количество синапсов в соответствующих группах. \*- $p < 0.05$  по сравнению с контролем, #- $p < 0.05$  сравнению с 4-АР.

Суммируя результаты серий экспериментов с использованием разных процедур избирательного вовлечения в активность «молчащих»  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов L-типа (с помощью их активатора S(-) Bay K8644 или за счет блокирования ВК-каналов), можно говорить о том, мы впервые показали, что при разных способах растормаживания  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов L-типа наблюдается одинаковый эффект - потенцирование квантовой секреции АХ за счет возрастания квантового состава ПКП, причем не только в условиях одиночной стимуляции синапсов. Такой прирост ПКП устойчив и равномерен по всему ходу ритмического залпа в случае кратковременной высокочастотной стимуляции моторных синапсов. Данное потенцирование секреции квантов АХ уникально и по своему механизму, т.к. отличается от наблюдаемого при усилении активности P/Q-типа  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов: в случае потенцирования работы триггерного для экзоцитоза синаптических везикул  $\text{Ca}^{2+}$ -входа через P/Q-тип  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов наблюдается увеличение вероятности выброса (p) квантов АХ, а

при селективной активации только  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов L-типа - возрастание размера RRP.

Таким образом, впервые удалось показать, что два разных потенциал-зависимых  $\text{Ca}^{2+}$ -входа моторных нервных терминалей (по P/Q- и L-типам  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов) при их избирательном усилении или активации хотя и сходно влияют на одиночную вызванную секрецию АХ (облегчают, усиливают ее), но механизмы этого облегчения – разные. Это проявляется в качественно разном характере усиления именно залповой активности моторных синапсов и в изменениях разных параметров вызванной квантовой секреции АХ. Впервые показано, что при избирательном растормаживании L-типа  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов (при неизменной активности  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов P/Q-типа), обеспечивается стойкий единообразный прирост квантового состава ПКП по всему ходу ритмического залпа вследствие увеличения размера RRP, но не вероятности выброса квантов ( $p$ ), как это наблюдается при усилении входа по P/Q-типу  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов, приводящему лишь к возрастанию первого ПКП в залпе [Dissanayake et al., 2021; Thomsen, Wilson, 1983].

### **3.1.3. Вклад $\text{Ca}^{2+}$ -зависимых ферментов в регуляцию квантовой секреции АХ при входе ионов $\text{Ca}^{2+}$ по L-типу $\text{Ca}^{2+}$ -каналов**

Потенцирование секреции АХ при запуске активности L-типа  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов могло быть не просто следствием включения дополнительного кальциевого входа, но являться результатом активации  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимых ферментов – таких как РКС и/или СаМКП.

Присутствие обеих протеинкиназ в составе моторных нервных терминалей млекопитающих подтверждается данными литературы [Lanuza et al., 2014; Plomp, Molenaar, 1996]. Однако специфика их избирательной активации при подключении определенных  $\text{Ca}^{2+}$ -входов, в том числе - по L-типу  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов - оставалась не изученной.

### 3.1.3.1. Эффекты ингибиторов РКС на вызванную активность моторных синапсов

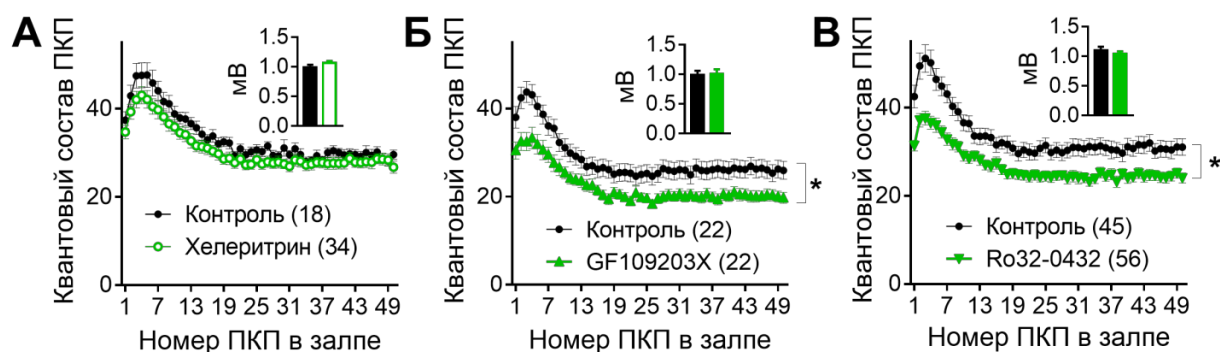
В нервно-мышечных синапсах показано наличие широкого спектра разных изоформ РКС, по-разному зависимых от ионов  $\text{Ca}^{2+}$  и способных регулировать синаптическую активность, участвуя в проявлении различных механизмов [Besalduch et al., 2010; Lanuza et al., 2014; Santafé et al., 2005].

В нашей работе был использован хелеритрин (4 мкМ), ингибитор многих изоформ РКС на уровне субстрат-связывающего сайта. Мы установили, что в условиях короткой залповой активности синапсов этот ингибитор не вызывает изменений амплитуды и квантового состава ПКП, что могло указывать на неучастие РКС в регуляции вызванной секреции АХ в моторных синапсах (рис. 7А)..

Данная точка зрения в целом поддерживается результатами, полученными на моторных синапсах мыши и крысы при одиночной стимуляции с использованием другого ингибитора РКС, калфостина С, действующего конкурентно на уровне сайта связывания диацилглицерола (DAG) [Lanuza et al., 2014; Santafé et al., 2009].

Однако, при использовании более селективных блокаторов классических ( $\text{Ca}^{2+}$ - и DAG-активируемых) изоформ РКС ( $\alpha$ ,  $\beta\text{I}$ ,  $\beta\text{II}$ ) – GF109203X (0.1 мкМ) и Ro 32-0432 (1 мкМ) – мы впервые обнаружили статистически значимое снижение амплитуды ПКП в залпах, сопровождающееся уменьшением квантового состава ПКП. При этом такое подавление квантового состава ПКП при блокировании  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимых изоформ РКС стойко сохранялось по всему ходу ритмического залпа (рис. 7Б,В).

Полученные данные позволяют говорить о том, что в нервных терминалях присутствует базально активная РКС, принимающая участие в поддержании вызванной квантовой секреции АХ в моторных синапсах.



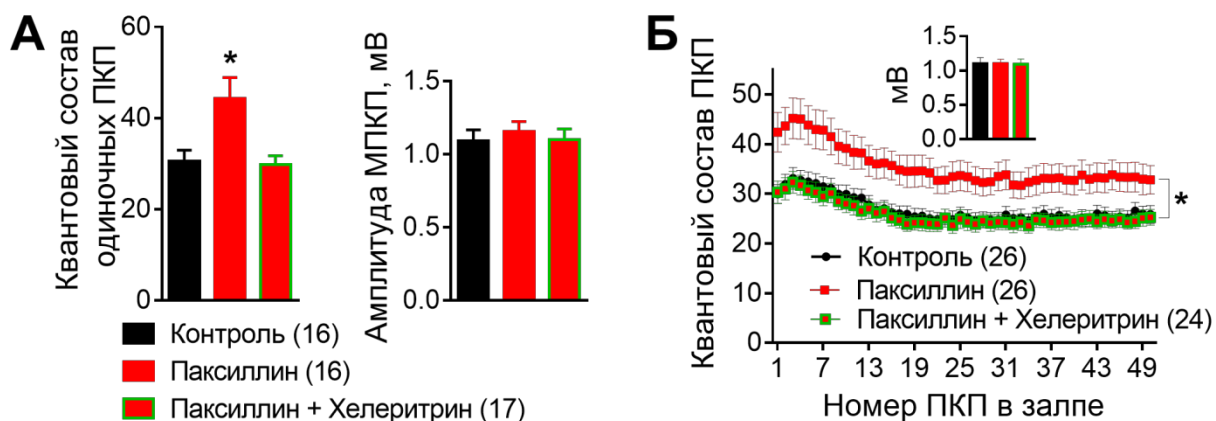
**Рис. 7.** Изменение квантового состава ПКП по ходу короткого высокочастотного залпа в контроле и под действием ингибиторов РКС: хелеритрина (4 мкМ) (А); GF109203X (0.1 мкМ) (Б) и Ro32-0432 (1 мкМ) (В). На врезках – амплитуда МПКП. В скобках – количество синапсов в соответствующих группах. \*- $p < 0.05$ .

### 3.1.3.2. Эффекты ингибитора РКС на фоне растормаживания L-типа $\text{Ca}^{2+}$ -каналов

Для растормаживания L-типа  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов использовали блокирование ВК-каналов паксиллином (5 мкМ). Как и в случае действия ибериотоксина, паксиллин усиливал секрецию АХ как у одиночных ПКП, так и в коротком высокочастотном залпе ПКП, равномерно увеличивая амплитуду и квантовый состав ПКП по всему ходу залпа, что является характерным признаком растормаживания L-типа  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов (рис. 4Г,Д). Ингибитор РКС хелеритрин (4 мкМ), апплицируемый на фоне паксиллина, уменьшал квантовый состав ПКП до контрольных значений как в случае одиночных ПКП, так и по всему ходу залпа (рис. 8). Это означает, что ингибирование РКС устраняет облегчающее действие ВК-блокатора паксиллина на квантовую секрецию АХ.

Можно предположить, что при растормаживании L-типа  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов и входа ионов  $\text{Ca}^{2+}$  в моторную терминаль по этим каналам происходит дополнительная (к базальной)  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимая активация РКС, которая принимает участие в специфическом облегчении как одиночных, так и ритмически генерируемых ПКП, характерном для активности именно  $\text{Ca}^{2+}$ -входа по L-типу  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов.





**Рис. 8.** Ингибирование РКС хелеритрином (4 мкМ) обращает потенцирующий действие растормаживания L-типа  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов паксиллином (5 мкМ) на вызванную секрецию АХ. (А) Квантовый состав ПКП и амплитуда МПКП при одиночной стимуляции нерва (0.3 Гц) в контроле, под действием паксиллина, и при действии хелеритрина в присутствии паксиллина. (Б) Изменение квантового состава ПКП по ходу залпа в контроле, под действием блокатора ВК-каналов паксиллина и при действии хелеритрина в присутствии паксиллина. На врезке – амплитуда МПКП. В скобках – количество синапсов в соответствующих группах. \*- $p < 0.05$ .

Оставалось проверить, не происходит ли дополнительной  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой активации РКС при усилении входа ионов  $\text{Ca}^{2+}$  по P/Q-типу  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов? Как мы продемонстрировали выше (рис. 5А), блокирование потенциал-зависимых  $\text{K}^+$ -каналов ТЭА способствует усилению входа ионов  $\text{Ca}^{2+}$  по потенциал-зависимым  $\text{Ca}^{2+}$ -каналам P/Q-типа.

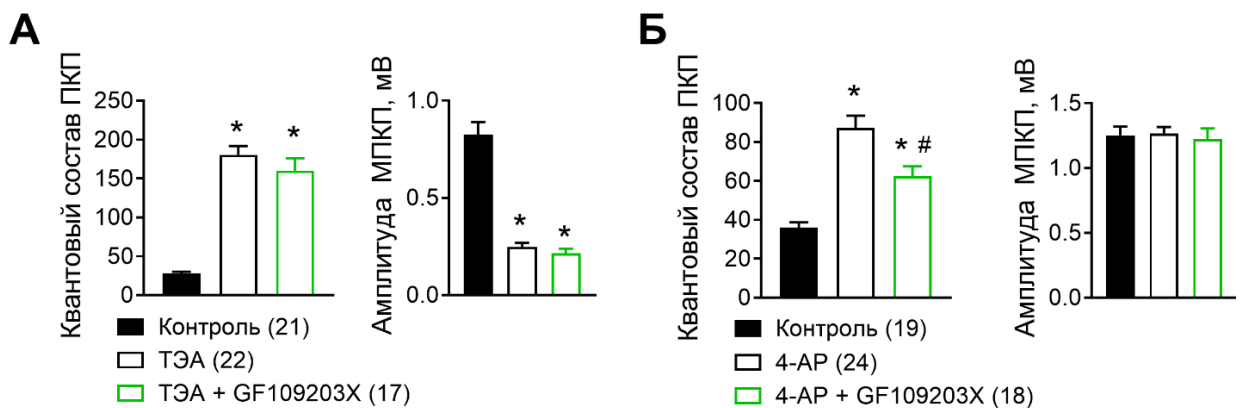
В связи с этим, на следующем этапе работы мы исследовали возможность участия  $\text{Ca}^{2+}$ -активируемой РКС в повышении уровня секреции АХ, наблюдаемой на фоне ТЭА.

### 3.1.3.3. Эффекты ингибитора РКС на фоне растормаживания или частичного блокирования $\text{Ca}^{2+}$ -каналов P/Q-типа

ТЭА (2 мМ) вызывал увеличение амплитуды и квантового состава ПКП, сопровождающееся снижением амплитуды МПКП, которое возникает за счет негативного воздействия ТЭА на проводимость постсинаптических нХР. В присутствии ТЭА ингибитор РКС GF109203X (0.1 мкМ) оказался неспособен статистически значимо уменьшить возросшее под действием ТЭА значение

квантового состава ПКП (рис. 9А). Таким образом, ТЭА-индуцированное увеличение квантового состава ПКП оказалось нечувствительным как к блокаде L-типа  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов нитрендипином, так и к ингибированию РКС с помощью GF109203X.

При использовании вместо ТЭА 4-АР (100 мкМ), приводящего не только к усилению работы  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов P/Q-типа, но и растормаживанию ранее «молчавших»  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов L-типа (рис. 5Б, 6), амплитуда и квантовый состав ПКП увеличивались в 2 раза при неизменной амплитуде МПКП. На фоне такого двухкратного прироста квантового состава ПКП (до  $87.29 \pm 6.27$ ,  $p < 0.05$ ), индуцированного 4-АР, последующая аппликация GF109203X (0.1 мкМ) в течение 30 мин действия приводила к статистически значимому снижению квантового состава ПКП до  $62.36 \pm 5.23$  ( $p < 0.05$ ) (рис. 9Б).



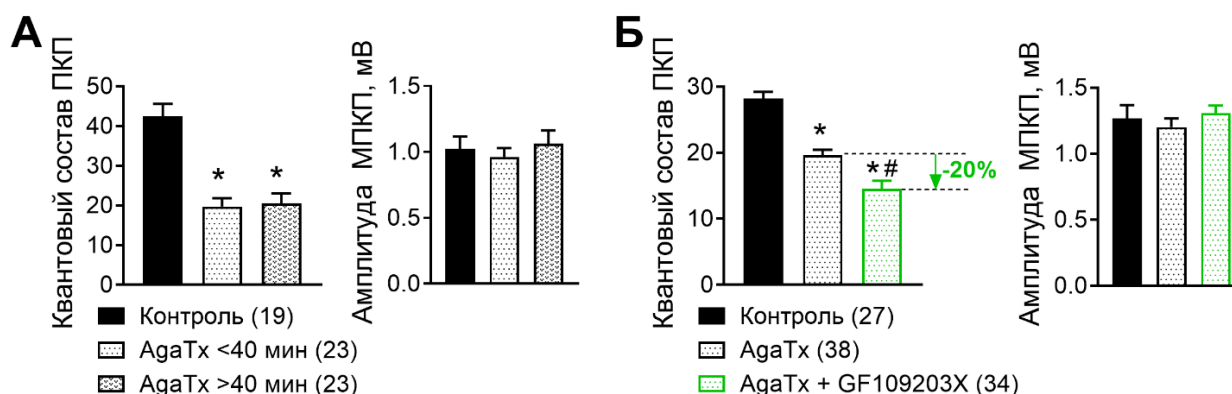
**Рис. 9.** (А) Квантовый состав ПКП и амплитуда МПКП при одиночной стимуляции нерва (0.3 Гц) в контроле, под действием ТЭА (2 мМ) и на фоне GF109203X (0.1 мкМ) в присутствии ТЭА. (Б) Квантовый состав ПКП и амплитуда МПКП при одиночной стимуляции нерва в контроле, под действием 4-АР (100 мкМ) и на фоне GF109203X (0.1 мкМ) в присутствии 4-АР. В скобках – количество синапсов в соответствующих группах. \*- $p < 0.05$  по сравнению с контролем, #- $p < 0.05$  сравнению с 4-АР.

Это свидетельствует о возможном вовлечении в регуляцию вызванной секреции АХ не только L-типа  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов, но и активности РКС, обеспечиваемое действием 4-АР. При этом ТЭА индуцирует увеличение квантового состава ПКП, которое никак не связано с активацией входа в

терминаль ионов  $\text{Ca}^{2+}$  по L-типу  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов и дополнительной активацией РКС.

Об этом говорят и результаты дополнительной серии экспериментов, где применяли селективный блокатор  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов P/Q-типа  $\omega$ -агатоксин IVA (AgaTx) [Uchitel et al., 1992]. Концентрация AgaTx (200 нМ), значительно лимитирующая вход ионов  $\text{Ca}^{2+}$  по триггерным для экзоцитоза синаптических везикул  $\text{Ca}^{2+}$ -каналам P/Q-типа, но не полностью блокирующая вызванную квантовую секрецию АХ, была выбрана на основании литературных данных [Molina-Campos et al., 2015; Rodrigues et al., 2019].

Негативное влияние AgaTx на амплитуду и квантовый состав ПКП проявлялось быстро, и было стабильно в течение 1.5 часов (рис. 10А). Ингибитор РКС GF109203X (0.1 мкМ) в условиях сниженной под действием AgaTx вызванной квантовой секреции АХ сохранил способность тормозить выброс АХ, дополнительно, за счет блокады РКС, еще на 20% уменьшая квантовый состав одиночных ПКП (рис. 10Б).



**Рис. 10.** (А) Квантовый состав ПКП и амплитуда МПКП при одиночной стимуляции нерва (0.3 Гц) в контроле, в присутствии AgaTx (200 нМ) в течение первых 40 минут действия и в течение следующих 40-50 минут действия AgaTx. (Б) Квантовый состав ПКП и амплитуда МПКП при одиночной стимуляции нерва в контроле, под действием AgaTx и на фоне GF109203X (0.1 мкМ) в присутствии AgaTx. В скобках – количество синапсов в соответствующих группах. \*-p < 0.05 по сравнению с контролем, #-p < 0.05 сравнению с AgaTx.

Совокупность полученных данных позволяет говорить о существовании пресинаптических  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимых РКС, которые не активируются  $\text{Ca}^{2+}$ -током через каналы P/Q-типа.

При этом мы впервые показали, что, наряду с базальной активностью, возможно дополнительное «подключение»  $\text{Ca}^{2+}$ -активируемой РКС за счет входа в моторную терминаль ионов  $\text{Ca}^{2+}$ , причем только по L-типу  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов, в результате чего и возникает существенное усиление вызванной секреции АХ. Ранее такое РКС-опосредованное вовлечение  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов L-типа в регуляцию одиночной вызванной секреции АХ предполагалось в условиях растормаживания этих каналов в результате загрузки в моторные терминали быстрого  $\text{Ca}^{2+}$ -буфера ВАРТА и ингибирования пресинаптических фосфатаз [Urbano et al., 2001].

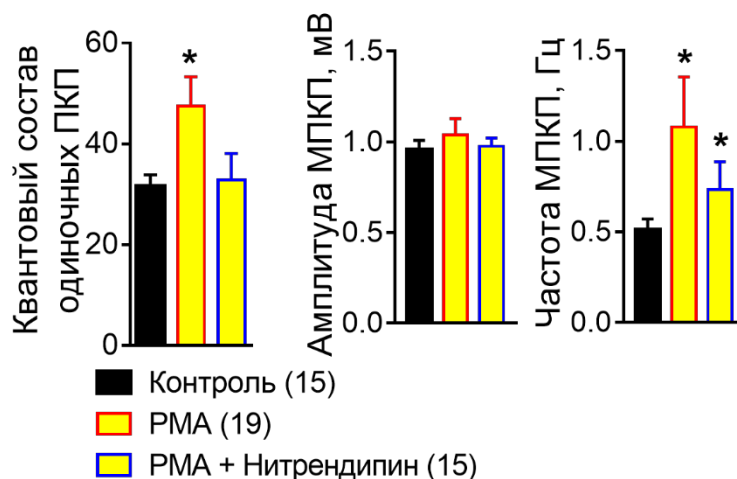
Еще одним фармакологическим инструментом, позволяющим активировать классические изоформы РКС, служат стабильные аналоги DAG, такие как форбол 12-миристат 13-ацетат (РМА) [Castagna et al., 1982]. Конечно, необходимо было проверить возможное участие L-типа  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов в регуляции вызванной секреции АХ в моторных синапсах при таком способе активации РКС.

#### **3.1.3.4. Эффекты пан-активатора РКС форбол 12-миристат 13-ацетата (РМА)**

Фармакологическая активация РКС с помощью РМА (10 нМ) приводила к значительному увеличению амплитуды и квантового состава одиночных ПКП. Такое РМА-индуцированное усиление квантовой секреции АХ было сопоставимо по величине с наблюдаемым при  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимом способе активации РКС, в условиях растормаживания L-типа  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов под действием ВК-блокатора паксиллина (рис. 8А). При этом на фоне РМА возрастала частота спонтанной секреции квантов АХ. Аналогичные данные о потенцирующем влиянии РМА были получены ранее в экспериментах с

использованием «рассеченного» нервно-мышечного препарата крысы [Santafé et al., 2009, 2005, 2006].

Оказалось, что на фоне действия РМА блокирование L-типа  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов нитрендипином (1 мкМ) значительно снижает прирост квантового состава ПКП, вызываемый РМА (рис. 11).

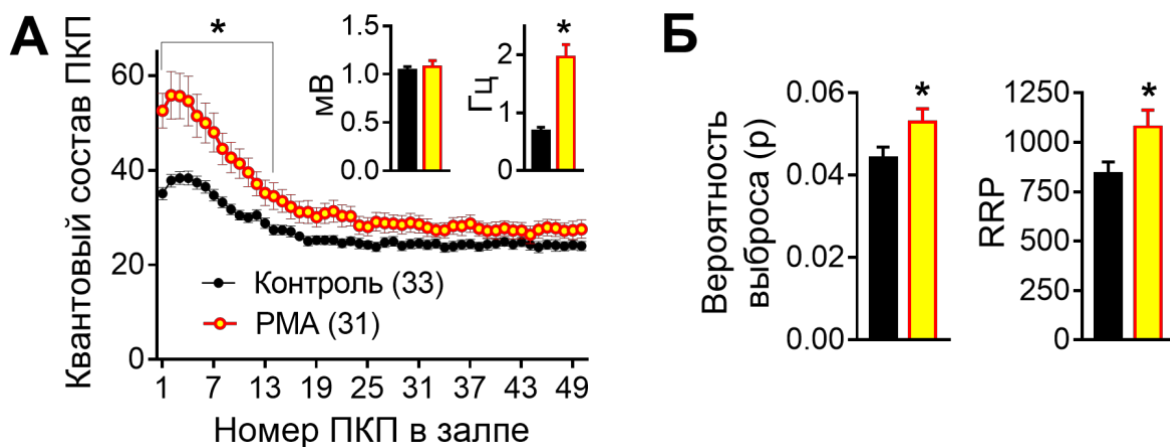


**Рис. 11.** При активации пресинаптической РКС РМА (10 нМ) потенцирование вызванной секреции АХ обеспечивается за счет активации L-типа  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов. Квантовый состав ПКП, амплитуда МПКП и частота МПКП при одиночной стимуляции нерва (0.3 Гц) в контроле, под действием РМА, и при действии блокатора L-типа  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов нитрендипина (1 мкМ) в присутствии РМА. В скобках – количество синапсов в соответствующих группах. \*-p < 0.05 по сравнению с контролем.

Таким образом, мы установили, что одним из направлений действия РКС, активированной с помощью РМА, может быть стимулирование входящего в моторную терминаль  $\text{Ca}^{2+}$ -тока через L-тип  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов.

Следует подчеркнуть, что при активации РКС с помощью РМА, несмотря на повышенную амплитуду и квантовый состав первого ПКП в залпе, выявилась неспособность моторных синапсов поддерживать повышенный уровень выброса АХ по всему ходу залпа, как это происходило при растормаживании  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов L-типа другими способами (рис. 12А). Анализ параметров квантовой секреции показал, что такое изменение короткого высокочастотного залпа ПКП на фоне РМА сопровождается возрастанием как

размера RRP (что характерно для растормаживания L-типа  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов), так и увеличением вероятности выброса квантов АХ (р) (рис. 12Б).



**Рис. 12.** Активация РКС с помощью РМА потенцирует вызванную секрецию АХ в начале короткого высокочастотного залпа ПКП (50 Гц, 1 с). (А) Квантовый состав ПКП в контроле и под действием РМА (10 нМ). На врезке – амплитуда МПКП (слева) и частота МПКП (справа). (Б) РМА вызывает увеличение как вероятности выброса квантов АХ, так и размера RRP. В скобках – количество синапсов в соответствующих группах. \*- $p < 0.05$ .

Последнее может быть связано с прямой активацией РМА белка активных зон Munc13, обеспечивающего активное состояние компонента SNARE-комплекса синтаксина [Silinsky, Searl, 2003]. Именно такое действие РМА может лежать в основе как увеличения частоты МПКП (рис. 11), что характерно и для моторных синапсов крысы [Santafé et al., 2009], так и развития выраженной депрессии вызванной секреции АХ в ходе коротких залпов ритмической активности моторных синапсов.

Итак, мы впервые показали, что РМА-индуцированное облегчение синаптической передачи не сохраняется в ходе ритмической синаптической активности и исчезает уже к концу короткого залпа из 50 ПКП. Таким образом, выявлен ранее не известный в моторных синапсах факт, что при разных способах активации  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой пресинаптической РКС облегчающего действия фермента на синаптическую передачу и рисунок залповой активности синапсов – различен. По-видимому, в зависимости от

условий и способов активации РКС, мишени ее действия в моторных терминалях также могут различаться, и это проявляется в разном характере изменений вызванной секреции АХ по ходу ритмической активности синапсов.

### 3.1.3.5. Эффекты ингибиторов СаМКП

СаМКП – серин-треониновая протеинкиназа, активность которой подробно описана в регуляции пре- и постсинаптической пластичности в синапсах ЦНС [Kim et al., 2016; Lisman et al., 2012; Yasuda et al., 2022; Zalzman et al., 2018]. В нервно-мышечных синапсах млекопитающих вопрос о способах активации и роли пресинаптической СаМКП остаётся малоизученным.

Сначала была предпринята попытка выявить роль СаМ в регуляции секреции квантов АХ, поскольку СаМ не только является основополагающим фактором активации СаМКП, но и сам, функционируя в качестве  $Ca^{2+}$ -сенсора, может влиять на работу  $Ca^{2+}$ -каналов как P/Q- [Lee et al., 1999], так и L-типа [Ames, 2021]. Ингибирование СаМ при помощи W-7 (10 мкМ) не оказало воздействия на амплитудно-временные характеристики и частоту МПКП, что хорошо согласуется с ранее полученными в экспериментах на нервно-мышечных синапсах млекопитающих данными [Cinalli et al., 2013; De Lorenzo et al., 2006]. W-7 оказался неспособен вызвать изменения квантового состава ПКП в ходе короткой ритмической активности моторных синапсов (рис. 13А). Ранее, в условиях одиночной стимуляции моторных синапсов крысы, W-7 оказался также не способен менять амплитуду и квантовый состав постсинаптических токов [Singh, Prior, 1998]. Такая картина отличается кардинальным образом от наблюдающейся в моторных синапсах лягушки, где применение W-7 приводило к разнообразным изменениям спонтанной и вызванной секреции АХ и кратковременной пластичности [Brailoiu et al., 2002; Mukhamedyarov et al., 2009]. Отсутствие W-7-индуцированных изменений в нервно-мышечной передаче в моторных синапсах мыши может быть связано с тем, что СаМ, в зависимости от выраженности и локализации динамических

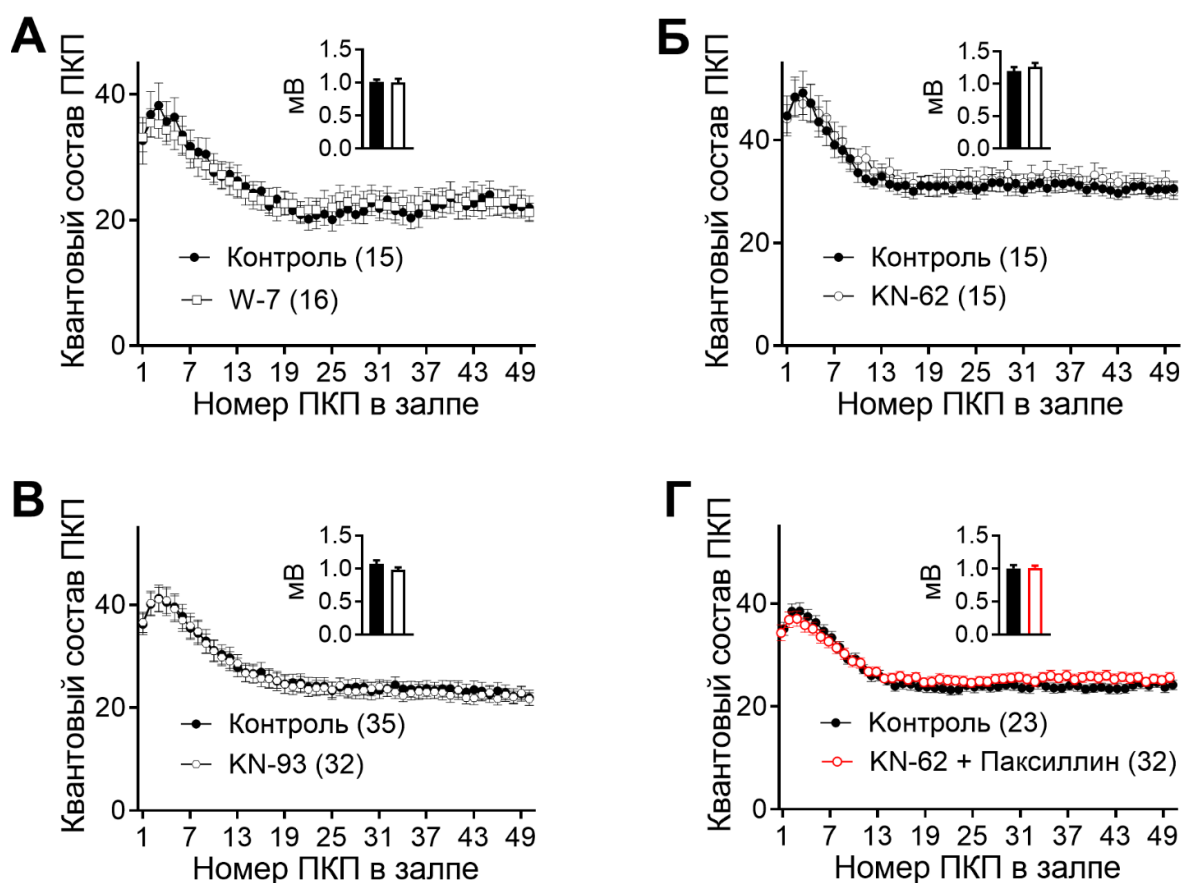
пресинаптических  $\text{Ca}^{2+}$ -сигналов, способен действовать на широкий спектр мишеней, включая триггерный для экзоцитоза синаптических везикул  $\text{Ca}^{2+}$ -вход по P/Q-типу  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов, взаимодействие белков экзоцитоза и целый ряд  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM-регулируемых ферментов [Lipstein et al., 2017]. Ингибируя CaM в моторном нервном окончании, мы, вероятнее всего, затрагиваем множество пресинаптических процессов, разнонаправленно влияющих на секрецию АХ.

Ингибирование CaMKII с помощью KN-62 или KN-93 (оба ингибитора использовали в концентрации 3 мкМ) не приводило к статистически значимым изменениям параметров как спонтанной, так и вызванной залповой активности моторных синапсов мыши (рис. 13Б,В).

Это свидетельствует, что триггерный  $\text{Ca}^{2+}$ -вход по P/Q-типу  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов и накопление вследствие его активности остаточного  $\text{Ca}^{2+}$  в активных зонах при кратковременной залповой активности синапсов - не достаточен для активации CaMKII и ее вовлечения в регуляцию вызванного выброса АХ в моторных синапсах. Данная особенность отличает моторные синапсы мыши от имеющихся в литературе примеров тесного взаимодействия CaMKII и P/Q-типа  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов в нейронах гиппокампа [Jiang et al., 2008], а также от моторных синапсов лягушки, где при работе триггерных  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов N-типа выявлен вклад CaMKII в регуляцию кратковременной пластичности и потенцирование выброса АХ при высокочастотной стимуляции нерва [Mukhamedyarov et al., 2010]. Такие различия в способах активации CaMKII могут быть связаны с особенностями объектов (строение активных зон), режимом активности синапсов, спецификой  $\text{Ca}^{2+}$ -входов и характером их колокализации с CaMKII.

Иную картину наблюдали при растормаживании другого  $\text{Ca}^{2+}$ -входа - по  $\text{Ca}^{2+}$ -каналам L-типа - путем блокирования  $\text{Ca}^{2+}$ -активируемых  $\text{K}^{+}$ -каналов ВК-типа паксиллином (5 мкМ), который вызывает увеличение квантового состава ПКП по всему ходу залпа (рис. 4Г). Предварительное ингибирование CaMKII при помощи KN-62 (3 мкМ) полностью предотвращало увеличение квантового состава ПКП, вызываемое паксиллином (рис. 13Г).





**Рис. 13.** Активность пресинаптической СаМКП необходима для потенцирования вызванной секреции АХ при растормаживании L-типа  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов. (А) Квантовый состав ПКП в контроле и под действием ингибитора СаМ W-7 (10 мкМ). (Б) Квантовый состав ПКП в контроле и под действием ингибитора СаМКП KN-62 (3 мкМ). (В) Квантовый состав ПКП в контроле и под действием СаМКП KN-93 (3 мкМ). (Г) Квантовый состав ПКП в контроле и под действием блокатора ВК-каналов паксиллина (5 мкМ) в присутствии KN-62. На врезках – амплитуда МПКП. В скобках – количество синапсов в соответствующих группах.

Совокупность полученных нами данных позволяет заключить, что  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимое активирование пресинаптической СаМКП в моторных нервных терминалях напрямую не ассоциировано с активностью P/Q-типа  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов и действием входящих по ним ионов  $\text{Ca}^{2+}$ . Вместе с тем, активация этой протеинкиназы может происходить и быть необходимой для проявления потенцирования секреции АХ при растормаживании  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов L-типа.

Таким образом, наряду с РКС, в этих условиях происходит активация и СаМКП. Такая возможность активации сразу нескольких  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимых

ферментов, в том числе СаМКП и РКС, при входе ионов Са<sup>2+</sup> по Са<sup>2+</sup>-каналам L-типа описана и в других возбудимых клетках, где функционируют эти каналы (кардиомиоциты, гладкомышечные клетки), причем активность протеинкиназ часто направлена на сами Са<sup>2+</sup>-каналы L-типа, обеспечивая их функционирование по принципу положительной обратной связи [Dai et al., 2009].

Наши результаты подкрепляют выдвинутую ранее гипотезу о том, что и в моторных синапсах в качестве возможных мишеней пресинаптической РКС можно рассматривать Са<sup>2+</sup>-каналы L-типа, чей вклад в регуляцию секреции АХ проявляется под действием активированной РКС [Oliveira, Correia-De-Sá, 2005; Urbano et al., 2001].

Что касается СаМКП, то считается, что эта протеинкиназа может быть локализована вблизи от потенциал-зависимых Са<sup>2+</sup>-каналов, и входящий Са<sup>2+</sup>-кальциевый ток обеспечивает активацию фермента, который за счет аутофосфорилирования дальше становится Са<sup>2+</sup>-независимым [Abiria, Colbran, 2010; Jiang et al., 2008]. В нервных терминалях разных типов синапсов у СаМКП могут быть разнообразные мишени - синапсин 1 [Tao-Cheng et al., 2006], ВК-каналы [Wang, 2008], потенциал-зависимые Са<sup>2+</sup>-каналы N-, P/Q-, а также L-типа [Hudmon et al., 2005; Tang et al., 2012]. Учитывая, что ингибиторы СаМКП никак не влияют на вызванную активность моторных синапсов млекопитающих в условиях, когда Са<sup>2+</sup>-каналы L-типа «замаскированы» - как на одиночную [Cinalli et al., 2013], так и ритмическую (рис. 13Б,Г), наиболее вероятной мишенью действия СаМКП в условиях растормаживания Са<sup>2+</sup>-каналов L-типа в моторных нервных терминалях могут быть сами Са<sup>2+</sup>-каналы L-типа.

В настоящее время общепризнано, что, независимо от типа нейрона или нервной терминали, наличествующий там L-тип Са<sup>2+</sup>-каналов является мишенью разнообразной фосфатазно-киназной и потенциал-зависимой регуляции [Calin-Jageman, Lee, 2008; Oliveria et al., 2012; Subramanian, Morozov, 2011], причём в моторных нервных терминалях доминируют

тормозные фосфатазные воздействия, в результате чего активность  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов L-типа оказывается подавленной [Urbano et al., 2001]. Однако в тех случаях, когда L-тип  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов расторможен, в клетке, как правило, присутствует сопряженная с ним активность СаМКП, нередко направленная в виде положительной обратной связи на поддержание функционирования самого канала [Erxleben et al., 2006; Tsui et al., 2005]. Именно такой сценарий хорошо известен в кардиомиоцитах, где мишенью СаМКП, активированной входом ионов  $\text{Ca}^{2+}$  по  $\text{Ca}^{2+}$ -каналам L-типа, являются сами же  $\text{Ca}^{2+}$ -каналы, у которых описано несколько сайтов для фосфорилирования СаМКП [Hudmon et al., 2005].

Мы не можем исключить, что и в моторных синапсах имеется подобная положительная связь между частично расторможенными  $\text{Ca}^{2+}$ -каналами L-типа и возникающей при этом активностью СаМКП, которая сдвигает баланс регуляторных воздействий на L-тип  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов в сторону усиления и поддержания их активности, и, таким образом, потенцирует вход ионов  $\text{Ca}^{2+}$  и последующий  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимый выброс АХ.

#### **3.1.4. Эндогенные регуляторные контуры, контролирующие активность L-типа $\text{Ca}^{2+}$ -каналов в моторных синапсах мышцы**

Учитывая обнаруженную нами способность L-типа  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов обеспечивать при растормаживании устойчивый прирост вызванного выброса АХ в моторных синапсах, неизбежно возникает вопрос, за счет каких эндогенных влияний и механизмов такая потенциально эффективная система усиления квантовой секреции АХ находится в подавленном (замаскированном) состоянии? Помимо описанного выше негативного влияния на L-тип  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов со стороны  $\text{Ca}^{2+}$ -активируемых  $\text{K}^+$ -каналов (ВК-каналов), мы исследовали возможную связь ряда иных тормозных механизмов, участвующих в подавлении активности  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов L-типа.

### **3.1.4.1. Регуляторные контуры, подавляющие активность $\text{Ca}^{2+}$ -каналов L-типа в моторных синапсах мышцы**

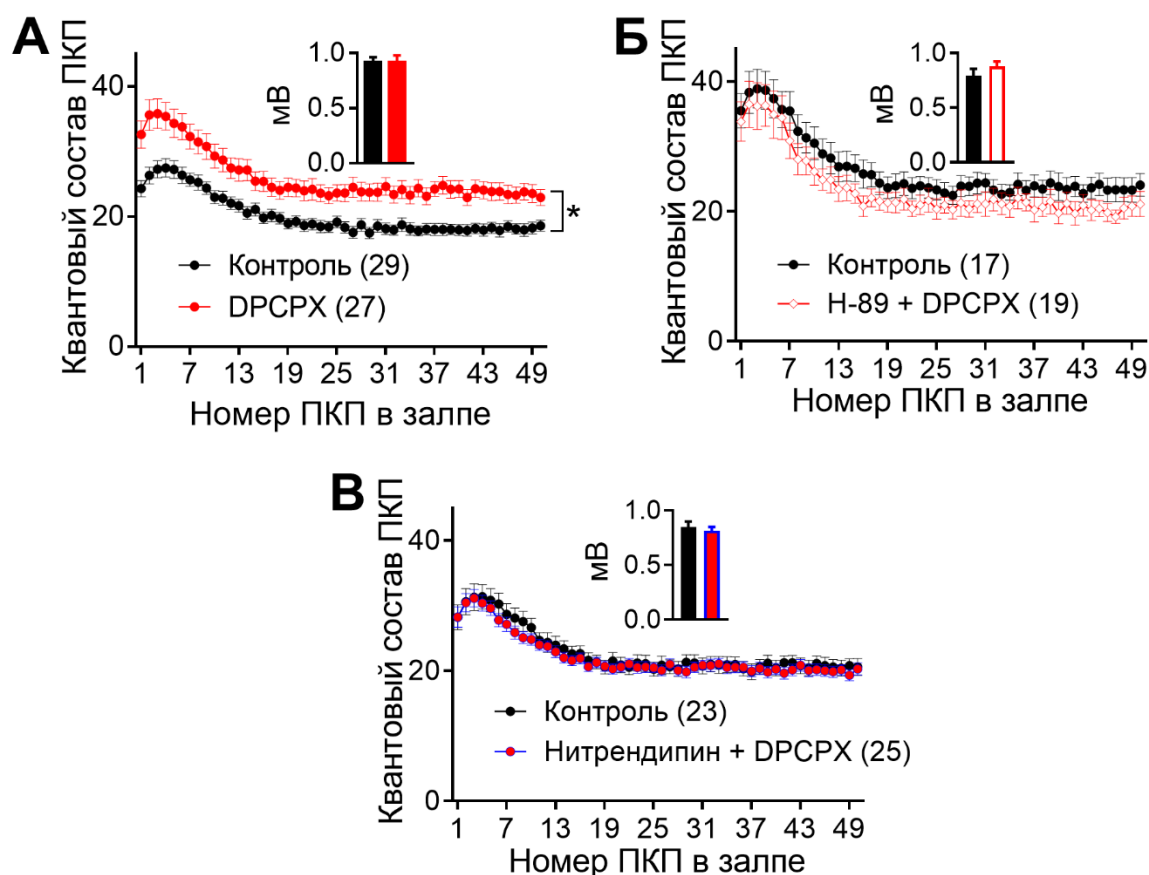
По данным литературы, в моторных синапсах имеется ряд мощных ауторегуляторных тормозных и облегчающих контуров, связанных с активацией разных типов пуринорецепторов АТФ и аденозином [Burnstock, 2007; Sokolova et al., 2003; Todd, Robitaille, 2006; Tomàs et al., 2014]. Финальные мишени этих регуляторных контуров малоизучены.

#### **3.1.4.1.1. Роль аденозиновых $A_1$ -рецепторов в подавлении активности $\text{Ca}^{2+}$ -каналов L-типа**

В составе нервных терминалей моторных синапсов млекопитающих описан целый комплекс пресинаптических аденозиновых рецепторов –  $A_1$ -,  $A_{2A}$ - и  $A_3$ -подтипов [Cinalli et al., 2013; Garcia et al., 2013]. Все эти рецепторы – метаботропные, и под воздействием эндогенного аденозина могут оказывать противоположные влияния на секрецию АХ - как тормозные (с участием  $A_1$  и  $A_3$ ), так и облегчающие (с участием  $A_{2A}$ ) [Correia-de-Sá et al., 2000; Correia-De-Sá et al., 1996; Correia-de-Sá et al., 1991; Nagano et al., 1992; Perissinotti, Uchitel, 2010].

Блокирование  $A_1$ -рецепторов при помощи ДРСРХ (100 нМ) вызывало равномерный прирост амплитуды и квантового состава первого и последующих ПКП в коротком ритмическом залпе на 26-30% (рис. 14А). Это свидетельствует, что в моторных синапсах в условиях коротких ритмических залпов имеет место тоническая активация  $A_1$ -рецепторов эндогенным аденозином, приводящая к подавлению вызванной секреции АХ. Механизм такого тормозного действия аденозина на квантовую секрецию АХ в моторных синапсах млекопитающих связывали с угнетением пресинаптических  $\text{Ca}^{2+}$ -токов через P/Q-тип  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов [Silinsky, 2004], хотя в качестве одной из возможных конвергентных мишеней как  $A_1$ -, так и  $A_{2A}$ -рецепторов рассматривают и  $\text{Ca}^{2+}$ -каналы L-типа [Oliveira, Correia-De-Sá, 2005; Oliveira et al., 2004]. По данным литературы,  $A_1$ -рецепторы

преимущественно сопряжены с  $G_{i/o}$ -белками, тормозящими функционирование аденилатциклазы, и их активация уменьшает активность РКА [Chen et al., 1989]. В присутствии ингибитора РКА Н-89 (1 мкМ) блокирование  $A_1$ -рецепторов с помощью ДРСРХ не приводила к увеличению амплитуды и квантового состава ПКП в залпе (рис. 14Б). Далее мы установили, что блокатор L-типа  $Ca^{2+}$ -каналов нитрендипин (10 мкМ) предотвращает равномерный прирост квантового состава ПКП в залпе под действием ДРСРХ (рис. 14В).



**Рис. 14.** Аденозиновые  $A_1$ -рецепторы тормозят активность L-типа  $Ca^{2+}$ -каналов и препятствуют потенцированию вызванной секреции АХ. (А) Изменение квантового состава ПКП по ходу залпа в контроле и под действием блокатора  $A_1$ -рецепторов ДРСРХ (100 нМ). (Б) Ингибирование РКА Н-89 (1 мкМ) предотвращает потенцирующее действие ДРСРХ на вызванную ритмическую секрецию АХ. (В) На фоне нитрендипина (10 мкМ) ДРСРХ утрачивает свое потенцирующее действие на вызванный выброс АХ. На врезках – амплитуда МПКП. В скобках – количество синапсов в соответствующих группах. \*- $p < 0.05$

Совокупность полученных данных позволяет предположить, что при выключении активности  $A_1$ -рецепторов с помощью DPCPX происходит не только усиление функционирования каскада аденилатциклаза→РКА, но и растормаживание  $Ca^{2+}$ -каналов L-типа как мишени РКА, активность которой находится под негативным контролем со стороны  $A_1$ -рецепторов.

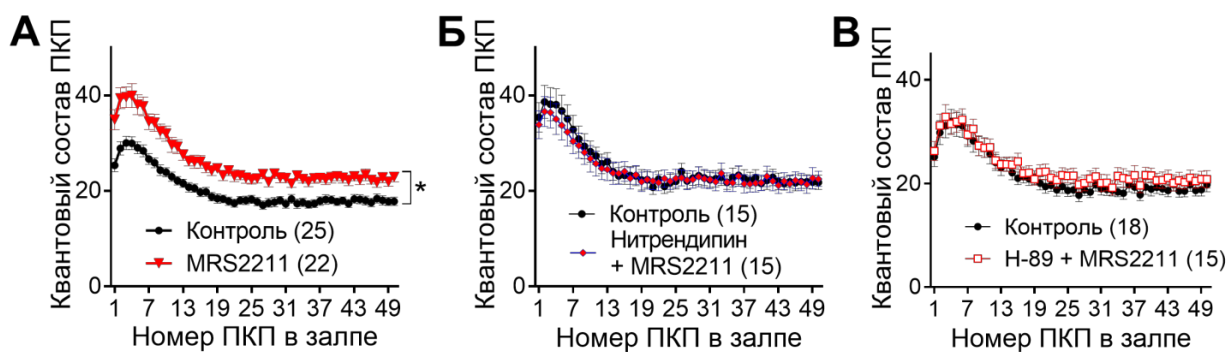
#### **3.1.4.1.2. Роль P2Y<sub>13</sub>-рецепторов АТФ в подавлении активности Ca<sup>2+</sup>-каналов L-типа**

Наряду с аденозином, синаптическую передачу в моторных синапсах способны регулировать и котрансмиттер АХ АТФ, и промежуточные продукты гидролиза АТФ. Все они задействуют несколько типов пуринорецепторов, включая недавно описанные на моторных нервных терминалях мыши P2Y<sub>13</sub>-рецепторы [Guarracino et al., 2016].

Мы установили, что селективный антагонист P2Y<sub>13</sub>-рецепторов MRS2211 (10 мкМ) увеличивает амплитуду и квантовый состав ПКП по всему ходу короткого ритмического залпа (рис. 15А). При этом, как и в случае с блокированием  $A_1$ -рецепторов с помощью DPCPX, потенцирующий квантовую секрецию АХ эффект MRS2211 полностью предотвращался блокированием L-типа кальциевых каналов нитрендипином (10 мкМ) или РКА с помощью Н-89 (1 мкМ) (рис. 15Б,В).

Таким образом, L-тип  $Ca^{2+}$ -каналов является мишенью для реализации тормозного действия на секрецию АХ со стороны P2Y<sub>13</sub>-рецепторов, как и в случае влияний на этот  $Ca^{2+}$ -вход со стороны  $A_1$ -аденозиновых рецепторов.

Такое своеобразное «дублирование» сигнальных контуров позволяет обеспечить устойчивое угнетение активности L-типа  $Ca^{2+}$ -каналов вне зависимости от того, что будет являться действующим сигналом – АТФ сразу после появления в синаптической щели (например, при экзоцитозе синаптических везикул), или образующийся в результате гидролиза АТФ аденозин.



**Рис. 15.** P2Y<sub>13</sub>-рецепторы АТФ тормозят вызванный выброс АХ, препятствуя активации L-типа Ca<sup>2+</sup>-каналов. (А) Изменение квантового состава ПКП по ходу залпа в контроле и под действием блокатора P2Y<sub>13</sub>-рецепторов MRS2211 (10 мкМ). (Б) Блокирование L-типа Ca<sup>2+</sup>-каналов нитрендипином (10 мкМ) предотвращает потенцирующее действие MRS2211 на выброс АХ. (В) В присутствии ингибитора РКА Н-89 (1 мкМ) MRS2211 утрачивает свое потенцирующее действие на вызванный выброс АХ. В скобках – количество синапсов в соответствующих группах. \*-p < 0.05

Считается, что физиологическое значение такого действия пуринов проявляется в виде аутокринного торможения секреции квантов АХ, что позволяет поддерживать работу моторных синапсов в режиме высоких нагрузок [Giniatullin, Sokolova, 1998; Ziganshin et al., 2020].

### 3.1.4.1.3. Роль Ca<sup>2+</sup>-зависимой фосфатазы кальцинейрина (CaN) в подавлении активности L-типа Ca<sup>2+</sup>-каналов

Кальцинейрин (CaN) – активируемая Ca<sup>2+</sup>/CaM серин-треониновая фосфатаза, описанная практически во всех типах клеток [Rusnak, Mertz, 2000], с высоким уровнем экспрессии в нейронах и синапсах, где при функционировании происходят динамические изменения внутриклеточной концентрации ионов Ca<sup>2+</sup>. Выявлена активность CaN в синапсах ЦНС и непосредственное участие этой фосфатазы в синаптической пластичности, регуляции ионных каналов и рецепторов, экзо- и эндоцитоза синаптических везикул и других синаптических процессах [Fassio et al., 2016; Hell, 2016; Herzig, Neumann, 2000; Reyes-García, Escobar, 2021; Sun et al., 2010; Yakel, 1997]. В то же время, вклад CaN в регуляцию квантовой секреции АХ в моторных синапсах млекопитающих практически не изучен.

Сначала, для выявления присутствия и активности CaN в синапсах диафрагмы мышцы регистрировали изменения в секреции АХ при действии двух ингибиторов CaN – циклоспорина А (CsA, 1 мкМ), в комплексе с циклофилинами блокирующего каталитический центр CaN [Li et al., 2011] и кальцинейрин-ингибирующего пептида (CN412, 2.3 мкМ), с последовательностью аминокислот, аналогичной аутоингибирующему домену CaN [Sago et al., 1996].

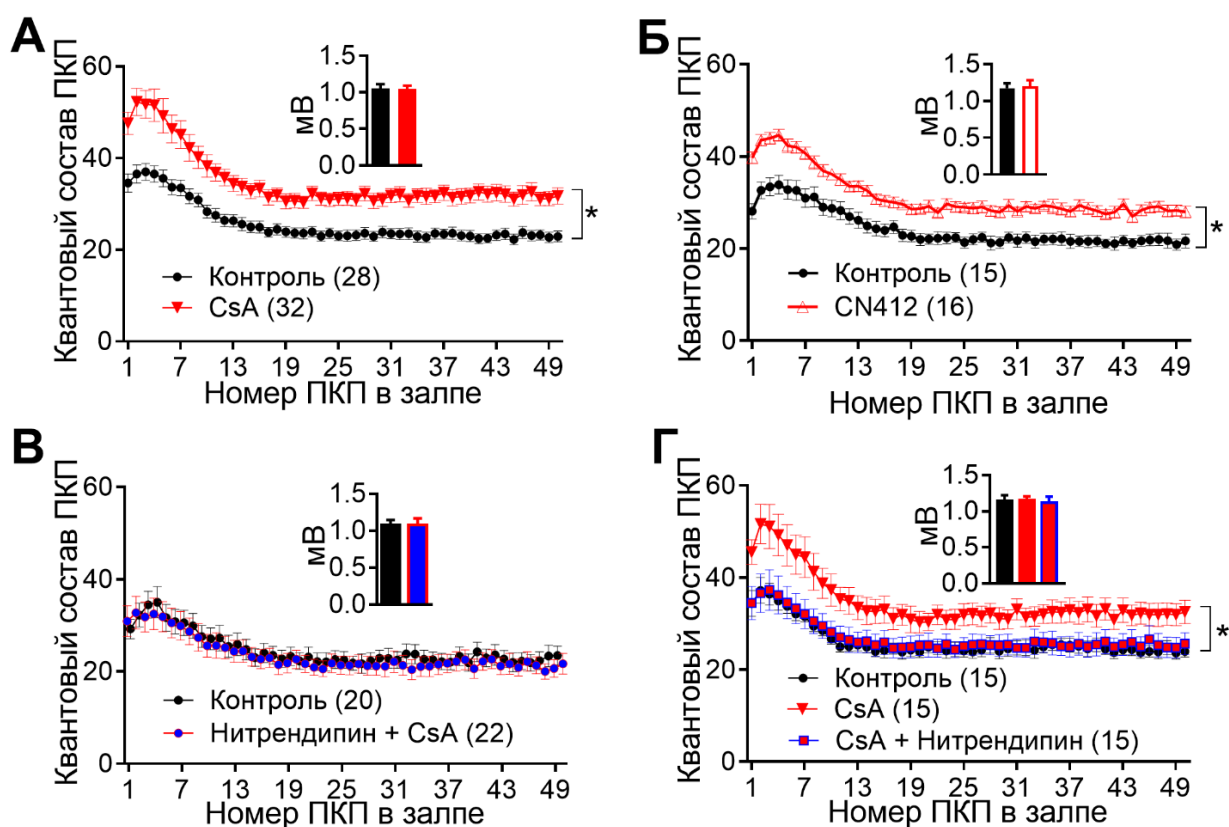
Мы установили, что оба ингибитора CaN вызывают сходный эффект – на их фоне амплитуда первого ПКП в залпе увеличивалась за счет возрастания квантового состава ПКП, и этот потенцирующий эффект сохранялся на протяжении всего залпа ПКП (рис. 16А,Б).

Полученные данные позволяют утверждать, что в нервных терминалях моторных синапсов присутствует активность CaN, направленная на торможение квантовой секреции АХ в условиях вызванной активности синапсов. Равномерный характер потенцирования залповой активности моторных синапсов при ингибировании CaN напоминал таковой при растормаживании Ca<sup>2+</sup>-каналов L-типа.

Действительно, оказалось, что блокирование L-типа Ca<sup>2+</sup>-каналов нитрендипином (1 мкМ) либо полностью предотвращает потенцирующее действие CsA на ПКП в залпе, либо возвращает к контрольным значениям потенцированные под действием CsA амплитуду и квантовый состав ПКП (рис. 16В,Г).

Активатор Ca<sup>2+</sup>-каналов L-типа S(-) Bay K8644 (1 мкМ) вызывал увеличение квантового состава одиночных ПКП на 34% ( $43.92 \pm 6.79$ ,  $n = 15$ ) по сравнению с контролем ( $30.22 \pm 1.65$ ,  $n = 20$ ,  $p < 0.05$ ), а воздействие 1 мкМ CsA в присутствии S(-) Bay K8644 не вызывало статистически значимого изменения квантового состава ПКП ( $43.96 \pm 2.58$ ,  $n = 17$ ,  $p > 0.05$ ) по сравнению с действием только S(-) Bay K8644. Это свидетельствует о том, что в условиях, когда L-тип Ca<sup>2+</sup>-каналов предварительно расторможен фармакологически, происходит окклюзия эффекта ингибирования CaN.





**Рис. 16.** В моторных синапсах существует активность фосфатазы CaN, направленная на торможение вызванного выброса АХ и активности L-типа  $Ca^{2+}$ -каналов. (А) Изменение квантового состава ПКП по ходу залпа в контроле и под действием ингибитора CaN CsA (1 мкМ). (Б) Изменение квантового состава ПКП по ходу залпа в контроле и под действием ингибитора CaN CN412 (2.3 мкМ) (В) Блокирование L-типа  $Ca^{2+}$ -каналов нитрендипином (1 мкМ) предотвращает потенцирующее действие CsA на вызванный выброс АХ в коротком залпе. (Г) Изменение квантового состава ПКП по ходу залпа в контроле, под действием CsA и при действии нитрендипина в присутствии CsA. На врезках – амплитуда МПКП. В скобках – количество синапсов в соответствующих группах. \*- $p < 0.05$ .

Совокупность полученных данных позволяет утверждать, что именно L-тип  $Ca^{2+}$ -каналов является тем  $Ca^{2+}$ -входом в моторную терминаль, который подавлен в норме под действием CaN, и растормаживается («демаскируется») при ингибировании этой фосфатазы. Таким образом, тоническое тормозное действие на L-тип  $Ca^{2+}$ -каналов со стороны CaN играет равноценную по значимости роль в поддержании L-типа  $Ca^{2+}$ -каналов в неактивном состоянии

наряду с активностью  $K^+$ -тока ВК-каналов, а также – активностью тормозных метаботропных пуриновых рецепторов.

### **3.1.4.2. Регуляторные контуры, облегчающие активность $Ca^{2+}$ -каналов L-типа в моторных синапсах мышцы**

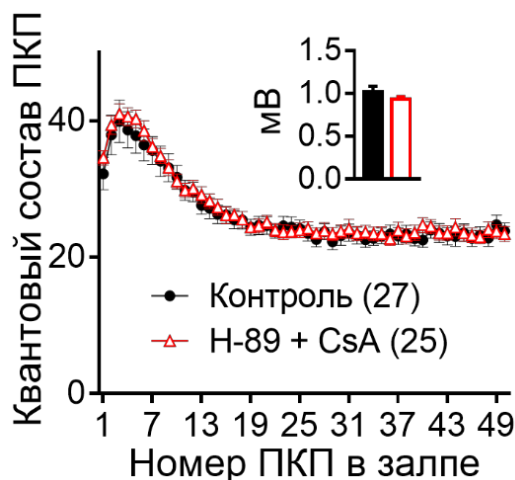
Функциональными антагонистами фосфатаз в регуляции активности белков являются протеинкиназы [Bastan et al., 2014; Sim et al., 2003]. В ЦНС регуляция активности  $Ca^{2+}$ -каналов L-типа, наряду с CaN, как правило, осуществляется и с участием РКА, причем оба фермента могут быть локализованы в непосредственной близости к этим каналам в составе мультимолекулярных регуляторных комплексов на якорных белках АКАР [Dittmer et al., 2014; Murphy et al., 2014; Oliveria et al., 2012; Sanderson, Dell'Acqua, 2011]. Поэтому далее мы исследовали возможное взаимодействие между CaN и РКА в управлении работой  $Ca^{2+}$ -каналов L-типа в моторных синапсах.

Мы установили, что ингибирование CaN с помощью CsA (1 мкМ) не приводило к возрастанию амплитуды и квантового состава ПКП в залпах в присутствии ингибитора РКА Н-89 (1 мкМ) (рис. 17).

Эти данные, а также отсутствие при предварительно заблокированной активности РКА прироста квантового состава ПКП в результате ингибирования аденозиновых  $A_1$ -рецепторов (рис. 14Б) или P2Y<sub>13</sub>-рецепторов (рис. 15В) позволяют утверждать, что в моторных терминалях РКА действительно задействована в регуляции L-типа  $Ca^{2+}$ -каналов, противоборствуя одновременно существующей активности CaN, аденозиновых  $A_1$ -рецепторов и P2Y<sub>13</sub>-рецепторов.

Очевидно, что в моторных синапсах мышцы существует баланс разнонаправленных воздействий на функциональное состояние  $Ca^{2+}$ -каналов L-типа, реализуемых с участием РКА и CaN. В этом балансе доминирует тормозное действие CaN, обеспечивающее, наряду с ВК-каналами и активностью  $A_1$ - и P2Y<sub>13</sub>-рецепторов (чья работа направлена на снижение

активности РКА) подавленное, «замаскированное» состояние L-типа  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов в моторных терминалях.



**Рис. 17.** Активность фосфатазы CaN препятствует усилению секреции АХ за счет сопряженной РКА-зависимой активности L-типа  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов. Изменение квантового состава ПКП по ходу залпа в контроле и под действием CsA в присутствии ингибитора РКА Н-89 (1 мкМ). На врезке – амплитуда МПКП. В скобках – количество синапсов в соответствующих группах. \* $-p < 0.05$ .

Необходимо было проверить, способно ли избирательное усиление активности РКА (независимо от присутствия и сохранения активности CaN) приводить к растормаживанию кальциевого входа через L-тип  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов и усилению выброса АХ? Мы предположили, что повышение активности РКА как фактора демаскирования L-типа  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов в нервных терминалях может привести к растормаживанию этого  $\text{Ca}^{2+}$ -входа в случае дополнительного стимулирования активности аденилатциклазы, повышающей уровень цАМФ в цитоплазме. Такое стимулирование может быть результатом активации аденозиновых  $A_{2A}$ -рецепторов, описанных в составе нервных терминалей [Correia-de-Sá et al., 2000; Oliveira, Correia-De-Sá, 2005; Oliveira et al., 2004].

### 3.1.4.2.1. Роль $A_{2A}$ -аденозиновых рецепторов в усилении активности $Ca^{2+}$ -каналов L-типа

Селективный антагонист  $A_{2A}$ -рецепторов ZM241385 (10 нМ) не вызвал статистически значимых изменений ни параметров спонтанной активности моторных синапсов, ни амплитуды и квантового состава ПКП на всем протяжении короткого залпа. Это могло свидетельствовать о том, что при выбранном режиме работы моторных синапсов мышцы в виде коротких залпов активация эндогенным аденозином  $A_{2A}$ -рецепторов недостаточна для воздействия на вызванную квантовую секрецию АХ. Однако предварительное блокирование  $A_{2A}$ -рецепторов оказалось способно полностью предотвратить усиление вызванной секреции АХ при ингибировании CaN CsA (1 мкМ) (рис. 18А).

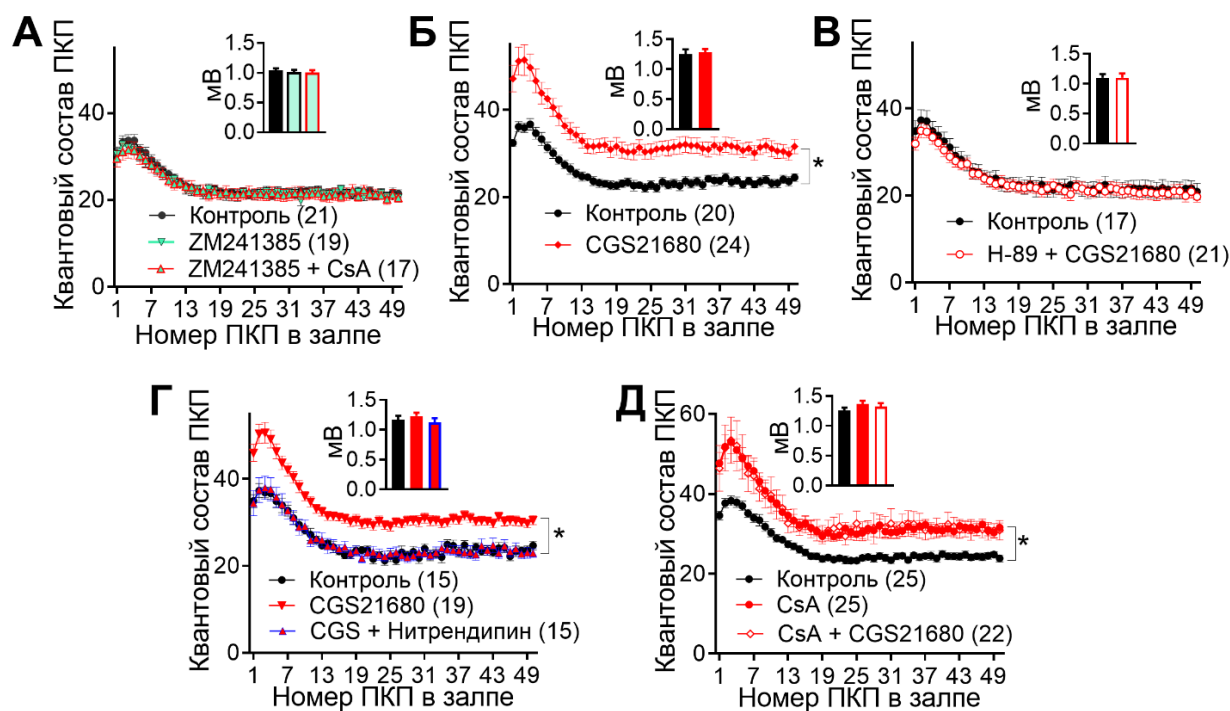
Дополнительная фармакологическая активация  $A_{2A}$ -рецепторов с помощью их агониста CGS21680 (1 мкМ) оказала эффект, аналогичный действию блокатора  $A_1$ -рецепторов или ингибитора CaN. Под действием CGS21680 происходило равномерное увеличение амплитуды и квантового состава ПКП в залпе, типичное для растормаживания L-типа  $Ca^{2+}$ -каналов (рис. 18Б).

Ингибирование РКА Н-89 (1 мкМ) или блокирование L-типа  $Ca^{2+}$ -каналов нитрендипином (1 мкМ) – все эти воздействия приводили к исчезновению облегчающего эффекта CGS21680 на выброс АХ (рис. 18В,Г). При этом CGS21680 в условиях, когда L-тип  $Ca^{2+}$ -каналов предварительно «демаскирован» за счет ингибирования CaN, не вызывал дополнительного усиления вызванной квантовой секреции АХ (рис. 18Д).

Таким образом, мы установили, что сигнальный каскад, обеспечивающий потенцирование вызванной секреции АХ при активации  $A_{2A}$ -рецепторов, включает в себя «растормаживание»  $Ca^{2+}$ -каналов L-типа с участием РКА.

В совокупности, полученные нами данные говорят о том, что при работе моторных синапсов происходит постоянная функционально значимая активация  $A_{2A}$ -рецепторов эндогенным аденозином, индуцирующая

повышение активности РКА. Такая активация не оказывает видимого воздействия на вызванный выброс АХ, но является обязательной для растормаживания  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов L-типа в случае ослабления тонических тормозных влияний на этот тип каналов со стороны  $\text{A}_1$ - и  $\text{P}_2\text{Y}_{13}$ -рецепторов и/или со стороны CaN.



**Рис. 18.** Потенцирование вызванной квантовой секреции АХ при активации  $\text{A}_2\text{A}$ -аденозиновых рецепторов реализуется за счет сопряженной РКА-регулируемой активности L-типа  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов. (А) Изменение квантового состава ПКП по ходу залпа в контроле, под действием антагониста  $\text{A}_2\text{A}$ -рецепторов ZM241385 (10 нМ) и при действии ингибитора CaN CsA (1 мкМ) в присутствии ZM241385. (Б) Агонист  $\text{A}_2\text{A}$ -рецепторов CGS21680 (1 мкМ) равномерно увеличивает квантовый состав ПКП в коротком ритмическом залпе. (В) Ингибитор РКА H-89 (1 мкМ) предотвращает потенцирующее действие CGS21680. (Г) Изменение квантового состава ПКП по ходу залпа в контроле, под действием CGS21680 и при действии нитрендипина в присутствии CGS21680. (Д) Окклюзия облегчающих вызванную секрецию АХ эффектов ингибирования CaN (CsA) и активации  $\text{A}_2\text{A}$ -рецепторов (CGS21680). На врезках – амплитуда МПКП. В скобках – количество синапсов в соответствующих группах. \*- $p < 0.05$ .

Таким образом, в нашей работе впервые показано, что обычно «молчащий» пресинаптический  $\text{Ca}^{2+}$ -вход по L-типу  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов находится

под совокупным контролем целого ряда одновременно действующих как облегчающих ( $A_{2A}$ -рецепторы и РКА), так и (обычно доминирующих) тормозных (CaN,  $A_1$ - и P2Y<sub>13</sub>-рецепторы) воздействий. Эта впервые выявленная нами в моторных терминалях многокомпонентная регуляция  $Ca^{2+}$ -входа по L-типу  $Ca^{2+}$ -каналов сходна с ранее описанной сложной и неоднозначной метаболической зависимостью активности L-типа  $Ca^{2+}$ -каналов и в других возбудимых клетках [Dittmer et al., 2014; Hudmon et al., 2005; Qian et al., 2017; Topolnik et al., 2009].

Обнаруженное нами дублирование систем потенциальной негативной регуляции L-типа  $Ca^{2+}$ -каналов вероятнее всего связано с тем, что может различаться пространственно-временной паттерн появления в синаптической щели каждого из эндогенных активаторов (АХ, АТФ и аденозина) разных типов метаботропных рецепторов (соответственно, M1-/M2-, P2Y<sub>13</sub> и  $A_1/A_{2A}$ ). Это позволяет создать в синапсах комплексную и пролонгированную избирательную активацию сигнальных путей, функционирующих сходно либо параллельно (подавление РКА, активирование CaN), и которые надежно препятствуют вовлечению  $Ca^{2+}$ -каналов L-типа в регуляцию секреции АХ. При этом наличие регуляторных контуров не только для снижения активности аденилатциклазного сигнального каскада, но и подключение других сигнальных путей (за счет вероятной активации M1-,  $A_{2A}$ -рецепторов) позволяет потенциально не только препятствовать, но и промотировать (при определенных условиях) вовлечение L-типа  $Ca^{2+}$ -каналов в регуляцию секреции АХ в моторных синапсах.

В завершении проведенных в нашей работе исследований роли L-типа  $Ca^{2+}$ -каналов важно отметить следующие моменты. Несмотря на данные, полученные при экспериментах на синапсах ЦНС [Fourcaudot et al., 2009; Rey et al., 2020; Subramanian, Morozov, 2011], в целом пресинаптические  $Ca^{2+}$ -каналы L-типа являются особенностью именно периферических моторных синапсов, а их роль в терминалях синапсов ЦНС как функционально значимых

регуляторов секреции нейротрансмиттеров достаточно ограничена. В связи с этим, именно в одиночных моторных синапсах очевидна особая роль этого  $\text{Ca}^{2+}$ -входа и специфических способов его регуляции с помощью комплекса контуров обратной связи с участием пресинаптических рецепторов для АТФ и аденозина. Контур обратной связи для регуляции секреции нейротрансмиттеров с участием пресинаптических ауторецепторов хорошо известны и в синапсах ЦНС. Однако там они, как правило, обеспечивают тонкую настройку основного  $\text{Ca}^{2+}$ -входа и функционирования ансамбля белков, обеспечивающего экзоцитоз синаптических везикул.

Наши исследования впервые показали, что в моторных терминалях аналогичные контуры, как выяснилось, могут быть нацелены на контроль не только и не столько триггерного  $\text{Ca}^{2+}$ -входа, сколько на отслеживание активности дополнительного  $\text{Ca}^{2+}$ -входа - обычно «молчащих»  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов L-типа. Низкий порог активации этих  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов и их высокая  $\text{Ca}^{2+}$ -проводимость делает их принципиально легко вовлекаемыми в регуляцию работы нервных терминалей моторных синапсов в виде своеобразной активности, способной избыточно повышать  $\text{Ca}^{2+}$ -нагрузку нервных терминалей. Именно поэтому, видимо, существуют продублированные механизмы удерживания этих каналов от их активного включения в контролирование вызванной квантовой секреции АХ при нормальной работе моторных синапсов. В то же время предусмотренное «аварийно включение» именно L-типа  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов в случае ослабления триггерного  $\text{Ca}^{2+}$ -входа, сопровождающегося дефицитом секреции АХ и нервно-мышечной передачи, призвано поддержать секрецию АХ, причем по собственным механизмам, не имеющим место при обычном функционировании выброса квантов АХ, запускаемого за счет входа ионов  $\text{Ca}^{2+}$  по триггерному P/Q-типу  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов.

Совокупный анализ всех полученных данных позволяет выдвинуть гипотезу, согласно которой присущий одиночным нервно-мышечным синапсам  $\text{Ca}^{2+}$ -вход по L-типу  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов, по-видимому, выполняет роль

резервной (страховочной) системы поддержания секреции АХ в случае ее ослабления.

Наряду с представленными в нашей работе фактами и собственными результатами, данные литературы также подтверждают это представление: именно в случаях существенного ослабления активности P/Q-типа  $Ca^{2+}$ -каналов в моторных терминалях мышцы при миастенических синдромах [Giovannini et al., 2002], или при избыточно длительной и интенсивной активности моторных терминалей [Perissinotti et al., 2008] наблюдается компенсаторное растормаживание L-типа  $Ca^{2+}$ -каналов как своеобразного страховочного механизма поддержания необходимого уровня нервно-мышечной передачи через одиночный моторный синапс.

### **3.2. Роль пресинаптических рианодиновых рецепторов (РиР) и выброса депонированного $Ca^{2+}$ в регуляции квантовой секреции АХ в моторных синапсах**

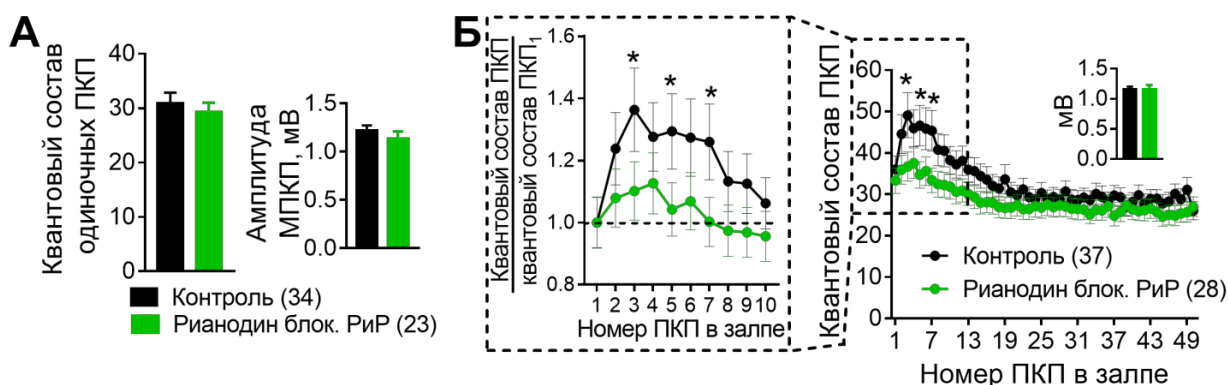
В нервных терминалях моторных синапсов млекопитающих показано наличие цистерн ЭР, выполняющих функцию  $Ca^{2+}$ -депо и содержащих в своих мембранах внутриклеточные  $Ca^{2+}$ -каналы - рианодиновые рецепторы (РиР). РиР при их активации ионами  $Ca^{2+}$  или рианодином способны обеспечивать  $Ca^{2+}$ - или рианодин-чувствительный выброса депонированного  $Ca^{2+}$ , способного по-разному модулировать спонтанную и вызванную секрецию АХ при разных условиях работы синапсов [Балезина, 2002; Balezina, Bukiya, 2001, 2003; Балезина и др., 2004; Balezina, Lapteva, 2007; Gerasimova et al., 2013; Khaziev et al., 2016; Khuzakhmetova et al., 2014; Nishimura et al., 1990; Pagani et al., 2006; Palma et al., 2011]. В нашей работе мы сосредоточились на выявлении условий вовлечения в активность РиР (и выброса депонированного  $Ca^{2+}$ ) при активации различных пресинаптических  $Ca^{2+}$ -входов и на последствиях этих взаимодействий для секреции АХ.



### 3.2.1. Блокирование РнР Са<sup>2+</sup>-депо рианодином и его последствия для квантовой секреции АХ

Рианодин в высоких (2-3 мкМ) дозах, блокирующих РнР Са<sup>2+</sup>-депо терминалей моторных синапсов [Fill, Copello, 2002], не вызывал статистически значимых изменений параметров МПКП, а также - амплитуды и квантового состава одиночных ПКП (рис. 19А).. По-видимому, при одиночных нервных импульсах (с частотой 0.3 Гц) в актах Са<sup>2+</sup>-зависимой вызванной секреции АХ выброс депонированного Са<sup>2+</sup> не принимает выраженного участия.

Однако в условиях кратковременной высокочастотной (50 Гц, 1 с) ритмической активности синапсов рианодин (2-3 мкМ) вызывал снижение начального облегчения в залпе по сравнению с контролем (рис. 19Б).



**Рис. 19.** (А) Квантовый состав ПКП и амплитуда МПКП при одиночной стимуляции нерва (0.3 Гц) в контроле и при действии рианодина в блокирующей РнР концентрации (2 мкМ). (Б) Блокирование РнР рианодином снижает выраженность облегчения в начале короткого залпа ПКП. На врезках: слева – отношение квантового состава первых 10 ПКП в начале ритмического залпа в контроле и на фоне рианодина (2 мкМ) к первому ПКП в каждой группе; справа – амплитуда МПКП. В скобках – количество синапсов в соответствующих группах. \*-p < 0.05.

Полученные данные о вкладе эндогенной активности РнР пресинаптических Са<sup>2+</sup>-депо в развитие облегчения синаптической передачи в начале залпа ПКП созвучны результатам, ранее полученным на кураризированном нервно-мышечном препарате диафрагмы мыши [Balezina, Vukiya, 2003].

Традиционно развитие начального облегчения синаптической передачи (возрастание амплитуд ПКП в начале залпа по сравнению с первым ПКП) связывают с увеличением уровня остаточного  $\text{Ca}^{2+}$ , накапливающегося при работе в составе активных зон  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов (в случае нервно-мышечных синапсов млекопитающих - P/Q-типа) [Jackman, Regehr, 2017; Katz, Miledi, 1968; Laghaei, Meriney, 2022; Mochida et al., 2008].

Считается, что остаточный  $\text{Ca}^{2+}$  увеличивает вероятность выброса отдельных синаптических везикул в активных зонах [Jackman, Regehr, 2017]. Наши данные позволяют предположить, что, наряду с появлением около синаптических везикул ионов  $\text{Ca}^{2+}$ , входящих снаружи по триггерным  $\text{Ca}^{2+}$ -каналам P/Q-типа, расположенные поблизости отделы ЭР, содержащие РиР, и опосредуемый РиР  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимый выброс депонированного  $\text{Ca}^{2+}$  - также могут участвовать в развитии  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимого начального облегчения синаптической передачи при высокочастотной ритмической активности моторных синапсов. Это может свидетельствовать о локализации ЭР в моторных нервных терминалях мышцы около активных зон и о возможности  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой активации РиР в таких участках ЭР за счет работы P/Q-типа  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов (напомним, что L-тип  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов, находясь под разнообразным подавляющим воздействием, в этих условиях «замаскирован»).

Вместе с тем, наши данные свидетельствуют, что  $\text{Ca}^{2+}$ -активируемый выброс ионов  $\text{Ca}^{2+}$  через РиР, во-первых, не оказывает выраженных воздействий на одиночные акты вызванного выброса АХ. Во-вторых, при кратковременной ритмической активности РиР-опосредованный выброс депонированного  $\text{Ca}^{2+}$ , индуцируемый и сопряженный с  $\text{Ca}^{2+}$ -входом по  $\text{Ca}^{2+}$ -каналам P/Q-типа, хоть и принимает участие в развитии начального облегчения, но такая его активность, направленная на усиление вызванного выброса квантов АХ – весьма ограничена и кратковременна.

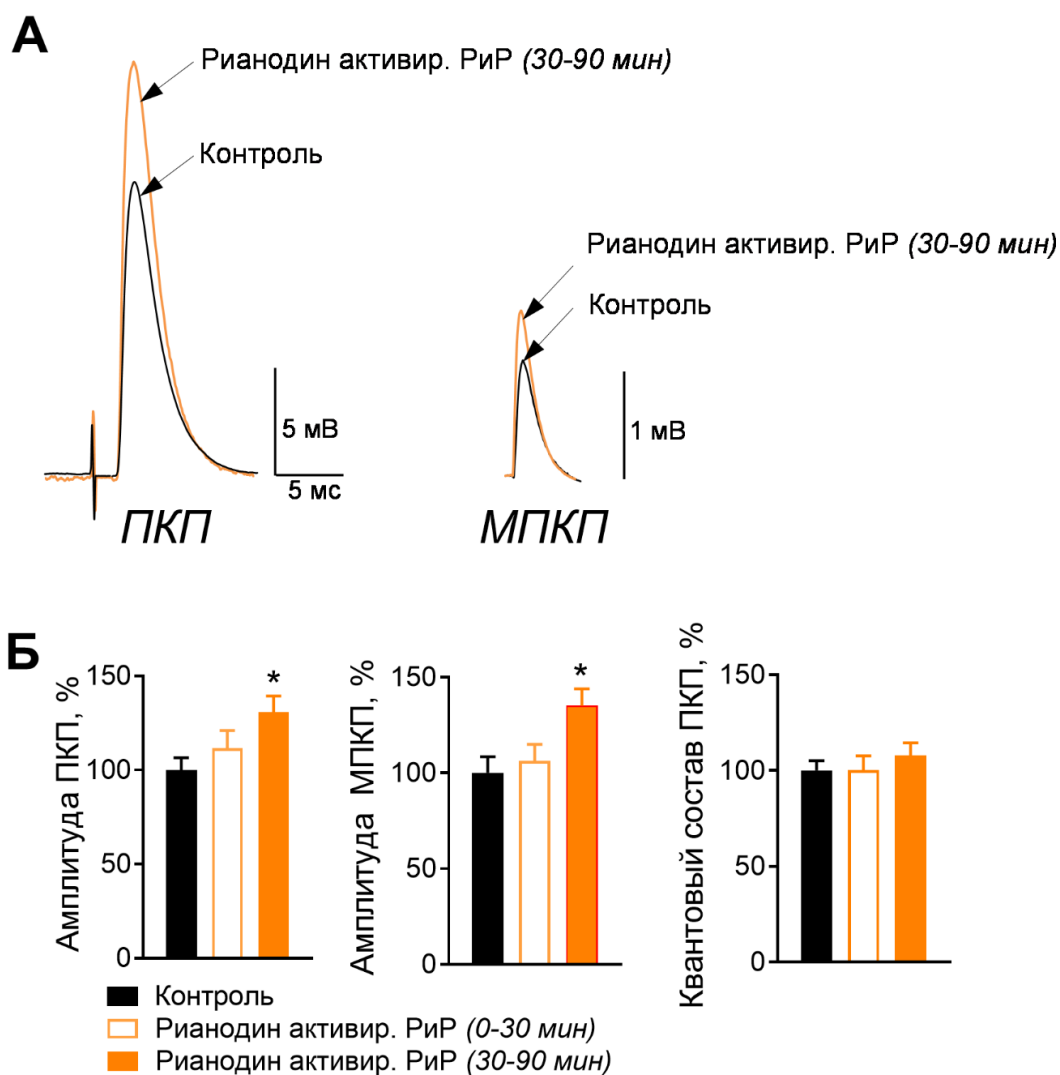
Мы предположили, что эффективность и продолжительность сигнальной функции  $\text{Ca}^{2+}$ -депо (регуляторного действия депонированного  $\text{Ca}^{2+}$  на экзоцитоз синаптических везикул), может меняться от нагрузки ЭР ионами

$\text{Ca}^{2+}$ , которая, в свою очередь, зависит от режима поступления ионов  $\text{Ca}^{2+}$  в активные зоны снаружи (от продолжительности активности синапсов), длительности активации РИР и последующего выброса депонированного  $\text{Ca}^{2+}$ . В связи с этим, далее была предпринята попытка пролонгированного удерживания пресинаптических РИР в открытом состоянии за счет прямой активации РИР рианодинем. Известно, что в субмикромольной концентрации рианодин, действуя на РИР, обеспечивает их стабилизацию в полупроводящем состоянии, обеспечивая продолжительную утечку ионов  $\text{Ca}^{2+}$  из депо [Балезина, 2002; Gerasimova et al., 2015; Zucchi, Ronca-Testoni, 1997].

### **3.2.2. Активация РИР $\text{Ca}^{2+}$ -депо рианодинем и его последствия для квантовой секреции АХ**

Активация РИР рианодинем (0.1 мкМ) в условиях одиночной стимуляции нерва (0.3 Гц) не вызывала увеличения амплитуды ПКП в течение первых 30 минут аппликации рианодина – от  $25.87 \pm 2.18$  мВ в контроле ( $n = 40$ ) до  $27.45 \pm 2.29$  мВ ( $n = 18$ ,  $p > 0.05$ ), но значение этого параметра статистически значимо увеличивалось при действии рианодина в интервале 30-90 минут до  $34.94 \pm 2.28$  мВ ( $n = 27$ ,  $p < 0.05$ ). Амплитуда МПКП менялась сходным образом – возрастала от  $1.08 \pm 0.07$  мВ в контроле до  $1.20 \pm 0.10$  мВ ( $p > 0.05$ ) в течение первых 30 минут аппликации рианодина с последующим увеличением на 30% до  $1.41 \pm 0.10$  мВ ( $p < 0.05$ ) в течение последующих 60 минут. При этом квантовый состав ПКП оставался неизменным – в контроле он составил  $24.09 \pm 1.24$ , в течение первых 30 минут присутствия рианодина -  $24.14 \pm 1.81$  и сохранился на этом же уровне ( $26.00 \pm 1.55$ ,  $p > 0.05$ ) на фоне действия рианодина в интервале 30-90 минут (рис. 20).

Дополнительное исследование на «нерассеченных» нервно-мышечных препаратах диафрагмы мыши только спонтанной активности моторных синапсов также выявило прирост амплитуды МПКП на 30%, выявляемый, начиная с 30й по 90ю минуты аппликации 0.1 мкМ рианодина – от  $1.36 \pm 0.06$  мВ в контроле ( $n = 23$ ) до  $1.75 \pm 0.06$  мВ ( $n = 28$ ,  $p < 0.05$ ) (рис. 21А,Б).



**Рис. 20.** Активация РиР рианодином (0.1 мкМ) вызывает увеличение амплитуд одиночных вызванных ПКП и МПКП. (А) Примеры оригинальных записей одиночных вызванных ПКП и отдельных МПКП в контроле и в присутствии рианоидина в течение 30-90 минут. (Б) Изменение амплитуд ПКП, амплитуд МПКП и квантового состава ПКП, нормализованных к контролю (принят за 100 %), под действием рианоидина. В скобках – количество синапсов в соответствующих группах. \*- $p < 0.05$ .

При этом график кумулятивной вероятности распределения амплитуд МПКП сдвигался в присутствии 0.1 мкМ рианоидина (30-90 минут) вправо, в сторону более высокоамплитудных значений (рис. 21Б). Это свидетельствует, что активация РиР вызывает прирост амплитуд во всей популяции МПКП, а не в какой-либо ее отдельной фракции.

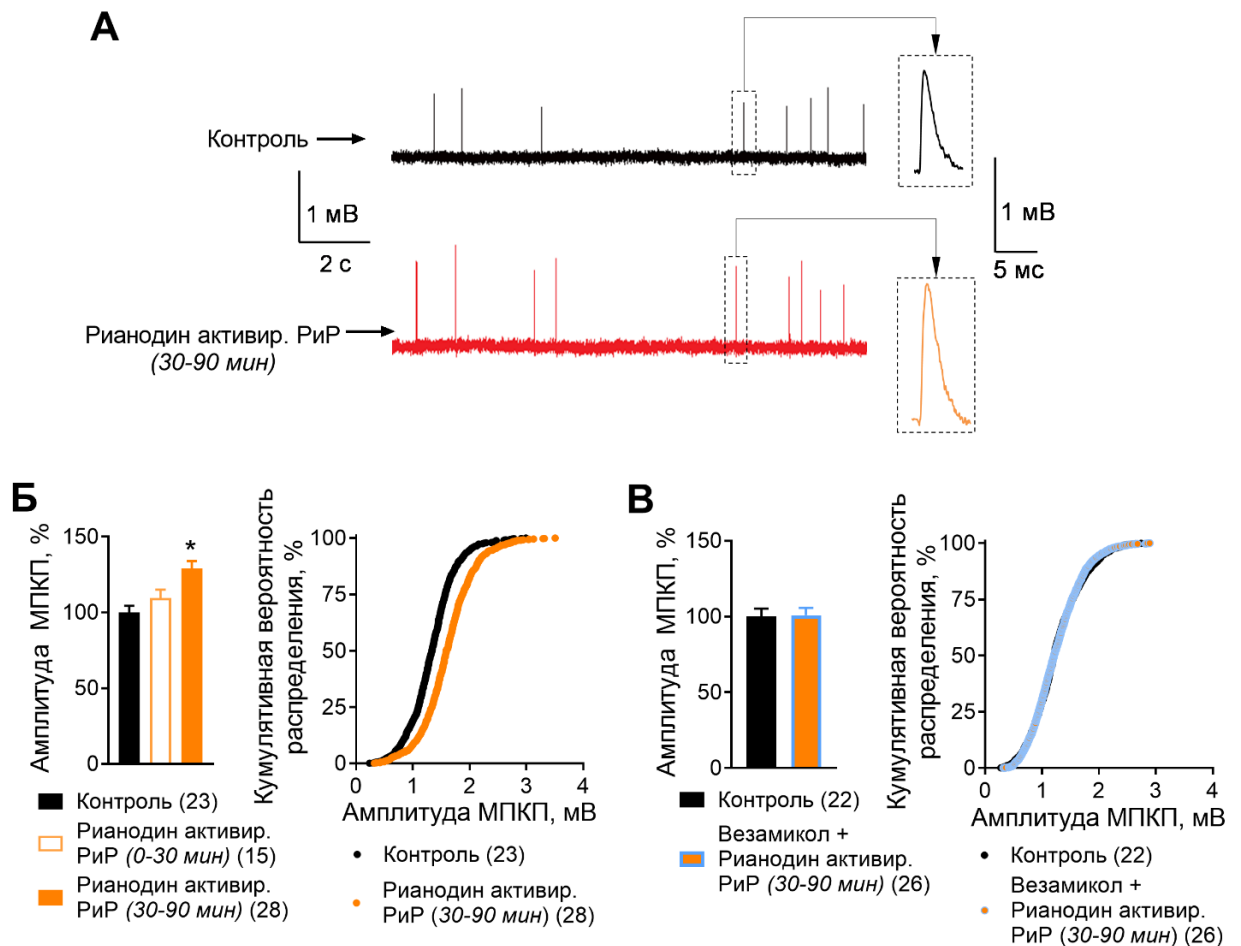
В отличие от амплитуды, под действием рианоидина не было зарегистрировано статистически значимых изменений частоты МПКП по

сравнению с контролем ( $0.57 \pm 0.05$  Гц) – она составила  $0.58 \pm 0.06$  Гц ( $p > 0.05$ ). Это было ожидаемо, поскольку активация РнР рианодинom может влиять на частоту МПКП только при дополнительной предварительной деполяризации и входе ионов  $Ca^{2+}$  через потенциалзависимые  $Ca^{2+}$ -каналы нервных окончаний [Balezina et al., 2004; Nishimura et al., 1990].

Параметры, характеризующие временной ход МПКП, также не менялись под действием активирующего РнР рианодинa: время нарастания МПКП (10% - 90%) составило  $0.86 \pm 0.03$  мс в контроле и  $0.83 \pm 0.03$  мс ( $p > 0.05$ ) в присутствии рианодинa, время полуспада МПКП было  $2.29 \pm 0.07$  мс и  $2.40 \pm 0.07$  мс в контроле и на фоне рианодинa, соответственно ( $p > 0.05$ ).

Рианодин-индуцированный прирост амплитуд МПКП полностью предотвращался при прямом блокировании везикулярного транспортера АХ везамиколом (1 мкМ). В контроле амплитуда МПКП составила  $1.25 \pm 0.07$  мВ ( $n = 22$ ), под действием рианодинa в присутствии везамикола -  $1.28 \pm 0.06$  мВ ( $n = 26$ ,  $p > 0.05$ ), при этом сдвиг графика кумулятивной вероятности распределения амплитуд МПКП отсутствовал (рис. 21В). Сам везамикол в микромолярной концентрации не оказывает статистически значимых изменений амплитуд миниатюрных постсинаптических потенциалов и токов в условиях длительного действия [Fong et al., 2010; Gaydukov, Balezina, 2006].

Совокупность полученных данных позволяет предполагать, что в основе прироста амплитуды МПКП при активации РнР рианодинom (в субмикромолярной концентрации) лежит увеличение размера квантов АХ, а прирост амплитуд мультиквантовых ПКП при стимуляции РнР (сопровождаемой высвобождением депонированного  $Ca^{2+}$ ) происходит не за счет увеличения квантового состава ПКП, а за счет возрастания размеров отдельных квантов АХ и, соответственно, средней амплитуды МПКП (при сохранении неизменными других постсинаптических параметров, таких как МП и входное сопротивление мышечных волокон, реактивность мышечных нХР).



**Рис. 21.** Активация РиР рианоудином (0.1 мкМ) вызывает увеличение амплитуды МПКП за счет прироста размера квантов АХ. (А) Примеры оригинальных записей МПКП в контроле (вверху) и на фоне 0.1 мкМ рианоидина (внизу), на врезке – увеличенные примеры МПКП. (Б) Изменение амплитуд МПКП, нормализованных к контролю (принят за 100 %), под действием рианоидина. Сдвиг вправо, в область более высокоамплитудных значений, графика кумулятивной вероятности распределения амплитуд МПКП под действием рианоидина ( $p < 0.05$ ). (В) Блокирование везикулярного транспортера АХ везамиколом (1 мкМ) предотвращало возрастание амплитуд МПКП и сдвиг вправо графика кумулятивной вероятности распределения амплитуд МПКП под действием рианоидина ( $p > 0.05$ ). В скобках – количество синапсов в соответствующих группах. \* -  $p < 0.05$ .

Нами была выдвинута гипотеза о том, что активация пресинаптических РиР и стимулируемый рианоудином выброс  $Ca^{2+}$  из депо в моторных терминалях вызывает  $Ca^{2+}$ -зависимую секрецию эндогенного кальцитонин-ген родственного пептида (КГРП), запасаемого в электронно-плотных

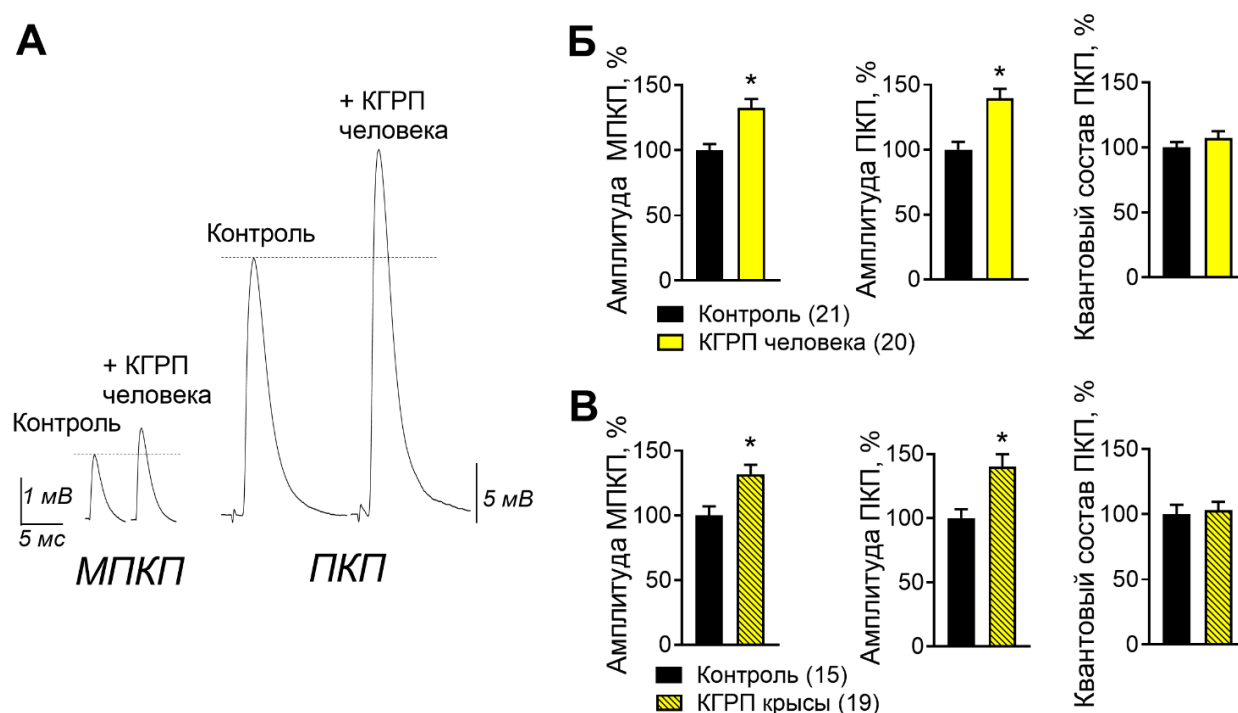
везикулах в моторных нервных терминалях [Csillik et al., 1993; Matteoli et al., 1988]. Считается, что данный нейропептид, состоящий из 37 аминокислот, может выделяться как котрансмиттер при продолжительной деполяризации мембраны или интенсивной вызванной синаптической активности [Sakaguchi et al., 1991; Sala et al., 1995; Uchida et al., 1990].

КГРП, оказавшись в синаптической щели, мог бы вызывать прирост амплитуды постсинаптических потенциалов за счет своего пресинаптического аутокринного действия, приводящего к увеличению размера квантов АХ. В нервно-мышечном синапсе лягушки при аппликации экзогенного КГРП было описан устойчивый рост амплитуды МПКП, и было сделано заключение, что, наряду с хорошо известной трофической ролью этого пептида в нервно-мышечной системе, он может обладать еще и важной краткосрочной аутокринной функцией, заключающейся в его пресинаптическом действии и потенцировании размера квантов АХ [Van der Kloot et al., 1998].

Исходя из вышеизложенного, было выдвинуто предположение, что в моторных синапсах млекопитающих (мыши) нейрогенный КГРП, высвобождаясь  $Ca^{2+}$ -зависимым способом из нервных терминалей под действием депонированного  $Ca^{2+}$ , и оказавшись в синаптической щели, мог бы обеспечивать возрастание амплитуд МПКП и ПКП за счет своего пресинаптического аутокринного действия, приводящего к увеличению размера квантов АХ.

Для подтверждения возможного участия КГРП в регуляции размера кванта АХ в моторных синапсах не только у лягушки, но и у мыши, было проведено тестирование эффектов экзогенного КГРП в отношении параметров синаптической активности в моторных синапсах мыши. Аппликация в течение 1 часа экзогенного КГРП (100 нМ) – изоформы пептида, экспрессируемой у человека, не вызвала изменений временных характеристик и частоты МПКП, но, как и под действием рианодина в активирующей РнР концентрации, привела к возрастанию их амплитуд от  $1.32 \pm 0.06$  мВ в контроле ( $n = 21$ ) до  $1.74 \pm 0.09$  мВ ( $n = 20$ ,  $p < 0.05$ ). Прирост амплитуд МПКП под действием

КГРП человека сопровождался статистически значимым возрастанием амплитуд одиночных ПКП – от  $27.71 \pm 1.67$  мВ в контроле до  $38.67 \pm 2.06$  мВ ( $p < 0.05$ ), при оставшемся неизменным квантовым составе ПКП (контроль -  $21.06 \pm 0.86$ , КГРП человека -  $22.61 \pm 1.09$ ) (рис. 22А,Б). Использование изоформы КГРП, экспрессируемой у крыс и мышей, оказало на спонтанную и одиночную вызванную секрецию квантов АХ эффект, аналогичный тому, который вызывал КГРП человека – возрастание амплитуд МПКП и одиночных вызванных ПКП на 30-40% по сравнению с контролем (рис. 22В).



**Рис. 22.** Изоформы КГРП человека и крысы сходным образом увеличивают амплитуду спонтанных и вызванных постсинаптических потенциалов в моторных синапсах мышцы (А). Примеры оригинальных записей отдельных МПКП и одиночных вызванных ПКП в контроле и на фоне 100 нМ КГРП человека. (Б) Изменение амплитуд МПКП, амплитуд ПКП, и квантового состава ПКП под действием КГРП человека. (В) Изменение амплитуд МПКП, амплитуд ПКП, и квантового состава ПКП под действием КГРП крысы. Амплитуды МПКП и ПКП и квантовый состав ПКП нормализованы к контролю (принят за 100%). В скобках – количество синапсов в соответствующих группах. \*- $p < 0.05$ .

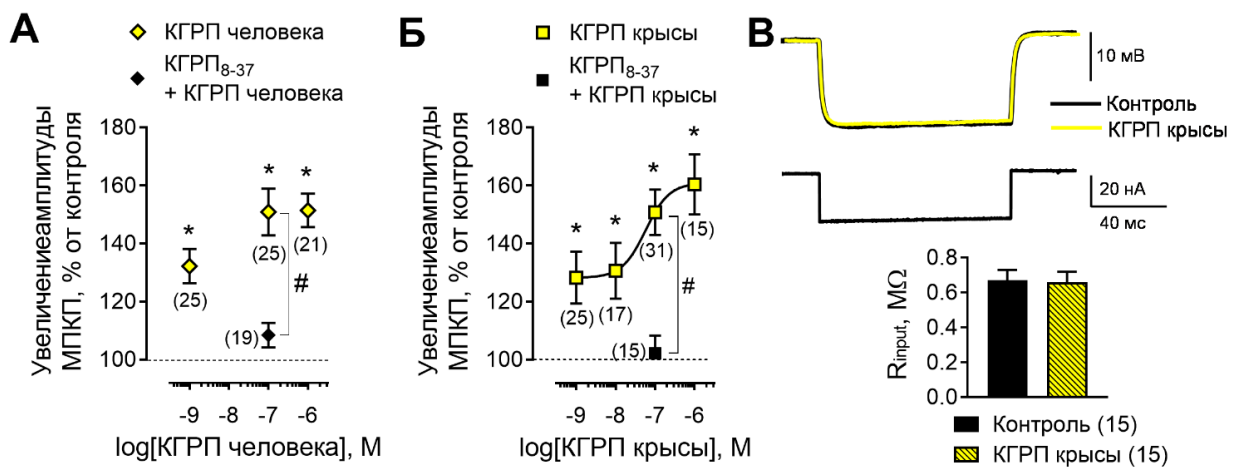


Исследования механизма действия КГРП на «нерассеченных» нервно-мышечных препаратах выявили дозозависимость потенцирующего эффекта изоформ КГРП. Максимальное значение прироста амплитуд МПКП составило 150-160% от контроля (рис. 23А,Б) и не сопровождалось изменением временных характеристик МПКП и их частоты. Определенное сходство в проявлении физиологических эффектов у изоформ КГРП из разных классов позвоночных описано в литературе [Poynier, 1992], и это связано с тем, что аминокислотные различия между разными изоформами не приводят к принципиальным изменениям трехмерной структуры КГРП, препятствующим связыванию пептида с рецепторным комплексом и его активации [Watkins et al., 2013].

У разных видов первичная структура лиганд-связывающей части КГРП-рецепторов имеет очень высокую степень гомологии – 91-96% и видоспецифичность их активации мало различается у полноразмерных пептидов из разных видов позвоночных [Poynier et al., 2002]. По всей видимости, именно этим обусловлена показанная аналогичность действия КГРП крысы (мышь) и человека в моторных синапсах мышцы. Для проверки рецепторного действия КГРП использовали в качестве блокаторов КГРП-рецепторов усеченные молекулы (КГРП<sub>8-37</sub>) 2соответствующих изоформ пептида, функционирующие в качестве конкурентных антагонистов, связывающихся сильнее с КГРП-рецепторами, чем с рецепторами к амилину или адреномедуллину [Hay et al., 2017]. Обе формы КГРП<sub>8-37</sub>, сами не влияя на параметры спонтанной секреции АХ, полностью предотвращали индуцированный КГРП человека или крысы прирост амплитуд МПКП (рис. 23А,Б), что свидетельствует о специфическом рецепторном действии изоформ КГРП.

Увеличение амплитуд постсинаптических потенциалов под действием КГРП могло быть пресинаптическим (за счет увеличения размера квантов АХ), но могло быть и результатом постсинаптических процессов, например, возрастания входного сопротивления мышечных волокон в зоне синапсов.

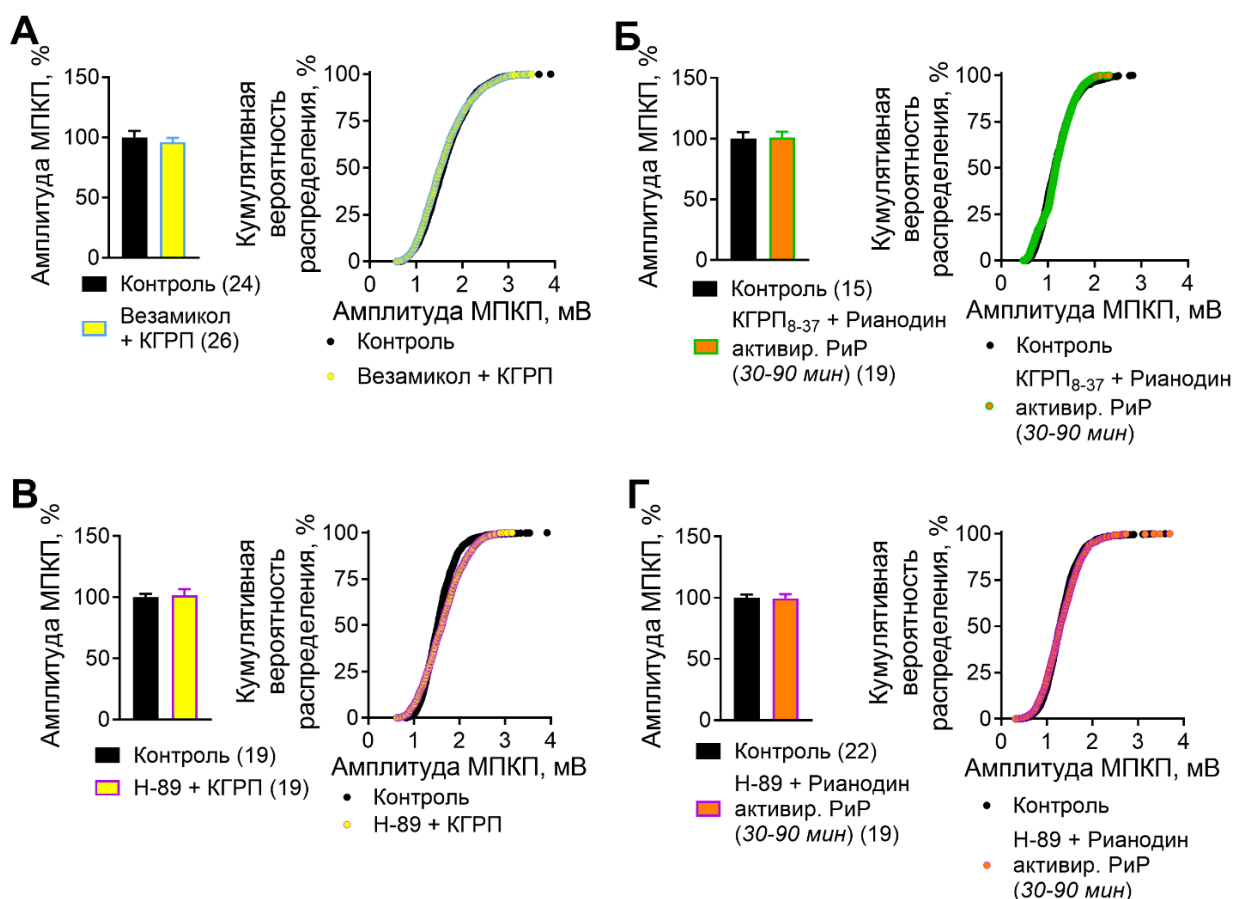
Такой эффект проявляет в моторных синапсах трансформирующий ростовой фактор  $\beta$  [Fong et al., 2010]. Входное сопротивление мышечных волокон под действием КГРП крысы (мышы) в максимальной из использованных концентраций (1 мкМ) составило  $0.66 \pm 0.06$  М $\Omega$  (n = 15), что не отличалось от контрольных значений  $0.67 \pm 0.06$  М $\Omega$  (n = 15, p > 0.05) (рис. 23В). Такая величина этого параметра согласуется с имеющимися в литературе данными для диафрагмы мышы [Galkin et al., 2001].



**Рис. 23.** Дозозависимое потенцирующее влияние на амплитуду МПКП изоформ КГРП обеспечивается за счет его рецепторного действия и не связано с возрастанием входного сопротивления мышечных волокон. (А) Увеличение средней амплитуды МПКП под действием КГРП человека. Блокатор КГРП-рецепторов - усеченный пептид КГРП<sub>8-37</sub> человека (1 мкМ) предотвращал потенцирующее действие КГРП человека. (Б) Увеличение средней амплитуды МПКП под действием КГРП крысы. Блокатор КГРП-рецепторов КГРП<sub>8-37</sub> крысы (1 мкМ) предотвращал потенцирующее действие КГРП крысы. (В) Сдвиги МП в контроле и в присутствии 1 мкМ КГРП крысы в ответ на гиперполяризующие прямоугольные импульсы тока при двухэлектродной регистрации сигналов (вверху). Входное сопротивление мышечных волокон в контроле и под действием КГРП (1 мкМ) (внизу). Амплитуды МПКП нормализованы к контролю (принят за 100%). В скобках – количество синапсов в соответствующих группах. \* - p < 0.05 по отношению к контролю. # - p < 0.05.

Как и в случае действия 0.1 мкМ рианоцина (рис. 21В), экзогенный КГРП крысы (1 мкМ) полностью утрачивал способность увеличивать

амплитуду МПКП в присутствии везамикола (1 мкМ) (рис. 24А). Прирост амплитуды МПКП под действием как экзогенного КГРП (рис. 23А,Б), так и активирующего РиР рианолина предотвращался блокированием КГРП-рецепторов с помощью усеченной формы нейропептида (КГРП<sub>8-37</sub>, 1 мкМ) (рис. 24Б) или ингибированием РКА с помощью Н-89 (1 мкМ) (рис. 24В,Г).



**Рис. 24.** (А) КГРП крысы (1 мкМ) утрачивал способность увеличивать амплитуду МПКП при блокировании везикулярного транспортера АХ везамиколом (1 мкМ). (Б) КГРП<sub>8-37</sub> крысы (1 мкМ) предотвращал прирост амплитуд МПКП под действием рианолина. (В) Ингибитор РКА Н-89 (1 мкМ) предотвращал прирост амплитуды МПКП под действием КГРП крысы (1 мкМ). (Г) Ингибитор РКА Н-89 (1 мкМ) предотвращал прирост амплитуды МПКП под действием стимулирующего РиР рианолина (0.1 мкМ) На гистограммах амплитуды МПКП нормализованы к контролю (принят за 100%). В скобках – количество синапсов в соответствующих группах.

Предотвращение везамиколом потенцирующего влияния на амплитуду постсинаптических потенциалов как рианолина в стимулирующей РиР

концентрации, так и экзогенного КГРП - является убедительным свидетельством того, что в обоих случаях возрастание амплитуд МПКП и ПКП происходит именно за счет роста размера квантов АХ в моторных нервных терминалях. Об этом говорит и отсутствие статистически значимых изменений временного хода постсинаптических потенциалов при их увеличении, и неизменность входного сопротивления мышечных волокон на фоне КГРП. Вопрос об условиях выброса эндогенного КГРП в работающих моторных синапсах долгое время оставался открытым. Попытка обнаружить выраженный выброс КГРП из нервных терминалей в моторных синапсах лягушки путем длительной интенсивной  $K^+$ -деполяризации оказалась неэффективной [Van der Kloot et al., 1998]. При этом было выявлено, что стимулирование выброса депонированного  $Ca^{2+}$  через РиР в терминалях сенсорных нейронов приводит к усиленной секреции КГРП [Huang et al., 2008].

В наших исследованиях аппликация рианодина вызвала эффект, аналогичный действию экзогенного КГРП, то есть существенный прирост амплитуды МПКП. Эти данные согласуются с полученными ранее результатами, где два разных агониста РиР - кофеин и рианодин - вызывали одинаковый эффект –  $Ca^{2+}$ -зависимый прирост амплитуды МПКП, который можно было предотвратить загрузкой в моторные нервные терминали  $Ca^{2+}$ -буферов, действием везамикола или Н-89 [Skiteva et al., 2012]. Мы впервые установили, что эффект субмикромольной концентрации рианодина - в виде прироста амплитуды МПКП - устраняется при блокировании рецепторов КГРП (пептидным фрагментом КГРП<sub>8-37</sub>). Полученные данные позволяют заключить, что в нервных терминалях моторных синапсов вызываемое рианодином возрастание амплитуды МПКП – результат пресинаптического действия эндогенного КГРП, экзоцитоз которого в синаптическую щель запускается при активации выброса депонированного  $Ca^{2+}$  рианодином. В таком случае становится понятной утрата потенцирующего действия на амплитуду МПКП как КГРП, так и стимулирующего РиР рианодина при

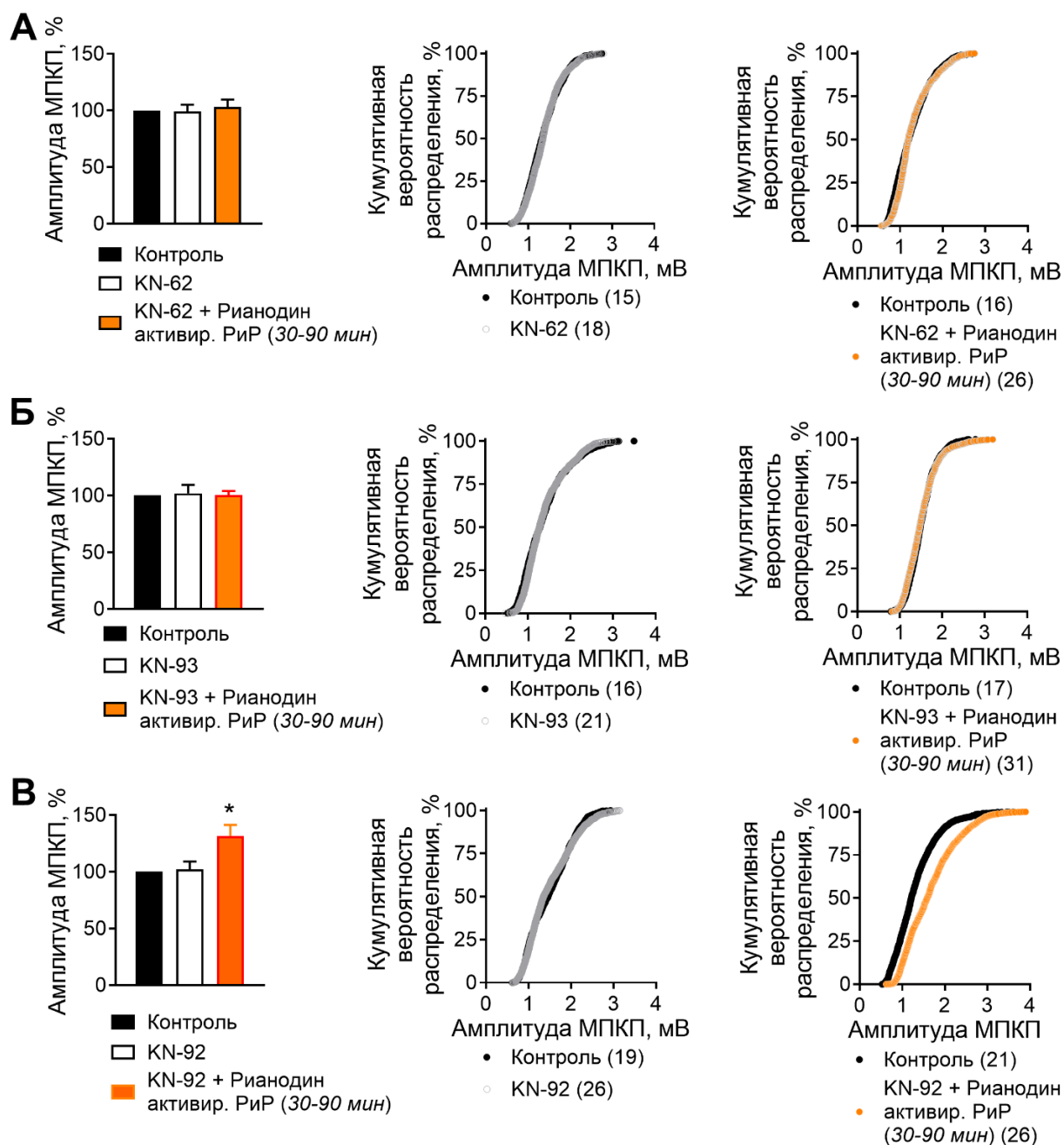
ингибированной Н-89 РКА, поскольку ранее была показана как вовлеченность этой протеинкиназы в увеличение размера кванта АХ в моторных синапсах холоднокровных и млекопитающих [Gaydukov, Balezina, 2006; Van der Kloot et al., 1998; Van der Kloot, Brănișteanu, 1992], так и ее участие в качестве основного внутриклеточного сигнального фактора, опосредующего действие КГРП [Russell et al., 2014].

Необходимо было выяснить, достаточно ли рианодин-индуцированного выброса депонированного  $Ca^{2+}$  для секреции эндогенного КГРП или для этого необходимо участие определенного  $Ca^{2+}$ -зависимого сигнального пути? В ряде нервных терминалей описаны случаи, выброс депонированного  $Ca^{2+}$  через РиР запускает активацию СаМКП [Arias-Cavieres et al., 2018; He et al., 2000; Shakiryanova et al., 2007, 2011]. Условия возможной активации этой киназы с участием депонированного  $Ca^{2+}$  в моторных терминалях мышцы были неизвестны. В связи с этим, в следующих сериях экспериментов эффекты стимулирующего РиР рианоидина исследовали на фоне действия ингибиторов СаМКП.

Мы впервые показали, что потенцирующее действие на амплитуду МПКП 0.1 мкМ рианоидина предотвращается ингибиторами СаМКП – KN-62 или KN-93 (оба – концентрации 3 мкМ), причем сами ингибиторы СаМКП, действуя в течение 90 минут (время, необходимое для проявления эффекта 0.1 мкМ рианоидина), не оказывали статистически значимого воздействия на амплитуду МПКП (рис. 25А,Б). При этом KN-92 (3 мкМ), использованный в качестве негативного контроля для KN-93, сам не оказывая какого-либо влияния на спонтанную секрецию АХ, оказался не способен предотвратить возрастание амплитуд МПКП на 30% под действием 0.1 мкМ рианоидина: от  $1.34 \pm 0.11$  мВ в контроле (n=21) до  $1.77 \pm 0.13$  мВ (n=26,  $p < 0.05$ ) (рис. 25В).

Полученные данные свидетельствуют, что в моторных синапсах диафрагмы мышцы может иметь место активация СаМКП за счет ионов  $Ca^{2+}$ , высвобождаемых из рианодин-чувствительных  $Ca^{2+}$ -депо. Впервые показано, что такая избирательная активация СаМКП является необходимой для

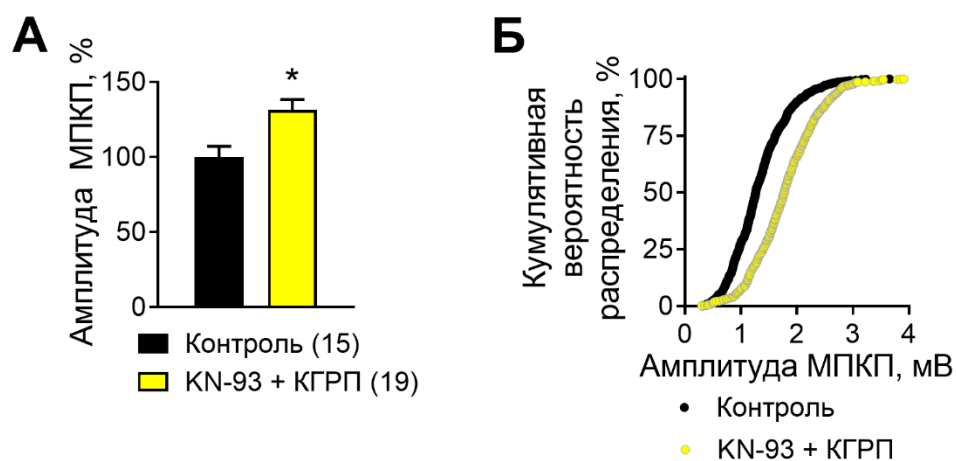
инициации секреции эндогенного КГРП, приводящего в результате своего аутокринного пресинаптического рецепторного действия к РКА-опосредованному возрастанию размера квантов АХ.



**Рис. 25.** Возрастание амплитуд МПКП при стимуляции РиР 0.1 мкМ рианодина опосредуется СаМКП (А). Средняя амплитуда МПКП (слева) и кумулятивные вероятности распределения амплитуд МПКП (в центре и справа) в контроле, под действием ингибитора СаМКП KN-62 (3 мкМ) и под действием рианодина в присутствии KN-62. (Б) Средняя амплитуда МПКП (слева) и кумулятивные вероятности распределения амплитуд МПКП (в центре и справа) в контроле, под действием

ингибитора СаМКП KN-93 (3 мкМ) и под действием рианодина в присутствии KN-93. **(В)** Средняя амплитуда МПКП (слева) и кумулятивные вероятности распределения амплитуд МПКП (в центре и справа) в контроле, под действием неактивного аналога KN-93 KN-92 (3 мкМ) и под действием рианодина в присутствии KN-92 ( $p < 0.05$ ). На гистограммах амплитуды МПКП нормализованы к контролю (принят за 100%). В скобках – количество синапсов в соответствующих группах. \*- $p < 0.05$  по отношению к контролю.

Нельзя было исключить возможность участия СаМКП не только в обеспечивании секреции эндогенного КГРП, но и сигнальном пути, развивающемся после активации КГРП-рецепторов и приводящего к увеличению амплитуды МПКП. Для исключения такой возможности был протестирован эффект экзогенного КГРП крысы (10 нМ) в присутствии ингибитора СаМКП KN-93 (3 мкМ). В отличие от предотвращающего действия KN-93 на индуцированное рианодином увеличение амплитуд МПКП, ингибирование СаМКП оказалось не способно воспрепятствовать развитию потенцирующего эффекта экзогенного КГРП на амплитуду МПКП: в контроле средняя амплитуда МПКП составила  $1.33 \pm 0.10$  мВ ( $n=15$ ) и  $1.74 \pm 0.09$  мВ ( $n = 19$ ,  $p < 0.05$ ) в присутствии КГРП и KN-93 (рис. 26).



**Рис. 26.** СаМКП не участвует в возрастании размера квантов АХ после активации КГРП-рецепторов **(А)** КГРП крысы (10 нМ) увеличивал амплитуду МПКП, несмотря на присутствие ингибитора СаМКП KN-93 (3 мкМ) **(Б)** Сдвиг вправо, в область более высокоамплитудных значений, графика кумулятивной вероятности распределения амплитуд МПКП под действием КГРП в присутствии KN-93 ( $p < 0.05$ ). На гистограммах

амплитуды МПКП нормализованы к контролю (принят за 100%). В скобках – количество синапсов в соответствующих группах. \*-p < 0.05.

Эти результаты свидетельствуют о том, что КГРП при появлении в синаптической щели и активируя КГРП-рецепторы, не использует СаМКП в качестве последующего сигнального эффектора для стимуляции закачки АХ в синаптические везикулы. В совокупности полученные данные свидетельствуют об использовании сходных механизмов реализации потенцирующих эффектов на амплитуду одноквантовых сигналов (МПКП) у экзогенного КГРП и рианодина как стимулятора выброса депонированного  $Ca^{2+}$ .

Таким образом, проведенные исследования впервые показали, что выброс депонированного  $Ca^{2+}$  в терминалях при активации РиР рианодином способен, во-первых, вызвать избирательную активацию пресинаптической СаМКП, и, во-вторых, обеспечить СаМКП-опосредованный выброс эндогенного КГРП, действующего на свои пресинаптические рецепторы и запускающего сигнальный каскад в моторной терминали с участием РКА, приводящий к увеличению размера квантов АХ.

В настоящее время известно много примеров, когда активация СаМКП происходит за счет выброса ионов  $Ca^{2+}$  из рианодин-чувствительных  $Ca^{2+}$ -депо. Такие случаи имеют место в мышечных клетках [Eigler et al., 2021], в постсинаптических участках нейронов [Kolarow et al., 2007] и в нервных окончаниях [Arias-Cavieres et al., 2018; He et al., 2000; Shakiryanova et al., 2007]. Установлено, что активированная таким образом СаМКП участвует в транспорте и секреции пептидергических электронноплотных везикул (large dense core vesicles, LDCVs) в моторных терминалях *Drosophila* [Shakiryanova et al., 2007, 2011; Wong et al., 2009].

В нашей работе впервые в моторных синапсах мышей выявлена зависимость функциональной активности пресинаптической СаМКП от



выброса депонированного  $\text{Ca}^{2+}$  и участие такой СаМКII в обеспечении секреции специализированного пула LDCVs, содержащих КГРП.

В совокупности полученные нами результаты свидетельствуют о том, что в нервно-мышечных синапсах разных видов животных существует консервативный сигнальный путь, запускаемый именно РиР-опосредованным выбросом депонированного  $\text{Ca}^{2+}$ , который в данном случае регулирует специфический процесс - экзоцитоз LDCVs с участием СаМКII.

Наряду с использованием экзогенного рианодина как избирательного активатора РиР и выброса депонированного  $\text{Ca}^{2+}$  в нервно-мышечных синапсах, недавно описаны естественные условия, при которых в моторных терминалях может происходить активация РиР (и выброс через них депонированного  $\text{Ca}^{2+}$ ), вызывающая секрецию КГРП и увеличение размера кванта АХ. В условиях высокочастотной ритмической активности моторных синапсов *m. extensor digitorum longus* и сократительной активности этой мышцы наблюдали пресинаптическое действие нейрогенного КГРП, направленное на увеличение размера кванта АХ. Секреция эндогенного КГРП и его пресинаптические эффекты требуют, наряду с сочетанной тетанической сократительной и электрической активностью нервно-мышечного препарата, обязательной активации пресинаптических РиР и выброса депонированного  $\text{Ca}^{2+}$ , поскольку увеличение размера квантов предотвращалось блокированием РиР рианодином (2 мкМ) [Bogacheva, Valezina, 2020].

Таким образом, в моторных нервных терминалях удалось выявить ряд ранее не известных регуляторных влияний  $\text{Ca}^{2+}$ -сигналов, обеспечиваемых активностью РиР  $\text{Ca}^{2+}$ -депо. Нами впервые установлено, что функциональное назначение таких специализированных  $\text{Ca}^{2+}$ -сигналов зависит не только от того, с каким именно входом ионов  $\text{Ca}^{2+}$  снаружи они оказываются структурно и функционально сопряженными, но и в каком режиме работает этот  $\text{Ca}^{2+}$ -вход.

В случае входа ионов  $\text{Ca}^{2+}$  по  $\text{Ca}^{2+}$ -каналам P/Q-типа рианодин-чувствительный выброс депонированного  $\text{Ca}^{2+}$  участвует в потенциации

секреции АХ при одиночной либо кратковременной залповой активности синапсов. Вместе с тем, в условиях длительной высокочастотной активности моторных синапсов роль  $\text{Ca}^{2+}$ -сигналов, обеспечиваемых  $\text{Ca}^{2+}$ -депо, возрастает. Впервые показано, что длительная тоническая активация утечки депонированного  $\text{Ca}^{2+}$  может быть обязательным условием для обеспечения секреции КГРП из моторных нервных терминалей.

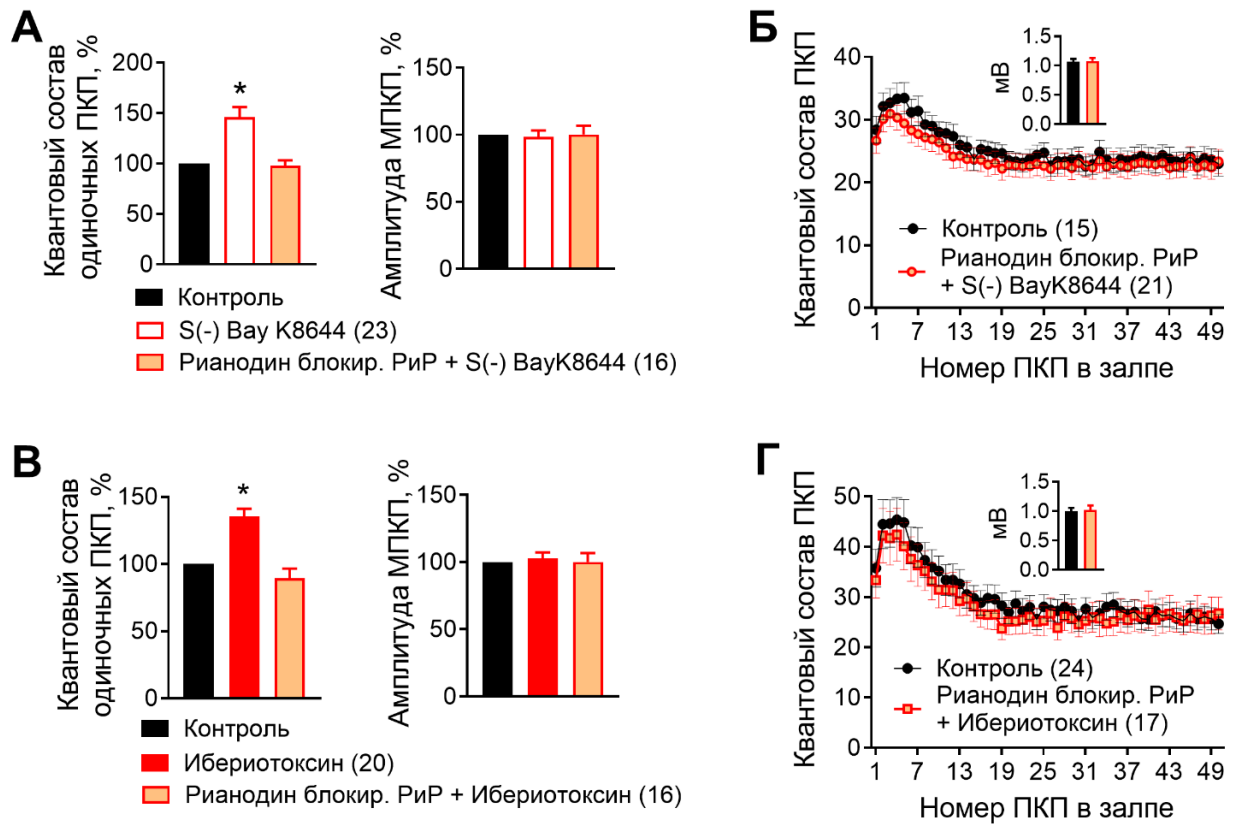
### **3.2.3. Вовлечение РиР в регуляцию квантовой секреции АХ при активации $\text{Ca}^{2+}$ -каналов L-типа**

Все описанные в современной литературе случаи участия пресинаптических РиР в секреции АХ в моторных синапсах – при деполяризации [Nishimura et al., 1990] или в условиях вызванной ритмической активности [Khuzakhmetova et al., 2014; Narita et al., 2000], предполагали  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимую активацию РиР за счет входа  $\text{Ca}^{2+}$  по триггерным  $\text{Ca}^{2+}$ -каналам P/Q-типа.

В нашей работе впервые был поставлен и решался вопрос, какую роль может играть другой  $\text{Ca}^{2+}$ -вход – по L-типу  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов - в активации рианодин-чувствительных  $\text{Ca}^{2+}$ -депо, выбросе депонированного  $\text{Ca}^{2+}$  и регуляции секреции АХ в моторных терминалях синапсов мышцы?

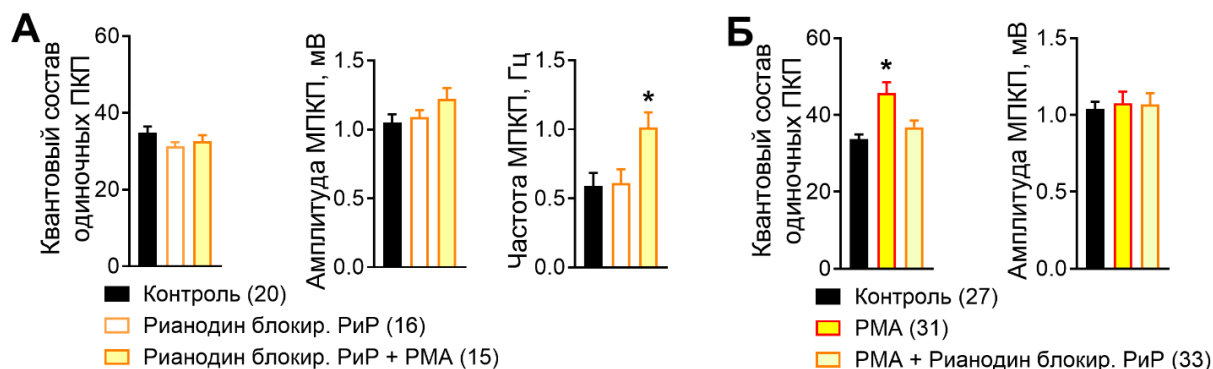
С этой целью были использованы два разных способа растормаживания активности  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов L-типа в моторных нервных терминалях – напрямую, с помощью их активатора S(-) Bay K8644, либо опосредованно, за счет блокирования  $\text{Ca}^{2+}$ -активируемых  $\text{K}^+$ -каналов BK-типа с помощью ибериотоксина. Обе процедуры приводили к сходному облегчению квантового состава одиночных и ритмически генерируемых ПКП (рис. 3, 4). Однако, блокирование РиР рианодином (2 мкМ) предотвращало увеличение амплитуды и квантового состава ПКП при активации L-типа  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов как с помощью S(-) Bay K8644, так и за счет блокирования BK-каналов при одиночной и залповой вызванной активности моторных синапсов (рис. 27).

Кроме того, необходимо было выяснить, задействована ли активность пресинаптических РиР и  $\text{Ca}^{2+}$ -депо при ранее выявленном РМА/РКС-зависимом способе растормаживания L-типа  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов (рис. 11)?



**Рис. 27.** Блокирование РиР рианоудином (2 мкМ) предотвращает потенцирующее действие растормаживания L-типа  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов на вызванную секрецию АХ (А) Квантовый состав ПКП и амплитуда МПКП при одиночной стимуляции нерва (0.3 Гц), нормированные по отношению к контролю (принят за 100%), под действием активатора  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов L-типа S(-) Вау K8644 (1 мкМ) и при действии S(-) Вау K8644 в присутствии рианоидина. (Б) Изменение квантового состава ПКП по ходу залпа в контроле и под действием S(-) Вау K8644 (1 мкМ) в присутствии рианоидина. (В) Квантовый состав ПКП и амплитуда МПКП при одиночной стимуляции нерва (0.3 Гц), нормированные по отношению к контролю (принят за 100%), под действием блокатора ВК-каналов ибериотоксина (100 нМ) и при действии ибериотоксина в присутствии рианоидина. (Г) Изменение квантового состава ПКП по ходу залпа в контроле и под действием ибериотоксина (100 нМ) в присутствии рианоидина. На врезках – амплитуда МПКП. В скобках – количество синапсов в соответствующих группах. \*-p < 0.05.

Предварительное блокирование РиР рианодинем (2 мкМ), само по себе не оказывая влияния на квантовый состав ПКП, эффективно предотвращало прирост квантового состава на фоне последующей аппликации РМА. Блокирование РиР в присутствии РМА возвращало повышенное на фоне РМА значение квантового состава ПКП к контрольному уровню (рис. 28).



**Рис. 28.** При активации пресинаптической РКС РМА (10 нМ) потенцирование вызванной секреции АХ обеспечивается за счет активации не только L-типа  $Ca^{2+}$ -каналов, но и РиР. (А) Квантовый состав ПКП, амплитуда МПКП и частота МПКП при одиночной стимуляции нерва (0.3 Гц) в контроле, при блокировании РиР рианодинем (2 мкМ), и при добавлении РМА в присутствии рианодина. (Б) Квантовый состав ПКП и амплитуда МПКП при одиночной стимуляции нерва (0.3 Гц) в контроле, под действием РМА и при блокировании РиР рианодинем (2 мкМ) в присутствии РМА. В скобках – количество синапсов в соответствующих группах. \*-р < 0.05 по сравнению с контролем.

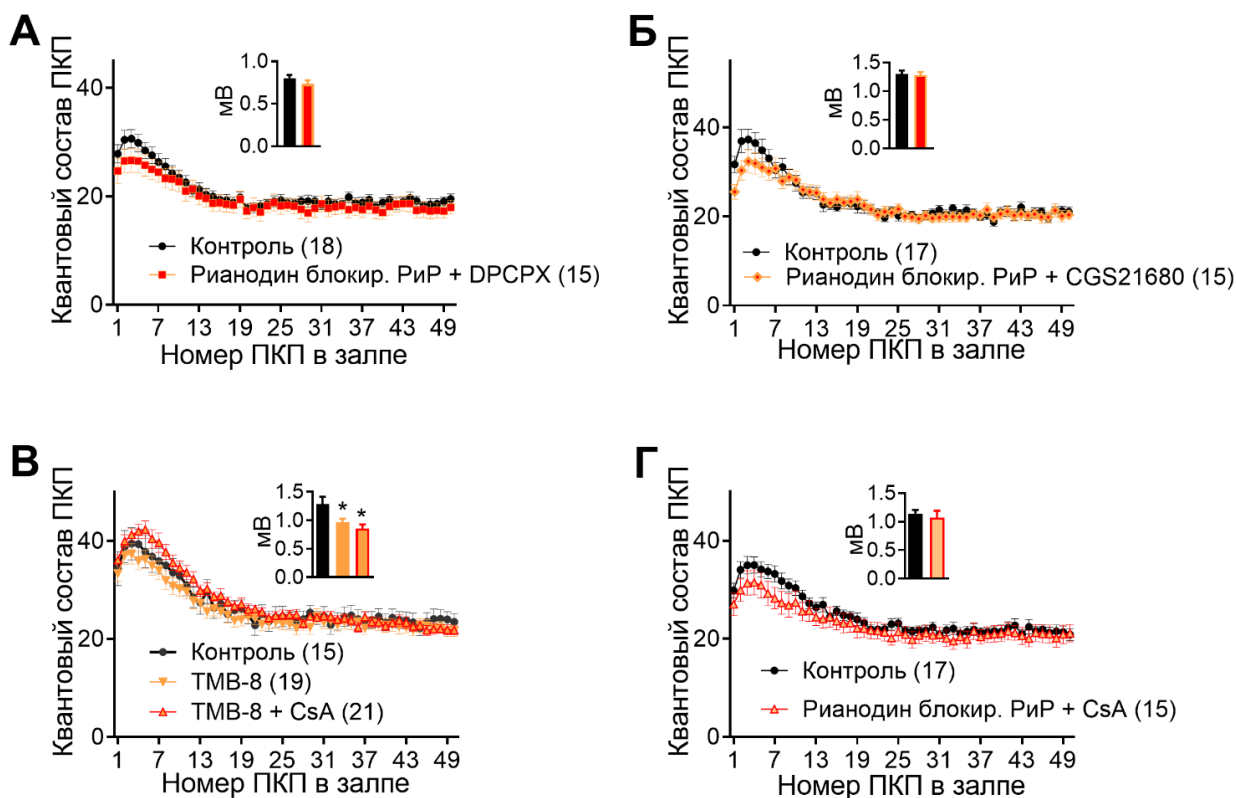
Полученные данные свидетельствуют о вовлечении функционального тандема «L-тип  $Ca^{2+}$ -каналов–РиР» в регуляцию вызванной квантовой секреции АХ при активации пресинаптической РКС форболовым эфиром.

Таким образом, мы подтвердили предположение о необходимости выброса ионов  $Ca^{2+}$  из рианодин-чувствительных  $Ca^{2+}$ -депо при потенцировании вызванной секреции квантов АХ с помощью РМА. Из этого следует, что функция РКС по поддержанию работы моторных синапсов в условиях их одиночной и залповой активности, в том случае, когда эта протеинкиназа активируется аналогом DAG, непосредственно будет связана с регуляцией выхода ионов  $Ca^{2+}$  из депо через РиР.

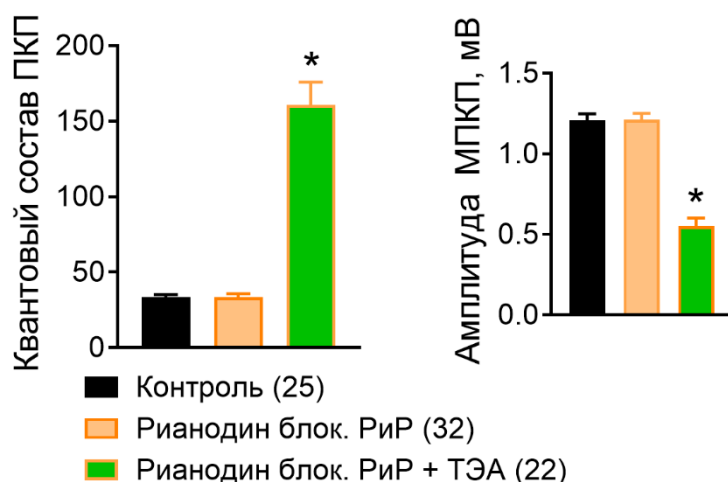
РМА является экзогенным кофактором РКС, регулирующим ее активность путем прямого взаимодействия с регуляторным С1-сайтом [Katti et al., 2022], поэтому первым участником каскада, приводящего к усилению вызванного выброса АХ при действии РМА на нервно-мышечный синапс, будет именно активированная РКС. Учитывая этот факт, можно говорить, что именно РМА-индуцированная активность РКС ведет к мобилизации  $\text{Ca}^{2+}$  из внутриклеточных  $\text{Ca}^{2+}$ -депо, а не наоборот (высвобождающийся из депо  $\text{Ca}^{2+}$  активирует РКС). Учитывая обнаруженную чувствительность усиления вызванного выброса АХ под влиянием РМА к действию нитрендипина (рис. 11), возможным сопрягающим звеном между активностью пресинаптической РКС и активацией РиР-опосредованного  $\text{Ca}^{2+}$ -входа могут быть потенциал-зависимые  $\text{Ca}^{2+}$ -каналы L-типа, тем более что выявлены сайты фосфорилирования этих каналов РКС [Arenson, Evans, 2001]. В пользу этого говорят и данные о мобилизации депонированного  $\text{Ca}^{2+}$  при растормаживании L-типа  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов (рис. 27) и способности хелеритрина нивелировать возникающее при этом потенцирование вызванной многоквантовой секреции АХ (рис. 8). Участие РиР в потенцировании вызванной секреции квантов АХ наблюдалось и при иных способах растормаживания L-типа  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов – блокировании  $\text{A}_1$ - рецепторов DPCPX, активации  $\text{A}_{2A}$ - рецепторов CGS21680 и ингибирования CaN с помощью CsA (рис. 29).

Таким образом, мы установили, что в условиях селективного усиления активности двух разных типов  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов – либо L-, либо P/Q-типа – вовлечение РиР (и выбрасываемых при этом ионов  $\text{Ca}^{2+}$  из  $\text{Ca}^{2+}$ -депо) в регуляцию секреции АХ – различно! Когда происходит потенцирование активности P/Q-типа  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов, их локализация непосредственно в активных зонах и формирование  $\text{Ca}^{2+}$ -нанодомена [Dittrich et al., 2018; Eggermann et al., 2012; Ginebaugh et al., 2022] обеспечивает узконаправленное локальное действие входящих по этим каналам ионов  $\text{Ca}^{2+}$  на  $\text{Ca}^{2+}$ -сенсоры синаптических везикул без дополнительного участия выброса депонированного  $\text{Ca}^{2+}$ . Однако, при ритмической активности моторных

синапсов, когда происходит суммация входящего по триггерному P/Q-типу  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов остаточного  $\text{Ca}^{2+}$ , увеличение  $\text{Ca}^{2+}$ -сигнала вблизи  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов P/Q-типа, достигая РиР, может вызвать кратковременный РиР-зависимый выброс депонированного  $\text{Ca}^{2+}$  из ЭР.



**Рис. 29.** РиР вовлекаются в потенцирование вызванной секреции АХ при увеличении активности L-типа  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов. (А) Блокирование РиР рианодином (3 мкМ) предотвращает потенцирование вызванной секреции АХ под действием блокатора  $\text{A}_1$ -рецепторов DPCPX (100 нМ). (Б) Блокирование РиР рианодином предотвращает потенцирующее действие агониста  $\text{A}_2\text{A}$ -рецепторов CGS21680 на квантовый состав ПКП в коротком залпе. (В) Изменение квантового состава ПКП по ходу залпа в контроле, под действием блокатора РиР ТМВ-8 (1 мкМ) и при действии ингибитора СаН CsA (1 мкМ) в присутствии ТМВ-8. Уменьшение амплитуды МПКП под действием ТМВ-8 связано со снижением на его фоне реактивности к АХ постсинаптических никотиновых холинорецепторов [Bencherif et al., 1995] (Г) Блокирование РиР рианодином (3 мкМ) предотвращает потенцирующее действие CsA на квантовый состав ПКП в коротком залпе. На врезках – амплитуда МПКП. В скобках – количество синапсов в соответствующих группах. \*-p < 0.05



**Рис. 30.** Мощное потенцирование вызванной секреции АХ при усилении активности Р/Q-типа  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов не требует участия РиР. Квантовый состав ПКП и амплитуда МПКП при одиночной стимуляции нерва (0.3 Гц) в контроле, под действием рианофина (2 мкМ) и ТЭА (2 мМ) в присутствии рианофина. В скобках – количество синапсов в соответствующих группах. \*-р < 0.05 по сравнению с контролем.

Итак, РиР-опосредуемый внутритерминальный  $\text{Ca}^{2+}$ -вход вовлекается при срабатывании триггерного  $\text{Ca}^{2+}$ -входа в регуляцию секреции АХ на стадии развития начального облегчения синаптической передачи (рис. 19Б). По-видимому, потенциал-зависимые  $\text{Ca}^{2+}$ -каналы Р/Q-типа формируют высокоспециализированный и строго пространственно ограниченный триггерный  $\text{Ca}^{2+}$ -сигнал. Он не требует особого усиления для запуска финального акта экзоцитоза докированных и праймированных в активных зонах синаптических везикул, находящихся в границах  $\text{Ca}^{2+}$ -нанодомена, образуемого этими  $\text{Ca}^{2+}$ -каналами. Если усиливать опосредуемый  $\text{Ca}^{2+}$ -каналами Р/Q-типа триггерный  $\text{Ca}^{2+}$ -сигнал (например, под действием ТЭА или 4-АР), то это резко увеличит вероятность выброса АХ (р), что отразится на форме залпа ПКП (рис. 6) [Tarr et al., 2013], и это не требует обязательного вовлечения РиР в регуляцию квантовой секреции АХ.

Вместе с тем, наши исследования показали, что при стимулировании другого входа ионов  $\text{Ca}^{2+}$  в моторные нервные терминалы - по пресинаптическим  $\text{Ca}^{2+}$ -каналам L-типа - происходит  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимая активация РиР, необходимая для усиления (либо пространственного

распространения)  $\text{Ca}^{2+}$ -сигнала, формируемого  $\text{Ca}^{2+}$ -каналами L-типа. Такое  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимое подключение РнР и выброса депонированного  $\text{Ca}^{2+}$ , генерируя новый, комбинированный  $\text{Ca}^{2+}$ -сигнал, способно обеспечить необходимую концентрацию ионов  $\text{Ca}^{2+}$  для запуска экзоцитоза везикул, готовых к выбросу АХ, но обычно «молчащих» из-за недостаточной насыщаемости их  $\text{Ca}^{2+}$ -сенсоров ионами  $\text{Ca}^{2+}$ , входящими снаружи.

Такая выдвинутая нами гипотеза объясняет расширение пространственного диапазона доступных для  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой секреции квантов АХ, что находит отражение в равномерном возрастании квантового состава ПКП по всему ходу короткого высокочастотного залпа именно за счет увеличения RRP, а не роста вероятности выброса (p) при подключении в регуляцию секреции АХ  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов L-типа (в комплексе с активацией РнР и выбросом депонированного  $\text{Ca}^{2+}$ ). На наш взгляд, активация РнР и выброс депонированного  $\text{Ca}^{2+}$ , вероятно, выступают в роли эффектора, необходимого для амплификации  $\text{Ca}^{2+}$ -сигнала, поступающего по L-типу  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов. Такой комбинированный  $\text{Ca}^{2+}$ -сигнал, по-видимому, способен специфически усиливать секрецию дополнительной популяции квантов АХ из ранее «молчавших» активных зон по механизму, отличному от реализуемого при входе  $\text{Ca}^{2+}$  по P/Q-типу  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов.

Таким образом, совокупность полученных нами данных позволяет выдвинуть новое представление, согласно которому специфическое увеличение концентрации ионов  $\text{Ca}^{2+}$  за счет срабатывания функционального тандема «L-тип  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов–РнР» может быть предназначено для вовлечения в секрецию АХ дополнительных, ранее «молчащих» активных зон и секретлируемых из них квантов АХ в ответ на достигающий моторной терминали нервной импульс. Об этом свидетельствует возрастание значения RRP, но не вероятности выброса (p) квантов АХ именно и только при активации (растормаживании разными способами) L-типа  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов.

Качественно подобный механизм усиления вызванной секреции нейротрансмиттера - за счет роста числа сайтов, участвующих в секреции



квантов, а не возрастания вероятности выброса или размера квантов - недавно выявлен в созревающих ГАМКергических синапсах интернейронов зрительной коры мыши под действием эндоканнабиноидов [Huang, Kirkwood, 2020]. Моторным синапсам присуща низкая вероятность выброса квантов АХ, но при большом количестве активных зон в совокупности это обеспечивает достаточно высокое значение квантового состава ПКП [Homan, Meriney, 2018; Ruiz et al., 2011]. Такое сочетание структурных и функциональных особенностей позволяет предполагать, что в активных зонах значительное число потенциально доступных для выброса в ответ на приходящий ПД (и активацию входа в моторную терминаль ионов  $\text{Ca}^{2+}$ ) синаптических везикул испытывает недостаток триггерного действия  $\text{Ca}^{2+}$ -сигнала из-за недостаточной «мощности» возникающих вблизи везикул  $\text{Ca}^{2+}$ -нанодоменов. Это может быть связано с низкой вероятностью открывания потенциал-зависимых  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов P/Q-типа в ответ на короткий по длительности пресинаптический ПД [Meriney et al., 2018]. Включение в активность моторных терминалей эффективно функционирующего тандема «L-тип  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов–РиР» в районе активных зон может дополнить недостающий уровень ионов  $\text{Ca}^{2+}$  вблизи «молчащих» активных зон и расположенных там готовых к выбросу синаптических везикул (рис 31) и, тем самым, вовлекать их в экзоцитоз.

Стабильность обеспечиваемого L-типом  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов  $\text{Ca}^{2+}$ -сигнала, вызывающего активацию РиР и выброс депонированного  $\text{Ca}^{2+}$ , может обеспечивать стабильный комбинированный  $\text{Ca}^{2+}$ -сигнал, и, как следствие – стабильное повышение размера RRP и обусловленное этим возрастание квантового состава (количества квантов) ПКП по всему ходу ритмического залпа. Именно это и наблюдается при растормаживании L-типа  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов, но, как оказалось, обязательно в тандеме с выбросом ионов  $\text{Ca}^{2+}$  из рианодин-чувствительных пресинаптических  $\text{Ca}^{2+}$ -депо (рис. 31).



**Рис. 31.** Механизм равномерного увеличения квантового состава ПКП в ритмических высокочастотных залпах при растормаживании функционального тандема «L-тип  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов - РиР» за счет вовлечения в секрецию ранее молчавших активных зон (внизу). Знак ? означает не установленное точно расположение определенных ионных каналов в активных зонах моторных синапсов млекопитающих. Относительное пространственное расположение везикул и каналов в составе активных зон представлено по литературным данным [Dittrich et al., 2018; Ginebaugh et al., 2022; Homan, Meriney, 2018].

Полученные нами данные свидетельствуют, что независимо от способа растормаживания L-типа  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов, они всегда сопряжены с активацией РиР и выбросом депонированного депонированного  $\text{Ca}^{2+}$ . По-видимому, в этом заключается особенность функционирования этого подтипа потенциал-зависимых  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов. Возможное вовлечение L-типа  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов в функционирование моторных синапсов было выявлено при длительной высокочастотной активности моторных синапсов, где такое вовлечение регулировало эндоцитоз синаптических везикул, обеспечивая направленное восполнение RRP [Perissinotti et al., 2008]. Кроме того, показано растормаживание и вовлекаемость этих каналов в поддержание квантовой

секреции АХ при нервно-мышечных патологиях, связанных с угнетением функционирования основного триггерного  $\text{Ca}^{2+}$ -входа [Ginebaugh et al., 2022; Giovannini et al., 2002].

На наш взгляд, не только и не столько  $\text{Ca}^{2+}$ -каналы L-типа как таковые, сколько их функциональный тандем с РИР  $\text{Ca}^{2+}$ -депо в моторных синапсах млекопитающих представляют собой своеобразную страховочную систему, включающуюся при дефиците активности основного  $\text{Ca}^{2+}$ -входа и/или связанных с ним патологиях, затрагивающих механизм обеспечения необходимого уровня секреции АХ. Наличие такой страховочной системы (L-тип  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов  $\rightarrow$  РИР  $\rightarrow$  выброс депонированного  $\text{Ca}^{2+}$ ) расширяет диапазон надежности нервно-мышечной передачи через имеющийся на мышечном волокне одиночный синапс. Срабатывание такой системы при определенных условиях способно значительно повысить  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимым образом квантовую секрецию АХ, причем с помощью специализированного механизма – возрастания размера RRP.

В заключение следует отметить, что выявленное нами функциональное сопряжение РИР и L-типа  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов, хорошо и давно известное в мышечных клетках, описано в настоящее время и в ряде нейронов, где  $\text{Ca}^{2+}$ -ток, входящий в сому по  $\text{Ca}^{2+}$ -каналам L-типа, запускает активацию РИР и выброс депонированного  $\text{Ca}^{2+}$  [Chavis et al., 1996; Welsby et al., 2006]. Наконец, в моторных терминалях нельзя исключить возможность прямой физической сцепки (характерной для триад в скелетных мышечных волокнах) между  $\text{Ca}^{2+}$ -каналами L-типа и РИР, опосредующей выброс депонированного  $\text{Ca}^{2+}$  [Palma et al., 2011].

Суммируя все изложенные результаты, касающиеся анализу роли внутритерминальных  $\text{Ca}^{2+}$ -сигналов, обеспечиваемых РИР  $\text{Ca}^{2+}$ -депо, в регуляции активности моторных синапсов, можно сказать следующее. Впервые удалось показать, РИР-опосредованные  $\text{Ca}^{2+}$ -сигналы могут, во-первых, индуцироваться и иметь структурно-функциональное сопряжение с разными пресинаптическими потенциал-зависимыми  $\text{Ca}^{2+}$ -входами – и по P/Q-

типу, и по L-типу  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов, хотя степень сопряжения и вклад формирующегося  $\text{Ca}^{2+}$ -сигнала в регуляцию квантовой секреции АХ при этом - существенно различается. Во-вторых, установлено, что выброс депонированного  $\text{Ca}^{2+}$ , в зависимости от его связи с разными  $\text{Ca}^{2+}$ -входами и режимами их работы, оказывается предназначенным для активации разных мишеней и достижения разных целей: поддержания развития начального облегчения при кратковременной синаптической пластичности, усиления экзоцитоза синаптических везикул за счет возрастания RRP или стимулирования секреции пептидного модулятора (экзоцитоза КГРП-содержащих LDCVs).

Однако, как оказалось далее, этим не исчерпывается многообразная роль РиР и высвобождаемого депонированного  $\text{Ca}^{2+}$ , сопряженных с наружными  $\text{Ca}^{2+}$ -входами пресинаптической мембраны. В главе IV нами впервые описан регуляторный контур, когда РиР оказываются избирательно сопряжены с  $\text{Ca}^{2+}$ -проводящими  $\alpha 7$ -нХР, а запускаемый при этом выброс депонированного  $\text{Ca}^{2+}$  участвует не в потенцировании, а в  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимом торможении квантовой секреции АХ.

Роль ионотропных рецепторов, активируемых сигнальными молекулами, как пресинаптических  $\text{Ca}^{2+}$ -входов, способных осуществлять собственную  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимую регуляцию квантовой секреции АХ в моторных синапсах мышцы, рассмотрена в двух последних главах работы.

### **3.3. Роль $\text{Ca}^{2+}$ -входа по каналам P2X7-рецепторов в регуляции квантовой секреции АХ**

Среди необычных синаптических  $\text{Ca}^{2+}$ -входов в моторных синапсах особое место занимают ионотропные рецепторы к АТФ – P2X7. В отличие от других подтипов P2-рецепторов, рецепторы P2X7 активируются только высокими концентрациями АТФ и обладают высокой проницаемостью для ионов  $\text{Ca}^{2+}$  [Martínez-Cuesta et al., 2020]. Однако данные о роли этого потенциального пресинаптического  $\text{Ca}^{2+}$ -входа в регуляции секреции АХ в

моторных синапсах скудны и противоречивы [Moores et al., 2005; Sokolova et al., 2003].

P2X7-рецепторы широко представлены на нейронах и глиальных клетках ЦНС [Deuchars et al., 2001; Lemos et al., 2018; Marín-García et al., 2008; Sánchez-Nogueiro et al., 2014; Sperlágh et al., 2002]. Роль P2X7 рецепторов в ЦНС неоднозначна: они могут участвовать как в нейропротекции, так и в воспалении и гибели нейронов [Vasileiou et al., 2010]. В ЦНС пресинаптическая локализация P2X7-рецепторов и их участие в регуляции секреции нейротрансмиттеров [Lemos et al., 2018; León et al., 2006]. Как правило, такое участие носит потенцирующий характер за счет увеличения концентрации ионов  $Ca^{2+}$  в нервной терминали [Deuchars et al., 2001; Gutiérrez-Martín et al., 2011]. При этом P2X7-рецепторы могут быть не только служить непосредственным входом для ионов  $Ca^{2+}$ , но и участвовать в активации  $Ca^{2+}$ -зависимых сигнальных каскадов, являясь, в частности, местом прикрепления для CaM [Kopp et al., 2019; Roger et al., 2008].

В моторных синапсах также показана экспрессия P2X7-рецепторов на пресинаптической мембране [Deuchars et al., 2001]. Однако свидетельства о роли этого потенциального  $Ca^{2+}$ -входа в регуляции квантовой секреции АХ - скудны и противоречивы. По данным флуоресцентного анализа меченых мембранными красителями синаптических холинергических везикул, тоническая активация P2X7-рецепторов их избирательным агонистом VzATP может облегчать спонтанный экзоцитоз таких везикул [Moores et al., 2005]. Однако в электрофизиологических экспериментах при действии VzATP в моторных синапсах лягушки не было обнаружено изменений параметров вызванной секреции АХ [Sokolova et al., 2003].

Очевидно, что выявление регуляторной активности P2X7-рецепторов в моторных синапсах требует учёта большого спектра других пуриновых рецепторов, присутствующих на моторных нервных терминалях ( $A_1$ -, P2Y<sub>13</sub>- и других типов), которые могут одновременно активироваться эндогенными АТФ/аденозином при работе синапсов [Correia-De-Sá et al., 1996; González

Sanabria et al., 2022; Guarracino et al., 2016]. В этих условиях возможность активации P2X7-рецепторов и ее последствия будут зависеть от концентрационного профиля АТФ/аденозина в щели и одновременной активации других пуриновых рецепторов, также участвующих в регуляции секреции АХ.

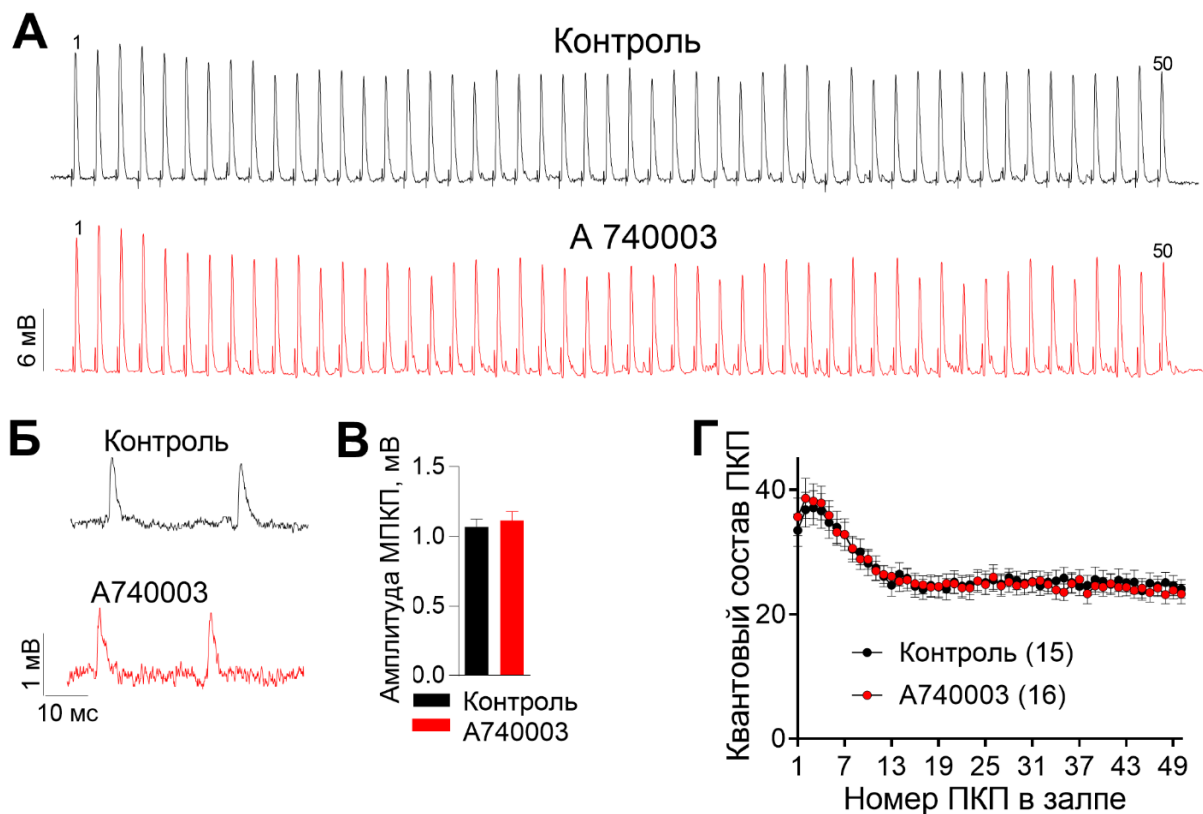
### **3.3.1. Квантовая секреция АХ в моторных синапсах мышцы при блокировании или активации P2X7-рецепторов**

Приступая к исследованиям вклада пресинаптических P2X7-рецепторов в модуляции секреции АХ в моторных синапсах, использовали А740003 (1 мкМ) в качестве P2X7-антагониста - для того, чтобы определить, присутствует ли индивидуальная регуляторная активность P2X7-рецепторов во время коротких ритмических залпов ПКП, запускаемая действием эндогенной АТФ на P2X7-рецепторы? Как известно, эндогенная АТФ может возникать и кратковременно действовать в синаптической щели в качестве котрансмиттера АХ при экзоцитозе синаптических везикул [Abbracchio et al., 2009].

Мы установили, что в течение 1 ч после добавления А740003 не было выявлено статистически значимых изменений МП мышечных волокон, амплитуды и временного хода МПКП, а также их частоты. Кроме того, блокирование P2X7-рецепторов никак не влияло на амплитуду и квантовый состав ПКП в коротких залпах. Средний квантовый состав первого ПКП в залпе составил в контроле (n=15)  $33.49 \pm 2.60$ , а в присутствии А740003 –  $35.65 \pm 3.00$  (n = 16, p > 0.05) (рис. 32).

Далее, с целью избирательно активировать P2X7-рецепторы, применяли их экзогенный агонист VzАТР (30 мкМ). Как и в случае с использованием антагониста P2X7-рецепторов А740003, стимуляция этих рецепторов VzАТР не привела к изменениям МП мышечных волокон, частоты, амплитуды и параметров временного хода МПКП. Неожиданным был тот факт, что VzАТР не вызывал каких-либо существенных изменений в вызванной квантовой

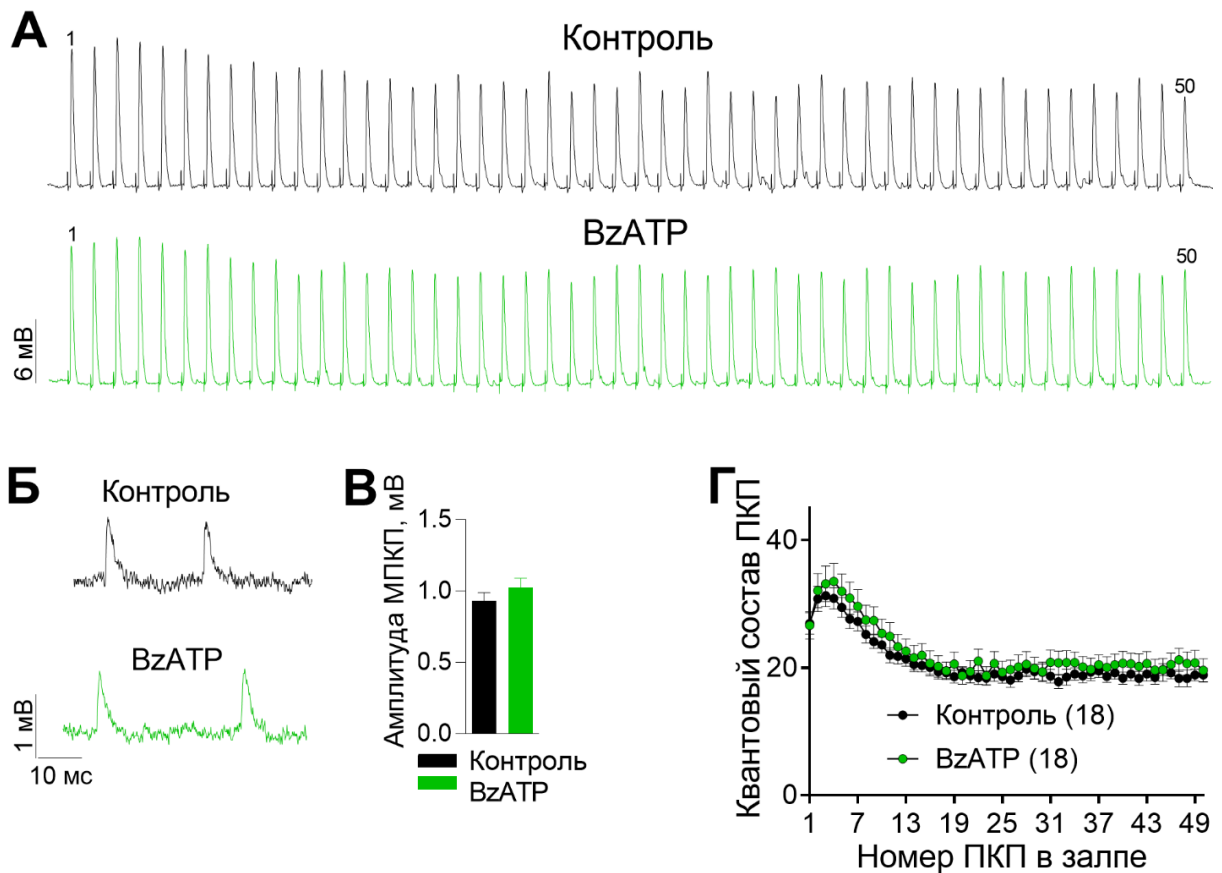
секреции АХ. Квантовый состав первого ПКП в залпе составил  $26.92 \pm 1.68$  в контроле ( $n = 18$ ) и  $26.62 \pm 2.18$  в присутствии VzATP ( $n = 18, p > 0.05$ ) (рис. 33).



**Рис. 32.** Нервно-мышечные синапсы диафрагмы мышцы не проявляют признаков опосредованной P2X7-рецепторами модуляции спонтанной или вызванной в ходе коротких (1 с) высокочастотных (50 Гц) залпов стимуляции квантовой секреции АХ (**А**) Примеры оригинальных записей залпов ПКП в контроле и в присутствии антагониста P2X7-рецепторов A740003 (1 мкМ). (**Б**) Примеры оригинальных записей МПКП в контроле и в присутствии A740003. (**В**) Амплитуда МПКП в контроле и в присутствии A740003 (**Г**) Изменение квантового состава ПКП по ходу залпа в контроле и под действием A740003. В скобках – количество синапсов в соответствующих группах.

В отдельной серии экспериментов использовали интактные (нерассеченные) нервно-мышечные препараты для более детального электрофизиологического исследования возможного влияния VzATP на спонтанную квантовую секрецию АХ в моторных синапсах. В отличие от результатов, полученных с использованием выгрузки витального флуоресцентного липофильного красителя из нервного окончания [Deuchars et

al., 2001; Moores et al., 2005], мы не обнаружили существенных изменений параметров спонтанного выброса АХ.



**Рис. 33.** Активация P2X7-рецепторов в нервно-мышечные синапсах диафрагмы мышцы не вызывает изменений параметров спонтанной или вызванной в ходе коротких (1 с) высокочастотных (50 Гц) залпов стимуляции квантовой секреции АХ. (**А**) Примеры оригинальных записей залпов ПКП в контроле и в присутствии агониста P2X7-рецепторов VzATP (30 мкМ). (**Б**) Примеры оригинальных записей МПКП в контроле и в присутствии VzATP. (**В**) Амплитуда МПКП в контроле и в присутствии VzATP (**Г**) VzATP (30 мкМ) не вызвал изменений квантового состава ПКП в залпе. В скобках – количество синапсов в соответствующих группах.

В течение 1 ч после аппликации VzATP средняя частота МПКП ( $0.43 \pm 0.03$  Гц ( $n = 20$ )) остается неизменной относительно контроля ( $0.45 \pm 0.04$  Гц ( $n = 16$ ,  $p > 0.05$ )). Амплитудные и временные параметры МПКП при стимуляции P2X7-рецепторов не изменились. Средняя амплитуда МПКП составила  $1.65 \pm 0.11$  мВ в контроле и  $1.73 \pm 0.09$  мВ под действием VzATP ( $p$



> 0.05). Время нарастания МПКП составляло  $0.93 \pm 0.06$  мс в контроле и оставалось на том же уровне ( $0.93 \pm 0.06$  мс) при аппликации VzATP. В контрольных условиях время полуспада MEPP составляло  $2.15 \pm 0.11$  мс и статистически значимо не менялось в присутствии VzATP –  $2.15 \pm 0.10$  мс ( $p > 0.05$ ).

Таким образом, ни ингибирование, ни активация рецепторов P2X7 не влияли ни на спонтанную, ни на ритмически вызванную синаптическую передачу в моторных синапсах мыши.

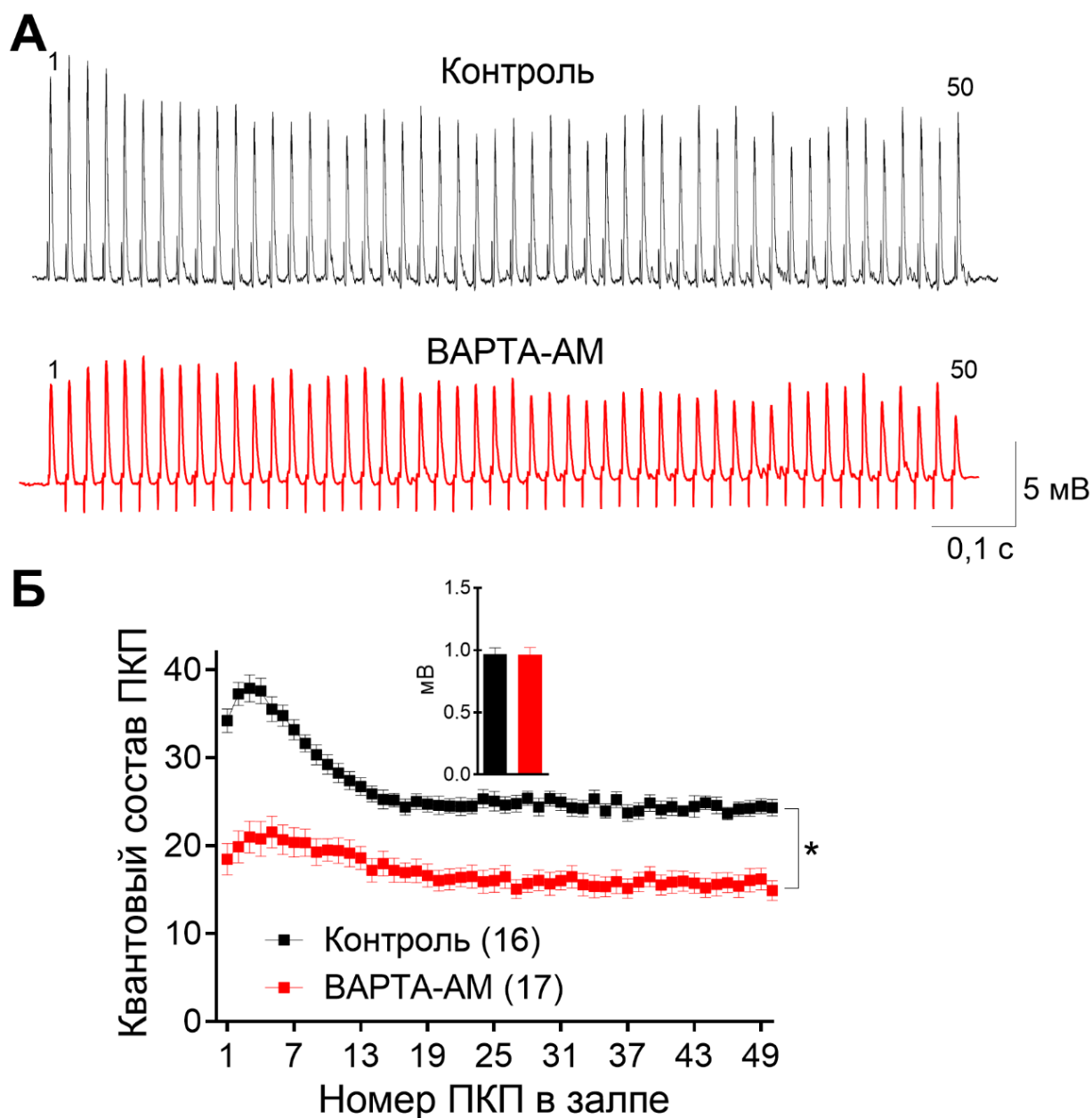
Отсутствие изменений вызванного выброса АХ как при активации, так и ингибировании P2X7-рецепторов в моторных синапсах мыши может, на наш взгляд, быть следствием нескольких причин и факторов. Во-первых, P2X7-рецепторы наиболее низкоаффинны из всех P2X-рецепторов по отношению к синаптической АТФ и не активируются продуктами гидролиза АТФ – АДФ и АМФ [Miras-Portugal et al., 2017; Ralevic, Burnstock, 1998]. В условиях быстрого гидролиза АТФ в синаптической щели [Smith, 1991] это может препятствовать их эффективной активации. Во-вторых, как мы предположили, последствия активации P2X7-рецепторов эндогенной АТФ могут не проявляться вследствие доминирования более выраженных тормозных влияний на секрецию АХ со стороны сосуществующих на пресинаптической мембране A<sub>1</sub>- и P2Y<sub>13</sub>-рецепторов [González Sanabria et al., 2022; Guarracino et al., 2016; Perissinotti, Uchitel, 2010; Ziganshin et al., 2020] или метаботропных мускариновых холинорецепторов [Santafe et al., 2015]. Наконец, само присутствие пресинаптических рецепторов P2X7 в нервных окончаниях недавно было поставлено под сомнение, и пресинаптические эффекты VzATP, там, где они проявлялись, рассматривались как результат активации глиальных, а не нейрональных P2X7-рецепторов с последующим высвобождением глутрансмиттеров [Illes et al., 2017]. Но наряду с этим имеются убедительные данные, свидетельствующие о локализации рецепторов P2X7 на нервных окончаниях моторных синапсов [Deuchars et al.,

2001; Moores et al., 2005], тогда как присутствие P2X7-рецепторов на перисинаптических Шванновских клетках до сих пор не продемонстрировано.

### **3.3.2. Доказательства возможности входа ионов $\text{Ca}^{2+}$ по каналам P2X7-рецепторов в присутствии $\text{Ca}^{2+}$ -буферов в моторных синапсах МЫШИ**

Учитывая, что P2X7-рецепторы способны при их экзогенной активации сохранять активность (вследствие отсутствия десенситизации) и более продолжительно (чем, например, потенциал-зависимые  $\text{Ca}^{2+}$ -каналы или нейрональные nXP) пропускать ионы  $\text{Ca}^{2+}$  [Coddou et al., 2011; North, 2002], мы попытались подтвердить факт участия P2X7-опосредуемого входа ионов  $\text{Ca}^{2+}$  в регуляции активности моторных нервных терминалей. Для этого проводили экзогенную активацию P2X7-рецепторов их агонистом ВzАТР на фоне предварительной загрузки в нервные терминали «быстрого»  $\text{Ca}^{2+}$ -буфера (в виде мембранопроникающей формы) - ВАРТА-АМ (50 мкМ). ВАРТА обладает высокой скоростью связывания ионов  $\text{Ca}^{2+}$ , и способен потенциально «перехватывать»  $\text{Ca}^{2+}$ -сигнал в  $\text{Ca}^{2+}$ -нанодомене, формируемом триггерными  $\text{Ca}^{2+}$ -каналами в активных зонах, как это показано в синапсах ЦНС [Burnashev, Rozov, 2005; Eggemann et al., 2012; Rozov et al., 2001]. Это должно приводить к снижению уровня  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимого экзоцитоза везикул и снижению квантового состава ПКП при стимуляции моторных терминалей.

Предварительная инкубация нервно-мышечных препаратов в растворе ВАРТА-АМ не привела к статистически значимым изменениям амплитуды МПКП, однако индуцировала значительное снижение амплитуды и квантового состава многоквантовых ПКП по сравнению с контролем. Кроме того, изменился и характер ритмического залпа ПКП: помимо общего снижения уровня их квантового состава, уменьшилась также и проявление начальной депрессии передачи в залпе. Вследствие этого повысился уровень фазы плато в залпе по сравнению с первым ПКП (рис. 34).



**Рис. 34.** «Быстрый»  $\text{Ca}^{2+}$ -буфер ВАРТА-АМ (50 мкМ) угнетает ритмическую вызванную активность нервно-мышечных синапсов диафрагмы мыши (50 Гц, 1 с) (**А**) Примеры оригинальных записей залпов ПКП в контроле и после загрузки ВАРТА-АМ. (**Б**) Изменение квантового состава ПКП в контроле и в результате загрузки ВАРТА-АМ. На врезке – амплитуда МПКП. В скобках – количество синапсов в соответствующих группах. \* $p < 0.05$

Отношение усредненного квантового состава десяти последних ПКП в залпе к квантовому составу первого ПКП ( $\text{ПКП}_{\text{плато}}/\text{ПКП}_1$ ) составило в среднем  $0.70 \pm 0.02$  в контроле ( $n = 16$ ) и  $0.93 \pm 0.08$  на фоне ВАРТА-АМ ( $n = 17$ ,  $p < 0.05$ ). Данное изменение рисунка залпа при загруженном в нервные

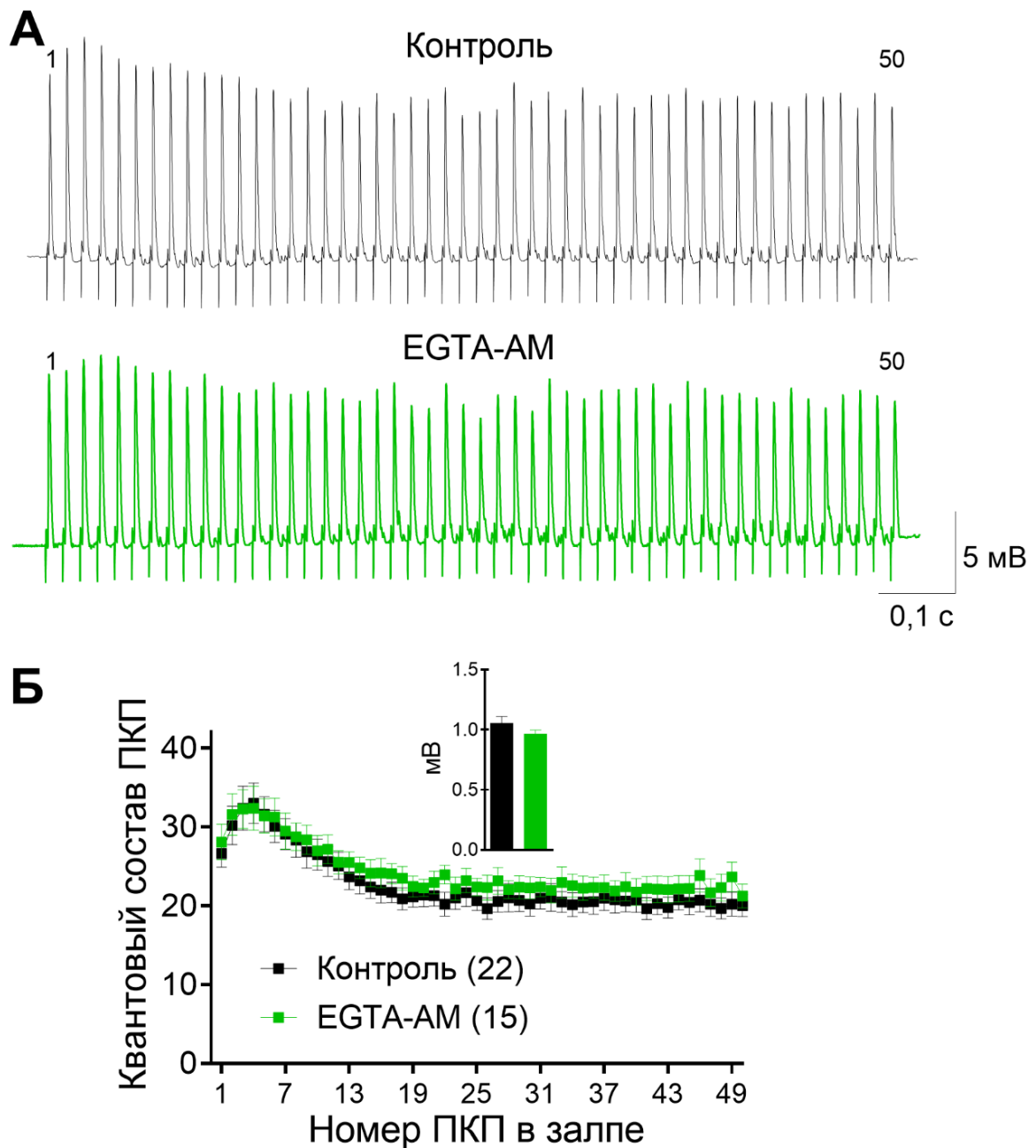
терминали «быстром»  $\text{Ca}^{2+}$ -буфере свидетельствует о снижении вероятности выброса медиатора – за счет «перехвата» ионов  $\text{Ca}^{2+}$ , поступающих в активные зоны по P/Q-типу  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов при их активации. В свою очередь, это выражается не только в сниженном квантовом составе первого ПКП в залпе, но и в изменении развития кратковременной пластичности (снижение депрессии и развитие облегчения) по ходу короткого ритмического залпа ПКП, как это показано в синапсах ЦНС [Burnashev, Rozov, 2005; Rozov et al., 2001].

В дополнительной серии экспериментов сравнивали эффект загрузки моторных терминалей ВАРТА-АМ с действием на синаптическую передачу «медленного»  $\text{Ca}^{2+}$ -буфера EGТА-АМ, использованного в той же, что и ВАРТА-АМ, концентрации – 50 мкМ. Напомним, что сравнительный анализ влияния эквимольных концентраций «медленного» и «быстрого»  $\text{Ca}^{2+}$ -буферов на секрецию нейротрансмиттера позволяет оценить как расстояние от  $\text{Ca}^{2+}$ -входа до его мишеней (различных  $\text{Ca}^{2+}$ -сенсоров), так и динамику обеспечиваемого  $\text{Ca}^{2+}$ -входом  $\text{Ca}^{2+}$ -сигнала.

Предварительная инкубация нервно-мышечных препаратов в растворе, содержащем EGТА-АМ (50 мкМ), не привела к изменению спонтанной и вызванной секреции медиатора. Амплитуда МПКП составила  $1.08 \pm 0.06$  мВ в контроле (n=22) и  $0.96 \pm 0.03$  мВ после инкубации с EGТА-АМ (n=15,  $p > 0.05$ ). Квантовый состав первого ПКП в залпе составил в контроле  $26.60 \pm 1.72$  и  $28.07 \pm 2.26$  после аппликации EGТА-АМ. Таким образом, редукция внутритерминальных  $\text{Ca}^{2+}$ -сигналов, вызываемая присутствием EGТА-АМ, не отразилась на характере залповой активности синапсов (рис. 35).

В итоге, только быстрый  $\text{Ca}^{2+}$ -буфер ВАРТА-АМ оказался способен подавлять  $\text{Ca}^{2+}$ -сигналы (обеспечиваемые P/Q-типом  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов), необходимые для поддержания обычного уровня  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой вызванной секреции АХ в залпах ПКП в моторных синапсах мышцы – и это является дополнительным аргументом в пользу того, что  $\text{Ca}^{2+}$ -каналы L-тип, расположенные, по данным структурного и функционального анализа, на

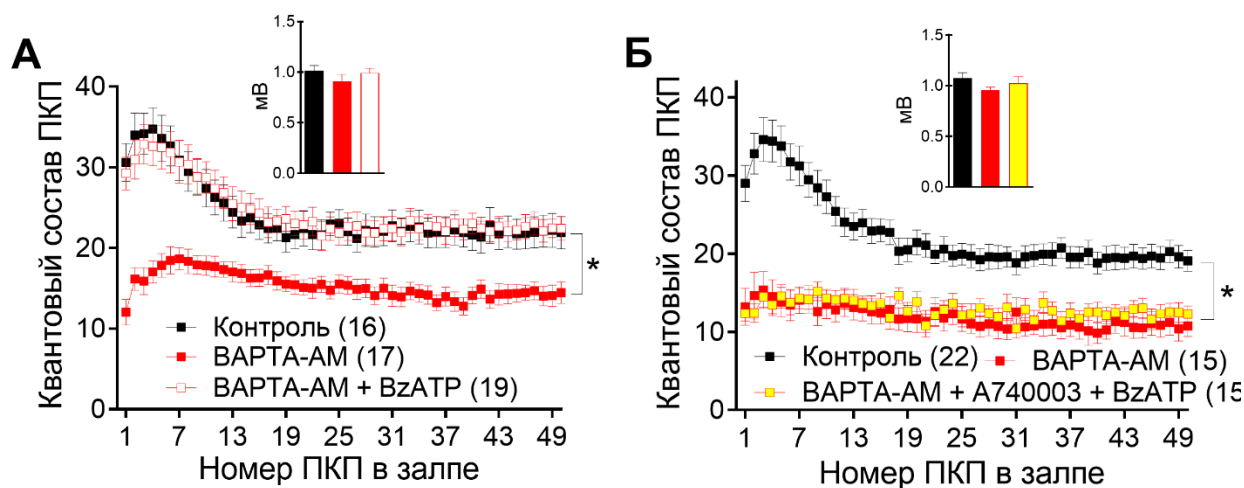
отдалении от синаптических везикул, в норме не активны, находясь под мощным «тормозным контролем», описанным нами выше.



**Рис. 35.** «Медленный»  $\text{Ca}^{2+}$ -буфер EGTA-AM (50 мкМ) не оказывает влияния на ритмическую вызванную активность нервно-мышечных синапсов диафрагмы мыши (50 Гц, 1 с) (А) Примеры оригинальных записей залпов ПКП в контроле и после загрузки EGTA-AM. (Б) Изменение квантового состава ПКП в контроле и в результате загрузки EGTA-AM. На врезке – амплитуда МПКП. В скобках – количество синапсов в соответствующих группах. \* $-p < 0.05$

На следующем этапе мы проводили - в присутствии загруженного в терминали «быстрого»  $\text{Ca}^{2+}$ -буфера ВАРТА - активацию P2X7-рецепторов их экзогенным агонистом VzATP. Как мы продемонстрировали (рис. 33), активация P2X7-рецепторов P2X7 их экзогенным агонистом VzATP (30 мкМ) в моторных синапсах не изменяет ни спонтанную, ни вызванную секрецию АХ во время ритмической синаптической активности. Однако, в присутствии предварительно нагруженного в моторные терминали ВАРТА стимуляция P2X7-рецепторов VzATP вызывала резкое изменение залпа ПКП. Удивительно, но VzATP возвращал значения как амплитуды, так и квантового состава ПКП (при отсутствии влияния на спонтанную секрецию), которые были снижены в результате инкубации нервно-мышечных препаратов с ВАРТА-АМ, к контрольному уровню (рис. 36А). Отношение  $\text{ПКП}_{\text{плато}}/\text{ПКП}_1$  увеличивалось с  $0,69 \pm 0,02$  в контроле ( $n = 16$ ) до  $1,21 \pm 0,13$  после инкубации с ВАРТА-АМ ( $n = 17$ ,  $p < 0,05$ ), а затем снижалось почти до контрольного значения при применении VzATP в присутствии ВАРТА ( $0,79 \pm 0,03$ ,  $n = 19$ ,  $p > 0,05$ ).

Кроме того, мы проверили, опосредовано ли VzATP-индуцированное восстановление квантового состава ПКП именно P2X7-рецепторами? В присутствии P2X7-антагониста А740003 (1 мкМ) VzATP не смог реверсировать сниженную в присутствии «быстрого»  $\text{Ca}^{2+}$ -буфера квантовую секрецию АХ к контрольному уровню (рис. 36Б). Таким образом, при наличии ВАРТА в нервных окончаниях мы смогли наблюдать вклад активности P2X7-рецепторов в регуляцию вызванного выброса АХ в моторных синапсах мышей дикого типа.



**Рис. 36.** Активация P2X7-рецепторов обеспечивают восстановление сниженной в результате загрузки «быстрого»  $\text{Ca}^{2+}$ -буфера ВАРТА-АМ (50 мкМ) ритмической вызванной активности нервно-мышечных синапсов диафрагмы мыши (50 Гц, 1 с) (А) Изменение квантового состава ПКП в контроле, в результате загрузки ВАРТА-АМ и последующем действии агониста P2X7-рецепторов VzATP (30 мкМ). (Б) Изменение квантового состава ПКП в контроле, в результате загрузки ВАРТА-АМ и под действием VzATP в присутствии антагониста P2X7-рецепторов A740003 (1 мкМ). На врезках – амплитуда МПКП. В скобках – количество синапсов в соответствующих группах. \* -  $p < 0.05$  по сравнению с контролем.

Эти данные позволяют предполагать, что при активации пресинаптических P2X7-рецепторов экзогенным агонистом, по-видимому, действительно происходит тоническое поступление ионов  $\text{Ca}^{2+}$  в моторную терминаль. Такой продолжительный вход ионов  $\text{Ca}^{2+}$  может обеспечивать частичное насыщение буферной емкости загруженного в нервное окончание ВАРТА и, тем самым, уменьшать способность этого «быстрого»  $\text{Ca}^{2+}$ -буфера эффективно «перехватывать» ионы  $\text{Ca}^{2+}$ , поступающие по  $\text{Ca}^{2+}$ -каналам P/Q-типа, предотвращая, таким образом, снижение  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой вызванной секреции АХ. Поэтому значения амплитуды и квантового состава ПКП реверсируют к контрольному уровню при стимуляции VzATP P2X7-рецепторов в присутствии ВАРТА-АМ.

Таким образом, мы установили, что активация P2X7-рецепторов и опосредуемого ими пресинаптического  $\text{Ca}^{2+}$ -входа способствует насыщению

«быстрого»  $\text{Ca}^{2+}$ -буфера, который обычно лимитирует  $\text{Ca}^{2+}$ -сигнал, генерируемый  $\text{Ca}^{2+}$ -каналами P/Q-типа кальциевых каналов, и угнетает  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимую секрецию АХ. Это является новым подтверждением возможной реальной активности пресинаптических P2X7-рецепторов и способности этого  $\text{Ca}^{2+}$ -входа специфически участвовать в пресинаптическом  $\text{Ca}^{2+}$ -гомеостазе. Возможность аналогичного частичного насыщения  $\text{Ca}^{2+}$ -буферов при активации P2X7-рецепторов описана и для других типов клеток [Lee et al., 2011; Roger et al., 2008].

### **3.3.3. Выявление эндогенной активности пресинаптических P2X7-рецепторов, направленной на потенцирование квантовой секреции АХ, при блокировании P2Y13-рецепторов**

Несмотря на кажущееся отсутствие влияний на секрецию АХ со стороны пресинаптических P2X7-рецепторов, нам удалось получить доказательства того, что они могут активироваться эндогенной АТФ при нормальной залповой активности моторных синапсов и эта активация косвенно влияет на  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимую секрецию АХ.

Действительно, неожиданным оказался обнаруженный нами факт, что в условиях предварительной блокады P2X7-рецепторов (с помощью A740003) блокирование пресинаптических P2Y13-рецепторов антагонистом MRS2211 (10 мкМ) не приводит к усилению вызванной секреции АХ в коротких залпах – MRS2211 утратил в этих условиях способность равномерно увеличивать амплитуду и квантовый состав каждого ПКП (рис. 37А).

Ранее мы показали, что механизм усиления вызванной секреции АХ при блокировании P2Y13-рецепторов обеспечивается растормаживанием  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов L-типа – которые являются мишенью сигнального каскада, запускаемого при активации P2Y13-рецепторов во время работы моторных синапсов (рис. 15). Однако оказалось, что в условиях предварительного блокирования P2X7-рецепторов не происходит потенцирования вызванной секреции АХ при блокировании P2Y13-рецепторов (и обусловленного этим



растормаживания  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов L-типа). Это могло означать, что в моторных синапсах при их активности в режиме коротких залпов имеет место активация не только P2Y13-рецепторов (препятствующих включению  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов L-типа в регуляцию квантовой секреции АХ), но и одновременно - P2X7-рецепторов эндогенной АТФ.

Эти данные позволяют предполагать, что, несмотря на активацию P2X7-рецепторов, их влияния на квантовую секрецию АХ «замаскированы» за счет нивелирования одновременно протекающими и, вероятно, более выраженными воздействиями выброс АХ со стороны активных метаботропных P2Y13-рецепторов. Эти рецепторы могут активироваться не только со стороны АТФ, но и ее производных - АДФ и АМФ, в отличие от P2X7-рецепторов, активирующихся только эндогенной АТФ (в высоких концентрациях).

В связи с обнаруженными взаимосвязанными влияниями на квантовую секрецию АХ со сторон тормозных P2Y13-рецепторов и потенцирующих P2X7-рецепторов, в следующей серии экспериментов использовали избирательную блокаду одного из типов рецепторов (P2Y13 или P2X7), для того чтобы в «чистом виде» наблюдать влияние на вызванную секрецию АХ со стороны другого типа рецепторов и исследовать механизмы этого действия.

#### **3.3.4. Механизм потенцирующего влияния на квантовую секрецию АХ пресинаптических P2X7-рецепторов**

Дальнейшее исследование взаимодействия P2X7- и P2Y13-рецепторов в регулировании квантовой секреции АХ выявили интересный факт. В условиях предварительно усиленной под действием MRS2211 вызванной секреции АХ антагонист P2X7-рецепторов A740003 оказался неспособен снизить квантовый состав ПКП в залпе к контрольному уровню (рис. 37Б). Эти результаты свидетельствуют о том, что при уже расторможенных  $\text{Ca}^{2+}$ -каналах L-типа (за счет блокирования P2Y13-рецепторов) и сохраняющейся активности P2X7-рецепторов блокирование последних оказывается

неэффективным. Это могло означать, что в таких условиях (когда функционируют P2X7-рецепторы, а P2Y13-рецепторы - нет) происходит запуск пресинаптического  $Ca^{2+}$ -зависимого и P2X7-опосредованного сигнального каскада, причем не требующего постоянной активности P2X7-рецепторов. Видимо, обеспечиваемый P2X7-рецепторами  $Ca^{2+}$ -вход выполняет роль своеобразного триггера, запускающего некий сигнальный путь, обеспечивающий вовлечение L-типа  $Ca^{2+}$ -каналов в регуляцию вызванной квантовой секреции АХ и ее потенцирование. Именно поэтому последующее блокирование P2X7-рецепторов уже не может повлиять на развившийся P2X7-индуцируемый процесс усиления секреции АХ.

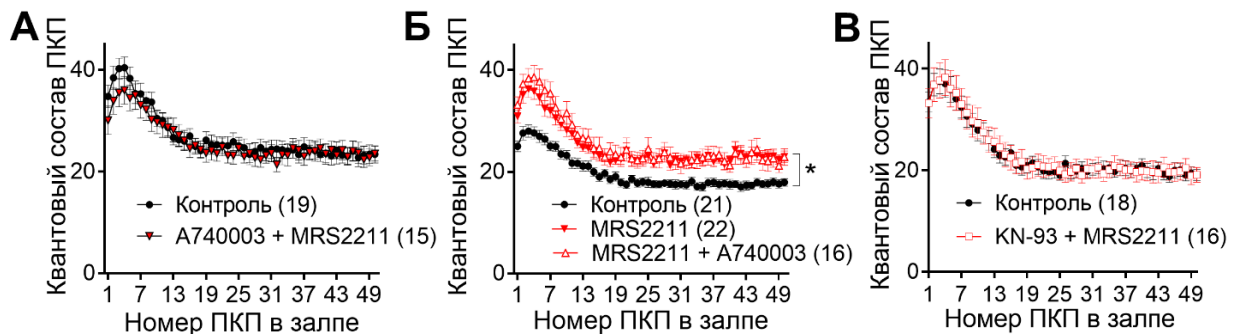
Мы предположили, что такое долговременное потенцирующее действие могло быть следствием активации СаМКII за счет входа ионов  $Ca^{2+}$  по P2X7-рецепторам.

Имеются факты, подтверждающие такую возможность активации СаМКII при стимуляции P2X7-рецепторов. Длинный внутриклеточный C-конец субъединиц P2X7-рецепторов имеет сайт связывания с СаМ [Roger et al., 2010]. Показана СаМ-опосредованная и P2X7-зависимая активация СаМКII в синапсах зернистых клеток мозжечка и других синапсах [Kopp et al., 2019; León et al., 2006]. При этом хорошо известна способность СаМКII к автономной продолжительной активности даже после терминирования стимулирующего  $Ca^{2+}$ /СаМ-сигнала - благодаря аутофосфорилированию фермента, обеспечивающего пролонгированную и  $Ca^{2+}$ -независимую киназную активность СаМКII [Lisman et al., 2012; Yasuda et al., 2022].

Для проверки выдвинутого предположения о возможной активации пресинаптической СаМКII и ее роли в реализации устойчивых потенцирующих эффектов, опосредованных P2X7-рецепторами в отношении вызванной квантовой секреции АХ, в следующей серии экспериментов проводили предварительное ингибирование активности СаМКII с помощью KN-93, и на этом фоне блокировали P2Y13-рецепторы для проявления потенцирующих влияний эндогенно активируемых P2X7-рецепторов на

квантовую секрецию АХ. KN-62 не использовали в качестве ингибитора СаМКП, поскольку существует возможность его прямого ингибирующего действия не только на активность СаМКП, но и на P2X7-рецепторы [Donnelly-Roberts et al., 2009; Humphreys et al., 1998].

Напомним, что ингибирование СаМКП с помощью KN-93 само по себе никак не влияет на спонтанную и вызванную квантовую секрецию АХ (рис. 13В). Однако в присутствии KN-93 не воспроизводилось потенцирующее действие антагониста P2Y13-рецепторов MRS2211 на квантовый состав ПКП по всему ходу короткого ритмического залпа (рис. 37В).



**Рис. 37.** Активация P2X7-рецепторов эндогенной АТФ способна опосредованно, через активацию СаМКП, потенцировать вызванную секрецию АХ, чему препятствует доминирующая тормозная активность P2Y13-рецепторов. (А) Антагонист P2X7-рецепторов A740003 (1 мкМ) предотвращает потенцирование вызванной секреции АХ под действием антагониста P2Y13-рецепторов MRS2211 (10 мкМ). (Б) A740003 не способен уменьшить предварительно потенцированный MRS2211 квантовый состав ПКП. (В) Ингибитор СаМКП KN-93 (3 мкМ) предотвращает потенцирующий эффект блокирования P2Y13-рецепторов в отношении вызванной активности моторных синапсов. В скобках – количество синапсов в соответствующих группах. \*- $p < 0.05$ .

Эти данные позволили выявить ранее не известный специфический способ активации СаМКП и ее регуляторного действия в моторных синапсах, проявляющийся в условиях сдвига баланса разнонаправленных пуринергических влияний на секрецию АХ в сторону P2X7-опосредованных потенцирующих влияний на секрецию АХ. Мы предполагаем, что при таком способе активации СаМКП мишенью, реализующей ее потенцирующего

действия на секрецию АХ, могут быть, среди прочих возможных целей,  $\text{Ca}^{2+}$ -каналы L-типа – СаМКП-зависимое фосфорилирование приводит к растормаживанию этого  $\text{Ca}^{2+}$ -входа и его подключению в регуляцию секреции АХ. В пользу этого говорит характерный именно для растормаживания  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов L-типа равномерный прирост всех ПКП в коротком залпе, происходящий при блокировании тормозных P2Y13-рецепторов, и требующий активности P2X7-рецепторов и сопряженной с ней активации СаМКП в моторных нервных терминалях.

Имеются многочисленные свидетельства способности  $\alpha 1\text{C}$ -субъединицы нейрональных  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов L-типа к взаимодействию с СаМКП, что приводит к увеличению вероятности открытия этих каналов в постсинаптических структурах нейронов ЦНС [Hudmon et al., 2005; Ma et al., 2013]. Мы впервые показали, что, возможно, аналогичное СаМКП-опосредованное стимулирующее влияние на активность  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов L-типа возникает в окончаниях двигательных нервов в ответ на активацию пресинаптической СаМКП входом ионов  $\text{Ca}^{2+}$  через рецепторы P2X7.

Учитывая тот факт, что метаботропные  $G_i$ -белок-сцепленные P2Y13-рецепторы входят в число негативных регуляторов активности L-типа  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов, можно предположить, что выявленный нами  $\text{Ca}^{2+}$ -вход по каналам P2X7-рецепторов и последующая активация СаМКП в моторных синапсах мышцы является необходимым условием поддержания баланса позитивных и негативных регуляторных воздействий на функциональный статус L-типа  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов, способствуя их растормаживанию в условиях ослабления тормозных воздействий (со стороны, в частности, P2Y13-рецепторов), но при обязательном сохранении активации P2X7-рецепторов со стороны эндогенных источников АТФ в синаптической щели.

Таким образом, в нашей работе впервые показано, что в моторных синапсах мышцы функционирует, наряду с другими, особый пресинаптический  $\text{Ca}^{2+}$ -вход - P2X7-рецепторы. Эти рецепторы не только присутствуют, но и подвержены активации со стороны эндогенной АТФ в условиях коротких (50

Гц, 1 с) ритмических залпов ПКП. При этом, несмотря на доказанный нами факт активации P2X7-рецепторов, их Ca<sup>2+</sup>-опосредованное потенцирующее действие на выброс АХ обычно замаскировано параллельной (и преобладающей) активностью других пуринорецепторов - P2Y13-типа, тормозящих функционирование аденилатциклазного сигнального пути, активность РКА, Ca<sup>2+</sup>-каналы L-типа и в итоге - квантовую секрецию АХ.

Нам также впервые удалось выявить сигнальный механизм, посредством которого P2X7-рецепторы в случае их проявленной регуляторной активности, потенцируют секрецию АХ в моторных синапсах. Мы впервые установили, что активация P2X7-рецепторов (как со стороны эндогенной АТФ, так и экзогенным агонистом) сопровождается запуском пресинаптического сигнального пути, ключевую роль в котором играет активация CaMKII, направленная, видимо, на стойкое вовлечение пресинаптических Ca<sup>2+</sup>-каналов L-типа в регуляцию секреции АХ. Это и приводит к P2X7-опосредованному усилению вызванной квантовой секреции АХ в моторных синапсах.

Таким образом, удалось показать, что ионотропные P2X7-рецепторы, традиционно рассматриваемые как рецепторы АТФ при патологических состояниях и активирующиеся лишь при возникновении аномально высоких концентраций АТФ в наружной среде [Köles et al., 2011; Ziganshin et al., 2020], на самом деле могут активироваться и при нормальной работе моторных синапсов теми локальными концентрациями АТФ, которые там возникают. Однако, несмотря на доказанную активацию P2X7-опосредуемого Ca<sup>2+</sup>-входа в нервных окончаниях нормально работающих моторных синапсов, его фактическое потенцирующее влияние на секрецию АХ проявляется лишь при определенных условиях.

Давно обсуждается возможность того, что при длительной и интенсивной активности моторных синапсов может происходить динамическое изменение концентрационного профиля определенных пуринов в синаптической щели. Оно сопровождается ограничением преимущественной активации тормозных пуринорецепторов [Correia-de-Sá et al., 2000; Correia-De-Sá et al., 1996; Oliveira,

Correia-De-Sá, 2005; Oliveira et al., 2004]. Это может быть следствием меняющихся при разных режимах активности синапсов концентрационных профилей определенных пуринов, а также паттерном расположения разных типов рецепторов на пресинаптической мембране, избирательно чувствительных и экспонированных по отношению к разным источникам пуринов, которые могут поступать в синаптическую щель. Источниками эндогенной АТФ в моторных синапсах может быть не только АТФ, поступающая из синаптических везикул, но и АТФ из мышечных или других близлежащих клеток (Шванновских, моторных аксонов) по имеющимся там каналам, образуемым паннексином 1 [Horton et al., 2017; Miteva et al., 2017; Riquelme et al., 2013; Wei et al., 2021]. Не исключено, что эти источники АТФ по-разному влияют на кластеры определенных пуринорецепторов в моторных синапсах.

В заключение заметим, что детали открывшейся в последние годы сложной мультирецепторной регуляции пуринами квантовой секреции АХ в моторных синапсах, в том числе с участием ионотропных P2X7-рецепторов, обеспечивающих при своей активности вход ионов  $Ca^{2+}$  в моторные терминалы - по-новому освещает проблему пуринергической регуляции передачи в моторных синапсах и заслуживает дальнейшей детальной проработки.

#### **3.4. Роль $Ca^{2+}$ -входа по каналам никотиновых холинорецепторов альфа7-типа ( $\alpha 7$ -нХР) в регуляции квантовой секреции АХ**

Спектр возможных пресинаптических  $Ca^{2+}$ -входов в моторных синапсах не исчерпывается  $Ca^{2+}$ -каналами L-типа, РиР и ионотропными  $Ca^{2+}$ -проводящими P2X7-рецепторами. Еще одним источником поступления ионов  $Ca^{2+}$  в моторные терминалы могут служить пресинаптические никотиновые гомопентамерные холинорецепторы альфа7-типа ( $\alpha 7$ -нХР). Они отличаются от других типов нХР высокой  $Ca^{2+}$ -проводимостью, превышающую таковую у NMDA-рецепторов [Papke, 2014; Papke, Lindstrom, 2020; Shen, Yakel, 2009], а

также способностью активироваться в ответ на действие не только АХ, но и эндогенного холина - продукта гидролиза АХ в синаптической щели [Alkondon et al., 1997; Uteshev et al., 2003]. В ЦНС активация пресинаптических  $\alpha 7$ -нХР эндогенными АХ/холином преимущественно потенцирует секрецию нейротрансмиттеров [Kalappa et al., 2011; Sharma, Vijayaraghavan, 2003].

В моторных синапсах при предполагаемой активации «околосинаптических»  $\alpha 7$ -нХР наблюдается торможение секреции АХ при одиночной или низкочастотной стимуляции нерва [Prior, Singh, 2000; Tian et al., 1994]. Механизмы этого торможения оставались не изученными. Нашей целью было попытаться выявить роль как эндогенных холина/АХ, так и экзогенного холина как возможных избирательных агонистов и регуляторов активности пресинаптических  $\alpha 7$ -нХР в моторных синапсах мышцы.

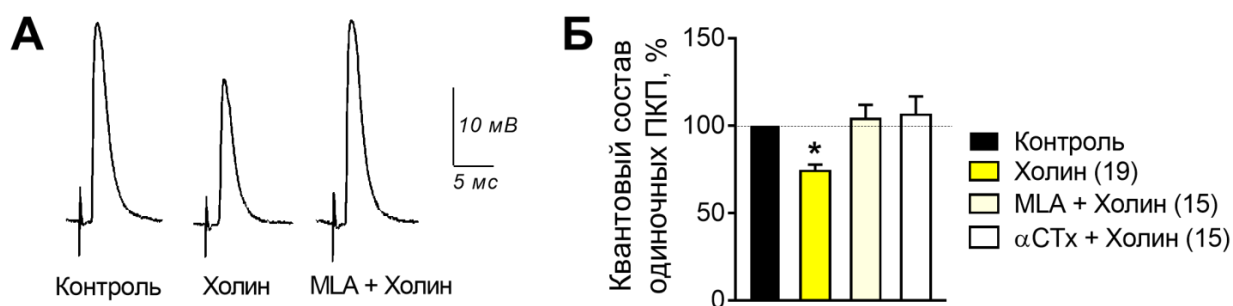
#### **3.4.1. Эффекты холина как агониста $\alpha 7$ -нХР при одиночной вызванной квантовой секреции АХ**

Мы использовали холин (100 мкМ) в качестве агониста  $\alpha 7$ -нХР. В присутствии холина в течение 40 минут не выявлено достоверных изменений МП в области постсинаптической мембраны - среднее значение МП в контроле составило  $-39.16 \pm 1.13$  мВ ( $n = 18$ ) и  $-40.06 \pm 1.18$  в присутствии холина ( $n = 19$ ). Холин приводил к снижению амплитуды ПКП в среднем, более чем на 25% по сравнению с контролем (рис. 38А). Эффект развивался на протяжении 10-15 минут от начала аппликации холина и оставался неизменным в течение последующих 30 минут. Холин-индуцированное снижение амплитуды ПКП происходило за счет уменьшения квантового состава ПКП - от  $34.20 \pm 2.56$  в контроле до  $25 \pm 2.56$  на фоне холина ( $p < 0.05$ ) (рис. 38Б).

В дополнительных экспериментах на нерассеченных нервно-мышечных препаратах холин не влиял на амплитуду МПКП ( $1.49 \pm 0.07$  мВ в контроле ( $n = 17$ ), под действием холина  $1.52 \pm 0.11$  ( $n = 17$ ,  $p < 0.05$ )). Частота и временной ход МПКП на фоне действия холина статистически значимо не отличались от

контрольных значений. Таким образом, снижение квантового состава ПКП в присутствии холина при неизменных параметрах МП и МПКП свидетельствует, что холин оказывает пресинаптическое тормозное действие на вызванную квантовую секрецию АХ.

Торможение холином квантового состава одиночных ПКП предотвращалось селективным блокатором  $\alpha 7$ -нХР – метилликаконитином (MLA) (20 нМ). Сам MLA в течение 15-30 минут аппликации не приводил к достоверным изменениям параметров МПКП и ПКП, однако холин в присутствии MLA не вызывал снижения амплитуды и квантового состава одиночных ПКП (рис. 38А,Б). Аналогичные результаты – предотвращение угнетающего действия экзогенного холина на квантовый состав одиночных ПКП – были достигнуты с использованием другого избирательного блокатора  $\alpha 7$ -нХР – длинноцепочечного  $\alpha$ -кобратоксина (5 нМ) (рис 38Б).



**Рис. 38.** Стимуляция  $\alpha 7$ -нХР холином (100 мкМ) тормозит одиночную вызванную секрецию АХ в моторных синапсах. (А) Примеры оригинальных записей одиночных ПКП в контроле, в присутствии холина и при действии холина на фоне блокатора  $\alpha 7$ -нХР MLA (20 нМ). (Б) Блокаторы  $\alpha 7$ -нХР MLA и  $\alpha$ -кобратоксина ( $\alpha$ -СТх, 5 нМ) предотвращают снижение квантового состава одиночных ПКП (нормализован к контролю, принятому за 100% (n > 15)). В скобках – количество синапсов в соответствующих группах. \*-p < 0.05.

Это означает, что холин при его тонической аппликации обеспечивает подавление вызванного выброса АХ именно через активацию пресинаптических  $\alpha 7$ -нХР.



### **3.4.2. Механизм действия холина как агониста $\alpha 7$ -нХР при короткой высокочастотной стимуляции моторных синапсов мышцы**

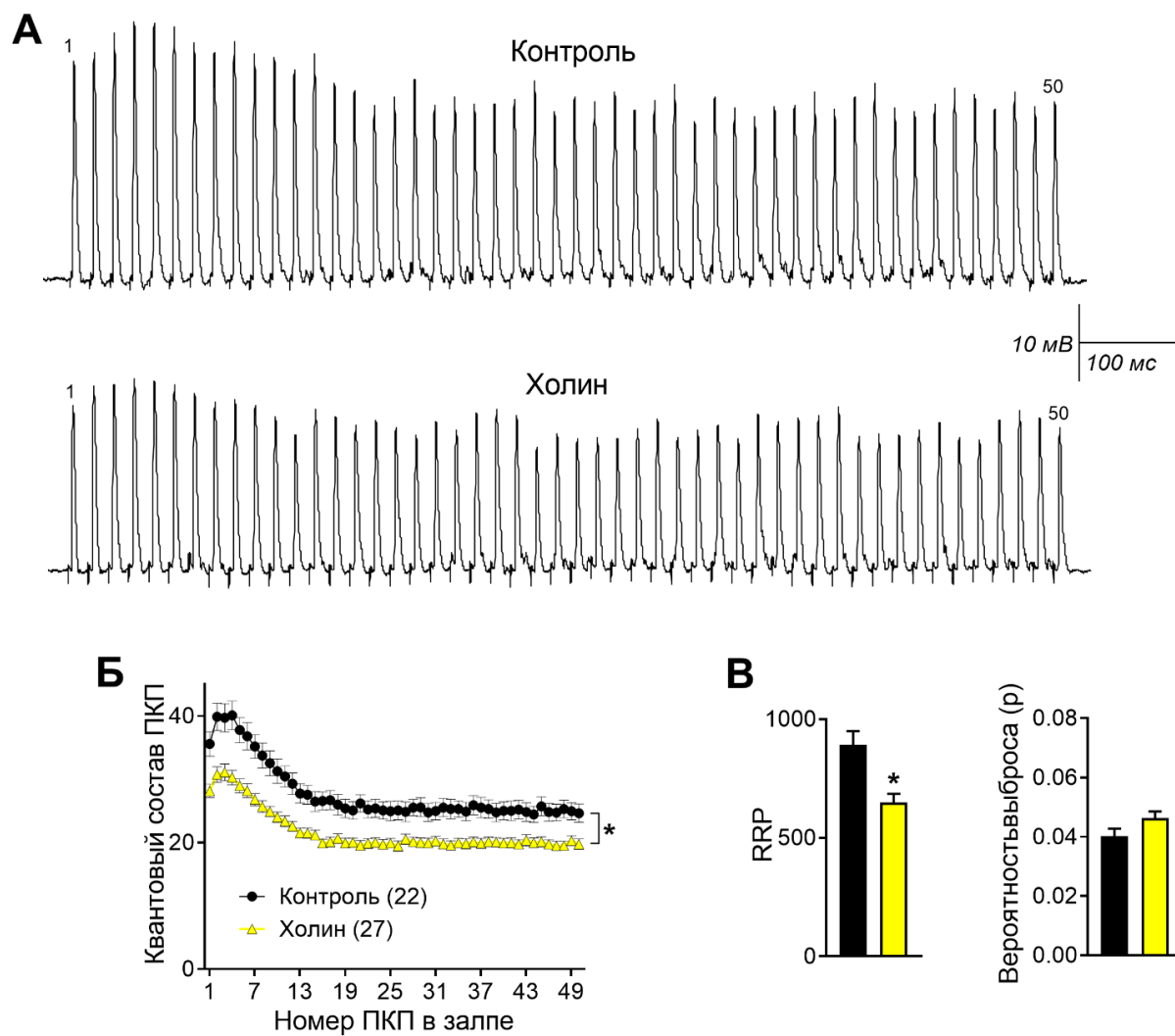
При регистрации вызванной активности моторных синапсов в коротких высокочастотных залпах (50 Гц, 1 с) холин также вызывал аналогичное наблюдавшемуся у одиночных ПКП снижение амплитуды и квантового состава, проявлявшееся у первого и всех последующих ПКП в залпе. При этом рисунок залпа ПКП не менялся: как и в контроле, в начале залпа наблюдается кратковременное облегчение синаптической передачи, которое сменяется депрессией с выходом на стабильный, сниженный по сравнению с первым ПКП в залпе уровень ПКП - плато (рис. 39А,Б). Эффект развивался на протяжении первых 10-15 минут действия холина и сохранялся в течение последующих 30 минут неизменным.

Расчет параметров квантовой секреции АХ в залпе показал, что тормозное действие холина сопровождается статистически значимым снижением RRP на 30%. Это означает, что часть активных зон моторных терминалей перестает принимать участие в синхронной вызванной квантов секреции АХ, при этом значение вероятности выброса квантов АХ ( $p$ ) при активации холином  $\alpha 7$ -нХР остается на контрольном уровне (рис. 39В).

Избирательные блокаторы  $\alpha 7$ -нХР –  $\alpha$ -кобратоксин (5 нМ) или MLA (20 нМ) не вызывали изменений параметров МПКП, а также амплитуды и квантового состава ПКП в высокочастотном коротком залпе. Это позволяет предполагать, что действующие при таком режиме работы моторного синапса (высокочастотная, но короткая активность) в синаптической щели концентрации АХ/холина - недостаточны для активации альфа7нХР и проявлений их регуляторной активности в отношении секреции АХ. Вместе с тем, на фоне этих блокаторов  $\alpha 7$ -нХР экзогенный холин (100 мкМ) оказался не способным оказывать тормозное действие на амплитуду и квантовый состав ПКП в залпах (рис. 40А).

Способность ряда эндогенных и экзогенных агонистов нейрональных нХР при кратковременной (в течение нескольких секунд) аппликации в

высоких миллимолярных концентрациях вызывать снижение секреции АХ в моторных синапсах была ранее продемонстрирована в ряде работ [Prior, Singh, 2000; Tian et al., 1994, 1997]. Однако не было четко установлено, какой именно тип пресинаптических нХР опосредует эти эффекты, и по какому механизму они реализуются.



**Рис. 39.** Торможение ритмической вызванной секреции АХ при активации  $\alpha 7$ -нХР холином (100 мкМ). **(А)** Пример оригинальных записей ПКП в коротком высокочастотном залпе (50 Гц, 1 с) в контроле и при действии холина. **(Б)** Изменение квантового состава ПКП по ходу залпа в контроле и под действием холина. **(В)** Активация  $\alpha 7$ -нХР холином вызывает уменьшение размера RRP без статистически значимого изменения ( $p=0.08$ ) вероятности выброса квантов АХ. В скобках – количество синапсов в соответствующих группах. \*- $p < 0.05$ .

Известно, что холин является полным избирательным агонистом  $\alpha 7$ -нХР, но в то же время может активировать и метаботропные М1-холинорецепторы, имеющиеся на нервных терминалях и Шванновских клетках моторных синапсов [Wright et al., 2009]. Однако холин активирует эти рецепторы в концентрациях, значительно превышающих 100 мкМ, применявшиеся в нашей работе [Fischer et al., 2014]. Кроме того, показано, что селективная стимуляция М1-холинорецепторов в моторных синапсах приводит к усилению секреции АХ [Santafé et al., 2006], и таким образом, не может быть причиной обнаруженного нами тормозного влияния экзогенного холина на нервно-мышечную передачу. Поэтому для объяснения обнаруженных нами эффектов холина мы основывались на хорошо документированных фактах о способности холина избирательно активировать  $\alpha 7$ -нХР [Alkondon et al., 1997; Papke et al., 1996].

Мы использовали протокол, при котором проводилась тоническая – в течение десятков минут – аппликация холина в низкой - 100 мкМ концентрации, которая не достигает  $EC_{50}$  для активации  $\alpha 7$ -нХР (0.5-1.5 мМ) [Alkondon et al., 1997; Papke, Porter Papke, 2002]. Известно, что  $\alpha 7$ -нХР относятся к очень быстро десенситизируемым нХР [Corradi, Bouzat, 2016; Noviello et al., 2021]. Однако согласно десенситизационной модели для  $\alpha 7$ -нХР, низкие (не достигающие  $EC_{50}$ ) концентрации агонистов приводят к пролонгированному открытию канала  $\alpha 7$ -нХР с незначительным развитием десенситизации или блоку открытого канала при негативных (гиперполяризационных) значениях МП [Papke et al., 1996; Papke, Porter Papke, 2002]. Тот факт, что снижение холином квантового состава ПКП предотвращается блокаторами  $\alpha 7$ -нХР, означает, что действие холина в данной концентрации (100 мкМ) реализуется через активацию, а не десенситизацию этих нейрональных нХР на пресинаптической мембране.

Долговременный характер наблюдаемых эффектов холина может быть следствием процессов, разыгрывающихся при активации  $\alpha 7$ -нХР. Похожая ситуация отмечена на претерминальных аксонах гиппокампальных нейронов,

где даже кратковременная (10 минут) активация  $\alpha 7$ -нХР экзогенными агонистами может приводить (вслед за быстрыми эффектами) к долговременным - в течение 30 и более минут - внутриклеточным подъемам уровня ионов  $\text{Ca}^{2+}$ , активации СаМКП и других ферментов, что сопровождается долговременным усилением секреции нейротрансмиттера [Zhong et al., 2013].

Нами было сделано предположение, что активация холином  $\text{Ca}^{2+}$ -проводящих  $\alpha 7$ -нХР создает в моторных терминалях  $\text{Ca}^{2+}$ -сигнал с особыми пространственно-временными характеристиками, который приводит к подавлению  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой секреции АХ за счет снижения числа активных зон терминали, готовых к освобождению квантов АХ, что и вызывает равномерное уменьшение квантового состава ПКП в залпе. Такое  $\alpha 7$ -нХР-опосредованное  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимое изменение возбудимости моторных терминалей могло происходить за счет активации низкопроводящих  $\text{Ca}^{2+}$ -активируемых  $\text{K}^+$ -каналов (СК-каналов), подобно тому, как это наблюдается в случае тормозного действия АХ на импульсную активность других возбудимых клеток [Griguoli et al., 2009; Yuhas, Fuchs, 1999].

СК-каналы (СК3-изоформа) были описаны в нервных терминалях моторных синапсов [Roncarati et al., 2001], однако их функциональная роль оставалась неясной. Мы установили, что блокатор СК-каналов апамин (200 нМ) не вызывает статистически значимых изменений амплитуды и квантового состава ПКП в ритмическом залпе ПКП. Это означало, что вход ионов  $\text{Ca}^{2+}$  по P/Q-типу  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов при генерации пресинаптических ПД и возникающий при этом околосезикулярный  $\text{Ca}^{2+}$ -сигнал оказывается неэффективным для активации СК-каналов в моторных терминалях мышцы.

Оказалось, что на фоне апамин холин утрачивает способность снижать квантовый состав ПКП (рис. 40Б). Это может свидетельствовать в пользу того, что в  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимом тормозном действии холина на секрецию АХ СК-каналы выступают в качестве финальной мишени сигнального каскада, запускаемого активацией  $\alpha 7$ -нХР. Возникающий при этом выходящий  $\text{K}^+$ -ток должен

сопровождаться гиперполяризацией пресинаптической мембраны, которая, по-видимому, способна переводить в «молчащее» состояние часть активных зон, что и приводит к холин-индуцированному снижению размера RRP и угнетению синхронного мультиквантового выброса АХ.

SK-каналы, которым для активации, в отличие от BK-каналов, не требуется сочетания деполяризации мембраны и возрастания концентрации ионов  $Ca^{2+}$ , а необходимо только повышение уровня внутриклеточного  $Ca^{2+}$ , могут активироваться ионами  $Ca^{2+}$  из разных источников [Adelman et al., 2012]. В частности, в определенных гиппокампальных нейронах работа SK-каналов усиливается за счет  $Ca^{2+}$ -индуцированного выброса ионов  $Ca^{2+}$  из РiР-содержащих  $Ca^{2+}$ -депо. Этот выброс депонированного  $Ca^{2+}$  индуцируется входом ионов  $Ca^{2+}$  по каналам  $\alpha 7$ -нХР [Griguoli et al., 2009]. Поэтому далее выясняли возможное вовлечение РiР и выброса ионов  $Ca^{2+}$  из ионов  $Ca^{2+}$ -депо моторных терминалей в реализацию ионов  $Ca^{2+}$ -зависимых тормозных эффектов холина с участием SK-каналов.

Рианодин в концентрации, обратимо блокирующей РiР (3 мкМ), не вызывал статистически значимых изменений амплитуды и квантового состава ПКП в коротком ритмическом залпе, и в незначительной степени снижал начальное облегчение передачи в начале короткого залпа ПКП. В присутствии рианофина (3мкМ) холин утратил способность снижать амплитуду и квантовый состав ПКП в залпе (рис. 40В). Это свидетельствует о необходимости участия не только  $\alpha 7$ -нХР, но выброса депонированного  $Ca^{2+}$  в реализации  $Ca^{2+}$ -зависимого торможения холином вызванной квантовой секреции АХ.

Открытие в молекуле  $\alpha 7$ -нХР аминокислотного кластера, обеспечивающего их функциональное взаимодействие с G-белками, расширило возможность функционирования  $\alpha 7$ -нХР не только как быстро десенситизируемых  $Ca^{2+}$ -проводящих ионотропных рецепторов, но и как особых метаботропных рецепторов, осуществляющих длительную сигнализацию, включающей активацию  $G_q$ -белка, фосфолипазы C, выброс

депонированного  $\text{Ca}^{2+}$  (с участием  $\text{IP}_3$ -рецепторов) и последующую активацию  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимых ферментов и белков [Borroni, Barrantes, 2021; Kabbani, Nichols, 2018; King et al., 2015]. Для выявления возможных механизмов тормозного действия холина на вызванную секрецию АХ не только с участием SK-каналов, но и других  $\text{Ca}^{2+}$ -активируемых белков, способность холина подавлять амплитуду и квантовый состав ПКП в залпе была исследована на фоне блокаторов  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимых ферментов – РКС (хелеритрин, 4 мкМ) и СаМКП (KN-62, 3 мкМ).

Хелеритрин (4 мкМ) течение 30-40 минут не вызывал изменений характера залповой синаптической активности – ни квантовый состав ПКП по ходу залпа, ни сам рисунок залпа (начальное облегчение, последующая депрессия, плато) достоверно не изменялись в его присутствии ( $p > 0.05$ ). Более того, хелеритрин никак не повлиял и на тормозные эффекты холина в отношении квантового состава ПКП при залповой активности моторных синапсов (рис. 40Г). Отсюда следует, что и  $\text{Ca}^{2+}$ -сигналы, поступающие в терминаль при активации холином  $\alpha 7$ -нХР с последующим выбросом депонированного  $\text{Ca}^{2+}$ , и возможная метаботропная сигнализация  $\alpha 7$ -нХР с участием  $G_q$ -белка, как показано на других объектах [Kabbani, Nichols, 2018; King et al., 2015], не способны активировать РКС и вовлечь ее в торможение секреции АХ в моторных синапсах. Это согласуется с вышеописанными нами данными, свидетельствующими, что в моторных терминалях активация РКС может запускаться поступлением ионов  $\text{Ca}^{2+}$  в терминаль через другие  $\text{Ca}^{2+}$ -входы – в частности, при работе  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов L-типа, и соучаствовать не в торможении, а в усилении квантовой секреции АХ (рис. 8).

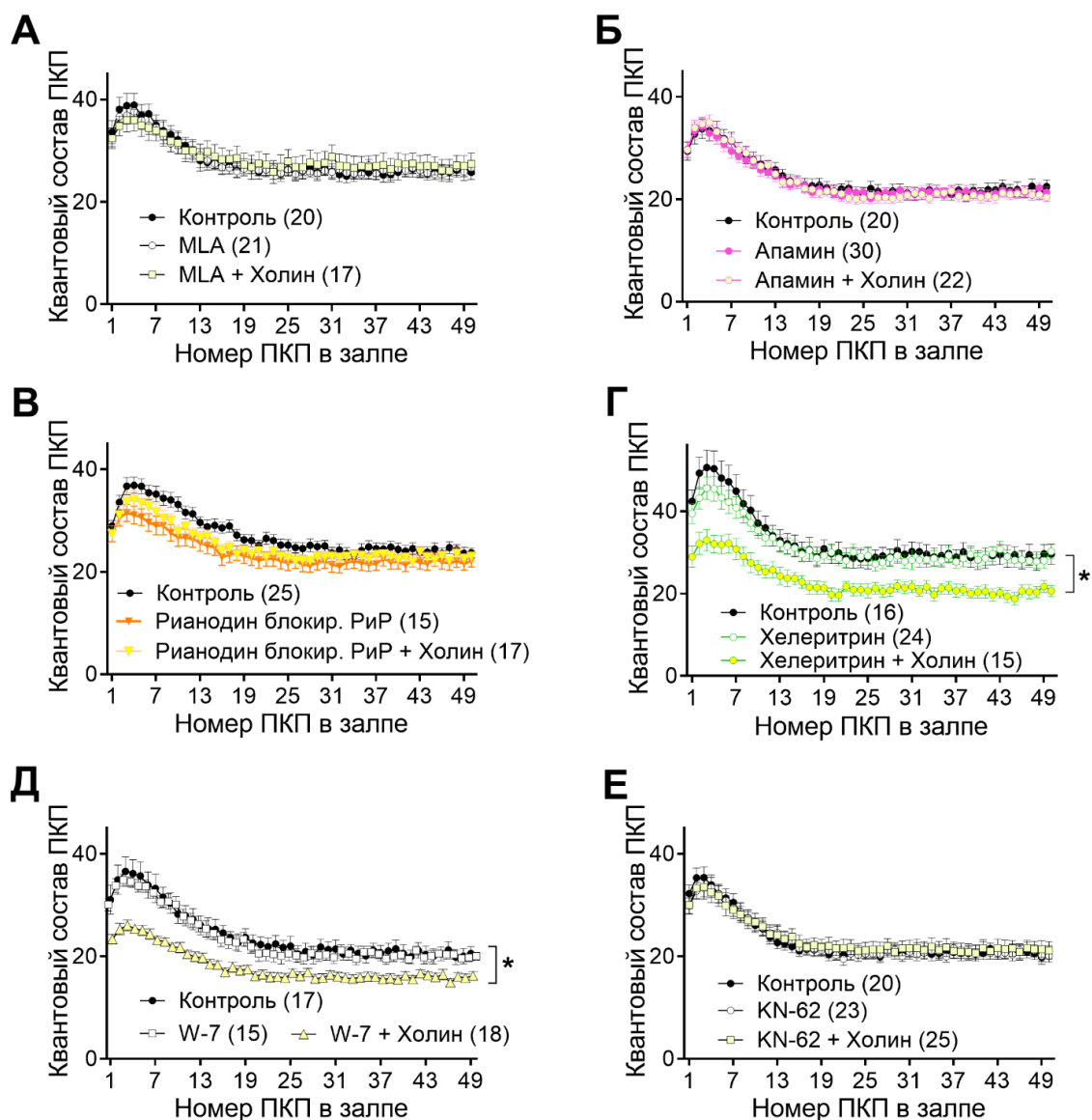
Далее исследовали эффекты холина на фоне предварительного выключения регуляторной активности СаМ с помощью его ингибитора W-7 (10 мкМ). Блокатор СаМ не оказывал собственного действия на передачу и достоверно не влиял на тормозный эффект холина в отношении вызванной секреции АХ (рис. 40Д). Совершенно иной результат показало использование блокатора СаМКП – KN-62 (3 мкМ). При перфузии нервно-мышечного

препарат раствором, содержащим KN-62 в течение 30-40 минут мы не обнаружили статистически значимых изменений ни амплитуды МПКП, ни квантового состава ПКП по ходу коротких залпов. Так, амплитуда МПКП в контроле составляет  $0.91 \pm 0,05$  мВ ( $n=20$ ), при действии KN-62  $0.85 \pm 0.04$  мВ ( $n = 23, p>0.05$ ), а на фоне холина в присутствии KN-62 –  $0.83 \pm 0.6$  мВ ( $n = 25$ ). Однако в присутствии KN-62 холин не вызвал снижения амплитуды и квантового состава ПКП в залпе по сравнению с контролем (рис. 40Е).

Полученные результаты свидетельствуют, что обнаруженное нами подавление выброса квантов АХ при активации  $\alpha 7$ -нХР холином предполагает, наряду с другими процессами, активацию СаМКП и её непосредственное участие в торможении квантовой секреции АХ.

В настоящее время в терминалях центральных и периферических синапсов известны примеры активации пресинаптической СаМКП как за счет функционирования входов наружного [Zhong et al., 2013], так и выброса внутриклеточного  $Ca^{2+}$  [de Jong, Verhage, 2009], и возможность её разнонаправленных влияний на секрецию нейротранмиттеров и котрансмиттеров [de Jong, Verhage, 2009; Shakiryanova et al., 2007]. В синапсах гиппокампа при активации холином пресинаптических  $\alpha 7$ -нХР описана генерация  $Ca^{2+}$ -сигнала, приводящая к возрастанию амплитуды возбуждающих постсинаптических потенциалов, однако эти эффекты не сопровождалась активацией СаМКП, и сохранялись в присутствии ингибитора её активности [Cheng, Yakel, 2015]. Совокупность полученных нами данных свидетельствует о том, что в моторных синапсах в механизмах ауторегуляции секреции АХ с участием холина и  $\alpha 7$ -нХР участвует также и СаМКП.

Выявленное нами вовлечение СаМКП в ауторегуляцию секреции АХ позволяет добавить эту протеинкиназу к уже известному набору ферментов, способных по-разному участвовать в передаче сигнала при активации  $\alpha 7$ -нХР в разных типах клеток.



**Рис. 40.** Механизм торможения квантовой секреции АХ при активации  $\alpha 7$ -нХР холином (100 мкМ). (А) Блокатор  $\alpha 7$ -нХР MLA (20 нМ) сам не изменяет квантовый состав ПКП в коротком высокочастотном залпе (50 Гц, 1 с) залпе, но полностью предотвращает его снижение под действием холина. (Б) Холин утрачивает способность снижать квантовый состав ПКП в залпе в присутствии блокатора SK-каналов апамина (200 нМ). (В) Блокада РиР рианоудином (3 мкМ) предотвращает торможение вызванной секреции АХ под действием холина. (Г) Блокирование РКС хелеритрином (4 мкМ) не способно предотвратить снижение квантового состава ПКП при активации  $\alpha 7$ -нХР холином. (Д) Холин снижает квантовый состав ПКП в присутствии ингибитора СаМ W-7 (10 мкМ) (Е) Холин утрачивает способность тормозить вызванную секрецию АХ в залпе на фоне предварительно заблокированной KN-62 (3 мкМ) СаМКП. В скобках – количество синапсов в соответствующих группах. \*-p < 0.05.



В итоге, нами впервые описан еще один способ активации и участия СаМКП в работе моторных нервных терминалей, когда активации  $\alpha 7$ -нХР сопровождается вовлечением СаМКП в торможение секреции АХ. Роль той популяции СаМКП, которая расположена в непосредственной близости от  $\alpha 7$ -нХР и внутриклеточных  $\text{Ca}^{2+}$ -депо, может заключаться в усилении и продлении обеспечиваемого работой РиР  $\text{Ca}^{2+}$ -сигнала, необходимого для активации SK-каналов. Не исключена и возможность того, что мишенью киназной активности пресинаптической СаМКП могут быть не только РиР, но и сами SK-каналы. В пользу такой возможности свидетельствуют известные примеры способности  $\text{Ca}^{2+}$ /СаМ-активированной СаМКП прямо усиливать (путем фосфорилирования) работу SK-каналов в кардиомиоцитах и, тем самым, влиять на их возбудимость [Mizukami et al., 2015].

Таким образом, мы впервые установили, что активация пресинаптических  $\text{Ca}^{2+}$ -проводящих  $\alpha 7$ -нХР с помощью экзогенного холина тормозит синаптическую передачу в моторных синапсах посредством запуска внутриклеточного каскада с участием рианодин-чувствительных  $\text{Ca}^{2+}$ -депо, СаМКП и  $\text{Ca}^{2+}$ -активируемых SK-каналов, приводя к уменьшению квантового состава ПКП в коротких залпах. Проведенные расчеты показали, что такое холин-индуцированное снижение квантового состава ПКП, удерживающееся стабильно в течение всего ритмического залпа ПКП, есть результат снижения на треть размера RRP (числа готовых к высвобождению квантов АХ), но не вероятности выброса квантов АХ (p) в моторных синапсах диафрагмы мыши во время их ритмической активности.

Полученные в нашей работе новые данные об активности пресинаптической СаМКП впервые продемонстрировали возможность избирательной активации СаМКП как при входе ионов  $\text{Ca}^{2+}$  снаружи по L-типу  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов, при выбросе депонированного  $\text{Ca}^{2+}$ , при активации P2X7-рецепторов, и наконец, при активации  $\alpha 7$ -нХР, причем - с разными функциональными последствиями для квантовой секреции АХ. Это указывает на существующую в моторных терминалях высокую степень

компарментализации этой протеинкиназы, её колокализацию с определенными и существенно разными  $\text{Ca}^{2+}$ -входами и соответствующими мишенями. В совокупности это отражает очень избирательный пространственно-временной паттерн активности этого фермента, который может лежать в основе его разных  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимых воздействий на параметры секреции АХ.

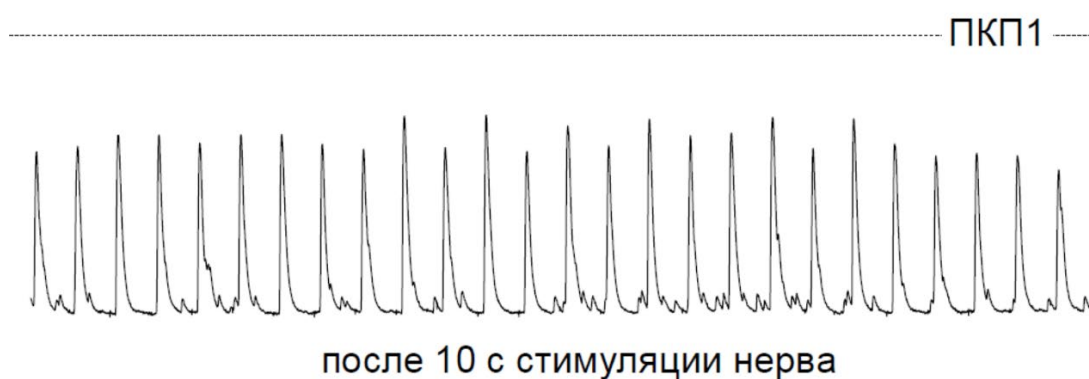
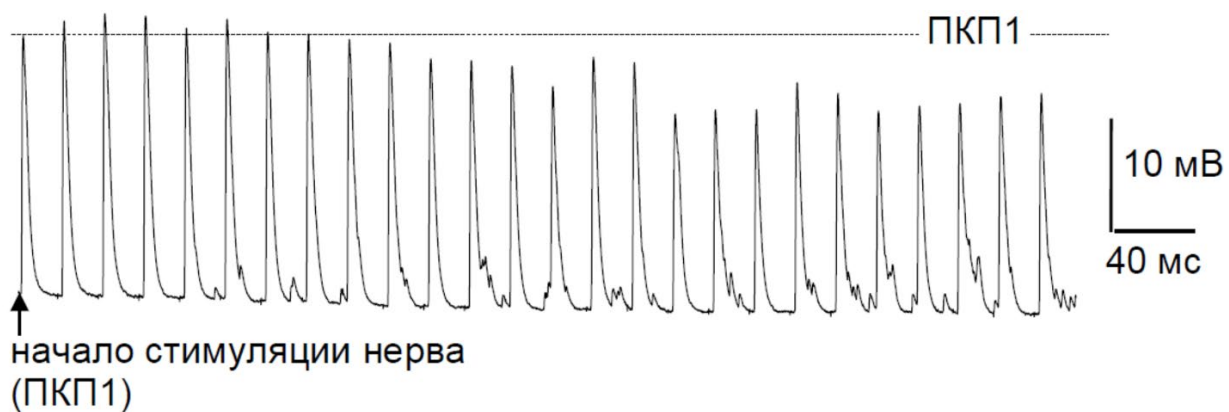
### **3.4.3. Роль $\alpha 7$ -нХР при длительной ритмической активности моторных синапсов мышцы**

Поскольку MLA (блокатор  $\alpha 7$ -нХР) не оказал влияния на параметры ПКП в коротком залпе (рис 40А), мы предположили, что необходима более продолжительная вызванная активность моторных синапсов для накопления эндогенных АХ/холина в синаптической щели в концентрациях, необходимых для активации пресинаптических  $\alpha 7$ -нХР, которые могут быть локализованы на удалении от непосредственных мест экзоцитоза везикул с АХ в терминалях.

Для проверки этого предположения мы использовали длительную непрерывную залповую стимуляцию моторных синапсов в течение 40 секунд с частотой 50 Гц. Это приводит к развитию депрессии синаптической передачи и уменьшению амплитуды ПКП до 35-40% от исходной (рис. 41).

Анализ средней амплитуды МПКП до залпа ПКП и после его окончания не выявил статистически значимых изменений этого параметра – до залпа амплитуда МПКП составляла  $1.01 \pm 0.08$  мВ, а после залпа –  $0.97 \pm 0.08$  мВ ( $n = 17$ ,  $p > 0.05$ ).

Расчет квантового состава ПКП на разных этапах по ходу залпа и развивающейся депрессии синаптической передачи показал, что уменьшение амплитуды ПКП имеет пресинаптическую природу и однозначно связано со снижением квантового состава ПКП на всем протяжении залпа ПКП.

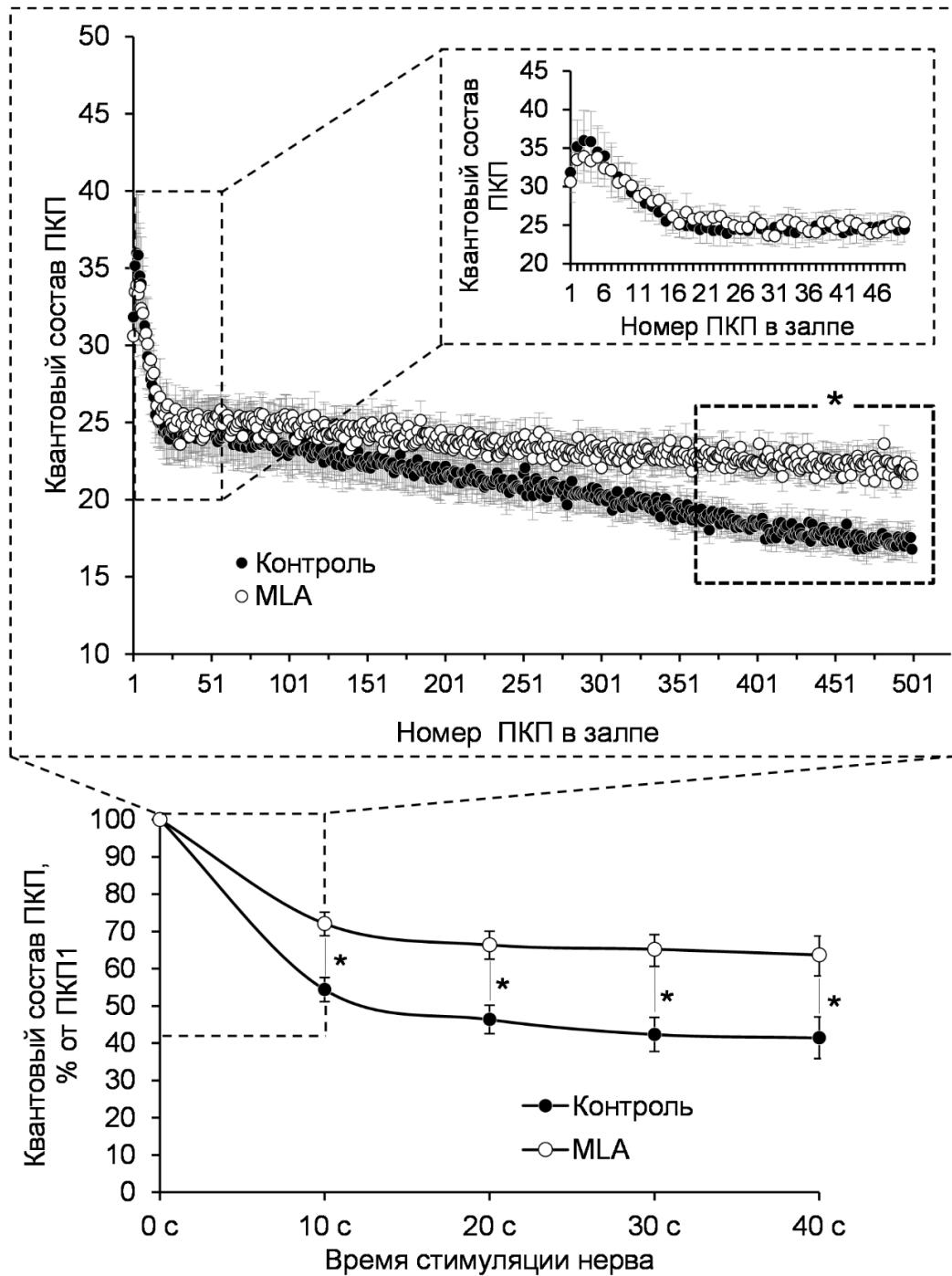


**Рис. 41.** Пример оригинальных записей ПКП в условиях длительной (40 секунд) высокочастотной (50 Гц) стимуляции диафрагмального нерва: в начале залпа (вверху), на 10-й секунде залпа (в середине) и в 40-й секунды залпа (внизу). Пунктирной линией показана амплитуда первого ПКП в залпе (ПКП1), стрелками показаны включение и выключение стимуляции диафрагмального нерва.

Депрессия синаптической передачи имеет, как минимум, две разные фазы: первую, более быструю (1-10 с), когда наблюдается быстрый спад квантового состава ПКП, в среднем, до 50% по сравнению с первым ПКП в залпе (ПКП1); и вторую – более медленную (10-40 с) – когда в результате к концу тетанической активности синапсов квантовый состав ПКП в контроле составляет порядка 35-40% от значений для ПКП1.

Избирательный блокатор  $\alpha 7$ -нХР MLA (20 нМ) по сравнению с контролем не вызывал достоверных изменений мембранного потенциала мышечных волокон ( $-35.65 \pm 1.20$  мВ ( $n = 17$ ) в контроле и  $-36.76 \pm 0.93$  мВ ( $n = 20$ ,  $p > 0.05$ ) на фоне MLA), амплитуды МПКП и квантового состава ПКП1 ( $31.84 \pm 2.60$  в контроле и  $30.61 \pm 2.66$  на фоне MLA). При заблокированных  $\alpha 7$ -нХР сохраняется неизменным квантовый состав ПКП и рисунок залповой активности в течение первой секунды стимуляции (рис. 42). – так же, как и в коротких высокочастотных залпах ПКП (рис. 40А). Однако, далее, в присутствии MLA в период со 2-й по 10-ю секунды продолжающейся залповой активности моторных синапсов, снижение квантового состава ПКП хотя и присутствовало, но постепенно становилось значительно менее выраженным, чем в контроле, и составило к концу 10-й секунды стимуляции  $72.1 \pm 3.2$  % по сравнению с ПКП1 (при том, что в контроле за этот же период квантовый состав ПКП период снижался до  $54.4 \pm 3.1$  % от значения для ПКП1 ( $p < 0.05$ )). Далее, с 10-й до 40-й секунды стимуляции значения квантового состава ПКП в залпе на фоне блокатора  $\alpha 7$ -нХР уже достоверно не снижались (рис. 42).

В результате, при заблокированных MLA  $\alpha 7$ -нХР выявилось существенное ослабление - на 18-20 % - первой фазы депрессии (снижения амплитуды и квантового состава ПКП в течение первых 10 секунд залповой активности моторных синапсов) и практически полное предотвращение дальнейшей (второй) фазы снижения квантового состава ПКП при продолжающейся стимуляции моторных синапсов (10-40 секунд стимуляции).



**Рис. 42.** Изменение нервно-мышечной передачи в условиях длительной тетанической активности синапсов (50 Гц, 40 секунд) при блокировании  $\alpha 7$ -нХР MLA (20 нМ): вверху - изменение квантового состава ПКП по ходу 10 секунд длительного ритмического залпа в контроле (n = 17) и в присутствии MLA (n = 20), на врезке – квантовый состав ПКП в течение первой секунды длительного залпа ПКП; внизу – снижение квантового состава ПКП, нормализованного к ПКП1 (принят за 100 %), по ходу длительного непрерывного залпа в контроле и в присутствии MLA. \* - p<0.05 по сравнению с контролем.

Таким образом, блокирование  $\alpha 7$ -нХР оказалось способно существенно сдерживать уменьшение амплитуды и квантового состава ПКП по ходу залпа и удерживать их на уровне около 65 % от значений для ПКП1 к 40-й секунде стимуляции, в отличие от снижения значений этих параметров для соответствующих ПКП до 40-35 % в контроле (без MLA).

Полученные данные позволяют предположить, что в моторных синапсах мышцы имеет место режим продолжительной активности, при котором происходит активация  $\alpha 7$ -нХР посредством эндогенных агонистов (АХ или образующегося из него холина), и которые осуществляют ауторегуляторное подавление квантовой вызванной секреции АХ из нервных терминалей по механизму отрицательной обратной связи.

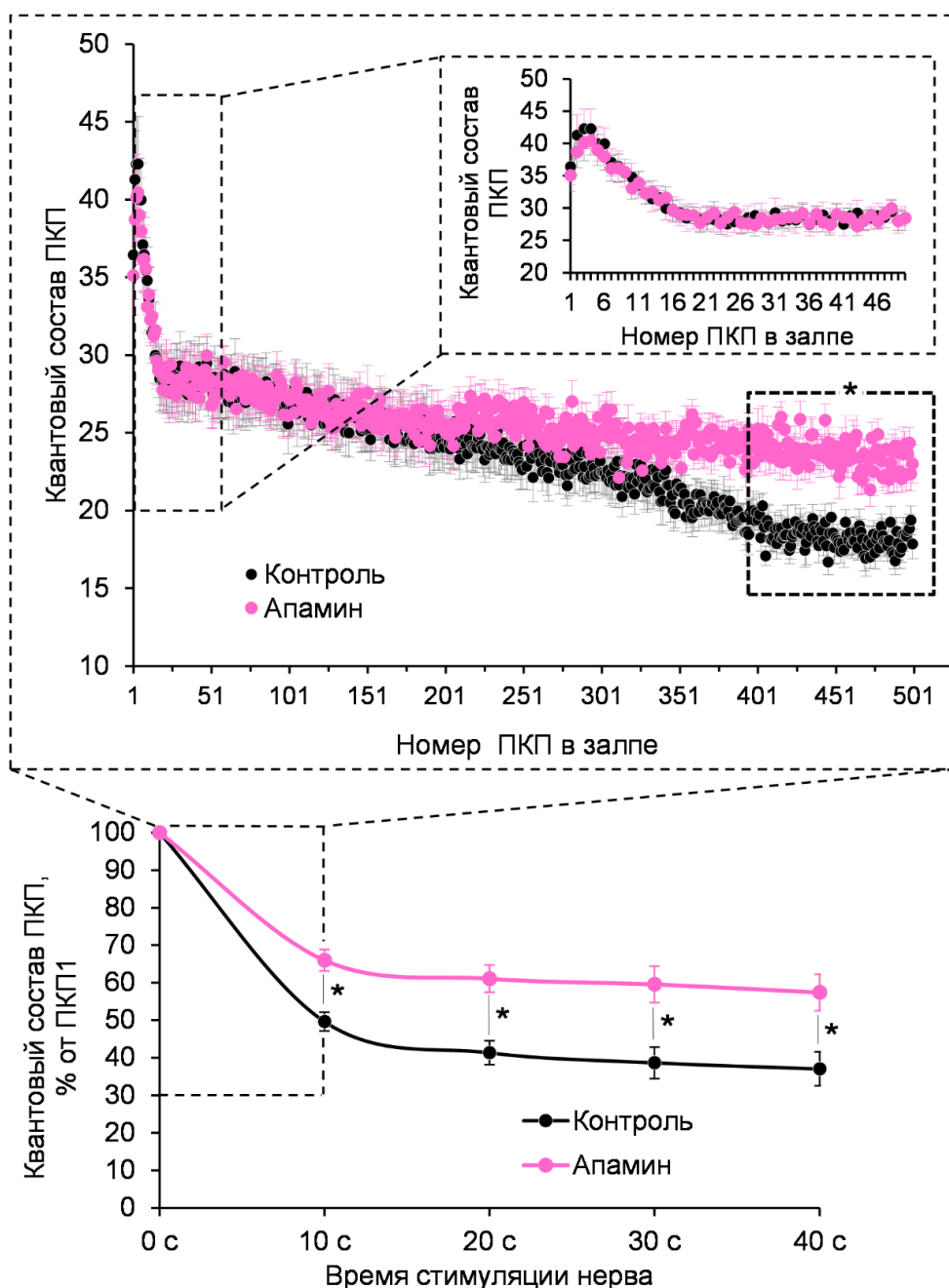
Далее было исследовано возможное участие SK-каналов и РнР в реализации запускаемого при активации  $\alpha 7$ -нХР подавления выброса АХ при длительных залпах ПКП. Блокатор SK-каналов апамин (1 мкМ) не вызывал достоверных изменений мембранного потенциала мышечных волокон, амплитудно-временных параметров МПКП (так, амплитуда МПКП составляла  $0.92 \pm 0.07$  мВ ( $n = 19$ ) в контроле и  $0.96 \pm 0.07$  мВ ( $n = 19$ ,  $p > 0.05$ ) на фоне апамина) и амплитуды и квантового состава ПКП1. Значения квантового состава ПКП по ходу залпа в течение первой секунды тетанической стимуляции нерва не претерпевали достоверных изменений в присутствии апамина (рис. 43). Однако апамин сдерживал развитие депрессии синаптической передачи в условиях продолжительной тетанической активности моторных синапсов на протяжении 40 с (рис. 43).

При этом апамин, подобно блокатору  $\alpha 7$ -нХР, не только практически полностью предотвращал медленную фазу снижения квантового состава ПКП на протяжении последних 30 секунд длинного залпа, но и существенно препятствовал снижению амплитуды и квантового состава ПКП на первой фазе депрессии синаптической передачи (в интервале 2-10 секунд непрерывной тетанической активности синапсов). В присутствии апамина квантовый состав ПКП к 10-й секунде стимуляции снижался до 66-69 % по

сравнению с ПКП1, в отличие от спада до 49-52 % в контроле ( $p < 0.05$ ). Дальнейшее развитие депрессии синаптической передачи в виде снижения квантового состава ПКП фактически останавливалось на фоне действия апамина и составило не более чем 57-60 % от ПКП1 в отличие от спада значения этого параметра до 35-37 % в контроле (рис. 43).

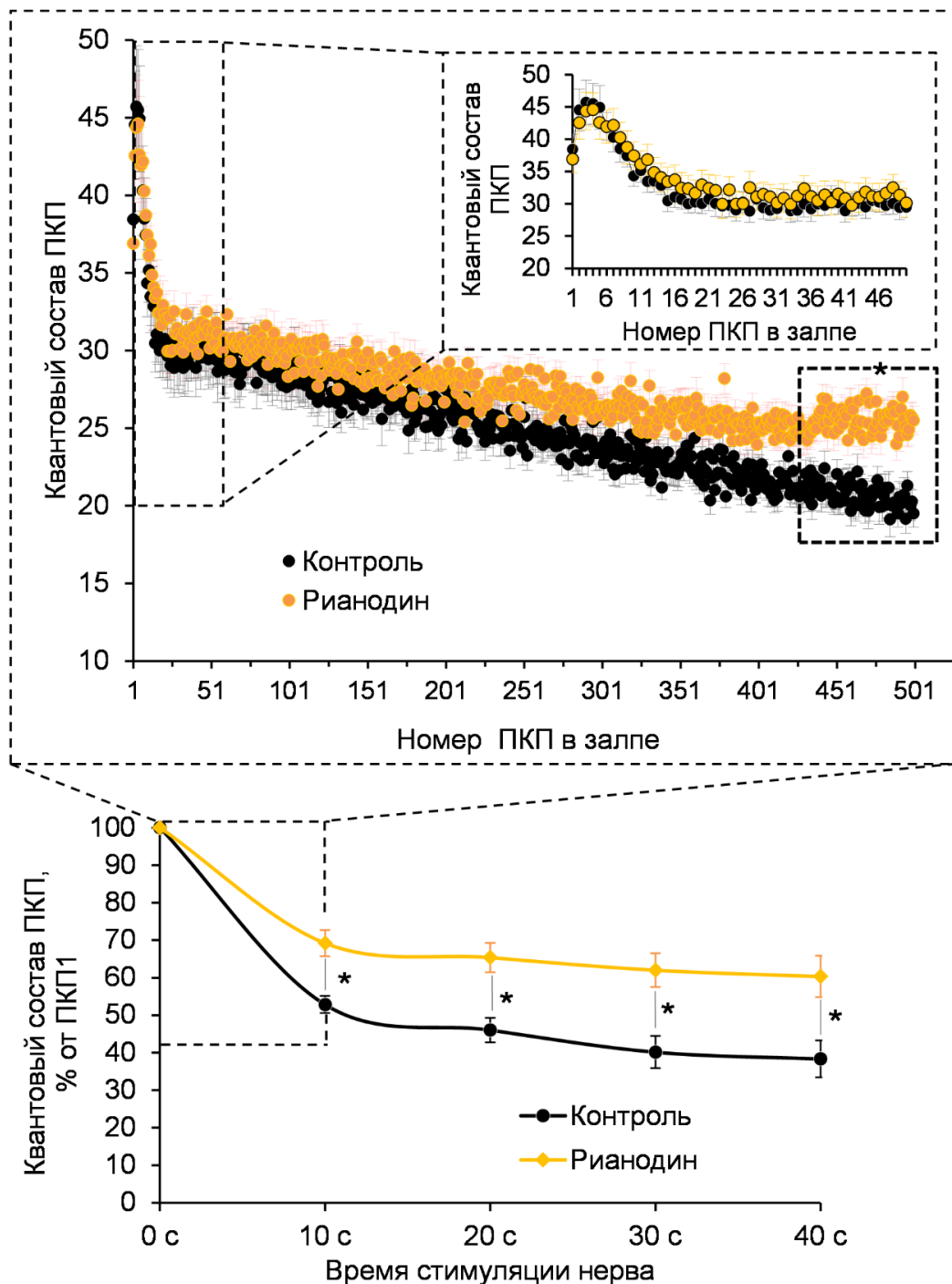
Рианодин в концентрации 3 мкМ, вызывающей блокирование РиР [Gerasimova et al., 2015], не приводил к изменениям МП мышечных волокон и амплитудно-временных характеристик МПКП. По ходу коротких (50 Гц, 1 секунда) ритмических залпов ПКП в присутствии блокирующего РиР рианофина возможно снижение начального кратковременного облегчения, однако кратковременная депрессия и снижение значений квантового состава ПКП по ходу такого короткого залпа на 15-25 % по сравнению с ПКП1 - сохраняется неизменным (рис. 19Б). В течение первой секунды длительной тетанической стимуляции наблюдали аналогичную картину. Вместе с тем, к концу 10-й секунды ритмической синаптической активности в присутствии 3 мкМ рианофина снижение квантового состава ПКП становится достоверно менее выраженным (69-72 % от ПКП1) по сравнению с контролем (50-52 % от ПКП1,  $p < 0.05$ ) (рис. 44). В последние 30 секунд тетанического залпа, с 10-й по 40-ю секунды, наблюдали стойкое удерживание амплитуды и квантового состава ПКП без значительного спада по сравнению с ПКП на 10-й секунде залпа. В результате, в присутствии рианофина величины квантового состава ПКП к концу залпа удерживались на уровне 60-65 % от ПКП1 (тогда как в контроле составляли 35-40 % от ПКП1).

Такое протекторное действие рианофина, сдерживающее депрессию синаптической передачи и падение уровня вызванной квантовой секреции АХ в длинном залпе, было фактически не отличимо от вышеописанного действия блокаторов  $\alpha 7$ -нХР и SK-каналов. Это позволяет предполагать наличие функционального сопряжения между активностью  $\alpha 7$ -нХР, пресинаптических РиР и SK-каналов, и их совместного участия в механизме торможении выброса АХ и депрессии передачи в моторных синапсах.



**Рис. 43.** Уменьшение развития синаптической депрессии при тетанической активности моторных синапсов (50 Гц, 40 секунд) при блокировании SK-каналов апамином (1 мкМ): вверху - изменение квантового состава ПКП по ходу 10 секунд длительного ритмического залпа в контроле ( $n = 19$ ) и при действии апамина ( $n = 19$ ), на врезке – квантовый состав ПКП в течение первой секунды длительного залпа ПКП; внизу – снижение квантового состава ПКП, нормализованного к ПКП1 (принят за 100 %), по ходу длительного непрерывного залпа в контроле и на фоне апамина. \*- $p < 0.05$  по сравнению с контролем.





**Рис. 44.** Депрессия синаптической передачи при длительной активности моторных синапсов (50 Гц, 40 секунд) снижается при блокировании РиР рианодином (3 мкМ): вверху - изменение квантового состава ПКП по ходу 10 секунд длительного ритмического залпа в контроле (n = 18) и на фоне рианодина (n = 17), на врезке – квантовый состав ПКП в течение первой секунды длительного залпа ПКП; внизу – снижение квантового состава ПКП, нормализованного к ПКП1 (принят за 100 %), по ходу длительного непрерывного залпа в контроле и в присутствии рианодина. \* -  $p < 0.05$  по сравнению с контролем.

Тетаническая депрессия синаптической передачи как в центральных, так и периферических синапсах, считается одним из проявлением их кратковременной пластичности [Regehr, 2012]. В качестве наиболее вероятной, но не единственной ее причины, называют постепенное истощение RRP [Cano et al., 2012; Regehr, 2012; Ruiz et al., 2011].

Кроме того, в качестве процессов, ответственных за индукцию депрессии, рассматривают возможность постепенной инактивации мест экзоцитоза синаптических везикул в активных зонах [Hosoi et al., 2009; Neher, 2010] или угнетение пресинаптического  $Ca^{2+}$ -входа ионов в районе активных зон из-за развивающейся инактивации быстрых потенциал-зависимых  $Ca^{2+}$ -каналов, работа которых необходима для запуска экзоцитоза [Forsythe et al., 1998; Mochida, 2017; Nanou et al., 2016; Neher, Sakaba, 2008].

Механизмы, обеспечивающие аутоингибирование секреции нейротрансмиттера с помощью пресинаптических рецепторов – широко распространенный феномен, описанный в самых разных по химизму синапсах ЦНС [Atwood et al., 2014; Castillo, 2012]. Срабатывание регуляторного контура отрицательной обратной связи в синаптической передаче с участием АХ и его рецепторов отмечен и в моторных синапсах, где эту роль приписывают пресинаптическим M2-холинорецепторам [Tomàs et al., 2014]. Возможный вклад и других, например, ионотропных nAChR в механизм аутоингибирования выброса АХ - также обсуждается [Khaziev et al., 2016; Oliveira et al., 2002; Бухараева, Скоринкин, 2021]. Однако возможное участие  $\alpha 7$ -nAChR в механизме аутоингибирования выброса АХ до сих пор оставалось не исследованным. Мы впервые показали, что  $\alpha 7$ -nAChR, для которых мы предполагаем пресинаптическую локализацию, могут, активируясь холином либо АХ, осуществлять торможение АХ, но для этого требуются специальные условия. В частности, при кратковременной работе моторных синапсов  $\alpha 7$ -nAChR не участвуют в регуляции синаптической передачи, однако они могут обеспечивать торможение выброса АХ в коротких залпах в ответ на их активацию никотином [Balezina et al., 2006].

Мы впервые показали, что не только у экзогенных агонистов  $\alpha 7$ -нХР, но и у эндогенных холина/АХ есть такая же физиологическая функция, но реализуется она только в результате их накопления в синаптической щели в условиях длительного высокочастотного залпа ПКП. Оказалось, что аутоингибирование выброса АХ с участием  $\alpha 7$ -нХР предполагает запуск в нервных терминалях каскада реакций с участием пресинаптических РнР и  $\text{Ca}^{2+}$ -активируемых  $\text{K}^+$ -каналов SK-типа. Эндогенный холин обычно присутствует в синаптической зоне в диапазоне концентраций 1-10 мкМ, что недостаточно для активации  $\alpha 7$ -нХР в отсутствие аллостерических модуляторов [Gusev, Uteshev, 2010; Parikh, Sarter, 2006]. Однако при длительной синаптической активности, вследствие продолжающегося гидролиза АХ (благодаря высокой активности ацетилхолинэстеразы в моторных синапсах теплокровных), может, по-видимому, происходить накопление холина в околосинаптическом пространстве вплоть до концентраций в сотни мкМ, достаточных для активации  $\alpha 7$ -нХР [Corradi, Bouzat, 2016].

В отличие от большинства синапсов ЦНС, где активация  $\alpha 7$ -нХР эндогенными АХ/холином, как правило, вызывает  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимое усиление секреции нейротрансмиттера [Cheng, Yakel, 2015], в моторных синапсах, как мы показали, активность эндогенных лигандов  $\alpha 7$ -нХР может приводить к торможению синхронной многоквантовой секреции АХ, причем, с участием пресинаптических  $\text{Ca}^{2+}$ -активируемых РнР и  $\text{Ca}^{2+}$ -активируемых SK-каналов. Известны редкие примеры, когда активация  $\alpha 7$ -нХР обеспечивает вход по ним ионов  $\text{Ca}^{2+}$ , приводит к активации РнР и далее - SK-каналов. Такой сигнальный каскад, в конечном итоге, вызывает гиперполяризацию мембраны [Griguoli et al., 2009]. Когда такой нетривиальный сигнальный путь реализуется на пресинаптическом уровне, он, в конечном итоге, может обеспечивать торможение секреции нейротрансмиттера [Porri et al., 2020].

Говоря об открытой нами роли пресинаптических  $\alpha 7$ -нХР в аутоингибировании квантовой секреции АХ, следует отметить, что в

настоящее время нет консенсуса по поводу места локализации и функционирования  $\alpha 7$ -нХР в моторных синапсах млекопитающих.

Давно обнаружено присутствие  $\alpha 7$ -нХР на постсинаптическом уровне, которое обеспечивает стабилизацию нервно-мышечного контакта на ранних этапах онтогенеза и в ходе структурных перестроек при денервации и реиннервации мышечных волокон [Fischer et al., 1999]. Постсинаптическая локализация  $\alpha 7$ -нХР и обеспечиваемая ими  $\text{Ca}^{2+}$ -сигнализация отмечена и в зрелых моторных синапсах [Dezaki et al., 1999]. При этом в последнее время доминирует гипотеза о расположении  $\alpha 7$ -нХР на мембране перисинаптических Шванновских клеток, где они служат своеобразным сенсором избыточного «растекания» АХ/холина в условиях снижения активности ацетилхолин- и бутирилхолинэстераз [Petrov et al., 2014, 2021] или при интенсивной и пролонгированной синаптической активности [Noronha-Matos et al., 2020]. Предполагается, что активация таких «непресинаптических» (глиальных)  $\alpha 7$ -нХР эндогенными лигандами, постепенно накапливающимися и достигающими Шванновских клеток, запускает выброс из них глиотрансмиттера (аденозина), который, через активацию своих пресинаптических  $A_1$ -рецепторов тормозит квантовую секрецию АХ из нервной терминали. Действительно, на первый взгляд, равномерное снижение квантового состава ПКП в коротких залпах при дополнительной стимуляции  $A_1$ -рецепторов [Miteva et al., 2017] напоминает описанное нами угнетение секреции квантов АХ по всему ходу короткого залпа при активации холином  $\alpha 7$ -нХР. Однако временные рамки, в которых становится возможной реализация регуляторных эффектов глиотрансмиттеров, высвобождаемых при работе моторных синапсов, существенно отличаются от обнаруженных нами при ритмической стимуляции.

Действительно, было установлено, что возможный выброс глиотрансмиттеров (АТФ/аденозина) в ответ на функционирование синапсов и последующая стимуляция этими глиотрансмиттерами пресинаптических

пуринорецепторов требует значительно более продолжительных режимов синаптической активности. Необходима ритмическая непрерывная стимуляция моторных синапсов с частотой 20 Гц не менее чем 3 минуты, и длительные последующие периоды для проявлений эффектов глиотрансмиттеров [Ko, Robitaille, 2015; Todd et al., 2010]. При этом такой паттерн продолжительной (20 Гц, 3 минуты) стимуляции моторных синапсов приводил не к снижению, а к увеличению на 15-20% амплитуд ПКП [Ko, Robitaille, 2015]. Подчеркнем, что в нашей работе начало  $\alpha 7$ -нХР-зависимого торможения секреции АХ в длинном ритмическом залпе ПКП (50 Гц, 40 с) реализуется уже на 2-й – 10-й секундах от начала тетанической стимуляции моторных синапсов.

Поэтому, несмотря на отсутствие прямых данных, верифицирующих расположение  $\alpha 7$ -нХР на моторных нервных терминалях, вероятность присутствия  $\alpha 7$ -нХР на пресинаптической мембране моторных синапсов, на наш взгляд, весьма велика, в особенности, учитывая доказанную возможность экспрессии  $\alpha 7$ -нХР в мотонейронах [Dehkordi et al., 2004] и присутствие функциональных  $\alpha 7$ -нХР именно в моторных синапсах [Chan et al., 2019].

Кроме того, аргументом против рассматривания полученных нами результатов как происходящих за счет функционирования  $\alpha 7$ -нХР, расположенных эксклюзивно на мембране перисинаптических Шванновских клеток и обеспечивающих секрецию из них аденозина [Noronha-Matos et al., 2020; Petrov et al., 2021], служит обнаруженный недавно факт, что в условиях пролонгированной высокочастотной синаптической активности наблюдается тенденция к усилению активации в моторных синапсах не  $A_1$ -рецепторов аденозина, а  $A_{2A}$ -рецепторов [González Sanabria et al., 2022]. Этот подтип аденозиновых рецепторов не подавляет квантовую секрецию АХ, а наоборот, ее стимулирует как мы показали, за счет, эффективного демаскирования L-типа  $Ca^{2+}$ -каналов (рис. 18). Вовлечение L-типа  $Ca^{2+}$ -каналов в регуляцию секреции АХ в условиях продолжительной непрерывной работы моторных синапсов (когда этот  $Ca^{2+}$ -вход обеспечивает эндоцитоз, направленный на

поддержание RRP) отмечено и другими авторами [Perissinotti et al., 2008]. Вместе с тем быстрая реализация тормозного эффекта экзогенного холина и финальная мишень  $\alpha 7$ -нХР-индуцируемого сигнального каскада, тормозящего секрецию АХ (СК-каналы), предполагает именно пресинаптическую, наряду с «глиальной», локализацию  $\alpha 7$ -нХР в моторных синапсах мышцы.

На наш взгляд, хорошо известное усиливающееся и доминирующее торможение секреции АХ, наблюдающееся при непрерывной активности одиночного нервно-мышечного синапса, и быстрая реализация этой синаптической депрессии могут быть следствием прямого действия на пресинаптические  $\alpha 7$ нХР эндогенных лигандов – АХ/холина, быстро накапливающихся в синаптической щели, уже на первых секундах непрерывной высокочастотной активности моторного синапса диафрагмы мышцы. В пользу того, что развитие тормозного эффекта обеспечивается сигнальным каскадом, запускаемым именно пресинаптическими  $\alpha 7$ -нХР, свидетельствует также тот факт, что конечной мишенью тормозного действия холина оказались СК-каналы, идентифицированные в моторных терминалях [Roncarati et al., 2001], но пока не известные (не описанные) в Шванновских клетках. Можно предполагать, что вход ионов  $\text{Ca}^{2+}$  при активации холином/АХ  $\alpha 7$ -нХР и дальнейшая продолжительная активность СК-каналов будет сопровождаться гиперполяризацией пресинаптической мембраны, которая, в свою очередь, приведет к ослаблению потенциал-зависимых  $\text{Ca}^{2+}$ -токов и формируемых ими  $\text{Ca}^{2+}$ -сигналов. В конечном итоге это отразится на уровне  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой секреции квантов АХ.

Подобный  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимый и опосредуемый  $\text{Ca}^{2+}$ -проводящими нейрональными нХР механизм гиперполяризации мембраны и тормозного контроля секреции нейротрансмиттера описан для некоторых специальных синапсов ЦНС – в эфферентных синапсах на волосковых клетках вестибулярной части улитки (где представлены гомомерные  $\alpha 9$ -нХР, сходные с  $\alpha 7$ -нХР по своей высокой  $\text{Ca}^{2+}$ -проводимости и чувствительности к холину/АХ) [Poppi et al., 2020; Yuhas, Fuchs, 1999]. В наших исследованиях

подобный механизм (и сигнальный путь) впервые удалось открыть в моторных синапсах. Более того, мы впервые установили, что  $\alpha 7$ -нХР-опосредованный вход ионов  $\text{Ca}^{2+}$  (и дальнейший сигнальный путь), также, видимо, приводящий к гиперполяризации, стойко подавляет уровень секреции АХ посредством снижения размера RRP в ритмически активных терминалях. Это показали расчеты при анализе экспериментальных данных, полученных с использованием экзогенного холина: стойкое единообразное уменьшение квантового состава ПКП по всему ходу ритмического залпа ПКП - результат сниженного под действием холина RRP при неизменности вероятности выброса квантов АХ ( $p$ ) из этого RRP.

В настоящее время механизмы, регулирующие размер RRP и динамику его изменений при ритмической активности синапсов – предмет активных дискуссий и анализа [Kaeser, Regehr, 2017; Kim et al., 2020; Lin et al., 2022]. В частности, обсуждается последовательная модель, допускающая возможность  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимого обратимого перехода части везикул в составе RRP от докированного в предокированное состояние и обратно [Lin et al., 2022]. При этом известно, что активность процесса докинга зависит от функционирования изоформ синапсина, известного не только как регулируемого стабилизатора синаптических везикул в их резервном пуле, но и как фактора, тормозящего докинг [Cesca et al., 2010; Mirza, Zahid, 2018; Sun et al., 2006]. В свою очередь, хорошо известно, что функциональная активность самих синапсинов контролируется CaMKII [Mirza, Zahid, 2018; Zhang, Augustine, 2021]. Обнаруженная нами функциональная связь между снижением под действием холина размера RRP в активных моторных синапсах, возможной гиперполяризацией пресинаптической мембраны (способной влиять и на потенциал-зависимые  $\text{Ca}^{2+}$ -входы и на опосредуемую ими  $\text{Ca}^{2+}$ -сигнализацию) и наличествующей при этом активностью CaMKII описана впервые. Конкретизация вопроса, как именно гиперполяризация пресинаптической мембраны, возникающая вслед за активацией  $\alpha 7$ -нХР эндогенным холином/АХ (и запуском сигнального пути с участием  $\text{PnR}$ ,

депонированного  $\text{Ca}^{2+}$ , CaMKII, SK-каналов) снижает размер RRP (стойко лимитирует число готовых к высвобождению квантов АХ в ритмическом залпе ПКП) – задача, требующая дальнейших исследований.

В заключение, оценивая физиологическую значимость открытой нами необычной роли  $\alpha 7$ -нХР в моторных синапсах, следует сказать, что, в отличие от большинства синапсов ЦНС, имеющих сравнительно низкий и часто – одноквантовый уровень выброса нейротрансмиттера, для одиночных концевых пластинок млекопитающих характерен избыточно высокий квантовый состав ПКП (при относительно низкой вероятности выброса) в ответ на одиночный нервный импульс [Cano et al., 2013; Ruiz et al., 2011]. Это, конечно, обеспечивает высокий фактор надежности синаптической передачи через единственный на мышечном волокне моторный синапс, когда величина выброса АХ может в 2-6 раз превышать необходимый для деполяризации постсинаптической мышечной мембраны, достаточной для достижения порога для генерации мышечного ПД. Вместе с тем, такой «супергарантированный» постсинаптический деполярирующий сигнал неизбежно приводит к избыточным тратам АХ и содержащих его готовых к выбросу синаптических везикул в ходе длительной работы нервно-мышечного синапса.

Мы предполагаем, что в моторных синапсах существует аутоингибирование выброса АХ по принципу отрицательной обратной связи, путем активации  $\alpha 7$ -нХР эндогенным холином/АХ. При этом, как мы впервые показали, включается механизм ограничения расхода RRP. Подобное аутоингибирование может служить адаптивным механизмом, оптимизирующим баланс между необходимым уровнем выброса АХ и его излишними расходами. Это может продлевать адекватную работоспособность одиночного нервно-мышечного контакта в условиях его продолжительной работы.



#### 4. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Многоликость  $\text{Ca}^{2+}$ -сигнализации как панрегулятора внутриклеточных процессов является общепризнанной парадигмой современной физиологии. При этом в химических синапсах - на пресинаптическом уровне – палитра возможных  $\text{Ca}^{2+}$ -сигналов, избирательно сопряженных с регуляцией секреции АХ, остается не раскрытой. В течение десятилетий роль ионов  $\text{Ca}^{2+}$  традиционно связывали с его поступлением по основному потенциал-зависимому  $\text{Ca}^{2+}$ -входу в области активных зон для запуска финальных шагов везикулярного экзоцитоза и его модуляций. Однако накопленные за последние 20-30 лет данные о наличии целого ряда других путей поступления ионов  $\text{Ca}^{2+}$  в аксоплазму и возможность формирования локальных  $\text{Ca}^{2+}$ -сигналов в терминалях аксонов неизбежно поставили вопрос о том, как сопряжены эти дополнительные  $\text{Ca}^{2+}$ -входы и создаваемые ими  $\text{Ca}^{2+}$ -сигналы с хорошо известным феноменом  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой регуляции кратковременной синаптической пластичности синапсов.

В нашей работе удалось собрать воедино данные о вкладе четырех разных источников поступления ионов  $\text{Ca}^{2+}$  в аксоплазму моторных нервных терминалей, об их специфической роли в управлении секрецией АХ по сравнению с триггерным  $\text{Ca}^{2+}$ -входом (по  $\text{Ca}^{2+}$ -каналам P/Q-типа), запускающим конечный акт квантовой секреции АХ. Были выбраны 4 мало изученных пресинаптических  $\text{Ca}^{2+}$ -входа - медленные потенциал-зависимые  $\text{Ca}^{2+}$ -каналы L-типа ( $\text{Ca}_v1.2-1.3$ ),  $\text{Ca}^{2+}$ -активируемые  $\text{Ca}^{2+}$ -каналы ЭР РнР,  $\text{Ca}^{2+}$ -проводящие P2X7-рецепторы и  $\text{Ca}^{2+}$ -проводящие  $\alpha 7$ -нХР, последствия активации которых для залповой активности моторных терминалей оставались не ясными.

Мы установили, что ни один из экспериментально исследованных  $\text{Ca}^{2+}$ -входов ( $\text{Ca}^{2+}$ -каналы L-типа, РнР, P2X7-рецепторы или  $\alpha 7$ -нХР) не функционирует в качестве дублера  $\text{Ca}^{2+}$ -тока через  $\text{Ca}^{2+}$ -каналы P/Q-типа и не способен самостоятельно запускать  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимую секрецию АХ, но может существенно влиять на нее, причем как в сторону усиления, так и торможения

секреции АХ. Удалось охарактеризовать вклад каждого  $\text{Ca}^{2+}$ -входа с точки зрения:

- а) условий, при которых он срабатывает;
- б) мишеней и сигнальных путей, запускаемых входящими ионами  $\text{Ca}^{2+}$ ;
- в) изменения параметров квантовой секреции АХ, включая квантовый состав ПКП, размер квантов АХ, вероятность выброса ( $p$ ), размера RRP.

Изменения и роль этих параметров с участием четырех разных  $\text{Ca}^{2+}$ -входов были впервые описаны не только для одиночной, но и залповой ритмической активности, являющейся характерным паттерном работы моторных синапсов и классическим примером кратковременной синаптической пластичности в химических синапсах.

#### 4.1. Роль $\text{Ca}^{2+}$ -каналов L-типа

Активность медленных потенциал-зависимых  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов L-типа ( $\text{Ca}_v1.2-1.3$ ) хорошо известна в синапсах ЦНС, где они участвуют в процессах  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой постсинаптической пластичности. На пресинаптическом уровне их активность в ЦНС, как правило, отмечается редко, в связи с преобладанием роли более быстрых  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов P/Q- и/или N-типа в регуляции секреции нейротрансмиттеров [Dolphin, 2018, 2020; Dolphin, Lee, 2020]. В периферических нервно-мышечных синапсах, напротив, было обнаружено не только присутствие (экспрессия), но и специфическая активность  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов L-типа именно на пресинаптическом уровне. Был установлен необычный статус этих каналов в моторных нервных терминалях: находясь там в подавленном состоянии (во всяком случае - не участвуя обычно в регуляции секреции АХ в функционально зрелых моторных синапсах), эти  $\text{Ca}^{2+}$ -каналы, тем не менее, могут «демаскироваться» (переходить в активное состояние) при определенных условиях и тогда приводить к значительному усилению вызванной синхронной многоквантовой секреции АХ. Системы удержания L-типа  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов в неактивном состоянии, приемы их растормаживания, а также механизмы, обеспечивающие высокий уровень

секреции АХ в случае включения в этих  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов в регуляцию выброса АХ при ритмической активности синапсов оставались мало- или совсем не изученными. Проведенные нами исследования впервые раскрыли неизвестные пути растормаживания  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов L-типа, молекулярные механизмы их потенцирующего действия на секрецию АХ и возможное функциональное предназначение этого пресинаптического  $\text{Ca}^{2+}$ -входа.

Оказалось, что в моторных синапсах мышцы активность «молчащих» пресинаптических потенциал-зависимых  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов L-типа находится под многоуровневым контролем и разнонаправленными влияниями со стороны пресинаптических метаботропных рецепторов, ферментов и  $\text{K}^+$ -токов. Мы показали, что активность  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов L-типа обычно заторможена благодаря сочетанной активности сигнальных петель отрицательной обратной связи с участием пуриnergических  $\text{A}_1$ - и  $\text{P}_2\text{Y}_{13}$ -рецепторов, активности  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой фосфатазы CaN и BK-каналов. Активирующие же влияния, способствующие растормаживанию  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов L-типа, обусловлены активностью других пресинаптических пуринорецепторов -  $\text{A}_{2\text{A}}$ - и  $\text{P}_2\text{X}_7$ -типов и сопряженных с ними протеинкиназ - PKA/PKC/CaMKII. Эти активирующие воздействия хотя и присутствуют (одновременно с тормозными), но обычно не достаточны для растормаживания  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов L-типа в работающем моторном синапсе. При этом, достаточно выключения лишь одного из тормозных либо усиления облегчающих влияний, чтобы сдвинуть баланс регуляторных воздействий в сторону активации L-типа  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов.

Мы установили, что значительно возрастающий (на 25-30%) квантовый состав одиночных ПКП при растормаживании активности  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов L-типа внешне напоминает таковой при избирательном усилении активности другого пресинаптического  $\text{Ca}^{2+}$ -входа - по P/Q-типу  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов. Однако мы впервые показали, что включение  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов L-типа в регуляцию секреции АХ облегчает вызванный выброс квантов АХ по другому механизму. Если в случае усиления  $\text{Ca}^{2+}$ -входа по  $\text{Ca}^{2+}$ -каналам P/Q-типа возрастает вероятность выброса квантов ( $p$ ), то вход ионов  $\text{Ca}^{2+}$  по L-типу  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов адресован

другим мишеням и регулирует иной параметрам квантовой секреции АХ: увеличивается размер RRP, что впервые удалось установить при анализе ритмической активности синапсов.

Анализируя картину ритмической залповой активности моторных терминалей, мы установили, что два потенциал-зависимых  $\text{Ca}^{2+}$ -входа - по P/Q- и по L-типам  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов существенно по-разному влияют на рисунок ритмического залпа (50 Гц, 1 с). Впервые установлено, что в отличие от последствий усиления входа ионов  $\text{Ca}^{2+}$  по  $\text{Ca}^{2+}$ -каналам P/Q-типа - когда вслед за возрастанием квантового состава первого ПКП в залпе, следует резкая депрессия синаптической передачи (уменьшение ПКП), отражающая дальнейшее ослабление вызванной секреции АХ, в случае вовлечения  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов L-типа характер изменения ПКП в залпе - другой. Увеличивается не только одиночный многоквантовый выброс АХ и квантовый состав первого ПКП в залпе, но и поддерживается на равномерно повышенном уровне квантовый состав ПКП в течение всего хода короткого высокочастотного залпа. Расчеты квантовых параметров выброса АХ в залпе показали, что это устойчивое повышение секреции АХ связано со способностью  $\text{Ca}^{2+}$ -сигналов, создаваемых входом ионов  $\text{Ca}^{2+}$  именно по расторможенным  $\text{Ca}^{2+}$ -каналам L-типа вовлекать в активность РиР, выброс депонированного  $\text{Ca}^{2+}$ , а также - активацию  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимых ферментов - РКС и СаМКП, что приводит к стойкому увеличению размера RRP. Моторные синапсы мышцы, имея относительно большой размер, характеризуются специфическим пространственным соотношением между расположением в активных зонах  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов P/Q-типа и докированными синаптическими везикулами, что выражается в не очень высокой вероятности экзоцитоза (p) в сочетании с наличием значительного числа «молчащих» активных зон, не участвующих в секреции АХ из-за недостатка поступающих туда ионов  $\text{Ca}^{2+}$  по  $\text{Ca}^{2+}$ -каналам P/Q-типа. Мы предполагаем, что благодаря подключению дополнительных  $\text{Ca}^{2+}$ -входов (и генерации новых  $\text{Ca}^{2+}$ -сигналов) со стороны  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов L-типа и выброса ионов  $\text{Ca}^{2+}$  из  $\text{Ca}^{2+}$ -депо), в определенных активных зонах

увеличивается доступность ионов  $\text{Ca}^{2+}$  к докированным синаптическим везикулам в ранее «молчавших» (из-за недостаточного триггерного  $\text{Ca}^{2+}$ -сигнала) активных зонах. Тем самым, увеличивается число срабатывающих активных зон (и экзоцитоза синаптических везикул в них), то есть возрастает размер RRP при постоянстве вероятности выброса ( $p$ ).

Важной особенностью функционирования  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов L-типа оказался тот факт, что, независимо от способа их растормаживания, именно подключение  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов L-типа и вход по ним ионов  $\text{Ca}^{2+}$  приводит к активации РнР, выбросу депонированного  $\text{Ca}^{2+}$  и активации  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимых протеинкиназ моторных терминалей РКС и СаМКII, участвующих в поддержании устойчиво повышенной синхронной секреции квантов АХ в ритмическом залпе ПКП. Возможность избирательной активации СаМКII - именно за счет  $\text{Ca}^{2+}$ -сигнала, создаваемого функциональным тандемом L-тип  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов-РнР, и специфическое участие этого фермента в регуляции (увеличении) размера RRP в ритмически работающих моторных синапсах выявлены впервые.

Таким образом, в нашей работе удалось обнаружить новый специфический механизм потенцирования выброса нейротрансмиттера, запускаемый активацией  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов L-типа (в тандеме с выбросом депонированного  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимыми ферментами), не описанный ранее в моторных синапсах и не наблюдающийся обычно во время характерной для этих синапсов короткой залповой активности.

На наш взгляд, возможность активации  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов L-типа и их способность специфически регулировать (поддерживать) секрецию нейротрансмиттера являются особенностью нервных терминалей одиночных нервно-мышечных контактов. Мы полагаем, что растормаживание  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов L-типа призвано включать новый аварийный механизм поддержания секреции медиатора, обычно не используемый синапсом. Этот механизм, видимо является частью адаптивной системы обеспечения надежности нервно-мышечной передачи через единственный синаптический контакт на

мышечном волокне. При этом в моторном синапсе предусмотрена возможность вовлечения в регуляцию квантовой секреции АХ  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов L-типа с помощью ряда дублирующих механизмов, что, видимо, необходимо для поддержания секреции АХ при разных вариантах функционального ослабления основного триггерного  $\text{Ca}^{2+}$ -входа и приданной ему машинерии экзоцитоза синаптических везикул. Действительно, опасные для нервно-мышечной передачи через одиночный моторный синапс деструктивные изменения могут иметь место при избыточной перегрузке синапса во время усиленной мышечной работы, воздействии токсических веществ, травмах и многих других патологиях. Подключение «страховочного»  $\text{Ca}^{2+}$ -входа по пресинаптическим  $\text{Ca}^{2+}$ -каналам L-типа в моторных синапсах действительно отмечено в случаях длительной и высокочастотной активности моторных синапсов [Perissinotti et al., 2008], либо – при патологиях нервно-мышечной передачи (таких, как миастенические синдромы), сопровождающихся мощной депрессией синаптической передачи и ослаблением триггерного  $\text{Ca}^{2+}$ -входа по P/Q-типу  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов [Flink, Atchison, 2002; Ginebaugh et al., 2022; Tarr et al., 2015].

#### **4.2. Роль РиР и депонированного $\text{Ca}^{2+}$**

Присутствие ЭР в аксонах и нервных терминалях и возможность выброса депонированного  $\text{Ca}^{2+}$  через РиР были убедительно показаны лишь в конце XX века как в синапсах ЦНС, так и на периферии [Балезина, 2002; Bouchard et al., 2003]. Такому специфическому внутриклеточному  $\text{Ca}^{2+}$ -входу первоначально приписывалась роль усилителя  $\text{Ca}^{2+}$ -сигнала, поступающего в нервные терминали из наружной среды по потенциал-зависимым  $\text{Ca}^{2+}$ -каналам и необходимого для потенцирования  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимого выброса нейротрансмиттеров [Emptage et al., 2001; Verkhratsky, 2005], либо фактора, десинхронизирующего многоквантовую вызванную секрецию [Khuzakhmetova et al., 2014].

Наши исследования выявили неожиданное разнообразие процессов, в которых участвует РиР-опосредованный выброс депонированного  $\text{Ca}^{2+}$  в моторных терминалях. Мы впервые показали, что существует, как минимум, три разных  $\text{Ca}^{2+}$ -входа – по  $\text{Ca}^{2+}$ -каналам P/Q-типа,  $\text{Ca}^{2+}$ -каналам L-типа и  $\alpha 7$ -нХР, которые могут с разной степенью эффективности приводить к активации РиР и выбросу депонированного  $\text{Ca}^{2+}$ , причем с различными последствиями для квантовой секреции АХ, реализующимися по разным механизмам.

Выявлены потенцирующие влияния на секрецию АХ со стороны депонированного  $\text{Ca}^{2+}$  в случаях входа ионов  $\text{Ca}^{2+}$  по  $\text{Ca}^{2+}$ -каналам P/Q- и L-типов, но в то же время - тормозные влияния депонированного  $\text{Ca}^{2+}$  при активации РиР ионами  $\text{Ca}^{2+}$ , входящим через каналы  $\alpha 7$ -нХР. При этом из двух потенциал-зависимых  $\text{Ca}^{2+}$ -входов ( $\text{Ca}^{2+}$ -каналы P/Q- и L-типов), именно медленные  $\text{Ca}^{2+}$ -каналы L-типа оказались более тесно функционально сопряженными с РиР и выбросом депонированного  $\text{Ca}^{2+}$ , усиливающим  $\text{Ca}^{2+}$ -сигнал при входе ионов  $\text{Ca}^{2+}$  по  $\text{Ca}^{2+}$ -каналам L-типа.

Мы также впервые установили, что в моторных терминалях для  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимого увеличения размера RRP и обеспечения стойкого потенцирования секреции АХ на протяжении всего хода залповой активности недостаточно только входа ионов  $\text{Ca}^{2+}$  снаружи по  $\text{Ca}^{2+}$ -каналам L-типа. Здесь, по-видимому, необходимо усиление  $\text{Ca}^{2+}$ -сигнала и обязательно соучастие выброса депонированного  $\text{Ca}^{2+}$ , не только и не столько усиливающего, сколько обеспечивающего определенную пространственно-временную структуру комбинированного  $\text{Ca}^{2+}$ -сигнала, необходимого для реализации влияний данного наружного  $\text{Ca}^{2+}$ -входа ( $\text{Ca}^{2+}$ -каналы L-типа) на определённые мишени в моторных терминалях.

Впервые показано, что активация  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой протеинкиназы CaMKII и ее участие в регуляции секреции АХ также может происходить за счет выброса именно депонированного  $\text{Ca}^{2+}$  (который может происходить за счет сопряжения РиР с активностью и  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов L-типа, и  $\alpha 7$ -нХР).

В нашей работе впервые выявлена и еще одна ранее не отмечавшаяся специфическая активность депонированного  $\text{Ca}^{2+}$  - его способность не только регулировать квантовую секрецию АХ, но и обеспечивать экзоцитоз LDCVs, содержащих пептид КГРП, позитивно регулирующий размер квантов АХ.

Неожиданным оказалось и обнаруженное нами функциональное (и, возможно, также тесное пространственное сближение) РиР в составе ЭР с пресинаптическими  $\alpha 7$ -нХР в моторных терминалях. В результате впервые нами выявлено участие РиР и выброса депонированного  $\text{Ca}^{2+}$  не в усилении, а в торможении квантовой секреции АХ. Это происходит в случае срабатывания  $\text{Ca}^{2+}$ -входа по  $\alpha 7$ -нХР, последующей активации РиР и выброса депонированного  $\text{Ca}^{2+}$ . Затем это приводит к активации низкопроводящих  $\text{Ca}^{2+}$ -активируемых  $\text{K}^+$ -каналов SK-типа и гиперполяризации пресинаптической мембраны. При этом очевидно, что для такой избирательной активации депонированным  $\text{Ca}^{2+}$  именно SK-каналов, но не других мишеней, также способных испытывать влияния со стороны высвобождаемого депонированного  $\text{Ca}^{2+}$  в аксоплазме или на пресинаптической мембране, в моторной терминали должен формироваться локальный  $\text{Ca}^{2+}$ -сигнал, создаваемый выходом депонированного  $\text{Ca}^{2+}$  через каналы РиР около  $\alpha 7$ -нХР и одновременно вблизи рядом расположенных SK-каналов.

Суммируя полученные нами данные о многообразии активности депонированного  $\text{Ca}^{2+}$  в моторных терминалях, можно заключить, что  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимая активация РиР в них – высокодифференцированный локальный процесс, приуроченный к определенным  $\text{Ca}^{2+}$ -входам в терминаль. Соответственно, выброс депонированного  $\text{Ca}^{2+}$  через РиР – участник пространственно и функционально дифференцированной системы создания локальных  $\text{Ca}^{2+}$ -сигналов для локальной регуляции определенных мишеней из числа специфических  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимых ферментов и ионных каналов, участвующих в регуляции секреции АХ.



### 4.3. Роль P2X7-рецепторов

Механизмы пуриnergической регуляции секреции АХ в нервно-мышечных синапсах с участием целого ряда аденозиновых (P1-типа) и пуриновых (P2-типа) рецепторов, исследования которых насчитывают несколько десятилетий, остается актуальной и до конца не решенной проблемой [Burnstock, 2007]. Это, в особенности, касается сравнительно недавно открытых и малоизученных ионотропных P2X7-рецепторов, присутствие которых описано повсеместно у разных типов клеток, включая и моторные нервные терминалы.

С момента обнаружения P2X7-рецепторов они сразу привлекли к себе особый интерес в связи с их уникальными свойствами: ионотропной активностью, проведением значительного  $Ca^{2+}$ -тока внутрь и  $K^{+}$ -наружу (причем при их активации только высокими концентрациями (более 100 мкМ) АТФ) и отсутствием десенситизации [Martínez-Cuesta et al., 2020; Miras-Portugal et al., 2021, 2017]. Оказалось также, что выход ионов  $K^{+}$  при активации именно P2X7-рецепторов в ряде клеток является способом активации паннексиновых полуканалов, известных своей способностью высвобождать АТФ в наружную среду и дополнительно активировать рецепторы P2X7 [Wilkaniec et al., 2017]. Ввиду отсутствия обычно столь высоких концентраций внеклеточной АТФ в ЦНС, нейрональные и синаптические P2X7-рецепторы стали рассматриваться как обычно «молчащие», но способные участвовать в развитии окислительного стресса и гибели клеток при патологических состояниях нейронов и синапсов в ЦНС, сопровождающихся появлением АТФ во внеклеточной среде в высокой концентрации при гипоксии и других повреждениях [Vasileiou et al., 2010].

В нашей работе впервые показано, что пресинаптические P2X7-рецепторы действительно, на первый взгляд, находятся в моторных синапсах в «молчащем» состоянии, поскольку их блокирование или стимуляция никак не сказывается на квантовой секреции АХ. Однако мы впервые открыли, что на самом деле P2X7-рецепторы могут проводить ионы  $Ca^{2+}$  в моторные

терминали, судя по их способности обеспечивать насыщение внутриклеточного  $\text{Ca}^{2+}$ -буфера ВАРТА и, тем самым, снижать его способность «перехватывать» ионы  $\text{Ca}^{2+}$ , входящие по  $\text{Ca}^{2+}$ -каналам P/Q-типа и редуцировать  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимый выброс АХ в ритмических залпах ПКП. Кроме того, мы впервые показали, что активность P2X7-рецепторов необходима и для контроля определенных  $\text{Ca}^{2+}$ -чувствительных мишеней и ферментов терминалей (предположительно, СаМКП и медленных  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов L-типа). Впервые показано, что при блокировании P2X7-рецепторов не удается «демаскировать»  $\text{Ca}^{2+}$ -каналы L-типа, несмотря на отключение тормозного контура, обычно работающего в моторных синапсах и подавляющего эти  $\text{Ca}^{2+}$ -каналы (с участием тормозных пресинаптических метаботропных P2Y13-рецепторов). Полученные нами результаты (в совокупности с литературными данными) позволяют предполагать, что в моторных синапсах существует функциональное взаимодействие между активностью пуриновых P2X7- и P2Y13-рецепторов, сочетанно (и разнонаправленно) регулирующих активность пресинаптических  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов L-типа. Доминирование активности того или другого типа пуринорецептора зависит, видимо, от динамики концентрационного профиля пуринов вблизи рецепторов и избирательной реактивности этих рецепторов к соответствующим эндогенным пуринам (АТФ/АДФ/АМФ/аденозин) в моторных синапсах.

В любом случае, в нашей работе впервые доказано, что пресинаптические  $\text{Ca}^{2+}$ -проводящие P2X7-рецепторы функционируют и принимают специфическое значимое участие в процессах кратковременной синаптической пластичности моторных синапсов, регулируя  $\text{Ca}^{2+}$ -гомеостаз моторных терминалей, активность пресинаптических ферментов, ионных каналов, и, в конечном итоге - квантовую секрецию АХ.

#### 4.4. Роль $\alpha 7$ -нХР

Крайне мало изученным  $\text{Ca}^{2+}$ -входом моторных терминалей являются и хемоактивируемые ионотропные  $\alpha 7$ -нХР, обладающие способностью

активироваться не только с помощью АХ/никотина, но и эндогенного холина (продукта гидролиза АХ в щели), и проводить ионы  $\text{Ca}^{2+}$  в терминаль [Albuquerque et al., 2009]. При каких условиях холин может служить не только захватываемым обратно в нервное окончание субстратом для синтеза АХ, но и сигналом обратной связи для активации пресинаптических  $\alpha 7$ -нХР и их участия в регуляции секреции АХ при ритмической активности синапсов, оставалось не ясным.

Наши исследования показали, что блокирование  $\alpha 7$ -нХР с помощью МЛА никак не меняет секрецию АХ не только при одиночной, но и короткой залповой активности синапсов. Это означало, что  $\alpha 7$ -нХР, даже если они имеются на моторных терминалях, не функционируют в таком режиме синаптической активности для регуляции выброса АХ. Однако экзогенный холин (100 мкМ) тормозил квантовую секрецию АХ, причем через активацию  $\alpha 7$ -нХР. Проведенный нами подробный анализ возможных механизмов этого неожиданного тормозного действия холина, снижающего квантовый состав по всему ходу короткого ритмического залпа ПКП, показал, что при этом происходит снижение размера RRP, но не вероятности выброса ( $p$ ), а механизм такого ограничения размера RRP включает вслед за  $\alpha 7$ -нХР-опосредованным входом ионов  $\text{Ca}^{2+}$  в моторную терминаль - активацию РнР, выброс депонированного  $\text{Ca}^{2+}$ , активацию СаМКП, приводящих, в конечном итоге, к активации SK-каналов и гиперполяризации пресинаптической мембраны, что и вызывает уменьшение размера RRP. Такой достаточно редкий механизм подавления вызванной секреции АХ за счет ограничения размера RRP с участием  $\alpha 7$ -нХР, обнаруженный нами в моторных терминалях мышцы, качественно отличается от известного в синапсах ЦНС, где  $\alpha 7$ -нХР под действием как эндогенного, так и экзогенного холина/АХ, как правило, стимулируют секрецию нейротрансмиттеров, причем нередко с участием РнР-опосредованного выброса депонированного  $\text{Ca}^{2+}$  [Sharma, Vijayaraghavan, 2003; Yakel, 2013, 2014].

Оставалась не ясным, может ли, и при каких условиях (в частности, при каких режимах ритмической активности моторных синапсов) наблюдаться аналогичное активирующее действие эндогенных холина/АХ на пресинаптические  $\alpha 7$ -нХР? В нашей работе впервые удалось установить, что этот необычный пресинаптический  $\text{Ca}^{2+}$ -вход по каналам  $\alpha 7$ -нХР действительно работает в моторных терминалях диафрагмы мыши, но требует для своей активации накопления АХ/холина в синаптической щели и срабатывает лишь при интенсивной и длительной ритмической активности моторных синапсов (50 Гц, 40 с). Это вызывает активацию РнР, выброс депонированного  $\text{Ca}^{2+}$  и последующую активацию пресинаптических SK-каналов, что, в конечном итоге, приводит к торможению квантовой секреции АХ в моторных синапсах (снижению амплитуды и квантового состава ПКП до 40-50% от исходных значений). Таким образом, фактически повторился тот же механизм тормозного воздействия  $\alpha 7$ -нХР на секрецию АХ, который был выявлен нами при действии экзогенного холина на параметры ПКП в коротком залпе.

Следует отметить, что мы впервые показали, что хорошо известное «утомление» нервно-мышечной передачи при длительной (40 с) высокочастотной активности (50 Гц) моторных синапсов, обычно приписываемое истощению пула везикул, или десенситизации мышечных нХР, или ослаблению функционирования триггерного  $\text{Ca}^{2+}$ -входа (по P/Q-типу  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов) на самом деле происходит, в значительной мере, благодаря аутоингибированию секреции АХ, осуществляемому с участием  $\alpha 7$ -нХР с помощью накапливающихся во время продолжительной синаптической активности эндогенных АХ/холина. Это означает, что общеизвестное снижение амплитуд и квантового ПКП по ходу продолжительной высокочастотной активности нервно-мышечных синапсов («утомление»), на самом деле - специально предусмотренное и осуществляемое синапсами адаптивное подавление выброса квантов АХ и квантового состава ПКП по механизму отрицательной обратной связи, включающееся с целью экономии

избыточной траты синаптических везикул из RRP и предотвращения его от излишнего расхода при продолжительной интенсивной работе моторных синапсов. О полном сохранении нормальной работы основного  $\text{Ca}^{2+}$ -входа и весьма большого уровня выброса квантов АХ (большого размера RRP) в этот период свидетельствует тот факт, что предварительное блокирование  $\alpha 7$ -нХР (или SK-каналов) перед индукцией развивающейся депрессии («утомления синаптической передачи») позволяет практически наполовину предотвратить такое «утомление» и сохранить и большой размер RRP, и высокий уровень квантовой секреции АХ во время продолжительной ритмической высокочастотной активности моторных синапсов.

В завершении, обсуждая специфику особого функционального предназначения  $\alpha 7$ -нХР как  $\text{Ca}^{2+}$ -входа, целесообразным, на наш взгляд, выглядит следующее объяснение. Впервые открытый нами механизм аутоингибирования передачи с участием  $\alpha 7$ -нХР может служить в одиночных нервно-мышечных синапсах (со значительным размером RRP и избыточно высоким выбросом из него квантов АХ) для оптимизации выброса АХ: срабатывая (включаясь) только при длительной работе такого единственного синапса, этот  $\text{Ca}^{2+}$ -вход обеспечивает поддержание необходимого баланса между излишним расходом и необходимой экономией квантов АХ при длительной интенсивной активности моторных синапсов, тем самым, продлевая их эффективную работу и делая, таким образом, нервно-мышечную передачу более надежной.

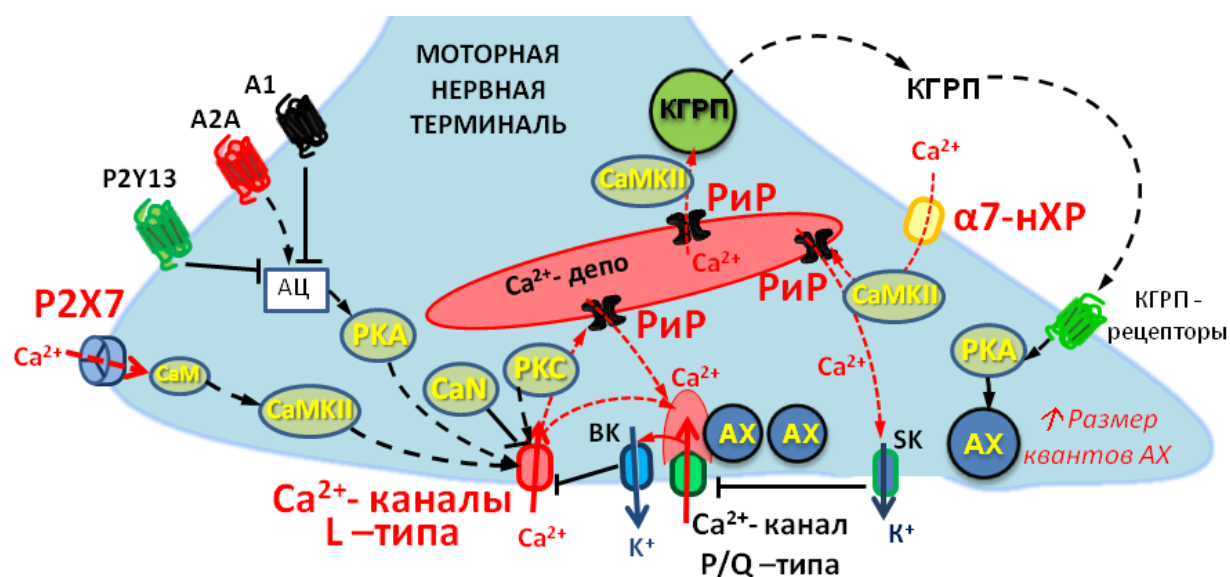
\*\*\*

Таким образом, впервые в моторных синапсах раскрыта роль 4-х разных пресинаптических  $\text{Ca}^{2+}$ -входов, их способность активировать локальные либо частично перекрывающихся  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимые сигнальные пути и их разнообразные мишени, вовлеченные в разнонаправленную регуляцию секреции АХ.

Мы впервые показали, что роль  $\text{Ca}^{2+}$ -входов и создаваемых ими  $\text{Ca}^{2+}$ -сигналов не сводится лишь к повышению пресинаптической концентрации

ионов  $\text{Ca}^{2+}$  и суммации с триггерными  $\text{Ca}^{2+}$ -сигналами, генерируемыми P/Q-типом  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов. Впервые установлено, что основным параметром квантовой секреции, подверженным регуляторным воздействием со стороны исследованных модуляторных  $\text{Ca}^{2+}$ -входов является не вероятность высвобождения квантов АХ (p) из исходного пула готовых к экзоцитозу синаптических везикул, а размер этого пула (RRP). Именно значение этого параметра испытывает  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимые изменения как в сторону возрастания (при активации медленных  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов L-типа (в тандеме с РиР) и  $\text{Ca}^{2+}$ -проводящих P2X7-рецепторов), так и в сторону его уменьшения (при активации холином  $\text{Ca}^{2+}$ -проводящих  $\alpha 7$ -нХР). Высокая функциональная значимость именно параметра RRP для явлений кратковременной пластичности становится все более очевидной в последнее время, а молекулярные механизмы его изменений – предмет активного обсуждения и изучения в современной синаптической физиологии. Полученные нами новые приоритетные данные о механизмах  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой регуляции RRP вносят свой вклад в проблему функционирования кратковременной синаптической пластичности, раскрывают новые аспекты в этом направлении исследований. В заключение, дана схема, суммирующая обнаруженные механизмы, регулирующие квантовую секрецию АХ при срабатывании разных  $\text{Ca}^{2+}$ -входов (рис. 45).

В итоге, совокупность полученных данных позволила охарактеризовать функциональную роль  $\text{Ca}^{2+}$ -сигналов, возникающих в моторных терминалях за счет активности разных путей поступления туда ионов  $\text{Ca}^{2+}$  (в дополнение ко входу  $\text{Ca}^{2+}$  по P/Q-типу  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов). Установлено, что каждый  $\text{Ca}^{2+}$ -вход – функционально значим и играет свою сугубо индивидуальную роль в регуляции параметров квантовой секреции АХ, включается лишь при определенных условиях, использует специфический механизм и является частью дифференцированной адаптивной  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой регулировки параметров секреции АХ в работающих синапсах.



**Рис. 45.** Дополнительные к основному (Ca<sup>2+</sup>-каналы P/Q-типа) пресинаптические Ca<sup>2+</sup>-входы (Ca<sup>2+</sup>-каналы L-типа, РиР, P2X7-рецепторы и α7-нХР) и сопряженные с ними мишени, которые обеспечивают разнообразные - как потенцирующие, так и тормозные - модулирующие воздействия на нервно-мышечную синаптическую передачу.

В комплексе, полученные данные расширяют современные представления о возможностях и механизмах пресинаптической Ca<sup>2+</sup>-зависимой регуляции параметров секреции нейротрансмиттеров в химических синапсах.

## ВЫВОДЫ

1. В нервных терминалях моторных синапсов выявлены причины подавленного состояния потенциал-зависимых  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов L-типа. Механизм торможения включают активность BK-каналов, CaN, подавление активности PKA со стороны пуринорецепторов A<sub>1</sub>- и P2Y<sub>13</sub>-типов.
2. Механизм растормаживания (перехода в активное состояние)  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов L-типа предполагает ослабление одного из тормозных влияний, либо – усиление специальных сигнальных каскадов с участием PKA, PKC или CaMKII.
3. Вход ионов  $\text{Ca}^{2+}$  по  $\text{Ca}^{2+}$ -каналам L-типа при любом способе их активации включает новый механизм - равномерного усиления секреции АХ по всему ходу залпа ПКП, за счет увеличения размера пула везикул, готовых к выбросу (RRP) с участием РиР  $\text{Ca}^{2+}$ -депо вблизи активных зон моторных терминалей.
4. РиР и выброс депонированного  $\text{Ca}^{2+}$  при их активации ионами  $\text{Ca}^{2+}$  от разных  $\text{Ca}^{2+}$ -входов, активируя разные  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимые ферменты (PKC, CaMKII) и/или ионные каналы (SK-типа), соучаствует в разнонаправленной регуляции квантовой секреции АХ.
5. Активация РиР рианодином, совместно с CaMKII, избирательно запускает выброс нейропептида КГРП, обеспечивающего аутокринное пресинаптическое увеличение размера квантов АХ.
6. В моторных синапсах имеет место активация и вход ионов  $\text{Ca}^{2+}$  по каналам P2X<sub>7</sub>-рецепторов, потенцирующий вызванную секрецию квантов АХ за счет CaMKII-опосредованного растормаживания  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов L-типа. Эта активность необходима для поддержания секреции АХ при ослаблении тормозных влияний со стороны P2Y<sub>13</sub>-рецепторов в моторных терминалях.



7. Активация  $\text{Ca}^{2+}$ -проводящих  $\alpha 7$ -нХР экзогенным холином приводит к подавлению квантовой секреции АХ в моторных синапсах посредством активации рианодин-чувствительных  $\text{Ca}^{2+}$ -депо, СаМКП и  $\text{Ca}^{2+}$ -активируемых калиевых каналов СК-типа, вызывающих снижение квантового состава ПКП в коротких залпах за счет уменьшения размера RRP.
8. Депрессия синаптической передачи в условиях длительной высокочастотной активности моторных синапсов обусловлена активацией пресинаптических  $\alpha 7$ -нХР эндогенным холином/АХ, с последующей активацией РиР и СК-каналов, ауторегуляторно ограничивая квантовую секрецию АХ для адаптивной экономии.
9. Сосуществующие в моторных синапсах мышцы 4 разных пресинаптических  $\text{Ca}^{2+}$ -входа -  $\text{Ca}^{2+}$ -каналы L-типа, РиР, P2X7-рецепторы и  $\alpha 7$ -нХР - функционально значимы и обладают способностью запускать избирательные механизмы для адаптивной  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой регуляции квантовой секреции АХ.

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АХ - ацетилхолин

КГРП – кальцитонин-ген родственный пептид

МП – мембранный потенциал

МПКП – спонтанный миниатюрный потенциал концевой пластинки

ПД – потенциал действия

ПКП – вызванный многоквантовый потенциал коцевой пластинки

РиР – рианодиновый рецептор

ЭР – эндоплазматический ретикулум

$\alpha 7$ -нХР – гомомерный никотиновый холинорецептор альфа7-типа

$\alpha$ -BgTx – альфа-бунгаротоксин

ВАРТА-АМ – тетраацетоксиметиловый эфир 1,2-бис (2-аминофенокси) этан-  
N,N,N',N'-тетрауксусной кислоты

СаМ – кальмодулин

СаМКП – кальций/кальмодулин-зависимая киназа II типа

СаN – кальцинейрин

СВД – кальмодулин-связывающий домен

СДФ – кальций-зависимая фасилитация

СДИ – кальций-зависимое ингибирование

СsА – циклоспорин А

ЕGТА-АМ – тетраацетоксиметиловый эфир этиленгликоль-бис( $\beta$ -  
аминоэтил)-N,N,N',N'-тетрауксусной кислоты

HVA – *high voltage activated*

LVA – *low voltage activated*

MLA – метилликаконитин

PIP<sub>2</sub> – фосфатидилинозитол-4,5-бифосфат

РКА – протеинкиназа А

РКС – протеинкиназа С

РМА – форбол 12-миристанат 13-ацетат

RIM – *Rab3-interacting molecules*

RRP – *readily-releasable pool*, пул синаптических везикул, непосредственно готовых к выбросу ацетилхолина

Synprint – *synaptic protein interaction*

## СПИСОК ЦИТИРОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Балезина О.П. Роль внутриклеточных кальциевых каналов нервных терминалей в регуляции секреции медиатора // Успехи физиологических наук. – 2002. – Т. 33. – № 3. – С. 38–56.
2. Балезина О.П., Сурова Н.В., Лаптева В.И. Изменения спектра спонтанно секретируемых квантов медиатора под действием кофеина и рианодина в нервно-мышечном синапсе мышцы // Доклады Академии наук. – 2001. – Т. 380. – № 6. – С. 834–836.
3. Балезина О.П., Букия А.Н., Лаптева В.И. Разнонаправленное действие внутриклеточного высвобождения кальция на квантовую секрецию медиатора // Российский физиологический журнал имени И.М. Сеченова. – 2005. – Т. 91. – № 1. – С. 61–70.
4. Балезина О.П., Букия А.Н., Лаптева В.И. Эффекты дантролена и рианодина на вызванную активность моторных синапсов мышцы // Российский физиологический журнал имени И.М. Сеченова. – 2001. – Т. 87. – № 11. – С. 1511–1517.
5. Балезина О.П., Ермишина К.И., Лаптева В.И. Индуцируемые рианодином разнонаправленные изменения частоты спонтанной секреции медиатора // Доклады Академии наук. – 2004. – Т. 397. – № 1. – С. 265–268.
6. Бухараева Э.А., Скоринкин А.И. Холинергическая модуляция секреции ацетилхолина в нервно-мышечном соединении // Российский физиологический журнал имени И.М. Сеченова. – 2021. – Т. 107. – № 4–5. – С. 458–473.
7. Хузахметова В.Ф., Нуруллин Л.Ф., Бухараева Э.А., Никольский Е.Е. Высокая асинхронность секреции медиатора в нервно-мышечных синапсах новорожденных крыс. Вклад дигидропиридинчувствительных кальциевых каналов // Доклады Академии наук. – 2016. – Т. 470. – № 1. – С. 610–613.

8. Abbracchio M.P., Burnstock G., Verkhratsky A., Zimmermann H. Purinergic Signaling in the nervous system: an overview // *Trends Neurosci.* – 2009. – V. 32. – № 1. – P. 19–29.
9. Abderemane-Ali F., Findeisen F., Rossen N.D., Minor D.L. A selectivity filter gate controls voltage-gated calcium channel calcium-dependent inactivation // *Neuron.* – 2019. – V. 101. – № 6. – P. 1134-1149.e3.
10. Abiria S.A., Colbran R.J. CaMKII associates with CaV1.2 L-type calcium channels via selected  $\beta$  subunits to enhance regulatory phosphorylation // *J. Neurochem.* – 2010. – V. 112. – № 1. – P. 150–161.
11. Adelman J.P., Maylie J., Sah P. Small-Conductance Ca<sup>2+</sup>-Activated K<sup>+</sup> Channels: Form and Function // *Annu. Rev. Physiol.* – 2012. – V. 74. – P. 245–269.
12. Adler M., Oliveira A.C., Albuquerque E.X., Mansour N.A., Eldefrawi A.T. Reaction of tetraethylammonium with the open and closed conformations of the acetylcholine receptor ionic channel complex. // *J. Gen. Physiol.* – 1979. – V. 74. – № 1. – P. 129–152.
13. Albuquerque E.X., Pereira E.F.R., Alkondon M., Rogers S.W. Mammalian nicotinic acetylcholine receptors: From structure to function // *Physiol. Rev.* – 2009. – V. 89. – № 1. – P. 73–120.
14. Alkadhi K.A. NMDA receptor-independent LTP in mammalian nervous system // *Prog. Neurobiol.* – 2021. – V. 200. – P. 101986.
15. Alkondon M., Pereira E.F.R., Cortes W. S., Maelicke A., Albuquerque E.X. Choline is a selective agonist of  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptors in the rat brain neurons // *Eur. J. Neurosci.* – 1997. – V. 9. – № 12. – P. 2734–2742.
16. Allsopp R.C., Evans R.J. Contribution of the Juxtatransmembrane Intracellular Regions to the Time Course and Permeation of ATP-gated P2X7 Receptor Ion Channels // *J. Biol. Chem.* – 2015. – V. 290. – № 23. – P. 14556–14566.
17. Alves L.A., De Melo Reis R.A., De Souza C.A.M., De Freitas M.S., Teixeira P.C.N., Neto Moreira Ferreira D., Xavier R.F. The P2X7 receptor: Shifting

- from a low- to a high-conductance channel — An enigmatic phenomenon? // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2014. – V. 1838. – № 10. – P. 2578–2587.
18. Ames J.B. L-Type Ca<sup>2+</sup> Channel Regulation by Calmodulin and CaBP1 // *Biomolecules.* – 2021. – V. 11. – № 12. – P. 1811.
  19. Amstrup J., Novak I. P2X7 receptor activates extracellular signal-regulated kinases ERK1 and ERK2 independently of Ca<sup>2+</sup> influx // *Biochem. J.* – 2003. – V. 374. – № 1. – P. 51–61.
  20. Andersen N., Corradi J., Sine S.M., Bouzat C. Stoichiometry for activation of neuronal  $\alpha 7$  nicotinic receptors // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2013. – V. 110. – № 51. – P. 20819–20824.
  21. Andrade A., Sandoval A., González-Ramírez R., Lipscombe D., Campbell K. P., Felix R. The  $\alpha 2\delta$  subunit augments functional expression and modifies the pharmacology of CaV1.3 L-type channels // *Cell Calcium.* – 2009. – V. 46. – № 4. – P. 282–292.
  22. Arenson M.S., Evans S.C. Activation of protein kinase c increases acetylcholine release from frog motor nerves by a direct action on L-type Ca<sup>2+</sup> channels and apparently not by depolarisation of the terminal // *Neuroscience.* – 2001. – V. 104. – № 4. – P. 1157–1164.
  23. Arias-Cavieres A., Barrientos G.C., Sánchez G., Elgueta C., Muñoz P., Hidalgo C. Ryanodine Receptor-Mediated Calcium Release Has a Key Role in Hippocampal LTD Induction // *Front. Cell. Neurosci.* – 2018. – V. 12. – P. 403.
  24. Armstrong J.N., Brust T.B., Lewis R.G., MacVicar B.A. Activation of Presynaptic P2X7-Like Receptors Depresses Mossy Fiber–CA3 Synaptic Transmission through p38 Mitogen-Activated Protein Kinase // *J. Neurosci.* – 2002. – V. 22. – № 14. – P. 5938–5945.
  25. Atchison W.D. Dihydropyridine-sensitive and -insensitive components of acetylcholine release from rat motor nerve terminals. // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* – 1989. – V. 251. – № 2 – P. 672–678.

26. Atchison W.D., O'Leary S.M. Bay K 8644 increases release of acetylcholine at the murine neuromuscular junction // *Brain Res.* – 1987. – V. 419. – № 1–2. – P. 315–319.
27. Atwood B.K., Lovinger D.M., Mathur B.N. Presynaptic long-term depression mediated by Gi/o-coupled receptors // *Trends Neurosci.* – 2014. – V. 37. – № 11. – P. 663–673.
28. Augustine G.J., Charlton M.P., Smith S.J. Calcium Action in Synaptic Transmitter Release // *Annu. Rev. Neurosci.* – 2003. – V. 10. – № 1. – P. 633–693.
29. Badawi Y., Nishimune H. Presynaptic active zones of mammalian neuromuscular junctions: Nanoarchitecture and selective impairments in aging // *Neurosci. Res.* – 2018. – V. 127. – P. 78–88.
30. Baker K.D., Edwards T.M., Rickard N.S. The role of intracellular calcium stores in synaptic plasticity and memory consolidation // *Neurosci. Biobehav. Rev.* – 2013. – V. 37. – № 7. – P. 1211–1239.
31. Balezina O.P., Bogacheva P.O. Suppression of mediator secretion in murine neogenic motor synapses with the participation of L-type Ca<sup>2+</sup> -channels and ryanodine receptors // *Biology Bulletin* – 2009. – V. 36. – № 5. – P. 498–504.
32. Balezina O.P., Bogacheva P.O., Orlova T.Y. Effect of L-type calcium channel blockers on activity of newly formed synapses in mice // *Bull. Exp. Biol. Med.* – 2007. – V. 143. – № 2. – P. 171–174.
33. Balezina O.P., Bukiya A.N. Facilitation and Depression of Neuromuscular Transmission under Conditions of Blockade of Ryanodine Receptors // *Neurophysiology.* – 2003. – V. 35. – № 2. – P. 75–81.
34. Balezina O.P., Bukiya A.N. Spontaneous Activity of Murine Neuromuscular Junctions in the Presence of Dantrolene // *Neurophysiology.* – 2001. – V. 33. – № 2. – P. 79–85.
35. Balezina O.P., Fedorin V.V., Gaidukov A.E. Effect of nicotine on neuromuscular transmission in mouse motor synapses // *Bull. Exp. Biol. Med.* – 2006. – V. 142. – № 1. – P. 17–21.

36. Balezina O.P., Lapteva V.I. Digoxin facilitates neuromuscular transmission in mouse diaphragm // *Bull. Exp. Biol. Med.* – 2007. – V. 144. – № 4. – P. 487–490.
37. Balshaw D.M., Xu L., Yamaguchi N., Pasek D.A., Meissner G. Calmodulin Binding and Inhibition of Cardiac Muscle Calcium Release Channel (Ryanodine Receptor) // *J. Biol. Chem.* – 2001. – V. 276. – № 23. – P. 20144–20153.
38. Bardo S., Robertson B., Stephens G.J. Presynaptic internal Ca<sup>2+</sup> stores contribute to inhibitory neurotransmitter release onto mouse cerebellar Purkinje cells // *Br. J. Pharmacol.* – 2002. – V. 137. – № 4. – P. 529.
39. Barrantes G.E., Murphy C.T., Westwick J., Wonnacott S. Nicotine increases intracellular calcium in rat hippocampal neurons via voltage-gated calcium channels // *Neurosci. Lett.* – 1995. – V. 196. – № 1–2. – P. 101–104.
40. Barros-Barbosa A.R., Oliveira Â., Lobo M.G., Cordeiro J. M., Correia-de-Sá P. Under stressful conditions activation of the ionotropic P2X7 receptor differentially regulates GABA and glutamate release from nerve terminals of the rat cerebral cortex // *Neurochem. Int.* – 2018. – V. 112. – P. 81–95.
41. Bartels P., Yu D., Huang H., Hu Z., Herzig S., Soong T.W. Alternative Splicing at N Terminus and Domain I Modulates CaV1.2 Inactivation and Surface Expression // *Biophys. J.* – 2018. – V. 114. – № 9. – P. 2095–2106.
42. Bartsch J.C., Fidzinski P., Huck J.H., Hörtnagl H., Kovács R., Liotta A., Priller J., Wozny C., Behr J. Enhanced Dopamine-Dependent Hippocampal Plasticity after Single MK-801 Application // *Neuropsychopharmacology* 2015 40:4. – 2014. – V. 40. – № 4. – P. 987–995.
43. Bastan R., Eskandari N., Sabzghabae A. M., Manian M. Serine/Threonine Phosphatases: Classification, Roles and Pharmacological Regulation // *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* – 2014. – V. 27. – № 4. – P. 473–484.
44. Baur D., Bornschein G., Althof D., Watanabe M., Kulik A., Eilers J., Schmidt H. Developmental tightening of cerebellar cortical synaptic influx-release coupling // *J. Neurosci.* – 2015. – V. 35. – № 5. – P. 1858–1871.



45. Bencherif M., Eisenhour C. M., Prince R.J., Lippiello P.M., Lukas R.J. The “calcium antagonist” TMB-8 [3,4,5-trimethoxybenzoic acid 8-(diethylamino)octyl ester] is a potent, non-competitive, functional antagonist at diverse nicotinic acetylcholine receptor subtypes // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* – 1995. – V. 275. – № 3 – P. 1418-1426.
46. Berger S.M., Bartsch D. The role of L-type voltage-gated calcium channels Cav1.2 and Cav1.3 in normal and pathological brain function // *Cell Tissue Res.* – 2014. – V. 357. – № 2. – P. 463–476.
47. Berkefeld H., Fakler B., Schulte U. Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels: From protein complexes to function // *Physiol. Rev.* – 2010. – V. 90. – № 4. – P. 1437–1459.
48. Berkefeld H., Sailer C.A., Bildl W., Rohde V., Thumfart J. O., Eble S., Klugbauer N., Reisinger E., Bischofberger J., Oliver D., Knaus H.G., Schultes U., Fakler B. BKCa-Cav channel complexes mediate rapid and localized Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> signaling // *Science.* – 2006. – V. 314. – № 5799. – P. 615–620.
49. Berridge M.J. Calcium microdomains: Organization and function // *Cell Calcium.* – 2006. – V. 40. – № 5–6. – P. 405–412.
50. Berridge M.J., Bootman M.D., Roderick H.L. Calcium signalling: Dynamics, homeostasis and remodelling // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* – 2003. – V. 4. – № 7. – P. 517–529.
51. Berrouit J., Isokawa M. Homeostatic and stimulus-induced coupling of the L-type Ca<sup>2+</sup> channel to the ryanodine receptor in the hippocampal neuron in slices // *Cell Calcium.* – 2009. – V. 46. – № 1. – P. 30–38.
52. Besalduch N., Tomàs M., Santafé M.M., Garcia N., Tomàs J., Lanuza M.A. Synaptic activity-related classical protein kinase C isoform localization in the adult rat neuromuscular synapse // *J. Comp. Neurol.* – 2010. – V. 518. – № 2. – P. 211–228.
53. Beske P.H., Hoffman K.M., Machamer J.B., Eisen M.R., McNutt P.M. Use-dependent potentiation of voltage-gated calcium channels rescues neurotransmission in nerve terminals intoxicated by botulinum neurotoxin serotype A // *Sci. Rep.* – 2017. – V. 7. – № 1 – P. 15862.

54. Bezprozvanny I., Scheller R.H., Tsien R.W. Functional impact of syntaxin on gating of N-type and Q-type calcium channels // *Nature*. – 1995. – V. 378. – № 6557. – P. 623–626.
55. Bezprozvanny I., Watras J., Ehrlich B.E. Bell-shaped calcium-response curves of Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>- and calcium-gated channels from endoplasmic reticulum of cerebellum // *Nature*. – 1991. – V. 351. – № 6329. – P. 751–754.
56. Bhattacharya A., Biber K. The microglial ATP-gated ion channel P2X<sub>7</sub> as a CNS drug target // *Glia*. – 2016. – V. 64. – № 10. – P. 1772–1787.
57. Blitz D.M., Foster K.A., Regehr W.G. Short-term synaptic plasticity: A comparison of two synapses // *Nat. Rev. Neurosci.* – 2004. – V. 5. – № 8. – P. 630–640.
58. Bock G., Gebhart M., Scharinger A., Jangsangthong W., Busquet P., Poggiani C., Sartori S., Mangoni M. E., Sinnegger-Brauns M.J., Herzig S., Striessnig J., Koschak A. Functional properties of a newly identified c-terminal splice variant of Ca<sub>v</sub>1.3 L-type Ca<sup>2+</sup> channels // *J. Biol. Chem.* – 2011. – V. 286. – № 49. – P. 42736–42748.
59. Bogacheva P., Balezina O. Delayed increase of acetylcholine quantal size induced by the activity-dependent release of endogenous CGRP but not ATP in neuromuscular junctions // *Synapse*. – 2020. – V. 74. – № 12. – P. e22175.
60. Bogacheva P.O., Balezina O.P. Postsynaptic Potentiation in Mouse Motor Synapses Induced by ATP Accumulation in Synaptic Cleft // *Bull. Exp. Biol. Med.* – 2015. – V. 159. – № 5. – P. 583–587.
61. Bogatcheva P.O., Balezina O.P. Multidirectional effects of calmodulin kinase II on transmitter release in mature and newly formed mouse motor synapses // *Bull. Exp. Biol. Med.* – 2013. – V. 154. – № 3. – P. 316–319.
62. Bornschein G., Schmidt H. Synaptotagmin Ca<sup>2+</sup> sensors and their spatial coupling to presynaptic Cav channels in central cortical synapses // *Front. Mol. Neurosci.* – 2019. – V. 11. – P. 494.

63. Borroni V., Barrantes F.J. Homomeric and Heteromeric  $\alpha 7$  Nicotinic Acetylcholine Receptors in Health and Some Central Nervous System Diseases // *Membranes*. – 2021. – V. 11. – № 9. – P. 664.
64. Bouchard R., Pattarini R., Geiger J.D. Presence and functional significance of presynaptic ryanodine receptors // *Prog. Neurobiol.* – 2003. – V. 69. – № 6. – P. 391–418.
65. Bourinet E., Soong T.W., Sutton K., Slaymaker S., Mathews E., Monteil A., Zamponi G.W., Nargeot J., Snutch T.P. Splicing of  $\alpha(1A)$  subunit gene generates phenotypic variants of P- and Q-type calcium channels // *Nat. Neurosci.* – 1999. – V. 2. – № 5. – P. 407–415.
66. Bouzat C., Bartos M., Corradi J., Sine S. M. The Interface between Extracellular and Transmembrane Domains of Homomeric Cys-Loop Receptors Governs Open-Channel Lifetime and Rate of Desensitization // *J. Neurosci.* – 2008. – V. 28. – № 31. – P. 7808–7819.
67. Bouzat C., Lasala M., Nielsen B.E., Corradi J., Esandi M.D.C. Molecular function of  $\alpha 7$  nicotinic receptors as drug targets // *J. Physiol.* – 2018. – V. 596. – № 10. – P. 1847–1861.
68. Bradford A.B., Machamer J.B., Russo T.M., McNutt P.M. 3,4-diaminopyridine reverses paralysis in botulinum neurotoxin-intoxicated diaphragms through two functionally distinct mechanisms // *Toxicology and Applied Pharmacology*. – 2018. – V. 341. – P. 77–86.
69. Brailoiu E., Miyamoto M.D., Dun N.J. Calmodulin increases transmitter release by mobilizing quanta at the frog motor nerve terminal // *Br. J. Pharmacol.* – 2002. – V. 137. – № 5. – P. 719–727.
70. Brigant J. L., Mallart A. Presynaptic currents in mouse motor endings // *J. Physiol.* – 1982. – V. 333. – № 1. – P. 619–636.
71. Brimblecombe K.R., Gracie C.J., Platt N.J., Cragg S.J. Gating of dopamine transmission by calcium and axonal N-, Q-, T- and L-type voltage-gated calcium channels differs between striatal domains // *J. Physiol.* – 2015. – V. 593. – № 4. – P. 929–946.

72. Brockhaus J., Schreitmüller M., Repetto D., Klatt O., Reissner C., Elmslie K., Heine M., Missler M.  $\alpha$ -Neurexins together with  $\alpha 2\delta$ -1 auxiliary subunits regulate  $\text{Ca}^{2+}$  influx through Cav2.1 channels // *J. Neurosci.* – 2018. – V. 38. – № 38. – P. 8277–8294.
73. Brooke R.E., Moores T.S., Morris N.P., Parson S.H., Deuchars J. Kv3 voltage-gated potassium channels regulate neurotransmitter release from mouse motor nerve terminals // *Eur. J. Neurosci.* – 2004. – V. 20. – № 12. – P. 3313–3321.
74. Budde T., Meuth S., Pape H.C. Calcium-dependent inactivation of neuronal calcium channels // *Nat. Rev. Neurosci.* – 2002. – V. 3. – № 11. – P. 873–883.
75. Bukharaeva E. A. Synchronous and asynchronous quantal release at synapses // *Biochem. Moscow Suppl. Ser. A.* – 2015. – V. 9. – P. 263–269.
76. Buraei Z., Yang J. Structure and function of the  $\beta$  subunit of voltage-gated  $\text{Ca}^{2+}$  channels // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2013. – V. 1828. – № 7. – P. 1530–1540.
77. Burnashev N., Rozov A. Presynaptic  $\text{Ca}^{2+}$  dynamics,  $\text{Ca}^{2+}$  buffers and synaptic efficacy // *Cell Calcium.* – 2005. – V. 37. – № 5. – P. 489–495.
78. Burnstock G. Physiology and Pathophysiology of Purinergic Neurotransmission // *Physiol. Rev.* – 2007. – V. 87. – № 2. – P. 659–797.
79. Burnstock G. Purine and pyrimidine receptors // *Cell. Mol. Life Sci.* – 2007. – V. 64. – № 12. – P. 1471–1483.
80. Cabezas C., Buño W. Distinct Transmitter Release Properties Determine Differences in Short-Term Plasticity at Functional and Silent Synapses // *J. Neurophysiol.* – 2006. – V. 95. – № 5. – P. 3024–3034.
81. Calderón J.C., Bolaños P., Caputo C. The excitation-contraction coupling mechanism in skeletal muscle // *Biophys. Rev.* – 2014. – V. 6. – № 1. – P. 133–160.
82. Calin-Jageman I., Lee A. Cav1 L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channel signaling complexes in neurons // *J. Neurochem.* – 2008. – V. 105. – № 3. – P. 573–583.

83. Calloway N., Gouzer G., Xue M., Ryan T.A. The active-zone protein Munc13 controls the use-dependence of presynaptic voltage-gated calcium channels // *eLife*. – 2015. – V. 4. – P. e07728.
84. Cano R., Ruiz R., Shen C., Tabares L., Betz W.J. The functional landscape of a presynaptic nerve terminal // *Cell Calcium*. – 2012. – V. 52. – № 3–4. – P. 321–326.
85. Cano R., Torres-Benito L., Tejero R., Biea A.I., Ruiz R., Betz W.J., Tabares L. Structural and functional maturation of active zones in large synapses // *Mol. Neurobiol.* – 2013. – V. 47. – № 1. – P. 209–219.
86. Castagna M., Takai Y., Kaibuchi K., Sano K., Kikkawa U., Nishizuka Y. Direct activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase by tumor-promoting phorbol esters. // *J. Biol. Chem.* – 1982. – V. 257. – № 13. – P. 7847–7851.
87. Castillo J. del, Katz B. Quantal components of the end-plate potential // *J. Physiol.* – 1954. – V. 124. – № 3. – P. 560–573.
88. Castillo P. E. Presynaptic LTP and LTD of Excitatory and Inhibitory Synapses // *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* – 2012. – V. 4. – № 2. – P. a005728.
89. Castro N. G., Albuquerque E.X. alpha-Bungarotoxin-sensitive hippocampal nicotinic receptor channel has a high calcium permeability // *Biophys. J.* – 1995. – V. 68. – № 2. – P. 516–524.
90. Catterall W.A. Structure and Regulation of Voltage-Gated Ca<sup>2+</sup> Channels // *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* – 2000. – V. 16. – № 1. – P. 521–555.
91. Catterall W.A. Voltage-gated calcium channels // *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* – 2011. – V. 3. – № 8. – P. a003947.
92. Catterall W.A., Few A.P. Calcium Channel Regulation and Presynaptic Plasticity // *Neuron*. – 2008. – V. 59. – № 6. – P. 882–901.
93. Catterall W.A., Lenaeus M.J., Gamal El-Din T.M. Structure and pharmacology of voltage-gated sodium and calcium channels // *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* – 2020. – V. 60. – P. 133–154.

94. Cekic C., Linden J. Purinergic regulation of the immune system // *Nat. Rev. Immunol.* – 2016. – V. 16. – № 3. – P. 177–192.
95. Cens T., Rousset M., Leyris J.P., Fesquet P., Charnet P. Voltage- and calcium-dependent inactivation in high voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels // *Prog. Biophys. Mol. Biol.* – 2006. – V. 90. – № 1–3. – P. 104–117.
96. Cesca F., Baldelli P., Valtorta F., Benfenati F. The synapsins: key actors of synapse function and plasticity // *Prog Neurobiol.* – 2010. – V. 91. – № 4. – P. 313–348.
97. Chan T., Williams E., Cohen O., Eliceiri B.P., Baird A., Costantini T.W. *CHRFAM7A* alters binding to the neuronal alpha-7 nicotinic acetylcholine receptor // *Neurosci. Lett.* – 2019. – V. 690. – P. 126–131.
98. Chanaday N.L., Cousin M.A., Milosevic I., Watanabe S., Morgan J.R. The Synaptic Vesicle Cycle Revisited: New Insights into the Modes and Mechanisms // *J. Neurosci.* – 2019. – V. 39. – № 42. – P. 8209–8216.
99. Chanaday N.L., Kavalali E.T. Presynaptic origins of distinct modes of neurotransmitter release // *Curr. Opin. Neurobiol.* – 2018. – V. 51. – P. 119–126.
100. Chand K.K., Lee K.M., Lavidis I.A., Noakes P.G. Loss of laminin-a4 results in pre- and postsynaptic modifications at the neuromuscular junction // *The FASEB Journal.* – 2017. – V. 31. – № 4. – P. 1323–1336.
101. Changeux J.P. Discovery of the First Neurotransmitter Receptor: The Acetylcholine Nicotinic Receptor // *Biomolecules.* – 2020. – V. 10. – № 4. – P. 547.
102. Chavis P., Fagni L., Lansman J.B., Bockaert J. Functional coupling between ryanodine receptors and L-type calcium channels in neurons // *Nature.* – 1996. – V. 382. – № 6593. – P. 719–722.
103. Chen H., Singh Y.N., Dryden W.F. Transduction mechanism involving the presynaptic adenosine receptor at mouse motor nerve terminals // *Neurosci. Lett.* – 1989. – V. 96. – № 3. – P. 318–322.

104. Chen J., Li L., Chen S.R., Chen H., Xie J.D., Sirrieh R.E., MacLean D.M., Zhang Y., Zhou M.H., Jayaraman V., Pan H.L. The  $\alpha 2\delta$ -1-NMDA Receptor Complex Is Critically Involved in Neuropathic Pain Development and Gabapentin Therapeutic Actions // *Cell Rep.* – 2018. – V. 22. – № 9. – P. 2307–2321.
105. Cheng L.-Z., Lü N., Zhang Y.-Q., Zhao Z.-Q. Ryanodine receptors contribute to the induction of nociceptive input-evoked long-term potentiation in the rat spinal cord slice // *Mol. Pain.* – 2010. – V. 6. – P. 1.
106. Cheng Q., Yakel J.L. The effect of  $\alpha 7$  nicotinic receptor activation on glutamatergic transmission in the hippocampus // *Biochem. Pharmacol.* – 2015. – V. 97. – № 4. – P. 439–444.
107. Chrestia J. F., Bruzzone A., Esandi M.D.C., Bouzat C. Tyrosine phosphorylation differentially fine-tunes ionotropic and metabotropic responses of human  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptor // *Cell. Mol. Life Sci.* – 2021. – V. 78. – № 13. – P. 5381–5395.
108. Cilleros-Mañé V., Just-Borràs L., Tomàs M., Garcia N., Tomàs J.M., Lanuza M.A. The M2 muscarinic receptor, in association to M1, regulates the neuromuscular PKA molecular dynamics // *The FASEB Journal.* – 2020. – V. 34. – № 4. – P. 4934–4955.
109. Cinalli A.R., Guarracino J.F., Fernandez V., Roquel L.I., Losavio A.S. Inosine induces presynaptic inhibition of acetylcholine release by activation of A3 adenosine receptors at the mouse neuromuscular junction // *Br. J. Pharmacol.* – 2013. – V. 169. – № 8. – P. 1810–1823.
110. Coddou C., Stojilkovic S.S., Huidobro-Toro J.P. Allosteric modulation of ATP-gated P2X receptor channels // *Rev. Neurosci.* – 2011. – V. 22. – № 3. – P. 335–354.
111. Coddou C., Yan Z., Obsil T., Huidobro-Toro J.P., Stojilkovic S.S. Activation and Regulation of Purinergic P2X Receptor Channels // *Pharmacol. Rev.* – 2011. – V. 63. – № 3. – P. 641–683.

112. Corradi J., Bouzat C. Understanding the Bases of Function and Modulation of  $\alpha 7$  Nicotinic Receptors: Implications for Drug Discovery // *Mol. Pharmacol.* – 2016. – V. 90. – № 3. – P. 288–299.
113. Correia-de-Sá P., Sebastião A.M., Ribeiro J.A. Inhibitory and excitatory effects of adenosine receptor agonists on evoked transmitter release from phrenic nerve endings of the rat // *Br. J. Pharmacol.* – 1991. – V. 103. – № 2. – P. 1614–1620.
114. Correia-de-Sá P., Timóteo M.A., Ribeiro J.A. A(2A) adenosine receptor facilitation of neuromuscular transmission: Influence of stimulus paradigm on calcium mobilization // *J. Neurochem.* – 2000. – V. 74. – № 6. – P. 2462–2469.
115. Correia-de-Sá P., Timóteo M.A., Ribeiro J.A. Influence of stimulation on  $Ca^{2+}$  recruitment triggering  $[3H]$ acetylcholine release from the rat motor-nerve endings // *Eur. J. Pharmacol.* – 2000. – V. 406. – № 3. – P. 355–362.
116. Correia-De-Sá P., Timóteo M.A., Ribeiro J.A. Presynaptic A1 inhibitory/A2A facilitatory adenosine receptor activation balance depends on motor nerve stimulation paradigm at the rat hemidiaphragm // *J. Neurophysiol.* – 1996. – V. 76. – № 6. – P. 3910–3919.
117. Costa-Junior H.M., Sarmiento Vieira F., Coutinho-Silva R. C terminus of the P2X7 receptor: treasure hunting // *Purinergic Signal.* – 2011. – V. 7. – № 1. – P. 7–19.
118. Csillik B., Tajti L., Kovács T., Kukla E., Rakic P., Knyihár-Csillik E. Distribution of calcitonin gene-related peptide in vertebrate neuromuscular junctions: relationship to the acetylcholine receptor // *J. Histochem. Cytochem.* – 1993. – V. 41. – № 10. – P. 1547–55.
119. Dai S., Hall D.D., Hell J.W. Supramolecular assemblies and localized regulation of voltage-gated ion channels // *Physiol. Rev.* – 2009. – V. 89. – № 2. – P. 411–452.
120. Dajas-Bailador F.A., Mogg A.J., Wonnacott S. Intracellular  $Ca^{2+}$  signals evoked by stimulation of nicotinic acetylcholine receptors in SH-SY5Y cells:



- contribution of voltage-operated Ca<sup>2+</sup> channels and Ca<sup>2+</sup> stores // *J. Neurochem.* – 2002. – V. 81. – № 3. – P. 606–614.
121. Dani J.A., Bertrand D. Nicotinic Acetylcholine Receptors and Nicotinic Cholinergic Mechanisms of the Central Nervous System // *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* – 2007. – V. 47. – P. 699–729.
122. Davydova D., Marini C., King C., Klueva J., Bischof F., Romorini S., Montenegro-Venegas C., Heine M., Schneider R., Schröder M.S., Altmann W.D., Henneberger C., Rusakov D.A., Gundelfinger E.D., Fejtova A. Bassoon specifically controls presynaptic P/Q-type Ca<sup>2+</sup> channels via RIM-binding protein // *Neuron.* – 2014. – V. 82. – № 1. – P. 181–194.
123. Day N.C., Wood S.J., Ince P.G., Volsen S.G., Smith W., Slater C.R., Shaw P. J. Differential localization of voltage-dependent calcium channel  $\alpha 1$  subunits at the human and rat neuromuscular junction // *J. Neurosci.* – 1997. – V. 17. – № 16. – P. 6226–6235.
124. De Crescenzo V., Fogarty K.E., ZhuGe R., Tuft R.A., Lifshitz L.M., Carmichael J., Bellvé K.D., Baker S.P., Zissimopoulos S., Lai F.A., Lemos J.R., Walsh Jr J.V. Dihydropyridine Receptors and Type 1 Ryanodine Receptors Constitute the Molecular Machinery for Voltage-Induced Ca<sup>2+</sup> Release in Nerve Terminals // *J. Neurosci.* – 2006. – V. 26. – № 29. – P. 7565.
125. De Giglio L., Cortese F., Pennisi E. M. Aminopyridines in the treatment of multiple sclerosis and other neurological disorders // *Neurodegener. Dis. Manag.* – 2020. – V. 10. – № 6. – P. 409–423.
126. de Jong A. P., Verhage M. Presynaptic signal transduction pathways that modulate synaptic transmission // *Curr. Opin. Neurobiol.* – 2009. – V. 19. – № 3. – P. 245–253.
127. de Juan-Sanz J., Holt G.T., Schreier E.R., de Juan F., Kim D.S., Ryan T.A. Axonal Endoplasmic Reticulum Ca<sup>2+</sup> Content Controls Release Probability in CNS Nerve Terminals // *Neuron.* – 2017. – V. 93. – № 4. – P. 867-881.e6.

128. De Lorenzo S., Veggetti M., Muchnik S., Losavio A. Presynaptic inhibition of spontaneous acetylcholine release mediated by P2Y receptors at the mouse neuromuscular junction. // *Neuroscience*. – 2006. – V. 142. – № 1. – P. 71–85.
129. Dehkordi O., Haxhiu M.A., Millis R.M., Dennis G.C., Kc P., Jafri A., Khajavi M., Trouth C.O., Zaidi S.I. Expression of  $\alpha$ -7 nAChRs on spinal cord–brainstem neurons controlling inspiratory drive to the diaphragm // *Respir. Physiol. Neurobiol.* – 2004. – V. 141. – № 1. – P. 21–34.
130. Deisseroth K., Heist E.K., Tsien R.W. Translocation of calmodulin to the nucleus supports CREB phosphorylation in hippocampal neurons // *Nature*. – 1998. – V. 392. – № 6672. – P. 198–202.
131. Demaria C.D., Soong T.W., Alseikhan B.A., Alvania R.S., Yue D.T. Calmodulin bifurcates the local Ca<sup>2+</sup> signal that modulates P/Q-type Ca<sup>2+</sup> channels // *Nature*. – 2001. – V. 411. – № 6836. – P. 484–489.
132. Depetris R.S., Nudler S.I., Uchitel O.D., Urbano F.J. Altered synaptic synchrony in motor nerve terminals lacking P/Q-calcium channels // *Synapse*. – 2008. – V. 62. – № 6. – P. 466–471.
133. des Georges A., Clarke O. B., Zalk R., Yuan Q., Condon K. J., Grassucci R. A., Hendrickson W. A., Marks A. R., Frank J. Structural Basis for Gating and Activation of RyR1 // *Cell*. – 2016. – V. 167. – № 1. – P. 145-157.e17.
134. Deuchars S.A., Atkinson L., Brooke R.E., Musa H., Milligan C.J., Batten T.F.C., Buckley N.J., Parson S.H., Deuchars J. Neuronal P2X7 Receptors Are Targeted to Presynaptic Terminals in the Central and Peripheral Nervous Systems // *J. Neurosci.* – 2001. – V. 21. – № 18. – P. 7143–7152.
135. Dezaki K., Tsuneki H., Kimura I. Methyllycaconitine-sensitive neuronal nicotinic receptor-operated slow Ca<sup>2+</sup> signal by local application or perfusion of ACh at the mouse neuromuscular junction // *Neurosci. Res.* – 1999. – V. 33. – № 1. – P. 17–24.
136. Di Virgilio F., Dal Ben D., Sarti A.C., Giuliani A.L., Falzoni S. The P2X7 Receptor in Infection and Inflammation // *Immunity*. – 2017. – V. 47. – № 1. – P. 15–31.

137. Di Virgilio F., Schmalzing G., Markwardt F. The Elusive P2X7 Macropore // Trends Cell Biol. – 2018. – V. 28. – № 5. – P. 392–404.
138. DiGregorio D. A., Peskoff A., Vergara J.L. Measurement of Action Potential-Induced Presynaptic Calcium Domains at a Cultured Neuromuscular Junction. // J. Neurosci. – 1999. – V. 19. – № 18. – P. 7846–7859.
139. Dissanayake K.N., Margetiny F., Whitmore C.L., Chou R.C.C., Roesl C., Patel V., McArdle J.J., Webster R., Beeson D., Tattersall J.E.H., Wyllie D.J.A., Eddleston M., Ribchester R.R. Antagonistic postsynaptic and presynaptic actions of cyclohexanol on neuromuscular synaptic transmission and function // J. Physiol. – 2021. – V. 599. – № 24. – P. 5417–5449.
140. Dittman J.S., Ryan T.A. The control of release probability at nerve terminals // Nat. Rev. Neurosci. – 2019. – V. 20. – № 3. – P. 177–186.
141. Dittmer P.J., Dell’Acqua M.L., Sather W.A. Ca<sup>2+</sup>/calcineurin-dependent inactivation of neuronal L-Type Ca<sup>2+</sup> channels requires priming by AKAP-anchored protein kinase A // Cell Rep. – 2014. – V. 7. – № 5. – P. 1410–1416.
142. Dittmer P.J., Wild A.R., Dell’Acqua M.L., Sather W.A. STIM1 Ca<sup>2+</sup> Sensor Control of L-type Ca<sup>2+</sup>-Channel-Dependent Dendritic Spine Structural Plasticity and Nuclear Signaling // Cell Rep. – 2017. – V. 19. – № 2. – P. 321–334.
143. Dittrich M., Homan A. E., Meriney S.D. Presynaptic mechanisms controlling calcium-triggered transmitter release at the neuromuscular junction // Curr. Opin. Physiol. – 2018. – V. 4. – P. 15–24.
144. Djillani A., Bazinet J., Catterall W.A. Synaptotagmin-7 Enhances Facilitation of Cav2.1 Calcium Channels // eNeuro. – 2022. – V. 9. – № 3. – P. ENEURO.0081-22.2022.
145. Dolphin A.C. Functions of Presynaptic Voltage-gated Calcium Channels // Function. – 2020. – V. 2. – № 1. – P. zqaa027.
146. Dolphin A.C. Voltage-gated calcium channels: Their discovery, function and importance as drug targets // Brain Neurosci. Adv. – 2018. – V. 2. – P. 2398212818794805.

147. Dolphin A.C., Lee A. Presynaptic calcium channels: specialized control of synaptic neurotransmitter release // *Nat. Rev. Neurosci.* – 2020. – V. 21. – № 4. – P. 213–229.
148. Domet M.A., Webb C.E., Wilson D.F. Impact of alpha-bungarotoxin on transmitter release at the neuromuscular junction of the rat // *Neurosci. Lett.* – 1995. – V. 199. – № 1. – P. 49–52.
149. Donnelly-Roberts D.L., Namovic M.T., Han P., Jarvis M.F. Mammalian P2X7 receptor pharmacology: comparison of recombinant mouse, rat and human P2X7 receptors // *Br. J. Pharmacol.* – 2009. – V. 157. – № 7. – P. 1203–1214.
150. Dunlap K., Luebke J.I., Turner T.J. Exocytotic Ca<sup>2+</sup> channels in mammalian central neurons // *Trends Neurosci.* – 1995. – V. 18. – № 2. – P. 89–98.
151. Dunn T.W., Syed N.I. Ryanodine receptor–transmitter release site coupling increases quantal size in a synapse-specific manner // *Eur. J. Neurosci.* – 2006. – V. 24. – № 6. – P. 1591–1605.
152. Egan T.M., Khakh B.S. Contribution of calcium ions to P2X channel responses // *J. Neurosci.* – 2004. – V. 24. – № 13. – P. 3413–3420.
153. Eggermann E., Bucurenciu I., Goswami S.P., Jonas P. Nanodomain coupling between Ca<sup>2+</sup> channels and sensors of exocytosis at fast mammalian synapses // *Nat. Rev. Neurosci.* – 2012. – V. 13. – № 1. – P. 7–21.
154. Ehrlich B.E., Kaftan E., Bezprozvannaya S., Bezprozvanny I. The pharmacology of intracellular Ca<sup>2+</sup>-release channels // *Trends Pharmacol. Sci.* – 1994. – V. 15. – № 5. – P. 145–149.
155. Eigler T., Zarfati G., Amzallag E., Sinha S., Segev N., Zabary Y., Zaritsky A., Shakked A., Umansky K.B., Schejter E.D., Millay D.P., Tzahor E., Avinoam O. ERK1/2 inhibition promotes robust myotube growth via CaMKII activation resulting in myoblast-to-myotube fusion // *Dev. Cell.* – 2021. – V. 56. – № 24. – P. 3349-3363.e6.
156. Emptage N., Bliss T.V.P., Fine A. Single Synaptic Events Evoke NMDA Receptor–Mediated Release of Calcium from Internal Stores in Hippocampal Dendritic Spines // *Neuron.* – 1999. – V. 22. – № 1. – P. 115–124.

157. Emptage N.J., Reid C.A., Fine A. Calcium Stores in Hippocampal Synaptic Boutons Mediate Short-Term Plasticity, Store-Operated Ca<sup>2+</sup> Entry, and Spontaneous Transmitter Release // *Neuron*. – 2001. – V. 29. – № 1. – P. 197–208.
158. Erxleben C., Liao Y., Gentile S., Chin D., Gomez-Alegria C., Mori Y., Birnbaumer L., Armstrong D.L. Cyclosporin and Timothy syndrome increase mode 2 gating of CaV1.2 calcium channels through aberrant phosphorylation of S6 helices // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2006. – V. 103. – № 10. – P. 3932–3937.
159. Evans R.J. Orthosteric and allosteric binding sites of P2X receptors // *Eur. Biophys. J.* – 2009. – V. 38. – № 3. – P. 319–327.
160. Falzoni S., Donvito G., Di Virgilio F. Detecting adenosine triphosphate in the pericellular space // *Interface Focus*. – 2013. – V. 3. – № 3.
161. Faria M., Oliveira L., Timóteo M.A., Lobo M.G., Correia-De-Sá P. Blockade of neuronal facilitatory nicotinic receptors containing  $\alpha 3\beta 2$  subunits contribute to tetanic fade in the rat isolated diaphragm // *Synapse*. – 2003. – V. 49. – № 2. – P. 77–88.
162. Fassio A., Fadda M., Benfenati F. Molecular Machines Determining the Fate of Endocytosed Synaptic Vesicles in Nerve Terminals // *Front. Synaptic Neurosci.* – 2016. – V. 8. – P. 10.
163. Fatt P., Katz B. An analysis of the end-plate potential recorded with an intracellular electrode // *J. Physiol.* – 1951. – V. 115. – № 3. – P. 320–370.
164. Fayuk D., Yakel J.L. Ca<sup>2+</sup> permeability of nicotinic acetylcholine receptors in rat hippocampal CA1 interneurons // *J. Physiol.* – 2005. – V. 566. – № 3. – P. 759–768.
165. Fekete A., Nakamura Y., Yang Y.M., Herlitze S., Mark M.D., DiGregorio D. A., Wang L.Y. Underpinning heterogeneity in synaptic transmission by presynaptic ensembles of distinct morphological modules // *Nat. Commun.* – 2019. – V. 10. – № 1. – P. 826.

166. Ferron L., Guderyan S.D., Smith E.J., Zamponi G.W. CaV $\beta$ -subunit dependence of forward and reverse trafficking of CaV1.2 calcium channels // *Mol. Brain.* – 2022. – V. 15. – № 1. – P. 1–7.
167. Fill M., Copello J.A. Ryanodine receptor calcium release channels // *Physiol. Rev.* – 2002. – V. 82. – № 4. – P. 893–922.
168. Fischer U., Reinhardt S., Albuquerque E.X., Maelicke A. Expression of functional  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptor during mammalian muscle development and denervation // *Eur. J. Neurosci.* – 1999. – V. 11. – № 8. – P. 2856–2864.
169. Fischer V., Both M., Draguhn A., Egorov A.V. Choline-mediated modulation of hippocampal sharp wave–ripple complexes in vitro // *J. Neurochem.* – 2014. – V. 129. – № 5. – P. 792–805.
170. Flink M.T., Atchison W.D. Iberitoxin-induced block of Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels induces dihydropyridine sensitivity of ACh release from mammalian motor nerve terminals // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* – 2003. – V. 305. – № 2. – P. 646–652.
171. Flink M.T., Atchison W.D. Passive transfer of Lambert-Eaton syndrome to mice induces dihydropyridine sensitivity of neuromuscular transmission. // *J. Physiol.* – 2002. – V. 543. – № Pt 2. – P. 567–76.
172. Fong S.W., McLennan I.S., McIntyre A., Reid J., Shennan K.I.J., Bewick G.S. TGF-beta2 alters the characteristics of the neuromuscular junction by regulating presynaptic quantal size. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2010. – V. 107. – № 30. – P. 13515–13519.
173. Ford K.J., Davis G.W. Archaelhodopsin voltage imaging: Synaptic calcium and BK channels stabilize action potential repolarization at the *Drosophila* neuromuscular junction // *J. Neurosci.* – 2014. – V. 34. – № 44. – P. 14517–14525.
174. Forsythe I.D., Tsujimoto T., Barnes-Davies M., Cuttle M.F., Takahashi T. Inactivation of presynaptic calcium current contributes to synaptic depression at a fast central synapse. // *Neuron.* – 1998. – V. 20. – № 4. – P. 797–807.

175. Foster T.C., McNaughton B.L. Long-term enhancement of CA1 synaptic transmission is due to increased quantal size, not quantal content // *Hippocampus*. – 1991. – V. 1. – № 1. – P. 79–91.
176. Fourcaudot E., Gambino F., Casassus G., Poulain B., Humeau Y., Lüthi A. L-type voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> channels mediate expression of presynaptic LTP in amygdala // *Nat. Neurosci.* – 2009. – V. 12. – № 9. – P. 1093–1095.
177. Fredholm B.B., Bättig K., Holmén J., Nehlig A., Zvartau E.E. Actions of caffeine in the brain with special reference to factors that contribute to its widespread use // *Pharmacol. Rev.* – 1999. – V. 51. – № 1 – P. 81–133.
178. Fucile S., Renzi M., Lax P., Eusebi F. Fractional Ca<sup>2+</sup> current through human neuronal  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptors // *Cell Calcium*. – 2003. – V. 34. – № 2. – P. 205–209.
179. Fukuoka T., Engel A.G., Lang B., Newsom-Davis J., Prior C., Wray D.W. Lambert-Eaton myasthenic syndrome: I. Early morphological effects of IgG on the presynaptic membrane active zones // *Ann. Neurol.* – 1987. – V. 22. – № 2. – P. 193–199.
180. Futatsugi A., Kato K., Ogura H., Li S.T., Nagata E., Kuwajima G., Tanaka K., Itohara S., Mikoshiba K. Facilitation of NMDAR-independent LTP and spatial learning in mutant mice lacking ryanodine receptor type 3 // *Neuron*. – 1999. – V. 24. – № 3. – P. 701–713.
181. Gaffield M.A., Tabares L., Betz W.J. Preferred sites of exocytosis and endocytosis colocalize during high- but not lower-frequency stimulation in mouse motor nerve terminals // *J. Neurosci.* – 2009. – V. 29. – № 48. – P. 15308–15316.
182. Gaffield M.A., Tabares L., Betz W.J. The spatial pattern of exocytosis and post-exocytic mobility of synaptopHluorin in mouse motor nerve terminals // *J. Physiol.* – 2009. – V. 587. – № 6. – P. 1187–1200.
183. Galkin A.V., Giniatullin R.A., Mukhtarov M.R., Švandová I., Grishin S. N., Vyskočil F. ATP but not adenosine inhibits nonquantal acetylcholine release at

- the mouse neuromuscular junction // *Eur. J. Neurosci.* – 2001. – V. 13. – № 11. – P. 2047–2053.
184. Gamage R., Wagnon I., Rossetti I., Childs R., Niedermayer G., Chesworth R., Gyengesi E. Cholinergic Modulation of Glial Function During Aging and Chronic Neuroinflammation // *Front. Cell. Neurosci.* – 2020. – V. 14. – P. 318.
185. Gamelli A.E., McKinney B.C., White J.A., Murphy G.G. Deletion of the L-type calcium channel CaV1.3 but not CaV1.2 results in a diminished sAHP in mouse CA1 pyramidal neurons // *Hippocampus.* – 2011. – V. 21. – № 2. – P. 133–141.
186. Garcia N., Priego M., Obis T., Santafé M.M., Tomàs M., Besalduch N., Lanuza M.A., Tomàs J. Adenosine A1 and A2A receptor-mediated modulation of acetylcholine release in the mice neuromuscular junction // *Eur. J. Neurosci.* – 2013. – V. 38. – № 2. – P. 2229–2241.
187. Garcia N., Santafé M.M., Salon I., Lanuza M.A., Tomàs J. Expression of muscarinic acetylcholine receptors (M1-, M2-, M3- and M4-type) in the neuromuscular junction of the newborn and adult rat // *Histol. Histopathol.* – 2005. – V. 20. – № 3. – P. 733–743.
188. Gaydukov A.E., Balezina O.P. Potentiating effect of allatostatin on transmitter quantal secretion in the mouse nerve-muscle synapse // *J. Evol. Biochem. Physiol.* – 2006. – V. 42. – № 6. – P. 699–705.
189. Ge L., Shin W., Arpino G., Wei L., Chan C.Y., Bleck C.K.E., Zhao W., Wu L. G. Sequential compound fusion and kiss-and-run mediate exo- and endocytosis in excitable cells // *Sci. Adv.* – 2022. – V. 8. – № 24. – P. 6049.
190. Geisler S., Schöpf C.L., Stanika R., Kalb M., Campiglio M., Repetto D., Traxler L., Missler M., Obermair G.J. Presynaptic  $\alpha 2\delta$ -2 calcium channel subunits regulate postsynaptic GABAA receptor abundance and axonal wiring // *J. Neurosci.* – 2019. – V. 39. – № 14. – P. 2581–2605.
191. Gerasimova E., Lebedeva J., Yakovlev A., Zefirov A., Giniatullin R., Sitdikova G. Mechanisms of hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S) action on synaptic transmission at



- the mouse neuromuscular junction // *Neuroscience*. – 2015. – V. 303. – P. 577–585.
192. Gerasimova E.V., Yakovleva O.V., Zefirov A.L., Sitdikova G.F. Role of Ryanodine Receptors in the Effects of Hydrogen Sulfide on Transmitter Release from the Frog Motor Nerve Ending // *Bull. Exp. Biol. Med* 2013 155:1. – 2013. – V. 155. – № 1. – P. 11–13.
193. Giansante G., Marte A., Romei A., Prestigio C., Onofri F., Benfenati F., Baldelli P., Valente P. Presynaptic L-Type Ca<sup>2+</sup> Channels Increase Glutamate Release Probability and Excitatory Strength in the Hippocampus during Chronic Neuroinflammation // *J. Neurosci.* – 2020. – V. 40. – № 36. – P. 6825–6841.
194. Ginebaugh S.P., Badawi Y., Tarr T.B., Meriney S.D. Neuromuscular Active Zone Structure and Function in Healthy and Lambert-Eaton Myasthenic Syndrome States // *Biomolecules*. – 2022. – V. 12. – № 6. – P. 740.
195. Giniatullin R.A., Sokolova E.M. ATP and adenosine inhibit transmitter release at the frog neuromuscular junction through distinct presynaptic receptors // *Br. J. Pharmacol.* – 1998. – V. 124. – № 4. – P. 839–844.
196. Giovannini F., Sher E., Webster R., Boot J., Lang B. Calcium channel subtypes contributing to acetylcholine release from normal, 4-aminopyridine-treated and myasthenic syndrome auto-antibodies-affected neuromuscular junctions // *Br. J. Pharmacol.* – 2002. – V. 136. – № 8. – P. 1135–1145.
197. Giugovaz-Tropper B., González-Inchauspe C., Di Guilmi M.N., Urbano F.J., Forsythe I.D., Uchitel O.D. P/Q-type calcium channel ablation in a mice glycinergic synapse mediated by multiple types of Ca<sup>2+</sup> channels alters transmitter release and short term plasticity // *Neuroscience*. – 2011. – V. 192. – P. 219–230.
198. Glavinović M. I. Voltage clamping of unparalysed cut rat diaphragm for study of transmitter release. // *J. Physiol.* – 1979. – V. 290. – № 2. – P. 467–480.
199. Godfraind T. Discovery and development of calcium channel blockers // *Front. Pharmacol.* – 2017. – V. 8. – P. 286.

200. Gong D., Yan N., Ledford H.A. Structural Basis for the Modulation of Ryanodine Receptors // *Trends Biochem. Sci.* – 2021. – V. 46. – № 6. – P. 489–501.
201. González Sanabria J., Hurtado Paso M., Frontera T., Losavio A. Effect of endogenous purines on electrically evoked ACh release at the mouse neuromuscular junction // *J. Neurosci. Res.* – 2022. – V. 100. – № 10. – P. 1933–1950.
202. Gotti C., Clementi F., Fornari A., Gaimarri A., Guiducci S., Manfredi I., Moretti M., Pedrazzi P., Pucci L., Zoli M. Structural and functional diversity of native brain neuronal nicotinic receptors // *Biochem. Pharmacol.* – 2009. – V. 78. – № 7. – P. 703–711.
203. Grady S.R., Salminen O., Lavery D.C., Whiteaker P., McIntosh J.M., Collins A.C., Marks M.J. The subtypes of nicotinic acetylcholine receptors on dopaminergic terminals of mouse striatum // *Biochem. Pharmacol.* – 2007. – V. 74. – № 8. – P. 1235–1246.
204. Gray R., Rajan A.S., Radcliffe K.A., Yakehiro M., Dani J.A. Hippocampal synaptic transmission enhanced by low concentrations of nicotine // *Nature.* – 1996. – V. 383. – № 6602. – P. 713–716.
205. Grigoryan G., Korkotian E., Segal M. Selective facilitation of LTP in the ventral hippocampus by calcium stores // *Hippocampus.* – 2012. – V. 22. – № 7. – P. 1635–1644.
206. Griguoli M., Scuri R., Ragozzino D., Cherubini E. Activation of nicotinic acetylcholine receptors enhances a slow calcium-dependent potassium conductance and reduces the firing of stratum oriens interneurons // *Eur. J. Neurosci.* – 2009. – V. 30. – № 6. – P. 1011–1022.
207. Griguoli M., Sgritta M., Cherubini E. Presynaptic BK channels control transmitter release: physiological relevance and potential therapeutic implications // *J. Physiol.* – 2016. – V. 594. – № 13. – P. 3489–3500.
208. Groome J.R., Bayless-Edwards L. Roles for Countercharge in the Voltage Sensor Domain of Ion Channels // *Front. Pharmacol.* – 2020. – V. 11. – P. 160.

209. Guarracino J.F., Cinalli A.R., Fernández V., Roquel L.I., Losavio A.S. P2Y<sub>13</sub> receptors mediate presynaptic inhibition of acetylcholine release induced by adenine nucleotides at the mouse neuromuscular junction // *Neuroscience*. – 2016. – V. 326. – P. 31–44.
210. Guarracino J.F., Cinalli A.R., Veggetti M.I., Losavio A.S. Endogenous purines modulate K<sup>+</sup>-evoked ACh secretion at the mouse neuromuscular junction // *J. Neurosci. Res.* – 2018. – V. 96. – № 6. – P. 1066–1079.
211. Gusev A.G., Uteshev V.V. Physiological Concentrations of Choline Activate Native alpha7-Containing Nicotinic Acetylcholine Receptors in the Presence of PNU-120596 [1-(5-Chloro-2,4-dimethoxyphenyl)-3-(5-methylisoxazol-3-yl)-urea] // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* – 2010. – V. 332. – № 2. – P. 588–598.
212. Gutiérrez-Martín Y., Bustillo D., Gómez-Villafuertes R., Sánchez-Nogueiro J., Torregrosa-Hetland C., Binz T., Gutiérrez L.M., Miras-Portugal M.T., Artalejo A.R. P2X<sub>7</sub> Receptors Trigger ATP Exocytosis and Modify Secretory Vesicle Dynamics in Neuroblastoma Cells // *J. Biol. Chem.* – 2011. – V. 286. – № 13. – P. 11370–11381.
213. Habermacher C., Dunning K., Chataigneau T., Grutter T. Molecular structure and function of P2X receptors // *Neuropharmacology*. – 2016. – V. 104. – P. 18–30.
214. Hakamata Y., Nakai J., Takeshima H., Imoto K. Primary structure and distribution of a novel ryanodine receptor/calcium release channel from rabbit brain // *FEBS Letters*. – 1992. – V. 312. – № 2–3. – P. 229–235.
215. Halls M.L., Cooper D.M.F. Regulation by Ca<sup>2+</sup>-signaling pathways of adenylyl cyclases // *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* – 2011. – V. 3. – № 1. – P. 1–22.
216. Hardie J., Lee A. Decalmodulation of Cav1 channels by CaBPs // *Channels*. – 2016. – V. 10. – № 1. – P. 33–37.
217. Harvey J., Collingridge G.L. Thapsigargin blocks the induction of long-term potentiation in rat hippocampal slices // *Neurosci. Lett.* – 1992. – V. 139. – № 2. – P. 197–200.

218. Hasreiter J., Goldnagl L., Böhm S., Kubista H. Cav1.2 and Cav1.3 L-type calcium channels operate in a similar voltage range but show different coupling to Ca<sup>2+</sup>-dependent conductances in hippocampal neurons // *Am. J. Cell Physiol.* – 2014. – V. 306. – № 12. – P. C1200–C1213.
219. Hay D.L., Garelja M.L., Poyner D.R., Walker C.S. Update on the pharmacology of calcitonin/CGRP family of peptides: IUPHAR Review 25 // *Br. J. Pharmacol.* – 2017. – V. 175. – № 1. – P. 3–17.
220. He X.P., Yang F., Xie Z.P., Lu B. Intracellular Ca<sup>2+</sup> and Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin-Dependent Kinase II Mediate Acute Potentiation of Neurotransmitter Release by Neurotrophin-3 // *J. Cell Biol.* – 2000. – V. 149. – № 4. – P. 783–792.
221. Heck J., Parutto P., Ciuraszkiewicz A., Bikbaev A., Freund R., Mitlöhner J., Andres-Alonso M., Fejtova A., Holcman D., Heine M. Transient Confinement of CaV2.1 Ca<sup>2+</sup>-Channel Splice Variants Shapes Synaptic Short-Term Plasticity // *Neuron.* – 2019. – V. 103. – № 1. – P. 66–79.e12.
222. Hell J.W., Westenbroek R.E., Warner C., Ahljianian M. K., Prystay W., Gilbert M.M., Snutch T.P., Catterall W.A. Identification and differential subcellular localization of the neuronal class C and class D L-type calcium channel  $\alpha 1$  subunits // *J. Cell Biol.* – 1993. – V. 123. – № 4. – P. 949–962.
223. Hell J.W. How Ca<sup>2+</sup>-permeable AMPA receptors, the kinase PKA, and the phosphatase PP2B are intertwined in synaptic LTP and LTD // *Sci. Signal.* – 2016. – V. 9. – № 425– P. e2.
224. Hernández-Vázquez F., Chavarría K., Garduño J., Hernández-López S., Mihailescu S.P. Nicotine increases gabaergic input on rat dorsal raphe serotonergic neurons through alpha7 nicotinic acetylcholine receptor // *J. Neurophysiol.* – 2014. – V. 112. – № 12. – P. 3154–3163.
225. Hertle D.N., Yeckel M.F. Distribution of inositol-1,4,5-trisphosphate receptor isoforms and ryanodine receptor isoforms during maturation of the rat hippocampus // *Neuroscience.* – 2007. – V. 150. – № 3. – P. 625–638.

226. Herzig S., Neumann J. Effects of serine/threonine protein phosphatases on ion channels in excitable membranes. // *Physiol. Rev.* – 2000. – V. 80. – № 1. – P. 173–210.
227. Heuser J.E., Reese T.S., Dennis M.J., Jan Y., Jan L., Evans L. Synaptic vesicle exocytosis captured by quick freezing and correlated with quantal transmitter release // *J. Cell Biol.* – 1979. – V. 81. – № 2. – P. 275–300.
228. Hirano M., Takada Y., Wong C.F., Yamaguchi K., Kotani H., Kurokawa T., Mori M.X., Snutch T.P., Ronjat M., De Waard M., Mori Y. C-terminal splice variants of P/Q-type Ca<sup>2+</sup> channel Cav2.1  $\alpha$ 1 subunits are differentially regulated by Rab3-interacting molecule proteins // *J. Biol. Chem.* – 2017. – V. 292. – № 22. – P. 9365–9381.
229. Hofmann F., Flockerzi V., Kahl S., Wegener J.W. L-type CaV1.2 calcium channels: From *in vitro* findings to *in vivo* function // *Physiol. Rev.* – 2014. – V. 94. – № 1. – P. 303–326.
230. Holmgaard K., Jensen K., Lambert J.D.C. Imaging of Ca<sup>2+</sup> responses mediated by presynaptic L-type channels on GABAergic boutons of cultured hippocampal neurons // *Brain Res.* – 2009. – V. 1249. – P. 79–90.
231. Homan A.E., Meriney S.D. Active zone structure-function relationships at the neuromuscular junction // *Synapse.* – 2018. – V. 72. – № 11. – P. e22057.
232. Hong S.J., Chang C.C. Inhibition of acetylcholine release from mouse motor nerve by a P-type calcium channel blocker, omega-agatoxin IVA. // *J. Physiol.* – 1995. – V. 482 ( Pt. 2). – № 2. – P. 283–90.
233. Hoppa M.B., Lana B., Margas W., Dolphin A.C., Ryan T.A.  $\alpha$ 2 $\delta$  expression sets presynaptic calcium channel abundance and release probability // *Nature.* – 2012. – V. 486. – № 7401. – P. 122–125.
234. Horton S.M., Luna Lopez C., Blevins E., Howarth H., Weisberg J., Shestopalov V.I., Makarenkova H.P., Shah S. B. Pannexin 1 modulates axonal growth in mouse peripheral nerves // *Front. Cell. Neurosci.* – 2017. – V. 11. – P. 365.

235. Hosoi N., Holt M., Sakaba T. Calcium dependence of exo- and endocytotic coupling at a glutamatergic synapse. // *Neuron*. – 2009. – V. 63. – № 2. – P. 216–229.
236. Huang C.C., Wang S.J., Gean P.W. Selective enhancement of P-type calcium currents by isoproterenol in the rat amygdala // *J. Neurosci.* – 1998. – V. 18. – № 6. – P. 2276–2282.
237. Huang S., Kirkwood A. Endocannabinoid Signaling Contributes to Experience-Induced Increase of Synaptic Release Sites From Parvalbumin Interneurons in Mouse Visual Cortex // *Front. Cell. Neurosci.* – 2020. – V. 14. – P. 304.
238. Huang W., Wang H., Galligan J.J., Wang D.H. Transient receptor potential vanilloid subtype 1 channel mediated neuropeptide secretion and depressor effects: Role of endoplasmic reticulum associated Ca<sup>2+</sup> release receptors in rat dorsal root ganglion neurons // *J. Hypertens.* – 2008. – V. 26. – № 10. – P. 1966–1975.
239. Hudmon A., Schulman H., Kim J., Maltez J.M., Tsien R.W., Pitt G.S. CaMKII tethers to L-type Ca<sup>2+</sup> channels, establishing a local and dedicated integrator of Ca<sup>2+</sup> signals for facilitation // *J. Cell Biol.* – 2005. – V. 171. – № 3. – P. 537–547.
240. Hulme J. T., Yarov-Yarovoy V., Lin T.W.C., Scheuer T., Catterall W.A. Autoinhibitory control of the CaV1.2 channel by its proteolytically processed distal C-terminal domain // *J. Physiol.* – 2006. – V. 576. – № 1. – P. 87–102.
241. Humphreys B.D., Virginio C., Surprenant A., Rice J., Dubyak G.R. Isoquinolines as antagonists of the P2X7 nucleotide receptor: high selectivity for the human versus rat receptor homologues // *Mol. Pharmacol.* – 1998. – V. 54. – № 1. – P. 22–32.
242. Illes P., Khan T. M., Rubini P. Neuronal P2X7 receptors revisited: Do they really exist? // *J. Neurosci.* – 2017. – V. 37. – № 30. – P. 7049–7062.
243. Jackman S.L., Regehr W.G. The Mechanisms and Functions of Synaptic Facilitation // *Neuron*. – 2017. – V. 94. – № 3. – P. 447–464.

244. Jeans A.F., van Heusden F.C., Al-Mubarak B., Padamsey Z., Emptage N.J. Homeostatic Presynaptic Plasticity Is Specifically Regulated by P/Q-type Ca<sup>2+</sup> Channels at Mammalian Hippocampal Synapses // *Cell Rep.* – 2017. – V. 21. – № 2. – P. 341–350.
245. Jenkins M.A., Christel C.J., Jiao Y., Abiria S., Kim K.Y., Usachev Y.M., Obermair G.J., Colbran R.J., Lee A. Ca<sup>2+</sup>-Dependent facilitation of cav1.3 ca<sup>2+</sup> channels by densin and ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II // *J. Neurosci.* – 2010. – V. 30. – № 15. – P. 5125–5135.
246. Jensen A.A., Frølund B., Liljefors T., Krogsgaard-Larsen P. Neuronal Nicotinic Acetylcholine Receptors: Structural Revelations, Target Identifications, and Therapeutic Inspirations // *J. Med. Chem.* – 2005. – V. 48. – № 15. – P. 4705–4745.
247. Jiang L.-H., Caseley E.A., Muench S.P., Roger S. Structural basis for the functional properties of the P2X7 receptor for extracellular ATP // *Purinergic Signal.* – 2021. – V. 17. – № 3. – P. 331–344.
248. Jiang R., Taly A., Grutter T. Moving through the gate in ATP-activated P2X receptors // *Trends Biochem. Sci.* – 2013. – V. 38. – № 1. – P. 20–29.
249. Jiang X., Lautermilch N.J., Watari H., Westenbroek R.E., Scheuer T., Catterall W.A. Modulation of CaV2.1 channels by Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II bound to the C-terminal domain // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2008. – V. 105. – № 1. – P. 341–346.
250. Jochenning F.W., Theis A.-K., Pannasch U., Rückl M., Rüdiger S., Schmitz D. Ryanodine Receptor Activation Induces Long-Term Plasticity of Spine Calcium Dynamics // *PLoS Biol.* – 2015. – V. 13. – № 6. – P. 1–29.
251. Jones I.W., Wonnacott S. Precise Localization of α7 Nicotinic Acetylcholine Receptors on Glutamatergic Axon Terminals in the Rat Ventral Tegmental Area // *J. Neurosci.* – 2004. – V. 24. – № 50. – P. 11244–11252.
252. Jones P.P., Guo W., Chen S.R.W. Control of cardiac ryanodine receptor by sarcoplasmic reticulum luminal Ca<sup>2+</sup> // *J. Gen. Physiol.* – 2017. – V. 149. – № 9. – P. 867–875.

253. Jun K., Piedras-Rentería E.S., Smith S.M., Wheeler D.B., Lee S.B., Lee T.G., Chin H., Adams M.E., Scheller R.H., Tsien R.W., Shin H.S. Ablation of P/Q-type Ca<sup>2+</sup> channel currents, altered synaptic transmission, and progressive ataxia in mice lacking the  $\alpha(1A)$ -subunit // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1999. – V. 96. – № 26. – P. 15245–15250.
254. Jurado S., Biou V., Malenka R.C. A calcineurin/AKAP complex is required for NMDA receptor-dependent long-term depression // *Nat. Neurosci.* – 2010. – V. 13. – № 9. – P. 1053–1055.
255. Juranek J., Mukherjee K., Rickmann M., Martens H., Calka J., Südhof T.C., Jahn R. Differential expression of active zone proteins in neuromuscular junctions suggests functional diversification // *Eur. J. Neurosci.* – 2006. – V. 24. – № 11. – P. 3043–3052.
256. Kabbani N., Nichols R.A. Beyond the Channel: Metabotropic Signaling by Nicotinic Receptors // *Trends Pharmacol. Sci.* – 2018. – V. 39. – № 4. – P. 354–366.
257. Kabbani N., Nordman J.C., Corgiat B.A., Veltri D.P., Shehu A., Seymour V. A., Adams D.J. Are nicotinic acetylcholine receptors coupled to G proteins? // *Bioessays.* – 2013. – V. 35. – P. 1025–1034.
258. Kaeser P.S., Deng L., Wang Y., Dulubova I., Liu X., Rizo J., Südhof T.C. RIM proteins tether Ca<sup>2+</sup> channels to presynaptic active zones via a direct PDZ-domain interaction // *Cell.* – 2011. – V. 144. – № 2. – P. 282–295.
259. Kaeser P.S., Regehr W.G. Molecular Mechanisms for Synchronous, Asynchronous, and Spontaneous Neurotransmitter Release // *Annu. Rev. Physiol.* – 2014. – V. 76. – № 1. – P. 333–363.
260. Kaeser P.S., Regehr W.G. The readily releasable pool of synaptic vesicles // *Curr. Opin. Neurobiol.* – 2017. – V. 43. – P. 63–70.
261. Kaja S., Van de Ven R.C.G., Ferrari M.D., Frants R.R., Van den Maagdenberg A.M.J.M., Plomp J.J. Compensatory Contribution of Ca<sup>v</sup> 2.3 Channels to Acetylcholine Release at the Neuromuscular Junction of Tottering Mice // *J. Neurophysiol.* – 2006. – V. 95. – № 4. – P. 2698–2704.



262. Kalamida D., Poulas K., Avramopoulou V., Fostieri E., Lagoumintzis G., Lazaridis K., Sideri A., Zouridakis M., Tzartos S.J. Muscle and neuronal nicotinic acetylcholine receptors // *The FEBS Journal*. – 2007. – V. 274. – № 15. – P. 3799–3845.
263. Kalappa B.I., Feng L., Kem W. R., Gusev A.G., Uteshev V.V. Mechanisms of facilitation of synaptic glutamate release by nicotinic agonists in the nucleus of the solitary tract // *Am. J. Cell Physiol.* – 2011. – V. 301. – № 2. – P. C347–C361.
264. Katti S. S., Krieger I.V., Ann J., Lee J., Sacchettini J.C., Igumenova T.I. Structural anatomy of Protein Kinase C C1 domain interactions with diacylglycerol and other agonists // *Nat. Commun.* – 2022. – V. 13. – № 1. – P. 1–11.
265. Katz B., Miledi R. The Effect Of Calcium On Acetylcholine Release From Motor Nerve Terminals // *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* – 1965. – V. 161. – P. 496–503.
266. Katz B., Miledi R. The role of calcium in neuromuscular facilitation // *J. Physiol.* – 1968. – V. 195. – № 2. – P. 481–492.
267. Katz B., Miledi R. The timing of calcium action during neuromuscular transmission // *J. Physiol.* – 1967. – V. 189. – № 3. – P. 535–544.
268. Katz E., Ferro P.A., Weisz G., Uchitel O.D. Calcium channels involved in synaptic transmission at the mature and regenerating mouse neuromuscular junction // *J. Physiol.* – 1996. – V. 497. – № 3. – P. 687–697.
269. Katz E., Protti D.A., Ferro P.A., Rosato Siri M.D., Uchitel O.D. Effects of Ca<sup>2+</sup> channel blocker neurotoxins on transmitter release and presynaptic currents at the mouse neuromuscular junction. // *Br. J. Pharmacol.* – 1997. – V. 121. – № 8. – P. 1531–40.
270. Kawabe J.I., Iwami G., Ebina T., Ohno S., Katada T., Ueda Y., Homey C.J., Ishikawa Y. Differential activation of adenylyl cyclase by protein kinase C isoenzymes // *J. Biol. Chem.* – 1994. – V. 269. – № 24. – P. 16554–16558.

271. Kawate T. P2X Receptor Activation // *Adv. Exp. Med. Biol.* – 2017. – V. 1051. – P. 55–69.
272. Khadra A., Tomić M., Yan Z., Zemkova H., Sherman A., Stojilkovic S.S. Dual Gating Mechanism and Function of P2X7 Receptor Channels // *Biophys. J.* – 2013. – V. 104. – № 12. – P. 2612–2621.
273. Khaziev E., Bukharaeva E., Nikolsky E., Samigullin D. Contribution of Ryanodine Receptors in Forming Presynaptic Ca<sup>2+</sup> Level and Cholinergic Modulation in Response to Single Potential in Frog Neuromuscular Junction // *BioNanoScience.* – V. 7. – № 1. – P. 106–108.
274. Khuzakhmetova V., Samigullin D., Nurullin L., Vyskočil F., Nikolsky E., Bukharaeva E. Kinetics of neurotransmitter release in neuromuscular synapses of newborn and adult rats // *Int. J. Dev. Neurosci.* – 2014. – V. 34. – № 1. – P. 9–18.
275. Khuzakhmetova V.F., Samigullin D. V., Bukharaeva E. A. The role of presynaptic ryanodine receptors in regulation of the kinetics of the acetylcholine quantal release in the mouse neuromuscular junction // *Biochem. Moscow Suppl. Ser. A.* – 2014. – V. 8. – № 1. – P. 144–152.
276. Kim H.H., Lee K.H., Lee D., Han Y.E., Lee S.H., Sohn J.W., Ho W.K. Costimulation of AMPA and metabotropic glutamate receptors underlies phospholipase C activation by glutamate in hippocampus // *J. Neurosci.* – 2015. – V. 35. – № 16. – P. 6401–6412.
277. Kim K., Saneyoshi T., Hosokawa T., Okamoto K., Hayashi Y. Interplay of enzymatic and structural functions of CaMKII in long-term potentiation // *J. Neurochem.* – 2016. – V. 139. – № 6. – P. 959–972.
278. Kim Y., Lee U., Choi C., Chang S. Release Mode Dynamically Regulates the RRP Refilling Mechanism at Individual Hippocampal Synapses // *J. Neurosci.* – 2020. – V. 40. – № 44. – P. 8426–8437.
279. King J.R., Nordman J.C., Bridges S.P., Lin M.K., Kabbani N. Identification and Characterization of a G Protein-binding Cluster in  $\alpha 7$  Nicotinic

- Acetylcholine Receptors // *J. Biol. Chem.* – 2015. – V. 290. – № 33. – P. 20060–20070.
280. Kiyonaka S., Wakamori M., Miki T., Uriu Y., Nonaka M., Bito H., Beedle A.M., Mori E., Hara Y., De Waard M., Kanagawa M., Itakura M., Takahashi M., Campbell K.P., Mori Y. RIM1 confers sustained activity and neurotransmitter vesicle anchoring to presynaptic Ca<sup>2+</sup> channels // *Nat. Neurosci.* – 2007. – V. 10. – № 6. – P. 691–701.
281. Ko C.P., Robitaille R. Perisynaptic Schwann Cells at the Neuromuscular Synapse: Adaptable, Multitasking Glial Cells // *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* – 2015. – V. 7. – № 10. – P. a020503.
282. Kohda K., Inoue T., Mikoshiba K. Ca<sup>2+</sup> release from Ca<sup>2+</sup> stores, particularly from ryanodine-sensitive Ca<sup>2+</sup> stores, is required for the induction of LTD in cultured cerebellar Purkinje cells // *J. Neurophysiol.* – 1995. – V. 74. – № 5. – P. 2184–2188.
283. Kolarow R., Brigadski T., Lessmann V. Postsynaptic Secretion of BDNF and NT-3 from Hippocampal Neurons Depends on Calcium–Calmodulin Kinase II Signaling and Proceeds via Delayed Fusion Pore Opening // *J. Neurosci.* – 2007. – V. 27. – № 39. – P. 10350–10364.
284. Köles L., Leichsenring A., Rubini P., Illes P. P2 Receptor Signaling in Neurons and Glial Cells of the Central Nervous System // *Advances in Pharmacology.* – 2011. – V. 61. – P. 441–493.
285. Kong H., Jones P.P., Koop A., Zhang L., Duff H.J., Chen S.R.W. Caffeine induces Ca<sup>2+</sup> release by reducing the threshold for luminal Ca<sup>2+</sup> activation of the ryanodine receptor // *Biochem. J.* – 2008. – V. 414. – № 3. – P. 441–452.
286. Kopp R., Krautloher A., Ramírez-Fernández A., Nicke A. P2X7 Interactions and Signaling – Making Head or Tail of It // *Front. Mol. Neurosci.* – 2019. – V. 12. – P. 183.
287. Korogod N., Lou X., Schneggenburger R. Posttetanic potentiation critically depends on an enhanced Ca<sup>2+</sup> sensitivity of vesicle fusion mediated by

- presynaptic PKC // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2007. – V. 104. – № 40. – P. 15923–15928.
288. Koschak A. Impact of gating modulation in CaV1.3 L-type calcium channels // *Channels.* – 2010. – V. 4. – № 6. – P. 523-525.
289. Koukouli F., Maskos U. The multiple roles of the  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptor in modulating glutamatergic systems in the normal and diseased nervous system // *Biochem. Pharmacol.* – 2015. – V. 97. – № 4. – P. 378–387.
290. Kubota M., Narita K., Murayama T., Suzuki S., Soga S., Usukura J., Ogawa Y., Kuba K. Type-3 ryanodine receptor involved in Ca<sup>2+</sup>-induced Ca<sup>2+</sup> release and transmitter exocytosis at frog motor nerve terminals // *Cell Calcium.* – 2005. – V. 38. – № 6. – P. 557–567.
291. Kushnir A., Wajsberg B., Marks A.R. Ryanodine receptor dysfunction in human disorders // *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell. Res.* – 2018. – V. 1865. – № 11 Pt. B. – P. 1687–1697.
292. Kuzmenkina E., Novikova E., Jangsangthong W., Matthes J., Herzig S. Single-Channel Resolution of the Interaction between C-Terminal Ca V 1.3 Isoforms and Calmodulin // *Biophys. J.* – 2019. – V. 116. – № 5. – P. 836–846.
293. Lacinová L. Voltage-dependent calcium channels // *Gen. Physiol. Biophys.* – 2005. – V. 24. – № Suppl. 1. – P. 1–78.
294. Lacinová L., Moosmang S., Langwieser N., Hofmann F., Kleppisch T. Cav1.2 calcium channels modulate the spiking pattern of hippocampal pyramidal cells // *Life Sci.* – 2008. – V. 82. – № 1–2. – P. 41–49.
295. Laghaei R., Ma J., Tarr T.B., Homan A.E., Kelly L., Tilvawala M.S., Vuocolo B.S., Rajasekaran H.P., Meriney S.D., Dittrich M. Transmitter release site organization can predict synaptic function at the neuromuscular junction // *J. Neurophysiol.* – 2018. – V. 119. – № 4. – P. 1340–1355.
296. Laghaei R., Meriney S.D. Microphysiological Modeling of the Structure and Function of Neuromuscular Transmitter Release Sites // *Front. Synaptic Neurosci.* – 2022. – V. 14. – P. 34.

297. Lanuza M.A., Santafe M.M., Garcia N., Besalduch N., Tomàs M., Obis T., Priego M., Nelson P.G., Tomàs J. Protein kinase C isoforms at the neuromuscular junction: Localization and specific roles in neurotransmission and development // *J. Anat.* – 2014. – V. 224. – № 1. – P. 61–73.
298. Latorre R., Castillo K., Carrasquel-Ursulaez W., Sepulveda R.V., Gonzalez-Nilo F., Gonzalez C., Alvarez O. Molecular determinants of BK channel functional diversity and functioning // *Physiol. Rev.* – 2017. – V. 97. – № 1. – P. 39–87.
299. Laver D.R. Regulation of the RyR channel gating by Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup> // *Biophys. Rev.* – 2018. – V. 10. – № 4. – P. 1087–1095.
300. Lee A., Wong S.T., Gallagher D., Li B., Storm D.R., Scheuer T., Catterall W.A. Ca<sup>2+</sup>/calmodulin binds to and modulates P/Q-type calcium channels // *Nature.* – 1999. – V. 399. – № 6732. – P. 155–159.
301. Lee M., Jantaratnotai N., McGeer E., McLarnon J.G., McGeer P.L. Mg<sup>2+</sup> ions reduce microglial and THP-1 cell neurotoxicity by inhibiting Ca<sup>2+</sup> entry through purinergic channels // *Brain Res.* – 2011. – V. 1369. – P. 21–35.
302. Leitch B., Szostek A., Lin R., Shevtsova O. Subcellular distribution of L-type calcium channel subtypes in rat hippocampal neurons // *Neuroscience.* – 2009. – V. 164. – № 2. – P. 641–657.
303. Lemos J.R., Custer E.E., Ortiz-Miranda S. Purinergic receptor types in the hypothalamic-neurohypophysial system // *J. Neuroendocrinol.* – 2018. – V. 30. № 8. – P. e12588.
304. Lendvai B., Kassai F., Szájlíagota, Némethy Z.  $\alpha 7$  Nicotinic acetylcholine receptors and their role in cognition // *Brain Res. Bull.* – 2013. – V. 93. – P. 86–96.
305. León D., Hervás C., Miras-Portugal M.T. P2Y 1 and P2X 7 receptors induce calcium/calmodulin-dependent protein kinase II phosphorylation in cerebellar granule neurons // *Eur. J. Neurosci.* – 2006. – V. 23. – № 11. – P. 2999–3013.
306. León D., Sánchez-Nogueiro J., Marín-García P., Miras-Portugal M.T. Glutamate release and synapsin-I phosphorylation induced by P2X7 receptors

- activation in cerebellar granule neurons // *Neurochem. Int.* – 2008. – V. 52. – № 6. – P. 1148–1159.
307. Letsinger A.C., Gu Z., Yakel J.L.  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptors in the hippocampal circuit: taming complexity // *Trends Neurosci.* – 2022. – V. 45. – № 2. – P. 145–157.
308. Li H., Rao A., Hogan P. G. Interaction of calcineurin with substrates and targeting proteins // *Trends Cell Biol.* – 2011. – V. 21. – № 2. – P. 91–103.
309. Li L., Li D.P., Chen S.R., Chen J., Hu H., Pan H.L. Potentiation of high voltage-activated calcium channels by 4-Aminopyridine depends on subunit composition // *Mol. Pharmacol.* – 2014. – V. 86. – № 6. – P. 760–772.
310. Liang X., Samways D.S.K., Wolf K., Bowles E.A., Richards J.P., Bruno J., Dutertre S., DiPaolo R.J., Egan T.M. Quantifying  $\text{Ca}^{2+}$  Current and Permeability in ATP-gated P2X7 Receptors // *J. Biol. Chem.* – 2015. – V. 290. – № 12. – P. 7930–7942.
311. Lieb A., Ortner N., Striessnig J. C-terminal modulatory domain controls coupling of voltage-sensing to pore opening in Cav1.3 L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels // *Biophys. J.* – 2014. – V. 106. – № 7. – P. 1467–1475.
312. Lim R., Oleskevich S., Few A.P., Leao R.N., Walmsley B. Glycinergic mIPSCs in mouse and rat brainstem auditory nuclei: modulation by ruthenium red and the role of calcium stores // *J. Physiol.* – 2003. – V. 546. – № 3. – P. 691–699.
313. Lin K.H., Taschenberger H., Neher E. A sequential two-step priming scheme reproduces diversity in synaptic strength and short-term plasticity // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2022. – V. 119. – № 34. – P. e2207987119.
314. Lipp P., Reither G. Protein kinase C: The “Masters” of calcium and lipid // *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* – 2011. – V. 3. – № 7. – P. 1–17.
315. Lipscombe D., Andrade A., Allen S.E. Alternative splicing: Functional diversity among voltage-gated calcium channels and behavioral consequences // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2013. – V. 1828. – № 7. – P. 1522–1529.
316. Lipscombe D., Helton T. D., Xu W. L-type calcium channels: The low down // *J. Neurophysiol.* – 2004. – V. 92. – № 5. – P. 2633–2641.

317. Lipstein N., Chang S., Lin K.H., López-Murcia F.J., Neher E., Taschenberger H., Brose N. Munc13-1 is a Ca<sup>2+</sup>-phospholipid-dependent vesicle priming hub that shapes synaptic short-term plasticity and enables sustained neurotransmission // *Neuron*. – 2021. – V. 109. – № 24. – P. 3980-4000.e7.
318. Lipstein N., Göth M., Piotrowski C., Pagel K., Sinz A., Jahn O. Presynaptic Calmodulin targets: lessons from structural proteomics // *Expert Rev. Proteomics*. – 2017. – V. 14. – № 3. – P. 223–242.
319. Lisman J., Yasuda R., Raghavachari S. Mechanisms of CaMKII action in long-term potentiation // *Nat. Rev. Neurosci.* – 2012. – V. 13. – № 3. – P. 169–182.
320. Liu N., Yang Y., Ge L., Liu M., Colecraft H.M., Liu X. Cooperative and acute inhibition by multiple C-terminal motifs of L-type Ca<sup>2+</sup> channels // *eLife*. – 2017. – V. 6. – P. e21989.
321. Liu Q., Chen B., Yankova M., Morest D.K., Maryon E., Hand A.R., Nonet M. L., Wang Z.-W. Presynaptic Ryanodine Receptors Are Required for Normal Quantal Size at the *Caenorhabditis elegans* Neuromuscular Junction // *J. Neurosci.* – 2005. – V. 25. – № 29. – P. 6745.
322. Llano I., González J., Caputo C., Lai F.A., Blayney L. M., Tan Y.P., Marty A. Presynaptic calcium stores underlie large-amplitude miniature IPSCs and spontaneous calcium transients // *Nat. Neurosci.* – 2000. – V. 3. – № 12. – P. 1256–1265.
323. Llinas R., Sugimori M., Lin J.W., Cherksey B. Blocking and isolation of a calcium channel from neurons in mammals and cephalopods utilizing a toxin fraction (FTX) from funnel-web spider poison // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 1989. – V. 86. – № 5. – P. 1689–1693.
324. Llinás R., Sugimori M., Silver R.B. Microdomains of high calcium concentration in a presynaptic terminal // *Science*. – 1992. – V. 256. – № 5057. – P. 677–679.
325. Lockman P.R., Allen D.D. The Transport of Choline // *Drug Dev. Ind. Pharm.* – 2002. – V. 28. – № 7. – P. 749–771.

326. Locovei S., Scemes E., Qiu F., Spray D.C., Dahl G. Pannexin1 is part of the pore forming unit of the P2X7 receptor death complex // *FEBS Letters*. – 2007. – V. 581. – № 3. – P. 483–488.
327. Losavio A., Muchnik S. Spontaneous acetylcholine release in mammalian neuromuscular junctions // *Am. J. Physiol.* – 1997. – V. 273. – № 6 – P. C1835–C1841.
328. Lu F., Pu W.T. The architecture and function of cardiac dyads // *Biophys. Rev.* – 2020. – V. 12. – № 4. – P. 1007–1017.
329. Luo F., Dittrich M., Cho S., Stiles J.R., Meriney S.D. Transmitter release is evoked with low probability predominately by calcium flux through single channel openings at the frog neuromuscular junction // *J. Neurophysiol.* – 2015. – V. 113. – № 7. – P. 2480–2489.
330. Luo F., Dittrich M., Stiles J.R., Meriney S.D. Single-pixel optical fluctuation analysis of calcium channel function in active zones of motor nerve terminals // *J. Neurosci.* – 2011. – V. 31. – № 31. – P. 11268–11281.
331. Ma H., Cohen S., Li B., Tsien R.W. Exploring the dominant role of Cav1 channels in signalling to the nucleus // *Biosci. Rep.* – 2013. – V. 33. – № 1. – P. 97–101.
332. Mackrill J.J. Ryanodine receptor calcium channels and their partners as drug targets // *Biochem. Pharmacol.* – 2010. – V. 79. – № 11. – P. 1535–1543.
333. Magueresse C. Le, Cherubini E. Presynaptic calcium stores contribute to nicotine-elicited potentiation of evoked synaptic transmission at CA3-CA1 connections in the neonatal rat hippocampus // *Hippocampus*. – 2007. – V. 17. – № 4. – P. 316–325.
334. Magupalli V.G., Mochida S., Yan J., Jiang X., Westenbroek R.E., Nairn A.C., Scheuer T., Catterall W.A. Ca<sup>2+</sup>-independent activation of Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin-dependent protein kinase II bound to the C-terminal domain of CaV2.1 calcium channels // *J. Biol. Chem.* – 2013. – V. 288. – № 7. – P. 4637–4648.
335. Marcoli M., Cervetto C., Paluzzi P., Guarnieri S., Alloisio S., Thellung S., Nobile M., Maura G. P2X7 pre-synaptic receptors in adult rat cerebrocortical



- nerve terminals: a role in ATP-induced glutamate release // *J. Neurochem.* – 2008. – V. 105. – № 6. – P. 2330–2342.
336. Marín-García P., Sánchez-Nogueiro J., Gómez-Villafuertes R., León D., Miras-Portugal M.T. Synaptic terminals from mice midbrain exhibit functional P2X7 receptor. // *Neuroscience.* – 2008. – V. 151. – № 2. – P. 361–73.
337. Martín E. D., Buño W. Caffeine-mediated presynaptic long-term potentiation in hippocampal CA1 pyramidal neurons // *J. Neurophysiol.* – 2003. – V. 89. – № 6. – P. 3029–3038.
338. Martínez-Cuesta M.Á., Blanch-Ruiz M.A., Ortega-Luna R., Sánchez-López A., Álvarez Á. Structural and Functional Basis for Understanding the Biological Significance of P2X7 Receptor // *Int. J. Mol. Sci.* – 2020. – V. 21. – № 22. – P. 8454.
339. Marx S.O., Reiken S., Hisamatsu Y., Jayaraman T., Burkhoff D., Rosemblyt N., Marks A.R. PKA phosphorylation dissociates FKBP12.6 from the calcium release channel (ryanodine receptor): Defective regulation in failing hearts // *Cell.* – 2000. – V. 101. – № 4. – P. 365–376.
340. Matteoli M., Haimann C., Torri-Tarelli F., Polak J.M., Ceccarelli B., De Camilli P. Differential effect of alpha-latrotoxin on exocytosis from small synaptic vesicles and from large dense-core vesicles containing calcitonin gene-related peptide at the frog neuromuscular junction. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1988. – V. 85. – № 19. – P. 7366–70.
341. McLachlan E.M., Martin A.R. Non-linear summation of end-plate potentials in the frog and mouse. // *J. Physiol.* – 1981. – V. 311. – № 1. – P. 307–324.
342. Meissner G. The structural basis of ryanodine receptor ion channel function // *J. Gen. Physiol.* – 2017. – V. 149. – № 12. – P. 1065–1089.
343. Melom J.E., Akbergenova Y., Gavornik J.P., Littleton J.T. Spontaneous and evoked release are independently regulated at individual active zones // *J. Neurosci.* – 2013. – V. 33. – № 44. – P. 17253–17263.

344. Meriney S.D., Dittrich M. Organization and function of transmitter release sites at the neuromuscular junction // *J. Physiol.* – 2013. – V. 591. – № 13. – P. 3159–3165.
345. Meriney S.D., Lacomis D. Reported direct aminopyridine effects on voltage-gated calcium channels is a high-dose pharmacological off-target effect of no clinical relevance // *J. Biol. Chem.* – 2018. – V. 293. – № 41. – P. 16100.
346. Meriney S.D., Tarr T.B., Ojala K.S., Wu M., Li Y., Lacomis D., Garcia-Ocaña A., Liang M., Valdomir G., Wipf P. Lambert–Eaton myasthenic syndrome: mouse passive-transfer model illuminates disease pathology and facilitates testing therapeutic leads // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* – 2018. – V. 1412. – № 1. – P. 73–81.
347. Mermelstein P.G., Bito H., Deisseroth K., Tsien R.W. Critical dependence of cAMP response element-binding protein phosphorylation on L-type calcium channels supports a selective response to EPSPs in preference to action potentials // *J. Neurosci.* – 2000. – V. 20. – № 1. – P. 266–273.
348. Metzger M.W., Walser S.M., Aprile-Garcia F., Dedic N., Chen A., Holsboer F., Arzt E., Wurst W., Deussing J.M. Genetically dissecting P2rx7 expression within the central nervous system using conditional humanized mice // *Purinergic Signal.* – 2017. – V. 13. – № 2. – P. 153–170.
349. Mielke J.G., Ahuja T.K., Comas T., Mealing G. A.R. Choline-mediated depression of hippocampal synaptic transmission // *Nutr. Neurosci.* – 2011. – V. 14. – № 5. – P. 186–194.
350. Millar N.S., Gotti C. Diversity of vertebrate nicotinic acetylcholine receptors // *Neuropharmacology.* – 2009. – V. 56. – № 1. – P. 237–246.
351. Miras-Portugal M.T., Ortega F., Gómez-Villafuertes R., Gualix J., Pérez-Sen R., Delicado E.G. P2X7 receptors in the central nervous system // *Biochem. Pharmacol.* – 2021. – V. 187. – P. 114472.
352. Miras-Portugal M.T., Sebastián-Serrano Á., de Diego García L., Díaz-Hernández M. Neuronal P2X7 Receptor: Involvement in Neuronal Physiology and Pathology // *J. Neurosci.* – 2017. – V. 37. – № 30. – P. 7063–7072.

353. Mirza F.J., Zahid S. The Role of Synapsins in Neurological Disorders // *Neurosci. Bull.* – 2018. – V. 34. – № 2. – P. 349–358.
354. Miteva A.S., Gaydukov A.E., Shestopalov V.I., Balezina O.P. The role of pannexin 1 in the purinergic regulation of synaptic transmission in mouse motor synapses // *Biochem. Moscow Suppl. Ser. A.* – 2017. – V. 11. – № 4. – P. 311–320.
355. Mizukami K., Yokoshiki H., Mitsuyama H., Watanabe M., Tenma T., Takada S., Tsutsui H. Small-conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> current is upregulated via the phosphorylation of CaMKII in cardiac hypertrophy from spontaneously hypertensive rats // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiology.* – 2015. – V. 309. – № 6. – P. H1066–H1074.
356. Mochida S. Millisecond Ca<sup>2+</sup> dynamics activate multiple protein cascades for synaptic vesicle control // *Proc. Jpn Acad. Ser. B Phys. Biol. Sci.* – 2017. – V. 93. – № 10. – P. 802–820.
357. Mochida S. Presynaptic calcium channels // *Int. J. Mol. Sci.* – 2019. – V. 20. – № 9 – P. 2217.
358. Mochida S. Presynaptic calcium channels // *Neurosci. Res.* – 2018. – V. 127. – P. 33–44.
359. Mochida S., Few A.P., Scheuer T., Catterall W.A. Regulation of Presynaptic CaV2.1 Channels by Ca<sup>2+</sup> Sensor Proteins Mediates Short-Term Synaptic Plasticity // *Neuron.* – 2008. – V. 57. – № 2. – P. 210–216.
360. Molina-Campos E., Xu Y., Atchison W.D. Age-Dependent Contribution of P/Q- and R-Type Ca<sup>2+</sup> Channels to Neuromuscular Transmission in Lethargic Mice // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* – 2015. – V. 352. – № 2. – P. 395–404.
361. Moores T.S., Hasdemir B., Vega-Riveroll L., Deuchars J., Parson S.H. Properties of presynaptic P2X7-like receptors at the neuromuscular junction // *Brain Res.* – 2005. – V. 1034. – № 1–2. – P. 40–50.
362. Moosmang S., Haider N., Klugbauer N., Adelsberger H., Langwieser N., Müller J., Stuess M., Marais E., Schulla V., Lacinová L., Goebbels S., Nave K. A., Storm D.R., Hofmann F., Kleppisch T. Role of hippocampal Cav1.2 Ca<sup>2+</sup>

- channels in NMDA receptor-independent synaptic plasticity and spatial memory // *J. Neurosci.* – 2005. – V. 25. – № 43. – P. 9883–9892.
363. Moreno C.M., Dixon R.E., Tajada S., Yuan C., Opitz-Araya X., Binder M.D., Santana L.F. Ca<sup>2+</sup> entry into neurons is facilitated by cooperative gating of clustered Cav1.3 channels // *eLife.* – 2016. – V. 5. – P. e15744.
364. Mukhamedyarov M.A., Grishin S.N., Zefirov A.L., Palotás A. The mechanisms of multi-component paired-pulse facilitation of neurotransmitter release at the frog neuromuscular junction // *Pflügers Arch.* – 2009. – V. 458. – № 3. – P. 563–570.
365. Mukhamedyarov M.A., Kochunova J.O., Yusupova E.R., Haidarov B.A., Zefirov A.L., Palotás A. The contribution of calcium/calmodulin-dependent protein-kinase II (CaMKII) to short-term plasticity at the neuromuscular junction // *Brain Res. Bull.* – 2010. – V. 81. – № 6. – P. 613–616.
366. Müller C.S., Haupt A., Bildl W., Schindler J., Knaus H.G., Meissner M., Rammner B., Striessnig J., Flockerzi V., Fakler B., Schulte U. Quantitative proteomics of the Cav2 channel nanoenvironments in the mammalian brain // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2010. – V. 107. – № 34. – P. 14950–14957.
367. Murphy J. G., Crosby K. C., Dittmer P. J., Sather W. A., Dell'Acqua M. L. AKAP79/150 recruits the transcription factor NFAT to regulate signaling to the nucleus by neuronal L-type Ca<sup>2+</sup> channels // *Mol. Biol. Cell.* – 2019. – V. 30. – № 14. – P. 1743–1756.
368. Murphy J.G., Sanderson J. L., Gorski J. A., Scott J. D., Catterall W. A., Sather W. A., Dell'Acqua M. L. AKAP-anchored PKA maintains neuronal L-type calcium channel activity and NFAT transcriptional signaling // *Cell Rep.* – 2014. – V. 7. – № 5. – P. 1577–1588.
369. Nadal L., Garcia N., Hurtado E., Simó A., Tomàs M., Lanuza M.A., Santafé M., Tomàs J. Presynaptic muscarinic acetylcholine autoreceptors (M1, M2 and M4 subtypes), adenosine receptors (A1 and A2A) and tropomyosin-related kinase B receptor (TrkB) modulate the developmental synapse elimination

- process at the neuromuscular junction // *Mol. Brain.* – 2016. – V. 9. – № 1 – P.67.
370. Nagano O., Földes F.F., Nakatsuka H., Reich D., Ohta Y., Sperlagh B., Vizi E.S. Presynaptic A1-purinoceptor-mediated inhibitory effects of adenosine and its stable analogues on the mouse hemidiaphragm preparation // *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* – 1992. – V. 346. – № 2. – P. 197–202.
371. Nagasaki K., Fleischer S. Ryanodine sensitivity of the calcium release channel of sarcoplasmic reticulum // *Cell Calcium.* – 1988. – V. 9. – № 1. – P. 1–7.
372. Nagwaney S., Harlow M.L., Jung J.H., Szule J.A., Ress D., Xu J., Marshall R.M., McMahan U.J. Macromolecular connections of active zone material to docked synaptic vesicles and presynaptic membrane at neuromuscular junctions of mouse // *J. Comp. Neurol.* – 2009. – V. 513. – № 5. – P. 457–468.
373. Nakamura Y., Reva M., DiGregorio D.A. Variations in Ca<sup>2+</sup>influx can alter chelator-based estimates of Ca<sup>2+</sup>channel–synaptic vesicle coupling distance // *J. Neurosci.* – 2018. – V. 38. – № 16. – P. 3971–3987.
374. Nakashima Y., Nishimura S., Maeda A., Barsoumian E.L., Hakamata Y., Nakai J., Allen P.D., Imoto K., Kita T. Molecular cloning and characterization of a human brain ryanodine receptor // *FEBS Letters.* – 1997. – V. 417. – № 1. – P. 157–162.
375. Nanou E., Yan J., Whitehead N.P., Kim M.J., Froehner S.C., Scheuer T., Catterall W.A. Altered short-term synaptic plasticity and reduced muscle strength in mice with impaired regulation of presynaptic CaV2.1 Ca<sup>2+</sup> channels // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2016. – V. 113. – № 4. – P. 1068–1073.
376. Narita K., Akita T., Hachisuka J., Huang S.-M., Ochi K., Kuba K. Functional Coupling of Ca<sup>2+</sup> Channels to Ryanodine Receptors at Presynaptic Terminals: Amplification of Exocytosis and Plasticity // *J. Gen. Physiol.* – 2000. – V. 115. – № 4. – P. 519–532.
377. Narita K., Akita T., Osanai M., Shirasaki T., Kijima H., Kuba K. A Ca<sup>2+</sup>-induced Ca<sup>2+</sup> Release Mechanism Involved in Asynchronous Exocytosis at

- Frog Motor Nerve Terminals // *J. Gen. Physiol.* – 1998. – V. 112. – № 5. – P. 593–609.
378. Nascimento F., Sebastião A.M., Ribeiro J.A. Presymptomatic and symptomatic ALS SOD1(G93A) mice differ in adenosine A1 and A2A receptor-mediated tonic modulation of neuromuscular transmission // *Purinergic Signal.* – 2015. – V. 11. – № 4. – P. 471–480.
379. Natarajan K., Mukhtasimova N., Corradi J., Lasala M., Bouzat C., Sine S.M. Mechanism of calcium potentiation of the  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptor // *J. Gen. Physiol.* – 2020. – V. 152. – № 9.
380. Neher E. What is rate-limiting during sustained synaptic activity: vesicle supply or the availability of release sites // *Front. Synaptic Neurosci.* – 2010. – V. 2. – P. 144.
381. Neher E., Sakaba T. Multiple Roles of Calcium Ions in the Regulation of Neurotransmitter Release // *Neuron.* – 2008. – V. 59. – № 6. – P. 861–872.
382. Nelson M., Todorovic S., Perez-Reyes E. The Role of T-Type Calcium Channels in Epilepsy and Pain // *Curr. Pharm. Des.* – 2006. – V. 12. – № 18. – P. 2189–2197.
383. Newman Z.L., Hoagland A., Aghi K., Worden K., Levy S.L., Son J.H., Lee L.P., Isacoff E.Y. Input-Specific Plasticity and Homeostasis at the *Drosophila* Larval Neuromuscular Junction // *Neuron.* – 2017. – V. 93. – № 6. – P. 1388-1404.e10.
384. Ng A.N., Doherty A.J., Lombroso P.J., Emptage N.J., Collingridge G.L. Rapid regulation of endoplasmic reticulum dynamics in dendritic spines by NMDA receptor activation // *Mol. Brain.* – 2014. – V. 7. – № 1. – P. 60.
385. Ng A.N., Toresson H. Endoplasmic reticulum dynamics in hippocampal dendritic spines induced by agonists of type I metabotropic glutamate but not by muscarinic acetylcholine receptors // *Synapse.* – 2011. – V. 65. – № 4. – P. 351–355.

386. Ng F., Lee D.C., Schrupf L.A., Mazurek M.E., Lee Lo V., Gill S.K., Maselli R.A. Effect of 3,4-diaminopyridine at the murine neuromuscular junction // *Muscle Nerve*. – 2017. – V. 55. – № 2. – P. 223–231.
387. Nishimune H. Molecular mechanism of active zone organization at vertebrate neuromuscular junctions // *Mol. Neurobiol.* – 2012. – V. 45. – № 1. – P. 1–16.
388. Nishimura M., Tsubaki K., Yagasaki O., Ito K. Ryanodine facilitates calcium-dependent release of transmitter at mouse neuromuscular junctions. // *Br. J. Pharmacol.* – 1990. – V. 100. – № 1. – P. 114.
389. Nojima H., Kimura I., Muroi M., Kimura M. Different modes of blockade by p-phenylene-polymethylene bis-ammonium compounds of the nicotinic acetylcholine receptor channel in skeletal muscle cells of mice // *J. Pharm. Pharmacol.* – 1993. – V. 45. – № 4. – P. 309–314.
390. Nordman J. C., Kabbani N. An interaction between  $\alpha 7$  nicotinic receptors and a G-protein pathway complex regulates neurite growth in neural cells // *J. Cell Sci.* – 2012. – V. 125. – P. 5502–5513.
391. Noronha-Matos J.B., Morais T., Trigo D., Timóteo M.A., Magalhães-Cardoso M.T., Oliveira L., Correia-De-Sá P. Tetanic failure due to decreased endogenous adenosine A2A tonus operating neuronal Cav1 (L-type) influx in Myasthenia gravis // *J. Neurochem.* – 2011. – V. 117. – № 5. – P. 797–811.
392. Noronha-Matos J.B., Oliveira L., Peixoto A.R., Almeida L., Castellão-Santana L.M., Ambiel C.R., Alves-do Prado W., Correia-de-Sá P. Nicotinic  $\alpha 7$  receptor-induced adenosine release from perisynaptic Schwann cells controls acetylcholine spillover from motor endplates // *J. Neurochem.* – 2020. – V. 154. – № 3. – P. 263–283.
393. North R.A. Molecular physiology of P2X receptors // *Physiol. Rev.* – 2002. – V. 82. – № 4. – P. 1013–1067.
394. Noviello C.M., Gharpure A., Mukhtasimova N., Cabuco R., Baxter L., Borek D., Sine S.M., Hibbs R.E. Structure and gating mechanism of the  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptor // *Cell*. – 2021. – V. 184. – № 8. – P. 2121-2134.e13.

395. Nowycky M.C., Fox A.P., Tsien R.W. Three types of neuronal calcium channel with different calcium agonist sensitivity // *Nature*. – 1985. – V. 316. – № 6027. – P. 440–443.
396. Nudler S., Piriz J., Urbano F.J., Rosato-Siri M.D., Piedras Renteria E.S., Uchitel O.D. Ca<sup>2+</sup> channels and synaptic transmission at the adult, neonatal, and P/Q-type deficient neuromuscular junction // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* – 2003. – V.998. – P. 11–17.
397. O'Brien F., Venturi E., Sitsapesan R. The ryanodine receptor provides high throughput Ca<sup>2+</sup>-release but is precisely regulated by networks of associated proteins: A focus on proteins relevant to phosphorylation // *Biochem. Soc. Trans.* – 2015. – V. 43. – № 3. – P. 426–433.
398. Oheim M., Kirchhoff F., Stühmer W. Calcium microdomains in regulated exocytosis // *Cell Calcium*. – 2006. – V. 40. – № 5–6. – P. 423–439.
399. Ojala K.S., Ginebaugh S.P., Wu M., Miller E.W., Ortiz G., Covarrubias M., Meriney S.D. A high-affinity, partial antagonist effect of 3,4-diaminopyridine mediates action potential broadening and enhancement of transmitter release at NMJs // *J. Biol. Chem.* – 2021. – V. 296. – P. 100302.
400. Oliveira L., Correia-De-Sá P. Protein kinase A and Cav1 (L-type) channels are common targets to facilitatory adenosine A<sub>2A</sub> and muscarinic M<sub>1</sub> receptors on rat motoneurons // *NeuroSignals*. – 2005. – V. 14. – № 5. – P. 262–272.
401. Oliveira L., Timóteo M.A., Correia-de-Sá P. Modulation by adenosine of both muscarinic M<sub>1</sub>-facilitation and M<sub>2</sub>-inhibition of [3H]-acetylcholine release from the rat motor nerve terminals. // *Eur. J. Neurosci.* – 2002. – V. 15. – № 11. – P. 1728–1736.
402. Oliveira L., Timóteo M.A., Correia-de-Sá P. Tetanic depression is overcome by tonic adenosine A<sub>2A</sub> receptor facilitation of L-type Ca<sup>2+</sup> influx into rat motor nerve terminals // *J. Physiol.* – 2004. – V. 560. – № 1. – P. 157–168.
403. Oliveria S.F., Dell'Acqua M.L., Sather W.A. AKAP79/150 Anchoring of Calcineurin Controls Neuronal L-Type Ca<sup>2+</sup> Channel Activity and Nuclear Signaling // *Neuron*. – 2007. – V. 55. – № 2. – P. 261–275.



404. Oliveria S.F., Dittmer P.J., Youn D., dell'Acqua M.L., Sather W.A. Localized calcineurin confers Ca<sup>2+</sup>-dependent inactivation on neuronal L-type Ca<sup>2+</sup> channels // *J. Neurosci.* – 2012. – V. 32. – № 44. – P. 15328–15337.
405. Ortner N. J., Kaserer T., Copeland J. N., Striessnig J. De novo CACAN1D Ca<sup>2+</sup> channelopathies: clinical phenotypes and molecular mechanism // *Pflügers Arch.* – 2020. – V. 472. – № 7. – P. 755–773.
406. Padamsey Z., Foster W.J., Emptage N.J. Intracellular Ca<sup>2+</sup> Release and Synaptic Plasticity: A Tale of Many Stores // *Neuroscientist.* – 2018. – V. 25. – № 3. – P. 208–226.
407. Pagani M.R., Reisin R.C., Uchitel O.D. Calcium Signaling Pathways Mediating Synaptic Potentiation Triggered by Amyotrophic Lateral Sclerosis IgG in Motor Nerve Terminals // *J. Neurosci.* – 2006. – V. 26. – № 10. – P. 2661.
408. Pagani R., Song M., Mcenery M., Qin N., Tsien R.W., Toro L., Stefani E., Uchitel O.D. Differential expression of  $\alpha 1$  and  $\beta$  subunits of voltage dependent Ca<sup>2+</sup> channel at the neuromuscular junction of normal and P/Q Ca<sup>2+</sup> channel knockout mouse // *Neuroscience.* – 2004. – V. 123. – № 1. – P. 75–85.
409. Palma A.G., Muchnik S., Losavio A.S. Excitatory effect of the A2A adenosine receptor agonist CGS-21680 on spontaneous and K<sup>+</sup>-evoked acetylcholine release at the mouse neuromuscular junction // *Neuroscience.* – 2011. – V. 172. – P. 164–176.
410. Pancrazio J.J., Viglione M.P., Kim Y.I. Effects of Bay K 8644 on spontaneous and evoked transmitter release at the mouse neuromuscular junction // *Neuroscience.* – 1989. – V. 30. – № 1. – P. 215–221.
411. Pankratov Y., Lalo U., Verkhratsky A., North R.A. Quantal Release of ATP in Mouse Cortex // *J. Gen. Physiol.* – 2007. – V. 129. – № 3. – P. 257–265.
412. Pankratov Y., Lalo U., Verkhratsky A., North R.A. Vesicular release of ATP at central synapses // *Pflügers Arch.* – 2006. – V. 452. – № 5. – P. 589–597.

413. Papke R.L., Lindstrom J.M. Nicotinic acetylcholine receptors: Conventional and unconventional ligands and signaling // *Neuropharmacology*. – 2020. – V. 168. – P. 108021.
414. Papke R.L. Merging old and new perspectives on nicotinic acetylcholine receptors // *Biochem. Pharmacol.* – 2014. – V. 89. – № 1. – P. 1–11.
415. Papke R.L., Bencherif M., Lippiello P. An evaluation of neuronal nicotinic acetylcholine receptor activation by quaternary nitrogen compounds indicates that choline is selective for the  $\alpha 7$  subtype // *Neurosci. Lett.* – 1996. – V. 213. – № 3. – P. 201–204.
416. Papke R.L., Horenstein N.A. Therapeutic Targeting of  $\alpha 7$  Nicotinic Acetylcholine Receptors // *Pharmacol. Rev.* – 2021. – V. 73. – № 3. – P. 1118–1149.
417. Papke R.L., Porter Papke J.K. Comparative pharmacology of rat and human  $\alpha 7$  nAChR conducted with net charge analysis // *Br. J. Pharmacol.* – 2002. – V. 137. – № 1. – P. 49–61.
418. Pardo N.E., Hajela R.K., Atchison W.D. Acetylcholine release at neuromuscular junctions of adult tottering mice is controlled by N-(Cav2.2) and R-type (Cav2.3) but not L-type (Cav1.2)  $Ca^{2+}$  channels // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* – 2006. – V. 319. – № 3. – P. 1009–1020.
419. Parikh V., Sarter M. Cortical choline transporter function measured in vivo using choline-sensitive microelectrodes: clearance of endogenous and exogenous choline and effects of removal of cholinergic terminals // *J. Neurochem.* – 2006. – V. 97. – № 2. – P. 488–503.
420. Patti L., Raiteri L., Grilli M., Parodi M., Raiteri M., Marchi M. P2X7 receptors exert a permissive role on the activation of release-enhancing presynaptic  $\alpha 7$  nicotinic receptors co-existing on rat neocortex glutamatergic terminals // *Neuropharmacology*. – 2006. – V. 50. – № 6. – P. 705–713.
421. Pattillo J.M., Yazejian B., DiGregorio D.A., Vergara J.L., Grinnell A.D., Meriney S.D. Contribution of presynaptic calcium-activated potassium

- currents to transmitter release regulation in cultured *Xenopus* nerve-muscle synapses // *Neuroscience*. – 2001. – V. 102. – № 1. – P. 229–240.
422. Pelegrin P., Surprenant A. Pannexin-1 mediates large pore formation and interleukin-1 $\beta$  release by the ATP-gated P2X7 receptor // *EMBO J.* – 2006. – V. 25. – № 21. – P. 5071–5082.
423. Peng Y. Ryanodine-Sensitive Component of Calcium Transients Evoked by Nerve Firing at Presynaptic Nerve Terminals // *J. Neurosci.* – 1996. – V. 16. – № 21. – P. 6703–6712.
424. Perfitt T.L., Wang X., Dickerson M.T., Stephenson J.R., Nakagawa T., Jacobson D.A., Colbran R.J. Neuronal L-type calcium channel signaling to the nucleus requires a novel CaMKII $\alpha$ -SHANK3 interaction // *J. Neurosci.* – 2020. – V. 40. – № 10. – P. 2000–2014.
425. Perissinotti P.P., Giugovaz Tropper B., Uchitel O.D. L-type calcium channels are involved in fast endocytosis at the mouse neuromuscular junction // *Eur. J. Neurosci.* – 2008. – V. 27. – № 6. – P. 1333–1344.
426. Perissinotti P.P., Uchitel O.D. Adenosine drives recycled vesicles to a slow-release pool at the mouse neuromuscular junction // *Eur. J. Neurosci.* – 2010. – V. 32. – № 6. – P. 985–996.
427. Petrov A.M., Zakirjanova G.F., Kovyazina I.V., Tsentsevitsky A.N., Bukharaeva E.A. Adrenergic receptors control frequency-dependent switching of the exocytosis mode between “full-collapse” and “kiss-and-run” in murine motor nerve terminal // *Life Sci.* – 2022. – V. 296. – P. 120433.
428. Petrov K.A., Girard E., Nikitashina A.D., Colasante C., Bernard V., Nurullin L., Leroy J., Samigullin D., Colak O., Nikolsky E., Plaud B., Krejci E. Schwann cells sense and control acetylcholine spillover at the neuromuscular junction by  $\alpha 7$  nicotinic receptors and butyrylcholinesterase // *J. Neurosci.* – 2014. – V. 34. – № 36. – P. 11870–11883.
429. Petrov K.A., Proskurina S.E., Krejci E. Cholinesterases in Tripartite Neuromuscular Synapse // *Front. Mol. Neurosci.* – 2021. – V. 14. – P. 339.

430. Picciotto M.R., Higley M.J., Mineur Y.S. Acetylcholine as a Neuromodulator: Cholinergic Signaling Shapes Nervous System Function and Behavior // *Neuron*. – 2012. – V. 76. – № 1. – P. 116–129.
431. Piovesana R., Intriago M.S.S., Dini L., Tata A.M. Cholinergic Modulation of Neuroinflammation: Focus on  $\alpha 7$  Nicotinic Receptor // *Int. J. Mol. Sci.* – 2021. – V. 22. – № 9. – P. 4912.
432. Plomp J.J., Molenaar P.C. Involvement of protein kinases in the upregulation of acetylcholine release at endplates of alpha-bungarotoxin-treated rats. // *J. Physiol.* – 1996. – V. 493. – № 1. – P. 175–186.
433. Plumbly W., Brandon N., Deeb T.Z., Hall J., Harwood A.J. L-type voltage-gated calcium channel regulation of in vitro human cortical neuronal networks // *Sci. Rep.* – 2019. – V. 9. – № 1 – P. 13810.
434. Poppi L.A., Holt J.C., Lim R., Brichta A.M. A review of efferent cholinergic synaptic transmission in the vestibular periphery and its functional implications // *J. Neurophysiol.* – 2020. – V. 123. – № 2. – P. 608–629.
435. Pousinha P.A., Correia A.M., Sebastião A.M., Ribeiro J.A. Predominance of Adenosine Excitatory over Inhibitory Effects on Transmission at the Neuromuscular Junction of Infant Rats // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* – 2010. – V. 332. – № 1. – P. 153–163.
436. Poyner D.R. Calcitonin gene-related peptide: Multiple actions, multiple receptors // *Pharmacology & Therapeutics*. – 1992. – V. 56. – № 1. – P. 23–51.
437. Poyner D.R., Sexton P.M., Marshall I., Smith D.M., Quirion R., Born W., Muff R., Fischer J.A., Foord S.M. International Union of Pharmacology. XXXII. The Mammalian Calcitonin Gene-Related Peptides, Adrenomedullin, Amylin, and Calcitonin Receptors // *Pharmacol. Rev.* – 2002. – V. 54. – № 2. – P. 233–246.
438. Prior C., Singh S. Factors influencing the low-frequency associated nicotinic ACh autoreceptor-mediated depression of ACh release from rat motor nerve terminals // *Br. J. Pharmacol.* – 2000. – V. 129. – № 6. – P. 1067–1074.

439. Protti D.A., Reisin R., Mackinley T.A., Uchitel O.D. Calcium channel blockers and transmitter release at the normal human neuromuscular junction // *Neurology*. – 1996. – V. 46. – № 5. – P. 1391–1396.
440. Protti D.A., Uchitel O.D. P/Q-type calcium channels activate neighboring calcium-dependent potassium channels in mouse motor nerve terminals // *Pflügers Arch.* – 1997. – V. 434. – № 4. – P. 406–412.
441. Protti D.A., Uchitel O.D. Transmitter release and presynaptic Ca<sup>2+</sup> currents blocked by the spider toxin  $\omega$ -Aga-IVA // *NeuroReport*. – 1993. – V. 5. – № 3. – P. 333–336.
442. Qian H., Patriarchi T., Price J.L., Matt L., Lee B., Nieves-Cintrón M., Buonarati O. R., Chowdhury D., Nanou E., Nystoriak M. A., Catterall W. A., Poomvanicha M., Hofmann F., Navedo M. F., Hell J. W. Phosphorylation of Ser1928 mediates the enhanced activity of the L-type Ca<sup>2+</sup> channel Cav1.2 by the  $\beta$ 2-adrenergic receptor in neurons // *Science Signal*. – 2017. – V. 10. – № 463.
443. Quinlan M.E., Hirasawa M. Multivesicular Release Underlies Short Term Synaptic Potentiation Independent of Release Probability Change in the Supraoptic Nucleus // *PLoS One*. – 2013. – V. 8. – № 9. – P. e77402.
444. Ralevic V., Burnstock G. Receptors for purines and pyrimidines. // *Pharmacol. Rev.* – 1998. – V. 50. – № 3. – P. 413–492.
445. Randall A., Tsien R.W. Pharmacological dissection of multiple types of Ca<sup>2+</sup> channel currents in rat cerebellar granule neurons // *J. Neurosci.* – 1995. – V. 15. – № 4. – P. 2995–3012.
446. Rathouz M.M., Berg D.K. Synaptic-type acetylcholine receptors raise intracellular calcium levels in neurons by two mechanisms // *J. Neurosci.* – 1994. – V. 14. – № 11. – P. 6935–6945.
447. Raymond C.R., Redman S.J. Different calcium sources are narrowly tuned to the induction of different forms of LTP // *J. Neurophysiol.* – 2002. – V. 88. – № 1. – P. 249–255.

448. Regateiro F.S., Cobbold S.P., Waldmann H. CD73 and adenosine generation in the creation of regulatory microenvironments // *Clin. Exp. Immunol.* – 2013. – V. 171. – № 1. – P. 1–7.
449. Regehr W.G. Short-Term Presynaptic Plasticity // *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* – 2012. – V. 4. – № 7. – P. a005702.
450. Rettig J., Sheng Z.H., Kim D.K., Hodson C.D., Snutch T.P., Catterall W.A. Isoform-specific interaction of the  $\alpha 1A$  subunits of brain  $Ca^{2+}$  channels with the presynaptic proteins syntaxin and SNAP-25 // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1996. – V. 93. – № 14. – P. 7363–7368.
451. Rey S., Maton G., Satake S., Llano I., Kang S., Surmeier D.J., Silverman R.B., Collin T. Physiological involvement of presynaptic L-type voltage-dependent calcium channels in GABA release of cerebellar molecular layer interneurons // *J. Neurochem.* – 2020. – V. 155. – № 4. – P. 390–402.
452. Reyes M., Stanton P.K. Induction of hippocampal long-term depression requires release of  $Ca^{2+}$  from separate presynaptic and postsynaptic intracellular stores // *J. Neurosci.* – 1996. – V. 16. – № 19. – P. 5951–5960.
453. Reyes-García S.E., Escobar M.L. Calcineurin Participation in Hebbian and Homeostatic Plasticity Associated with Extinction // *Front. Cell. Neurosci.* – 2021. – V. 15. – P. 226.
454. Richards K.S., Swensen A.M., Lipscombe D., Bommert K. Novel  $CaV2.1$  clone replicates many properties of Purkinje cell  $CaV2.1$  current // *Eur. J. Neurosci.* – 2007. – V. 26. – № 10. – P. 2950–2961.
455. Riquelme M.A., Cea L.A., Vega J.L., Boric M.P., Monyer H., Bennett M.V. L., Frank M., Willecke K., Sáez J.C. The ATP required for potentiation of skeletal muscle contraction is released via pannexin hemichannels // *Neuropharmacology.* – 2013. – V. 75. – P. 594–603.
456. Risher W.C., Eroglu C. Emerging roles for  $\alpha 2\delta$  subunits in calcium channel function and synaptic connectivity // *Curr. Opin. Neurobiol.* – 2020. – V. 63. – P. 162–169.

457. Robitaille R., Charlton M.P. Presynaptic calcium signals and transmitter release are modulated by calcium-activated potassium channels // *J. Neurosci.* – 1992. – V. 12. – № 1. – P. 297–305.
458. Robitaille R., Garcia M.L., Kaczorowski G.J., Chariton M.P. Functional colocalization of calcium and calcium-gated potassium channels in control of transmitter release // *Neuron.* – 1993. – V. 11. – № 4. – P. 645–655.
459. Robson S.C., Sévigny J., Zimmermann H. The E-NTPDase family of ectonucleotidases: Structure function relationships and pathophysiological significance // *Purinergic Signal.* – 2006. – V. 2. – № 2. – P. 409–430.
460. Rodrigues A.Z.C., Wang Z.M., Messi M.L., Delbono O. Sympathomimetics regulate neuromuscular junction transmission through TRPV1, P/Q- and N-type Ca<sup>2+</sup> channels // *Mol. Cell. Neurosci.* – 2019. – V. 95. – P. 59–70.
461. Rodrigues R.J., Tomé A.R., Cunha R.A. ATP as a multi-target danger signal in the brain // *Front. Neurosci.* – 2015. – V. 9. – № APR. – P. 148.
462. Rodríguez-Menchaca A.A., Adney S.K., Zhou L., Logothetis D.E. Dual regulation of voltage-sensitive ion channels by PIP<sub>2</sub> // *Front. Pharmacol.* – 2012. – V. 3. – P. 170.
463. Roger S., Gillet L., Baroja-Mazo A., Surprenant A., Pelegrin P. C-terminal Calmodulin-binding Motif Differentially Controls Human and Rat P2X<sub>7</sub> Receptor Current Facilitation // *J. Biol. Chem.* – 2010. – V. 285. – № 23. – P. 17514–17524.
464. Roger S., Pelegrin P., Surprenant A. Cellular/Molecular Facilitation of P2X<sub>7</sub> Receptor Currents and Membrane Blebbing via Constitutive and Dynamic Calmodulin Binding // *J. Neurosci.* – 2008. – V. 28. – P. 6393–6401.
465. Rokic M.B., Stojilkovic S.S. Two open states of P2X receptor channels // *Front. Cell. Neurosci.* – 2013. – V. 7. – P. 215.
466. Roncarati R., Di Chio M., Sava A., Terstappen G.C., Fumagalli G. Presynaptic localization of the small conductance calcium-activated potassium channel SK3 at the neuromuscular junction. // *Neuroscience.* – 2001. – V. 104. – № 1. – P. 253–262.

467. Rosato Siri M.D., Uchitel O.D. Calcium channels coupled to neurotransmitter release at neonatal rat neuromuscular junctions // *J. Physiol.* – 1999. – V. 514. – № 2. – P. 533–540.
468. Rosato-Siri M.D., Piriz J., Giugovaz Tropper B.A., Uchitel O.D. Differential Ca<sup>2+</sup>-dependence of transmitter release mediated by P/Q- and N-type calcium channels at neonatal rat neuromuscular junctions // *Eur. J. Neurosci.* – 2002. – V. 15. – № 12. – P. 1874–1880.
469. Ross W.N. Understanding calcium waves and sparks in central neurons // *Nature reviews. Neuroscience.* – 2012. – V. 13. – № 3. – P. 157–168.
470. Rozov A., Burnashev N., Sakmann B., Neher E. Transmitter release modulation by intracellular Ca<sup>2+</sup> buffers in facilitating and depressing nerve terminals of pyramidal cells in layer 2/3 of the rat neocortex indicates a target cell-specific difference in presynaptic calcium dynamics // *J. Physiol.* – 2001. – V. 531. – № 3. – P. 807–826.
471. Rozov A., Zakharova Y., Vazetdinova A., Valiullina-Rakhmatullina F. The Role of Polyamine-Dependent Facilitation of Calcium Permeable AMPARs in Short-Term Synaptic Enhancement // *Front. Cell. Neurosci.* – 2018. – V. 12. .
472. Ruiz R., Cano R., Casañas J.J., Gaffield M.A., Betz W.J., Tabares L. Active zones and the readily releasable pool of synaptic vesicles at the neuromuscular junction of the mouse // *J. Neurosci.* – 2011. – V. 31. – № 6. – P. 2000–2008.
473. Rusnak F., Mertz P. Calcineurin: form and function. // *Physiol. Rev.* – 2000. – V. 80. – № 4. – P. 1483–1521.
474. Russell F.A., King R., Smillie S.-J., Kodji X., Brain S.D. Calcitonin Gene-Related Peptide: Physiology and Pathophysiology // *Physiol. Rev.* – 2014. – V. 94. – № 4. – P. 1099–1142.
475. Sabatini B.L., Oertner T.G., Svoboda K. The Life Cycle of Ca<sup>2+</sup> Ions in Dendritic Spines // *Neuron.* – 2002. – V. 33. – № 3. – P. 439–452.
476. Sagoo J.K., Fruman D.A., Wesselborg S., Walsh C.T., Bierer B.E. Competitive inhibition of calcineurin phosphatase activity by its autoinhibitory domain. // *Biochem. J.* – 1996. – V. 320. – № 3. – P. 879–884.



477. Sahu G., Asmara H., Zhang F.X., Zamponi G.W., Turner R.W. Activity-dependent facilitation of CaV1.3 calcium channels promotes Kca3.1 activation in hippocampal neurons // *J. Neurosci.* – 2017. – V. 37. – № 46. – P. 11255–11270.
478. Sakaguchi M., Inaishi Y., Kashihara Y., Kuno M. Release of calcitonin gene-related peptide from nerve terminals in rat skeletal muscle. // *J. Physiol.* – 1991. – V. 434. – P. 257–70.
479. Sakurai T., Hell J.W., Woppmann A., Miljanich G.P., Catterall W.A. Immunochemical identification and differential phosphorylation of alternatively spliced forms of the  $\alpha(1A)$  subunit of brain calcium channels // *J. Biol. Chem.* – 1995. – V. 270. – № 36. – P. 21234–21242.
480. Sala C., Andreose J. S., Fumagalli G., Lømo T. Calcitonin gene-related peptide: possible role in formation and maintenance of neuromuscular junctions. // *J. Neurosci.* – 1995. – V. 15. – № 1 Pt 2. – P. 520–528.
481. Sánchez-Nogueiro J., Marín-García P., Bustillo D., Olivos-Oré L.A., Miras-Portugal M.T., Artalejo A. R. Subcellular distribution and early signalling events of P2X7 receptors from mouse cerebellar granule neurons // *Eur. J. Pharmacol.* – 2014. – V. 744. – P. 190–202.
482. Sancho M., Kyle B.D. The Large-Conductance, Calcium-Activated Potassium Channel: A Big Key Regulator of Cell Physiology // *Front. Physiol.* – 2021. – V. 12. – P. 1856.
483. Sanderson J.L., Dell'Acqua M.L. AKAP signaling complexes in regulation of excitatory synaptic plasticity // *Neuroscientist*. 2011. T. 17. № 3. C. 321–336.
484. Santafé M.M., Garcia N., Lanuza M.A., Tomàs M., Tomàs J. Interaction between protein kinase C and protein kinase A can modulate transmitter release at the rat neuromuscular synapse // *J. Neurosci Res.* – 2009. – V. 87. – № 3. – P. 683–690.
485. Santafé M.M., Garcia N., Lanuza M.A., Uchitel O.D., Tomás J. Calcium channels coupled to neurotransmitter release at dually innervated

- neuromuscular junctions in the newborn rat // *Neuroscience*. – 2001. – V. 102. – № 3. – P. 697–708.
486. Santafé M.M., Lanuza M.A., Garcia N., Tomàs J. Calcium inflow-dependent protein kinase C activity is involved in the modulation of transmitter release in the neuromuscular junction of the adult rat // *Synapse*. – 2005. – V. 57. – № 2. – P. 76–84.
487. Santafé M.M., Lanuza M.A., Garcia N., Tomàs J. Muscarinic autoreceptors modulate transmitter release through protein kinase C and protein kinase A in the rat motor nerve terminal // *Eur. J. Neurosci*. – 2006. – V. 23. – № 8. – P. 2048–205.
488. Santafé M.M., Priego M., Obis T., Garcia N., Tomàs M., Lanuza M.A., Tomàs J. Adenosine receptors and muscarinic receptors cooperate in acetylcholine release modulation in the neuromuscular synapse // *Eur. J. Neurosci*. – 2015. – V. 42. – № 2. – P. 1775–1787.
489. Santafé M.M., Salon I., Garcia N., Lanuza M.A., Uchitel O.D., Tomàs J. Modulation of ACh release by presynaptic muscarinic autoreceptors in the neuromuscular junction of the newborn and adult rat // *Eur. J. Neurosci*. – 2003. – V. 17. – № 1. – P. 119–127.
490. Santafé M.M., Urbano F.J., Lanuza M.A., Uchitel O.D. Multiple types of calcium channels mediate transmitter release during functional recovery of botulinum toxin type A-poisoned mouse motor nerve terminals // *Neuroscience*. – 1999. – V. 95. – № 1. – P. 227–234.
491. Santulli G., Nakashima R., Yuan Q., Marks A.R. Intracellular calcium release channels: an update // *J. Physiol*. – 2017. – V. 595. – № 10. – P. 3041–3051.
492. Sather W.A., Dittmer P.J. Regulation of voltage-gated calcium channels by the ER calcium sensor STIM1 // *Curr. Opin. Neurobiol*. – 2019. – V. 57. – P. 186–191.
493. Savalli N., Pantazis A., Sigg D., Weiss J.N., Neely A., Olcese R. The  $\alpha 2\delta$ -1 subunit remodels CaV1.2 voltage sensors and allows Ca<sup>2+</sup> influx at

- physiological membrane potentials // *J. Gen. Physiol.* – 2016. – V. 148. – № 2. – P. 147–159.
494. Scarnati M.S., Clarke S.G., Pang Z.P., Paradiso K.G. Presynaptic Calcium Channel Open Probability and Changes in Calcium Influx Throughout the Action Potential Determined Using AP-Waveforms. // *Front. Synaptic Neurosci.* – 2020. – V. 12. – P. 17.
495. Scholze P., Huck S. The  $\alpha 5$  Nicotinic Acetylcholine Receptor Subunit Differentially Modulates  $\alpha 4\beta 2^*$  and  $\alpha 3\beta 4^*$  Receptors // *Front. Synaptic Neurosci.* – 2020. – V. 12. – P. 54.
496. Schwartz A.D., Whitacre C.L., Wilson D.F. Do ryanodine receptors regulate transmitter release at the neuromuscular junction of the rat? // *Neurosci. Lett.* – 1999. – V. 274. – № 3. – P. 163–166.
497. Scullin C.S., Partridge L.D. Contributions of SERCA pump and ryanodine-sensitive stores to presynaptic residual  $\text{Ca}^{2+}$  // *Cell Calcium.* – 2010. – V. 47. – № 4. – P. 326–338.
498. Sebastião A.M., Rei N., Ribeiro J.A. Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) and adenosine receptors // *Front. Pharmacol.* – 2018. – V. 9. – P. 267.
499. Segal M., Korkotian E. Roles of Calcium Stores and Store-Operated Channels in Plasticity of Dendritic Spines // *Neuroscientist.* – 2016. – V. 22. – № 5. – P. 477-485.
500. Seguela P., Wadiche J., Dineley-Miller K., Dani J.A., Patrick J.W. Molecular cloning, functional properties, and distribution of rat brain alpha 7: a nicotinic cation channel highly permeable to calcium // *J. Neurosci.* – 1993. – V. 13. – № 2. – P. 596–604.
501. Serra S.A., Gené G.G., Elorza-Vidal X., Fernández-Fernández J.M. Cross talk between  $\beta$  subunits, intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  signaling, and SNAREs in the modulation of  $\text{CaV}2.1$  channel steady-state inactivation // *Physiol. Rep.* – 2018. – V. 6. – № 2 – P. e13557.
502. Shakiryanova D., Klose M.K., Zhou Y., Gu T., Deitcher D.L., Atwood H.L., Hewes R.S., Levitan E.S. Presynaptic Ryanodine Receptor-Activated

- Calmodulin Kinase II Increases Vesicle Mobility and Potentiates Neuropeptide Release // *J. Neurosci.* – 2007. – V. 27. – № 29. – P. 7799–7806.
503. Shakiryanova D., Zettel G.M., Gu T., Hewes R.S., Levitan E.S. Synaptic neuropeptide release induced by octopamine without Ca<sup>2+</sup> entry into the nerve terminal // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2011. – V. 108. – № 11. – P. 4477–4481.
504. Sharma G., Vijayaraghavan S. Modulation of Presynaptic Store Calcium Induces Release of Glutamate and Postsynaptic Firing // *Neuron.* – 2003. – V. 38. – № 6. – P. 929–939.
505. Sharp A., McPherson P., Dawson T., Aoki C., Campbell K., Snyder S. Differential immunohistochemical localization of inositol 1,4,5- trisphosphate- and ryanodine-sensitive Ca<sup>2+</sup> release channels in rat brain // *J. Neurosci.* – 1993. – V. 13. – № 7. – P. 3051–3063.
506. Shen J.X., Yakel J.L. Nicotinic acetylcholine receptor-mediated calcium signaling in the nervous system // *Acta Pharmacol. Sin.* – 2009. – V. 30. – № 6. – P. 673–680.
507. Shin M. C., Nonaka K., Yamaga T., Wakita M., Akaike H., Akaike N. Calcium channel subtypes on glutamatergic mossy fiber terminals synapsing onto rat hippocampal CA3 neurons // *J. Neurophysiol.* – 2018. – V. 120. – № 3. – P. 1264–1273.
508. Shishmarev D. Excitation-contraction coupling in skeletal muscle: recent progress and unanswered questions // *Biophys. Rev.* – 2020. – V. 12. – № 1. – P. 143–153.
509. Silinsky E.M. Adenosine decreases both presynaptic calcium currents and neurotransmitter release at the mouse neuromuscular junction // *J. Physiol.* – 2004. – V. 558. – № 2. – P. 389–401.
510. Silinsky E.M., Searl T.J. Phorbol esters and neurotransmitter release: more than just protein kinase C? // *Br. J. Pharmacol.* – 2003. – V. 138. – № 7. – P. 1191–1201.

511. Silva M., Tran V., Marty A. Calcium-dependent docking of synaptic vesicles // Trends Neurosci. – 2021. – V. 44. – № 7. – P. 579–592.
512. Silveira P.E., Lima R.F., Guimarães J.D.S., Molgó J., Naves L.A., Kushmerick C. Ryanodine and inositol triphosphate receptors modulate facilitation and tetanic depression at the frog neuromuscular junction // Muscle Nerve. – 2015. – V. 52. – № 4. – P. 623–630.
513. Sim A.T.R., Baldwin M.L., Rostas J.A.P., Holst J., Ludowyke R.I. The role of serine/threonine protein phosphatases in exocytosis. // Biochem. J. – 2003. – V. 373. – № 3. – P. 641–659.
514. Simms B.A., Souza I.A., Rehak R., Zamponi G.W. The amino-terminus of high voltage activated calcium channels: CaM you or can't you? // Channels. – 2014. – V. 8. – № 4. – P. 370–375.
515. Simms B.A., Zamponi G.W. Neuronal voltage-gated calcium channels: Structure, function, and dysfunction // Neuron. – 2014. – V. 82. – № 1. – P. 24–45.
516. Simon C.M., Blanco-Redondo B., Buettner J.M., Pagiazitis J.G., Fletcher E.V., Sime Longang J.K., Mentis G.Z. Chronic pharmacological increase of neuronal activity improves sensory-motor dysfunction in spinal muscular atrophy mice // J. Neurosci. – 2021. – V. 41. – № 2. – P. 376–389.
517. Singh S., Prior C. Prejunctional effects of the nicotinic ACh receptor agonist dimethylphenylpiperazinium at the rat neuromuscular junction // J. Physiol. – 1998. – V. 511. – № 2. – P. 451–460.
518. Sinnegger-Brauns M.J., Huber I.G., Koschak A., Wild C., Obermair G.J., Einzinger U., Hoda J.C., Sartori S.B., Striessnig J. Expression and 1,4-dihydropyridine-binding properties of brain L-type calcium channel isoforms // Mol. Pharmacol. – 2009. – V. 75. – № 2. – P. 407–414.
519. Skiteva O.I., Lapteva V.I., Balezina O.P. Role of Stored Calcium in the Regulation of Neurotransmitter Quantum Size // Bull. Exp. Biol. Med. – 2012. – V. 152. – № 4. – P. 392–396.

520. Slater C.R. The functional organization of motor nerve terminals // *Prog. Neurobiol.* – 2015. – V. 134. – P. 55–103.
521. Sluyter R. The P2X7 Receptor // *Adv. Exp. Med. Biol.* – 2017. – V. 1051. – P. 17–53.
522. Smith A.B., Cunnane T.C. Ryanodine-sensitive calcium stores involved in neurotransmitter release from sympathetic nerve terminals of the guinea-pig. // *J. Physiol.* – 1996. – V. 497 (Pt. 3). – № 3. – P. 657-664.
523. Smith D.O. Sources of adenosine released during neuromuscular transmission in the rat. // *J. Physiol.* – 1991. – V. 432. – P. 343–54.
524. Soga-Sakakibara S., Kubota M., Suzuki S., Akita T., Narita K., Kuba K. Calcium dependence of the priming, activation and inactivation of ryanodine receptors in frog motor nerve terminals // *Eur. J. Neurosci.* – 2010. – V. 32. – № 6. – P. 948–962.
525. Sokolova E., Grishin S., Shakirzyanova A., Talantova M., Giniatullin R. Distinct receptors and different transduction mechanisms for ATP and adenosine at the frog motor nerve endings // *Eur. J. Neurosci.* – 2003. – V. 18. – № 5. – P. 1254–1264.
526. Soldatov N.M. Molecular Determinants of Cav1.2 Calcium Channel Inactivation // *ISRN Mol. Biol.* – 2012. – V. 2012. – P. 691341.
527. Soliakov L., Wonnacott S. Involvement of protein kinase C in the presynaptic nicotinic modulation of [3H]-dopamine release from rat striatal synaptosomes // *Br. J. Pharmacol.* – 2001. – V. 132. – № 3. – P. 785–791.
528. Sperlágh B., Köfalvi A., Deuchars J., Atkinson L., Milligan C.J., Buckley N.J., Vizi E.S. Involvement of P2X7 receptors in the regulation of neurotransmitter release in the rat hippocampus // *J. Neurochem.* – 2002. – V. 81. – № 6. – P. 1196–1211.
529. Sridharan P.S., Lu Y., Rice R.C., Pieper A.A., Rajadhyaksha A.M. Loss of Cav1.2 channels impairs hippocampal theta burst stimulation-induced long-term potentiation // *Channels.* – 2020. – V. 14. – № 1. – P. 287–293.

530. Stanley E.F. The Nanophysiology of Fast Transmitter Release // Trends Neurosci. 2016. T. 39. № 3. C. 183–197.
531. Steele T.W.E., Samsó M. The FKBP12 subunit modifies the long-range allostereism of the ryanodine receptor // J. Struct. Biol. – 2019. – V. 205. – № 2. – P. 180–188.
532. Stelmashenko O., Lalo U., Yang Y., Bragg L., North R.A., Compan V. Activation of Trimeric P2X2 Receptors by Fewer than Three ATP Molecules // Mol. Pharmacol. – 2012. – V. 82. – № 4. – P. 760–766.
533. Stokes C., Camacho-Hernandez G.A., Thakur G.A., Wu X., Taylor P., Papke R.L. Differential Activation and Desensitization States Promoted by Noncanonical  $\alpha 7$  Nicotinic Acetylcholine Receptor Agonists // J. Pharmacol. Exp. Ther. – 2022. – V. 383. – № 2. – P. 157–171.
534. Stokes C., Treinin M., Papke R.L. Looking below the surface of nicotinic acetylcholine receptors // Trends Pharmacol. Sci. – 2015. – V. 36. – № 8. – P. 514–523.
535. Stotz S.C., Jarvis S.E., Zamponi G.W. Functional roles of cytoplasmic loops and pore lining transmembrane helices in the voltage-dependent inactivation of HVA calcium channels // J. Physiol. – 2004. – V. 554. – № 2. – P. 263–273.
536. Striessnig J., Pinggera A., Kaur G., Bock G., Tuluc P. L-type  $Ca^{2+}$  channels in heart and brain // Wiley Interdiscip. Rev. Membr. Transp. Signal. – 2014. – V. 3. – № 2. – P. 15–38.
537. Strom T.M., Nyakatura G., Apfelstedt-Sylla E., Hellebrand H., Lorenz B., Weber B.H.F., Wutz K., Gutwillinger N., Rütther K., Drescher B., Sauer C., Zrenner E., Meitinger T., Rosenthal A., Meindl A. An L-type calcium-channel gene mutated in incomplete X-linked congenital stationary night blindness // Nat. Genet. – 1998. – V. 19. – № 3. – P. 260–263.
538. Subramanian J., Morozov A. Erk1/2 inhibit synaptic vesicle exocytosis through L-type calcium channels // J. Neurosci. – 2011. – V. 31. – № 12. – P. 4755–4764.

539. Sun J., Bronk P., Liu X., Han W., Südhof T.C. Synapsins regulate use-dependent synaptic plasticity in the calyx of Held by a Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent pathway // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2006. – V. 103. – № 8. – P. 2880–2885.
540. Sun T., Wu X.-S., Xu J., McNeil B.D., Pang Z.P., Yang W., Bai L., Qadri S., Molkenkin J.D., Yue D.T., Wu L.-G. The role of calcium/calmodulin-activated calcineurin in rapid and slow endocytosis at central synapses. // *J. Neurosci.* – 2010. – V. 30. – № 35. – P. 11838–11847.
541. Surprenant A., Rassendren F., Kawashima E., North R.A., Buell G. The Cytolytic P2Z Receptor for Extracellular ATP Identified as a P2X Receptor (P2X7) // *Science.* – 1996. – V. 272. – № 5262. – P. 735–738.
542. Sweet D.H., Miller D.S., Pritchard J.B. Ventricular Choline Transport: A Role for Organic Cation Transporter 2 Expressed in Choroid Plexus // *J. Biol. Chem.* – 2001. – V. 276. – № 45. – P. 41611–41619.
543. Tabares L., Ruiz R., Linares-Clemente P., Gaffield M.A., Alvarez De Toledo G., Fernandez-Chacón R., Betz W.J. Monitoring synaptic function at the neuromuscular junction of a mouse expressing synaptotagmin // *J. Neurosci.* – 2007. – V. 27. – № 20. – P. 5422–5430.
544. Tabti N., Bourret C., Mallart A. Three potassium currents in mouse motor nerve terminals // *Pflügers Arch.* – 1989. – V. 413. – № 4. – P. 395–400.
545. Tadross M.R., Ben Johny M., Yue D.T. Molecular endpoints of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin- and voltage-dependent inactivation of Cav1.3 channels // *J. Gen. Physiol.* – 2010. – V. 135. – № 3. – P. 197–215.
546. Tang Q., Bangaru M.L.Y., Kostic S., Pan B., Wu H.E., Koopmeiners A.S., Yu H., Fischer G.J., Bruce McCallum J., Kwok W.-M., Hudmon A., Hogan Q.H. Ca<sup>2+</sup>-Dependent Regulation of Ca<sup>2+</sup> Currents in Rat Primary Afferent Neurons: Role of CaMKII and the Effect of Injury // *J. Neurosci.* – 2012. – V. 32. – № 34. – P. 11737–11749.
547. Tao-Cheng J.H., Dosemeci A., Winters C.A., Reese T.S. Changes in the distribution of calcium calmodulin-dependent protein kinase II at the



- presynaptic bouton after depolarization // *Brain Cell Biol.* – 2006. – V. 35. – № 2–3. – P. 117–124.
548. Tarasova E.O., Gaydukov A.E., Balezina O.P. Calcineurin and Its Role in Synaptic Transmission // *Biochemistry (Moscow)*. – 2018. – V. 83. – № 6. – P. 674–689.
549. Tarr T.B., Dittrich M., Meriney S.D. Are unreliable release mechanisms conserved from NMJ to CNS? // *Trends Neurosci.* – 2013. – V. 36. – № 1. – P. 14–22.
550. Tarr T.B., Malick W., Liang M., Valdomir G., Frasso M., Lacomis D., Reddel S. W., Garcia-Ocano A., Wipf P., Meriney S.D. Evaluation of a Novel Calcium Channel Agonist for Therapeutic Potential in Lambert–Eaton Myasthenic Syndrome // *J. Neurosci.* – 2013. – V. 33. – № 25. – P. 10559–10567.
551. Tarr T.B., Wipf P., Meriney S.D. Synaptic Pathophysiology and Treatment of Lambert-Eaton Myasthenic Syndrome // *Mol. Neurobiol.* – 2015. – V. 52. – № 1. – P. 456–463.
552. Thalhammer A., Contestabile A., Ermolyuk Y.S., Ng T., Volynski K.E., Soong T.W., Goda Y., Cingolani L.A. Alternative Splicing of P/Q-Type Ca<sup>2+</sup> Channels Shapes Presynaptic Plasticity // *Cell Rep.* – 2017. – V. 20. – № 2. – P. 333–343.
553. Thanawala M.S., Regehr W.G. Determining synaptic parameters using high-frequency activation // *J. Neurosci. Methods.* – 2016. – V. 264. – P. 136–152.
554. Thomsen R.H., Wilson D.F. Effects of 4-aminopyridine and 3,4-diaminopyridine on transmitter release at the neuromuscular junction. // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* – 1983. – V. 227. – № 1 – P. 260–265.
555. Tian L., Prior C., Dempster J., Marshall I.G. Hexamethonium- and methyllycaconitine-induced changes in acetylcholine release from rat motor nerve terminals // *Br. J. Pharmacol.* – 1997. – V. 122. – № 6. – P. 1025–1034.
556. Tian L., Prior C., Dempster J., Marshall I.G. Nicotinic antagonist-produced frequency-dependent changes in acetylcholine release from rat motor nerve terminals // *J. Physiol.* – 1994. – V. 476. – № 3. – P. 517–529.

557. Tippens A.L., Pare J.F., Langwieser N., Moosmang S., Milner T.A., Smith Y., Lee A. Ultrastructural evidence for pre- and postsynaptic localization of Cav1.2 L-type Ca<sup>2+</sup> channels in the rat hippocampus // *J. Comp. Neurol.* – 2008. – V. 506. – № 4. – P. 569–583.
558. Todd K.J., Darabid H., Robitaille R. Perisynaptic Glia Discriminate Patterns of Motor Nerve Activity and Influence Plasticity at the Neuromuscular Junction // *J. Neurosci.* – 2010. – V. 30. – № 35. – P. 11870–11882.
559. Todd K.J., Robitaille R. Purinergic modulation of synaptic signalling at the neuromuscular junction // *Pflügers Arch.* – 2006. – V. 452. – № 5. – P. 608–614.
560. Tomàs J., Garcia N., Lanuza M.A., Santafé M.M., Tomàs M., Nadal L., Hurtado E., Simó A., Cilleros V. Presynaptic Membrane Receptors Modulate ACh Release, Axonal Competition and Synapse Elimination during Neuromuscular Junction Development // *Front. Mol. Neurosci.* – 2017. – V. 10. – P. 132.
561. Tomàs J., Santafé MM., Garcia N., Lanuza M.A., Tomàs M., Besalduch N., Obis T., Priego M., Hurtado E. Presynaptic membrane receptors in acetylcholine release modulation in the neuromuscular synapse // *J. Neurosci Research.* – 2014. – V. 92. – № 5. – P. 543–554.
562. Topolnik L., Chamberland S., Pelletier J.G., Ran I., Lacaille J.C. Activity-Dependent Compartmentalized Regulation of Dendritic Ca<sup>2+</sup> Signaling in Hippocampal Interneurons // *J. Neurosci.* – 2009. – V. 29. – № 14. – P. 4658–4663.
563. Torben Bech-Hansen N., Naylor M.J., Maybaum T.A., Pearce W.G., Koop B., Fishman G.A., Mets M., Musarella M.A., Boycott K.M. Loss-of-function mutations in a calcium-channel  $\alpha 1$ -subunit gene in Xp11.23 cause incomplete X-linked congenital stationary night blindness // *Nat. Genet.* – 1998. – V. 19. – № 3. – P. 264–267.

564. Tran V., Miki T., Marty A. Three small vesicular pools in sequence govern synaptic response dynamics during action potential trains // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2022. – V. 119. – № 5. – P. e2114469119.
565. Tran-Van-Minh A., De Waard M., Weiss N. Cav $\beta$  surface charged residues contribute to the regulation of neuronal calcium channels // *Mol. Brain.* – 2022. – V. 15. – № 1. – P. 1–5.
566. Tsao H.K., Chiu P.H., Sun S.H. PKC-dependent ERK phosphorylation is essential for P2X7 receptor-mediated neuronal differentiation of neural progenitor cells // *Cell Death Dis.* – 2013. – V. 4. – № 8. – P. e751–e751.
567. Tsien R.W., Bean B.P., Hess P., Lansman J.B., Nilius B., Nowycky M.C. Mechanisms of calcium channel modulation by  $\beta$ -adrenergic agents and dihydropyridine calcium agonists // *J. Mol. Cell. Cardiol.* – 1986. – V. 18. – № 7. – P. 691–710.
568. Tsui J., Inagaki M., Schulmann H. Calcium/Calmodulin-dependent Protein Kinase II (CaMKII) Localization Acts in Concert with Substrate Targeting to Create Spatial Restriction for Phosphorylation // *J. Biol. Chem.* – 2005. – V. 280. – № 10. – P. 9210–9216.
569. Tsuneki H., Klink R., Léna C., Korn H., Changeux J.P. Calcium mobilization elicited by two types of nicotinic acetylcholine receptors in mouse substantia nigra pars compacta // *Eur. J. Neurosci.* – 2000. – V. 12. – № 7. – P. 2475–2485.
570. Tuluc P., Yarov-Yarovoy V., Benedetti B., Flucher B.E. Molecular Interactions in the Voltage Sensor Controlling Gating Properties of CaV Calcium Channels // *Structure.* – 2016. – V. 24. – № 2. – P. 261–271.
571. Uchida S., Yamamoto H., Iio S., Matsumoto N., Wang X.B., Yonehara N., Imai Y., Inoki R., Yoshida H. Release of calcitonin gene-related peptide-like immunoreactive substance from neuromuscular junction by nerve excitation and its action on striated muscle. // *J. Neurochem.* – 1990. – V. 54. – № 3. – P. 1000–3.

572. Uchitel O.D., Protti D.A., Sanchez V., Cherksey B.D., Sugimori M., Llinas R. P-type voltage-dependent calcium channel mediates presynaptic calcium influx and transmitter release in mammalian synapses // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1992. – V. 89. – № 8. – P. 3330–3333.
573. Unni V.K., Zakharenko S.S., Zablow L., DeCostanzo A.J., Siegelbaum S.A. Calcium Release from Presynaptic Ryanodine-Sensitive Stores Is Required for Long-Term Depression at Hippocampal CA3-CA3 Pyramidal Neuron Synapses // *J. Neurosci.* – 2004. – V. 24. – № 43. – P. 9612–9622.
574. Unwin N., Miyazawa A., Li J., Fujiyoshi Y. Activation of the Nicotinic Acetylcholine Receptor Involves a Switch in Conformation of the  $\alpha$  Subunits // *J. Mol. Biol.* – 2002. – V. 319. – № 5. – P. 1165–1176.
575. Urbano F.J., Depetris R.S., Uchitel O.D. Coupling of L-type calcium channels to neurotransmitter release at mouse motor nerve terminals // *Pflügers Arch.* – 2001. – V. 441. – № 6. – P. 824–831.
576. Urbano F.J., Piedras-Rentería E.S., Jun K., Shin H.S., Uchitel O.D., Tsien R.W. Altered properties of quantal neurotransmitter release at endplates of mice lacking P/Q-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2003. – V. 100. – № 6. – P. 3491–3496.
577. Urbano F.J., Rosato-Siri M.D., Uchitel O.D. Calcium channels involved in neurotransmitter release at adult, neonatal and P/Q-type deficient neuromuscular junctions (Review) // *Mol. Membr. Biol.* – 2002. – V. 19. – № 4. – P. 293–300.
578. Urbano F.J., Uchitel O.D. L-type calcium channels unmasked by cell-permeant  $\text{Ca}^{2+}$  buffer at mouse motor nerve terminals. // *Pflügers Archiv* . – 1999. – V. 437. – № 4. – P. 523–8.
579. Uteshev V.V., Meyer E.M., Papke R.L. Regulation of neuronal function by choline and 4OH-GTS-21 through  $\alpha 7$  nicotinic receptors // *J. Neurophysiol.* – 2003. – V. 89. – № 4. – P. 1797–1806.
580. Van der Kloot W. The regulation of quantal size // *Prog. Neurobiol.* – 1991. – V. 36. – № 2. – P. 93–130.

581. Van der Kloot W., Benjamin W.B., Balezina O.P. Calcitonin gene-related peptide acts presynaptically to increase quantal size and output at frog neuromuscular junctions. // *J. Physiol.* – 1998. – V. 507. – № 3. – P. 689–695.
582. Van der Kloot W., Brănișteanu D.D. Effects of activators and inhibitors of protein kinase A on increases in quantal size at the frog neuromuscular junction. // *Pflügers Archiv.* – 1992. – V. 420. – № 3–4. – P. 336–41.
583. Vandael D., Okamoto Y., Jonas P. Transsynaptic modulation of presynaptic short-term plasticity in hippocampal mossy fiber synapses // *Nat. Commun.* – 2021. – V. 12. – № 1. – P. 2912.
584. Vasileiou E., Montero R.M., Turner C.M., Vergoulas G. P2X(7) receptor at the heart of disease. // *Hippokratia.* – 2010. – V. 14. – № 3. – P. 155–163.
585. Vatanpour H., Harvey A.L. Modulation of acetylcholine release at mouse neuromuscular junctions by interaction of three homologous scorpion toxins with K<sup>+</sup> channels // *Br. J. Pharmacol.* – 1995. – V. 114. – № 7. – P. 1502–1506.
586. Verkhratsky A. Physiology and pathophysiology of the calcium store in the endoplasmic reticulum of neurons // *Physiol. Rev.* – 2005. – V. 85. – № 1. – P. 201–279.
587. Virginio C., MacKenzie A., Rassendren F.A., North R.A., Surprenant A. Pore dilation of neuronal P2X receptor channels // *Nat. Neurosci.* – 1999. – V. 2. – № 4. – P. 315–321.
588. Vizi E.S., Somogyi G.T. Prejunctional modulation of acetylcholine release from the skeletal neuromuscular junction: link between positive (nicotinic)– and negative (muscarinic)-feedback modulation // *Br. J. Pharmacol.* – 1989. – V. 97. – № 1. – P. 65–70.
589. Volonté C., Amadio S., D'Ambrosi N., Colpi M., Burnstock G. P2 receptor web: Complexity and fine-tuning // *Pharmacol. Ther.* – 2006. – V. 112. – № 1. – P. 264–280.
590. Vyleta N.P., Jonas P. Loose coupling between Ca<sup>2+</sup> channels and release sensors at a plastic hippocampal synapse // *Science.* – 2014. – V. 343. – № 6171. – P. 665–670.

591. Wang D., Grillner S., Wallén P. Calcium dynamics during NMDA-induced membrane potential oscillations in lamprey spinal neurons - contribution of L-type calcium channels (CaV1.3) // *J. Physiol.* – 2013. – V. 591. – № 10. – P. 2509–2521.
592. Wang L.Y., Augustine G.J. Presynaptic nanodomains: A tale of two synapses // *Front. Cell. Neurosci.* – 2015. – V. 8. – P. 455.
593. Wang S., Stanika R.I., Wang X., Hagen J., Kennedy M.B., Obermair G.J., Colbran R.J., Lee A. Densin-180 controls the trafficking and signaling of L-Type voltage-gated Cav1.2 Ca<sup>2+</sup> channels at excitatory synapses // *J. Neurosci.* – 2017. – V. 37. – № 18. – P. 4679–4691.
594. Wang X., Burke S.R.A., Talmadge R.J., Voss A.A., Rich M.M. Depressed neuromuscular transmission causes weakness in mice lacking BK potassium channels // *J. Gen. Physiol.* – 2020. – V. 152. – № 5. – P. e201912526.
595. Wang X., Marks C.R., Perfitt T.L., Nakagawa T., Lee A., Jacobson D.A., Colbran R.J. A novel mechanism for Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II targeting to L-type Ca<sup>2+</sup> channels that initiates longrange signaling to the nucleus // *J. Biol. Chem.* – 2017. – V. 292. – № 42. – P. 17324–17336.
596. Wang X., McIntosh J.M., Rich M.M. Muscle Nicotinic Acetylcholine Receptors May Mediate Trans-Synaptic Signaling at the Mouse Neuromuscular Junction // *J. Neurosci.* – 2018. – V. 38. – № 7. – P. 1725–1736.
597. Wang X., Pinter M.J., Rich M.M. Ca<sup>2+</sup> dependence of the binomial parameters p and n at the mouse neuromuscular junction // *J. Neurophysiol.* – 2010. – V. 103. – № 2. – P. 659–666.
598. Wang X., Wang Q., Engisch K.L., Rich M.M. Activity-dependent regulation of the binomial parameters p and n at the mouse neuromuscular junction in vivo // *J. Neurophysiol.* – 2010. – V. 104. – № 5. – P. 2352–2358.
599. Wang Y., Rowan M.J., Anwyl R. Induction of LTD in the dentate gyrus in vitro is NMDA receptor independent, but dependent on Ca<sup>2+</sup> influx via low-voltage-activated Ca<sup>2+</sup> channels and release of Ca<sup>2+</sup> from intracellular stores // *J. Neurophysiol.* – 1997. – V. 77. – № 2. – P. 812–825.

600. Wang Z.W. Regulation of synaptic transmission by presynaptic CAMKII and BK channels // *Mol. Neurobiol.* – 2008. – V. 38. – № 2. – P. 153–166.
601. Watkins H.A., Rathbone D.L., Barwell J., Hay D.L., Poyner D.R. Structure-activity relationships for  $\alpha$ -calcitonin gene-related peptide // *Br. J. Pharmacol.* – 2013. – V. 170. – № 7. – P. 1308–1322.
602. Wei Z.Y., Qu H.L., Dai Y.J., Wang Q., Ling Z.M., Su W.F., Zhao Y.Y., Shen W.X., Chen G. Pannexin 1, a large-pore membrane channel, contributes to hypotonicity-induced ATP release in Schwann cells // *Neural Regen. Res.* – 2021. – V. 16. – № 5. – P. 899–904.
603. Weiss N., Zamponi G.W. T-type calcium channels: From molecule to therapeutic opportunities // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* – 2019. – V. 108. – P. 34–39.
604. Welsby P., Rowan M., Anwyl R. Nicotinic receptor-mediated enhancement of long-term potentiation involves activation of metabotropic glutamate receptors and ryanodine-sensitive calcium stores in the dentate gyrus // *Eur. J. Neurosci.* – 2006. – V. 24. – № 11. – P. 3109–3118.
605. Westenbroek R.E., Hoskins L., Catterall W.A. Localization of Ca<sup>2+</sup> channel subtypes on rat spinal motor neurons, interneurons, and nerve terminals // *J. Neurosci.* – 1998. – V. 18. – № 16. – P. 6319–6330.
606. Westrum L.E., Gray E.G. New observations on the substructure of the active zone of brain synapses and motor endplates // *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* – 1986. – V. 229. – № 1254. – P. 29–38.
607. Wilkaniec A., Gąssowska M., Czapski G.A., Cieślik M., Sulkowski G., Adamczyk A. P2X7 receptor-pannexin 1 interaction mediates extracellular alpha-synuclein-induced ATP release in neuroblastoma SH-SY5Y cells // *Purinergic Signal.* – 2017. – V. 13. – № 3. – P. 347–361.
608. Williams A.J., Thomas N.L., George C.H. The ryanodine receptor: advances in structure and organization // *Curr. Opin. Physiol.* – 2018. – V. 1. – P. 1–6.
609. Williams D.J., Sidaway P., Cunnane T.C., Brain K.L. Mechanisms Involved in Nicotinic Acetylcholine Receptor-Induced Neurotransmitter Release from

- Sympathetic Nerve Terminals in the Mouse Vas Deferens // PLoS One. – 2011. – V. 6. – № 12. – P. 29209.
610. Wirkner K., Köfalvi A., Fischer W., Günther A., Franke H., Gröger-Arndt H., Nörenberg W., Madarász E., Vizi E.S., Schneider D., Sperlágh B., Illes P. Supersensitivity of P2X7 receptors in cerebrocortical cell cultures after in vitro ischemia // J. Neurochem. – 2005. – V. 95. – № 5. – P. 1421–1437.
611. Woll K.A., Van Petegem F. Calcium-release channels: Structure and function of IP3 receptors and ryanodine receptors // Physiol. Rev. – 2022. – V. 102. – № 1. – P. 209–268.
612. Wong M.Y., Shakiryanova D., Levitan E.S. Presynaptic Ryanodine Receptor–CamKII Signaling is Required for Activity-dependent Capture of Transiting Vesicles // J. Mol. Neurosci. – 2009. – V. 37. – № 2. – P. 146–150.
613. Wright M.C., Potluri S., Wang X., Dentcheva E., Gautam D., Tessler A., Wess J., Rich M.M., Son Y.J. Distinct muscarinic acetylcholine receptor subtypes contribute to stability and growth, but not compensatory plasticity, of neuromuscular synapses // J. Neurosci. – 2009. – V. 29. – № 47. – P. 14942–14955.
614. Wu J., Lukas R.J. Naturally-expressed nicotinic acetylcholine receptor subtypes // Biochem. Pharmacol. – 2011. – V. 82. – № 8. – P. 800–807.
615. Wu L., Bauer C.S., Zhen X., Xie C., Yang J. Dual regulation of voltage-gated calcium channels by PtdIns(4, 5)P2 // Nature. – 2002. – V. 419. – № 6910. – P. 947–952.
616. Wu Y., Whiteus C., Xu C.S., Hayworth K.J., Weinberg R.J., Hess H.F., De Camilli P. Contacts between the endoplasmic reticulum and other membranes in neurons // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2017. – V. 114. – № 24. – P. E4859–E4867.
617. Wu Z.Z., Li D.P., Chen S.R., Pan H.L. Aminopyridines potentiate synaptic and neuromuscular transmission by targeting the voltage-activated calcium channel  $\beta$  subunit // J. Biol. Chem. – 2009. – V. 284. – № 52. – P. 36453–36461.



618. Wyatt R.M., Balice-Gordon R.J. Heterogeneity in synaptic vesicle release at neuromuscular synapses of mice expressing synaptopHluorin // *J. Neurosci.* – 2008. – V. 28. – № 1. – P. 325–335.
619. Xu J., He L., Wu L.G. Role of Ca(2+) channels in short-term synaptic plasticity // *Curr. Opin. Neurobiol.* – 2007. – V. 17. – № 3. – P. 352–359.
620. Xu W., Lipscombe D. Neuronal Cav1.3 $\alpha$ 1 L-type channels activate at relatively hyperpolarized membrane potentials and are incompletely inhibited by dihydropyridines // *J. Neurosci.* – 2001. – V. 21. – № 16. – P. 5944–5951.
621. Xu Y., Halievski K., Henley C., Atchison W.D., Katsuno M., Adachi H., Sobue G., Marc Breedlove S., Jordan C.L. Defects in Neuromuscular Transmission May Underlie Motor Dysfunction in Spinal and Bulbar Muscular Atrophy // *J. Neurosci.* – 2016. – V. 36. – № 18. – P. 5094–5106.
622. Xu Y.F., Hewett S.J., Atchison W.D. Passive transfer of Lambert-Eaton Myasthenic Syndrome induces dihydropyridine sensitivity of I(Ca) in mouse motor nerve terminals // *J. Neurophysiol.* – 1998. – V. 80. – № 3. – P. 1056–1069.
623. Xu Z.-Q., Zhang W.-J., Su D.-F., Zhang G.-Q., Miao C.-Y. Cellular responses and functions of  $\alpha$ 7 nicotinic acetylcholine receptor activation in the brain: a narrative review // *Ann. Transl. Med.* – 2021. – V. 9. – № 6. – P. 509–509.
624. Yakel J.L. Calcineurin regulation of synaptic function: from ion channels to transmitter release and gene transcription. // *Trends Pharmacol. Sci.* – 1997. – V. 18. – № 4. – P. 124–134.
625. Yakel J.L. Cholinergic receptors: Functional role of nicotinic ACh receptors in brain circuits and disease // *Pflügers Arch.* – 2013. – V. 465. – № 4. – P. 441–450.
626. Yakel J.L. Nicotinic ACh receptors in the hippocampal circuit; functional expression and role in synaptic plasticity // *J. Physiol.* – 2014. – V. 592. – № 19. – P. 4147–4153.

627. Yang T., Xiao T., Sun Q., Wang K. The current agonists and positive allosteric modulators of  $\alpha 7$  nAChR for CNS indications in clinical trials // *Acta Pharm. Sin. B.* – 2017. – V. 7. – № 6. – P. 611–622.
628. Yasuda R., Hayashi Y., Hell J.W. CaMKII: a central molecular organizer of synaptic plasticity, learning and memory // *Nat. Rev. Neurosci.* – 2022. – V. 23. – № 11. – P. 666–682.
629. Yokoyama C.T., Myers S.J., Fu J., Mockus S.M., Scheuer T., Catterall W.A. Mechanism of SNARE protein binding and regulation of Ca v2 channels by phosphorylation of the synaptic protein interaction site // *Mol. Cell. Neurosci.* – 2005. – V. 28. – № 1. – P. 1–17.
630. Yuhas W.A., Fuchs P.A. Apamin-sensitive, small-conductance, calcium-activated potassium channels mediate cholinergic inhibition of chick auditory hair cells // *J. Comp. Physiol. A.* – 1999. – V. 185. – № 5. – P. 455–462.
631. Zalcmán G., Federman N., Romano A. CaMKII isoforms in learning and memory: Localization and function // *Front. Mol. Neurosci.* – 2018. – V. 11. – P. 445.
632. Zamponi G.W., Bourinet E., Nelson D., Nargeot J., Snutch T.P. Crosstalk between G proteins and protein kinase C mediated by the calcium channel  $\alpha 1$  subunit // *Nature.* – 1997. – V. 385. – № 6615. – P. 442–446.
633. Zamponi G.W., Currie K.P.M. Regulation of CaV2 calcium channels by G protein coupled receptors // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2013. – V. 1828. – № 7. – P. 1629–1643.
634. Zamponi G.W., Striessnig J., Koschak A., Dolphin A.C. The physiology, pathology, and pharmacology of voltage-gated calcium channels and their future therapeutic potential // *Pharmacol. Rev.* – 2015. – V. 67. – № 4. – P. 821–870.
635. Zhang C., Wu B., Beglopoulos V., Wines-Samuelson M., Zhang D., Dragatsis I., Südhof T.C., Shen J. Presenilins are Essential for Regulating Neurotransmitter Release // *Nature.* – 2009. – V. 460. – № 7255. – P. 632.

636. Zhang H., Dong H., Lei S. Neurotensinergic augmentation of glutamate release at the perforant path-granule cell synapse in rat dentate gyrus: Roles of L-Type  $\text{Ca}^{2+}$  channels, calmodulin and myosin light-chain kinase // *Neuropharmacology*. – 2015. – V. 95. – P. 252–260.
637. Zhang M., Augustine G.J. Synapsins and the Synaptic Vesicle Reserve Pool: Floats or Anchors? // *Cells*. – 2021. – V. 10. – № 3. – P. 658.
638. Zhang Y., Chen Y.H., Bangaru S.D., He L., Abele K., Tanabe S., Kozasa T., Yang J. Origin of the voltage dependence of G-protein regulation of P/Q-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels // *J. Neurosci.* – 2008. – V. 28. – № 52. – P. 14176–14188.
639. Zhao F., Li P., Chen S.R.W., Louis C.F., Fruen B.R. Dantrolene inhibition of ryanodine receptor  $\text{Ca}^{2+}$  release channels. Molecular mechanism and isoform selectivity // *J. Biol. Chem.* – 2001. – V. 276. – № 17. – P. 13810–13816.
640. Zhao Y.F., Tang Y., Illes P. Astrocytic and Oligodendrocytic P2X7 Receptors Determine Neuronal Functions in the CNS // *Front. Mol. Neurosci.* – 2021. – V. 14. – P. 641570.
641. Zhilyakov N., Arkhipov A., Malomouzh A., Samigullin D. Activation of Neuronal Nicotinic Receptors Inhibits Acetylcholine Release in the Neuromuscular Junction by Increasing  $\text{Ca}^{2+}$  Flux through Cav1 Channels // *Int. J. Mol. Sci.* – 2021. – V. 22. – № 16. – P. 9031.
642. Zhong C., Talmage D.A., Role L.W. Nicotine Elicits Prolonged Calcium Signaling along Ventral Hippocampal Axons // *PLoS One*. – 2013. – V. 8. – № 12. – P. e82719.
643. Zhong H., Yokoyama C.T., Scheuer T., Catterall W.A. Reciprocal regulation of P/Q-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels by SNAP-25, syntaxin and synaptotagmin [1] // *Nat. Neurosci.* – 1999. – V. 2. – № 11. – P. 939–941.
644. Ziganshin A.U., Khairullin A.E., Hoyle C.H.V., Grishin S.N. Modulatory Roles of ATP and Adenosine in Cholinergic Neuromuscular Transmission // *Int. J. Mol. Sci.* – 2020. – V. 21. – № 17. – P. 6423.

645. Zoli M., Pistillo F., Gotti C. Diversity of native nicotinic receptor subtypes in mammalian brain // *Neuropharmacology*. – 2015. – V. 96. – № Pt B. – P. 302–311.
646. Zoli M., Pucci S., Vilella A., Gotti C. Neuronal and Extraneuronal Nicotinic Acetylcholine Receptors // *Curr. Neuropharmacol.* – 2018. – V. 16. – № 4. – P. 338–349.
647. Zucchi R., Ronca-Testoni S. The sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> channel/ryanodine receptor: modulation by endogenous effectors, drugs and disease states // *Pharmacol. Rev.* – 1997. – V. 49. – № 1. – P. 1–51.
648. Zuccotti A., Clementi S., Reinbothe T., Torrente A., Vandael D.H., Pirone A. Structural and functional differences between L-type calcium channels: Crucial issues for future selective targeting // *Trends Pharmacol. Sci.* – 2011. – V. 32. – № 6. – P. 366–375.
649. Zucker R.S., Regehr W.G. Short-term synaptic plasticity // *Annu. Rev. Physiol.* – 2002. – V. 64. – P. 355–405.
650. Zühlke R.D., Pittt G.S., Deisseroth K., Tsien R.W., Reuter H. Calmodulin supports both inactivation and facilitation of L-type calcium channels // *Nature*. – 1999. – V. 399. – № 6732. – P. 159–162.