
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

РЕГУЛЯЦИЯ ВНУТРИКЛЕТОЧНОГО КАЛЬЦИЯ
ПРИ ВЫСОКОЧАСТОТНОЙ РИТМИЧЕСКОЙ СТИМУЛЯЦИИ
ДВИГАТЕЛЬНОГО НЕРВНОГО ОКОНЧАНИЯ ЛЯГУШКИ

© 2025 г. Д. В. Самигуллин^{1,2,*}, Н. Ф. Фатихов¹, Э. Ф. Хазиев¹, Э. А. Бухараева¹

¹Казанский институт биохимии и биофизики Казанского научного центра РАН,
Казань, Россия

²Казанский национальный исследовательский технический университет им. А.Н. Туполева,
Казань, Россия

*E-mail: samid75@mail.ru

Поступила в редакцию 01.08.2025 г.

После доработки 20.08.2025 г.

Принята к публикации 20.08.2025 г.

В физиологических условиях химические синапсы, включая нервно-мышечные соединения, работают ритмически с разной частотой в зависимости от функционального типа мышц и состояния синаптического аппарата. Ионы кальция (Ca^{2+}), входящие в аксоплазму через потенциал-зависимые Ca^{2+} -каналы во время каждого потенциала действия, активируют экзоцитоз синаптических везикул и играют ключевую роль в модуляции секреторного процесса. Существенный вклад в динамику внутриклеточного Ca^{2+} может вносить эндоплазматический ретикулум (ЭР), способный высвобождать ионы Ca^{2+} посредством Ca^{2+} -зависимого освобождения. Для отслеживания изменений внутриклеточного Ca^{2+} применяются методы оптической регистрации с использованием Ca^{2+} -чувствительных флуоресцентных красителей. Особое внимание при такой оценке необходимо уделять характеристикам связывания красителя с ионами Ca^{2+} , а именно их аффинности, поскольку степень насыщения красителя влияет на параметры Ca^{2+} -ответа. В данном исследовании для анализа изменений внутриклеточного содержания ионов Ca^{2+} в нервно-мышечном синапсе кожно-грудинной мышцы лягушки (*m. cutaneus pectoris*) при ритмической стимуляции был использован низкоаффинный краситель Magnesium Green, который позволяет корректно оценивать Ca^{2+} -сигналы. При увеличении частоты стимуляции двигательного нерва плавное нарастание Ca^{2+} -ответа при частоте стимуляции 20 Гц сменялось двухфазным увеличением при 50 Гц и резким ростом при 70 Гц. Это свидетельствует о включении дополнительных источников Ca^{2+} , каковым может быть ЭР. Блокирование рианодиновых и инозитольных рецепторов устраняло возрастание Ca^{2+} -ответа при повышенных частотах стимуляции нерва. Блокирование кальциевых АТФаз ЭР (SERCA) приводило к резкому увеличению Ca^{2+} -ответа и устраняло его многофазность. Установлено, что изменение Ca^{2+} -транзientа отражает накопление внутриклеточного Ca^{2+} в аксоплазме и зависит от активности SERCA, рианодиновых и инозитольных рецепторов. Применение низкоаффинного флуоресцентного Ca^{2+} -красителя дает возможность отслеживать включение этих систем в формирование внутриклеточного содержания основных ионов, определяющих процесс нейросекреции.

Ключевые слова: ионы кальция, нервно-мышечное соединение, рианодиновые рецепторы, инозитольные рецепторы, кальциевые АТФазы

ВВЕДЕНИЕ

Одним из наиболее важных параметров, регулирующих синаптическую передачу, является вход ионов кальция (Ca^{2+}) в нервное окончание через потенциал-зависимые Ca^{2+} -каналы. Доказано, что они запускают работу внутриклеточной машины экзоцитоза синаптических везикул [1, 2]. Помимо Ca^{2+} -тока, входящего в нервное окончание из внеклеточной среды во время потенциала действия, существенный вклад в содержание Ca^{2+} в аксоплазме и, соответственно, в процесс высвобождения медиатора может вносить Ca^{2+} , освобождаемый из внутриклеточных Ca^{2+} -буферных систем. Экспериментальные доказательства этого получены на моторных нервных окончаниях лягушки [3–5], препаратах центральных синапсов [6–8] и симпатических ганглиях [9]. Одним из основных внутриклеточных депо Ca^{2+} является эндоплазматический ретикулум (ЭР), способный высвобождать ионы Ca^{2+} через рианодиновые и инозитолтрифосфатные рецепторы, а также секвестрировать Ca^{2+} посредством кальциевых АТФаз (SERCA). Многочисленные морфологические исследования показали наличие функционального ЭР в пресинаптических терминалях [10–15]. Также было отмечено, что структуры ЭР расположены в непосредственной близости (40–400 нм) от активных зон секреции медиатора. ЭР в нервном окончании находится в близкой ассоциации с микротрубочками и синаптическими везикулами, и, кроме того, части ЭР соединяются непосредственно с пресинаптической мембраной, формируя “трубчато-волокнистые” расширения [10, 16]. Такое соединение ЭР и пресинаптической мембраны может привести к образованию микродомена, существенного для экзоцитоза. Однако роль выхода Ca^{2+} из ЭР в регулировании выброса медиатора остается спорной, есть аргументы, подтверждающие [13, 17, 18] или отрицающие [19] его значение. Эксперименты, проведенные с применением фармакологических подходов и регистрацией спонтанных и вызванных постсинаптических токов, продемонстрировали, что как высвобождение Ca^{2+} из ЭР, так и поглощение Ca^{2+} в ЭР может существенно модулировать экзоцитоз нейротрансммиттера в синаптических терминалях [3, 10, 20, 21], а также влиять на временной ход высвобождения медиатора [22]. Экспериментально подтверждено, что в нервно-мышечном соединении лягушки выход Ca^{2+} из внутриклеточных депо посредством Ca^{2+} -активируемого Ca^{2+} -освобождения (CICR), инициируемого входом ионов Ca^{2+} через потенциал-чувствительные Ca^{2+} -каналы, усиливает высвобождение нейромедиатора [3]. Установлено взаимодействие рианодиновых рецепторов с Ca^{2+} -каналами плазмалеммы, где вход Ca^{2+} активирует CICR, способствующий освобождению нейромедиатора [20]. Роль внутриклеточных систем, регулирующих CICR, наиболее важна при высокочастотной стимуляции нерва в условиях, приближенных к физиологическим [23]. Измерение концентрации Ca^{2+} в нервно-мышечном соединении является нетривиальной задачей, при решении которой встает ряд методических трудностей. Малые размеры нервного окончания затрудняют измерения Ca^{2+} -тока обычными электрофизиологическими методами [24]. Для анализа содержания Ca^{2+} в нервном окончании применяют оптические методы регистрации, основанные на использовании специальных Ca^{2+} -чувствительных флуоресцентных красителей, интенсивность свечения которых изменяется при взаимодействии со свободными ионами Ca^{2+} (Ca^{2+} -транзист) [25–27]. Чаще для визуализации пресинаптического уровня Ca^{2+} в синапсах и оценки роли ЭР в регуляции метаболизма Ca^{2+} используют высокоаффинные к Ca^{2+} красители [3, 10, 20]. Однако индикаторы с высоким сродством к Ca^{2+} могут интерферировать с внутриклеточными буферными системами и искажать Ca^{2+} -сигналы, увеличивая время их затухания и снижая амплитуду [28–31]. Этого не наблюдается в присутствии низкоаффинных красителей по сравнению с высокоаффинными [28, 31–33]. В связи с этим в данном исследовании при помощи низкоаффинного к Ca^{2+} красителя изучали роль SERCA, рианодиновых и инозитольных рецепторов в регуляции пресинаптического уровня Ca^{2+} в периферических нервных окончаниях лягушки.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Препарат

Эксперименты выполняли на изолированном нервно-мышечном препарате *m. cutaneus pectoris* лягушек *Rana ridibunda* в осенне-зимний период. Изолированную мышцу с фрагментом нерва помещали в экспериментальную камеру объемом 5 мл, через которую со скоростью 5 мл/мин протекал раствор Рингера следующего состава (мМ): NaCl 113.0, KCl 2.5, NaHCO₃ 3.0, CaCl₂ 1.8; pH раствора поддерживали на уровне 7.2–7.4. Эксперименты проводили при температуре 20.0 ± 0.3 °C, которую стабилизировали с помощью встроенных в экспериментальную камеру элементов Пельтье. Двигательный нерв раздражали через всасывающий электрод прямоугольными импульсами длительностью 0.2 мс сверхпороговой амплитуды с частотой стимуляции от 20 до 70 Гц. Длительность стимуляции составляла 55 с. Для блокирования мышечных сокращений применяли д-тубокурарин в концентрации 10 мкМ.

Регистрация Ca²⁺-транзientа

Оценку внутриклеточного уровня Ca²⁺ (Ca²⁺-транзient) в нервном окончании осуществляли с помощью измерения интенсивности свечения Ca²⁺-чувствительного флуоресцентного красителя, взаимодействующего с Ca²⁺, входящим в нервное окончание во время развития пресинаптического потенциала действия [34]. Применяли низко-аффинный краситель Magnesium Green pentapotassium salt с константой диссоциации $K_d = 19$ мкМ [38]. Загрузку флуоресцентного красителя выполняли через культю нерва, как это описано в работах, выполненных ранее [35–37]. Раствор для загрузки красителя содержал HEPES-Na 10 мМ и 30 мМ флуоресцентного красителя (pH 7.2–7.4). Было установлено, что концентрация красителя, загруженного в нерв этим методом, составляет около 40–150 мкМ [4]. Как показали наши собственные данные и результаты, полученные ранее, загрузка в нервное окончание красителя не изменяла процесс секреции квантов медиатора [36].

Ca²⁺-транзient регистрировали с помощью конфокального микроскопа (TCS SP5; Leica Microsystems, Heidelberg, Германия), оснащенного аргоновым лазером. Микроскоп был предоставлен ЦКП-САЦ Казанского научного центра РАН. Наблюдения проводили с использованием объектива 20X с водной иммерсией (1.00 NA; Leica Microsystems, Heidelberg, Германия). Для возбуждения красителя использовали аргоновый лазер с длиной волны 488 нм, регистрацию флуоресценции красителя вели в диапазоне 500–560 нм. Поверхностные нервно-мышечные синапсы обнаруживали с помощью канала просвечивания конфокального микроскопа. Регистрацию флуоресценции проводили от протяженных нервных окончаний, загруженных красителем. Данные представляли в виде отношения $(\Delta F/F_0 - 1) \times 100\%$, где ΔF – изменение интенсивности флуоресценции красителя при стимуляции, F_0 – интенсивность флуоресценции красителя в покое. Обработку данных вели в программном обеспечении Leica Application Suit (Leica Microsystems, Heidelberg, Германия).

Реактивы

Применяли следующие блокаторы: д-тубокурарин (10 мкМ), тапсигаргин (2 мкМ), рианодин (10 мкМ) и ксестоспонгин С (2.8 мкМ). В экспериментах с тапсигаргином, рианодином и ксестоспонгином С вещества предварительно растворяли в ДМСО. В экспериментах, проведенных с этими агентами, в контрольный раствор добавляли такую же концентрацию ДМСО, которая присутствовала в растворе с апплицируемым соединением. Конечная концентрация ДМСО в растворе не превышала 0.01%.

Статистический анализ

Экспериментальные данные представлены как среднее значение $\pm$ ошибка среднего. В экспериментах по регистрации Ca^{2+} -транзientа n – количество синапсов в нервно-мышечных препаратах от 4–5 животных. Для статистической обработки результатов использовали двухсторонний критерий Стьюдента. Различия считали статистически значимыми при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

 Ca^{2+} -транзient при высокочастотной стимуляции двигательного нерва

На первом этапе оценивали изменение пресинаптического уровня Ca^{2+} в условиях высокочастотной стимуляции нервного окончания. Стимуляция препарата с частотой 50 Гц в присутствии красителя в течение 55 с вызывала изменения интенсивности свечения красителя – Ca^{2+} -транзientа (рис. 1). Интенсивность свечения нарастала не монотонно: резкое увеличение сменялось двухфазным ростом Ca^{2+} -сигнала, затем интенсивность свечения снижалась и выходила на стационарный уровень. Для удобства анализа мы ввели обозначения этих фаз нарастания: f_1 – первая быстрая фаза, f_2 – вторая медленная фаза, f_3 – третья медленная фаза (рис. 1б). Фазы f_2 и f_3 разделялись “точкой перегиба” (точка 3 рис. 1б). После прекращения стимуляции интенсивность свечения красителя резко снижалась.

Для анализа частотной зависимости характера изменений Ca^{2+} -транзientа препарат стимулировали в течение 55 с частотами от 20 до 70 Гц и производили регистрацию Ca^{2+} -транзientа. При повышении частоты стимуляции существенно изменялся характер Ca^{2+} -сигнала. На рис. 2 представлены Ca^{2+} -транзientы, полученные при разных частотах стимуляции. При стимуляции препарата с частотой 20 Гц резкое увеличение амплитуды Ca^{2+} -сигнала сменялось монотонным нарастанием базальной концентрации Ca^{2+} . При таком режиме стимуляции можно выделить две фазы нарастания сигнала, которые соответствуют фазам f_1 и f_2 . При увеличении частоты стимуляции до 40 Гц к быстрой фазе f_1 добавлялся двухфазный рост Ca^{2+} -сигнала и можно было выделить фазы f_2 и f_3 . Характер нарастания Ca^{2+} -транзientа при стимуляции 40 Гц был сходен с таковым, зарегистрированным при стимуляции 50 Гц, как показано на рис. 1. После быстрой фазы f_1 следовало двухфазное увеличение Ca^{2+} -сигнала, но фаза f_3 наступала раньше, чем при частоте 40 Гц (рис. 2а). Дальнейшее увеличение частоты стимуляции до 70 Гц вызывало резкий рост сигнала и последующий выход на стационарный уровень. При такой частоте стимуляции четко можно было выделить фазу f_1 , а фазы f_2 и f_3 зачастую могли сливаться без характерной точки перегиба. Но в части экспериментов удавалось выделить точку перегиба, разделяющую фазы f_2 и f_3 (рис. 2а).

Многофазный характер нарастания кривой Ca^{2+} -транзientа может быть связан с активацией внутриклеточных систем регуляции Ca^{2+} -метаболизма, активируемых во время высокочастотной стимуляции препарата. Для количественного анализа изменения кривой Ca^{2+} -транзientа при высокочастотной стимуляции медленные фазы роста f_2 и f_3 аппроксимировались прямыми с соответствующими угловыми коэффициентами k_1 и k_2 (рис. 2а). Коэффициент угла наклона k находили из уравнения $y = kx + b$.

Величины коэффициентов k_1 и k_2 составили 0.027 ± 0.004 и 0.061 ± 0.008 ($n = 9$, $p < 0.05$) соответственно при аппроксимации фаз Ca^{2+} -транзientа, полученного при частоте стимуляции 50 Гц (рис. 2е). В дальнейшем для статистического анализа данных при проведении фармакологического анализа была использована эта частота стимуляции для определения точки перегиба и аппроксимации Ca^{2+} -транзientа прямыми, поскольку именно при этой частоте наиболее четко наблюдался излом фронта нарастания Ca^{2+} -транзientа и четко определялась точка перегиба.

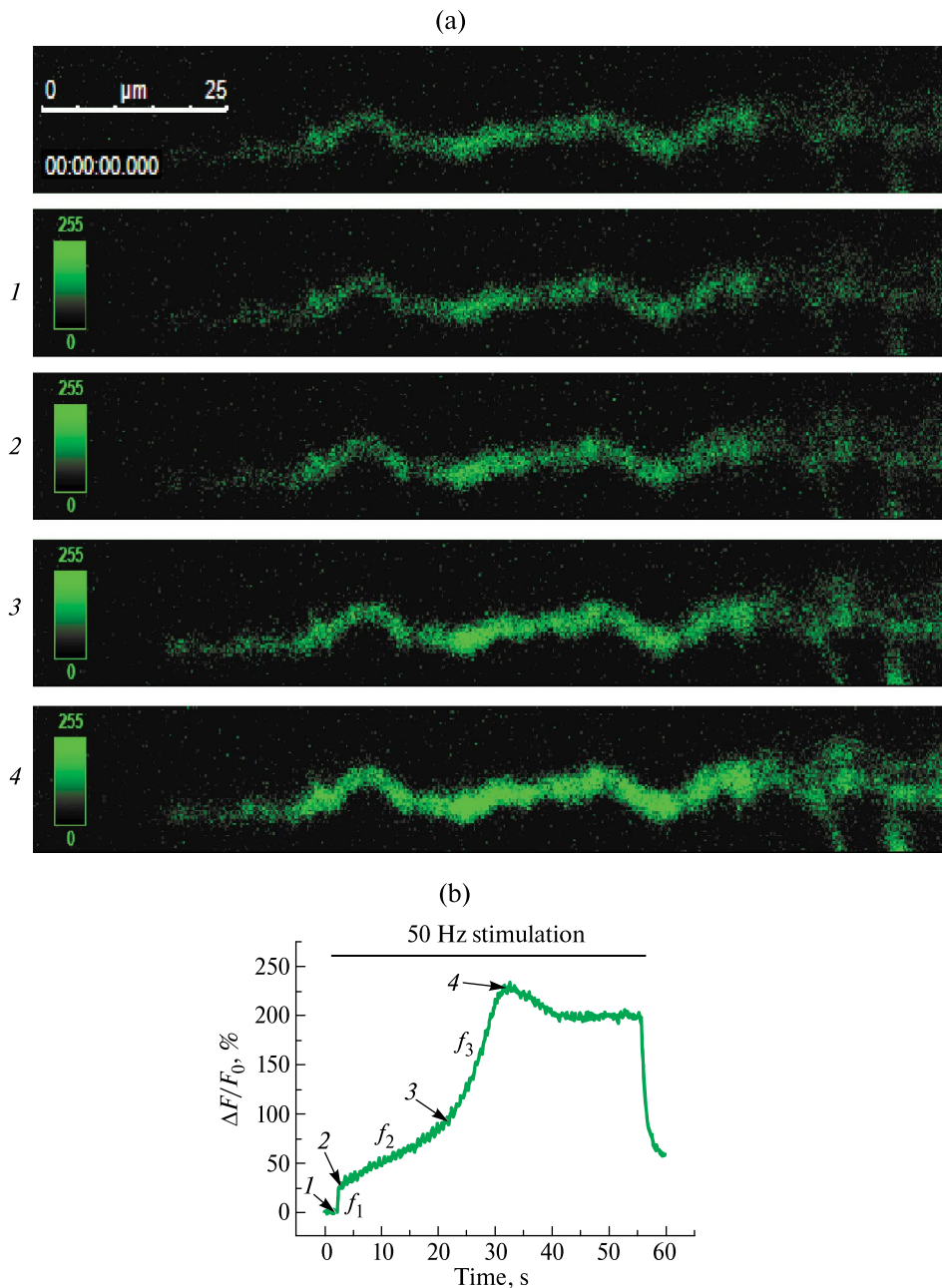


Рис. 1. Регистрация Ca^{2+} -транзientа во время ритмической активности при помощи конфокального микроскопа в присутствии низкоаффинного Ca^{2+} -красителя. (a) – Флуоресцентные микрофотографии нервного окончания, загруженного красителем Magnesium Green. Микрофотографии соответствуют различным временным точкам во время стимуляции нерва с частотой 50 Гц. (b) – Ca^{2+} -транзient, зарегистрированный в препарате, представленном на панели (a). Цифрами отмечены характерные временные точки во время стимуляции, соответствующие микрофотографиям на панели (a). На панели (b) также обозначены фазы нарастания Ca^{2+} -транзientа: f_1 – первая быстрая фаза нарастания (между точками 1 и 2), f_2 – вторая медленная фаза нарастания (между точками 2 и 3), f_3 – третья медленная фаза нарастания (между точками 3 и 4).

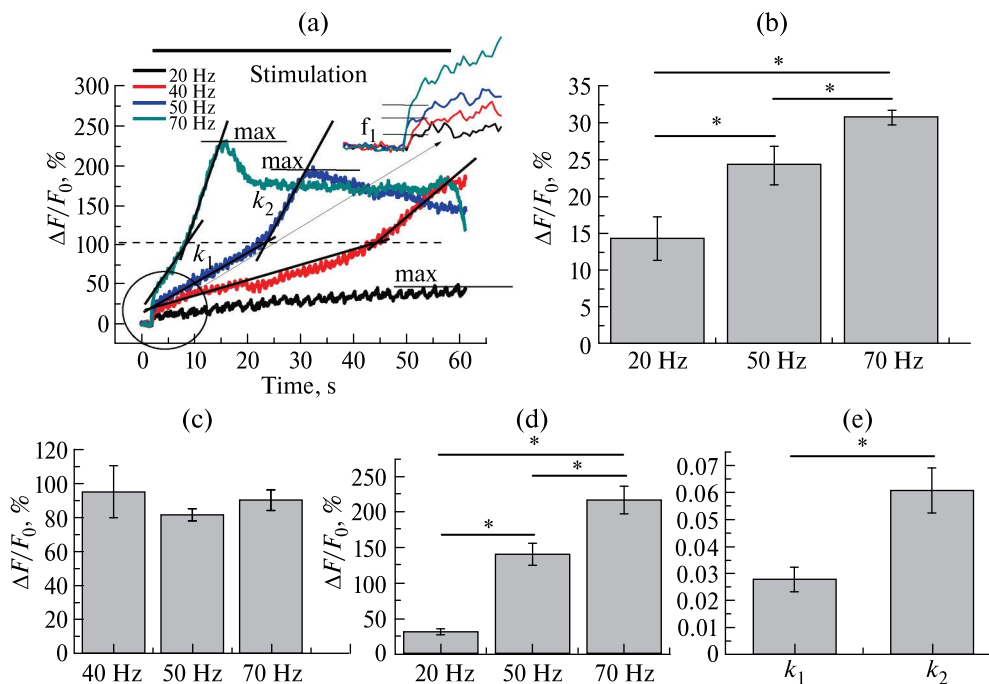


Рис. 2. Ca²⁺-транзистент при высокочастотной стимуляции двигательного нерва. (а) – Репрезентативные кривые Ca²⁺-транзистентов, зарегистрированные в одном препарате при частотах стимуляции от 20 до 70 Гц. Штриховая горизонтальная линия отмечает “точку перегиба”, сплошные горизонтальные линии отмечают максимальную амплитуду медленных фаз нарастания сигнала. На врезке показана первая быстрая фаза f_1 нарастания Ca²⁺-сигнала при частотах стимуляции от 20 до 70 Гц. Амплитуды быстрой фазы f_1 отмечены горизонтальными линиями. (б) – Средние значения амплитуды быстрой фазы f_1 нарастания Ca²⁺-транзистента при частотах стимуляции 20, 50 и 70 Гц (см. врезку на панели (а)). (с) – Средние значения амплитуды Ca²⁺-транзистента, при которой возникает точка перегиба Ca²⁺-транзистента, т. е. переход от фазы f_2 к фазе f_3 (см. штриховую линию на панели (а)) при частотах стимуляции 40, 50 и 70 Гц. (д) – Средние значения максимальной амплитуды (max) медленных фаз нарастания Ca²⁺-транзистента (черные горизонтальные линии на панели (а)) при частотах стимуляции 20, 50 и 70 Гц. (е) – Средние значения коэффициентов k_1 и k_2 , полученных при аппроксимации Ca²⁺-транзистента, зарегистрированного при частоте стимуляции 50 Гц. Данные представлены как среднее $\pm$ стандартная ошибка среднего, $n = 4-9$, * $p < 0.05$.

Одной из характеристик Ca²⁺-транзистента был уровень интенсивности флуоресценции, при котором на кривой Ca²⁺-транзистента образовывалась точка перегиба и фаза f_2 менялась на фазу f_3 (рис. 2а, с). Этот уровень флуоресценции был примерно одинаковым при частотах стимуляции 40, 50 и 70 Гц. Для примера на рис. 2 представлен Ca²⁺-транзистент, зарегистрированный в одном препарате при частотах стимуляции 20, 40, 50 и 70 Гц. Стоит отметить, что на рис. 2 представлен Ca²⁺-транзистент при частоте стимуляции 70 Гц в эксперименте, где было возможно выделить точку перегиба. Характер нарастания фаз f_2 и f_3 Ca²⁺-транзистента и наклон прямых аппроксимации могли незначительно варьировать от эксперимента к эксперименту. Исходя из этого, выделяли положение точки перегиба. Можно сделать предположение, что уровень $\Delta F/F_0$ в точке перегиба соответствует определенной концентрации Ca²⁺ в нервном окончании, при которой включается дополнительный Ca²⁺-зависимый процесс активации выброса Ca²⁺. Скорее всего, это включение механизма CICR. Средняя амплитуда Ca²⁺-транзистента в этой точке составила $95 \pm 15\%$ ($n = 4$) для частоты 40 Гц, $82 \pm 4\%$ ($n = 24$) для 50 Гц и $90 \pm 6\%$ ($n = 10$) для 70 Гц (рис 2с).

Также анализировали амплитуду быстрой фазы f_1 (рис. 2, врезка) и максимальную амплитуду нарастания Ca^{2+} -транзientа (рис. 2а). Амплитуда разных фаз нарастания Ca^{2+} -транзientа при высокочастотной стимуляции частотами 20, 50 и 70 Гц представлена на рис. 2д. Амплитуда быстрой фазы f_1 составила при 20 Гц $14 \pm 3\%$ ($n = 8$), при 50 Гц $24 \pm 3\%$ ($n = 14$) и $30 \pm 1\%$ ($n = 5$) при стимуляции 70 Гц. Максимальная амплитуда Ca^{2+} -транзientа составила при 20 Гц $31 \pm 4\%$ ($n = 7$), при 50 Гц $140 \pm 15\%$ ($n = 9$) и $216 \pm 20\%$ ($n = 4$) при 70 Гц.

При увеличении частоты стимуляции растет амплитуда как быстрой фазы нарастания f_1 , так и максимальная амплитуда, которую достигает Ca^{2+} -транзient, что может быть связано с накоплением Ca^{2+} в аксоплазме при увеличении частоты стимуляции.

Ca^{2+} -транзient при повышенном содержании ионов Ca^{2+} в растворе

Для того, чтобы показать связь изменения формы кривой Ca^{2+} -транзientа при частоте стимуляции 50 Гц с изменением концентрации Ca^{2+} в нервном окончании и подтвердить включение механизма CICR, исследовали изменение Ca^{2+} -транзientа при частоте стимуляции 50 Гц при повышении концентрации Ca^{2+} в омывающем препарат растворе до 3.6 мМ (рис. 3).

При повышении концентрации Ca^{2+} достоверно увеличивалась на $92 \pm 20\%$ ($n = 5$, $p < 0.05$) амплитуда первой быстрой фазы f_1 нарастания Ca^{2+} -сигнала. Максимальная амплитуда Ca^{2+} -сигнала также имела тенденцию к увеличению при повышении содержания Ca^{2+} в омывающем растворе (рис. 3).

При повышении концентрации Ca^{2+} в среде до 3.6 мМ достижение точки перегиба наблюдалось раньше, чем при нормальном содержании Ca^{2+} . Определить точно эту точку было невозможно, и кривая нарастания Ca^{2+} -транзientа аппроксимировалась только одной прямой, фазы f_2 и f_3 сливались в одну. При этом коэффициент, характеризующий наклон кривой при концентрации Ca^{2+} 3.6 мМ, достоверно не отличался от коэффициента k_2 при аппроксимации прямыми в контрольных условиях (0.061 ± 0.008 и 0.058 ± 0.011 соответственно, $n = 5-9$, $p > 0.05$) (рис. 3б).

Таким образом, характер поведения фаз нарастания и соответствующей им точки перегиба связан с накоплением Ca^{2+} в клетке. Возможно, что при увеличении концентрации Ca^{2+} в среде, омывающей препарат, на каждый последующий стимул в клетку входит большее количество Ca^{2+} и порог срабатывания механизма CICR наступает раньше. Он фактически включается сразу вслед за первой быстрой фазой входа Ca^{2+} .

Влияние блокаторов Ca^{2+} -АТФаз эндоплазматического ретикула на Ca^{2+} -транзient при высокочастотной стимуляции

Одним из основных Ca^{2+} -насосов, секвестрирующих Ca^{2+} из цитоплазмы в ЭР, является SERCA или Ca^{2+} -АТФаза ЭР. Для проверки гипотезы об участии SERCA в регуляции уровня пресинаптического Ca^{2+} во время частотной стимуляции были проведены эксперименты с добавлением в раствор тапсигаргина, который является блокатором SERCA, осуществляющего закачку ионов Ca^{2+} в ЭР [3].

Добавление тапсигаргина в концентрации 2 мкМ в раствор приводило к увеличению скорости нарастания Ca^{2+} -транзientа, а также к увеличению амплитуд быстрой фазы f_1 и максимальных амплитуд фаз f_2 и f_3 нарастания (рис. 4). Амплитуда быстрой фазы f_1 после действия тапсигаргина увеличилась на $108.9 \pm 28.1\%$ по отношению к контролю ($n = 5$, $p < 0.03$) (рис. 4д). Максимальная амплитуда Ca^{2+} -сигнала в присутствии тапсигаргина увеличилась на $42.7 \pm 10.1\%$ по отношению к контролю ($n = 5$, $p < 0.02$) (рис. 4д). Применение тапсигаргина приводило к увеличению скорости нарастания Ca^{2+} -транзientа, и достижение точки перегиба наблюдалось раньше, чем в контрольных условиях. Выделить эту точку не представлялось возможным.

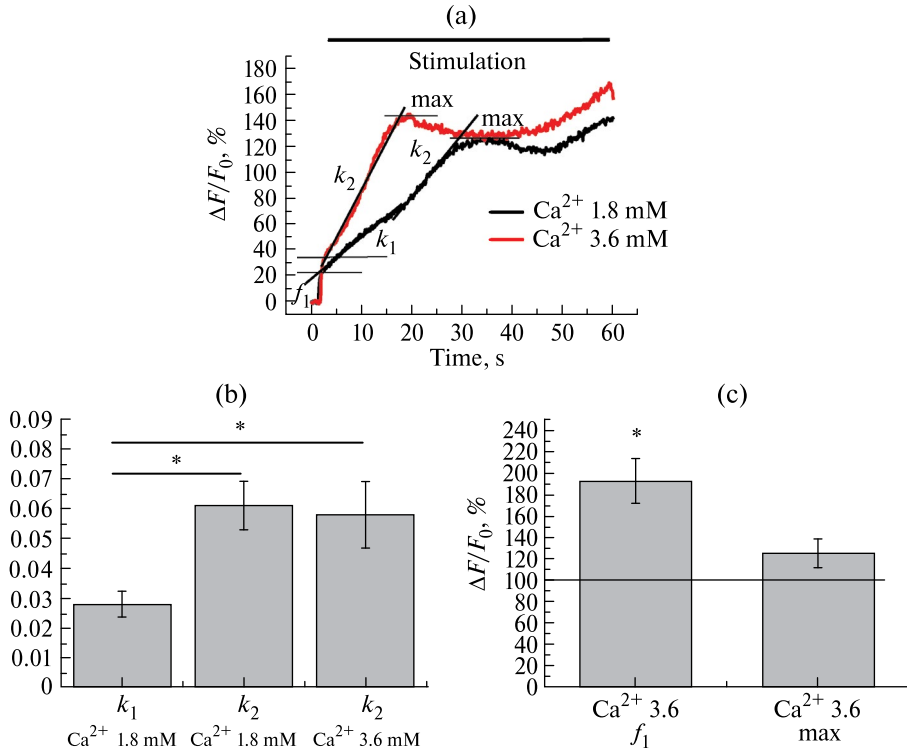


Рис. 3. Ca^{2+} -транзист при повышенном содержании ионов Ca^{2+} в растворе. (a) – Репрезентативные кривые Ca^{2+} -транзиста, зарегистрированные в одном препарате при нормальном (1.8 mM) и повышенном (3.6 mM) содержании Ca^{2+} в растворе при частоте стимуляции 50 гц. (b) – Средние значения коэффициентов k_1 и k_2 , полученных при аппроксимации Ca^{2+} -транзиста, зарегистрированного при частоте стимуляции 50 Гц при нормальном и повышенном содержании Ca^{2+} . (c) – Влияние повышения концентрации Ca^{2+} в растворе на величину быстрой (f_1) и медленной (max) фаз Ca^{2+} -транзиста (отмечены горизонтальными линиями на панели (a)), выраженных в процентах от контрольных значений (при нормальном содержании Ca^{2+}). Данные представлены как среднее $\pm$ стандартная ошибка среднего, $n = 5$, $*p < 0.05$.

Медленные фазы нарастания Ca^{2+} -транзиста f_2 и f_3 сливались в одну фазу нарастания Ca^{2+} -транзиста, которая аппроксимировалась одной прямой (рис. 4a). При этом коэффициент, характеризующий наклон прямой k_2 , аппроксимирующей эти фазы, в присутствии тапсигаргина был больше коэффициентов k_1 и k_2 , полученных в контрольных условиях (0.084 ± 0.009 и 0.030 ± 0.009 , 0.058 ± 0.011 соответственно, $n = 5$, $p < 0.05$) (рис. 4c). Эффекты тапсигаргина на Ca^{2+} -транзист были схожи с эффектами, наблюдаемыми при повышении содержания Ca^{2+} в растворе.

Таким образом, блокада SERCA приводила к уменьшению накачки Ca^{2+} во внутриклеточные Ca^{2+} -депо и к его накоплению в аксоплазме, о чем говорит изменение характера кривых Ca^{2+} -транзиста под действием тапсигаргина.

Влияние блокатора рианодиновых рецепторов на Ca^{2+} -транзист при высокочастотной стимуляции

Исходя из полученных результатов в экспериментах с применением тапсигаргина и повышенной концентрации Ca^{2+} , свидетельствующих о наличии дополнительного внутриклеточного процесса (CICR), регулирующего содержание Ca^{2+} в клетке, было

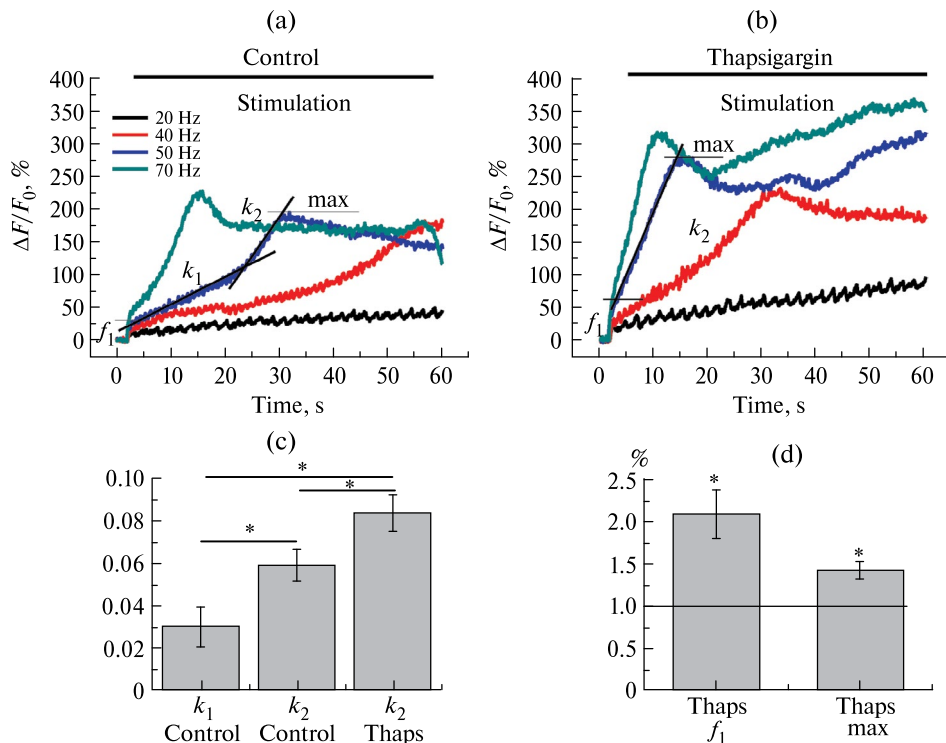


Рис. 4. Изменение характера нарастания Ca²⁺-транзientа при блокаде SERCA тапсигаргином; параметры Ca²⁺-транзientа при стимуляции 50 Гц. (а) – Репрезентативные кривые Ca²⁺-транзientа, зарегистрированные в одном препарате в контроле при частотах стимуляции от 20 до 70 Гц. (б) – Репрезентативные кривые Ca²⁺-транзientа, зарегистрированные в том же препарате, что и на панели (а), в присутствии тапсигаргина (2 мкМ) при частотах стимуляции от 20 до 70 Гц. (с) – Средние значения коэффициентов k_1 и k_2 , полученных при аппроксимации Ca²⁺-транзientа, зарегистрированного при частоте стимуляции 50 Гц в контроле (Control) и в присутствии тапсигаргина (Thaps). (д) – Влияние тапсигаргина на величину быстрой (f_1) и медленной (max) фаз Ca²⁺-транзientа, выраженные в процентах от контрольных значений. Данные представлены как среднее $\pm$ стандартная ошибка среднего, $n = 5$, $*p < 0.05$.

сделано предположение о возможной связи между многофазным характером нарастания Ca²⁺-транзientа и включением дополнительного источника ионов Ca²⁺ – внутриклеточных депо, в частности ЭР. Для изучения возможного вклада ЭР во внутриклеточную динамику Ca²⁺ использовали рианодин – блокатор рианодиновых рецепторов ЭР. Изучали влияние рианофина в концентрации 10 мкМ на Ca²⁺-транзient при высокочастотной стимуляции препарата. По данным литературы, в этой концентрации рианодин блокирует рианодиновые рецепторы [38]. Анализировали характер поведения кривой Ca²⁺-транзientа при частоте стимуляции 20 и 50 Гц. Под действием рианофина устранялась вторая медленная фаза f_3 нарастания Ca²⁺-транзientа, зарегистрированного при частоте стимуляции 50 Гц. Характер Ca²⁺-транзientа при стимуляции частотой 20 Гц достоверно не изменился (рис. 5).

Первая медленная фаза нарастания сигнала f_2 оставалась неизменной после действия рианофина. Соответственно, и коэффициент наклона прямой аппроксимации этой фазы – k_1 оставался без изменения и не отличался от величины коэффициента, измеренного в контрольных условиях ($n = 5$, $p > 0.05$) (рис. 5с).

Амплитуда быстрой фазы нарастания Ca²⁺-транзientа f_1 также осталась неизменной при добавлении рианофина и составила $91.7 \pm 4.1\%$ ($n = 5$, $p > 0.05$) и $100.1 \pm 3.4\%$

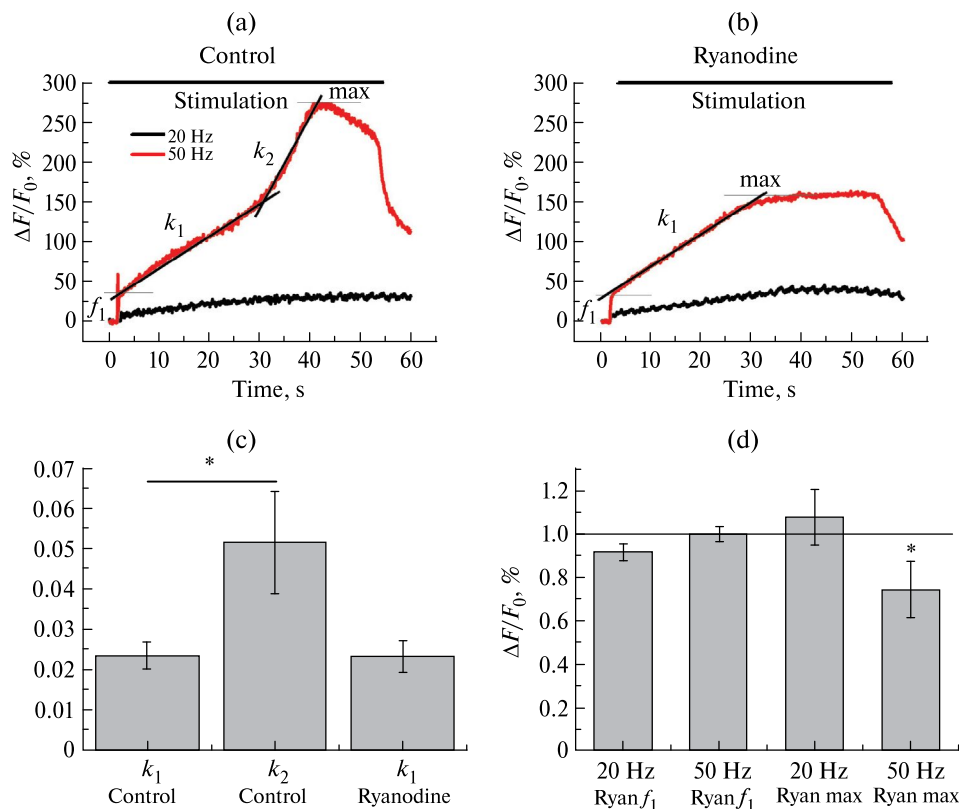


Рис. 5. Влияние риаподина на Ca^{2+} -транзист при высокочастотной стимуляции. (а) – Репрезентативные кривые Ca^{2+} -транзиста, зарегистрированные в одном препарате, в контроле при частотах стимуляции 20 и 50 Гц. (б) – Репрезентативные кривые Ca^{2+} -транзиста, зарегистрированные в том же препарате, что и на панели (а) в присутствии риаподина (10 мкМ) при частотах стимуляции 20 и 50 Гц. (с) – Средние значения коэффициентов k_1 и k_2 , полученных при аппроксимации Ca^{2+} -транзиста, зарегистрированного при частоте стимуляции 50 Гц в контроле (Control) и в присутствии риаподина (Ryan). (д) – Влияние риаподина на величину быстрой (f_1) и медленной фаз (max) Ca^{2+} -транзиста, выраженные в процентах от контрольных значений. Данные представлены как «среднее $\pm$ стандартная ошибка среднего» ($n = 5$, $*p < 0.05$).

соответственно при стимуляции в 20 Гц и 50 Гц. Максимальная амплитуда после действия риаподина при 20 Гц осталась неизменной ($108.0 \pm 12.7\%$; $n = 5$, $p > 0.05$), а при стимуляции в 50 Гц за счет исчезновения второй медленной фазы f_2 нарастания сигнала уменьшилась на $25.6 \pm 13.1\%$ ($n = 5$, $p < 0.05$) (рис. 5д).

Таким образом, ингибирование риаподиновых рецепторов, а значит, выключение механизма высвобождения Ca^{2+} из ЭР (CICR), приводило к устранению последней фазы нарастания концентрации Ca^{2+} в цитоплазме терминали, что может свидетельствовать об участии внутриклеточных Ca^{2+} -депо в работе нервного окончания при частотной стимуляции двигательного нерва.

Влияние блокатора инозитольных рецепторов на Ca^{2+} -транзист при высокочастотной стимуляции

Помимо риаподиновых рецепторов, на поверхности ЭР также присутствуют рецепторы, активируемые инозитолтрифосфатом. Для определения их роли в регуляции динамики изменения концентрации Ca^{2+} в нервной терминали был использован блокатор

инозитольных рецепторов ксестоспонгин С в концентрации 2.8 мкМ [39, 40]. Результаты действия ксестоспонгина С на Ca^{2+} -транзист в нервном окончании лягушки в условиях ритмической стимуляции препарата представлены на рис 6. Под действием ксестоспонгина С устранялась вторая медленная фаза f_2 нарастания Ca^{2+} -транзиста, зарегистрированного при частоте стимуляции 50 Гц так же, как и в присутствии рианоцина. Характер Ca^{2+} -транзиста при стимуляции частотой 20 Гц достоверно не изменился.

Первая медленная фаза нарастания сигнала f_1 оставалась неизменной после действия ксестоспонгина С. Соответственно, и коэффициент наклона прямой аппроксимации этой фазы $-k_1$ оставался без изменения и не отличался от величины коэффициента, измеренного в контрольных условиях ($n = 5, p > 0.05$) (рис. 6с).

За счет устранения второй медленной фазы f_2 максимальная амплитуда нарастания сигнала при стимуляции в 50 Гц уменьшилась на $27.5 \pm 9.3\%$ ($n = 5, p < 0.05$). Также на $7.0 \pm 2.4\%$ ($n = 5, p < 0.05$) уменьшалась первая быстрая фаза нарастания f_1 Ca^{2+} -транзиста (рис. 6д).

Таким образом, ингибирование инозитольных рецепторов, а значит, выключение механизма высвобождения Ca^{2+} из ЭР (CICR), приводило к устранению двухфазного характера нарастания концентрации Ca^{2+} , что может свидетельствовать об участии инозитольных рецепторов, наряду с рианодиновыми рецепторами, в выбросе Ca^{2+} из внутриклеточных Ca^{2+} -депо при частотной стимуляции нерва.

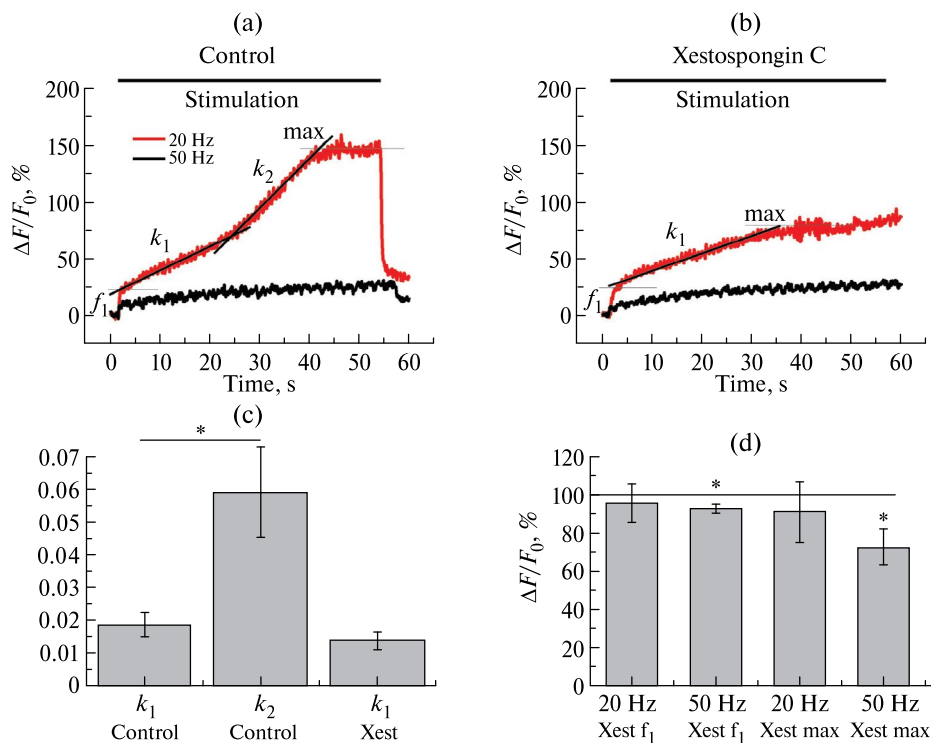


Рис. 6. Влияние ксестоспонгина С на Ca^{2+} -транзист при высокочастотной стимуляции. (а) – Репрезентативные кривые Ca^{2+} -транзиста, зарегистрированные в одном препарате в контроле при частотах стимуляции 20 и 50 Гц. (б) – Репрезентативные кривые Ca^{2+} -транзиста, зарегистрированные в том же препарате, что и на панели (а), в присутствии ксестоспонгина С (2.8 мкМ) при частотах стимуляции 20 и 50 Гц. (с) – Средние значения коэффициентов k_1 и k_2 , полученные при аппроксимации Ca^{2+} -транзиста, зарегистрированного при частоте стимуляции 50 Гц в контроле (Control) и в присутствии ксестоспонгина С (Xest). (д) – Влияние ксестоспонгина С на величину быстрой (f_1) и медленной фаз (max) Ca^{2+} -транзиста, выраженную в процентах от контрольных значений. Данные представлены как среднее $\pm$ стандартная ошибка среднего, $n = 5$, $*p < 0.05$.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Настоящее исследование было направлено на изучение изменения пресинаптического уровня Ca^{2+} в моторных нервных окончаниях лягушки при длительной высокочастотной стимуляции двигательного нерва с использованием Ca^{2+} -чувствительного флуоресцентного красителя. Режим высокочастотной стимуляции двигательного нерва является наиболее приближенным к физиологическим условиям работы синаптического аппарата, поскольку информация между моторным нейроном и мышечными единицами передается в виде пачек импульсов с частотой от 30 до 100 Гц [23, 31]. Анализ уровня Ca^{2+} в синапсах холоднокровных животных в подобных условиях стимуляции посвящен ряд работ [3, 20, 41–43]. Но в этих исследованиях, в основном, для оценки внутриклеточного содержания Ca^{2+} использовали высокоафинные Ca^{2+} -красители, которые могут некорректно давать оценку пресинаптического уровня Ca^{2+} при массивном его входе во время пачек импульсов вследствие их насыщения. Для предотвращения насыщения красителя некоторые исследователи используют импульсный режим стимуляции препарата в виде коротких пачек, во время которых краситель потенциально не успевает насыщаться [4]. Но даже в таких условиях стимуляции индикаторы с высоким сродством [4, 43] не дают корректной оценки фаз секвестрации Ca^{2+} после пачки импульсов [44, 45]. Это предположение было также подтверждено для нервно-мышечного соединения речного рака [46], в этой работе было показано, что индикаторы с высоким сродством искажают временные характеристики Ca^{2+} -транзиентов, вызванных одиночными импульсами. Для оценки пресинаптического уровня Ca^{2+} при таких условиях стимуляции двигательного нерва предпочтительнее использовать низкоафинные красители, которые не насыщаются. В данном исследовании был использован низкоафинный Ca^{2+} -краситель Magnesium Green, который может корректно отражать пресинаптический уровень Ca^{2+} в широком диапазоне концентраций при разных режимах стимуляции препарата [30–32]. Были проведены эксперименты по оценке пресинаптического уровня Ca^{2+} при частотах стимуляции 20, 50 и 70 Гц, которые вписываются в физиологический диапазон частот паттернов активности мышечных единиц [23, 31]. При повышении частоты стимуляции существенно изменялся характер Ca^{2+} -сигнала. Плавное нарастание концентрации Ca^{2+} при 20 Гц сменялось двухфазным увеличением этого сигнала при 50 Гц и последующим резким ростом при частоте 70 Гц. Особый интерес представляет кривая, полученная при частоте стимуляции 50 Гц, поскольку позволяет выделить моменты начала разных фаз нарастания Ca^{2+} -сигнала. Первая быстрая фаза нарастания практически вертикальная, затем происходит изменение характера кривой Ca^{2+} -транзиента, которое проявляется в появлении более медленной плавной фазой с последующим изломом и второй более быстрой фазы, достигающей максимума и переходящей в плато. Поскольку при частоте стимуляции 50 Гц наиболее четко проявлялся характер изменения Ca^{2+} -транзиента, последующий анализ был проведен с использованием этой частоты. При более высоких частотах стимуляции точка излома кривой Ca^{2+} -транзиента выделяется с трудом, скорее всего из-за того, что скорости процессов накачки, секвестрирования Ca^{2+} и его выброса из Ca^{2+} -депо выравниваются. При частоте стимуляции 20 Гц после первой быстрой фазы нарастания наблюдается плавный подъем Ca^{2+} -транзиента без достижения второй фазы нарастания сигнала. Фазы нарастания Ca^{2+} -сигнала, по-видимому, соответствуют определенным процессам, связанным с накоплением и секвестрованием Ca^{2+} в аксоплазме. Первая быстрая фаза обусловлена быстрым входом ионов Ca^{2+} в нервное окончание через открытые потенциал-чувствительные Ca^{2+} -каналы [43, 47]. Последующие фазы могут быть связаны с накоплением Ca^{2+} внутри терминали и его секвестрированием внутриклеточными буферными системами, а также выбросом Ca^{2+} из внутриклеточных депо посредством Ca^{2+} -активируемого Ca^{2+} -выброса с участием риадиновых и инозитольных рецепторов [48]. Изменения характера Ca^{2+} -сигнала при повышении частоты стимуляции могут свидетельствовать о включении дополнительных источников Ca^{2+} .

Эксперименты при повышенной концентрации Ca^{2+} в растворе, омывающем препарат, показали, что, действительно, увеличение концентрации Ca^{2+} с 1.8 до 3.6 мМ изменяло характер кривой нарастания Ca^{2+} -транзientа. Увеличивались амплитуда быстрой фазы нарастания транзientа и его максимальная амплитуда. Аппроксимация Ca^{2+} -сигнала прямыми и анализ коэффициента, характеризующего наклон этих прямых, позволяет сделать предположение о природе кальцийзависимых процессов, происходящих при ритмической активности синапса. При повышении концентрации Ca^{2+} в среде до 3.6 мМ достижение точки перегиба наблюдалось раньше, чем при нормальном содержании Ca^{2+} . Фактически выделить эту точку не представлялось возможным, и кривая нарастания Ca^{2+} -транзientа аппроксимировалась только одной прямой. Коэффициент наклона этой прямой был равен значению второго коэффициента, определенного в контрольных условиях. То есть в терминаль входило достаточно большое количество Ca^{2+} , который не успевал секвестрироваться, и включался сразу второй Ca^{2+} -зависимый процесс выброса Ca^{2+} из Ca^{2+} -депо. Это связано, скорее всего, с увеличением движущей силы Ca^{2+} , поскольку увеличивается концентрационный градиент для этих ионов. Это может свидетельствовать о том, что при данном режиме стимуляции 50 Гц SERCA участвует в быстрой регуляции содержания Ca^{2+} в цитоплазме. SERCA играет роль Ca^{2+} -буфера, закачивающего Ca^{2+} из цитоплазмы в ЭР, а его блокада приводит к накоплению Ca^{2+} и ускорению включения Ca^{2+} -зависимого механизма освобождения Ca^{2+} в цитоплазму. После достижения максимальной амплитуды транзientа наблюдалось его достаточно резкое падение. Именно это снижение амплитуды сигнала может быть обусловлено частичным истощением Ca^{2+} -депо. Последующее восстановление амплитуды, аналогичное эффекту повышения внеклеточной концентрации Ca^{2+} при высоких частотах стимуляции, может быть обусловлено превалированием выхода ионов из ЭПР над степенью его закачки, а также вкладом других участников системы Ca^{2+} -метаболизма в нервном окончании. Аналогичные результаты были получены при стимуляции короткими пачками импульсов в присутствии как высокоафинного [49], так и низкоафинного красителя [50]. Значение SERCA при сходных режимах стимуляции на таком же объекте показано Soga-Sakakibara с соавт. [43]. Однако наблюдаемые этими авторами снижение амплитуды Ca^{2+} -транзientа и уменьшение его максимальной амплитуды могут быть обусловлены применением высокоафинного Ca^{2+} -красителя. Вероятно, резкое увеличение концентрации Ca^{2+} при блокаде SERCA вызывало быстрое насыщение кальциевого красителя, и он уже не мог корректно отражать увеличение концентрации Ca^{2+} в цитоплазме, что и приводило к снижению амплитуды кривой Ca^{2+} -транзientа. Подтверждением того, что блокада SERCA может приводить к накоплению Ca^{2+} в аксоплазме, служат данные о возрастании уровня нейросекреции под действием тапсигаргина [10, 49].

Установлено, что SERCA связаны с гладким ЭР, расположенным на расстоянии ~ 1 мкм от мест высвобождения нейромедиатора [49, 51], в котором происходит накопление Ca^{2+} в результате активности SERCA. ЭР действует как динамическое хранилище Ca^{2+} благодаря согласованной активности Ca^{2+} -каналов и транспортеров, расположенных в эндомембране, а также интралюминальных Ca^{2+} -связывающих белков, которые служат буферной системой Ca^{2+} высокой емкости [10, 21]. Выход Ca^{2+} из ЭР опосредован двумя семействами Ca^{2+} -каналов: Ca^{2+} -зависимыми Ca^{2+} -каналами, обычно называемыми риадиноновыми рецепторами, и рецепторами инозитолтрифосфата [10, 21].

Результаты проведенных экспериментов с блокадой риадиноновых и инозитольных рецепторов позволили оценить момент включения выброса Ca^{2+} из ЭР за счет активации этих типов рецепторов. При этом амплитуда Ca^{2+} транзientа, при которой наблюдался дополнительный выброс депонированного Ca^{2+} , был примерно один и тот же при разных частотах стимуляции. Это свидетельствует о том, что он, вероятно, соответствует моменту, когда Ca^{2+} внутри аксоплазмы достигает уровня, при котором включается Ca^{2+} -активируемый выброс Ca^{2+} , опосредованный активацией риадиноновых и инозитольных рецепторов. Таким образом, путем анализа Ca^{2+} -транзientа

при частоте 50 Гц возможно отследить момент включения рианодиновых рецепторов в процесс формирования внутриклеточного уровня Ca^{2+} . Он находится в промежутке от 25–30 с от начала стимуляции. Ранее показано, что увеличение Ca^{2+} посредством активации рианодиновых рецепторов активирует фосфолипазу С для продукции инозитолтрифосфата, что приводит к дальнейшему росту Ca^{2+} -активируемого освобождения Ca^{2+} через инозитольные рецепторы [48]. Тот факт, что при блокаде инозитольных рецепторов уменьшается первая быстрая фаза Ca^{2+} -транзита при частоте стимуляции 50 Гц (рис. 6d) говорит о том, что эти рецепторы могут вносить вклад в формирование входа Ca^{2+} в нервное окончание даже в начале стимуляции, еще до включения основного массивованного выброса Ca^{2+} за счет Ca^{2+} -активируемого освобождения Ca^{2+} . Полученные данные о характере изменений внутриклеточного содержания Ca^{2+} при частотной ритмической стимуляции двигательного нерва хорошо согласуются с данными, полученными электрофизиологическими методами. Было показано, что нейротрофин NT-3 значительно усиливал спонтанное высвобождение нейромедиатора в нервно-мышечном соединении, это действие требовало как высвобождения Ca^{2+} через рианодиновые и инозитольные рецепторы, так и активации Ca^{2+} /кальмодулин-зависимой киназы II [52]. Также было показано, что выход депонированного Ca^{2+} из внутриклеточных Ca^{2+} -депо способствует высвобождению медиатора в автономных синапсах млекопитающих [9], нервно-мышечных соединениях лягушек [3, 20, 43] и центральных синапсах [6, 8].

Проведенное исследование показало, что использование низкоаффинного флуоресцентного Ca^{2+} -красителя при высокочастотной ритмической стимуляции двигательного нерва позволяет достаточно точно отслеживать включение SERCA, рианодиновых и инозитольных рецепторов, вносящих существенный вклад в формирование внутриклеточного содержания Ca^{2+} в двигательных нервных окончаниях и участвующих в модуляции нейросекреторного процесса.

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента (Д. В. С. и Н. Ф. Ф.), сбор данных (Д. В. С., Э. Ф. Х.), обработка данных (Д. В. С., Э. А. Б.), написание и редактирование манускрипта (Д. В. С., Э. А. Б.).

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена за счет гранта Академии наук Республики Татарстан, предоставленного молодым кандидатам наук (постдокторантам) с целью защиты докторской диссертации, выполнения научно-исследовательских работ, а также выполнения трудовых функций в научных и образовательных организациях Республики Татарстан в рамках Государственной программы Республики Татарстан “Научно-технологическое развитие Республики Татарстан” (Соглашение № 77/2024-ПД от 16.12.2024 г.).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Эксперименты на животных проводили с соблюдением принципов гуманности и требований, предъявляемых к работе с лабораторными животными в России, и в соответствии с Европейской конвенцией по охране животных и Директивами 86/609/ЕЕС. Протоколы исследований, заявляемые в настоящей работе, одобрены Комитетом по биоэтике Казанского научного центра РАН (протокол № 24/2 от 04.10.2024 г.).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией данной статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Katz B, Miledi R* (1965) The Effect of Calcium on Acetylcholine Release from Motor Nerve Terminals. *Proc R Soc B Biol Sci* 161: 496–503.
<https://doi.org/10.1098/rspb.1965.0017>
2. *Schweizer FE, Betz H, Augustine GJ* (1995) From vesicle docking to endocytosis: Intermediate reactions of exocytosis. *Neuron* 14: 689–696.
[https://doi.org/10.1016/0896-6273\(95\)90213-9](https://doi.org/10.1016/0896-6273(95)90213-9)
3. *Narita K, Akita T, Osanai M, Shirasaki T, Kijima H, Kuba K* (1998) A Ca^{2+} -induced Ca^{2+} Release Mechanism Involved in Asynchronous Exocytosis at Frog Motor Nerve Terminals. *J Gen Physiol* 112: 593–609.
<https://doi.org/10.1085/jgp.112.5.593>
4. *Suzuki S ichi, Osanai M, Murase M, Suzuki N, Ito K, Shirasaki T, Narita K, Ohnuma K, Kuba K, Kijima H* (2000) Ca^{2+} dynamics at the frog motor nerve terminal. *Pflugers Arch Eur J Physiol* 440: 351–365.
<https://doi.org/10.1007/S004240000278>
5. *Narita K, Suzuki N, Himi N, Murayama T, Nakagawa T, Okabe N, Nakamura-Mariyama E, Hayashi N, Sakamoto I, Miyamoto O, Kuba K* (2019) Effects of intravesicular loading of a Ca^{2+} chelator and depolymerization of actin fibers on neurotransmitter release in frog motor nerve terminals. *Eur J Neurosci* 50: 1700–1711.
<https://doi.org/10.1111/ejn.14353>
6. *Galante M, Marty A* (2003) Presynaptic Ryanodine-Sensitive Calcium Stores Contribute to Evoked Neurotransmitter Release at the Basket Cell-Purkinje Cell Synapse. *J Neurosci* 23: 11229–11234.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-35-11229.2003>
7. *Emptage NJ, Reid CA, Fine A* (2001) Calcium stores in hippocampal synaptic boutons mediate short-term plasticity, store-operated Ca^{2+} entry, and spontaneous transmitter release. *Neuron* 29: 197–208.
[https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(01\)00190-8](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(01)00190-8)
8. *Conti R, Tan YP, Llano I* (2004) Action Potential-Evoked and Ryanodine-Sensitive Spontaneous Ca^{2+} Transients at the Presynaptic Terminal of a Developing CNS Inhibitory Synapse. *J Neurosci* 24: 6946–6957.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1397-04.2004>
9. *Smith AB, Cunnane TC* (1996) Ryanodine-sensitive calcium stores involved in neurotransmitter release from sympathetic nerve terminals of the guinea-pig. *J Physiol* 497: 657–664.
<https://doi.org/10.1113/JPHYSIOL.1996.SP021797>
10. *Verkhratsky A* (2005) Physiology and pathophysiology of the calcium store in the endoplasmic reticulum of neurons. *Physiol Rev* 85: 201–279.
<https://doi.org/10.1152/physrev.00004.2004>
11. *McGraw CF, Somlyo AV, Blaustein MP* (1980) Localization of calcium in presynaptic nerve terminals. An ultrastructural and electron microprobe analysis. *J Cell Biol* 85: 228–241.
<https://doi.org/10.1083/JCB.85.2.228>
12. *Hartter DE, Burton PR, Laveri LA* (1987) Distribution and calcium-sequestering ability of smooth endoplasmic reticulum in olfactory axon terminals of frog brain. *Neuroscience* 23: 371–386.
[https://doi.org/10.1016/0306-4522\(87\)90297-1](https://doi.org/10.1016/0306-4522(87)90297-1)
13. *Bouchard R, Pattarini R, Geiger JD* (2003) Presence and functional significance of presynaptic ryanodine receptors. *Prog Neurobiol* 69: 391–418.
[https://doi.org/10.1016/S0301-0082\(03\)00053-4](https://doi.org/10.1016/S0301-0082(03)00053-4)
14. *Castejón OJ, Apkarian RP* (1992) Conventional and high resolution scanning electron microscopy of outer and inner surface features of cerebellar nerve cells. *J Submicrosc Cytol Pathol* 24: 549–562.
15. *Blaustein MP, McGraw CF, Somlyo AV, Schweitzer ES* (1980) How is the cytoplasmic calcium concentration controlled in nerve terminals? *J Physiol (Paris)* 76: 459–470.
16. *Westrum LE, Gray EG* (1986) New observations on the substructure of the active zone of brain synapses and motor endplates. *Proc R Soc London Ser B Biol Sci* 229: 29–38.
<https://doi.org/10.1098/rspb.1986.0072>
17. *Balezina OP, Bogacheva PO, Orlova TY* (2007) Effect of L-type calcium channel blockers on activity of newly formed synapses in mice. *Bull Exp Biol Med* 143: 171–174.
<https://doi.org/10.1007/s10517-007-0041-y>

18. Балезина ОП, Букин АН, Лантева ВИ (2001) Влияние дантролена и рианодина на вызванную активность нервно-мышечных синапсов у мышей. 87: 1511–1517. [Balezina OP, Bukin AN, Lapteva VI (2001) Effects of dantrolene and ryanodine on the evoked activity of neuromuscular synapses in mice. Russ J Physiol 87: 1511–1517. (In Russ)].
19. Zucker RS, Regehr WG (2002) Short-Term Synaptic Plasticity. Annu Rev Physiol 64: 355–405. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.64.092501.114547>
20. Narita K, Akita T, Hachisuka J, Huang SM, Ochi K, Kuba K (2000) Functional coupling of Ca^{2+} channels to ryanodine receptors at presynaptic terminals: Amplification of exocytosis and plasticity. J Gen Physiol 115: 519–532. <https://doi.org/10.1085/JGP.115.4.519>
21. Verkhratsky A (2004) Endoplasmic reticulum calcium signaling in nerve cells. Biol Res 37: 693–699. <https://doi.org/10.4067/s0716-97602004000400027>
22. Khuzakhmetova VF, Samigullin DV, Bukharaeva EA (2014) The role of presynaptic ryanodine receptors in regulation of the kinetics of the acetylcholine quantal release in the mouse neuromuscular junction. Biochem Suppl Ser A Membr Cell Biol 8: 144–152. <https://doi.org/10.1134/S199074781305005X>
23. Tazerart S, Vinay L, Brocard F (2008) The persistent sodium current generates pacemaker activities in the central pattern generator for locomotion and regulates the locomotor rhythm. J Neurosci 28: 8577–8589. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1437-08.2008>,
24. Bullen A, Saggau P (1999) Optical Recording from Individual Neurons in Culture. In: Windhorst U, Johansson H (eds) Modern Techniques in Neuroscience Research. Springer, Berlin, pp 89–126.
25. Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY (1985) A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. J Biol Chem 260: 3440–3450. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)83641-4](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)83641-4)
26. Tsien RY (1989) Fluorescent Indicators of Ion Concentrations. Methods Cell Biol 30: 127–156. [https://doi.org/10.1016/S0091-679X\(08\)60978-4](https://doi.org/10.1016/S0091-679X(08)60978-4)
27. Adams SR (2010) How Calcium Indicators Work. Cold Spring Harb Protoc 2010(3): pdb.top70. <https://doi.org/10.1101/pdb.top70>
28. Tank DW, Regehr WG, Delaney KR (1995) A quantitative analysis of presynaptic calcium dynamics that contribute to short-term enhancement. J Neurosci 15: 7940–7952. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.15-12-07940.1995>
29. Regehr WG, Atluri PP (1995) Calcium transients in cerebellar granule cell presynaptic terminals. Biophys J 68: 2156–2170. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(95\)80398-X](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(95)80398-X)
30. Samigullin D, Fatikhov N, Khaziev E, Skorinkin A, Nikolsky E, Bukharaeva E (2015) Estimation of presynaptic calcium currents and endogenous calcium buffers at the frog neuromuscular junction with two different calcium fluorescent dyes. Front Synaptic Neurosci 6: 29. <https://doi.org/10.3389/FNSYN.2014.00029>
31. Samigullin DV, Bukharaeva EA (2025) Monitoring presynaptic calcium dynamics with membrane-impermeant fluorescent indicators in motor nerve endings. Biophys Rev. <https://doi.org/10.1007/s12551-025-01336-4>
32. Vyshedskiy A, Allana T, Lin J-W (2000) Analysis of Presynaptic Ca^{2+} Influx and Transmitter Release Kinetics during Facilitation at the Inhibitor of the Crayfish Neuromuscular Junction. J Neurosci 20: 6326–6332. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.20-17-06326.2000>
33. Vyshedskiy A, Lin JW (2000) Presynaptic Ca^{2+} influx at the inhibitor of the crayfish neuromuscular junction: a photometric study at a high time resolution. J Neurophysiol 83: 552–562. <https://doi.org/10.1152/jn.2000.83.1.552>
34. Borst JGG, Sakmann B (1998) Calcium current during a single action potential in a large presynaptic terminal of the rat brainstem. J Physiol 506: 143–157. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.1998.143bx.x>
35. Peng Y, Zucker RS (1993) Release of LHRH is linearly related to the time integral of presynaptic Ca^{+} elevation above a threshold level in bullfrog sympathetic ganglia. Neuron 10: 465–473. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(93\)90334-N](https://doi.org/10.1016/0896-6273(93)90334-N)

36. *Wu LG, Betz WJ* (1996) Nerve activity but not intracellular calcium determines the time course of endocytosis at the frog neuromuscular junction. *Neuron* 17: 769–779.
[https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(00\)80208-1](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(00)80208-1)
37. *Samigullin DV, Khaziev EF, Zhilyakov NV, Bukharaeva EA, Nikolsky EE* (2017) Loading a Calcium Dye into Frog Nerve Endings Through the Nerve Stump: Calcium Transient Registration in the Frog Neuromuscular Junction. *J Vis Exp* (125): 55122.
<https://doi.org/10.3791/55122>
38. *Fill M, Copello JA* (2002) Ryanodine receptor calcium release channels. *Physiol Rev* 82: 893–922.
<https://doi.org/10.1152/physrev.00013.2002>
39. *De Smet P, Parys JB, Callewaert G, Weidema AF, Hill E, De Smedt H, Erneux C, Sorrentino V, Missiaen L* (1999) Xestospongins are equally potent inhibitors of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor and the endoplasmic-reticulum Ca^{2+} pumps. *Cell Calcium* 26: 9–13.
<https://doi.org/10.1054/CECA.1999.0047>
40. *Castonguay A, Robitaille R* (2002) Xestospongins are potent inhibitors of SERCA at a vertebrate synapse. *Cell Calcium* 32: 39–47.
[https://doi.org/10.1016/s0143-4160\(02\)00093-3](https://doi.org/10.1016/s0143-4160(02)00093-3)
41. *Kubota M, Narita K, Murayama T, Suzuki S, Soga S, Usukura J, Ogawa Y, Kuba K* (2005) Type-3 ryanodine receptor involved in Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release and transmitter exocytosis at frog motor nerve terminals. *Cell Calcium* 38: 557–567.
<https://doi.org/10.1016/j.ceca.2005.07.008>
42. *Suzuki S, Osanai M, Mitsumoto N, Akita T, Narita K, Kijima H, Kuba K* (2002) Ca^{2+} -Dependent Ca^{2+} Clearance Via Mitochondrial Uptake and Plasmalemmal Extrusion in Frog Motor Nerve Terminals. *J Neurophysiol* 87: 1816–1823.
<https://doi.org/10.1152/jn.00456.2001>
43. *Soga-Sakakibara S, Kubota M, Suzuki S, Akita T, Narita K, Kuba K* (2010) Calcium dependence of the priming, activation and inactivation of ryanodine receptors in frog motor nerve terminals. *Eur J Neurosci* 32: 948–962.
<https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2010.07381.x>
44. *Sinha SR, Wu L-G, Saggau P* (1997) Presynaptic Calcium Dynamics and Transmitter Release Evoked by Single Action Potentials at Mammalian Central Synapses. *Biophys J* 72: 637–651.
[https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(97\)78702-2](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(97)78702-2)
45. *Sala F, Hernández-Cruz A* (1990) Calcium diffusion modeling in a spherical neuron. Relevance of buffering properties. *Biophys J* 57: 313–324.
[https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(90\)82533-9](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(90)82533-9)
46. *Lin J-W, Fu Q, Allana T* (2005) Probing the endogenous Ca^{2+} buffers at the presynaptic terminals of the crayfish neuromuscular junction. *J Neurophysiol* 94: 377–386.
<https://doi.org/10.1152/jn.00617.2004>
47. *Neher E* (1998) Usefulness and limitations of linear approximations to the understanding of Ca^{++} signals. *Cell Calcium* 24: 345–357.
[https://doi.org/10.1016/S0143-4160\(98\)90058-6](https://doi.org/10.1016/S0143-4160(98)90058-6)
48. *Narita K, Akita T, Osanai M, Shirasaki T, Kijima H, Kuba K* (1998) A Ca^{2+} -induced Ca^{2+} Release Mechanism Involved in Asynchronous Exocytosis at Frog Motor Nerve Terminals. *J Gen Physiol* 112: 593–609.
<https://doi.org/10.1085/JGP.112.5.593>
49. *Castonguay A, Robitaille R* (2001) Differential regulation of transmitter release by presynaptic and glial Ca^{2+} internal stores at the neuromuscular synapse. *J Neurosci* 21: 1911–1922.
<https://doi.org/10.1523/jneurosci.21-06-01911.2001>
50. *Bennett MR, Farnell L, Gibson WG, Dickens P* (2007) Mechanisms of calcium sequestration during facilitation at active zones of an amphibian neuromuscular junction. *J Theor Biol* 247: 230–241.
<https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2007.03.022>
51. *John LM, Lechleiter JD, Camacho P* (1998) Differential Modulation of SERCA2 Isoforms by Calreticulin. *J Cell Biol* 142: 963.
<https://doi.org/10.1083/JCB.142.4.963>
52. *He XP, Yang F, Xie ZP, Lu B* (2000) Intracellular Ca^{2+} and Ca^{2+} /Calmodulin-Dependent Kinase II Mediate Acute Potentiation of Neurotransmitter Release by Neurotrophin-3. *J Cell Biol* 149: 783.
<https://doi.org/10.1083/JCB.149.4.783>

Regulation of Intracellular Calcium during High-Frequency Rhythmic Stimulation of the Motor Nerve Ending of a Frog

D. V. Samigullin^{a, b, *}, N. F. Fatikhov^a, E. F. Khaziev^a, and E. A. Bukharaeva^a

^a*Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics, FRC Kazan Scientific Center,
Russian Academy of Sciences, Kazan, Russia*

^b*Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education "Kazan National Research
Technical University named after A.N. Tupolev – KAI", Kazan, Russia*

*e-mail: samid75@mail.ru

Under physiological conditions, chemical synapses, including neuromuscular junctions, operate rhythmically at different frequencies depending on the functional type of muscle and the state of synaptic contact. Calcium ions (Ca^{2+}) entering the axoplasm through voltage-gated Ca^{2+} channels during each action potential activate exocytosis of synaptic vesicles and play a key role in modulating the secretory process. The endoplasmic reticulum (ER), which can release Ca^{2+} ions via Ca^{2+} -dependent release, may contribute significantly to intracellular Ca^{2+} dynamics. Optical recording techniques using Ca^{2+} -sensitive fluorescent dyes are used to monitor changes in intracellular Ca^{2+} . However, such an evaluation must pay special attention to the dye's binding characteristics with Ca^{2+} ions, specifically its affinity, because the degree of dye saturation affects the parameters of the Ca^{2+} response being investigated. In this study, the low-affinity dye Magnesium Green was used to analyze changes in the intracellular Ca^{2+} ions concentration in the neuromuscular synapse *m. cutaneus pectoris* of the frog during rhythmic stimulation, which allows correct assessment of Ca^{2+} signals. With increasing frequency of motor nerve stimulation, the smooth increase at 20 Hz of Ca^{2+} response was replaced by a biphasic increase at 50 Hz and a sharp increase at 70 Hz. This indicates the inclusion of additional Ca^{2+} sources, which may be the ER. Blocking ryanodine and inositol receptors abolished the increase in Ca^{2+} response at higher frequencies of nerve stimulation. Blocking Ca^{2+} ATPases ER (SERCA) resulted in a dramatic increase in the Ca^{2+} response and eliminated its multiphasic character. It is shown that the change in Ca^{2+} transient reflects the accumulation of intracellular Ca^{2+} in the axoplasm and depends on the activity of SERCA, ryanodine and inositol receptors. The use of a low affinity fluorescent Ca^{2+} dye makes it possible to track the contribution of these systems to the formation of the intracellular concentration of the main ions that determine the process of neurosecretion.

Keywords: calcium ions, neuromuscular junction, ryanodine receptors, inositol receptors, calcium ATPases