

*На правах рукописи*

**Хузахметова Венера Фаритовна**

**РОЛЬ ПРЕСИНАПТИЧЕСКИХ РИАНОДИНОВЫХ РЕЦЕПТОРОВ В  
РЕГУЛЯЦИИ КИНЕТИКИ СЕКРЕЦИИ КВАНТОВ АЦЕТИЛХОЛИНА В  
НЕРВНО-МЫШЕЧНЫХ СИНАПСАХ НА РАЗНЫХ СТАДИЯХ  
ПОСТНАТАЛЬНОГО ОНТОГЕНЕЗА**

Специальность 03.03.01 – физиология

Автореферат  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Казань 2014

Работа выполнена в лаборатории биофизики синаптических процессов Федерального государственного бюджетного учреждения науки Казанского института биохимии и биофизики Казанского научного центра Российской Академии наук (КИББ КазНЦ РАН).

**Научный руководитель:**

**Бухараева Элля Ахметовна**

доктор биологических наук, профессор

**Официальные оппоненты:**

**Балезина Ольга Петровна**

доктор биологических наук, профессор кафедры физиологии человека и животных биологического факультета ФГОУ ВПО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова»

**Кривой Игорь Ильич**

доктор биологических наук, профессор кафедры общей физиологии биологического факультета ФГБОУ ВПО «Санкт-Петербургский государственный университет»

**Ведущее научное учреждение:**

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, г. Санкт-Петербург.

Защита состоится «\_\_» 201 г. в \_\_\_ часов на заседании диссертационного совета Д 212.081.28 при ФГАОУ ВПО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» по адресу: 420008, г. Казань, ул. Левобулачная, д. 44.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке им. Н. И. Лобачевского при ФГАОУ ВПО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» по адресу: 420008, г. Казань, ул. Кремлевская, д. 35.

Электронная версия автореферата размещена на официальном сайте ФГАОУ ВПО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» [www.ksu.ru](http://www.ksu.ru)

Автореферат разослан «\_\_» \_\_\_\_\_ 201 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,  
доктор медицинских наук,  
профессор



Зефилов Т.Л.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### *Актуальность исследования*

Передача возбуждения с одной клетки на другую в синаптических контактах химического типа лежит в основе функционирования как центральной, так и периферической нервной системы, обеспечивая реализацию практически всех жизненно важных процессов - от управления работой внутренних органов и двигательной системой до формирования памяти и обучения. На пресинаптическом уровне главными факторами, обеспечивающими надежную передачу сигнала, являются среднее число квантов нейромедиатора, освобождаемых в ответ на нервный стимул (Zucker, Regehr, 2002), и размер кванта - содержание нейромедиатора в одном кванте (Van der Kloot, 1991). В последние годы обсуждается участие еще одного, ранее не рассматриваемого механизма пресинаптической модуляции процесса передачи возбуждения, связанного с изменением временного хода (кинетики) секреции выделения квантов нейромедиатора (Barrett, Stevens, 1972; Bukharaeva et al., 1999; 2002; Nikolsky et al., 2004). Кванты, формирующие фазный ответ на нервный импульс, освобождаются не одновременно, а с достаточно выраженными флуктуациями моментов их выделения (Katz, Miledi, 1965). Несинхронность выделения квантов вносит вклад в затягивание амплитудно-временных параметров многоквантового постсинаптического ответа и снижение его амплитуды (Van der Kloot, 1988; Зефирова, Гафурова, 1997). После окончания пресинаптического потенциала действия, особенно в режиме ритмической стимуляции, наблюдается задержанное асинхронное освобождение, отличающееся по своим параметрам от спонтанного выделения квантов, наблюдаемого в отсутствии нервного импульса (Rahamimoff, Yaari, 1973; Goda, Stevens, 1994; Atluri, Regehr, 1998). Однако его роль в процессе синаптической передачи практически не изучена. Наличие квантов медиатора, выделяющихся в различные временные интервалы после развития пресинаптического потенциала действия, позволяет говорить об интегральной характеристике процесса вызванного освобождения квантов – интенсивности квантовой секреции, которая определяется как число квантов, выделившихся в определенный временной интервал. Анализ интенсивности фазного и задержанного асинхронного освобождения при различных состояниях синапса позволит выявить особенности механизмов модуляции процесса нейросекреции.

Известно, что число выделяющихся квантов медиатора экспоненциально зависит от количества ионов кальция, входящих в нервное окончание через потенциал-управляемые кальциевые каналы (Katz, 1969; Neher, Sakaba, 2008). Временные параметры вызванной секреции также определяются концентрацией внеклеточного кальция, но эта зависимость имеет иной характер и не известны механизмы ее реализации (Benoit, Mambrini, 1970; Augustine et al., 1991; Bukharaeva et al., 2007). В модуляции секреторного процесса может принимать участие также и кальций, который освобождается из внутриклеточных кальциевых депо при участии рианодиновых и инозитол-3-фосфатных рецепторов (Nishimura et al., 1990; Narita et al., 1998; Балезина 2002; Bouchard et al., 2003; Smith et al., 2012). Пресинаптические рианодиновые рецепторы в последние годы стали объектом более пристального изучения вследствие выявления их вклада в нарушения кальциевого метаболизма на ранних этапах развития болезни Альцгеймера (см. обзор Porugayeva, Bezprozvanny, 2013), а блокаторы этих рецепторов рассматриваются как потенциальные лекарственные средства для ее лечения (Inan, Wei, 2010; Peng et al., 2012).

Однако вопрос о том, какую роль играют рианодиновые рецепторы нервного окончания в модуляции временных параметров секреции, остается открытым. Особый интерес при этом представляет режим ритмической активности синапса, способствующий накоплению внутриклеточного кальция и характерный для работы синапса в условиях *in vivo*. Классическим в нейрофизиологических исследованиях объектом являются нервно-мышечные соединения мышей и крыс, поскольку в них в условиях экстраклеточного микроэлектродного отведения можно анализировать как моменты выделения отдельных квантов, формирующих фазное освобождение квантов ацетилхолина, так и оценивать интенсивность задержанного асинхронного выделения квантов нейромедиатора при различных режимах ритмической стимуляции двигательного нерва. Кроме того, используя эти объекты, можно сопоставлять параметры нейросекреторного процесса при различных воздействиях у животных, находящихся на разных стадиях постнатального онтогенеза.

### ***Цель и задачи исследования***

Целью исследования является изучение роли пресинаптических рианодиновых рецепторов в регуляции интенсивности синхронного и асинхронного освобождения квантов ацетилхолина при разных режимах стимуляции двигательного нерва в нервно-мышечных синапсах мышей и крыс, находящихся на разных стадиях постнатального онтогенеза.

*В соответствии с целью были поставлены следующие задачи:*

1. Сопоставить интенсивность фазного и задержанного асинхронного освобождения ацетилхолина при разных режимах стимуляции двигательного нерва в синапсах мышей и крыс, находящихся на разных стадиях постнатального онтогенеза.
2. Оценить с помощью кальций-чувствительного красителя изменение внутриклеточного содержания свободных ионов кальция при блокировании рианодиновых рецепторов в условиях ритмической стимуляции двигательного нерва.
3. Исследовать влияние блокирования рианодиновых рецепторов на интенсивность фазного и задержанного асинхронного освобождения ацетилхолина при разных режимах стимуляции двигательного нерва в синапсах взрослых и новорожденных животных.
4. Изучить роль потенциал-зависимых кальциевых каналов L-типа в регуляции интенсивности фазного и асинхронного освобождения квантов ацетилхолина в условиях ритмической стимуляции двигательного нерва в синапсах животных, находящихся на разных стадиях постнатального онтогенеза.
5. Сопоставить вклад рианодиновых рецепторов и потенциал-зависимых кальциевых каналов L-типа в регуляцию фазного и задержанного освобождения квантов ацетилхолина при разных режимах стимуляции двигательного нерва в синапсах животных, находящихся на разных стадиях постнатального онтогенеза.

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

1. В нервно-мышечных синапсах взрослых мышей и крыс блокирование рианодиновых рецепторов при ритмической стимуляции двигательного нерва приводит к уменьшению внутриклеточного содержания ионов кальция в нервном окончании, повышению синхронности выделения квантов ацетилхолина и уменьшению интенсивности задержанного асинхронного освобождения.

2. Высокая степень асинхронности в синапсах новорожденных животных, в отличие от синапсов взрослых, не связана с активацией пресинаптических рианодиновых рецепторов при ритмической стимуляции двигательного нерва и модулируется при участии потенциал-зависимых кальциевых каналов L-типа.

### ***Научная новизна работы***

Впервые проведен анализ изменения внутриклеточного содержания ионов кальция в аксоплазме двигательного нервного окончания крысы и мыши и временных параметров вызванной секреции квантов ацетилхолина при блокировании рианодиновых рецепторов. Установлено, что блокатор рианодиновых рецепторов снижает интенсивность свечения специфического кальций-чувствительного красителя Fluo-3 AM в аксоплазме, повышающееся при ритмической стимуляции двигательного нерва. Впервые показано, что в синапсах взрослых мышей и крыс блокирование рианодиновых рецепторов блокаторами (рианодином, ТМВ-8, дантроленом) вызывает снижение количества квантов, выделяющихся в ответ на нервный импульс, которое в большей степени проявляется для задержанного асинхронного освобождения квантов. Впервые сопоставлен вклад в регуляцию кинетики вызванной секреции квантов медиатора потенциал-зависимых кальциевых каналов L-типа и рианодиновых рецепторов в синапсах взрослых и новорожденных животных. Установлено, что повышенный уровень асинхронности, наблюдаемый в нервно-мышечных синапсах на ранних стадиях постнатального онтогенеза, не связан с изменением работы пресинаптических рианодиновых рецепторов, а в отличие от синапсов взрослых животных, модулируется при участии потенциал-зависимых кальциевых каналов L-типа.

### ***Научно-практическая значимость работы***

Основное значение результатов проведенных исследований состоит в получении новых данных об особенностях регуляции временных параметров нейросекреции в нервно-мышечных соединениях мышей и крыс – объектах, наиболее часто используемых для самых разнообразных нейрофизиологических исследований. Выявленное повышение синхронности секреции при блокировании рианодиновых рецепторов, которое может частично компенсировать наблюдаемое снижение количества освобождаемых квантов медиатора, важно учитывать при анализе состояния синаптической передачи при ритмической стимуляции, когда вклад рианодиновых рецепторов наиболее выражен. Учитывая, что некоторые из исследованных блокаторов рианодиновых рецепторов, в частности, дантролен, уже используется в клинической практике при лечении злокачественной гипертермии и нейролептического синдрома (Inan, Wei, 2010), а также рассматривается как один из возможных лекарственных препаратов для лечения болезни Альцгеймера на ранних стадиях (Peng et al., 2012), необходимо принимать во внимание выявленные эффекты блокаторов на процессы секреции медиатора. Полученные данные о вкладе рианодиновых рецепторов в регуляцию интенсивности синхронного и асинхронного выделения квантов важны для понимания механизмов модуляции синаптической передачи и разработки способов преодоления последствий развития патологий, связанных с синаптическими дефектами, в частности с эффектами повышенного внутриклеточного содержания ионов кальция.

### ***Личный вклад диссертанта в исследования***

Приведенные в работе данные получены при личном участии соискателя на всех этапах работы, включая составление плана исследования, проведение экспериментов, обработку полученных данных и оформление публикаций.

### ***Достоверность полученных данных***

Достоверность полученных данных основана на большом объеме результатов экспериментальных исследований с использованием адекватных методических подходов и статистической обработки полученных результатов.

### ***Апробация работы***

Материалы работы представлены на Международных научных конференциях студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов» (Москва, 2010, 2011, 2012 гг); Международном междисциплинарном конгрессе «Нейронаука для медицины и психологии» (Судак, Украина, 2011); Всероссийской с международным участием школе-конференции «Физиологические механизмы адаптации растущего организма» (Казань, 2012); Международной школе-конференции молодых ученых «Биология - наука XXI века» (Пушино, 2012); Международной конференции «Рецепция и внутриклеточная сигнализация» (Пушино, 2011, 2013 гг).

Работа выполнена при поддержке грантами РФФИ № 12-04-01127, «Ведущая научная школа» НШ-2669.2012.7 и Программы №7 Президиума РАН.

### ***Реализация результатов исследования***

По теме диссертации опубликовано 20 печатных работ, в том числе 5 статей в рецензируемых журналах (из списка ВАК).

### ***Структура и объём диссертации***

Диссертация изложена на 146 страницах, состоит из введения, обзора литературы, описания методики исследования, результатов исследования и их обсуждения, выводов, списка литературы, иллюстрирована 48 рисунками и 1 таблицей. Список цитируемой литературы содержит 255 источников, из них 238 иностранных авторов.

## **ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

**Объекты.** Эксперименты выполнялись на изолированных нервно-мышечных препаратах диафрагмальной мышцы лабораторных животных: мышей (взрослых особях обоего пола, весом 20-25 г) и крыс трех возрастов (на 6-ой (П6), 10-ый (П10) постнатальный день и взрослых особях, весом 150-250 г). Приготовление изолированных нервно-мышечных препаратов производили согласно этическим требованиям с использованием эфирного наркоза.

Выделенную мышцу с фрагментом нерва закрепляли на подложке из смолы Sylgard в экспериментальной ванночке (объем 5 мл), через которую протекал физиологический раствор со скоростью 5 мл/мин следующего состава: (ммоль/л): NaCl - 120.0; KCl - 5; MgCl<sub>2</sub> - 5.0; CaCl<sub>2</sub> - 0.4-0.5; Нерес - 5.0; глюкоза - 11.0. pH растворов поддерживали на уровне 7.2 - 7.4. Эксперименты проводили при температуре 20.0±0.3°C, стабилизацию которой

осуществляли при помощи встроенных в дно ванночки элементов Пельтье.

В экспериментах были использованы вещества (все фирмы Sigma): рианодин, ТМВ-8 (8-N,N-диэтиламино-октил-3,4,5-триметоксибензоат HCl), дантролен, нитрендипин, диметилсульфоксид (ДМСО). Поскольку некоторые вещества растворялись в ДМСО, конечная концентрация которого в растворе не превышала 0.1%, то предварительно были проведены эксперименты по анализу эффектов растворителя на исследуемые процессы.

**Одновременная регистрация токов действия нервного окончания и токов концевой пластинки (ТКП)** осуществлялась с помощью микроэлектрода, заполненного физиологическим раствором, с оплавленным кончиком диаметром 2.5-3.5 мкм, (сопротивление 2.0-4.0 МОм). Для визуализации синаптической области использовали микроскоп Olympus BW-51, оснащенный водноимерсионным объективом LUMPPlan FI 40x фирмы Olympus. Стимуляцию двигательного нерва осуществляли с помощью «всасывающего» электрода прямоугольными электрическими импульсами длительностью 0.1 мс супрамаксимальной величины с частотой 0.5, 4, 10, 15 имп/с. Зарегистрированные сигналы после фильтрации до 10 кГц усиливали и подавали на вход 16-разрядного аналого-цифрового преобразователя, квантуя с интервалом 3-5 мкс. Анализ параметров вызванных сигналов в «окне» регистрации длительностью 50 мс осуществляли с помощью персонального компьютера и созданной в нашей лаборатории программы.

**Анализ квантового состава токов концевой пластинки.** Средний квантовый состав ( $m$ ) определяли, используя прямой метод оценки количества выделившихся квантов или метод «выпадений» (Martin, 1955), согласно формуле:  $m = \ln N/n_0$ , где  $N$  - общее число импульсов,  $n_0$  - число падений. Количество зарегистрированных одноквантовых ответов в каждом опыте варьировало в пределах 250-350.

**Оценка параметров временного хода вызванной секреции квантов медиатора.** Величину истинной синаптической задержки определяли как временной интервал от пика натриевой компоненты тока нервного окончания до начала ТКП на уровне 20% от максимального значения его амплитуды. Для анализа временного хода квантовой секреции медиатора строили гистограммы и кумулятивные кривые распределения истинных синаптических задержек одноквантовых ТКП. Для оценки минимальной синаптической задержки зарегистрированные синаптические задержки ранжировали по возрастанию и усредняли первые 5% значений от общего количества сигналов в контрольных условиях или после подачи вещества. Для оценки интенсивности синхронного и асинхронного компонентов процесса выделения квантов подсчитывали количество ответов, синаптические задержки которых укладывались во временные интервалы, соответствующие спаду экспонент, аппроксимирующих гистограммы синаптических задержек (Bukharaeva et al., 2007; Васин и др., 2010). Для того чтобы количество зарегистрированных ТКП не зависело от интенсивности секреции при разных режимах, число накопленных ТКП нормировали на одинаковое количество стимуляций.

**Анализ внутриклеточного содержания ионов кальция<sup>1</sup>.** Для оценки изменений внутриклеточного содержания  $Ca^{2+}$  при блокировании рианодиновых рецепторов с помощью специфического кальций-чувствительного красителя использовали нервно-мышечный

---

<sup>1</sup> Эта серия экспериментов выполнена совместно с кбн Самигуллиным Д.В.

препарат *levator auris longus* мыши. Препарат инкубировали в течение 60 мин при температуре 15°C в растворе, содержащем 20 мкМ кальциевого красителя Fluo-3 AM, и 0.02% плюрониловой кислоты, затем отмывали физиологическим раствором в течение 20 мин. Изменения интенсивности флуоресцентного сигнала регистрировали при помощи конфокального лазерного сканирующего микроскопа Leica TCS SP 5 и водноиммерсионного объектива HCX APOl 20x/1.0 W (1.00 NA). Для возбуждения красителя применяли аргоновый лазер с длиной волны 488 нм. Кальциевый ответ измеряли в ответ на раздражение нерва при стимуляции с частотой 10 и 20 имп/с в течение 35 с. Измеряли максимальную амплитуду плато флуоресцентного ответа. Изменение интенсивности флуоресценции оценивали как  $\Delta F/F_0 = (F - F_0)/F_0$ , где  $F$  – интенсивность флуоресценции во время стимуляции,  $F_0$  – интенсивность флуоресценции в покое.

**Иммуногистохимический анализ<sup>2</sup>** морфологических особенностей строения синапсов новорожденных и взрослых крыс осуществляли, используя первичные моноклональные антитела к синаптофизину в фосфатном буфере, содержащем 1% BSA, 0.5% Triton X-100 при 4°C. После этого их отмывали 30 мин в фосфатном буфере и инкубировали 1 час с вторичными антителами, конъюгированными с флуорохромом Alexa350, с последующей отмывкой 30 мин в фосфатном буфере. Последующая инкубация 30 мин с альфа-бунгаротоксином, связанным с тетраметилродамином (TMR), была проведена для локализации ацетилхолиновых рецепторов. Измерения проводили на лазерном сканирующем конфокальном микроскопе Leica TCS SP5 MP с маслоиммерсионным объективом х63. Концевые пластинки идентифицировали по связыванию флуоресцентного альфа-бунгаротоксина с ацетилхолиновыми рецепторами. Для получения изображения использовали лазер с длинами волн 350 нм для Alexa350 и 557 нм для TMR. Полученные изображения обрабатывали в программе ImageJ (NIH, USA), оценивали площади терминалей (оптический срез плоскостного конфокального изображения), окрашенных на синаптофизин. Для выявления экспрессии дигидропиридин-чувствительных кальциевых каналов L-типа использовали специфические поликлональные антитела к альфа 1С-субъединице каналов Ca<sub>v</sub>1.2 (L-тип) (Hell et al., 1993).

**Статистическая обработка результатов** проводилась с использованием программы Microcal Origin 7.5. Использовали стандартные методы определения средних величин, стандартных ошибок, а также параметрический t-критерий Стьюдента для попарно связанных вариантов (Бронштейн, Семендяев, 1986; Гланц, 1999) на уровне значимости 0.05.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

### **1. Синхронное и асинхронное освобождение квантов ацетилхолина при ритмической стимуляции двигательного нерва в синапсах взрослых животных**

В ответ на стимуляцию двигательного нерва после развития тока действия нервного окончания в синапсах мыши и крысы наблюдались одноквантовые ТКП, время возникновения которых существенно варьировало (Рис. 1 А, Б). Гистограммы распределения

---

<sup>2</sup> Эта серия экспериментов выполнена совместно с кбн Нуруллиным Л.Ф.



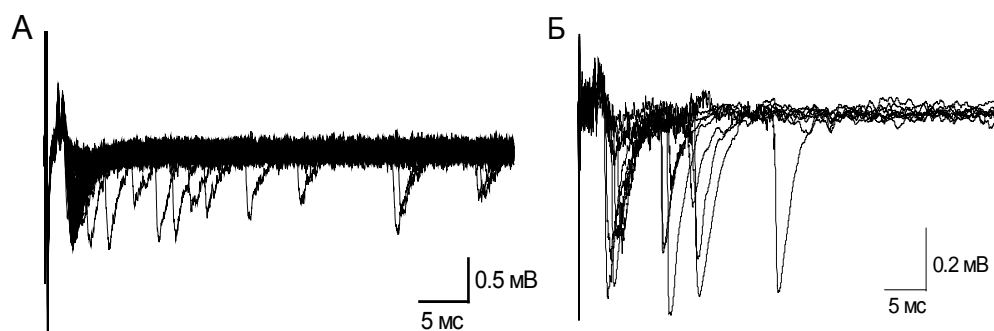


Рис. 1. Одноквантовые токи концевой пластинки с варьирующими синаптическими задержками, зарегистрированные экстраклеточно на протяжении 50 мс в отдельном участке синаптического контакта мышцы (А) и крысы (Б) при частоте 0.5 имп/с

синаптических задержек аппроксимировали тремя экспонентами. В синапсах мышцы первая экспонента заканчивалась в интервале до 3 мс, в котором выделилось  $78.6 \pm 1.5\%$  квантов ( $n=32$ ) от общего количества зарегистрированных ТКП, что представляло ранний период фазного синхронного освобождения квантов. Вторая экспонента заканчивалась в интервале от 3 до 8 мс, при этом выделялось  $4.2 \pm 0.3\%$  квантов ( $n=32$ ), которые можно отнести к позднему периоду синхронного выделения квантов ацетилхолина. В интервале от 8 до 50 мс выделялись оставшиеся  $17.2 \pm 1.3\%$  квантов ( $n=32$ ), формирующие третью экспоненту и представляющие задержанное асинхронное освобождение квантов (Рис. 2 А). Аналогичная картина наблюдалась в синапсах крысы. В ранний период секреции выделилось  $78.1 \pm 4.5\%$  квантов, в поздний период –  $4.1 \pm 0.8\%$  квантов ( $n=24$ ). В фазу задержанного асинхронного освобождения секретировалось  $17.4 \pm 3.8\%$  кванта ( $n=24$ ). Таким образом, анализ кинетики выделения квантов показал, что даже при редкой частоте стимуляции двигательного нерва, когда отсутствует явление облегчения связанное с накоплением «остаточного» кальция (Kamiya, Zucker, 1994), в синапсах мышечных и крысы процесс выделения квантов неоднороден и состоит из раннего и позднего периода синхронного фазного освобождения и задержанного асинхронного освобождения. Поскольку ранее считалось, что возникновение задержанного асинхронного освобождения обусловлено возрастанием внутриклеточной концентрации ионов кальция, накапливающихся после развития пресинаптического потенциала действия при ритмической стимуляции (Rahamimoff, Yaari, 1973; Hagler, Goda, 2001; Otsu et al., 2004), то для анализа соотношения фазного и задержанного асинхронного освобождения были проведены исследования при ритмической стимуляции двигательного нерва с частотами 4, 10 и 15 имп/с. Повышение частоты стимуляции приводило к достоверному возрастанию количества квантов медиатора, освобождающихся во все три периода секреции (Рис. 2 Б). При этом наблюдалось изменение доли квантов, выделившихся в составе синхронной и асинхронной фаз секреции (Рис. 3.). Число ответов, составляющих раннюю синхронную фазу секреции при частоте стимуляции 15 имп/с уменьшилось до  $75.0 \pm 1.7\%$  (у крысы до  $74.5 \pm 5.6\%$ ,  $n=24$ ), поздняя синхронная фаза выросла до  $5.0 \pm 0.7\%$  (у крысы до  $4.7 \pm 1.0\%$ ,  $n=24$ ), а задержанное асинхронное достоверно увеличилось до  $20.0 \pm 1.4\%$  ( $n=32$ ,  $p < 0.05$ ), а у крысы - до  $20.8 \pm 4.7\%$  ( $n=24$ ).

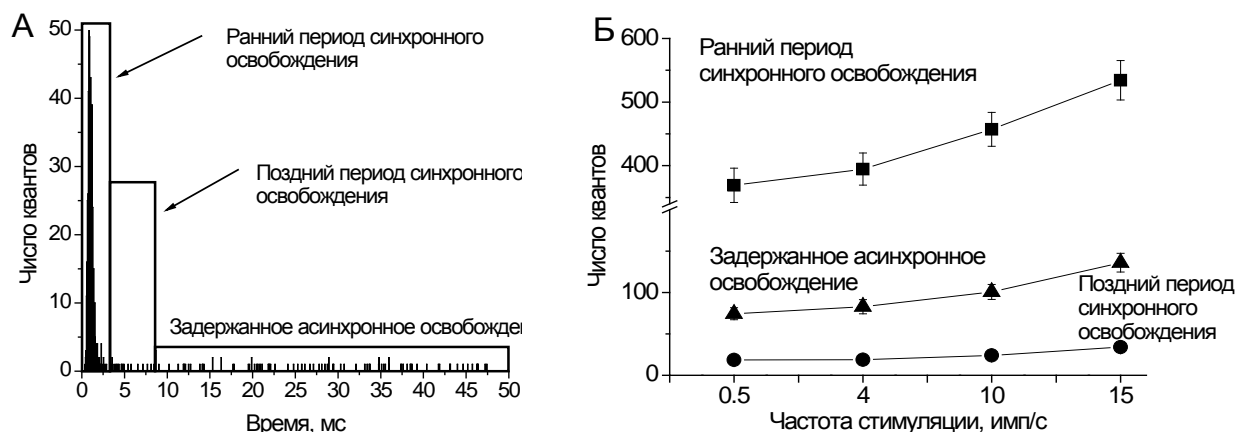


Рис. 2. А – Гистограмма распределения синаптических задержек ТКП в синапсе мышцы (в отдельном эксперименте). Б – Изменение интенсивности синхронного и асинхронного освобождения при ритмической стимуляции

Таким образом, при повышении частоты стимуляции двигательного нерва в синапсах взрослых животных число квантов, относящихся к задержанному асинхронному

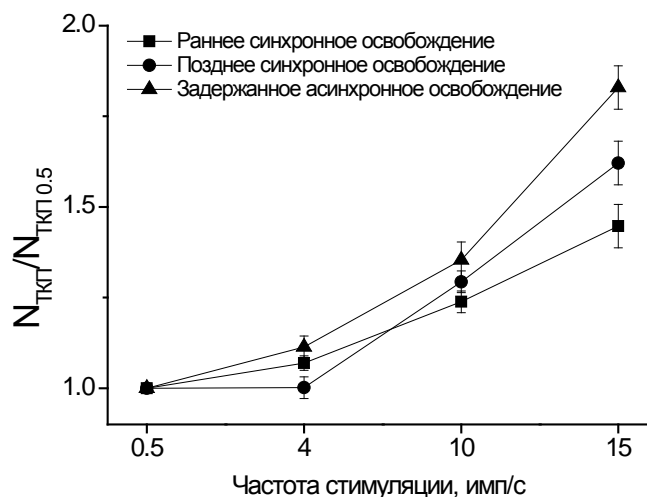


Рис. 3. Увеличение интенсивности синхронного и асинхронного освобождения при повышении частоты стимуляции. По оси ординат - отношение числа квантов, освободившихся при частотах 4, 10 и 15 имп/с к числу квантов, выделившихся в разные фазы секреции при исходной частоте 0.5 имп/с

освобождению, возрастало в большей степени, чем число квантов, освободившихся в период фазной секреции, что свидетельствует о повышении несинхронности секреции.

## 2. Характеристика секреторного процесса в синапсах животных на разных стадиях постнатального онтогенеза

В процессе развития и, особенно в ранний постнатальный период, нервно-мышечные соединения подвергаются значительным изменениям (Ferraro et al., 2012; Punga, Ruegg, 2012). На синапсах центральной нервной системы показано, что на ранних этапах развития активность кальциевых буферных систем, в том числе и рианодин-чувствительных кальциевых депо, существенно отличается от свойств этих систем у взрослых животных (Chen, Regehr, 1999). В связи с этим была поставлена задача, выявить особенности синхронного и асинхронного освобождения квантов ацетилхолина у животных на ранних

стадиях постнатального онтогенеза и сравнить их с показателями в синапсах взрослых животных.

Эксперименты проводили на синапсах крыс на 6-ой (П6) и 10-ый (П10) день после рождения и сравнивали результаты, полученные на взрослых животных. Выбор 6-ти и 10-ти дневных животных был обусловлен тем, что на более ранних постнатальных сроках (3-5 дней) вследствие очень низкой вероятности секреции не удавалось накопить количество одноквантовых ТКП, достаточное для корректного анализа временных параметров секреции. В синапсах животных на более поздних сроках (13-17 дней) не наблюдалось достоверной разницы между величиной квантового состава по сравнению с взрослыми животными.

В синапсах П6 средний квантовый состав был равен  $0.24 \pm 0.03$  кванта ( $n=20$ ), у П10 -  $0.18 \pm 0.02$  кванта ( $n=22$ ), у взрослых квантовый состав был достоверно выше и составил  $0.37 \pm 0.04$  кванта ( $n=24$ ,  $p < 0.05$ ). Наряду с отличиями в квантовом составе в синапсах П6 и П10 наблюдалась высокая степень флуктуаций синаптических задержек одноквантовых ТКП, свидетельствующая о значительной асинхронности выделения медиатора (Рис. 4). При частоте стимуляции 0.5 имп/с в синапсах П6 количество квантов, освободившихся с задержками до 3 мс составляло только  $22.1 \pm 4.0\%$  ( $n=20$ ) от общего числа выделившихся квантов, тогда как в период позднего освобождения выделялось наибольшее количество квантов  $53.6 \pm 3.1\%$  ( $n=20$ ), остальные  $24.3 \pm 2.7\%$  ( $n=20$ ;  $p < 0.05$ ) квантов выделялось с задержками в интервале от 8 до 50 мс.

При повышении частоты стимуляции двигательного нерва у новорожденных наблюдалось увеличение асинхронности выделения квантов медиатора и перераспределение квантов, выделяющихся в разные временные интервалы (Рис. 4 и 5). В синапсах П6 при повышении частоты стимуляции уменьшалось число квантов, формирующих синхронное фазное освобождение (до  $8.0 \pm 2.1\%$  ( $n=20$ ) при 15 имп/с) и возрастала доля квантов, составляющих задержанное асинхронное освобождение ( $57.7 \pm 4.4\%$  ( $n=20$ ) при 15 имп/с). Аналогичный характер имели изменения временных параметров секреции в синапсах П10.

Секреторный аппарат в синапсах животных, находящихся на разных стадиях постнатального онтогенеза, по-разному реагировал на повышение частоты стимуляции двигательного нерва, демонстрируя отсутствие явления облегчения фазного освобождения и выраженную десинхронизацию секреции. Такое увеличение задержанного асинхронного освобождения квантов при повышении частоты стимуляции может быть обусловлено кальций-активируемым освобождением ионов кальция из депо гладкого эндоплазматического ретикулума при участии рианодиновых рецепторов (Kubota et al., 2005). Следовательно, можно ожидать, что блокада этих рецепторов приведет к снижению внутриклеточного содержания ионов кальция и уменьшению интенсивности задержанного асинхронного освобождения квантов ацетилхолина. Оценить изменение внутриклеточного содержания ионов кальция можно, используя анализ интенсивности флуоресцентного ответа специфического кальций-чувствительного красителя (Sabatini, Regehr, 1998; Самигуллин и др., 2010).

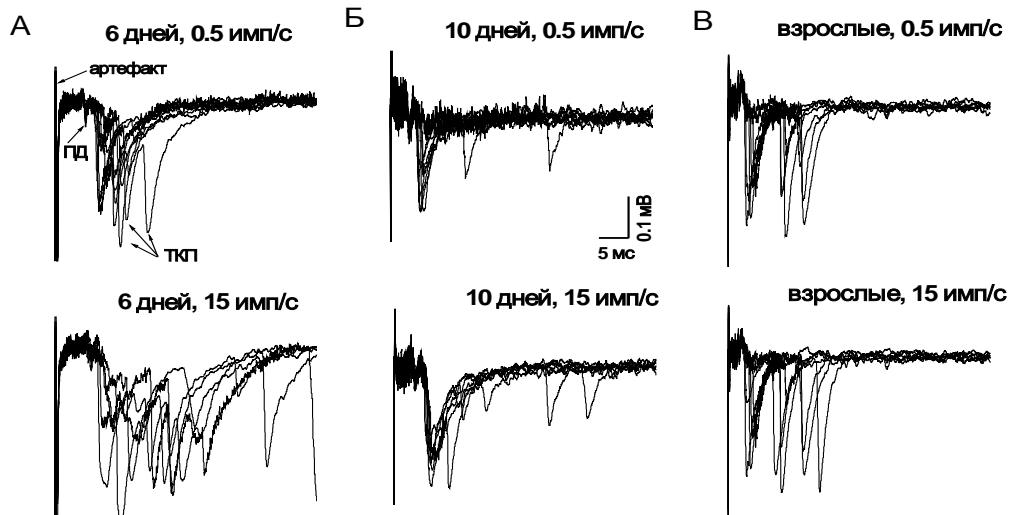


Рис. 4 Суперпозиция токов концевой пластинки, зарегистрированных в синапсах 6- (А), 10- (Б) дневных и взрослых (В) крыс при частоте стимуляции 0.5 и 15 имп/с

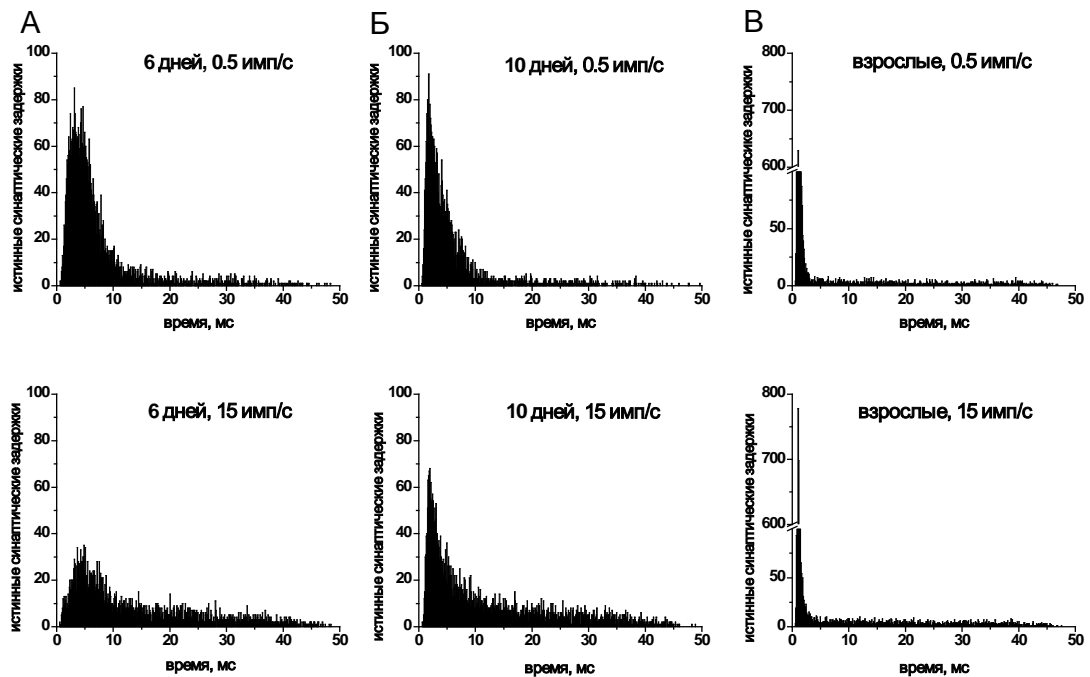


Рис. 5. Гистограммы распределения истинных синаптических задержек в синапсах 6- (А), 10- (Б) дневных и взрослых (В) крыс при частоте стимуляции 0.5 и 15 имп/с. Важно отметить, что ось ординат различна для новорожденных и взрослых животных

### 3. Анализ флуоресцентного кальциевого ответа при ритмической стимуляции в условиях блокады рианодиновых рецепторов

В ответ на стимуляцию двигательного нерва с частотой 10 имп/с в области двигательных нервных окончаний наблюдалось увеличение интенсивности флуоресценции

кальций-чувствительного красителя Fluo-3 AM - кальциевый ответ, обусловленный взаимодействием ионов кальция с красителем (Рис. 6).

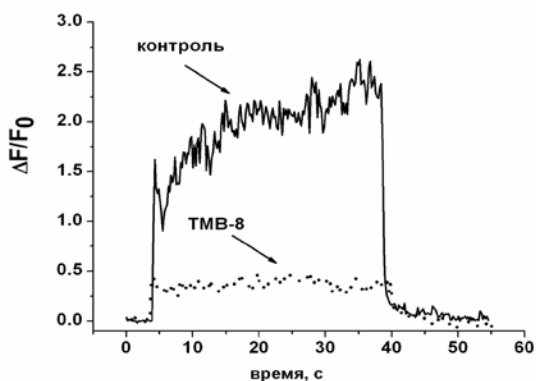


Рис. 6. Изменение интенсивности флуоресцентного сигнала  $\Delta F/F_0$ . Сплошная линия - характер флуоресцентного ответа в контроле при частоте стимуляции 10 имп/с, пунктирная линия - в присутствии TMB-8. По оси ординат - изменение интенсивности флуоресценции  $\Delta F/F_0$

Добавление в раствор блокатора рианодиновых рецепторов TMB-8 (25 мкМ) приводило к снижению амплитуды кальциевого ответа на  $69 \pm 9\%$  при частоте стимуляции 10 имп/с, соответственно (Рис. 6). Таким образом, рианодин-чувствительные кальциевые каналы принимают участие в поддержании внутриклеточного кальция в двигательном нервном окончании мышцы при ритмической стимуляции, и можно предположить, что их блокада будет влиять на интенсивность задержанного асинхронного освобождения квантов ацетилхолина.

#### 4. Оценка интенсивности синхронного и задержанного асинхронного освобождения квантов медиатора при блокаде рианодиновых рецепторов в синапсах взрослых животных

Рианодин в блокирующей рианодиновые рецепторы концентрации 3 мкМ (Xu et al., 1998) в синапсах мышцы вызвал снижение среднего квантового состава от  $0.57 \pm 0.05$  кванта в контроле до  $0.39 \pm 0.06$  кванта при редкой частоте стимуляции ( $n=8$ ;  $p<0.05$ ). Сравнение гистограмм синаптических задержек, и построенные на их основе кумулятивные кривые показали, что при добавлении рианодина происходило снижение интенсивности как фазного, так и задержанного освобождения и увеличение степени синхронности секреции квантов. Это проявлялось в сдвиге кумулятивных кривых в сторону меньших значений в присутствии рианодина, вследствие снижения числа квантов, имеющих задержки выше 8 мс. Анализ интенсивности секреции квантов, выделившихся в разные временные интервалы, показал, что рианодин изменял их соотношение (Рис. 7). В контроле число квантов, освобождаемых в синхронную фазу при частоте стимуляции 0.5 имп/с составило  $72.8 \pm 2.3\%$  от общего количества квантов, а в присутствии рианодина оно увеличилось до  $82.4 \pm 3.2\%$  ( $n=8$ ;  $p<0.05$ ). Число квантов, выделившихся в асинхронную фазу секреции в контроле составило  $21.6 \pm 1.7\%$ , а после действия рианодина снизилось до  $14.2 \pm 2.7\%$  ( $n=8$ ;  $p<0.05$ ) от общего количества квантов. Повышение частоты стимуляции в присутствии рианодина привело к более выраженному перераспределению числа ответов с маленькими и большими задержками в сторону синхронизации процесса секреции. При частоте стимуляции 15 имп/с число квантов, освобождаемых в синхронную фазу в контроле стало составлять  $69.0 \pm 3.9\%$  и  $77.0 \pm 5.1\%$  после действия рианодина ( $n=8$ ;  $p<0.05$ ). В асинхронную фазу секреции при этой частоте выделилось  $25.2 \pm 3.1\%$  квантов в контроле и  $17.9 \pm 5.1\%$  после действия рианодина

(n=8; p<0.05).

В синапсах крысы анализ степени дисперсии синаптических задержек, сравнение гистограмм синаптических задержек и кумулятивных кривых показали, что при добавлении рианодина, также как и у мышей, происходило снижение интенсивности как фазного, так и задержанного освобождения. Из 100% выделившихся квантов в контроле на синхронную фазу при частоте стимуляции 0.5 имп/с приходилось  $77.3 \pm 9.1\%$ , на асинхронную фазу –  $19.2 \pm 7.6\%$  (n=7). После добавления рианодина число квантов, освободившихся в период синхронного фазного освобождения составило  $85.0 \pm 6.7\%$  (n=7, p<0.05), а задержанного асинхронного –  $10.9 \pm 5.6\%$  (n=7, p<0.05). При повышении частоты до 15 имп/с в присутствии рианодина число квантов при фазном освобождении возросло до  $83.6 \pm 11.5\%$  (n=7, p<0.05), при задержанном асинхронном снизилось до  $12.0 \pm 8.8\%$  (n=7, p<0.05).

Блокатор TMB-8 в концентрации 25 мкМ (Singh et al., 1994), подобно рианодину, вызывал достоверное снижение квантового состава вызванных ответов. При частоте стимуляции 0.5 имп/с средний квантовый состав снизился от  $0.51 \pm 0.05$  кванта в контроле до  $0.33 \pm 0.02$  кванта при добавлении блокатора (n=7; p<0.05). При добавлении TMB-8 наблюдалось уменьшение общего количества выделившихся квантов, но при этом интенсивность асинхронного освобождения падала сильнее, чем синхронного за счет более выраженного снижения числа квантов с большими задержками (Рис. 7), вследствие чего секреция медиатора становилась более синхронной.

В синапсах крыс, несмотря на то, что при добавлении TMB-8 не происходило достоверного падения среднего квантового состава, наблюдалась выраженная тенденция к снижению общего количества выделившихся квантов в синхронной и асинхронной фазах секреции. При этом, как и в синапсах мыши, наблюдалось перераспределение выделившихся квантов в пользу снижения задержанного асинхронного освобождения и синхронизации процесса секреции.

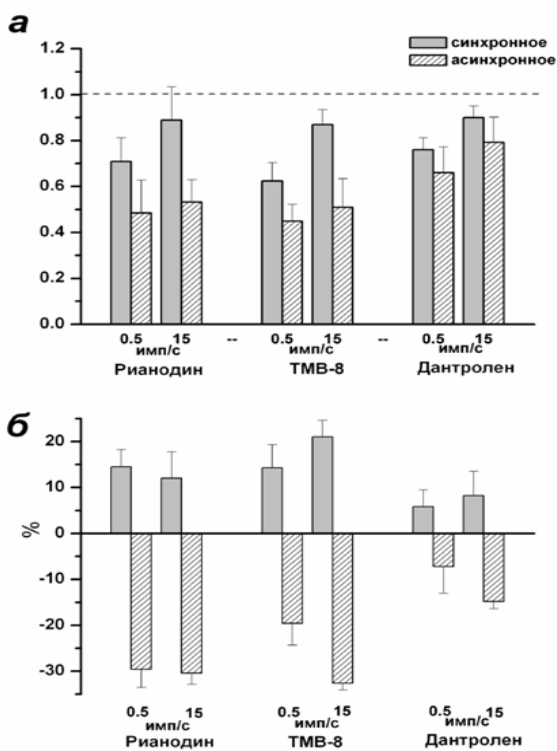


Рис. 7. Изменение количества квантов, освобождаемых в синхронную и асинхронную фазы секреции под действием блокаторов рианодиновых рецепторов

А – изменение числа квантов, выделившихся в синхронную и асинхронную фазы секреции в присутствии блокаторов рианодиновых рецепторов, относительно числа квантов, зарегистрированных в эти же временные интервалы в контроле при частоте стимуляции двигательного нерва 0.5 и 15 имп/с

Б – изменение доли квантов, выделившихся в синхронную и асинхронную фазы секреции в процентах от суммарного количества освобождаемых квантов в присутствии блокаторов рианодиновых рецепторов, относительно контрольных условий

*Дантролен* в концентрации 20 мкМ вызывал снижение среднего квантового состава при частоте стимуляции 0.5 имп/с от  $0.36 \pm 0.06$  кванта в контроле до  $0.27 \pm 0.04$  кванта в синапсах мыши, при этом наблюдалось уменьшение количества сигналов, имеющих большие синаптические задержки, вследствие чего секреция медиатора становилась более синхронной. Число квантов, освобождаемых в синхронную фазу секреции при частоте стимуляции 0.5 имп/с снизилось на  $23.5 \pm 2.0\%$  по отношению к контролю, в то время как в асинхронную фазу на  $33.4 \pm 3.6\%$  ( $n=6$ ;  $p<0.05$ ) (Рис. 7). При повышении частоты стимуляции до 15 имп/с в присутствии дантролена в большей степени снижалось число квантов, выделявшихся в асинхронную фазу секреции (Рис. 7).

Таким образом, блокирование рианодиновых рецепторов блокаторами разной природы: растительным алкалоидом рианодином, синтетическим эфиром триметоксибензойной кислоты (ТМВ-8), производным имидазолина (*дантролен*) наряду со снижением количества освобождающегося медиатора ацетилхолина вызывало в нервно-мышечных синапсах взрослых мыши и крысы изменение интенсивности фазного синхронного и задержанного асинхронного освобождения. При действии блокаторов рианодиновых рецепторов доля квантов, имеющих большие синаптические задержки, т.е. формирующих задержанное асинхронное освобождение, уменьшалась в большей степени, чем доля квантов, выделяющихся в период фазной синхронной секреции.

#### ***5. Влияние ингибирования рианодиновых рецепторов на кинетику секреции медиатора в синапсах новорожденных животных***

Повышенный уровень задержанного асинхронного освобождения в синапсах новорожденных животных и его возрастание при высокой частоте стимуляции двигательного нерва также может быть обусловлен работой рианодин-чувствительных внутриклеточных кальциевых депо, как было показано выше в синапсах взрослых мышей и крыс. Для выяснения роли рианодиновых рецепторов в регуляции синхронного и асинхронного освобождения были сопоставлены временные параметры секреции в синапсах взрослых и новорожденных животных при действии рианодина в блокирующей концентрации. В присутствии рианодина (5 мкМ) в синапсах П6 и П10, в отличие от взрослых животных, не наблюдалось достоверных различий в частотной зависимости временных параметров секреции (Рис. 8), что свидетельствует о том, что повышенный уровень задержанного асинхронного освобождения квантов медиатора в синапсах новорожденных животных не связан с изменением активности рианодин-чувствительных кальциевых депо.

#### ***6. Выявление L-типа кальциевых каналов и оценка их вклада в модуляцию параметров синхронного и задержанного асинхронного освобождения квантов ацетилхолина в синапсах взрослых и новорожденных животных***

На многих типах возбудимых тканей, в том числе и нервной, показано, что работа рианодиновых рецепторов тесно сопряжена с активностью дигидропиридин-чувствительных потенциал-зависимых кальциевых каналов L-типа (Markram et al., 1995; Rebello et al., 2013). Изменение активности этих каналов влияет на секрецию медиатора в синапсах животных на ранних стадиях постнатального онтогенеза (Urbano et al., 2001; Nudler et al., 2003), при восстановлении поврежденного двигательного нерва (Katz et al., 1996; Balezina et al., 2007; Balezina, Bogacheva, 2009), а также в условиях пролонгированного потенциала действия

нервного окончания (Гайдуков и др., 2008; Berridge, 2009). В связи с этим возникает вопрос: не связаны ли наблюдаемые изменения кинетики секреции квантов ацетилхолина при блокаде рианодиновых рецепторов с работой кальциевых каналов L-типа.

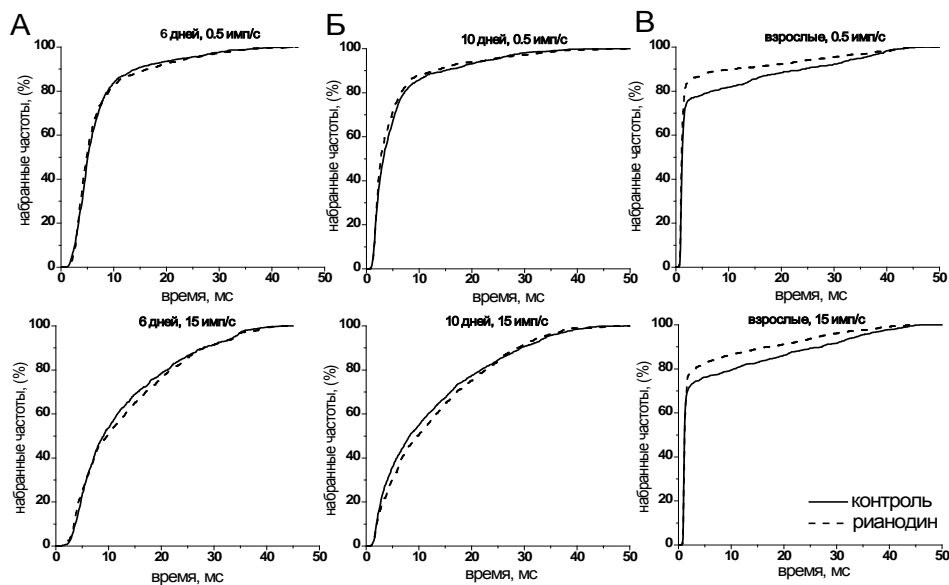


Рис. 8. Кумулятивные кривые распределения истинных синаптических задержек в синапсах 6- (А), 10- (Б) дневных и взрослых (В) крыс при частоте стимуляции 0.5 и 15 имп/с в присутствии рианодина

Для выявления присутствия кальциевых каналов L-типа в исследуемых синапсах был проведен иммуногистохимический анализ с использованием поликлональных антител к альфа 1С-субъединице каналов  $Ca_v1.2$  (L-тип). Флуоресцентный анализ показал наличие специфического окрашивания этими антителами в области двигательных нервных окончаний в синапсах животных всех исследуемых возрастов.

Для оценки вклада этих каналов в регуляцию параметров синхронного и асинхронного освобождения проведены исследования в присутствии блокатора их активности нитрендипина (Rosato Siri, Uchitel, 1999). В синапсах новорожденных (П6 и П10) нитрендипин (10 мкМ), вызывал снижение числа квантов, освободившихся в ответ на стимуляцию и уменьшал число квантов в асинхронной фазе секреции. Однако, в синапсах взрослых животных (крыс и мышей) не наблюдалось достоверных изменений среднего квантового состава и в кинетике секреции медиатора при всех частотах стимуляции, что свидетельствует об отсутствии участия «молчащих» дигидропиридин-чувствительных каналов L-типа в модуляции кинетики квантового освобождения медиатора (Katz et al., 1996). Вместе с тем, в условиях предварительного пролонгирования пресинаптического тока действия с помощью блокатора калиевых каналов 4-аминопиридина, нитрендипин (10 мкМ) в синапсах взрослых мышей и крыс вызывал снижение интенсивности фазного синхронного и задержанного асинхронного освобождения квантов ацетилхолина. При этом, в условиях предварительной блокады L-типа каналов в синапсах взрослых животных, рианодин в блокирующей и активирующей концентрациях продолжал изменять интенсивность фазной и задержанной асинхронной секреции, что указывает на независимую работу L-типа кальциевых каналов и рианодиновых рецепторов в процессе регуляции интенсивности синхронного и асинхронного освобождения медиатора.



## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенное исследование посвящено изучению вклада рианодиновых рецепторов в регуляцию интенсивности синхронного и асинхронного освобождения квантов ацетилхолина в нервно-мышечных синапсах мышей и крыс. Процесс вызванной секреции квантов в этих синапсах представлен тремя фазами – ранним и поздним периодом фазной синхронной секреции и задержанным асинхронным освобождением. Повышение частоты стимуляции двигательного нерва до 15 имп/с приводило к перераспределению квантов между фазным и задержанным асинхронным освобождением и увеличению последнего. Это может быть результатом возрастания внутриклеточного содержания ионов кальция вследствие активации выхода его из рианодин-чувствительных кальциевых депо (Nishimura et al., 1990; Narita et al., 1998; 2000; Bouchard et al., 2003; Rusakov, 2006; Smith et al., 2012). Блокатор рианодиновых рецепторов вызывал уменьшение амплитуды флуоресцентного ответа специфического кальций-чувствительного красителя при ритмической стимуляции двигательного нерва, что свидетельствует о снижении внутриклеточной концентрации ионов кальция. Анализ гистограмм синаптических задержек показал, что блокаторы рианодиновых рецепторов рианодин, ТМВ-8 и дантролен снижали интенсивность как фазного синхронного, так и задержанного асинхронного освобождения медиатора в синапсах взрослых мышей и крыс. При этом возрастала доля синхронно выделившихся квантов за счет снижения числа квантов, формирующих задержанное асинхронное освобождение, т.е. происходило перераспределение квантов между синхронной и асинхронной фазами секреции. Таким образом, в нервно-мышечном соединении взрослых мышей и крыс пресинаптические рианодиновые рецепторы участвуют в контроле внутриклеточного содержания ионов кальция в ходе ритмической стимуляции нервного окончания и вносят вклад в модуляцию временных параметров секреции, увеличивая интенсивность преимущественно задержанного асинхронного освобождения нейромедиатора. В синапсах животных, находящихся на ранних стадиях постнатального онтогенеза, наряду со сниженной фазной синхронной секрецией, наблюдалась существенно более высокая интенсивность задержанного асинхронного освобождения квантов ацетилхолина по сравнению с синапсами взрослых животных. При этом блокада рианодиновых рецепторов в синапсах новорожденных животных рианодином и ТМВ-8 не изменяла ни количество квантов, освобождаемых в ответ на нервный стимул, ни временные параметры их выделения. В то же время, выключение потенциал-зависимых дигидропиридин-чувствительных кальциевых каналов L-типа в этих синапсах с помощью нитрендипина снижало интенсивность синхронной и асинхронной секреции, в большей степени влияя на задержанное асинхронное освобождение квантов. Таким образом, в отличие от синапсов взрослых животных, у новорожденных повышенный уровень задержанного асинхронного освобождения связан не с рианодиновыми рецепторами, а с участием L-типа кальциевых каналов в регуляции временных параметров квантовой секреции медиатора.

## ВЫВОДЫ

1. В нервно-мышечных синапсах взрослых мышей и крыс вызванная нервным стимулом секреция квантов ацетилхолина представлена ранним и поздним периодом фазного синхронного освобождения и задержанным асинхронным освобождением, отличающимися

по интенсивности и величине синаптических задержек, с которыми секретируются кванты. Существенной разницы в параметрах секреции в синапсах мышей и крыс не наблюдалось.

2. При повышении частоты стимуляции двигательного нерва в синапсах взрослых животных число квантов, относящихся к задержанному асинхронному освобождению, возрастало в большей степени, чем число квантов, освободившихся в период фазной секреции, что свидетельствует о повышении несинхронности секреции.

3. В синапсах новорожденных животных, наряду с низкой интенсивностью фазной синхронной секреции, наблюдалась высокая степень асинхронного освобождения, которая возрастала при повышении частоты стимуляции двигательного нерва в большей степени, чем в синапсах взрослых животных.

4. Анализ флуоресцентного ответа с использованием специфического кальций-чувствительного красителя Fluo-3 AM показал снижение внутриклеточного содержания свободных ионов кальция в нервном окончании под действием блокатора рианодиновых рецепторов ТМВ-8, что свидетельствует об участии рианодин-чувствительных кальциевых депо в поддержании внутриклеточной концентрации ионов кальция при ритмической стимуляции нерва.

5. В синапсах взрослых животных блокаторы рианодиновых рецепторов (рианодин, ТМВ-8, дантролен) наряду со снижением количества освобождаемых квантов во всех трех фазах секреции, в большей степени подавляли задержанное асинхронное освобождение, приводя к синхронизации процесса выделения квантов медиатора.

6. В синапсах новорожденных крыс при действии блокаторов рианодиновых рецепторов не наблюдалось изменения интенсивности фазного синхронного и задержанного асинхронного освобождения квантов ацетилхолина, что указывает на отсутствие связи между высокой интенсивностью асинхронного освобождения в синапсах новорожденных с работой рианодин-чувствительных депо.

7. Иммуногистохимический анализ показал наличие окрашивания специфическими антителами к альфа 1С субъединице дигидропиридин-чувствительных потенциал-зависимых кальциевых каналов (L-типа) в синапсах животных всех исследуемых возрастов.

8. В синапсах новорожденных крыс при блокировании кальциевых каналов L-типа наблюдалось снижение интенсивности задержанного асинхронного освобождения.

9. Блокирование кальциевых каналов L-типа в синапсах взрослых животных вызывало изменение количества освобождающихся квантов медиатора и кинетики их секреции только в условиях пролонгированного пресинаптического потенциала действия в присутствии блокатора калиевых каналов 4-аминопиридина.

10. Блокирование и активация рианодиновых рецепторов на фоне заблокированных кальциевых каналов L-типа в синапсах взрослых животных изменяла количество освобождающихся квантов медиатора и их кинетики во всех фазах секреции, что свидетельствует о независимости работы рианодиновых рецепторов и кальциевых каналов L-типа при модуляции временных параметров секреции квантов медиатора.

11. В синапсах новорожденных крыс, в отличие от взрослых животных, повышенный уровень асинхронного освобождения не связан с работой рианодиновых рецепторов и модулируется при участии потенциал-зависимых кальциевых каналов L-типа.

## СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО МАТЕРИАЛАМ ДИССЕРТАЦИИ

1. Самигуллин, Д.В. Рецепторы пресинаптических нервных окончаний, участвующие в регуляции кинетики секреции квантов нейромедиатора / Д.В. Самигуллин, **В.Ф. Хузахметова**, А.Н. Ценцевицкий, Э.А. Бухараева // Биологические мембраны. – 2011. - Т. 28, № 6. - С. 436–445.
2. **Хузахметова, В.Ф.** Участие ионов кальция в регуляции кинетики освобождения квантов ацетилхолина, формирующих многоквантовый постсинаптический ответ / **В.Ф. Хузахметова**, Н.Ф. Фатихов, Э.А. Бухараева, Е.Е. Никольский // Российский физиологический журнал им. И. М. Сеченова. – 2011. - Т. 97, № 10. - С. 1147-1156.
3. **Хузахметова, В.Ф.** Особенности передачи возбуждения в нервно-мышечных синапсах крысы на разных сроках постнатального развития / **В.Ф. Хузахметова**, Д.В. Самигуллин, Л.Ф. Нуруллин, Е.Е. Никольский, Э.А. Бухараева // Российский физиологический журнал им. И. М. Сеченова. – 2012. - Т. 98, № 12. - С. 1544-1554.
4. **Хузахметова, В.Ф.** Роль пресинаптических рианодиновых рецепторов в регуляции кинетики вызванного освобождения квантов ацетилхолина в нервно-мышечном синапсе мышцы / **В.Ф. Хузахметова**, Д.В. Самигуллин, Э.А. Бухараева // Биологические мембраны. – 2013. - Т. 30, № 5–6. - С. 499-508.
5. **Khuzakhmetova, V.** Kinetics of neurotransmitter release in neuromuscular synapses of newborn and adult rats / **V. Khuzakhmetova**, D. Samigullin, L. Nurullin, F. Vyskocil, E. Nikolsky, E. Bukharaeva // Int. J. Devl. Neuroscience. – 2014. - №34. – P. 09–18.
6. Самигуллин, Д.В. Пресинаптические рецепторы, участвующие в регуляции временных параметров квантовой секреции нейромедиатора / Д.В. Самигуллин, **В.Ф. Хузахметова**, А.Н. Ценцевицкий, Э.А. Бухараева // Сборник статей международной конференции «Рецепторы и внутриклеточная сигнализация». – Пущино, 2011. - Т. 1. - С. 200-206.
7. **Хузахметова В.Ф.** Модуляция синхронного и асинхронного освобождения нейромедиатора – вклад пресинаптических рианодиновых рецепторов / **В.Ф. Хузахметова**, Д.В. Самигуллин, Э.А. Бухараева // Сборник статей международной конференции «Рецепторы и внутриклеточная сигнализация». - Пущино, 2013. – Т. 1. - С. 368-373.
8. **Хузахметова, В.Ф.** Участие внутриклеточных кальциевых депо в регуляции синхронного и асинхронного вызванного освобождения квантов ацетилхолина / **В.Ф. Хузахметова** // XVII Международная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов -2010». - Москва, 2010. – Тезисы докладов. - С. 291-292.
9. Васин, А.Л. Особенности синаптической передачи в синапсах животных на разных стадиях онтогенеза / А.Л. Васин, **В.Ф. Хузахметова**, Д.В. Самигуллин // X Юбилейная всероссийская научная конференция «Физиологические механизмы адаптации растущего организма». - Казань, 2010. - Тезисы докладов. - С. 31-32.
10. **Хузахметова, В.Ф.** Участие рианодиновых рецепторов и потенциал-зависимых кальциевых каналов L-типа в регуляции синхронного и асинхронного освобождения квантов ацетилхолина в нервно-мышечном синапсе мышцы / **В.Ф. Хузахметова**, А.Л. Васин // Российская школа молодых ученых «Актуальные проблемы современной биохимии и молекулярной биологии». - Казань, 2010. - Тезисы докладов. - С. 64.
11. **Хузахметова, В.Ф.** Роль потенциал-зависимых кальциевых каналов L-типа в регуляции синхронного и асинхронного освобождения квантов медиатора / **В.Ф.**

- Хузахметова, А.Л.** Васин, Д.В. Самигуллин, Э.А. Бухараева // XXIII Международная зимняя молодежная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии». - Москва, 2011. - Тезисы докладов. - С. 116.
12. **Хузахметова, В.Ф.** Особенности квантовой секреции в синапсах животных на разных стадиях онтогенеза / **В.Ф. Хузахметова** // XVIII Международная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов -2011». - Москва, 2011. - Тезисы докладов. - С. 274-275.
13. Бухараева, Э.А. Синхронное и асинхронное освобождение нейромедиатора в синапсах химического типа / Э.А. Бухараева, Д.М Самигуллин, **В.Ф. Хузахметова** // VII Международный междисциплинарный конгресс «Нейронаука для медицины и психологии». - Судак, Украина, 2011. - Тезисы докладов. - С. 106-107.
14. **Хузахметова, В.Ф.** Роль  $Ca^{2+}$ -каналов L-типа в секреции квантов медиатора в синапсах крыс на разных стадиях онтогенеза / **В.Ф. Хузахметова**, Л.Ф. Нуруллин // XIX Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов -2012». - Москва, 2012. - Тезисы докладов. - С. 262.
15. **Хузахметова, В.Ф.** Роль внутриклеточных кальциевых буферных систем в регуляции кинетики секреции медиатора в нервно-мышечных синапсах теплокровных / **В.Ф. Хузахметова**, Э.А. Бухараева // XVI Международная Пуцинская школа-конференция молодых ученых «Биология - наука XXI века». - Пушино, 2012. - Тезисы докладов. -С. 75-76.
16. **Хузахметова, В.Ф.** Участие рианодиновых рецепторов в регуляции кинетики вызванного освобождения квантов ацетилхолина / **В.Ф. Хузахметова**, Д.В. Самигуллин, Э.А. Бухараева // VIII Международный Междисциплинарный Конгресс «Нейронаука для медицины и психологии». - Судак, Украина, 2012. - Тезисы докладов. - С. 427-428.
17. **Хузахметова, В.Ф.** Участие рианодиновых рецепторов и потенциал-зависимых кальциевых каналов L-типа в регуляции кинетики секреции медиатора в нервно-мышечном синапсе мыши / **В.Ф. Хузахметова**, Э.А. Бухараева // 11 Всероссийская с международным участием Школа-конференция «Физиологические механизмы адаптации растущего организма». - Казань, 2012. - Тезисы докладов. - С. 162-163.
18. Савельев, А.А. Анализ синхронного и асинхронного освобождения нейромедиатора с помощью статистической модели на основе смеси гамма-распределений / А.А. Савельев, Д.В. Самигуллин, **В.Ф. Хузахметова**, Э.А. Бухараева // IV Съезд биофизиков России, Симпозиум II «Физические основы физиологических процессов». - Нижний Новгород, 2012. - Тезисы докладов. - С. 125.
19. **Хузахметова, В.Ф.** Особенности вызванной секреции квантов медиатора в нервно-мышечных синапсах новорожденных крыс / **В.Ф. Хузахметова**, Д.В. Самигуллин, Э.А. Бухараева // V Всероссийский с международным участием медико-биологический конгресс молодых ученых «Симбиоз-Россия». - Тверь, 2012. - Тезисы докладов. - С. 71-73.
20. **Хузахметова, В.Ф.** Регуляция кинетики квантовой секреции медиатора потенциал-зависимыми кальциевыми каналами и рецепторами эндоплазматического ретикула / **В.Ф. Хузахметова**, Э.А. Бухараева // XXII съезд физиологического общества имени И.П. Павлова. - Волгоград, 2013. - Тезисы докладов. - С. 565-566.