

**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 человека и животных

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Москва – 2023

Работа выполнена на кафедре физиологии человека и животных биологического факультета Федерального государственного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»

**Научный
консультант**

Балезина Ольга Петровна – доктор биологических наук,
профессор

**Официальные
оппоненты**

Шаронова Ирина Николаевна – доктор биологических наук, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение Научный центр неврологии, Институт мозга, Лаборатория функциональной синаптологии, ведущий научный сотрудник

Ситдикова Гузель Фаритовна – доктор биологических наук, профессор, Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования "Казанский (Приволжский) федеральный университет", Институт фундаментальной медицины и биологии, кафедра физиологии человека и животных, заведующий

Мальшиев Алексей Юрьевич – доктор биологических наук, профессор Российской Академии Наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт Высшей Нервной Деятельности и Нейрофизиологии РАН, директор

Защита диссертации состоится «17» апреля 2023 г. в 15:30 на заседании диссертационного совета МГУ.015.7 Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова по адресу: 119234, Россия, Москва, Ленинские горы, д.1, строение 12, биологический факультет МГУ, аудитория 389.

E-mail: bellaum@mail.ru

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В.Ломоносова (Ломоносовский проспект, д. 27) и на сайте ИАС «ИСТИНА»: <https://istina.msu.ru/dissertations/525955766/>

Автореферат разослан «17» февраля 2023 г.

Ученый секретарь диссертационного совета

МГУ.015.7 (МГУ.03.06), доктор биологических наук

Б.А. Умарова



ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

Роль ионов кальция (Ca^{2+}), входящих снаружи в нервные терминали синапсов и приводящих к выбросу нейротрансмиттера, впервые была обнаружена в нервно-мышечных синапсах скелетных мышц [Katz, Miledi, 1965, 1967]. В настоящее время вход ионов Ca^{2+} по определенным пресинаптическим потенциал-зависимым 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 Ca^{2+} -сигналов в нейронах и других клетках весьма разнообразен. В постсинаптических структурах синапсов ЦНС подробно описана пространственно-временная организация 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 Ca^{2+} -зависимой пресинаптической пластичности, такие как Ca^{2+} -зависимое облегчение, депрессия, посттетаническая потенциация [Foster, McNaughton, 1991; Korogod et al., 2007; Quinlan, Hirasawa, 2013; Xu et al., 2007]. Однако, источники регуляторного Ca^{2+} в таких случаях часто остаются неясными, либо – по умолчанию – приписываются Ca^{2+} , входящему в нервные терминали по основному, триггерному Ca^{2+} -входу [Catterall, Few, 2008]. Между тем, в последние годы идентифицирован целый ряд других путей и возможностей локального повышения уровня Ca^{2+} в нервных терминалях. Это и активность разнообразных пресинаптических потенциал-зависимых Ca^{2+} -каналов, отличных от триггерного Ca^{2+} -входа [Brimblecombe et al., 2015; Striessnig et al., 2014], и пресинаптические Ca^{2+} -проводящие ионотропные хеморецепторы [Moore et al., 2005; Yakel, 2014], и выброс Ca^{2+} из внутриклеточных Ca^{2+} -депо по каналам рианодиновых (РиР) или IP_3 -рецепторов [Bouchard et al., 2003; de Juan-Sanz et al., 2017]. Как правило, такие Ca^{2+} -входы рассматривают как вспомогательный источник ионов Ca^{2+} для усиления триггерного Ca^{2+} -сигнала в терминалях. Способны ли такие Ca^{2+} -входы обеспечивать дифференцированную регуляцию параметров квантовой секреции нейротрансмиттера как в сторону ее усиления, так и торможения – остается малоизученным. Решение этих вопросов - выявление спектра регуляторных 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 Ca^{2+} -входов и мишеней ионов 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 Ca^{2+} -входом (по потенциал-зависимым Ca^{2+} -каналам P/Q-типа), описан ряд других потенциал-зависимых Ca^{2+} -каналов [Kaja et al., 2006; Nishimune, 2012; Nudler et al., 2003; Pagani et al., 2004; Pardo

et al., 2006]. Среди них особый интерес представляют «медленные» Ca^{2+} -каналы L-типа, роль и условия активации которых в нервно-мышечных синапсах - малоизучены. Не ясен спектр регуляторных возможностей ионов Ca^{2+} , поступающего из пресинаптических Ca^{2+} -депо по каналам P/Q . Нуждается в исследовании и регуляторная активность ионов Ca^{2+} , поступающего по Ca^{2+} -проводящим хемоактивируемым каналам пресинаптических никотиновых холинорецепторов альфа7-типа ($\alpha 7$ -нХР) и P2X7 -рецепторов АТФ. В качестве потенциальных мишеней разных Ca^{2+} -сигналов обсуждаются имеющиеся здесь многочисленные Ca^{2+} -регулируемые канальные и другие белки, а также 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 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 Ca^{2+} -входов, их функционального сопряжения с определенными 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 Ca^{2+} -входов – по быстрым Ca^{2+} -каналам P/Q -типа и медленным Ca^{2+} -каналам L-типа в регуляции параметров квантовой секреции АХ в моторных синапсах мышцы.
2. Выявить способы регуляции Ca^{2+} -входа по потенциал-зависимым Ca^{2+} -каналам L-типа
3. Выявить роль Ca^{2+} , внутритерминально высвобождаемого из рианодин-чувствительных Ca^{2+} -депо в регуляции вызванной секреции АХ и спонтанной одноквантовой секреции АХ и размера одиночных квантов АХ.
4. Выявить роль Ca^{2+} -сигналов, поступающих по хемоактивируемым 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 Ca^{2+} , поступающими в нервную терминаль по определенным Ca^{2+} -входам: а) протеинкиназы С (РКС), кальций/кальмодулин-зависимой киназы II типа (СаМКII), кальций-зависимой фосфатазы кальцинейрина (СаN); б) Ca^{2+} -активируемым K^+ -каналам высокой (ВК-типа) и низкой (СК-типа) проводимости.
6. Описать сопряжение определенных пресинаптических 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 Ca^{2+} -каналов L-типа; описан баланс воздействий, контролирующих статус L-типа Ca^{2+} -каналов: активирующих - со стороны аденозиновых рецепторов

A_{2A}-типа, протеинкиназы А (РКА), РКС; и тормозных – со стороны аденозиновых A₁-рецепторов, P2Y₁₃-рецепторов АТФ, CaN и BK-каналов. Впервые выявлены сигнальные каскады, следующие за входом ионов Ca²⁺ по L-типу Ca²⁺-каналов, и облегчающие секрецию АХ с участием РКС и CaMKII. Впервые установлено, что вовлечение Ca²⁺-каналов L-типа в регуляцию секреции АХ облегчает вызванный выброс квантов АХ по механизму, отличному от лежащего в основе потенцирования секреции АХ при усилении Ca²⁺-входа по триггерным Ca²⁺-каналам P/Q-типа - вход ионов Ca²⁺ по L-типу Ca²⁺-каналов обеспечивает возрастание размера пула синаптических везикул, готовых к высвобождению АХ, а не вероятности выброса АХ. Впервые в моторных синапсах мышцы описана роль пресинаптической Ca²⁺-зависимой фосфатазы CaN, ее способность контролировать работу L-типа Ca²⁺-каналов во взаимодействии с аденозиновыми A₂-рецепторами и РКА.

Впервые описана возможность двунаправленных регуляторных воздействий на секрецию АХ при выбросе депонированного Ca²⁺ через РиР: направленность действия зависит от способов активации этих рецепторов со стороны разных Ca²⁺-входов - по P/Q- и L-типам Ca²⁺-каналов или каналов α7-нХР.

Впервые показано обязательное участие РиР/депонированный Ca²⁺/CaMKII в секреции кальцитонин ген-родственного пептида (КГРП) для последующего потенцирования размера квантов АХ.

Впервые описаны условия активации пресинаптических α7-нХР экзогенным и эндогенным АХ/холином. Раскрыта роль пресинаптических α7-нХР в аутоингибировании вызванной квантовой секреции АХ по механизму отрицательной обратной связи с участием РиР, CaMKII и Ca²⁺-активируемых калиевых каналов SK-типа. Впервые показана возможность значительно ослабить тетаническую депрессию синаптической передачи в нервно-мышечных синапсах путем блокирования α7-нХР, РиР и SK-каналов.

Впервые описаны условия растормаживания P2X₇-рецепторов АТФ и роль ионов Ca²⁺, поступающего по ним, в активации CaMKII и растормаживании Ca²⁺-каналов L-типа с последующим усилением вызванной секреции АХ.

Впервые показана возможность избирательного вовлечения CaMKII при активации этой протеинкиназы со стороны различных Ca²⁺-входов в разные, противоположно направленные воздействия на секрецию АХ: а) в усиление вызванного выброса АХ при растормаживании L-типа Ca²⁺-каналов; б) в торможение вызванного выброса АХ при активации α7-нХР; в) в осуществление РиР-зависимой секреции эндогенного КГРП; г) в опосредованное активацией P2X₇ рецепторов растормаживание L-типа Ca²⁺-каналов с последующим потенцированием вызванного выброса АХ.

Теоретическая и практическая значимость работы

Результаты работы открывают новые направления в исследованиях Ca²⁺-зависимых регуляторных контуров, управляющих квантовой секрецией АХ в моторных синапсах. Наряду с общеизвестным триггерным Ca²⁺-входом (по P/Q-типу Ca²⁺-каналов), описан вклад четырех других источников повышения пресинаптического Ca²⁺ – за счет входа Ca²⁺ по потенциал-зависимым Ca²⁺-каналам L-типа, РиР, P2X₇-рецепторам и α7-нХР. Раскрыта индивидуальная роль каждого Ca²⁺-входа в регуляции определенных Ca²⁺-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 Ca^{2+} -входа.

Полученные данные представляют большую научную ценность как основа для модели комплексной 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 Ca^{2+} -входов и их мишеней, позволяющем обеспечить избирательность Ca^{2+} -регуляции отдельных процессов и функций моторной нервной терминали. Представлены доказательства в пользу специфической локализации и функционирования потенциал-зависимых Ca^{2+} -каналов L-типа, Ca^{2+} -активируемых K^+ -каналов BK- и SK-типов, вероятной компартиментализации Ca^{2+} -зависимых ферментов – РКС, СаМКII, СаN, сопряженных функционально с определенными пресинаптическими Ca^{2+} -входами. Кроме того, научная ценность данной работы заключается в раскрытии новых ауторегуляторных механизмов, контролирующих активность моторных синапсов (с участием $\alpha 7$ -нХР, SK-каналов, РиР, Ca^{2+} -каналов L-типа, СаМКII и др.). Представлена модель избирательного вовлечения одного и того же фермента – СаМКII – в разные, зачастую противоположно направленные воздействия на квантовую секрецию АХ в моторных синапсах при активации со стороны разных источников ионов 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 $\text{A}_{2\text{A}}$ -рецепторов аденозина, ингибиторы СаN и др.

Положения, выносимые на защиту

1. В нервно-мышечных синапсах мышцы существует система разнонаправленной регуляции потенциал-зависимых Ca^{2+} -каналов L-типа, обеспечиваемая функционированием пресинаптических метаботропных рецепторов, ферментов и ионных каналов. В случае растормаживания L-типа Ca^{2+} -каналов (независимо от способа), их активность сопряжена с активацией РиР, выбросом депонированного Ca^{2+} и вовлечением Ca^{2+} -зависимых ферментов в усиление квантовой секреции АХ.
2. В моторных синапсах мышцы обязательно участие РиР и депонированного Ca^{2+} в СаМКII-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 Ca^{2+} -каналов.
4. В ритмически активных моторных синапсах имеет место активация ионотропных P2X7-рецепторов АТФ и вход ионов Ca^{2+} по каналам этих рецепторов. В условиях ослабления тормозных пресинаптических пуринергических воздействий активация P2X7-рецепторов может приводить к активации СаМКII и L-типа Ca^{2+} -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 $\alpha 7$ -нХР во взаимодействии с РиР, СаМКП и СК-каналами. Долговременная тетаническая депрессия синаптической передачи практически наполовину снижается путем избирательного ингибирования $\alpha 7$ -нХР, РиР или СК-каналов.
6. В моторных синапсах мышцы возможен запуск активности пресинаптической СаМКП и ее противоположно направленных (усиливающих либо подавляющих) воздействий на квантовую секрецию АХ, в зависимости от условий активации этой протеинкиназы со стороны трех разных источников поступления ионов Ca^{2+} 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 XXIII 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 308 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.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В экспериментах были использованы мыши обоих полов линий BALB/C, 129/Sv и C57Bl/6 в возрасте 5-8 недель.

Экспериментальная модель зрелых нервно-мышечных синапсов.

Эксперименты проводили на изолированных нервно-мышечных препаратах диафрагмальной мышцы (*m. diaphragma - n. phrenicus*). Содержание животных и экспериментальные процедуры осуществлялось в соответствии с директивой 86/609/ЕЕС по обращению человека с лабораторными животными, корм и вода предоставлялись *ad libitum*. Мыши умерщвлялись посредством быстрого обезглавливания. Декапитированное животное помещали на препаровальном столике вентральной стороной вверх, вскрывали брюшную и грудную полости. После этого отпрепаровывали веточку диафрагмального нерва. 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.

Электрофизиология

Все эксперименты проводились при температуре 20-22°C. Изолированный нервно-мышечный препарат левой половины диафрагмы с диафрагмальным нервом помещали в экспериментальную камеру объемом 3 мл, растягивали и перфузировали оксигенированным (95% O₂, 5% CO₂) физиологическим раствором Лайли (pH 7.2-7.4), содержащим (мМ): NaCl – 135, KCl – 4, NaH₂PO₄ – 0.9, CaCl₂ – 2, MgCl₂ – 1, NaHCO₃ – 16.3, глюкоза – 11. При исследовании только спонтанной активности моторных синапсов использовали интактный препарат. Спонтанную секрецию квантов АХ в виде миниатюрных потенциалов концевой пластинки (МПКП) регистрировали в течение 120-180 с. При регистрации вызванной активности моторных синапсов сначала проводили процедуру поперечного рассечения мышечных волокон, используя стандартный протокол [Flink, Atchison, 2003]. 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 ПД моторных аксонов. В результате значение мембранного потенциала устанавливалось на более низком уровне по сравнению с нерассеченными волокнами.

Внутриклеточную регистрацию спонтанных 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) и 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. 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.

Регистрация кратковременной ритмической активности моторных синапсов. Кратковременная ритмическая активность синапсов исследовалась при стимуляции нерва короткими залпами сверхпороговых импульсов (50 стимулов с частотой 50 Гц). Такая высокочастотная стимуляция напоминает паттерн разрядки мотонейронов *in vivo* и отличается характерными изменениями амплитуды и квантового состава ПКП по ходу залпа [Slater, 2015]. В ходе эксперимента между стимуляциями делали перерывы не менее 4 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.

Регистрация длительной тетанической активности моторных синапсов. 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.

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

Анализ данных

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

Расчет квантовых параметров секреции нейротрансммитера. Оценивали МП мышечных волокон, амплитуду и временной ход МПКП и ПКП, 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 препаратах. Квантовый состав ПКП рассчитывали

как отношение средней стандартизованной и скорректированной на нелинейную сумму амплитуды ПКП [McLachlan, Martin, 1981; Flink, Atchison, 2003] к средней стандартизованной амплитуде МПКП.

Размер пула готовых к выбросу везикул (RRP - англ. Ready Releasable Pool) оценивали, используя последовательную модель, предполагающую, что снижение квантового состава ПКП в начале залпа отражает непрерывное истощение RRP при высокочастотной ритмической активности моторных синапсов, и возникновение фазы плато в конце короткого залпа ПКП за счет компенсации истощения RRP рекрутированием в него синаптических везикул [Ruiz et al., 2011]. Используя линейную регрессию на начальном этапе депрессии передачи (6-10 ПКП), проводили пересечение с осью x (кумулятивный квантовый состав в коротком залпе ПКП). Первый и несколько последующих ПКП в самом начале залпа, где присутствовало облегчение передачи, не учитывались при расчете размера RRP [Ruiz et al., 2011] (рис. 1). Вероятность выброса квантов АХ (p – англ. probability) рассчитывали как отношение квантового состава первого ПКП в залпе к значению RRP [Ruiz et al., 2011].

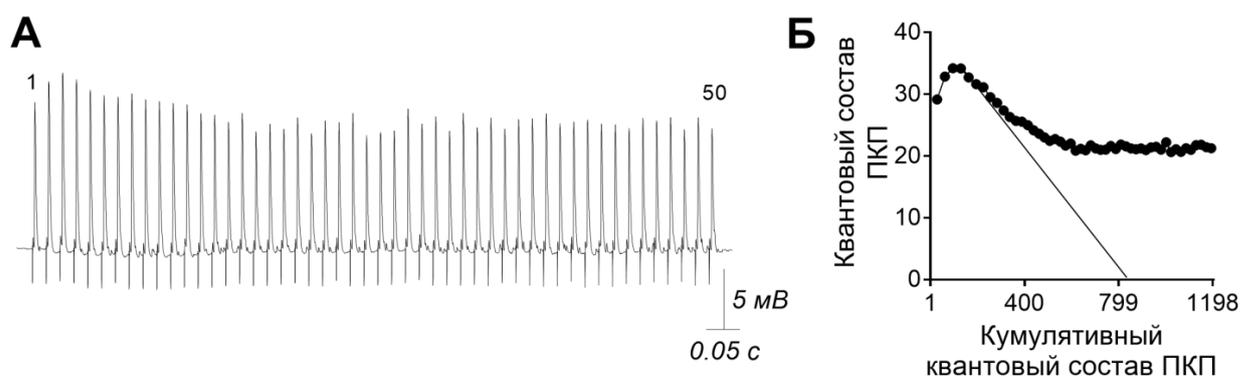


Рис. 1. (А) Пример оригинальных записей ПКП в коротком высокочастотном залпе (50 Гц, 1 с). (Б) График квантового состава ПКП по ходу залпа в зависимости от кумулятивного квантового состава ПКП. Пересечение с осью X, экстраполированное из начальной фазы депрессии, отражает размер RRP.

Статистическая обработка.

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 ПКП в случае нормально-распределенных величин применяли t-критерий Стьюдента или однофакторный дисперсионный анализ с апостериорным тестом Холм-Сидака, в случае распределения отличающегося от нормального в одной из выборок – критерий Манна-Уитни или критерий Краскелла-Уоллеса с апостериорным тестом Данна. Критерий Колмогорова-Смирнова применяли при оценивании кумулятивной вероятности распределения амплитуд МПКП. Для анализа амплитуды и квантового состава ПКП применяли двухфакторный дисперсионный анализ с последующим применением апостериорного критерия Бонферрони. Данные представлены 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).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Роль Ca^{2+} -входа по Ca^{2+} -каналам L-типа в регуляции квантовой секреции АХ

Потенциал-зависимые Ca^{2+} -каналы L-типа обнаружены в составе функционально зрелых нервных терминалей моторных синапсов сравнительно недавно [Urbano, Uchitel, 1999]. Оказалось, что при обычных режимах вызванной активности моторных синапсов этот Ca^{2+} -вход находится в неактивном (заторможенном) состоянии [Giovannini et al., 2002]. Однако в случае растормаживания активности Ca^{2+} -каналов L-типа (с помощью специальных процедур) и входа Ca^{2+} по ним в терминали, наблюдается прирост квантового состава одиночных ПКП в моторных синапсах мыши [Atchison, O'Leary, 1989; Urbano et al., 2001]. При этом механизмы облегчения выброса АХ при подключении этого Ca^{2+} -входа по сравнению с действием основного триггерного входа Ca^{2+} по P/Q-типу Ca^{2+} -каналов в моторных синапсах оставались не изученными, как при одиночной, так и вызванной залповой активности синапсов. Блокирование Ca^{2+} -каналов L-типа с помощью верапамила (5 мкМ), нифедипина (10 мкМ), нитрендипина (1 или 10 мкМ) не приводило к изменениям амплитуды и квантового состава ПКП в условиях одиночной стимуляции нерва (0.3 Гц), а также при ритмической активности синапсов по всему ходу короткого высокочастотного (50 Гц, 1 с) залпа ПКП (рис. 2).

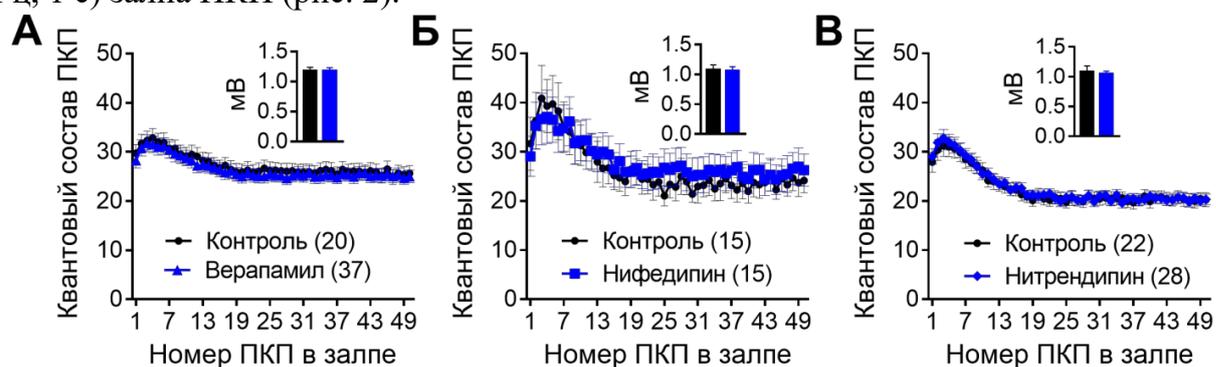


Рис. 2. Изменение квантового состава ПКП по ходу короткого высокочастотного залпа в контроле и под действием блокаторов Ca^{2+} -каналов L-типа: верапамила (5 мкМ) (А); нифедипина (10 мкМ) (Б) и нитрендипина 10 мкМ. На врезках – амплитуда МПКП. В скобках – количество синапсов в соответствующих группах.

Растормаживание Ca^{2+} -каналов L-типа и его последствия. Вовлечение в активность Ca^{2+} -каналов L-типа в моторных терминалях проводили разными способами с последующим сравнением наблюдаемых при этом изменений в квантовой секреции АХ.

Эффекты активатора L-типа Ca^{2+} -каналов S(-) Bay K8644. S(-) Bay K8644 (1 мкМ) вызывал 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). Проведенные расчеты показали, что при растормаживании L-типа 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 ± 65.3 в контроле (n=33) до 1241.4 ± 104.0 (n=24, $p < 0.05$), при этом вероятность выброса везикул (p) – 0.034 ± 0.002 не отличалась от контрольных значений – 0.037 ± 0.002 ($p > 0.05$) (рис. 3В).

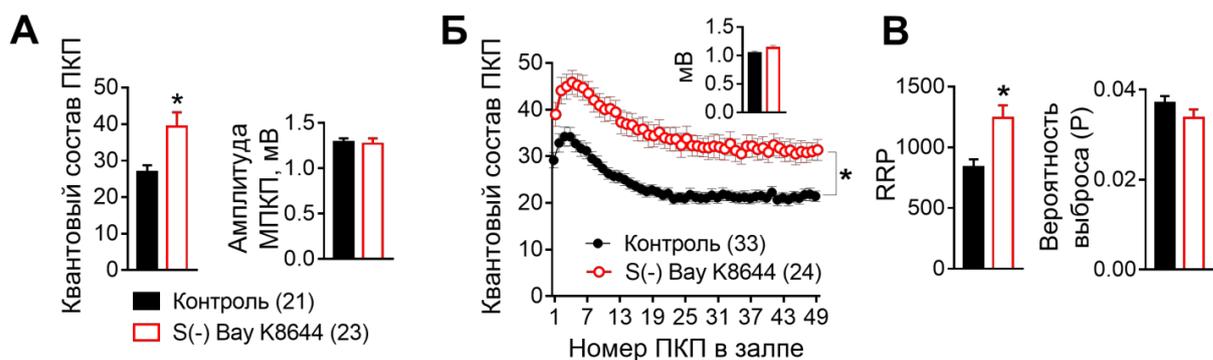


Рис. 3. Активация L-типа Ca^{2+} -каналов потенцирует вызванную секрецию АХ. Квантовый состав ПКП и амплитуда МПКП при одиночной стимуляции (0.3 Гц) (А) и по ходу короткого высокочастотного залпа (50 Гц, 1 с) (Б) в контроле и под действием активатора Ca^{2+} -каналов L-типа S(-) Bay K8644 (1 мкМ). (В)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

Эффекты блокирования Ca^{2+} -активируемых K^+ -каналов ВК-типа. В моторных нервных терминалях Ca^{2+} -активируемые K^+ -каналы высокой проводимости (ВК-каналы) локализованы в активных зонах в контакте с Ca^{2+} -каналами, запускающими секрецию АХ [Katz et al., 1997]. Принято считать, что активация ВК-каналов входящим в терминаль Ca^{2+} -током во время нервного импульса, вызывая гиперполяризацию мембраны, ограничивает дальнейшее поступление ионов Ca^{2+} по потенциал-зависимым Ca^{2+} -каналам по механизму отрицательной обратной связи [Dittrich et al., 2018]. Действительно, блокада ВК-каналов в моторных синапсах сопровождается увеличением Ca^{2+} -сигнала и уровня выброса АХ в ответ на одиночный нервный импульс [Flink, Atchison, 2003]. На фоне блокирования ВК-каналов с помощью ибериотоксина (100 нМ) или паксиллина (5 мкМ) мы также наблюдали значительное увеличение амплитуды и квантового состава ПКП, причем не только одиночных ПКП, но и всех ПКП в составе короткого ритмического залпа. Такой прирост полностью предотвращался предварительным блокированием L-типа Ca^{2+} -каналов верапамилом или нитрендипином (рис. 4). Это означает, что роль ВК-каналов в активных зонах моторных нервных терминалей мышцы предназначена не для ограничения входящего Ca^{2+} -тока по триггерным каналам P/Q-типа, а в удержании в «молчащем» состоянии Ca^{2+} -каналов L-типа, которые, по-видимому, также сближены с ВК-каналами. Согласно выдвинутой нами гипотезе, в моторных синапсах мышцы существует взаимосвязь между активностью двух потенциал-управляемых Ca^{2+} -входов терминалей – по P/Q- и L-типам Ca^{2+} -каналов, осуществляемая с участием ВК-каналов. Вход Ca^{2+} по P/Q-типу каналов в результате пресинаптического ПД активирует ВК-каналы. В свою очередь, их срабатывание предназначено для одновременного подавления активности L-типа Ca^{2+} -каналов. По-видимому, этот тип каналов играет роль резервного (страховочного) Ca^{2+} -входа, необходимого для поддержания секреции АХ в условиях ослабления триггерного Ca^{2+} -входа по P/Q-типу Ca^{2+} -каналов.

Выдвинутые нами представления подтверждаются и данными литературы, поскольку в случаях существенного ослабления активности P/Q-типа Ca^{2+} -каналов в моторных терминалях мышцы при миастенических синдромах [Giovannini et al., 2002] либо при длительной и интенсивной активности моторных терминалей [Perissinotti et al., 2008] наблюдается компенсаторное растормаживание L-типа Ca^{2+} -каналов.

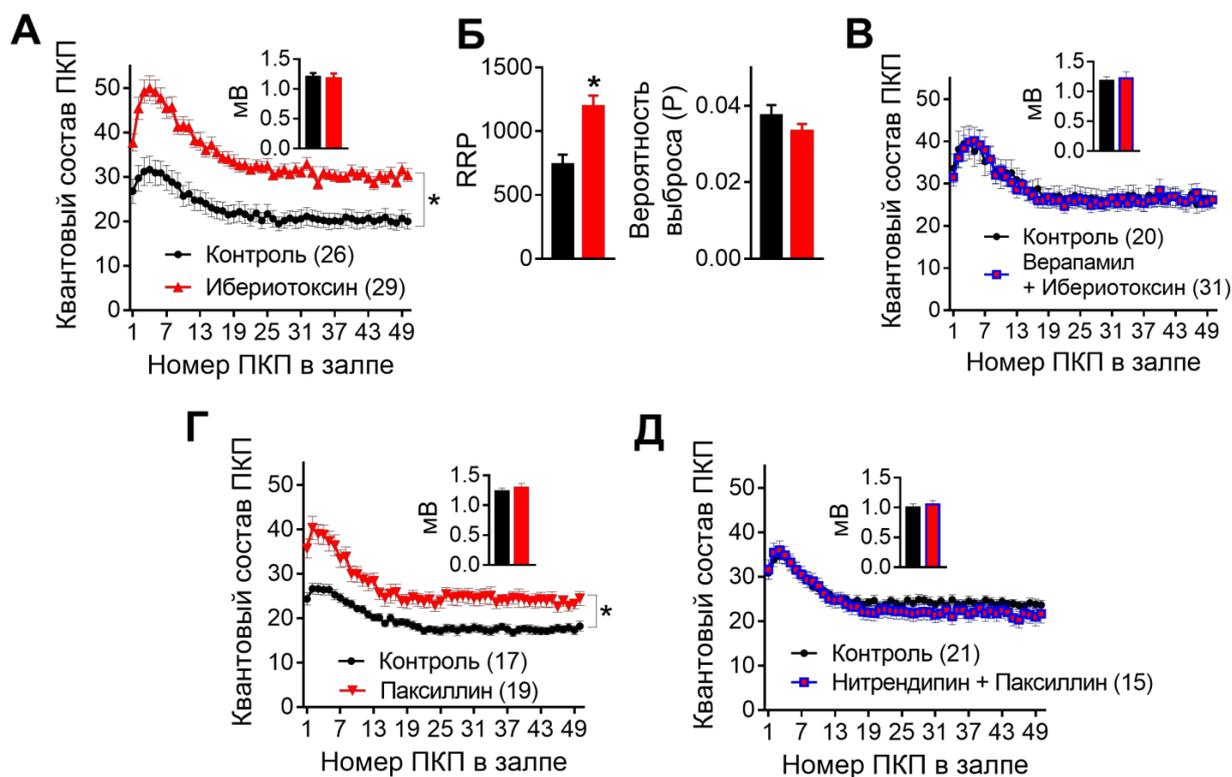


Рис. 4. Блокирование ВК-каналов растормаживает L-тип Ca^{2+} -каналов и потенцирует вызванную секрецию АХ. (А) Изменение квантового состава ПКП по ходу залпа в контроле и под действием блокатора ВК-каналов ибериотоксина (100 нМ). (Б) Блокирование ВК-каналов ибериотоксином увеличивает размер RRP, но не 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. *- $p < 0.05$.

Эффекты блокирования потенциал-зависимых K^+ -каналов. В следующей серии экспериментов попытались установить, происходит ли активация (растормаживание) L-типа Ca^{2+} -каналов при блокировании потенциал-зависимых K^+ -каналов с помощью тетраэтиламмония (ТЭА) (2 мМ) или 4-аминопиридина (4-АР) (100 мкМ), традиционно используемых для расширения фазы реполяризации пресинаптического ПД и усиления за счет этого входящих Ca^{2+} -токов в моторных терминалях [Brigant, Mallart, 1982].

Влияние ТЭА на параметры одиночных ПКП. ТЭА вызывал значительный (более чем двухкратный) прирост амплитуды и квантового состава одиночных ПКП. На фоне ТЭА блокатор Ca^{2+} -каналов L-типа нитрендипин (1 мкМ) не привел к снижению возросшего квантового состава ПКП, вызванного действием ТЭА (рис. 5А). Это свидетельствует о неучастии L-типа Ca^{2+} -каналов в потенцировании вызванной секреции АХ под действием ТЭА. Прирост квантового состава ПКП в этом случае, по видимому, обеспечивается увеличением входа Ca^{2+} в терминали по P/Q-типу Ca^{2+} -каналов.

Влияние 4-АР на параметры одиночных ПКП. 4-АР оказал более сложное действие на амплитуду и квантовый состав одиночных ПКП. Возрастание значений этих параметров на фоне действия 4-АР происходит как за счет увеличения активности

P/Q-типа Ca^{2+} -каналов, так и Ca^{2+} -каналов L-типа, поскольку нитрендипин (1 мкМ) приводил к снижению более чем двукратного прироста квантового состава ПКП под действием 4-АР (рис. 5Б).

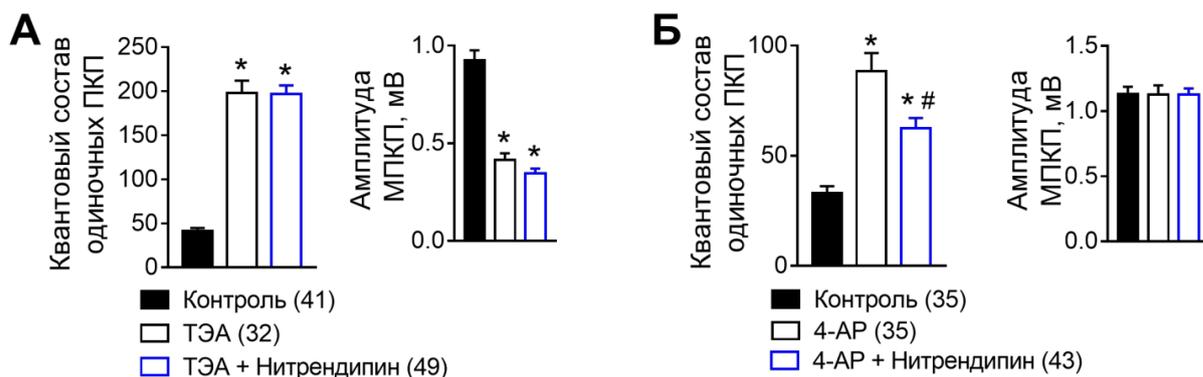


Рис. 5. (А) Квантовый состав ПКП и амплитуда МПКП при одиночной стимуляции нерва (0.3 Гц) в контроле, под действием ТЭА (2 мМ) и на фоне нитрендипина (1 мкМ) в присутствии ТЭА. (Б) Квантовый состав ПКП и амплитуда МПКП при одиночной стимуляции нерва в контроле, под действием 4-АР (100 мкМ) и на фоне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

Данный эффект объясняется, по-видимому, не только блокированием K^+ -тока под действием 4-АР, что потенцирует работу Ca^{2+} -каналов P/Q-типа, но и непосредственной активацией L-типа Ca^{2+} -каналов. Такая способность 4-АР, помимо блокирования потенциал-зависимых K^+ -каналов, напрямую облегчать работу Ca^{2+} -каналов L-типа действительно недавно выявлена в нейронах ЦНС и в нервно-мышечных синапсах [Wu et al., 2009; Li et al., 2014].

Влияние 4-АР на ПКП в коротких залпах. На фоне 4-АР наблюдалось значительное изменение рисунка залпа ПКП. Значительное увеличение амплитуды и квантового состава первого ПКП в залпе (как в случае одиночной активности синапсов) сопровождалось полным отсутствием начального облегчения и развитием депрессии с выходом на стабильный уровень (плато) на уровне контроля (рис. 6А). Полученные данные созвучны описанным в литературе эффектам 4-АР на нервно-мышечных синапсах [Thomsen, Wilson, 1983; Brooke et al., 2004] и существенно отличаются от изменения рисунка залпа ПКП на фоне растормаживания Ca^{2+} -каналов L-типа при блокировании ВК-каналов.

Проведенные расчеты RRP и вероятности квантовой секреции АХ в режиме коротких залпов показали, что под действием 4-АР размер RRP в терминалях статистически значимо не меняется, при этом значительно увеличивается вероятность выброса везикул (за счет усиления работы триггерных для экзоцитоза везикул в активных зонах Ca^{2+} -каналов P/Q-типа). Это приводит к значительному и быстрому расходу везикул из состава RRP в ходе ритмического залпа, не компенсируемому в достаточной степени механизмами восполнения RRP в терминалях, что и проявляется в выраженной депрессии передачи по ходу залпа. Блокирование L-типа Ca^{2+} -каналов нитрендипином на фоне 4-АР приводило к статистически значимому снижению квантового состава ПКП в начале залпа, в большей степени за счет снижения RRP, чем вероятности выброса квантов АХ (Р) (рис. 6Б).

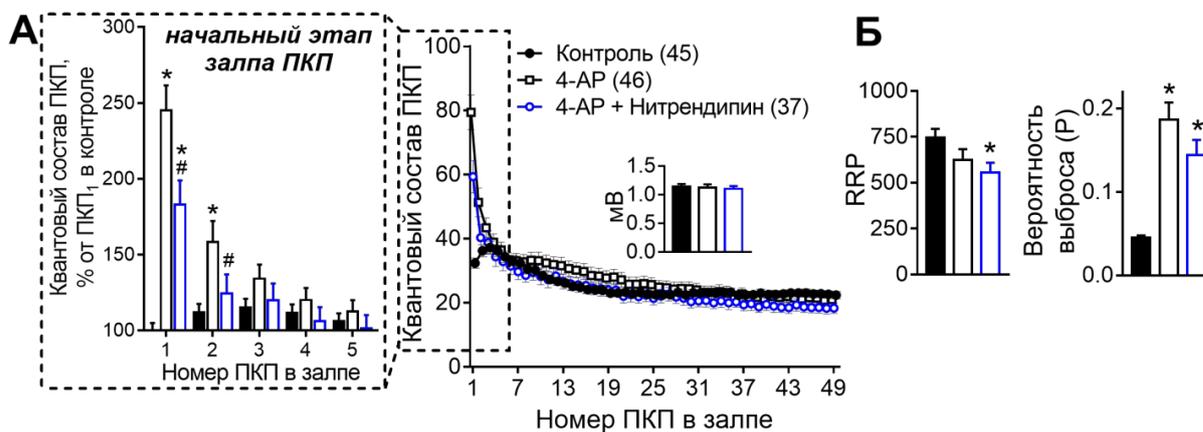


Рис. 6. (А) Изменение квантового состава ПКП по ходу залпа в контроле, под действием 4-АР (100 мкМ) и на фоне нитрендипина (1 мкМ) в присутствии 4-АР. На врезках: слева – квантовый состав первых 5 ПКП в залпе, нормированный к значению первого ПКП в залпе в контроле (ПКП₁ – принят за 100%); справа – амплитуда 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 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.

Наши исследования впервые показали, что при разных способах активации (растормаживания) Ca^{2+} -каналов L-типа наблюдается одинаковый эффект – потенцирование секреции квантов АХ за счет возрастания квантового состава ПКП, причем не только одиночных ПКП, но и равномерный устойчивый прирост ПКП по всему ходу ритмического залпа. Такое усиление секреции уникально и по своему механизму, т.к. отличается от наблюдаемого при усилении активности P/Q-типа Ca^{2+} -каналов: в случае усиления работы P/Q-типа Ca^{2+} -каналов наблюдается увеличение вероятности выброса квантов АХ, а при активации только Ca^{2+} -каналов L-типа – возрастание размера самого RRP.

Таким образом, впервые удалось показать, что два разных потенциал-зависимых Ca^{2+} -входа моторных нервных терминалей (по P/Q- и L-типам Ca^{2+} -каналов) при их избирательном усилении или активации – хотя и качественно сходно влияют на одиночную вызванную секрецию АХ (облегчают ее), но механизмы этого облегчения – разные, что и 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 Ca^{2+} -каналов (при неизменной активности Ca^{2+} -каналов P/Q-типа), обеспечивается стойкий единообразный прирост квантового состава ПКП по всему ходу ритмического залпа вследствие увеличения размера пула готовых к высвобождению везикул (RRP), но не вероятности выброса (p), как это наблюдается при усилении входа по P/Q-типу Ca^{2+} -каналов, приводящему лишь к кратковременному облегчению выброса квантов в залпе.

Роль пресинаптических рианодиновых рецепторов (РиР) и выброса депонированного Ca^{2+} в регуляции секреции АХ в моторных синапсах

В нервных терминалях моторных синапсов млекопитающих показано наличие Ca^{2+} -депо и рианодин-чувствительного выброса депонированного Ca^{2+} , способного по разному модулировать спонтанную и вызванную секрецию АХ при разных

условиях работы синапса [Balezina, Bukiya, 2001; Балезина, 2002; Balezina, Bukiya, 2003; Balezina et al., 2004]. В нашей работе мы сосредоточились на выявлении условий вовлечения в активность рианодиновых рецепторов (РиР) (и выброса депонированного Ca^{2+}) при активации различных Ca^{2+} -входов моторных терминалей и на последствиях этих взаимодействий для секреции АХ.

Эффекты блокирования РиР. Рианодин в концентрациях 2-3 мкМ, блокирующий РиР Ca^{2+} -депо терминалей, не вызывал статистически значимых изменений параметров МПКП, а также - амплитуды и квантового состава одиночных ПКП (рис. 7А). По-видимому, при одиночных ПД (с частотой 0.3 Гц) в актах Ca^{2+} -зависимой вызванной секреции АХ выброс депонированного Ca^{2+} не участвует. 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. 7Б). Традиционно развитие начального облегчения связывают с увеличением уровня остаточного Ca^{2+} , накапливающегося при работе Ca^{2+} -каналов в составе активных зон (в случае моторных синапсов млекопитающих - P/Q-типа) [Jackman, Regehr, 2017]. Наши данные позволяют предположить, что РиР и выброс депонированного Ca^{2+} также могут участвовать в развитии начального облегчения в залпе, что может свидетельствовать о Ca^{2+} -зависимой активации РиР за счет работы P/Q-типа Ca^{2+} -каналов.

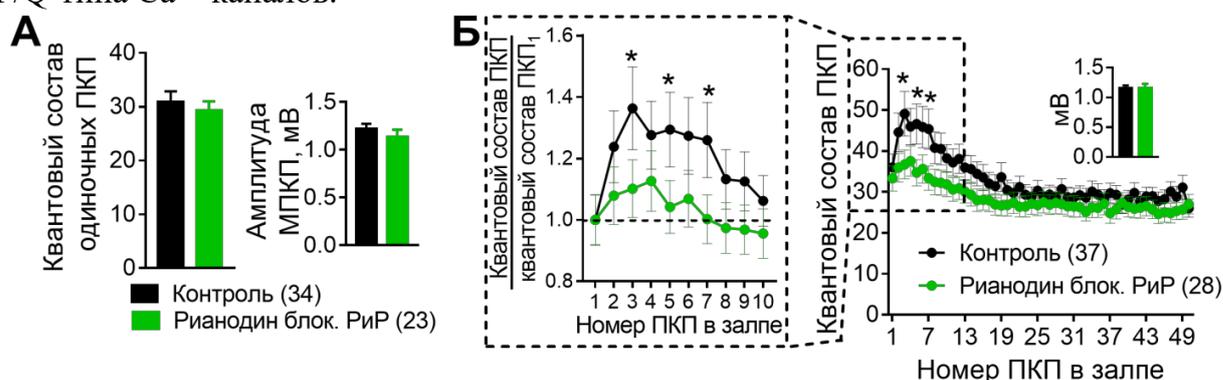


Рис. 7. (А) Квантовый состав ПКП и амплитуда МПКП при одиночной стимуляции нерва (0.3 Гц) в контроле и при действии рианоидина в блокирующей РиР концентрации (2 мкМ). (Б) Блокирование РиР рианоидином снижает выраженность облегчения в начале короткого залпа ПКП. На врезках: слева – отношение квантового состава первых 10 ПКП в начале ритмического залпа в контроле и на фоне рианоидина (2 мкМ) к первому ПКП в каждой группе; справа – амплитуда МПКП. В скобках – количество синапсов в соответствующих группах. *- $p < 0.05$.

Эффекты активации РиР. Обратная процедура - активация РиР рианоидином в субмикромольной концентрации 0.1 мкМ [Балезина, 2002; Gerasimova et al., 2015] в условиях одиночной стимуляции нерва (0.3 Гц) не вызывала увеличения амплитуды ПКП в течение первых 30 минут аппликации рианоидина – от 25.87 ± 2.18 мВ в контроле ($n=40$) до 27.45 ± 2.29 мВ ($n=18$, $p > 0.05$), но значение этого параметра статистически значимо увеличивалось до 34.94 ± 2.28 мВ при действии рианоидина в интервале 30-90 минут ($n=27$, $p < 0.05$). Амплитуда МПКП менялась сходным образом – от 1.08 ± 0.07 мВ в контроле до 1.20 ± 0.10 мВ ($p > 0.05$) в течение первых 30 минут аппликации рианоидина с последующим увеличением на 30% до 1.41 ± 0.10 мВ ($p < 0.05$) в течение последующих 30-90 минут. Квантовый состав ПКП при этом оставался неизменным. Таким образом, мы установили, что прирост амплитуды мультиквантового ПКП при стимуляции РиР (сопровождаяемой 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.

Исследование на «нерассеченных» нервно-мышечных препаратах только спонтанной активности синапсов также выявило прирост амплитуды МПКП на 30%, выявляемый, начиная с 30 по 90 минуты действия 0.1 мкМ рианоидина. Этот прирост полностью предотвращался при прямой блокаде везикулярного транспортера АХ везамиколом (1 мкМ) (рис. 8). Это позволяет предполагать, что в основе прироста амплитуды МПКП лежит увеличение размера кванта АХ.

Нами была выдвинута гипотеза о том, что активация пресинаптических РиР и стимулируемый рианоидином выброс Ca^{2+} из депо терминалей вызывает Ca^{2+} -зависимую секрецию эндогенного кальцитонин-ген родственного пептида (КГРП), запасаемого в электронно-плотных везикулах в моторных нервных терминалях [Matteoli et al., 1988; Csillik et al., 1993]. Данный нейропептид, в свою очередь, оказавшись в синаптической щели, мог бы вызывать прирост амплитуды постсинаптических потенциалов за счет своего пресинаптического аутокринного действия, приводящего к увеличению размера квантов АХ, как это было ранее описано в нервно-мышечном синапсе лягушки при аппликации экзогенного КГРП [Van der Kloot et al., 1998].

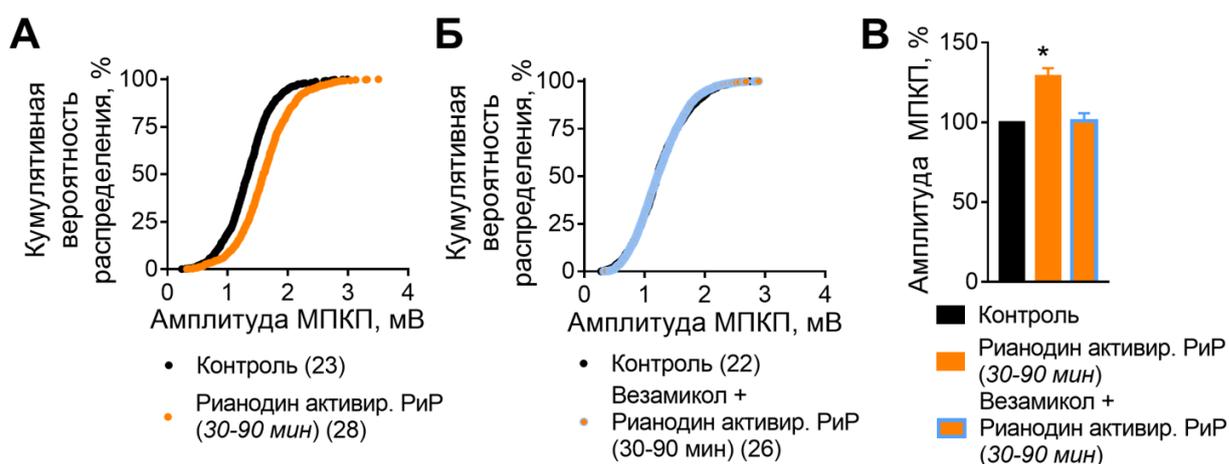


Рис. 8. Активация РиР рианоидином (0.1 мкМ) вызывает увеличение амплитуды МПКП за счет прироста размера квантов АХ. (А) Сдвиг вправо, в область более высокоамплитудных значений, графика кумулятивной вероятности распределения амплитуд МПКП под действием рианоидина ($p < 0.05$). (Б) Блокирование везикулярного транспортера АХ везамиколом (1 мкМ) предотвращает сдвиг вправо графика кумулятивной вероятности распределения амплитуд МПКП под действием рианоидина ($p > 0.05$). В скобках – количество синапсов в соответствующих группах. (В) Изменение амплитуд МПКП, нормализованных к контролю (принят за 100 %) по действием рианоидина и рианоидина в присутствии везамикола. В скобках – количество синапсов в соответствующих группах. *- $p < 0.05$.

Для подтверждения возможного участия КГРП в регуляции размера кванта АХ, было проведено тестирование эффектов экзогенного КГРП в отношении параметров синаптической активности в моторных синапсах мыши. Аппликация в течение 1 часа экзогенного КГРП – как «крысиной» так и «человеческой» изоформ (100 нМ) – вызывала в обоих случаях прирост амплитуд МПКП и одиночных вызванных ПКП на 30-40% по сравнению с контролем (рис. 9А). Эффект изоформ КГРП был дозозависим, максимальное значение прироста амплитуд МПКП составило 150-160% от

контроля (рис. 9Б,В) и не сопровождалось изменением временных характеристик МПКП, их частоты и входного сопротивления мембраны мышечных волокон. Как и в случае действия 0.1 мкМ рианолина, экзогенный КГРП полностью утрачивал способность увеличивать амплитуду МПКП в присутствии везамикола. Прирост амплитуды МПКП под действием как экзогенного КГРП, так и активирующего РиР рианолина предотвращался блокированием КГРП-рецепторов с помощью усеченной формы нейропептида (КГРП₈₋₃₇, 1 мкМ) или ингибированием протеинкиназы А (РКА) с помощью Н-89 (1 мкМ). Мы впервые показали, что потенцирующее действие на амплитуду МПКП 0.1 мкМ рианолина, но не экзогенного КГРП предотвращалось KN-93 (3 мкМ) – ингибитором кальций/кальмодулин-активируемой протеинкиназы II типа (СаМКII) (рис. 9Г-Ж).

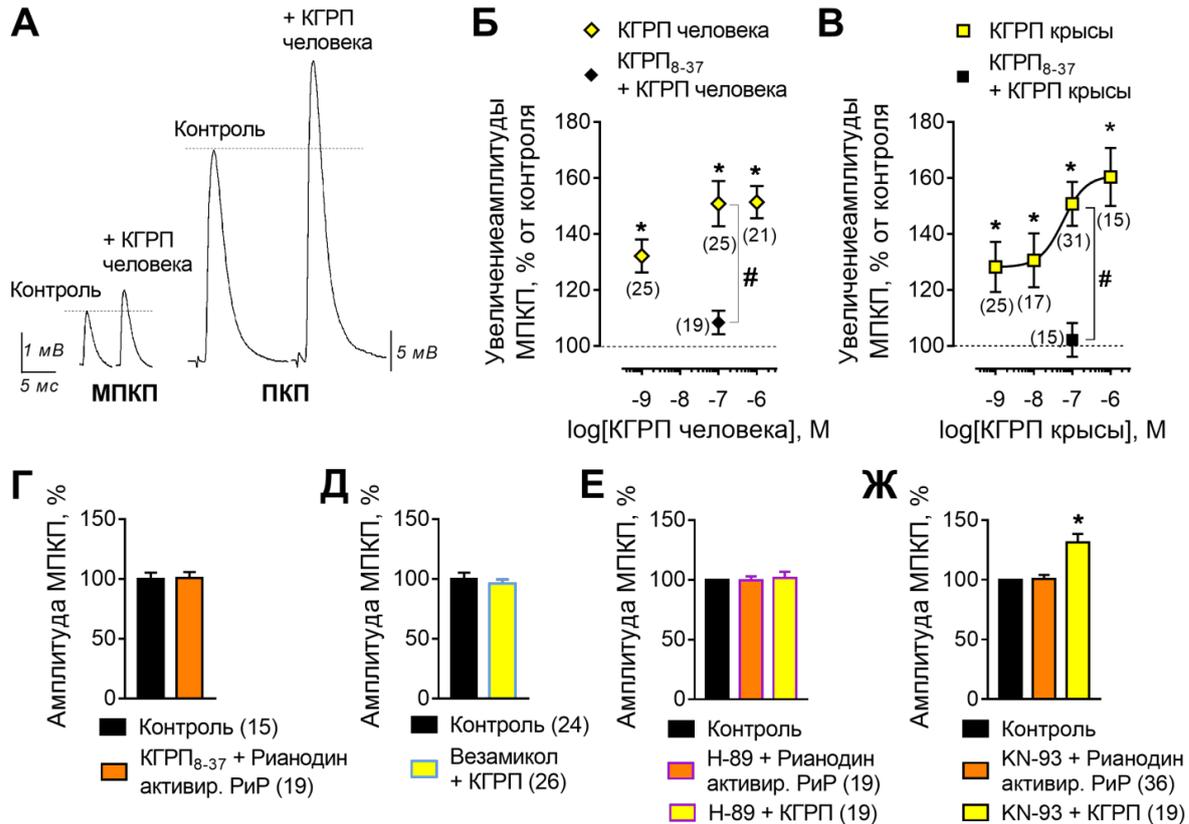


Рис. 9. Стимуляция РиР 0.1 мкМ рианолина вызывает СаМКII-опосредованный выброс эндогенного КГРП, приводящего к увеличению размера квантов АХ(А). Примеры оригинальных записей отдельных МПКП и одиночных вызванных ПКП в контроле и на фоне 100 нМ КГРП человека. (Б) Увеличение средней амплитуды МПКП под действием КГРП человека. Блокатор КГРП-рецепторов - усеченный пептид КГРП₈₋₃₇ человека (1 мкМ) предотвращал потенцирующее действие КГРП человека. (В) Увеличение средней амплитуды МПКП под действием КГРП крысы. Блокатор КГРП-рецепторов КГРП₈₋₃₇ крысы (1 мкМ) предотвращал потенцирующее действие КГРП крысы. (Г) КГРП₈₋₃₇ крысы (1 мкМ) предотвращал прирост амплитуд МПКП под действием рианолина. (Д) КГРП крысы (1 мкМ) утрачивал способность увеличивать амплитуду МПКП при блокировании везикулярного транспортера АХ везамиколом (1 мкМ). (Е) Ингибитор РКА Н-89 (1 мкМ) предотвращал прирост амплитуды МПКП как под действием стимулирующего РиР рианолина, так и КГРП крысы (1 мкМ). Амплитуды МПКП нормализованы к контролю (принят за 100%). (Ж) Изменение амплитуд МПКП по действию рианолина или КГРП крысы (10 нМ) в присутствии ингибитора СаМКII – KN-93 (3 мкМ). 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.

Полученные данные свидетельствуют об использовании сходных механизмов реализации потенцирующих эффектов на амплитуду постсинаптических потенциалов у экзогенного КГРП и рианодина как стимулятора выброса депонированного Ca^{2+} .

Проведенные исследования впервые показали, что выброс депонированного Ca^{2+} 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 терминали с участием РКА, приводящий к увеличению размера квантов АХ.

Вовлечение РиР в регуляцию секреции АХ при активации Ca^{2+} -каналов L-типа.

Все описанные в современной литературе случаи участия пресинаптических РиР в секреции АХ в моторных синапсах – будь то при деполяризации [Nishimura et al., 1990] или в условиях вызванной ритмической активности [Narita et al., 2000; Khuzakhmetova et al., 2014] предполагали Ca^{2+} -зависимую активацию РиР за счет входа Ca^{2+} по триггерным Ca^{2+} -каналам P/Q-типа. В нашей работе впервые решался вопрос, какую роль может играть другой Ca^{2+} -вход – по L-типу Ca^{2+} -каналов – в активации рианодин-чувствительных Ca^{2+} -депо, выбросе депонированного Ca^{2+} и регуляции секреции АХ в моторных синапсах мышцы? С этой целью были использованы два разных способа растормаживания в моторных нервных терминалях активности Ca^{2+} -каналов L-типа – непосредственно (с помощью их активатора S(-)Bay K8644) либо опосредованно, за счет блокирования Ca^{2+} -активируемых K^+ -каналов ВК-типа с помощью ибериотоксина. Обе процедуры приводили к сходному облегчению квантового состава одиночных и ритмически генерируемых ПКП. Однако, блокирование РиР рианодином (2 мкМ) предотвращало увеличение амплитуды и квантового состава ПКП при активации L-типа Ca^{2+} -каналов как с помощью S(-)Bay K8644 (1 мкМ), так и за счет блокирования ВК-каналов ибериотоксином (100 нМ) при одиночной и залповой вызванной активности моторных синапсов (рис. 10).

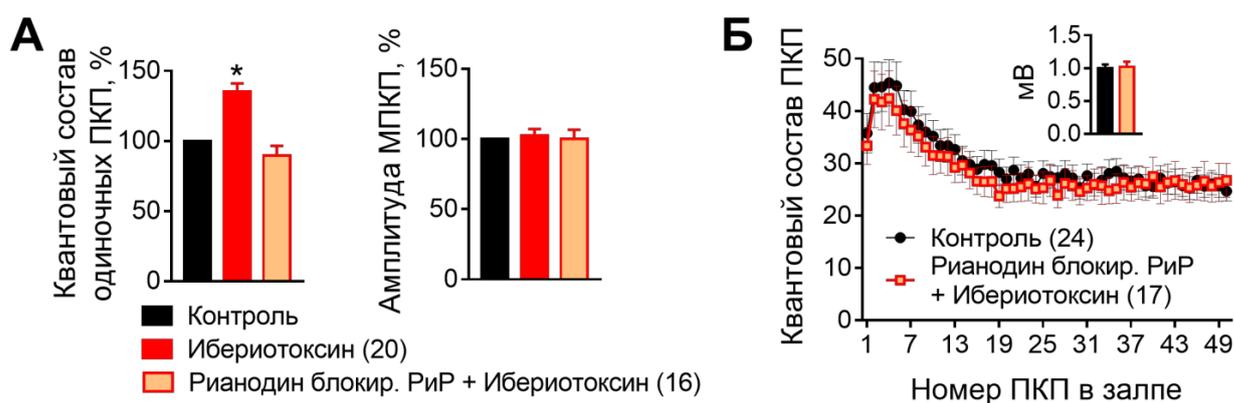


Рис. 10. Блокирование РиР рианодином (2 мкМ) предотвращает потенцирующее действие растормаживания L-типа Ca^{2+} -каналов на вызванную секрецию АХ (А) Квантовый состав ПКП и амплитуда МПКП при одиночной стимуляции нерва (0.3 Гц), нормированные по отношению к контролю (принят за 100%), под действием ибериотоксина (100 нМ) и при действии ибериотоксина в присутствии рианодина. (Б) Изменение квантового состава ПКП по ходу залпа в контроле и под действием блокатора ВК-каналов ибериотоксина (100 нМ) в присутствии рианодина. На врезке – амплитуда МПКП. В скобках – количество синапсов в соответствующих группах. *-p < 0.05.

В следующей серии исследовали вероятное вовлечение РиР при избирательном усилении работы основного триггерного Ca^{2+} -входа в терминали - Ca^{2+} -каналов P/Q-типа – путем блокирования потенциал-зависимых K^+ -каналов ТЭА (2 мМ). Оказалось, что значительное увеличение амплитуды и квантового состава ПКП в условиях одиночной стимуляции нерва на фоне ТЭА (рис 5А) нечувствительно к блокированию РиР: в контроле квантовый состав ПКП составил 33.24 ± 1.90 ($n=25$), а на фоне ТЭА в присутствии 2 мкМ рианодина он возрастал до 160.80 ± 15.08 ($n=22$, $p < 0.05$).

Таким образом, мы установили, что в условиях селективного усиления активности 2-х разных типов Ca^{2+} -каналов – либо L-, либо P/Q-типа – вовлечение РиР (и выбрасываемого при этом депонированного Ca^{2+} из Ca^{2+} -депо) в регуляцию секреции АХ – различно. Когда происходит потенцирование активности P/Q-типа Ca^{2+} -каналов, их локализация непосредственно в активных зонах обеспечивает действие входящего по ним Ca^{2+} на везикулярные Ca^{2+} -сенсоры без дополнительного участия выброса депонированного Ca^{2+} . При подключении пресинаптических Ca^{2+} -каналов L-типа и входа Ca^{2+} по ним происходит активация РиР, необходимая для увеличения секреции АХ. Активация РиР и выброс депонированного Ca^{2+} , вероятно, выступают в роли эффектора, необходимого для амплификации Ca^{2+} -сигнала, поступающего по L-типу Ca^{2+} -каналов. Такой Ca^{2+} -сигнал, по-видимому, способен специфически усиливать секрецию квантов АХ в активных зонах по механизму, отличному от реализуемого при входе Ca^{2+} по P/Q-типу Ca^{2+} -каналов (рис. 11).

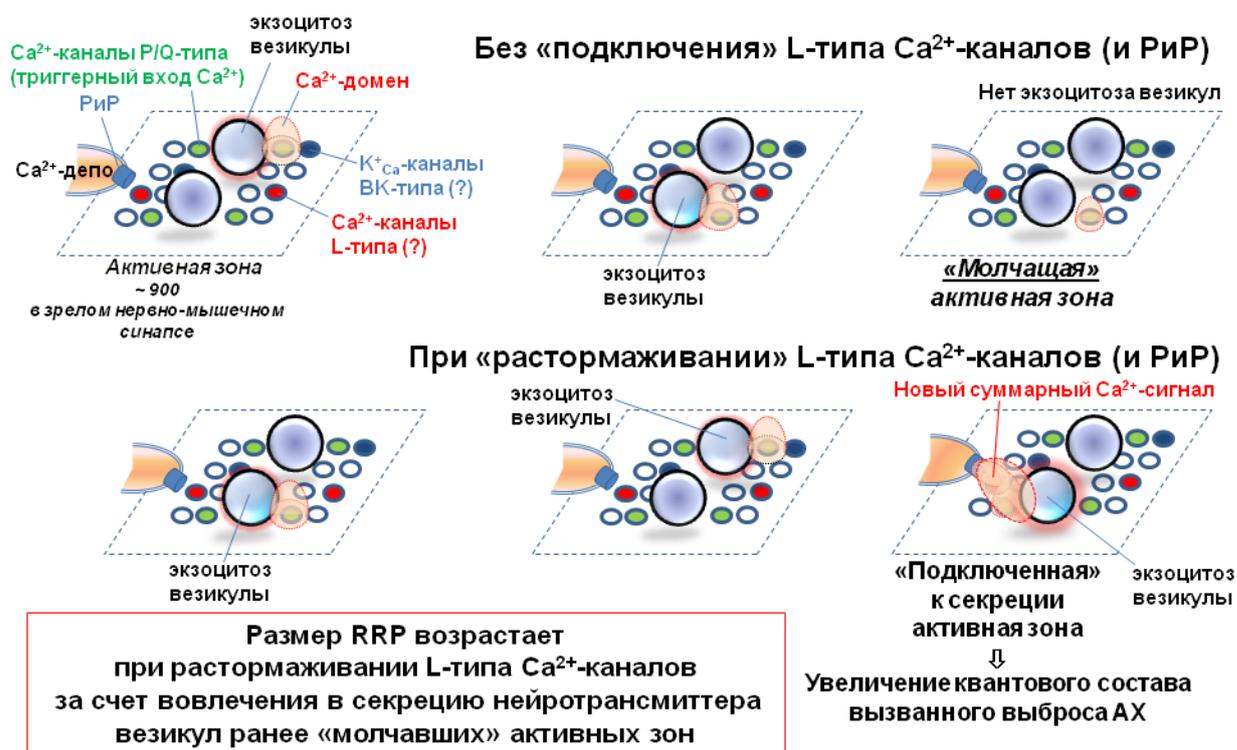


Рис. 11. Механизм равномерного увеличения квантового состава ПКП в ритмических высокочастотных залпах при растормаживании функционального тандема «L-тип Ca^{2+} -каналов - РиР» за счет вовлечения в секрецию ранее молчавших активных зон. Знак ? означает не установленное точно расположение каналов в активных зонах. Относительное пространственное расположение везикул и каналов в составе активных зон представлено по литературным данным [Homan, Meriney, 2018; Dittrich et al., 2018].

Мы впервые показали, что такое увеличение концентрации Ca^{2+} может быть предназначено для вовлечения в секрецию АХ дополнительных активных зон и секретлируемых квантов в ответ на нервный импульс, судя по возрастанию значения RRP (но не вероятности выброса (p)), обнаруженному нами при активации L-типа Ca^{2+} -каналов.

Функциональное сопряжение РнР и L-типа Ca^{2+} -каналов описано в настоящее время и в ряде нейронов, где Ca^{2+} -ток, входящий в сому по Ca^{2+} -каналам L-типа, запускает активацию РнР и выброс депонированного Ca^{2+} [Chavis et al., 1996, Welsby et al., 2006]. Кроме того, нельзя исключить возможность прямой физической сцепки между Ca^{2+} -каналами L-типа и РнР. Обнаруженное нами сопряжение пресинаптических РнР с активацией L-типа Ca^{2+} -каналов, приводящее к значительному облегчению передачи при разных режимах работы синапса, по-новому освещает возможности участия тандема « Ca^{2+} -каналы L-типа – РнР» в регуляции секреции АХ в моторных нервных терминалях.

Вклад Ca^{2+} -зависимых ферментов в регуляцию секреции АХ при входе Ca^{2+} по L-типу Ca^{2+} -каналов

Потенцирование секреции АХ при запуске функционального тандема «L-тип Ca^{2+} -каналов – РнР» могло быть не просто следствием включения дополнительного Ca^{2+} -входа, но являться результатом активации Ca^{2+} -зависимых ферментов – таких как протеинкиназа С (PKC) и/или CaMKII. Присутствие обоих ферментов в составе моторных нервных терминалей млекопитающих подтверждается данными литературы [Lanuza et al., 2014; Plomp, Molenaar, 1996]. Однако специфика их избирательной активации при подключении определенных Ca^{2+} -входов, в том числе - по L-типу Ca^{2+} -каналов - оставалась не изученной.

Эффекты блокаторов РКС на вызванную активность синапсов. В моторных синапсах показано наличие широкого спектра разных изоформ РКС, по-разному регулируемых Ca^{2+} и способных регулировать синаптическую активность с использованием специфических механизмов [Santafe et al., 2005; Besalduch et al., 2010; Lanuza et al., 2014]. 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 блокатор не вызывает изменений амплитуды и квантового состава ПКП, что могло указывать на неучастие РКС в регуляции вызванной секреции АХ в моторных синапсах. Однако, при использовании более селективных блокаторов классических изоформ РКС (α , βI , βII) – GF109203X (0.1 мкМ) и Ro 32-0432 (1 мкМ) – мы обнаружили статистически значимое снижение амплитуды ПКП в залпах, сопровождающееся уменьшением квантового состава ПКП. При этом такое подавление квантового состава ПКП при блокировании Ca^{2+} -зависимых изоформ РКС стойко сохранялось по всему ходу ритмического залпа (рис. 12).

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

Эффекты блокаторов РКС на фоне растормаживания L-типа Ca^{2+} -каналов. Для растормаживания L-типа Ca^{2+} -каналов использовали блокаду ВК-каналов паксиллином (5 мкМ). Как и в случае действия ибериотоксина, паксиллин усиливал

секрецию АХ как у одиночных ПКП, так и в коротком залпе ПКП, равномерно увеличивая амплитуду и квантовый состав ПКП по всему ходу залпа, что является характерным признаком растормаживания L-типа Ca^{2+} -каналов. Ингибитор РКС хелеритрин (4 мкМ) на фоне паксиллина уменьшал возросший квантовый состав ПКП до контрольных значений - как в случае одиночных ПКП, так и по всему ходу ритмического залпа (рис. 13).

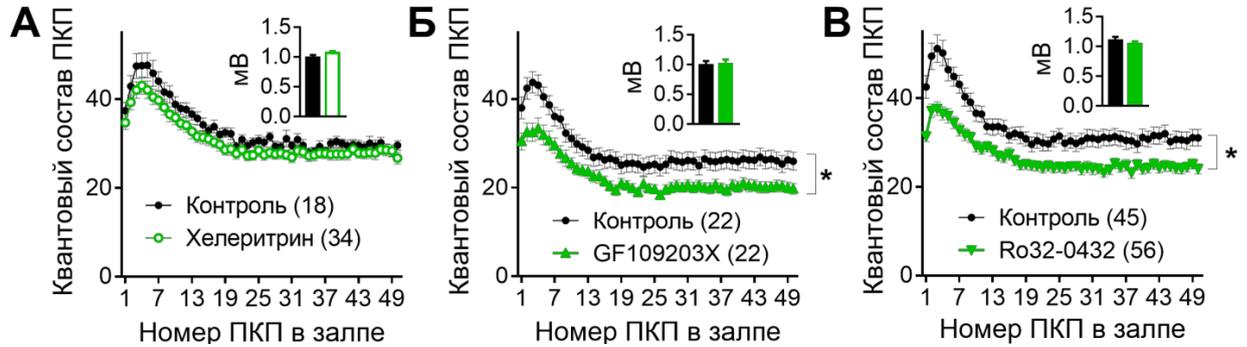


Рис. 12. Изменение квантового состава ПКП по ходу короткого высокочастотного залпа в контроле и под действием ингибиторов РКС: хелеритрина (4 мкМ) (А); GF109203X (0.1 мкМ) (Б) и Ro32-0432 (1 мкМ). На врезках – амплитуда МПКП. В скобках – количество синапсов в соответствующих группах. *- $p < 0.05$.

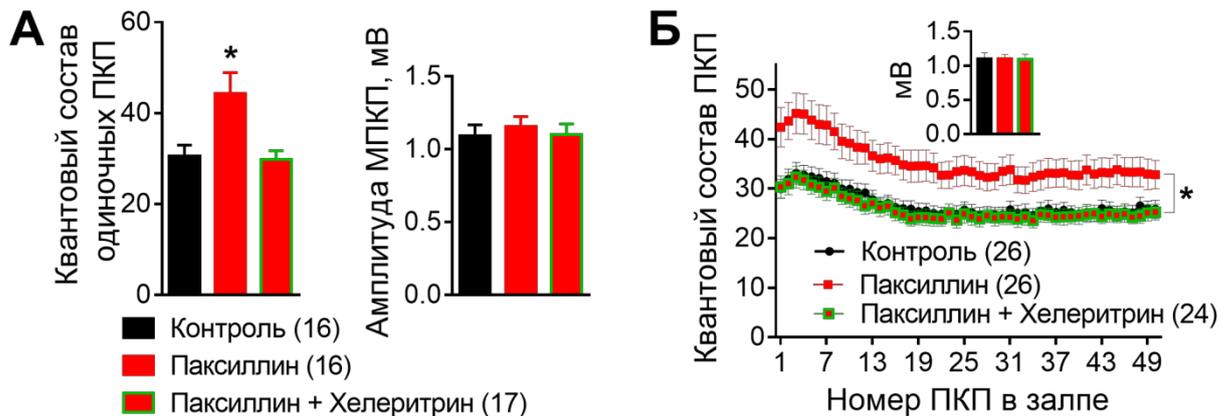


Рис. 13. Ингибирование РКС хелеритрином (4 мкМ) обращает потенцирующее действие растормаживания L-типа Ca^{2+} -каналов паксиллином (5 мкМ) на вызванную секрецию АХ. (А) Квантовый состав ПКП и амплитуда МПКП при одиночной стимуляции нерва (0.3 Гц) в контроле, под действием паксиллина, и при действии 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. *- $p < 0.05$.

Это означает, что ингибирование РКС устраняет облегчающее действие паксиллина на выброс АХ. Можно предположить, что при растормаживании Ca^{2+} -входа по L-типу Ca^{2+} -каналов происходит дополнительная (к базальной) Ca^{2+} -зависимая активация РКС, которая принимает участие в специфическом усилении как одиночных, так и ритмически генерируемых ПКП, характерном для активности именно Ca^{2+} -входа по L-типу Ca^{2+} -каналов.

Эффекты пан-активатора РКС фторбол 1-миристан 13-ацетата (РМА). Фармакологическая активация РКС с помощью РМА (10 нМ) приводила к значительному увеличению амплитуды и квантового состава одиночных ПКП, сопоставимое по величине с наблюдаемым при Ca^{2+} -зависимом способе активации этой протеинкиназы (в условиях растормаживания L-типа Ca^{2+} -каналов паксиллином). При этом на фоне РМА возрастала частота спонтанной секреции квантов АХ. Блокирование L-типа Ca^{2+} -каналов нитрендипином (1 мкМ) на фоне действия РМА значительно снижало прирост квантового состава ПКП, вызываемый РМА (рис. 14А).

Таким образом, мы установили, что одним из направлений действия РКС, активированной с помощью РМА, может быть стимулирование входящего в терминаль Ca^{2+} -тока через L-тип Ca^{2+} -каналов. Оставался открытым вопрос, включаются ли в активность РиР и Ca^{2+} -депо терминалей при таком РМА/РКС-зависимом способе растормаживания L-типа Ca^{2+} -каналов? Предварительное блокирование РиР рианодином (2 мкМ), само по себе не оказывая влияния на квантовый состав ПКП, эффективно предотвращало прирост квантового состава под действием РМА (рис. 14Б). Блокирование РиР в присутствии РМА возвращало повышенное на фоне РМА значение квантового состава ПКП к уровню контроля.

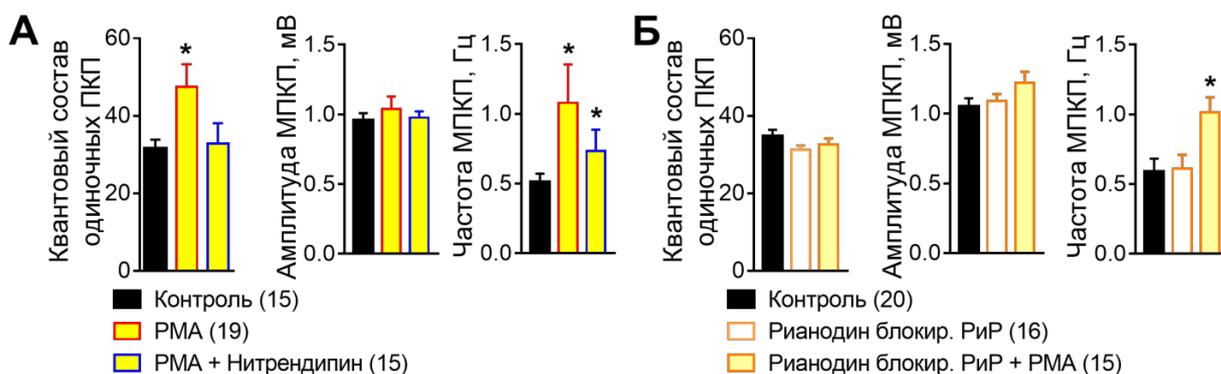


Рис. 14. При активации пресинаптической РКС РМА (10 нМ) потенцирование вызванной секреции АХ обеспечивается за счет активации L-типа Ca^{2+} -каналов и РиР. (А) Квантовый состав ПКП, амплитуда МПКП и частота МПКП при одиночной стимуляции нерва (0.3 Гц) в контроле, под действием РМА, и при действии блокатора L-типа Ca^{2+} -каналов нитрендипина (1 мкМ) в присутствии РМА. (Б) Квантовый состав ПКП, амплитуда МПКП и частота МПКП при одиночной стимуляции нерва (0.3 Гц) в контроле, при блокировании РиР рианодином (2 мкМ), и при добавлении РМА в присутствии рианоидина. В скобках – количество синапсов в соответствующих группах. *- $p < 0.05$ по сравнению с контролем.

Полученные данные свидетельствуют об активации функционального тандема «L-тип Ca^{2+} -каналов – РиР» при РМА-стимуляции пресинаптической РКС. Следует подчеркнуть, что при активации РКС фторболовым эфиром, несмотря на повышенную амплитуду и квантовый состав первого ПКП в залпе, выявилась неспособность синапсов поддерживать повышенный уровень выброса АХ по всему ходу залпа ПКП, как это происходило при растормаживании Ca^{2+} -каналов L-типа другими способами. 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 Ca^{2+} -каналов), так и увеличением вероятности выброса квантов АХ (P) (рис. 15).

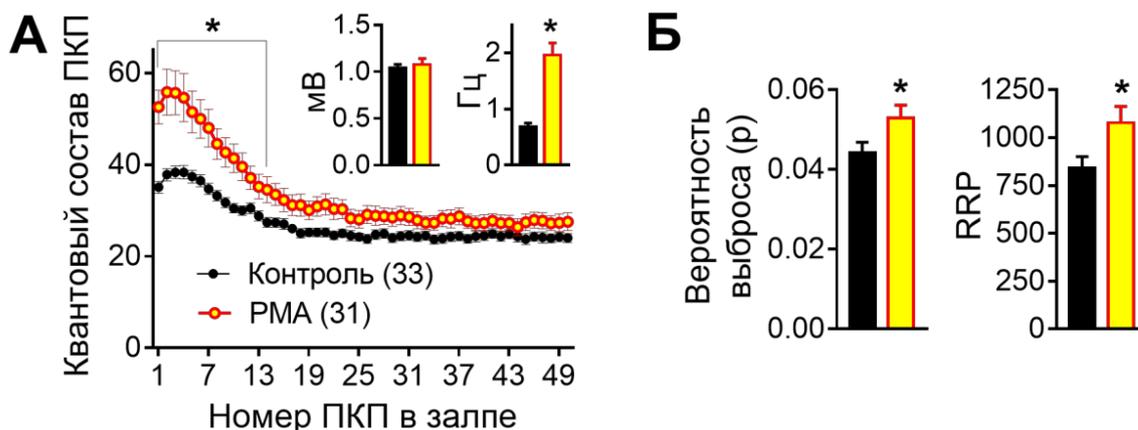


Рис. 15. Активация РКС с помощью РМА потенцирует вызванную секрецию АХ в начале короткого высокочастотного залпа ПКП (50 Гц, 1 с). **(А)** Квантовый состав ПКП в контроле и под действием РМА (10 нМ). На врезке – амплитуда МПКП (слева) и частота МПКП (справа). **(Б)** РМА вызывает увеличение как вероятности 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 [Betz et al., 1998]. Именно такое действие РМА может лежать в основе как увеличения частоты МПКП, так и развития выраженной депрессии вызванной секреции АХ в ходе коротких залпов ПКП. Итак, мы впервые показали, что РМА-индуцированное облегчение синаптической передачи не сохраняется в ходе ритмической активности и исчезает уже к середине короткого залпа из 50 ПКП.

Таким образом, выявлен ранее не известный в моторных синапсах факт, что при разных способах активации Ca^{2+} -зависимой пресинаптической РКС характер 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 терминалях также могут различаться, и это проявляется в разном характере вызванной секреции АХ по ходу ритмической активности синапсов.

Эффекты ингибиторов (СаМКII). СаМКII – серин-треониновая протеинкиназа, активность которой подробно описана в регуляции пре- и постсинаптической пластичности центральных синапсов [Lisman et al., 2012; Zalzman et al., 2018; Yasuda et al., 2022]. В нервно-мышечных синапсах млекопитающих вопрос о способах активации и роли пресинаптической СаМКII остается малоизученным.

Ингибирование СаМКII с помощью KN-62 или KN-93 (оба – 3 мкМ) не приводило к статистически значимым изменениям параметров как спонтанной, так и вызванной залповой активности моторных синапсов мыши (рис. 16А,Б). Это свидетельствует, что основной триггерный Ca^{2+} -вход по P/Q-типу Ca^{2+} -каналов и накопление вследствие его активности остаточного Ca^{2+} в активных зонах при кратковременной залповой активности синапсов - не достаточен для активации СаМКII и ее вовлечения в регуляцию вызванного выброса АХ в моторных синапсах. Данная особенность отличает моторные синапсы мыши от примеров тесного взаимодействия СаМКII и P/Q-типа Ca^{2+} -каналов в нейронах гиппокампа [Jiang et al., 2008], а также от моторных синапсов лягушки, где при активности триггерных Ca^{2+} -каналов N-типа выявлен вклад СаМКII в регуляцию кратковременной пластичности и потенциацию выброса АХ при высокочастотной стимуляции нерва [Mukhamedyarov et al., 2010]. Такие различия в способах активации СаМКII могут

быть связаны с особенностями объектов, режимом активности синапсов, спецификой Ca^{2+} -входов и характером их колокализации с ферментом.

Иную картину наблюдали при растормаживании другого Ca^{2+} -входа - по Ca^{2+} -каналам L-типа - путем ингибирования Ca^{2+} -активируемых K^+ -каналов ВК-типа паксиллином (5 мкМ). Мы установили, что паксиллин вызывает увеличение квантового состава ПКП по всему ходу короткого ритмического залпа ПКП (рис. 4Г). Ингибирование СаМКП при помощи KN-62 (3 мкМ) полностью предотвращало увеличение квантового состава ПКП, вызываемое паксиллином (рис. 16В).

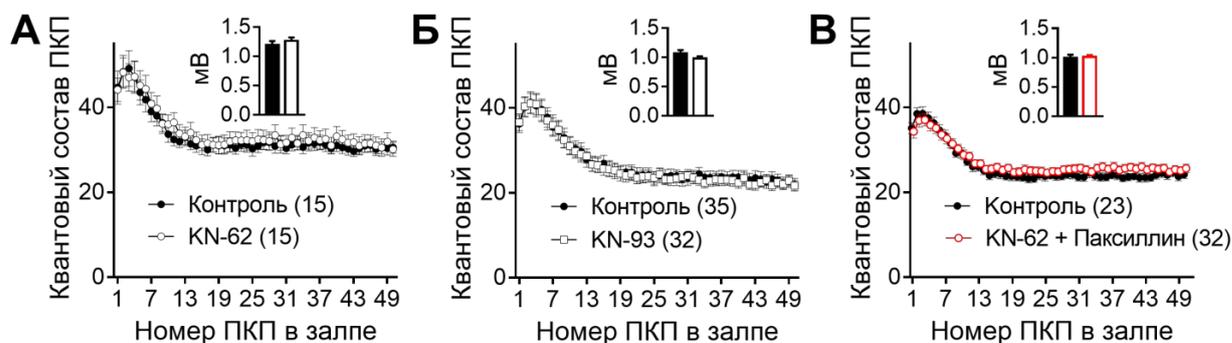


Рис. 16. Активность пресинаптической СаМКП необходима для потенцирования вызванной секреции АХ при растормаживании L-типа Ca^{2+} -каналов. (А) Квантовый состав ПКП в контроле и под действием ингибитора СаМКП KN-62 (3 мкМ). (Б) Квантовый состав ПКП в контроле и под действием СаМКП KN-93 (3 мкМ). (В) 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.

Полученные нами данные позволяют заключить, что активность пресинаптической СаМКП не направлена на регуляцию P/Q-типа Ca^{2+} -каналов, но вместе с тем, она необходима для проявления потенцирования секреции при растормаживании Ca^{2+} -каналов L-типа.

Анализ совокупности разнонаправленных регуляторных воздействий на активность L-типа Ca^{2+} -каналов в моторных синапсах

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

Эндогенные регуляторные контуры, подавляющие активность L-типа Ca^{2+} -каналов. По данным литературы, в моторных синапсах имеется ряд мощных ауторегуляторных тормозных и облегчающих контуров, связанных с активацией разных типов пуринорецепторов с участием АТФ и аденозина. Финальные мишени этих регуляторных контуров малоизучены [Sokolova et al., 2003; Todd, Robitaille, 2006; Burnstock et al., 2013; Tomas et al., 2014].

Роль A_1 -аденозиновых рецепторов. В составе терминалей моторных синапсов описан комплекс пресинаптических аденозиновых рецепторов – A_1 -, A_{2A} - и A_3 -подтипов (Garcia et al., 2013; Cinalli 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}).

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. 17А). 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. По данным литературы, A_1 -рецепторы преимущественно сопряжены с $G_{i/o}$ -белками, тормозящими аденилатциклазу, уменьшая тем самым активность РКА. В присутствии ингибитора РКА Н-89 (1 мкМ) блокирование A_1 -рецепторов с помощью ДРСРХ не приводило к увеличению амплитуды и квантового состава ПКП в залпе (рис. 17Б). В качестве одной из возможных мишеней A_1 - и A_{2A} -рецепторов рассматривают Ca^{2+} -каналы L-типа [Oliveira et al., 2005]. Мы установили, что блокатор L-типа Ca^{2+} -каналов нитрендипин (10 мкМ) предотвращает прирост квантового состава ПКП в залпе под действием ДРСРХ (рис. 17В). Совокупность полученных данных позволяет предположить, что при выключении активности A_1 -рецепторов с помощью ДРСРХ происходит растормаживание не только функциональной связки аденилатциклаза-РКА, но и Ca^{2+} -каналов L-типа как мишени РКА, фермента, активность которого находится под контролем A_1 -рецепторов. Кроме того, мы установили, что при заблокированных рианодинем (3 мкМ) РиР возрастание амплитуды и квантового состава ПКП в коротких ритмических залпах под действием ДРСРХ не происходит (рис. 17Г).

Следовательно, и при таком способе растормаживания L-типа Ca^{2+} -каналов в потенцировании вызванной синаптической активности принимают участие активация РиР и выброс депонированного Ca^{2+} . Таким образом, мы установили, что в моторных синапсах L-тип Ca^{2+} -каналов находится под мощным негативным тоническим контролем со стороны аденозиновых A_1 -рецепторов, которые реализуют свое тормозное действие через снижение активности РКА.

Роль $P2Y_{13}$ -рецепторов АТФ. Наряду с аденозином, передачу в моторных синапсах способны регулировать и АТФ, и промежуточные продукты ее гидролиза, действующие на несколько типов пуринорецепторов [Burnstock et al., 2013], включая недавно описанные на моторных нервных терминалях $P2Y_{13}$ -рецепторы [Guarracino et al., 2016].

Мы установили, что селективный антагонист $P2Y_{13}$ -рецепторов MRS2211 (10 мкМ) увеличивал амплитуду и квантовый состав ПКП по всему ходу короткого ритмического залпа (рис. 18А). При этом эффект MRS2211 полностью предотвращался блокированием L-типа Ca^{2+} -каналов нитрендипином (10 мкМ) или РКА с помощью Н-89 (1 мкМ) (рис. 18).

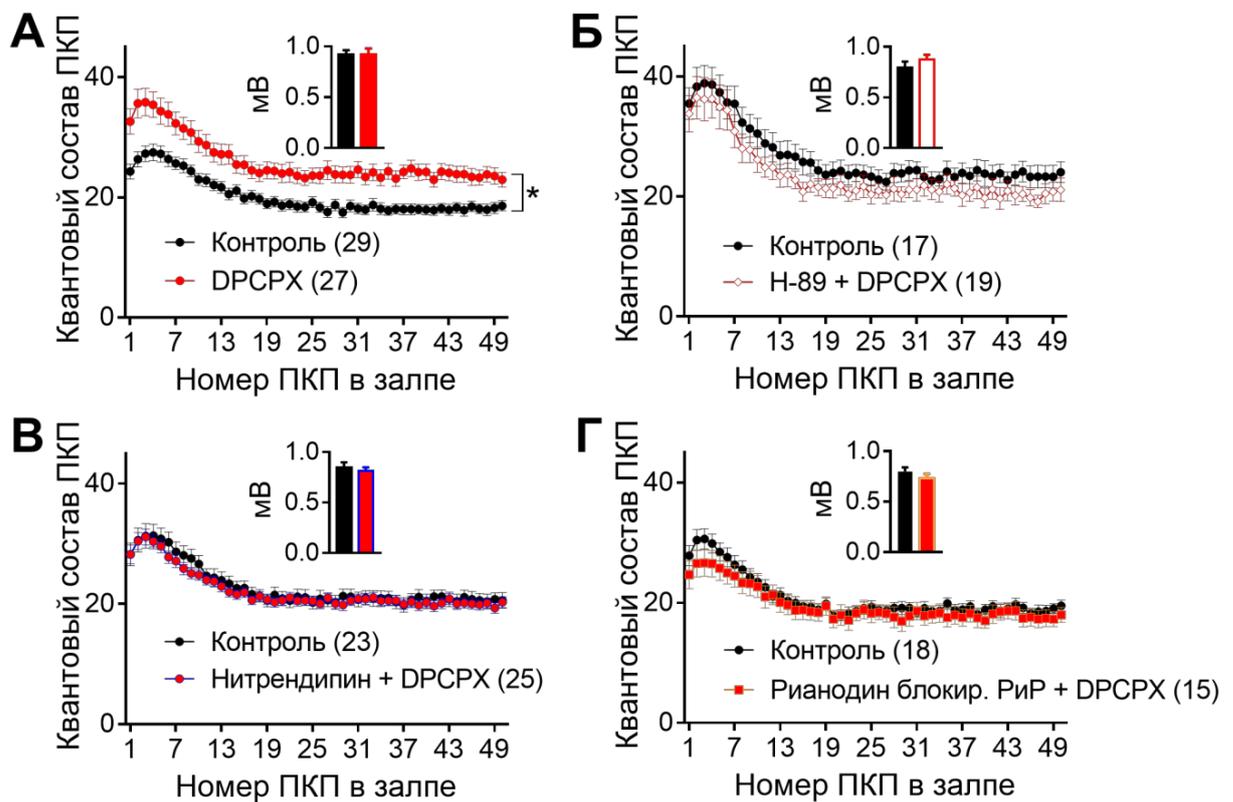


Рис. 17. Аденозиновые A1-рецепторы тормозят активность L-типа Ca^{2+} -каналов и препятствуют потенцированию вызванной секреции АХ. (А) Изменение квантового состава ПКП по ходу залпа в контроле и под действием блокатора A1-рецепторов DPCPX (100 нМ). (Б) Ингибирование РКА H-89 (1 мкМ) предотвращает потенцирующее действие DPCPX на вызванную ритмическую секрецию АХ. (В) На фоне нитрендипина (10 мкМ) DPCPX утрачивает свое потенцирующее действие на вызванный выброс АХ. (Г) Блокирование РиР рианоудином (3 мкМ) предотвращает потенцирование вызванной секреции АХ под действием DPCPX. На врезках – амплитуда МПКП. В скобках – количество синапсов в соответствующих группах. *- $p < 0.05$

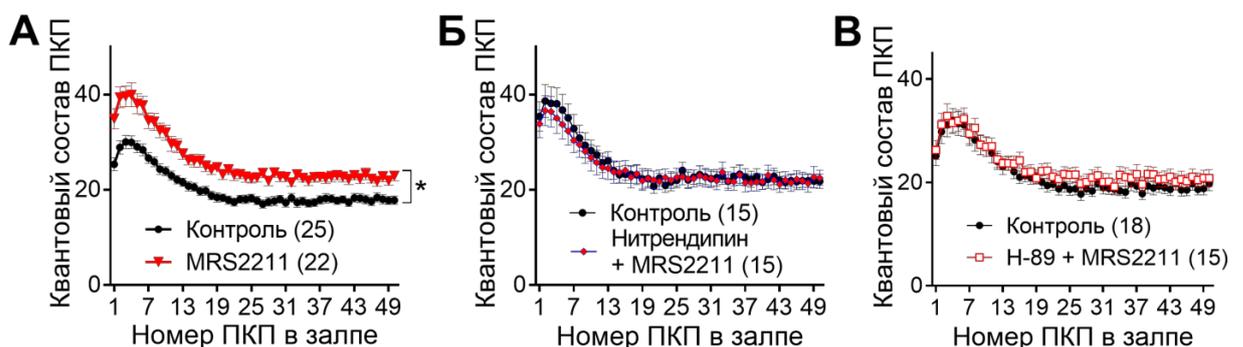


Рис. 18. P2Y13-рецепторы АТФ тормозят вызванный выброс АХ, препятствуя активации L-типа Ca^{2+} -каналов. (А) Изменение квантового состава ПКП по ходу залпа в контроле и под действием блокатора P2Y13-рецепторов MRS2211 (10 мкМ). (Б) Блокирование L-типа Ca^{2+} -каналов нитрендипином (10 мкМ) предотвращает потенцирующее действие MRS2211 на выброс АХ. (В) В присутствии ингибитора РКА H-89 (1 мкМ) MRS2211 утрачивает свое потенцирующее действие на вызванный выброс АХ. В скобках – количество синапсов в соответствующих группах. *- $p < 0.05$

Таким образом, L-тип Ca^{2+} -каналов является мишенью для реализации тормозных влияний на секрецию АХ со стороны P2Y13 рецепторов, как и в случае

воздействий со стороны A_1 -аденозиновых рецепторов. В нашей работе впервые показано, что в обоих случаях – и при тормозном действии аденозина на A_1 -рецепторы, и АТФ на $P2Y_{13}$ -рецепторы – мишенью являются Ca^{2+} -каналы L-типа. Оба типа рецепторов и запускаемые ими каскады, по-видимому, предназначены для затормаживания активности L-типа Ca^{2+} -каналов и препятствуют, таким образом, приросту квантового состава вызванной секреции АХ.

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

Роль Ca^{2+} -зависимой фосфатазы кальциейрина (CaN). Для выявления присутствия и активности CaN в синапсах диафрагмы мыши регистрировали изменения в секреции АХ при действии двух ингибиторов CaN – циклоспорина А (CsA, 1 мкМ) и кальциейрин-ингибирующего пептида (CN412, 2.3 мкМ). 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. 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^{2+} -каналов L-типа. Действительно, оказалось, что блокирование L-типа Ca^{2+} -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. 19).

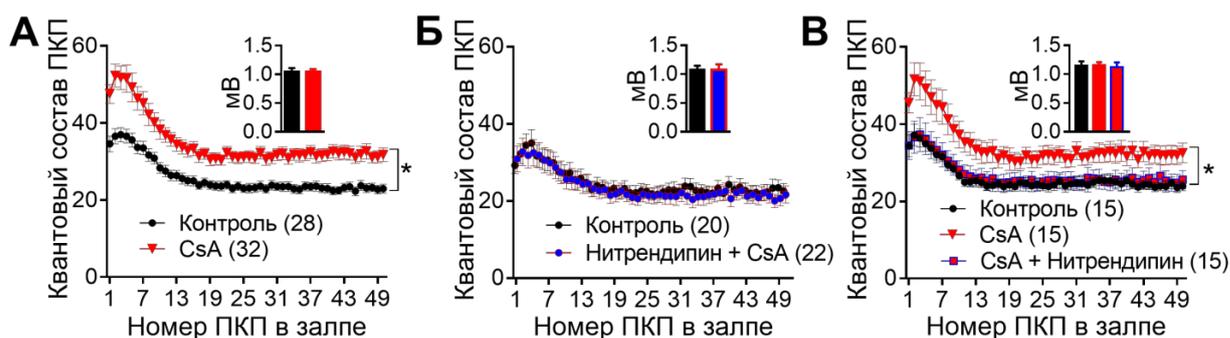


Рис. 19. В моторных синапсах имеется активность фосфатазы CaN, направленная на торможение вызванного выброса АХ и активности L-типа Ca^{2+} -каналов. (А) Изменение квантового состава ПКП по ходу залпа в контроле и под действием ингибитора CaN CsA (1 мкМ) (Б) Блокирование L-типа Ca^{2+} -каналов нитрендипином (1 мкМ) предотвращает потенцирующее действие CsA на вызванный выброс АХ в коротком залпе. (В) 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. *- $p < 0.05$.

Активатор Ca^{2+} -каналов L-типа - S(-) Bay K8644 (1 мкМ) вызывал увеличение квантового состава одиночных ПКП на 34% (до 43.92 ± 6.79 , $n=15$) по сравнению с контролем (30.22 ± 1.65 , $n=20$, $p < 0.05$), а воздействие 1 мкМ CsA в присутствии S(-)

Bay K8644 не вызывало достоверного изменения квантового состава ПКП (43.96 ± 2.58 , $n=17$, $p>0.05$) по сравнению с действием S(-) Bay K8644. Это свидетельствует о том, что в условиях, когда L-тип Ca^{2+} -каналов предварительно расторможен фармакологически, происходила окклюзия эффекта ингибирования CaN. Совокупность полученных данных позволяет утверждать, что именно L-тип Ca^{2+} -каналов является тем Ca^{2+} -входом в 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. Мы также установили, что блокирование РiР с помощью ТМВ-8 (1 мкМ) или рианодин (3 мкМ) также препятствует потенцированию вызванной секреции АХ в коротких залпах при ингибировании CaN (рис. 20А,Б). Таким образом, результаты данной серии экспериментов подтвердили, что при растормаживании L-типа Ca^{2+} -каналов путём ингибирования CaN для усиления секреции АХ необходима сопряженная Ca^{2+} -зависимая активация РiР и выброс Ca^{2+} из рианодин-чувствительных Ca^{2+} -депо.

Эндогенные регуляторные контуры, облегчающие активность L-типа Ca^{2+} -каналов. Функциональными антагонистами фосфатаз в регуляции активности белков являются протеинкиназы [Sim, 2003; Bastan et al., 2014]. В ЦНС регуляция активности Ca^{2+} -каналов L-типа, наряду с CaN, как правило, осуществляется и с участием РКА [Sanderson, Dell'Acqua, 2011; Oliveria et al., 2012; Murphy et al., 2014, Dittmer, 2014], причем оба фермента могут быть локализованы в непосредственной близости к каналам на якорных белках в составе регуляторных мультимолекулярных комплексов. 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. 20В).

Эти данные, а также отсутствие прироста квантового состава ПКП при ингибировании A_1 -аденозиновых рецепторов (рис. 17Б) или $P2Y_{13}$ -рецепторов (рис. 18В) на фоне предварительно заблокированной РКА позволяют утверждать, что в моторных терминалях РКА действительно задействована в регуляции L-типа Ca^{2+} -каналов, противопоставляя одновременно существующей активности CaN, аденозиновых A_1 -рецепторов и $P2Y_{13}$ -рецепторов.

Очевидно, что 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 $P2Y_{13}$ -рецепторов (чья работа направлена на снижение активности РКА) подавленное, замаскированное состояние L-типа Ca^{2+} -каналов в моторных терминалях. Необходимо было проверить, способно ли избирательное усиление активности РКА (независимо от присутствия и сохранения активности CaN) приводить к растормаживанию Ca^{2+} -входа через L-тип Ca^{2+} -каналов и усилению выброса АХ?

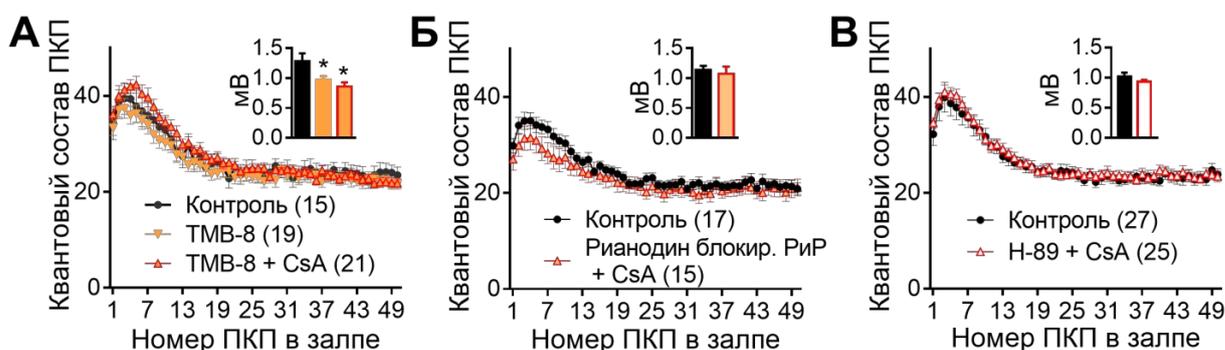


Рис. 20. Активность фосфатазы CaN препятствует усилению секреции АХ за счет сопряженной РКА-зависимой активности L-типа Ca^{2+} -каналов и РиР Ca^{2+} -депо. (А) Изменение квантового состава ПКП по ходу залпа в контроле, под действием блокатора РиР ТМВ-8 (1 мкМ) и при действии ингибитора CaN CsA (1 мкМ) 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; Yamashita, 2012]. (Б) Блокирование РиР рианодинем (3 мкМ) предотвращает потенцирующее действие CsA на квантовый состав ПКП в коротком залпе. (В) Изменение квантового состава ПКП по ходу залпа в контроле и под действием CsA в присутствии ингибитора РКА Н-89 (1 мкМ). На врезках – амплитуда МПКП. В скобках – количество синапсов в соответствующих группах. * - $p < 0.05$.

Мы предположили, что повышение активности РКА как фактора демаскирования L-типа Ca^{2+} -каналов в нервных терминалях может привести к растормаживанию этих каналов в случае дополнительного увеличения активности аденилатциклазы, повышающей уровень цАМФ в цитоплазме. В моторных терминалях такое увеличение может быть результатом активации аденозиновых A_{2A} -рецепторов [Oliveira et al., 2004; Oliveira, Correia-de-Sa, 2005].

Роль A_{2A} -аденозиновых рецепторов. Селективный антагонист A_{2A} -рецепторов ZM241385 (10 нМ) не вызвал статистически значимых изменений ни параметров спонтанной активности, ни амплитуды и квантового состава ПКП на всем протяжении короткого залпа. Это могло свидетельствовать о том, что при выбранном режиме работы моторных синапсов мыши в виде коротких залпов активация эндогенным аденозином A_{2A} -рецепторов не достаточна для воздействия на вызванный выброс АХ. Однако предварительное блокирование A_{2A} -рецепторов оказалось способно полностью предотвратить усиление вызванной секреции АХ при аппликации CsA (1 мкМ) (рис. 21А). 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. Рис. 21Б). Ингибирование РКА Н-89 (1 мкМ) или L-типа Ca^{2+} -каналов нитрендипином (1 мкМ), а так же блокада РиР рианодинем (3 мкМ) – все эти воздействия приводили к исчезновению облегчающего эффекта CGS21680 на выброс АХ (рис. 21В-Д). CGS21680 в условиях, когда L-тип Ca^{2+} -каналов предварительно демаскирован ингибированием CaN, не вызывал дополнительного усиления секреции АХ (рис. 21Е).

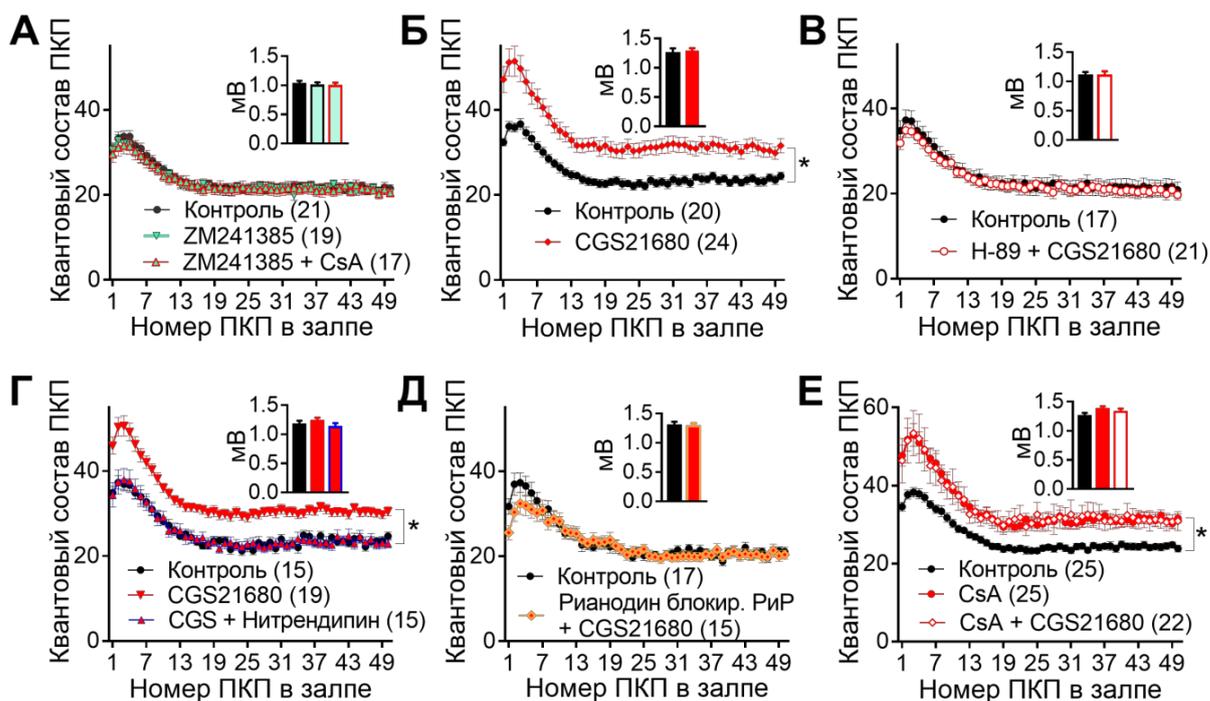


Рис. 21. Потенцирование вызванной секреции АХ при активации A_{2A} -аденозиновых рецепторов реализуется за счет сопряженной РКА-регулируемой активности L-типа Ca^{2+} -каналов и РнР Ca^{2+} -депо. (А) Изменение квантового состава ПКП по ходу залпа в контроле, под действием антагониста A_{2A} -рецепторов ZM241385 (10 нМ) и при действии ингибитора CaN CsA (1 мкМ) в присутствии ZM241385. (Б) Агонист A_{2A} -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) Блокирование РнР рианоудином (3 мкМ) предотвращает потенцирующее действие CGS21680 на квантовый состав ПКП в коротком залпе. (Е) Окклюзия облегчающих вызванную секрецию АХ эффектов ингибирования CaN (CsA) и активации A_{2A} -рецепторов (CGS21680). На врезках – амплитуда МПКП. В скобках – количество синапсов в соответствующих группах. * - $p < 0.05$.

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 с последующей активацией РнР.

В совокупности полученные данные говорят о том, что при работе моторных синапсов происходит постоянная функционально значимая активация A_{2A} -рецепторов эндогенным аденозином. Она не оказывает видимого воздействия на вызванный выброс АХ, но является обязательной для растормаживания Ca^{2+} -каналов L-типа в случае ослабления тонических тормозных влияний на этот тип каналов со стороны A_1 - и $P2Y_{13}$ -рецепторов и со стороны CaN.

Итак, в нашей работе впервые показано, что особый – обычно «молчаливый» пресинаптический Ca^{2+} -вход по L-типу Ca^{2+} -каналов - находится под совокупным регуляторным контролем целого ряда одновременно действующих как облегчающих (A_{2A} -рецепторы и РКА), так и (обычно доминирующих) тормозных (CaN, A_1 - и $P2Y_{13}$ -рецепторы) воздействий.

Эта впервые описанная нами в моторных терминалях многокомпонентная регуляция Ca^{2+} -входа по L-типу Ca^{2+} -каналов сходна со сложной и неоднозначной метаболической зависимостью активности L-типа Ca^{2+} -каналов и в других возбудимых клетках [Hudmon et al., 2005; Topolnik et al., 2009; Dittmer et al., 2014; Qian et al., 2017; Roca-Lapirot et al., 2018].

Исследование роли Ca^{2+} -входа по каналам P2X7-рецепторов в регуляции квантовой секреции АХ

Среди необычных синаптических Ca^{2+} -входов особое место занимают ионотропные P2X7-рецепторы, активирующиеся только АТФ в высоких концентрациях, и обладающие высокой проницаемостью для ионов Ca^{2+} [Deuchars et al., 2001; Moores et al., 2005]. Однако данные о роли этого потенциального Ca^{2+} -входа в регуляции секреции АХ в моторных синапсах скудны и противоречивы [Sokolova et al., 2003; Moores et al., 2005].

Антагонист P2X7-рецепторов A740003 (1 мкМ) не оказал воздействия на амплитуду и квантовый состав ПКП в коротких ритмических залпах (рис. 22А). Мы попытались селективно фармакологически активировать P2X7-рецепторы, апплицируя их агонист VzАТР (30 мкМ). Неожиданно, VzАТР не вызвал никаких изменений параметров спонтанной и вызванной секреции АХ в моторных синапсах (рис. 22Б). Отсутствие изменений вызванного выброса АХ при активации или ингибировании P2X7-рецепторов может, на наш взгляд, быть следствием нескольких причин и факторов. Во-первых, P2X7-рецепторы наиболее низкоаффинны по отношению к синаптической АТФ из всех P2X рецепторов и не активируются продуктами гидролиза АТФ – АДФ и АМФ [Ralevic, Burnstock, 1998]. В условиях быстрого гидролиза АТФ в щели [Smith, 1991] это может препятствовать их эффективной активации. Во-вторых, 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_1 - и P2Y13-рецепторов [Perissinotti et al., 2010; Guarracino et al., 2016; Miteva et al., 2017] или мускариновых холинорецепторов [Santafe et al., 2015].

Вместе с тем, несмотря на кажущееся отсутствие влияний на секрецию АХ со стороны пресинаптических P2X7-рецепторов, нам удалось получить доказательства того, что они все-таки активируются и косвенно влияют на секрецию АХ. Действительно, неожиданным оказался обнаруженный нами далее факты, что в условиях предварительной блокады P2X7-рецепторов (с помощью A740003) антагонист P2Y13-рецепторов MRS2211 (10 мкМ) утрачивает способность потенцировать вызванную секрецию АХ в коротких залпах и равномерно увеличивать амплитуду и квантовый состав каждого ПКП (рис. 22В). Иными словами, в условиях блокады P2X7-рецепторов не происходит растормаживания Ca^{2+} -каналов L-типа. Это означает, что в моторных синапсах при их активности в режиме коротких залпов имеет место активация P2X7-рецепторов эндогенной АТФ, при этом такая «скрытая» активность Ca^{2+} -проводящих рецепторов направлена на облегчение секреции АХ в составе комплексных разнонаправленных регуляторных воздействий на внутриклеточные мишени, включая L-тип Ca^{2+} -каналов.

В условиях предварительно усиленной под действием MRS2211 вызванной секреции антагонист P2X7-рецепторов A740003 оказался неспособен снизить квантовый состав ПКП в залпе к контрольному уровню (рис. 22Г) – при уже

расторженных Ca^{2+} -каналах L-типа с участием P2X7-рецепторов их блокирование оказывается неэффективным. Это могло свидетельствовать о запуске определенного Ca^{2+} -зависимого P2X7-опосредованного сигнального каскада, не требующего постоянной активности P2X7-рецепторов, и обеспечивающего подключение L-типа Ca^{2+} -каналов к усилению вызванной секреции АХ. Такое долговременное потенцирующее действие могло быть следствием активации СаМКП за счет входа Ca^{2+} по P2X7-рецепторам. Возможность запуска такого сигнального каскада была выявлена в синапсах ЦНС (León et al., 2006). И действительно, предварительное блокирование СаМКП с помощью KN-93 устраняло потенцирующий эффект антагониста P2Y13-рецепторов (рис. 22Д).

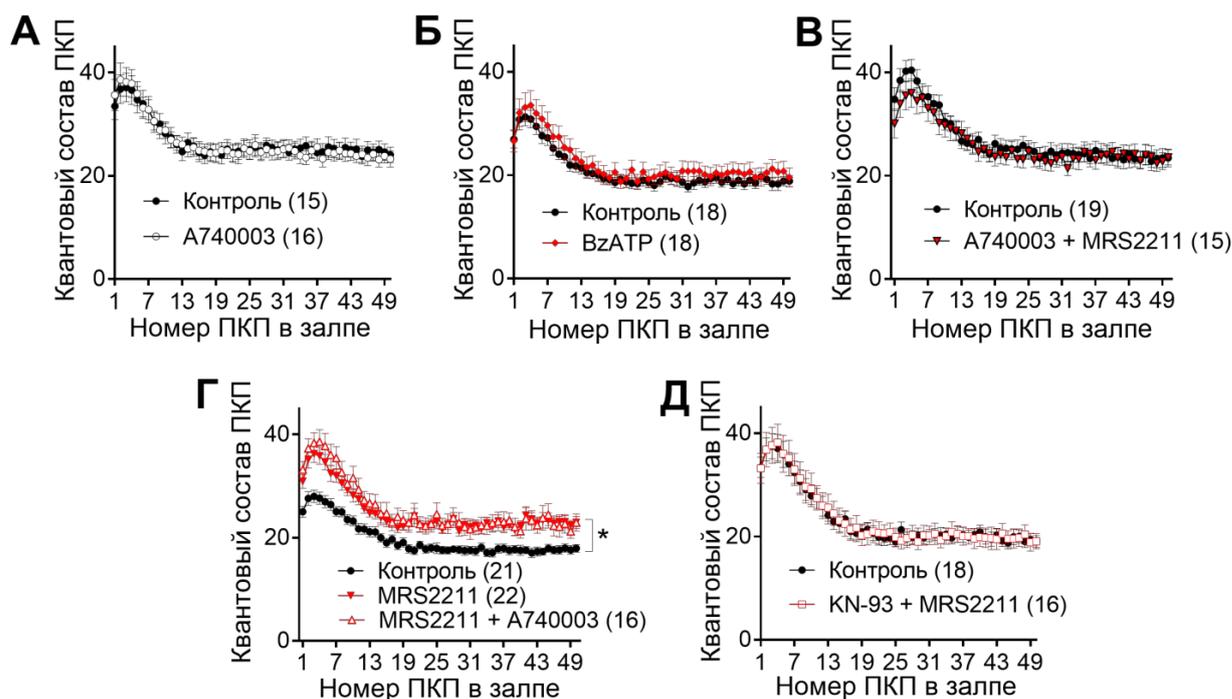


Рис. 22. Активация P2X7-рецепторов эндогенной АТФ способна опосредованно, через активацию СаМКП, потенцировать вызванную секрецию АХ, чему препятствует доминирующая активность P2Y13-рецепторов. (А) Изменение квантового состава ПКП по ходу залпа в контроле и под действием антагониста P2X7-рецепторов A740003 (1 мкМ). (Б) Агонист P2X7-рецепторов BzATP (30 мкМ) не вызвал изменений квантового состава ПКП в залпе. (В) Блокирование P2X7-рецепторов предотвращает потенцирование вызванной секреции АХ под действием антагониста P2Y13-рецепторов MRS2211 (10 мкМ). (Г) A740003 не способен уменьшить предварительно потенцированный MRS2211 квантовый состав ПКП. (Д) Ингибитор СаМКП KN-93 (3 мкМ) предотвращает потенцирующий эффект блокирования P2Y13-рецепторов в отношении вызванной активности моторных синапсов. На врезках – амплитуда МПКП. В скобках – количество синапсов в соответствующих группах. *- $p < 0.05$.

Таким образом, в нашей работе впервые показано, что в интактных моторных синапсах мышцы пресинаптические P2X7-рецепторы не только присутствуют, но и подвержены активации со стороны эндогенной АТФ в условиях коротких (50 Гц, 1 с) ритмических залпов ПКП. При этом их потенцирующее действие на выброс АХ замаскировано параллельной (и преобладающей) активностью других пуринорецепторов - P2Y13-типа, тормозящих квантовую секрецию АХ. Вместе с тем, удалось показать, что вход ионов Ca^{2+} при активации P2X7-рецепторов сопровождается активацией сигнального пути с участием СаМКП, направленного на

вовлечение Ca^{2+} -каналов L-типа в регуляцию секреции АХ. Учитывая то, что P2Y13-рецепторы входят в число негативных регуляторов активности L-типа Ca^{2+} -каналов, можно предположить, что в интактных синапсах активация P2X7-рецепторов (сопряженно с другими регуляторами) является необходимым условием для поддержания функционального статуса L-типа Ca^{2+} -каналов и их растормаживания при ослаблении тормозных воздействий на этот тип Ca^{2+} -каналов со стороны P2Y13-рецепторов.

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 $\alpha 7$ -типа ($\alpha 7$ -нХР).

Исследование роли Ca^{2+} -входа по никотиновым холинорецепторам альфа7-типа ($\alpha 7$ -нХР) в регуляции квантовой секреции АХ

Гомепентамерные $\alpha 7$ -нХР отличаются от других типов нХР высокой Ca^{2+} -проводимостью [Faria et al., 2003; Shen, Yakel, 2009; Papke, 2014] 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 [Sharma, Vijayaraghavan, 2003]. В моторных синапсах при предполагаемой активации «околосинаптических» $\alpha 7$ -нХР наблюдается торможение секреции АХ при одиночной или низкочастотной стимуляции нерва [Tian et al., 1994; Prior, Singh, 2000]. Механизмы этого торможения оставались не изученными.

В нашей работе холин (100 мкМ) также вызывал снижение квантового состава одиночных ПКП, в среднем, на 25% - от 34.20 ± 2.56 (n=18) в контроле до 25 ± 2.56 на фоне холина (n = 19, $p < 0.05$). Избирательные блокаторы $\alpha 7$ -нХР – метилликаконитин (MLA, 20 нМ) или альфа-кобратоксин (αCTx , 5 нМ) сами по себе не влияли на секрецию АХ, но полностью предотвращали тормозное действие холина на квантовый состав ПКП (рис. 23), что говорит о подавлении вызванного выброса АХ холином именно через активацию пресинаптических $\alpha 7$ -нХР.

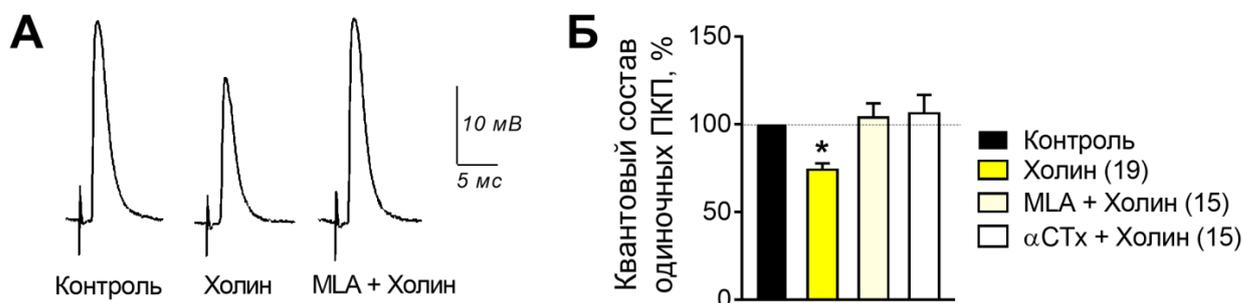


Рис. 23. Стимуляция $\alpha 7$ -нХР холином (100 мкМ) тормозит одиночную вызванную секрецию АХ в моторных синапсах. (А) Примеры оригинальных записей одиночных ПКП в контроле, в присутствии холина и при действии холина на фоне блокатора $\alpha 7$ -нХР MLA (20 нМ). (Б) Блокаторы $\alpha 7$ -нХР MLA и αCTx (5 нМ) предотвращают снижение квантового состава одиночных ПКП (нормализован к контролю, принятому за 100%). В скобках – количество синапсов в соответствующих группах. *- $p < 0.05$.

При короткой высокочастотной стимуляции моторных синапсов (50 Гц, 1 с) холин также вызывал снижение амплитуды и квантового состава каждого ПКП в залпе, не изменяя при этом рисунок залпа (рис. 24А,Б). Расчет параметров квантовой секреции АХ в залпе показал, что тормозное действие холина сопровождается статистически значимым снижением RRP. Это означает, что часть активных зон терминалей перестает принимать участие в синхронной вызванной секреции АХ, при этом значение вероятности вызванного выброса АХ (Р) при активации $\alpha 7$ -нХР холином остается на контрольном уровне (рис. 24В). MLA (20 нМ) предотвращал подавление холином амплитуды и квантового состава ПКП по ходу ритмических залпов. (рис. 24Г).

Было сделано предположение, что активация холином Ca^{2+} -проводящих $\alpha 7$ -нХР создает в терминалях Ca^{2+} -сигнал, который приводит к подавлению Ca^{2+} -зависимой секреции АХ за счет снижения числа активных зон терминали, готовых к освобождению квантов, что и вызывает снижение квантового состава ПКП в залпе. Такое Ca^{2+} -зависимое изменение возбудимости терминалей могло происходить за счет активации низкопроводящих Ca^{2+} -активируемых K^+ -каналов SK-типа, описанных в нервных терминалях моторных синапсов [Roncarati et al., 2001]. Мы установили, что блокатор SK-каналов апамин (200 нМ) не вызывает статистически значимых изменений амплитуды и квантового состава ПКП в ритмическом залпе ПКП, но на его фоне холин утрачивал способность снижать квантовый состав ПКП (рис. 24Д). Это может свидетельствовать в пользу того, что в Ca^{2+} -зависимом тормозном действии холина на секрецию АХ SK-каналы выступают в качестве финальной мишени сигнального каскада, запускаемого активацией $\alpha 7$ -нХР. Возникающая при этом гиперполяризация мембраны, по-видимому, способна переводить в «молчащее» состояние некоторые активные зоны, что и приводит угнетению синхронного мультиквантового выброса АХ.

Для выявления возможных механизмов тормозного действия холина на вызванную секрецию АХ с участием SK-каналов, способность холина подавлять амплитуду и квантовый состав ПКП в залпе была исследована на фоне блокаторов РиР (рианодин, 3 мкМ) и Ca^{2+} -зависимых ферментов – РКС (хелеритрин, 4 мкМ) и СаМКII (KN-62, 3 мкМ). Оказалось, что хелеритрин не устраняет снижение квантового состава ПКП в залпе, индуцируемое холином, тогда как блокаторы РиР и СаМКII способны (каждый по отдельности) предотвращать тормозный эффект холина (рис. 24Е-З).

Таким образом, мы впервые установили, что активация пресинаптических Ca^{2+} -проводящих $\alpha 7$ -нХР с помощью экзогенного холина тормозит синаптическую передачу в моторных синапсах посредством запуска внутриклеточного каскада с участием риаинодин-чувствительных Ca^{2+} -депо, СаМКII и Ca^{2+} -активируемых калиевых каналов SK-типа, приводя к уменьшению квантового состава ПКП в коротких залпах. Полученные в нашей работе новые данные об активности пресинаптической СаМКII впервые продемонстрировали возможность избирательной активации СаМКII при активации P2X7-рецепторов, при входе Ca^{2+} по L-типу Ca^{2+} -каналов, при выбросе депонированного Ca^{2+} , и при активации $\alpha 7$ -нХР, но с разными функциональными последствиями для секреции АХ.

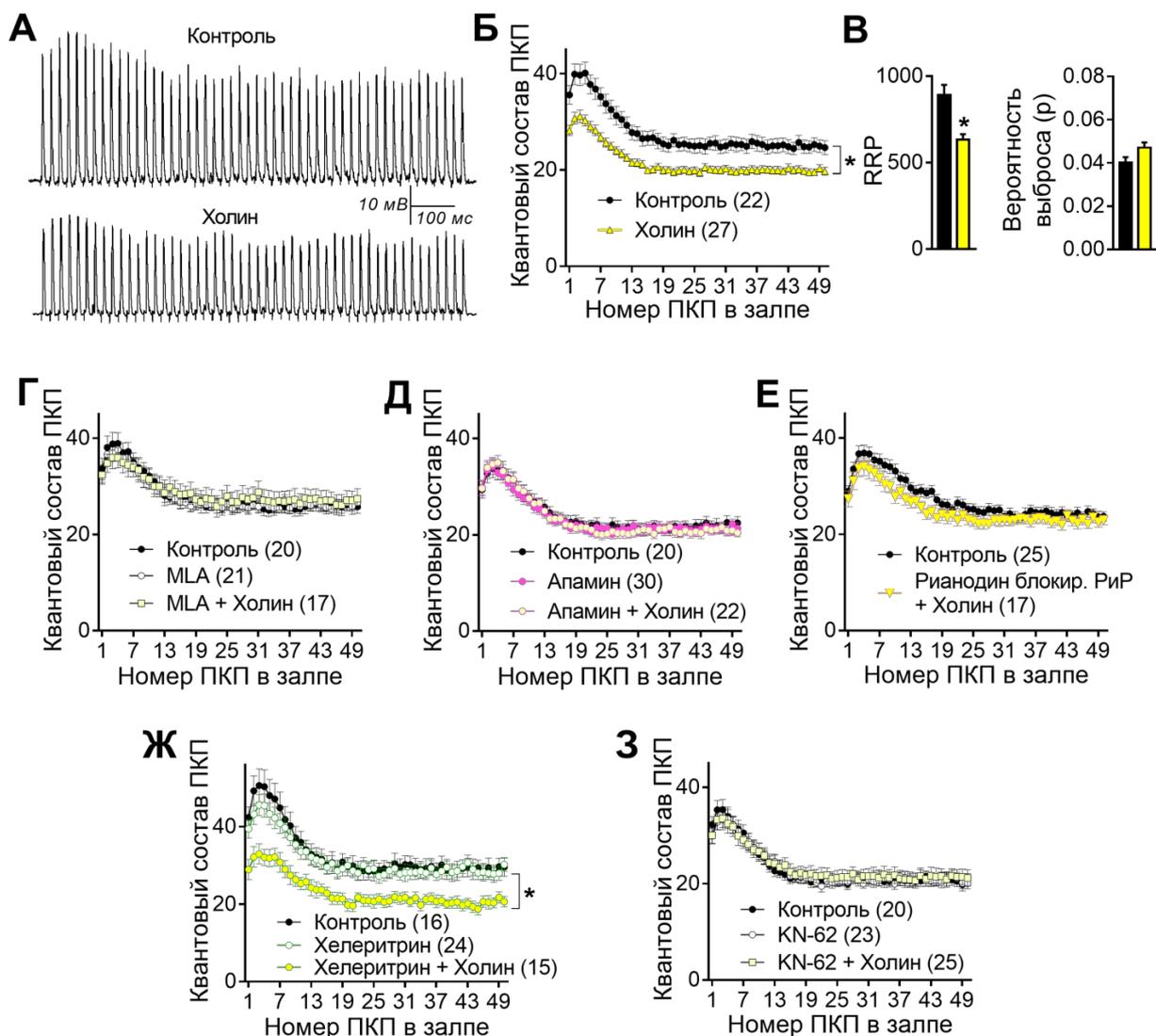


Рис. 24. Торможение ритмической вызванной секреции АХ при активации $\alpha 7$ -нХР холином (100 мкМ) и его механизм. (А) Пример оригинальных записей ПКП в коротком высокочастотном залпе (50 Гц, 1 с) в контроле и при действии холина. (Б) Изменение квантового состава ПКП по ходу залпа в контроле и под действием холина. (В) Активация $\alpha 7$ -нХР холином вызывает уменьшение размера RRP без значимого изменения вероятности выброса квантов АХ. (Г) Блокатор $\alpha 7$ -нХР MLA (20 нМ) сам не изменяет квантовый состав ПКП в залпе, но полностью предотвращает его снижение под действием холина. (Д) Холин утрачивает способность снижать квантовый состав ПКП в залпе в присутствии блокатора SK-каналов апамина (200 нМ). (Е) Блокада РиР рианоидином (3 мкМ) предотвращает торможение вызванной секреции АХ под действием холина. (Ж) Блокирование РКС хелеритрином (4 мкМ) не способно предотвратить снижение квантового состава ПКП при активации $\alpha 7$ -нХР холином. (З) Холин утрачивает способность тормозить вызванную секрецию АХ в залпе на фоне предварительно заблокированной KN-62 (3 мкМ) CaMKII. В скобках – количество синапсов в соответствующих группах. *- $p < 0.05$.

Это указывает на высокую степень компартиментализации фермента, его колокализацию с определенными Ca^{2+} -входами и соответствующими мишенями. В совокупности, это отражает узкоизбирательный пространственно-временной паттерн активности ферментов, который может лежать в основе разных Ca^{2+} -зависимых воздействий на параметры секреции нейротрансмиттера.

Роль $\alpha 7$ -нХР при длительной ритмической активности моторных синапсов. Поскольку MLA (блокатор $\alpha 7$ -нХР) не оказал влияния на параметры ПКП в коротком залпе (рис. 24Г), 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 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. 25А). 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 ± 0.08 мВ, а после залпа – 0.97 ± 0.08 мВ ($n = 17$, $p > 0.05$). Расчет квантового состава ПКП на разных этапах по ходу залпа и развивающейся депрессии передачи показал, что уменьшение амплитуды ПКП имеет пресинаптическую природу и однозначно связано со снижением квантового состава ПКП на всем протяжении залпа ПКП. Депрессия 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.

Блокирование $\alpha 7$ -нХР с помощью MLA (20 нМ) не вызывало достоверных изменений квантового состава ПКП в первую секунду залпа. Однако, в период со 2-й по 10-ю секунды снижение квантового состава ПКП становилось значительно менее выраженным, чем в контроле, и составило к концу 10-й секунды стимуляции $72.1 \pm 3.2\%$ по сравнению с ПКП1 (в контроле за этот же период квантовый состав ПКП снижался до $54.4 \pm 3.1\%$ ($p < 0.05$) от значения для ПКП1) (рис. 25Б). 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 ПКП1 в отличие от депрессии (снижения) ПКП до 35-40% в контроле. Далее мы установили, что и блокатор SK-каналов апамин (1 мкМ), и блокирующий РиР рианодин (3 мкМ), аналогично MLA, способны снижать развитие депрессии синаптической передачи в ходе длительной залповой активности моторных синапсов (рис. 25В, Г).

Таким образом, нами впервые показано, что хорошо известная депрессия передачи в условиях продолжительной (в течение десятков секунд) высокочастотной тетанической активности моторных синапсов мышцы, обычно именуемая «утомлением синапса», может быть в значительной степени предотвращена избирательной блокадой $\alpha 7$ -нХР, SK-каналов и РиР. Это свидетельствует о том, что имеет место активация $\alpha 7$ -нХР эндогенным холином/АХ, обеспечивающая ауторегуляторное снижение секреции АХ по механизму отрицательной обратной связи в условиях продолжительной активности моторных синапсов. Данное аутоингибирование выброса АХ с участием Ca^{2+} -входа по каналам $\alpha 7$ -нХР может служить адаптивным механизмом, оптимизирующим баланс между необходимым уровнем выброса АХ и его излишними расходами, что может

продлевать адекватную работоспособность одиночной концевой пластинки в условиях ее продолжительной работы.

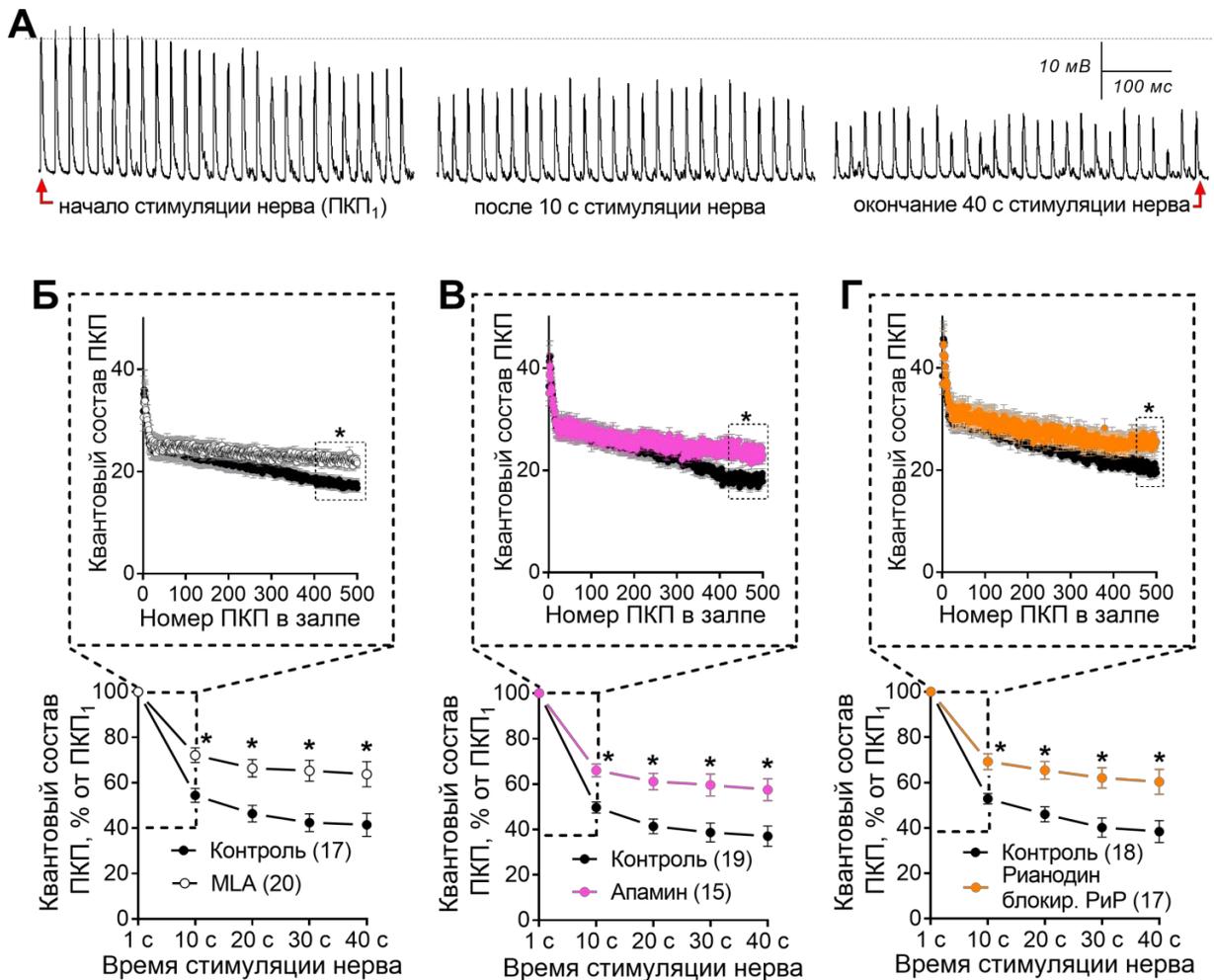


Рис. 25. Ауторегуляторная активация $\alpha 7$ -нХР при длительной высокочастотной активности моторных синапсов в значительной мере обуславливает депрессию синаптической передачи. Пример оригинальных записей ПКП на разных участках длительного высокочастотного залпа (50 Гц, 40 с) (А). Изменение квантового состава ПКП по ходу длительного высокочастотного залпа в контроле и под действием блокатора $\alpha 7$ -нХР MLA (20 нМ) (Б), под действием блокатора SK-каналов апамина (1 мкМ) (В) и под действием рианодина в концентрации, блокирующей РиР (3 мкМ) (Г). На врезках – динамика изменения квантового состава ПКП в первые 10 с залпа. В скобках – количество синапсов в соответствующих группах. * - $p < 0.05$.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе собраны воедино данные о вкладе четырех разных источников поступления Ca^{2+} в аксоплазму нервных терминалей моторных синапсов млекопитающих (мышь), о специфической роли этих пресинаптических Ca^{2+} -входов в управлении машиной секреции АХ по сравнению с триггерным Ca^{2+} -входом, запускающим конечный акт выброса нейротрансмиттера (АХ) (рис. 26).

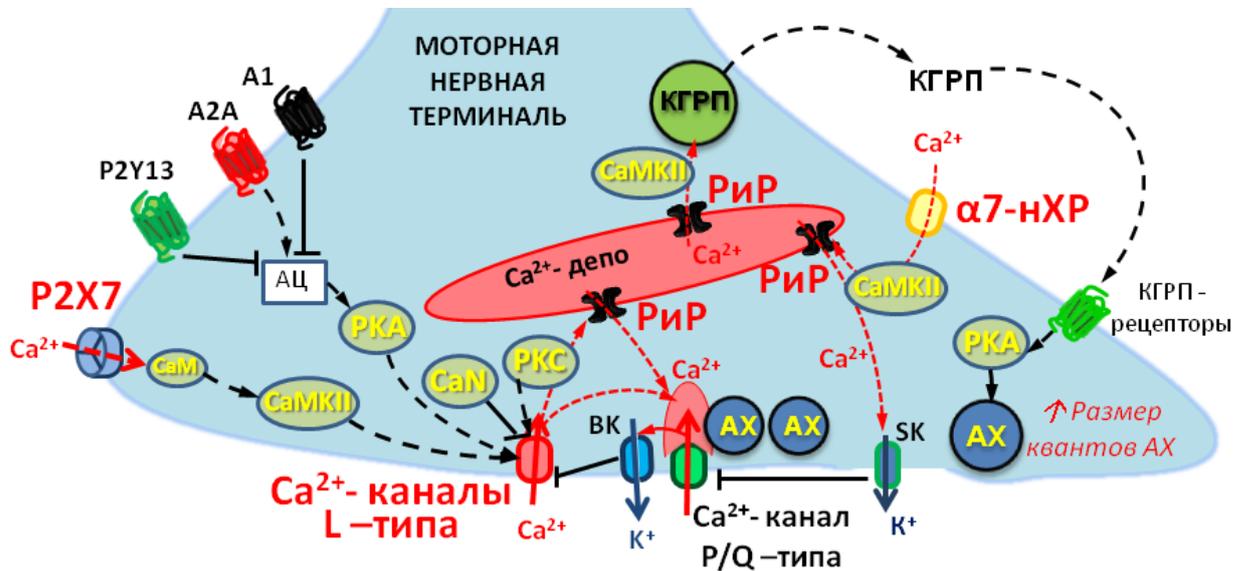


Рис. 26. Ансамбль дополнительных к основному (Р/В-тип Ca^{2+} -каналов) пресинаптических Ca^{2+} -входов, который обеспечивает разнообразные - как потенцирующие, так и тормозные - модулирующие воздействия на синаптическую передачу при разных режимах работы моторных синапсов, при этом данные входы могут функционировать как обособленно, так и совместно.

Мы установили, что ни один из обследованных Ca^{2+} -входов - по потенциал-зависимым Ca^{2+} -каналам L-типа, Ca^{2+} -активируемыми каналами РИР внутритерминальных Ca^{2+} -депо, Ca^{2+} -проводящим каналам Р2Х7-рецепторов и каналам $\alpha 7$ -нХР - не дублирует роли Ca^{2+} , входящего по Р/В-типу Ca^{2+} -каналов и не способен самостоятельно запускать Ca^{2+} -зависимую секрецию АХ в моторных синапсах, но может существенно влиять на нее, причем как в сторону усиления, так и торможения.

Удалось охарактеризовать вклад каждого Ca^{2+} -входа с точки зрения: а) условий, при которых он срабатывает, б) мишеней и сигнальных каскадов, запускаемых входящим Ca^{2+} ; в) изменения параметров квантовой секреции АХ, включая квантовый состав ПКП, размер квантов АХ, вероятность выброса квантов (р), размер готового к высвобождению пула синаптических везикул (RRP).

Впервые установлено, что в моторных синапсах активность обычно «молчащих» пресинаптических Ca^{2+} -каналов L-типа находится под многоуровневым и разнонаправленным контролем со стороны метаболитных рецепторов (и ионотропных рецепторов Р2Х7), ферментов, и К⁺-токов в терминалях. Мы показали, что активность L-типа Ca^{2+} -каналов обычно заторможена, благодаря сочетанной активности пуринергических А1- и Р2У13-рецепторов, а также Ca^{2+} -зависимой протеинфосфатазы СаН. Активирующие же влияния - со стороны А2А- и Р2Х7-рецепторов и сопряженных с ними ферментов РКА и СаМКИ - хотя и присутствуют, но обычно не достаточны для растормаживания Ca^{2+} -каналов L-типа

в работающем синапсе. При этом достаточно выключения лишь одного из тормозных, либо усиления облегчающих влияний, чтобы сдвинуть баланс модулирующих воздействий в сторону активации L-типа Ca^{2+} -каналов. Возрастающий при этом квантовый состав одиночных ПКП внешне напоминает таковой при усилении другого Ca^{2+} -входа - по P/Q-типу Ca^{2+} -каналов. Однако мы впервые показали, что включение L-типа Ca^{2+} -каналов облегчает выброс нейротрансмиттера по другому механизму - усиливает не только одиночный акт выброса АХ, но и поддерживает его на повышенном уровне в течение всего хода короткого (1 с, 50 Гц) залпа ПКП.

Мы также впервые показали, что независимо от способа растормаживания L-типа каналов, их подключение приводит к активации РиР, выбросу депонированного Ca^{2+} и вовлечению Ca^{2+} -зависимых ферментов - РКС и СаМКП – в поддержание устойчиво повышенной секреции АХ в ритмическом залпе ПКП. Расчеты показали, что это сопровождается увеличением размера RRP, т.е. ростом числа срабатывающих активных зон при стабильности вероятности выброса квантов АХ (p). Таким образом, обнаружен специфический механизм потенцирования выброса нейротрансмиттера при активации L-типа Ca^{2+} -каналов. На наш взгляд, пресинаптические Ca^{2+} -каналы L-типа и их регуляторная роль в секреции нейротрансмиттера являются особенностью терминалей нервно-мышечных контактов, несмотря на то что эти каналы функционируют и в нервных окончаниях синапсов ЦНС. Это может быть частью адаптивной системы страхования надежности синаптической передачи через единственный синапс мышечного волокна - в случае его функционального ослабления при избыточной активности или различных патологиях нервно-мышечной передачи.

Действительно, вовлечение пресинаптических Ca^{2+} -каналов L-типа в регуляцию секреции нейротрансмиттера отмечено лишь при длительной высокочастотной активности моторных синапсов [Perissinotti et al., 2008], либо – при расстройствах передачи, таких, как миастенические синдромы, сопровождающихся депрессией передачи и ослаблением основного Ca^{2+} -входа по P/Q-типу Ca^{2+} -каналов [Giovannini et al., 2002].

Присутствие ЭР и возможность выброса депонированного Ca^{2+} через РиР хорошо доказано в моторных терминалях [Балезина, 2002]. Такому выбросу обычно приписывают роль усилителя Ca^{2+} -сигнала, поступающего из наружной среды для потенцирования выброса АХ [Nishimura et al., 1990; Palma et al., 2011; Gerasimova et al., 2015], либо – роль фактора, десинхронизирующего многоквантовый вызванный выброс АХ [Khuzakhmetova et al., 2014]. Однако наши исследования выявили неожиданное разнообразие процессов, в которых участвует выброс депонированного Ca^{2+} .

Мы впервые показали, что существует как минимум три разных входа Ca^{2+} – по P/Q-типу, L-типу Ca^{2+} -каналов и $\alpha 7$ -нХР, которые могут приводить к активации РиР и выбросу депонированного Ca^{2+} , но с различными последствиями для секреции АХ, реализующимися по разным механизмам. Выявлены облегчающие влияния - при входе по Ca^{2+} -каналам P/Q- и L-типов, и тормозные – по каналам $\alpha 7$ -нХР. Наконец, в нашей работе впервые выявлена способность Ca^{2+} , выбрасываемого из Ca^{2+} -депо, регулировать экзоцитоз не только холинергических, но, скорее всего, и крупных везикул, содержащих пептид КГРП, регулирующий размер квантов АХ. Сделано заключение, что выброс депонированного Ca^{2+} через РиР – участник пространственно и функционально дифференцированной системы Ca^{2+} -зависимой

регуляции процессов секреции нейротрансмиттера, с вовлечением избирательно активируемых, специфических Ca^{2+} -зависимых ферментов и каналов.

В нашей работе впервые проведен детальный электрофизиологический анализ роли Ca^{2+} -входа через ионотропные P2X7-рецепторы, способные при их избирательной активации со стороны эндогенной АТФ пропускать в терминаль поток Ca^{2+} по необычным (имеющим тримерную структуру) ионным каналам [North, 2002]. Их присутствие ранее было описано на моторных терминалях [Deuchars et al., 2001; Moores et al., 2005], однако мы впервые показали, что при обычных режимах работы синапсов непосредственный видимый вклад P2X7 рецепторов в контроль секреции АХ отсутствует, и это связано с преобладанием одновременно функционирующей совокупности тормозных пуринорецепторов терминалей, подавляющих секрецию АХ.

Мы впервые показали, что в случае ослабления доминирующих тормозных пуринергических влияний, активация P2X7 рецепторов способна приводить к активации СаМКП, растормаживанию L-типа Ca^{2+} -каналов и облегчению вызванной секреции АХ.

Крайне мало изученным Ca^{2+} -входом моторных терминалей являются и ионотропные никотиновые холинорецепторы $\alpha 7$ -типа, обладающие способностью активироваться не только с помощью АХ или никотина, но и эндогенного холина (продукта гидролиза АХ в щели), и проводить при своей активации ионы Ca^{2+} в терминаль [Albuquerque et al., 2009]. Несмотря на возможное наличие таких нХР в моторных синапсах, их роль оставалась не изученной.

В нашей работе впервые показано, что в моторных синапсах $\alpha 7$ -нХР играют важную роль в системе ауторегуляции квантовой секреции АХ по принципу отрицательной обратной связи. Впервые показано, что этот уникальный Ca^{2+} -вход требует накопления АХ/холина в синаптической щели для своей активации и срабатывает лишь при интенсивной и длительной ритмической активности моторных синапсов. Это вызывает избирательную активацию пресинаптической СаМКП и Ca^{2+} -активируемых K^+ -каналов SK-типа, что, в свою очередь, приводит к торможению выброса АХ в моторных синапсах.

Мы впервые показали, что хорошо известное «утомление синаптической передачи» при длительной ритмической активности моторных синапсов, обычно приписываемое истощению RRP либо прогрессирующей десенситизации мышечных нХР, на самом деле в значительной степени обусловлено аутоингибированием секреции АХ с участием $\alpha 7$ -нХР и эндогенных АХ/холина. Фармакологическое блокирование этого Ca^{2+} -входа способно существенно снизить развитие утомления в моторных синапсах. Обнаруженный механизм аутоингибирования, служит, по-видимому, для оптимизации выброса нейротрансмиттера (АХ) и соблюдения необходимого баланса между его расходом и экономией при интенсивной активности синапсов.

Таким образом, впервые в периферических синапсах раскрыта роль 4-х разных пресинаптических Ca^{2+} -входов, их способность активировать локальные, обособленные либо частично перекрывающихся Ca^{2+} -зависимые сигнальные каскады и мишени, вовлеченные в разнонаправленную регуляцию секреции АХ (рис. 26).

Мы впервые показали, что роль Ca^{2+} -входов не сводится лишь к повышению внутритерминальной концентрации Ca^{2+} и суммации с Ca^{2+} , поступающим по основному, P/Q-типу Ca^{2+} -каналов. Сформулирована концепция, согласно которой

каждый Ca^{2+} -вход играет свою сугубо индивидуальную роль в регуляции секреции квантов АХ, включается лишь при определенных условиях, использует специфический механизм и является частью дифференцированной адаптивной регулировки параметров секреции АХ в работающих синапсах. Взятые вместе, эти данные расширяют современные представления о возможностях Ca^{2+} -зависимой регуляции параметров секреции нейротрансмиттеров в химических синапсах.

ВЫВОДЫ

1. В нервных терминалях моторных синапсов выявлены причины подавленного состояния потенциал-зависимых Ca^{2+} -каналов L-типа. Механизм торможения включают активность ВК-каналов, CaN, подавление активности РКА со стороны пуринарецепторов A_1 - и P_2Y_{13} -типов.
2. Механизм растормаживания (перехода в активное состояние) Ca^{2+} -каналов L-типа предполагает ослабление одного из тормозных влияний, либо – усиление специальных сигнальных каскадов с участием РКА, РКС или СаМКП.
3. Вход ионов Ca^{2+} по 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 Ca^{2+} -депо вблизи активных зон моторных терминалей.
4. РиР и выброс депонированного Ca^{2+} при их активации ионами Ca^{2+} от разных Ca^{2+} -входов, активируя разные Ca^{2+} -зависимые ферменты (РКС, СаМКП) и/или ионные каналы (СК-типа), соучаствует в разнонаправленной регуляции квантовой секреции АХ.
5. Активация РиР рианодинном, совместно с СаМКП, избирательно запускает выброс нейропептида КГРП, обеспечивающего аутокринное пресинаптическое увеличение размера квантов АХ.
6. В моторных синапсах имеет место активация и вход ионов Ca^{2+} по каналам P_2X_7 -рецепторов, потенцирующий вызванную секрецию квантов АХ за счет СаМКП-опосредованного растормаживания Ca^{2+} -каналов L-типа. Эта активность необходима для поддержания секреции АХ при ослаблении тормозных влияний со стороны P_2Y_{13} -рецепторов в моторных терминалях.
7. Активация Ca^{2+} -проводящих $\alpha 7$ -нХР экзогенным холином приводит к подавлению квантовой секреции АХ в моторных синапсах посредством активации рианодин-чувствительных Ca^{2+} -депо, СаМКП и 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 Ca^{2+} -входа - Ca^{2+} -каналы L-типа, РиР, P_2X_7 -рецепторы и $\alpha 7$ -нХР - функционально значимы и обладают способностью запускать избирательные механизмы для адаптивной Ca^{2+} -зависимой регуляции квантовой секреции АХ.

**СПИСОК НАУЧНЫХ СТАТЕЙ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ
ДИССЕРТАЦИИ В ЖУРНАЛАХ SCOPUS, WOS, RSCI, А ТАКЖЕ В
ИЗДАНИЯХ, РЕКОМЕНДОВАННЫХ ДЛЯ ЗАЩИТЫ В
ДИССЕРТАЦИОННОМ СОВЕТЕ МГУ.015.7 ПО СПЕЦИАЛЬНОСТИ
«ФИЗИОЛОГИЯ ЧЕЛОВЕКА И ЖИВОТНЫХ»**

1. A.S. Miteva, **A.E. Gaydukov**, O.P. Balezina. Interaction between calcium chelators and the activity of P2X7 Receptors in mouse motor synapses // International Journal of Molecular Sciences. – 2020. – V. 21. – № 6 – P. 2034. (doi: 10.3390/ijms21062034, IF=4.556, WoS) (1.4/1.1)
2. **A.E. Gaydukov**, P.O. Bogacheva, E.O. Tarasova, A.I. Molchanova, E.S. Pravdivceva, O.P. Balezina. Regulation of acetylcholine quantal release by coupled thrombin/BDNF signaling in mouse motor synapses // Cells. – 2019. – V. 8. – № 6 – P. 762. (doi: 10.3390/cells8070762 IF=4.366, WoS) (2.24/1.8)
3. **A.E. Gaydukov**, P.O. Bogacheva, O.P. Balezina. The participation of presynaptic alpha7 nicotinic acetylcholine receptors in the inhibition of acetylcholine release during long-term activity of mouse motor synapses. Neurochemical Journal. – 2019. – V. 13. – № 1 – P. 20-27. (doi: 10.1134/S1819712419010082, IF=0.488, WoS) (1.1/0.9)
4. E.O. Tarasova, **A.E. Gaydukov**, O.P. Balezina. Calcineurin and its role in synaptic transmission. Biochemistry (Moscow). – 2018. – V. 83. – № 6 – P. 674-689. (doi: 10.1134/S0006297918060056 IF=2.727, Scopus) (2.3/1.9)
5. A.S. Miteva, **A.E. Gaydukov**, V.I. Shestopalov, O.P. Balezina. Mechanism of P2X7 receptor-dependent enhancement of neuromuscular transmission in pannexin 1 knockout mice // Purinergic Signalling. – 2018. – V. 14. – № 4 – P. 459-469. (doi: 10.1007/s11302-018-9630-7 IF=4.130, Scopus) (1.5/1.2)
6. **A.E. Gaydukov**, O.P. Balezina. Ryanodine- and CaMKII-dependent release of endogenous CGRP induces an increase in acetylcholine quantal size in neuromuscular junctions of mice // Brain and Behavior. – 2018. – V. 8. – № 8 – P. e01058. (doi: 10.1002/brb3.1058 IF=2.091, WoS) (1.6/1.4)
7. О.П. Балезина, **А.Е. Гайдуков**. Пресинаптическая регуляция размера квантов медиатора // Успехи физиологических наук. – 2018. – V. 49. – № 2 – P. 20-44. (doi: 10.7868/S0301179818020029, IF(RINC)=0.509, Scopus) (3.08/2.6)
8. **A.E. Gaydukov**, O.P. Balezina. CaMKII is involved in the choline-induced downregulation of acetylcholine release in mouse motor synapses // Acta Naturae. – 2017. – V. 9. – № 4 – P. 110-113. (doi: 10.32607/2075851-2017-9-4-110-113 IF=1.36, WoS) (0.61/0.5)
9. A.S. Miteva, **A.E. Gaydukov**, V.I. Shestopalov, O.P. Balezina. The role of pannexin 1 in the purinergic regulation of synaptic transmission in mouse motor synapses // Biochemistry (Moscow), Supplement Series A: Membrane and Cell Biology. – 2017. – V. 11. – № 4 – P. 311-320. (doi: 10.1134/S1990747817040067 IF=0.134, WoS) (1.3/1.0)
10. A.E. Gaydukov, P.O. Bogacheva, O.P. Balezina. Calcitonin gene-related peptide increases acetylcholine quantal size in neuromuscular junctions of mice // Neuroscience Letters. – 2016. – V. 628. – P. 17-23. (doi: 10.1016/j.neulet.2016.06.014 IF= 2.274, WoS) (1.1/0.9)
11. E.O. Tarasova, **A.E. Gaydukov**, O.P. Balezina. Methods of activation and the role of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II in the regulation of acetylcholine

- secretion in the motor synapses of mice // *Neurochemical Journal*. – 2015. – V. 9. – № 2. – P. 101-107. (doi: 10.1134/S1819712415020099 IF=0.419, WoS) (1/0.7)
12. E.O. Tarasova, A.S. Miteva, **A.E. Gaydukov**, O.P. Balezina. The role of adenosine receptors and L-type calcium channels in the regulation of the mediator secretion in mouse motor synapses // *Biochemistry (Moscow), Supplement Series A: Membrane and Cell Biology*. – 2015. – V. 9. – № 4. – P. 328-328. (doi: 10.1134/S1990747817040067 IF=0.134 WoS) (1.4/1)
 13. **A.E. Gaydukov**, P.O. Bogacheva, E.O. Tarasova, O.P. Balezina. The mechanism of choline-mediated inhibition of acetylcholine release in mouse motor synapses // *Acta Naturae*. – 2014 – V. 6. – № 4 – P. 110-115. (doi: 10.32607/20758251-2014-6-4-110-115 IF=1.36 WoS) (0.91/0.6)
 14. **A.E. Gaydukov**, E.O. Tarasova, O.P. Balezina. Calcium-dependent phosphatase calcineurin downregulates evoked neurotransmitter release in neuromuscular junctions of mice // *Neurochemical Journal*. – 2013. – V. 7. – № 1 – P. 29-33. (doi: 10.1134/S1819712413010030 IF=0.419 WoS) (0.76/0.5)
 15. **A.E. Gaydukov**, A.A. Marchenkova, O.P. Balezina. Involvement of basal and calcium-activated protein kinase C in neurotransmitter secretion in mouse motor synapses // *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. – 2012. – V. 153. – № 6 – P. 820-823. (doi: 10.1007/s10517-012-1834-1 IF=0.804, Scopus) (0.72/0.5).
 16. **A.E. Gaydukov**, A.A. Marchenkova, O.P. Balezina. Facilitation of neurotransmitter release in mouse motor synapses in different modes of protein kinase C activation // *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. – 2012 – V. 153. – № 4 – P. 415-418. (doi: 10.1007/s10517-012-1729-1 IF=0.804 Scopus) (0.7/0.5)
 17. **A.E. Gaydukov**, S.N. Melnikova, O.P. Balezina. Facilitation of acetylcholine secretion in mouse motor synapses caused by calcium release from depots upon activation of L-type calcium channels // *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. – 2009 – V. 148. – № 2. – P. 163-166. (doi: 10.1007/s10517-009-0678-9 IF=0.804 Scopus) (0.8/0.6).

**СПИСОК НАУЧНЫХ СТАТЕЙ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ
ДИССЕРТАЦИИ В ЖУРНАЛАХ, ВХОДЯЩИХ В ПЕРЕЧЕНЬ ИЗДАНИЙ,
РЕКОМЕНДОВАННЫХ ВАК ПРИ МИНОБРНАУКИ РОССИИ**

1. E.O. Tarasova, **A.E. Gaydukov**, O.P. Balezina. Участие пресинаптических аденозиновых рецепторов A_{2A}-типа в модулировании секреции медиатора в нервно-мышечных синапсах мышцы. *Современные проблемы науки и образования*, 3: <http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=13621>, 2014.

Основные тезисы докладов

1. E.O. Tarasova, **A.E. Gaydukov**, O.P. Balezina. Presynaptic adenosine A_{2A}-receptor mediated pathway acts as counteragent of calcineurin-based downregulation of L-type calcium channel activity in mouse neuromuscular junctions. Abstracts of Annual Meeting “Society for Neuroscience 2014”, Washington, DC, USA, 2014.
2. **A.E. Gaydukov**, O.P. Balezina. Calcitonin gene-related peptide acts as positive regulator of presynaptic quantal size in mouse neuromuscular junction. Abstracts of 9th FENS Forum, Milan, Italy, 2014.
3. **A.E. Gaydukov**, E.O. Tarasova, O.P. Balezina. Механизм тормозного действия кальцинейрина в моторных синапсах мышцы. XXII съезд Физиологического

- общества имени И.П. Павлова: Тезисы докладов, стр. 113, Волгоград, Россия, 2013.
4. A.E. Gaydukov, O.P. Balezina. Pathways of PKC modulatory action on acetylcholine secretion in mouse motor synapses depends on methods of the PKC activation. Abstracts of 8th FENS Forum, Barcelona, Spain, 2012.
 5. A.E. Gaydukov, O.P. Balezina. Choline-induced downregulation of mediator secretion via presynaptic $\alpha 7$ -nicotinic acetylcholine receptors, release of stored calcium and SK-channels activation in mouse motor synapses. Abstracts of 7th FENS Forum, Amsterdam, The Netherlands, 2010.
 6. A.E. Gaydukov, O.P. Balezina. Upregulation of ACh release in mouse synapses after activation of L-type Ca^{2+} channels is due to release of stored calcium. Meeting of the Physiological Society "Physiology 2009", Dublin, Ireland. Proc Physiol Soc 15, PC88, 2009.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- 4-AP – 4-аминопиридин
АХ – ацетилхолин
КГРП – кальцитонин-ген родственный пептид
МП – мембранный потенциал
МПКП – спонтанный миниатюрный потенциал концевой пластинки
ПД – потенциал действия
ПКП – вызванный многоквантовый потенциал концевой пластинки
РиР – рианодиновый рецептор
ТЭА – тетраэтиламмоний
ЭР – эндоплазматический ретикулум
 $\alpha 7$ -нХР – гомомерный никотиновый холинорецептор альфа7-типа
СаМКП – кальций/кальмодулин-зависимая киназа II типа
CaN – кальцинейрин
CsA – циклоспорин А
MLA – метилликаконитин
РКА – протеинкиназа А
PKC – протеинкиназа С
РМА – форбол 12-миристат 13-ацетат
RRP – *readily-releasable pool*, пул синаптических везикул, непосредственно готовых к выбросу ацетилхолина