

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ
СТАТЬИ

КАЛЬЦИЕВЫЙ ТРАНЗИЕНТ И СЕКРЕЦИЯ МЕДИАТОРА
В РАЗНЫХ УЧАСТКАХ НЕРВНОГО ОКОНЧАНИЯ ЛЯГУШКИ
ПРИ ИЗМЕНЕНИИ УСЛОВИЙ ВХОДА ИОНОВ КАЛЬЦИЯ

© 2019 г. Э. Ф. Хазиев^{1, 2, 3, *}, Д. В. Балашова³, А. Н. Ценцевский^{1, 2},
Э. А. Бухараева¹, Д. В. Самигуллин^{1, 2, 3}

¹Казанский институт биохимии и биофизики “Казанский научный центр Российской академии наук”,
Казань, Россия

²Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

³Казанский национальный исследовательский технический университет им. А.Н. Туполева,
Казань, Россия

*E-mail: eduard.khaziev@gmail.com

Поступила в редакцию 25.06.2019 г.

После доработки 07.07.2019 г.

Принята к публикации 07.07.2019 г.

В экспериментах на нервно-мышечном препарате лягушки исследовали особенности кальциевого ответа и секреции квантов ацетилхолина в разных участках протяженной нервной терминали при изменении условий входа кальция. Используя кальций-чувствительный флуоресцентный краситель, анализировали вход Ca^{2+} (Ca^{2+} -транзистент) в проксимальном и дистальном участках нервного окончания при увеличении содержания ионов K^+ , под действием блокаторов N- и L-типов кальциевых каналов, а также при блокировании кальций-активируемых калиевых каналов. Проведенное исследование показало, что при равномерной плотности распределения потенциал-зависимых кальциевых каналов вдоль нервного окончания проксимо-дистальный декремент кальциевого транзистента и интенсивности квантовой секреции сохраняется при дополнительном открывании потенциал-зависимых кальциевых каналов путем калиевой деполяризации, при прорезивании этих каналов специфическими блокаторами, но изменяется при блокировании кальций-активируемых калиевых каналов.

Ключевые слова: нервно-мышечное соединение, кальциевый транзистент, проксимо-дистальный декремент, квантовый состав, кальциевые каналы, калиевые каналы

DOI: 10.1134/S0869813919100030

Нервно-мышечный синапс позвоночных является классическим и широко используемым объектом для изучения механизмов реализации и модуляции синаптической передачи возбуждения в быстрых синапсах химического типа. Как хорошо известно, вход Ca^{2+} после пресинаптического потенциала действия запускает секрецию и определяет интенсивность выделения квантов нейромедиатора [1]. Однако, достаточно трудно точно оценить количество Ca^{2+} , вошедшего в нервное окончание в ответ на стимул. Сложность обусловлена очень малыми размерами нервной терминали, не позволяющими использовать микроэлектрод для измерения входящего кальциевого тока [2, 3]. Для оценки входа Ca^{2+} в ответ на нервный стимул в настоящее время применяют метод регистрации кальциевого транзистента — флуоресцентного

сигнала, отражающего изменение свечения кальций-чувствительного красителя при связывании с Ca^{2+} [4].

Нервные окончания лягушки существенно различаются по размерам и числу терминальных ответвлений [5, 6]. Вдоль протяженной терминали происходит изменение формы потенциала действия от преимущественно отрицательно направленного к полностью положительному сигналу [7–10]. Изменение пресинаптического потенциала действия сопровождается изменением вероятности высвобождения нейромедиатора в разных участках терминали [11–14]. Причинами, определяющими различие параметров квантового освобождения ацетилхолина вдоль терминали, могут быть морфологические особенности разных участков, в частности, диаметр поперечного сечения терминали, определяющий длину синаптического контакта, и количество активных зон секреции в каждом участке [15, 16], разная плотность и проводимость потенциал-зависимых ионных (калиевых, натриевых и кальциевых) каналов, участие кальциевых каналов разных типов, различия в функционировании активных зон секреции в разных участках нервной терминали, разная работа систем, обеспечивающих поддержание внутриклеточной концентрации Ca^{2+} [7].

Ранее при использовании методов кальциевого имиджинга мы показали наличие проксимо-дистального декремента амплитуды кальциевого транзиента, проявляющегося в уменьшении входа Ca^{2+} в нервную терминаль лягушки по направлению от проксимальной части нервного окончания к дистальной [17, 18]. Однако иммуногистохимический анализ не выявил различий в плотности распределения кальциевых каналов вдоль нервного окончания [19]. В связи с этим возникает вопрос, почему при одинаковой плотности кальциевых каналов наблюдается уменьшение величины кальциевого ответа и соответственно снижение вероятности секреции квантов ацетилхолина. Пытаясь ответить на этот вопрос, мы провели анализ входа кальция в проксимальном и дистальном участках протяженных двигательных нервных окончаний лягушки и сопоставили его с изменением интенсивности вызванной квантовой секреции в этих участках при модуляции активности потенциал-чувствительных кальциевых каналов путем блокады их отдельных подтипов. В ходе экспериментов с использованием флуоресцентного красителя, специфичного к Ca^{2+} , анализировали вход этих ионов (Ca^{2+} -транзистент) и параметры вызванного квантового освобождения ацетилхолина в проксимальном и дистальном участках нервной терминали в контроле и под действием блокаторов N- и L-типов кальциевых каналов, а также при увеличении содержания ионов K^+ в растворе.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты на изолированном препарате кожно-грудинной мышцы озерной лягушки *Rana ridibunda* проводили в соответствии с этическими принципами и нормативными документами, рекомендованными Европейским научным фондом (ESF) и декларацией о гуманном отношении к животным. В каждой серии экспериментов использовали 3–5 животных, у которых анализировали 1–3 синапса. Выделение препарата и процесс очистки мышцы от соединительной ткани производили в растворе Рингера следующего состава (мМ): NaCl – 113.0, KCl – 2.5, NaHCO_3 – 3.0, CaCl_2 – 1.8; pH раствора поддерживали на уровне 7.2–7.4.

Выделенный препарат кожно-грудинной мышцы с фрагментом нерва помещали в чашку Петри для загрузки флуоресцентного кальциевого красителя. На короткий отрезок нерва длиной 2–3 мм помещали каплю краски Oregon Green 488 BAPTA-1 Hexapotassium Salt, cell impermeant в концентрации 50 мМ объемом 0.1–0.3 мкл, после чего производили инкубацию препарата в два этапа. На первом этапе выдерживали препарат в растворе Рингера в условиях комнатной температуры в течение

4–6 ч во влажной камере. На втором – 15–20 ч в холодильнике при температуре $8 \pm 2^\circ\text{C}$. На этом этапе отмывался краситель, попадающий на препарат снаружи, и загрузка кальциевого красителя происходила за счет диффузии и антероградного аксонного транспорта [20–22]. При таком способе загрузки непроникающий сквозь клеточную мембрану краситель загружается только в цитозоль нервного окончания, что позволяет регистрировать кальциевые сигналы только от пресинаптической нервной клетки. После загрузки флуоресцентного красителя в нервные терминалы, препарат помещали в ванночку объемом 5 мл, через которую протекал перфузионный раствор Рингера с пониженным содержанием Ca^{2+} и повышенным Mg^{2+} (мМ): $\text{NaCl} - 113.0$, $\text{KCl} - 2.5$, $\text{NaHCO}_3 - 3.0$, $\text{MgCl}_2 - 6.0$, $\text{CaCl}_2 - 0.9$ (рН 7.2–7.4, температура $20.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$). При освещении препарата монохроматическим светом с длиной волны 488 нм, возбуждающей краситель, производили регистрацию увеличения свечения в ответ на стимуляцию двигательного нерва прямоугольными электрическими импульсами сверхпороговой амплитуды и длительностью 0.2 мс. Выбирали терминалы длиной не менее 100 мкм, проксимальным считали участок на расстоянии 30% длины всей терминалы от окончания миелиновой оболочки нерва, дистальным – 30% от кончика терминалы.

Для регистрации изменения флуоресцентного свечения красителя в терминалы использовали высокоскоростную камеру Neuro CCD (Redshirt Imaging), которая позволяет локально оценивать низкоамплитудные быстрые кальциевые сигналы в различных участках нервной терминалы. Амплитуду Ca^{2+} -транзientа оценивали как $100\% \times \Delta F/F_0$, где ΔF изменение интенсивности флуоресценции в ответ на стимуляцию относительно базовой флуоресценции F_0 без стимула [23].

Для оценки среднего квантового состава постсинаптических ответов осуществляли регистрацию внеклеточных токов нервного окончания и токов концевой пластинки при помощи стандартной микроэлектродной техники. Экстраклеточные микроэлектроды с диаметром кончика 2.5–3.5 мкм, заполненные раствором Рингера или NaCl (0.5 мМ), имели сопротивление 1.0–1.5 МОм. Отведенные сигналы после фильтрации до 10 кГц усиливали и подавали на вход 16-ти разрядного АЦП, квантуя с интервалом 10 мкс. Регистрацию токов проводили с использованием раствора Рингера с пониженным содержанием Ca^{2+} (мМ): $\text{NaCl} - 113.0$, $\text{KCl} - 2.5$, $\text{NaHCO}_3 - 3.0$, $\text{MgCl}_2 - 4.0$, $\text{CaCl}_2 - 0.3$. Средний квантовый состав токов концевой пластинки оценивали методом “выпадений” [24].

В экспериментах были использованы следующие вещества (все фирмы Sigma): конотоксин GVIA, нитрендипин, ибериотоксин, д-тубокурарин. Поскольку некоторые реактивы растворялись в ДМСО (диметилсульфоксид), конечная концентрация которого в растворе не превышала 0.1%, то предварительно были проведены эксперименты по анализу эффектов растворителя на исследуемые процессы. Было показано, что на протяжении более 2-х ч регистрации ДМСО не оказывал достоверно значимого влияния на амплитуду Ca^{2+} -транзientа.

Для статистической обработки экспериментально полученных сигналов Ca^{2+} -транзientа использовали стандартные методы определения средних величин, стандартных ошибок, параметрический t -критерий Стьюдента для попарно связанных вариант и критерий Манна–Уитни. Достоверность различия средних значений определяли при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В контрольных условиях амплитуда Ca^{2+} -транзientа снижалась по мере удаления от проксимального к дистальному участку на $39.9 \pm 5.6\%$ ($n = 22$, $p < 0.05$). Величина

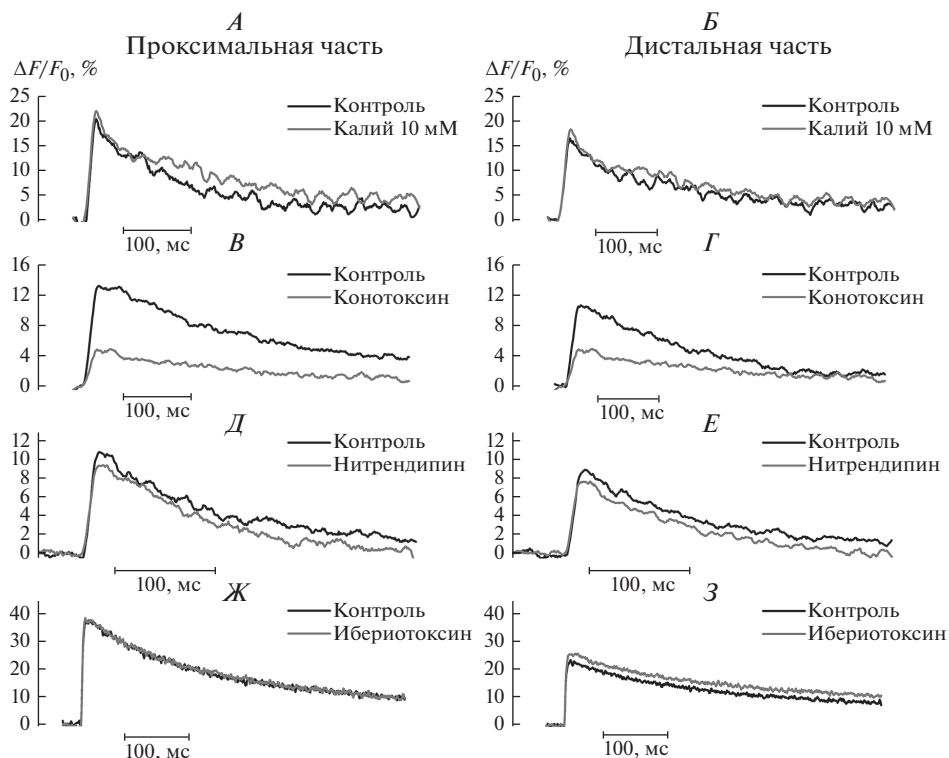


Рис. 1. Ca^{2+} -транзистент в проксимальной и дистальной частях нервного окончания в контроле и в присутствии повышенной до 10 мМ концентрации ионов K^+ (А и Б), конотоксина (В и Г), нитрендипина (Д и Е), ибериотоксина (Ж и З).

квантового состава в контроле составила 0.45 ± 0.06 ($n = 10$) в проксимальной части и 0.31 ± 0.09 ($n = 7$) – в дистальной.

При деполяризации нервного окончания происходит увеличение вероятности открытия кальциевых каналов [1]. Можно ожидать, что в различных участках терминали деполяризация приведет к изменению транзистента в разной степени вследствие особенностей разных участков – различные диаметры поперечного сечения терминали, количество активных зон секреции в каждом участке, разная плотность и проводимость потенциал-зависимых ионных каналов, участие кальциевых каналов разных типов, различия в функционировании активных зон секреции. Повышение внеклеточной концентрации калия вызывало уменьшение мембранного потенциала клетки [25]. При увеличении концентрации ионов калия в омывающем препарат растворе от 2.5 до 10 мМ, амплитуда Ca^{2+} -транзистента увеличивалась в равной мере в проксимальной части – на $16.7 \pm 3.5\%$ ($n = 7$, $p < 0.05$), и в дистальной – на $16.6 \pm 2.2\%$ ($n = 6$, $p < 0.05$) (рис. 1А, Б, рис. 2), что указывает на одинаковый прирост концентрации Ca^{2+} и, равное количество дополнительно открывшихся кальциевых каналов в проксимальном и дистальном участках терминали.

Основным типом кальциевых каналов, обеспечивающих вход кальция в нервное окончание лягушки после развития пресинаптического потенциала действия, являются потенциал-зависимые каналы N-типа [26]. Обработка нервно-мышечного

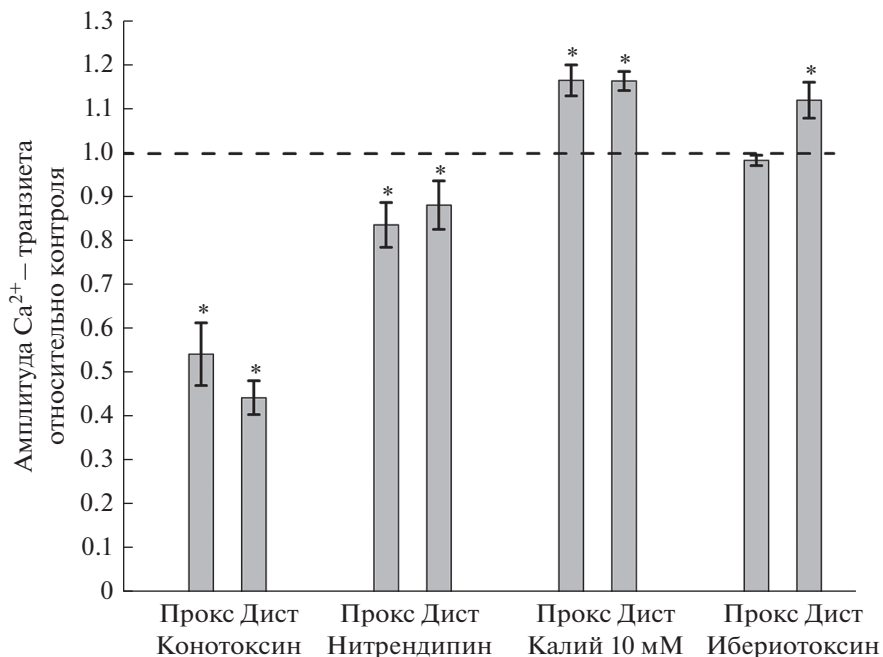


Рис. 2. Изменения амплитуды Ca^{2+} -транзита по отношению к контролю (принят за 1), измеренные в проксимальной и дистальной частях нервного окончания под действием блокаторов N-типа кальциевых каналов (конотоксин), L-типа кальциевых каналов (нитрендипин), при увеличенной до 10 мМ концентрации ионов K^+ и под действием ибериотоксина.

препарата специфическим антагонистом кальциевых каналов N-типа конотоксином GVIA в концентрации 300 нМ приводила к снижению амплитуды Ca^{2+} -транзита в проксимальной части на $45.6 \pm 7.2\%$ ($n = 7, p < 0.05$), а в дистальной на $55.5 \pm 3.9\%$ ($n = 6, p < 0.05$) (рис. 1А, рис. 2А, Б), при этом достоверного различия в степени снижения кальциевого ответа в разных участках не наблюдалось. Под действием конотоксина GVIA квантовый состав достоверно снизился на $57.4 \pm 5.2\%$ ($n = 11, p < 0.05$) в проксимальной части и на $46.4 \pm 8.8\%$ ($n = 7, p < 0.05$) – в дистальной (рис. 1В, Г, рис. 2). Уменьшение среднего квантового состава под действием блокатора N-типа кальциевых каналов в проксимальном и дистальном участках синапса также не различалось достоверно.

Ранее нами установлено, что помимо основного N-типа кальциевых каналов, на нервных окончаниях лягушки находятся каналы L-типа [27]. Специфический блокатор кальциевых каналов L-типа нитрендипин в концентрации 5 мкМ снижал Ca^{2+} -транзент в проксимальной части на $16.2 \pm 5.1\%$ ($n = 13, p < 0.05$) и в дистальной на $11.7 \pm 5.5\%$ ($n = 11, p < 0.05$) по отношению к контролю, без достоверного отличия в разных участках (рис. 1Д, Е, рис. 2). В присутствии нитрендипина квантовый состав уменьшился относительно контрольной величины на $28.3 \pm 4.9\%$ ($n = 13, p < 0.05$) в проксимальной части и на $34.1 \pm 3.2\%$ ($n = 12, p < 0.05$) – в дистальной. Достоверного различия в эффектах нитрендипина на квантовый состав в разных частях нервной терминали также не наблюдалось.

Кальций-активируемые калиевые каналы нервного окончания участвуют в формировании амплитуды и длительности пресинаптического потенциала дей-

ствия, и, вследствие этого, определяют уровень деполяризации пресинаптической мембраны [28]. Блокатор кальций-активируемых калиевых каналов ибериотоксин в концентрации 100 нМ мкМ не изменял Ca^{2+} -транзиент в проксимальной части ($-1.5 \pm 1.2\%$, $n = 17$, $p > 0.05$) и достоверно увеличивал Ca^{2+} -транзиент в дистальной части нервного окончания на $12.2 \pm 4.1\%$ ($n = 17$, $p < 0.05$) по отношению к контролю (рис. 1Ж, 3, рис. 2).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

По мере удлинения немиелинизированной части аксона наблюдается изменение параметров вызванного нервным импульсом освобождения квантов ацетилхолина в протяженных нервно-мышечных синапсах лягушки. Описано уменьшение интенсивности вызванной секреции квантов, оцениваемой по величине квантового состава [11, 13, 14], повышение степени синхронности секреции квантов [29], разная выраженность влияния физиологически активных соединений [29]. Поскольку ведущим звеном, запускающим процесс секреции квантов, является вход Ca^{2+} после развития потенциала действия [1, 30], естественно предположить, что именно этот фактор является основным в определении проксимо-дистального декремента параметров квантовой секреции. Действительно, при регистрации интенсивности свечения специфического кальций-чувствительного флуоресцентного красителя нами установлено, что по мере удаления от проксимальной части к дистальной вход кальция в нервное окончание в ответ на нервный импульс уменьшается [17, 18]. Это может быть связано с изменением плотности кальциевых каналов вдоль протяженной нервной терминали. Однако наши исследования иммунофлуоресцентным методом с использованием специфических антител к кальциевым каналам N- и L-типов [19], а также работа R. Robitaille с соавт. [31], показали, что кальциевые каналы равномерно распределены вдоль нервного окончания. Представленные в данном исследовании эксперименты показали, что величина кальциевого ответа уменьшается при блокировании кальциевых каналов N-типа конотоксином GVIA и нитрендипином — блокатором дигидропиридин-чувствительных каналов L-типа. Причем, эти эффекты в равной степени проявлялись и в проксимальной и в дистальной частях синапса. Дополнительная деполяризация нервного окончания при повышении внеклеточной концентрации калия приводила к увеличению амплитуды кальциевого ответа также в равной степени в разных участках. Блокада кальций-активируемых калиевых каналов ибериотоксином вызывала увеличение входа Ca^{2+} только в дистальной части терминали. Это указывает на то, что проксимо-дистальный декремент Ca^{2+} -транзиента обусловлен неравномерным распределением потенциал-чувствительных и кальций-зависимых калиевых каналов. Изменение Ca^{2+} -транзиента при блокировании каналов сопровождалось уменьшением числа освободившихся квантов в ответ на нервный импульс, одинаково проявляющимся в разных участках синапса. Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что потенциал-зависимые кальциевые каналы N- и L-типов участвуют в реализации входа Ca^{2+} в двигательное нервное окончание лягушки, их активация приводит к повышению интенсивности вызванного нервным стимулом освобождения квантов ацетилхолина. Эти каналы в равной степени представлены в разных участках протяженной терминали, а их “прореживание” с помощью специфических каналоблокаторов приводит к снижению как входа Ca^{2+} в терминаль, так и уменьшению числа выделяющихся квантов медиатора в одинаковой мере в проксимальной и дистальной частях протяженного синаптического контакта. И только блокирование кальций-активируемых калиевых каналов выявило разницу в

изменении входа кальция в нервное окончание. Возникает вопрос, в чем же причина наличия проксимо-дистального декремента амплитуды Ca^{2+} -транзientа?

Как показали J.M. Pattillo с соавт. [32] и Dittrich с соавт. [33], существует зависимость между формой потенциала действия и пресинаптическим кальциевым током. Хорошо известно, что по мере удаления от проксимального отдела нервного окончания к дистальному изменяется форма потенциала действия [7]. Изменение формы электрических ответов вдоль нервного окончания на разных расстояниях от конца миелинизированной части нерва объясняется различным вкладом разных типов потенциал-зависимых каналов, распределенных по поверхности мембраны [7]. Установлено, что натриевые каналы присутствуют с наибольшей плотностью в проксимальной части каждой терминальной ветви и почти не детектируемы в дистальной части. Калиевые каналы с более высокой плотностью расположены в средних частях нервного окончания [7]. Таким образом, по-видимому, разная степень активности или разное число натриевых и калиевых каналов обеспечивает разный уровень деполяризации в разных участках и определяет наличие проксимо-дистального декремента Ca^{2+} -транзientа. Нельзя также исключить вклада изменения размера и архитектуры активных зон секреции вдоль уменьшающегося по диаметру нервного окончания [7].

Таким образом, проведенное исследование показало, что при равномерной плотности распределения потенциал-зависимых кальциевых каналов вдоль протяженного нервного окончания в синапсе лягушки проксимо-дистальный декремент Ca^{2+} -транзientа и интенсивности квантовой секреции сохраняется при дополнительном открывании кальциевых каналов путем калиевой деполяризации, при прореживании этих каналов специфическими блокаторами, но изменяется при блокировании кальций-активируемых калиевых каналов, участвующих в формировании пресинаптического потенциала действия. Это указывает на важную роль параметров пресинаптического потенциала действия в обеспечении проксимо-дистального декремента входа кальция и квантовой секреции в нервно-мышечном синапсе лягушки.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа частично поддержана грантом РФФИ № 19-04-00490.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Burnashev N., Rozov A. Presynaptic Ca^{2+} dynamics, Ca^{2+} buffers and synaptic efficacy. *Cell Calcium*. 37(5): 489–495. 2005.
2. Borst J.G., Sakmann B. Calcium influx and transmitter release in a fast CNS synapse. *Nature*. 383(6599): 431–434. 1996.
3. Yazejian B., DiGregorio D.A., Vergara J.L., Poage R.E., Meriney S.D., Grinnell A.D. Direct measurements of presynaptic calcium and calcium-activated potassium currents regulating neurotransmitter release at cultured *Xenopus* nerve-muscle synapses. *J. Neurosci*. 17(9): 2990–3001. 1997.
4. Tsiien R.Y. Fluorescence ratio imaging of dynamic intracellular signals. *Acta Physiol. Scand. Suppl.* 582: 6. 1989.
5. Bennett M.R., Lavidis N.A. Quantal secretion at release sites of nerve terminals in toad (*Bufo marinus*) muscle during formation of topographical maps. *J. Physiol.* 401: 567–579. 1988.
6. Nudell B.M., Grinnell A.D. Inverse relationship between transmitter release and terminal length in synapses on frog muscle fibers of uniform input resistance. *J. Neurosci*. 2(2): 216–224. 1982.
7. Mallart A. Presynaptic currents in frog motor endings. *Pflugers Arch.* 400(1): 8–13. 1984.
8. Katz B., Miledi R. The effect of local blockage of motor nerve terminals. *J. Physiol.* 199(3): 729–741. 1968.
9. Braun M., Schmidt R.F. Potential changes recorded from the frog motor nerve terminal during its activation. *Pflugers. Arch. Gesamte Physiol. Menschen Tiere.* 287(1): 56–80. 1966.
10. Зефирова А.Л., Халилов И.А. Анализ электрической активности в различных участках нервного окончания амфибий. Физиология медиаторов. Периферический синапс: тез.

- докл. V Всесоюз. симпозиума (июнь 1984 г.). 97–99. Казань. 1984. [Zefirov A.L., Halilov I.A. Analiz elektricheskoy aktivnosti v razlichnykh uchastkah nervnogo okonchaniya amfibij. Fiziologiya mediatorov. Perifericheskij sinaps : tez. dokl. V Vsesoyuz. simpoziuma (iyun' 1984 g.). 97–99. Kazan'. 1984. (In Russ.)].
11. Bennett M.R., Lavidis N.A. Variation in quantal secretion at different release sites along developing and mature motor terminal branches. *Brain Res.* 281(1): 1–9. 1982.
 12. D'Alonzo A.J., Grinnell A.D. Profiles of evoked release along the length of frog motor nerve terminals. *J. Physiol.* 359: 235–258. 1985.
 13. Bennett M.R., Jones P., Lavidis N.A. The probability of quantal secretion along visualized terminal branches at amphibian (*Bufo marinus*) neuromuscular synapses. *J. Physiol.* 379: 257–274. 1986.
 14. Bukharaeva E., Samigullin D., Nikolsky E.E., Vyskocil F. Cyclic AMP synchronizes evoked quantal release at frog neuromuscular junctions. *Physiol. Res.* 49(4): 475–479. 2000.
 15. Davey D.F., Bennett M.R. Variation in the size of synaptic contacts along developing and mature motor terminal branches. *Brain Res.* 281(1): 11–22. 1982.
 16. Bennett M.R., Lavidis N.A., Armon F.M. Changes in the dimensions of release sites along terminal branches at amphibian neuromuscular synapses. *J. Neurocytol.* 16(2): 221–237. 1987.
 17. Khaziev E., Golovyahina A., Bukharaeva E., Nikolsky E., Samigullin D. Action of ATP on Ca^{2+} -transient in different parts of the frog motor nerve ending. *BioNanoScience*. 2017 <https://doi.org/10.1007/s12668-016-0350-6>
 18. Samigullin D.V., Vasin A.L., Bukharaeva E.A., Nikolsky E.E. Characteristics of calcium transient in different parts of frog nerve terminal in response to nerve impulse. *Dokl. Biol. Sci.* 431(1): 83–85. 2010.
 19. Nurullin L.F., Mukhitov A.R., Tsentsevytsky A.N., Petrova N.V., Samigullin D.V., Malomouzh A.I., Bukharaeva E.A., Vyskočil F., Nikolsky E.E. Voltage-Dependent P/Q-Type Calcium Channels at the Frog Neuromuscular Junction. *Physiol. Res.* 60: 815–823. 2011.
 20. Peng Y.Y., Zucker R.S. Release of LHRH is linearly related to the time integral of presynaptic Ca^{2+} elevation above a threshold level in bullfrog sympathetic ganglia. *Neuron.* 10(3): 465–473. 1993.
 21. Neher E. The use of fura-2 for estimating Ca buffers and Ca fluxes. *Neuropharmacol.* 34(11): 1423–1442. 1995.
 22. Shahrezaei V., Cao A., Delaney K.R. Ca^{2+} from one or two channels controls fusion of a single vesicle at the frog neuromuscular junction. *J. Neurosci.* 26(51): 13240–13249. 2006.
 23. Samigullin D.V., Khaziev E.F., Zhilyakov N.V., Bukharaeva E.A., Nikolsky E.E. Loading a Calcium Dye into Frog Nerve Endings Through the Nerve Stump: Calcium Transient Registration in the Frog Neuromuscular Junction. *J. Vis. Exp.* (125) e55122. <https://doi.org/10.3791/55122>
 24. Del Castillo J., Katz B. Quantal components of the end-plate potential. *J. Physiol.* 124: 560–573. 1954.
 25. Matyushkin D.P., Shabunova I.A., Sharovarova G.M., Vinogradova I.M. On Potassium Functional Feedback in Neuromuscular Junction. *J. Neurosci. Res.* 3: 441–450. 1978.
 26. Khaziev E., Samigullin D., Zhilyakov N., Fatikhov N., Bukharaeva E., Verkhratsky A., Nikolsky E. Acetylcholine-Induced Inhibition of Presynaptic Calcium Signals and Transmitter Release in the Frog Neuromuscular Junction. *Front. Physiol.* 7: 621. <https://doi.org/10.3389/fphys.2016.00621>
 27. Tsentsevytsky A.N., Samigullin D.V., Nurullin L.F., Khaziev E.F., Nikolsky E.E., Bukharaeva E.A. Presynaptic Voltage-Dependent Calcium Channels at the Frog Neuromuscular Junction. Frogs genetic diversity, neural development and ecological implications. Nova Science Publishers. Inc. New York. Chapter 5. 179–194. ISBN: 978-1-63117-626-5. 2014.
 28. Roncarati R., Di Chio M., Sava A., Terstappen G.C., Fumagalli G. Presynaptic localization of the small conductance calcium-activated potassium channel SK3 at the neuromuscular junction. *Neuroscience.* 104(1): 253–262. 2001.
 29. Bukharaeva E.A., Kim K.C., Moravec J., Nikolsky E.E., Vyskocil F. Noradrenaline synchronizes evoked quantal release at frog neuromuscular junctions. *J. Physiol.* 517 (Pt 3): 879–888. 1999.
 30. Pang Z.P., Südhof T.C. Cell biology of Ca^{2+} -triggered exocytosis. *Curr. Opin. Cell Biol.* 22(4): 496–505. 2010. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2010.05.001>
 31. Robitaille R., Adler E.M., Charlton M.P. Strategic location of calcium channels at transmitter release sites of frog neuromuscular synapses. *Neuron.* 5: 773–779. 1990.
 32. Pattillo J.M., Yazejian B., DiGregorio D.A., Vergara J.L., Grinnell A.D., Meriney S.D. Contribution of presynaptic calcium-activated potassium currents to transmitter release regulation in cultured *Xenopus* nerve–muscle synapses. *Neuroscience.* 102: 229–240. 2001.
 33. Dittrich M., Homan A.E., Meriney S.D. Presynaptic mechanisms controlling calcium-triggered transmitter release at the neuromuscular junction. *Curr. Opin. Physiol.* 15–24. <https://doi.org/10.1016/j.cophys.2018.03.004>

Calcium Transient and Mediator Release in Different Parts of the Frog Nerve Ending on the Change of Conditions of Calcium Ions Entry

E. F. Khaziev^{a, b, c, *}, D. V. Balashova^c, A. N. Tsentsevitsky^{a, b},
E. A. Bukharaeva^a, D. V. Samigullin^{a, b, c}

^a*Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics of FRC Kazan Scientific Center of RAS, Kazan, Russia*

^b*Kazan (Volga Region) Federal University, Kazan, Russia*

^c*Tupolev Kazan National Research Technical University, Kazan, Russia*

**e-mail: eduard.khaziev@gmail.com*

In experiments on the frog neuromuscular preparation, the peculiarities of the calcium transient and the release of acetylcholine quanta in different parts of the nerve terminal were investigated on the change of calcium entry conditions. Using calcium-sensitive fluorescent dye, calcium entry (Ca²⁺-transient) was analyzed in the proximal and distal parts of the nerve ending under increase of ambient K⁺ ions concentration, under the action of blockers of N- and L-types of calcium channels, and also after the blockade of calcium-dependent potassium channels. The study showed that the proximal-distal gradient of the calcium transient and of the intensity of quantal release is preserved at both the additional opening of voltage-dependent calcium channels during the depolarization caused by potassium ions and under reduced amount of these channels in the presence of specific blockers, but is modified by the inactivation of calcium-dependent potassium channels.

Keywords: neuromuscular junction, calcium dyes, calcium transient, quantum content, calcium channels, potassium channels

ЦИТИРОВАТЬ:

Хазиев Э.Ф., Балашова Д.В., Ценцевицкий А.Н., Бухараева Э.А., Самигуллин Д.В. Кальциевый транзиент и секреция медиатора в разных участках нервного окончания лягушки при изменении условий входа ионов кальция. Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 105(10): 1262–1270.

DOI: 10.1134/S0869813919100030

TO CITE THIS ARTICLE:

Khaziev E.F., Balashova D.V., Tsentsevitsky A.N., Bukharaeva E.A., Samigullin D.V. Calcium Transient and Mediator Release in Different Parts of the Frog Nerve Ending on the Change of Conditions of Calcium Ions Entry. Russian Journal of Physiology. 105(10): 1262–1270.

DOI: 10.1134/S0869813919100030