

Государственное бюджетное образовательное учреждение  
высшего профессионального образования  
«Казанский государственный медицинский университет»  
Министерства здравоохранения Российской Федерации

На правах рукописи

**Петров Алексей Михайлович**

**Роль холестерина в везикулярном цикле и процессах освобождения медиатора из  
двигательных нервных окончаний**

Специальности

03.01.02 - биофизика

03.03.01 – физиология

Диссертация на соискание ученой степени  
доктора биологических наук

Научный консультант –  
чл.-корр. РАН, д.м.н., проф.  
Зефирова Андрей Львович

Казань - 2015

## Оглавление

1. ВВЕДЕНИЕ .....	7
2. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ .....	16
2.1 Общие представления о нервно-мышечном синапсе .....	16
2.2 Синаптическая везикула и общие понятия о пулах везикул .....	19
2.3 Активные зоны (АЗ) двигательных нервных окончаний .....	23
2.4 Молекулярный механизм экзоцитоза .....	25
2.4.1 Кратко о сцеплении и докировании .....	26
2.4.2 Прайминг и SNARE-комплекс .....	27
2.4.3 Кальциевые сенсоры экзоцитоза .....	32
2.4.4 Шапероны и экзоцитоз. Разборка SNARE комплекса .....	35
2.5 Эндоцитоз синаптических везикул .....	37
2.5.1. Кратко о механизмах клатрин-опосредованного эндоцитоза .....	40
2.6 Мембранный холестерин и представления о рафтах .....	51
2.6.1 Специализированные варианты рафтов - кавеолы .....	56
2.7. Метаболизм холестерина в нервной системе .....	59
2.7.1 Общие сведения об источниках мозгового холестерина .....	59
2.7.2 Регуляция синтеза холестерина .....	60
2.7.3 Депонирование, эфиры холестерина .....	64
2.7.4 Межклеточный транспорт холестерина .....	65
2.7.5 Экскреция холестерина из мозга. Оксистеролы .....	66
2.8 Холестерин и липидные плотки в регуляции синаптической передачи .....	70
2.8.1 Пресинаптические механизмы и холестерин .....	70
2.8.2 Постсинаптические процессы и холестерин .....	73
3. МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ .....	80
3.1 Объект, растворы и реагенты .....	80

3.2 Электрофизиологические подходы.....	82
3.3. Флуоресцентные подходы.....	84
3.3.1 Слежение за везикулярными процессами: эндоцитозные FM-красители .....	84
3.3.2 Цитозольный уровень кальция .....	89
3.3.3 Внеклеточный уровень ацетилхолина .....	89
3.3.4 Внеклеточной уровень пероксида водорода .....	90
3.3.5 Оценка количества окисленного холестерин оксидазой холестерина.....	90
3.3.6 Внутриклеточный уровень активных форм кислорода (АФК) .....	91
3.3.7 Оценка перекисного окисления липидов .....	91
3.3.8 Оценка внутриклеточного рН .....	92
3.3.9 Идентификация холестерина в мембранах.....	93
3.3.10 Маркирование скоплений ганглиозидов GM1 .....	93
3.3.11 Оценка фазовых свойств мембраны .....	94
3.3.12 Маркирование никотиновых ацетилхолиновых рецепторов.....	95
3.3.14 Иммунофлуоресценция .....	95
3.4 Статистическая обработка данных .....	96
4. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.....	97
4.1 Холестерин и липидные плотики в нервно-мышечных синапсах.....	97
4.1.1 Локализация холестерина в синаптических мембранах .....	97
4.1.2 Идентификация липидных рафтов в синаптических мембранах .....	99
4.1.3 Распределение липидных рафтов и синаптических везикул в нервных окончаниях.....	102
4.1.4 Распределение липидных рафтов и постсинаптических никотиновых ацетилхолиновых рецепторов.....	106
4.1.5 Метил- $\beta$ -циклодекстрин (МЦД) как инструмент для исследования значения мембранного холестерина и липидных плотиков.....	108

4.1.6	Возможная роль сосредоточения холестерина и липидных плотиков в нервно-мышечных синапсах.....	112
4.2	Роль холестерина в вызванном экзоцитозе синаптических везикул и их рециклировании в нервно-мышечном синапсе лягушки .....	115
4.2.1	Влияние 1мМ МЦД на спонтанную и вызванную одиночными потенциалами действия секрецию .....	115
4.2.2	Эффекты МЦД на кинетику освобождения медиатора при длительном высокочастотном раздражении .....	117
4.2.3	Эффекты 1 мМ МЦД на эндоцитоз и экзоцитоз синаптических везикул.....	120
4.2.4	Скорость везикулярного цикла и мембранный холестерин .....	125
4.2.5	Роль пресинаптического и везикулярного холестерина в экзо- и эндоцитозе везикул в двигательном нервном окончании.....	125
4.3	Механизмы участия холестерина в контроле спонтанного экзоцитоза в нервно-мышечном синапсе лягушки.....	129
4.3.1	МЦД (10 мМ) усиливает спонтанную секрецию медиатора и экзоцитоз синаптических везикул .....	130
4.3.2	Истощение холестерина усиливает продукцию активных форм кислорода (АФК) во внутри- и внеклеточной среде, вызывая перекисное окисление липидов в синаптическом регионе .....	131
4.3.3	АФК вовлечены в вызванное удалением холестерина усиление спонтанного освобождения медиатора и экзоцитоза .....	135
4.3.4	АФК-зависимое увеличение внутриклеточной концентрацию $Ca^{2+}$ под действием МЦД: источники $Ca^{2+}$ .....	136
4.3.5	Иммунофлуоресцентное мечение TRPV1-каналов в синаптическом регионе	139
4.3.6	Повышение внутриклеточного $Ca^{2+}$ опосредует эффекты МЦД на освобождение медиатора и экзоцитоз .....	140
4.3.7	$Ca^{2+}$ зависимое-дефосфорилирование участвует в эффектах истощения мембранного холестерина на спонтанное освобождение и экзоцитоз .....	141

4.3.8 Роль протеинкиназы С в индуцированном удалением мембранного холестерина экзоцитозе.....	143
4.3.9 Механизм холестерин-зависимого контроля спонтанного экзоцитоза синаптических везикул .....	149
4.4 Холестерин и невезикулярное освобождение нейромедиатора в нервно-мышечном синапсе крысы. Связь невезикулярного освобождения с процессами экзо- и эндоцитоза.....	158
4.4.1 Влияние 1 мМ МЦД на спонтанное освобождение и вызванную секрецию медиатора при редкой и высокочастотной стимуляции.....	158
4.4.2 Протекание эндо- и экзоцитоза синаптических везикул после частичного удаления мембранного холестерина.....	161
4.4.3 Изменение Н-эффекта (показатель невезикулярного освобождения) под действием МЦД в покое и при ритмической стимуляции двигательного нерва .....	164
4.4.4 Н-эффект в условиях ингибирования везикулярного транспортера ацетилхолина везамиколом.....	167
4.4.5 Влияние МЦД на цитоплазматический рН в синаптическом регионе.....	169
4.4.6 Эффект уменьшения внутриклеточного рН на Н-эффект .....	171
4.4.7 Эффекты МЦД, стимуляции и везамикола на внеклеточный уровень ацетилхолина .....	172
4.4.8 Значение холестерина в невезикулярном освобождении медиатора. Связь некантового освобождения и рециклирования синаптических везикул.....	176
4.5 Влияние ферментативного окисления холестерина на везикулярный цикл в нервно-мышечных синапсах лягушки.....	182
4.5.1 Холестерин оксидаза эффективно окисляет холестерин мембран в нервно-мышечном препарате и снижает стабильность липидных рафтов .....	183
4.5.2 Влияние окисления холестерина на спонтанное и вызванное освобождение нейромедиатора .....	186
4.5.3 Эффекты холестерин оксидазы на эндо- и экзоцитоз синаптических везикул	188
4.5.4 Рециклирующий пул везикул и окисление мембранного холестерина .....	192

4.5.5 Влияние окисления холестерина на этапы везикулярного цикла в нервно-мышечном синапсе. Возможные механизмы.....	194
4.6 Влияние оксистерола, 5 $\alpha$ -холестан-3-она, на экзо-эндоцитозный цикл синаптических везикул в нервно-мышечном синапсе мыши.....	200
4.6.1 5 $\alpha$ -Холестан-3-он изменяет свойства синаптических мембран.....	201
4.6.2 5 $\alpha$ -Холестан-3-он подавляет освобождение нейромедиатора при низкой и высокой частоте стимуляции, не влияя на спонтанное освобождение.....	204
4.6.3 5 $\alpha$ -Холестан-3-он снижает интенсивность эндоцитоза синаптических везикул, вызванного высокочастотной стимуляцией.....	207
4.6.4 5 $\alpha$ -Холестан-3-он ослабляет экзоцитоз синаптических везикул при высокочастотной стимуляции .....	211
4.6.5 5 $\alpha$ -Холестан-3-он не изменяет время рециклирования синаптических везикул .....	213
4.6.6 Эффекты 5 $\alpha$ -холестан-3-она на свойства мембран и экзоцитоз зависят от исходного уровня холестерина в плазматических мембранах .....	214
4.6.7 Возможные механизмы влияния 5 $\alpha$ -холестан-3-она на цикл синаптических везикул и состояние синаптических мембран .....	220
5. ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	225
6. ВЫВОДЫ .....	230
7. СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ .....	232
8. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	233

## 1. ВВЕДЕНИЕ

### Актуальность исследования

Холестерин является одним из основных компонентов мембран эукариотических клеток, который эволюционно всех позже появился в составе мембран (Simons, Samraio, 2011; Петров, Зефилов, 2013, 2014). От его содержания зависит текучесть и способность мембран к деформации. Холестерин напрямую взаимодействует с некоторыми рецепторами, ионными каналами и ферментами. Вместе со сфинголипидами холестерин организует микродомены в мембране, липидные плотки (рафты). В плотках присутствует множество белков, участвующих в сигнализации, мембранном и ионном транспорте (Aureli et al., 2015; Петров, Зефилов, 2013). В исследованиях последних лет показано, что удаление холестерина, нарушающее стабильность рафтов, драматично сказывается на многих клеточных процессах (Зефилов, Петров, 2010б; Segatto et al., 2014; Martín et al., 2014). Особенно высокое содержание холестерина обнаружено в мозге, где холестерин в процессе эволюции приобрел специфические функции, связанные с формированием и функционированием миелиновых оболочек, и синаптических контактов (Dietschy, 2009; Vance, 2012; Leoni, Caccia, 2015).

В течение пребывания в плазматической мембране холестерин может окисляться ферментами или активными формами кислорода (АФК). В результате образуются разнообразные оксистеролы, которые зачастую характеризуются высокой биологической активностью, обладая протективными или, наоборот, токсическими свойствами (Jeitner et al., 2011; Hu et al., 2014; Marwarha, Ghribi, 2015). Стимулировать образование оксистеролов могут изменения активности клеток, содержания мембранного холестерина, гомеостаза  $Ca^{2+}$  и оксидативный стресс (Hughes et al., 2013). В качестве холестерин оксидазы может выступать амилоидный пептид  $\beta$  в комплексе с  $Cu^{2+}$  (Puglielli et al., 2005; Stelmashook et al., 2014). В клетках обнаружено семейство оксистерол-связывающих белков, которые участвуют во внутриклеточной сигнализации, организации мембранных контактных сайтов и регулируют формирование липидных плотиков (Weber-Bouvat et al. 2013). Некоторые оксистеролы могут взаимодействовать с ядерными рецепторами (Gabbi et al., 2014) или аллостерически модулировать работу глутаматных NMDA-рецепторов (Paul et al., 2013;

Hu et al., 2014; Linsenhardt et al., 2014). В целом, механизмы влияния оксистеролов и их эффекты на многие клеточные процессы остаются во многом не известными.

Химическая синаптическая передача является одним из самых сложно регулируемых процессов, который основывается на освобождении нейромедиатора (Магазаник и др., 2001; Балабан, 2007; Зефирова, Петрова, 2010а; Südhof, 2014; Rizo, Xu, 2015). В пресинаптических нервных окончаниях содержатся синаптические везикулы, заполненные молекулами нейромедиатора. Поступление потенциала действия в нервные окончания способствует активации потенциал-зависимых  $Ca^{2+}$  каналов, вход  $Ca^{2+}$  через которые запускает экзоцитоз (слияние синаптической везикулы с поверхностной мембраной в специфичном регионе) и выход нейромедиатора в синаптическую щель. После экзоцитоза мембрана синаптической везикулы захватывается в нервное окончание путем эндоцитоза, в итоге образуется новая везикула, которая заполняется нейромедиатором и приобретает способность повторно участвовать в освобождении нейромедиатора. Таким образом, при синаптической активности в нервных окончаниях протекает везикулярный экзо-эндоцитозный цикл, который поддерживает освобождение нейромедиатора (Betz et al., 1992; Зефирова, 2007). Изменение скорости везикулярного цикла участвует в контроле эффективности синаптической передачи. Везикулярный цикл очень точно скоординирован в пространстве, и каждый этап протекает в специфичном регионе (Zefirov et al., 1995; Südhof, 2004; Rohrbough, Brodie, 2005; Зефирова, Петрова, 2010а; Rizzoli, 2014). Особым вариантом везикулярного цикла, о существовании которого в физиологических условиях до сих пор ведутся обширные дискуссии, является «kiss-and-run» путь («поцеловал-и-убежал»). В этом случае между пресинаптической и везикулярной мембранами образуется пора слияния, которая закрывается вскоре после освобождения нейромедиатора (Зефирова и др. 2004; Зефирова, Петрова, 2010а; Alabi, Tsien, 2013; Watanabe et al., 2013; Watanabe, 2015).

Популяция синаптических везикул функционально неоднородна: часть везикул, немедленно освобождающая медиатор в ответ на потенциал действия, составляет немедленно готовый к освобождению пул; другая часть, обозначаемая как рециклирующий пул, может быстро транспортироваться в сайты экзоцитоза, а затем подвергаться быстрому эндоцитозу; самая большая популяция везикул формирует резервный пул, везикулы которого слабо вовлекаются в экзоцитоз и восстанавливаются медленным эндоцитозом (Зефирова, 2007; Зефирова, Петрова, 2010а; Захаров и др. 2012;

Rizzoli, Betz, 2005). Участие отдельных пулов в синаптическую передачу может иметь специфические механизмы регуляции, и участвует в реализации феноменов синаптической пластичности (Neher, 2015; Fowler, Staras, 2015).

Помимо вызванного потенциалами действия экзоцитоза существует спонтанный экзоцитоз, который хотя и наблюдается в отсутствие потенциала действия, но может модулироваться цитозольным  $Ca^{2+}$ , поэтому не в полном смысле спонтанный. Накапливаются данные о том, что спонтанный экзоцитоз имеет специфичные пути регуляции и функции, связанные с контролем чувствительности постсинаптических рецепторов, вероятности вызванного экзоцитоза и локального белкового синтеза (Kaeser, Regehr, 2014; Truckenbrodt, Rizzoli, 2014). Секреция нейромедиатора из нервных окончаний происходит не только в ходе экзоцитоза, но и невезикулярным путем при участии белковой транспортной системы (Katz, Miledi, 1977, 1981; Nikolsky et al., 1991, 1994). Невезикулярное освобождение влияет на чувствительность постсинаптических рецепторов, модулирует экзоцитоз, регулирует формирование и регенерацию синапсов, мембранный потенциал (Vyskocil et al., 2009).

В ходе везикулярного цикла происходят радикальные изменения геометрии мембраны, для осуществления которых потенциально требуется холестерин, а также многие белки, вовлеченные в экзо-эндоцитоз, перенос молекул нейромедиатора и сигнализацию, напрямую могут связываться с холестерином и/или локализоваться во фракции устойчивых к действию детергентов мембран (Зефилов, Петров, 2010б; Darios et al., 2007; Puchkov, Haucke, 2013; Segatto et al., 2014). Поэтому изменение содержания мембранного холестерина может существенно и всеобъемлюще изменять функционирование синаптического аппарата. Исследования в данной области имеют не только фундаментальное значение для понимания механизмов синаптической коммуникации, но и сопряженный клинический аспект, поскольку снижение содержания холестерина в синаптических мембранах наблюдается в результате увеличения нейрональной активности, в ходе старения и при многих патологиях (Sodero et al., 2011, 2012; Martin et al., 2014). Одним из главных механизмов уменьшения мембранного холестерина является его окисление, в результате образуются оксистеролы, способные покидать мембраны и обладающие высокой биологической активностью. Следует отметить, что концентрация различных оксистеролов часто претерпевает значительные специфические изменения при сменах режима

синаптической активности, старении и многих нейродегенеративных заболеваниях (Leoni, Caccia, 2011; Sodero et al., 2012; Björkhem, 2013; Hughes et al., 2013; Kreilaus et al., 2015; Marwarha, Ghribi, 2015). К сожалению, об эффектах оксистеролов и окисления холестерина на синаптическую передачу известно крайне мало.

### **Цель исследования**

Провести с помощью электрофизиологических и оптических методов исследование роли холестерина в функционировании нервно-мышечных синапсов холоднокровных (лягушка) и теплокровных (мышь, крыса) животных.

### **Основные задачи исследования**

1. Изучить распределение холестерина и скоплений ганглиозидов GM1 (липидных плотиков) в синаптических мембранах, а также выявить липидные плотики в мембранах синаптических везикул. Определить взаимное расположение липидных плотиков и скоплений синаптических везикул.

2. Оценить эффект метил- $\beta$ -циклодекстрина на содержание холестерина и стабильность липидных плотиков в мембранах нервно-мышечных синапсов.

3. Выявить последствия удаления холестерина из поверхностных мембран на процессы вызванного освобождения медиатора при низко- и высокочастотной стимуляции двигательного нерва, а также на процессы экзоцитоза и рециклирования синаптических везикул.

4. Изучить роль холестерина мембран синаптических везикул в вызванном освобождении нейромедиатора и экзо-эндоцитозном везикулярном цикле.

5. Исследовать роль холестерина в контроле спонтанного освобождения нейромедиатора и экзоцитоза синаптических везикул. Выяснить механизм вызванных удалением холестерина изменений спонтанного освобождения нейромедиатора и экзоцитоза.

6. Определить значение холестерина в регуляции невезикулярного освобождения нейромедиатора, а также выявить связь между эффектами удаления холестерина на экзо-эндоцитоз синаптических везикул и невезикулярное освобождение.

7. Исследовать влияние бактериального фермента холестерин оксидазы на процессы вызванного освобождения нейромедиатора и экзо-эндоцитоза синаптических везикул. Оценить эффективность окисления мембранного холестерина холестерин оксидазой и ее влияние на стабильность липидных плотиков.

8. Изучить эффекты оксистерола (5 $\alpha$ -холестан-3она) на вызванное освобождение нейромедиатора (при низко- / высокочастотной, парной стимуляции), а также на процессы экзо-эндоцитоза синаптических везикул. Определить его влияние на свойства синаптических мембран. Оценить зависимость эффектов 5 $\alpha$ -холестан-3она на стабильность липидных плотиков и экзоцитоз синаптических везикул от исходного содержания холестерина в поверхностной мембране.

### **Научная новизна**

Впервые было показано, что в интактных поверхностных мембранах нервно-мышечных синапсов имеются скопления ганглиозидов GM1 (липидные плотики) в сайтах экзо- и эндоцитоза. Особенно высокое содержание скоплений ганглиозидов GM1 было обнаружено в синаптических везикулах. Также было показано концентрирование холестерина в мембранах нервно-мышечных контактов, удаление даже небольшой части которого снижало стабильность плотиков.

Впервые выявлено угнетение избирательно вызванного освобождения медиатора за счет уменьшения пула синаптических везикул, активно вовлекающихся в нейротрансдукцию, в условиях высокочастотной активности в ответ на удаление небольшой части холестерина из поверхностных мембран. Впервые показано блокирование эндоцитоза и рециклирования синаптических везикул при удалении части холестерина из мембран синаптических везикул, что способствует истощению везикулярных пулов в ходе интенсивной активности.

Впервые расшифрованы НАДФН-оксидаза / активные формы кислорода (АФК) / TRPV-каналы / Ca<sup>2+</sup> / кальциневрин-зависимый механизм усиления спонтанного экзоцитоза при удалении значительной части мембранного холестерина. Также приоритетными являются данные о зависимости механизма («полный» или «kiss-and-run») спонтанного экзоцитоза, связанного с удалением холестерина, от Ca<sup>2+</sup> / фосфолипаза C-независимой активности протеинкиназы C.

Впервые обнаружено усиление невезикулярного освобождения нейромедиатора, опосредуемое усилением активности везикулярного транспортера ацетилхолина и сопровождаемое закислением аксоплазмы, при удалении небольшой части мембранного холестерина. Причем удаление холестерина из мембран рециклирующих синаптических везикул еще больше потенцировало невезикулярное освобождение, что связано с

блокированием эндоцитоза и, как следствие, накоплением везикулярных транспортеров ацетилхолина в пресинаптической мембране.

Впервые показаны снижение стабильности синаптических липидных плотиков и существенные изменения в синаптическом везикулярном цикле при ферментативном окислении небольшой части холестерина. Оказалось, что после воздействия бактериальной холестерин оксидазы в ходе высокочастотной активности везикулы рециклирующего пула начинали освобождать медиатор через скоротечную пору слияния (kiss-and-run путь), а мобилизация везикул резервного пула значительно угнеталась, вероятно, за счет нарушения кластеризации синаптических везикул.

Впервые обнаружена высокая биологическая активность оксистерола, 5 $\alpha$ -холестан-3-она, который в наномолярной концентрации, не затрагивая спонтанную секрецию, угнетал вызванный экзоцитоз, уменьшал популяцию синаптических везикул, активно вовлекаемых в нейротрансдукцию, и нарушал стабильность синаптических плотиков. Причем эффекты оксистерола на экзоцитоз и свойства мембран существенно ослаблялись при изменении исходного содержания мембранного холестерина.

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

Проведенное исследование расширяет наши представления о фундаментальных механизмах синаптической передачи, в частности, о роли холестерина в протекании пресинаптических процессов, обеспечивающих освобождение нейромедиатора. Полученные данные позволяют по-новому взглянуть на дефекты метаболизма холестерина как пускового фактора синаптической дисфункции, которая может способствовать нейродегенерации. Результаты исследования следует учитывать при фармакологической коррекции обмена холестерина с помощью ингибирующих его синтез агентов (статинов), особенно способных проникать через гематоэнцефалический барьер. Обнаруженные эффекты холестерин оксидазы (синтезирует 4-холестан-3-он) и 5 $\alpha$ -холестан-3-она на свойства синаптических мембран и везикулярные процессы указывают на возможную роль оксистеролов в патогенезе ряда нейродегенеративных заболеваний, сопряженных с увеличением их продукции. Работа открывает новые горизонты для молекулярных исследований механизмов действия данных оксистеролов и выявления в синапсе оксистерол-связывающих сайтов, способных управлять синаптической передачей и мембранными свойствами. Другой аспект работы, выявляющий тесную связь холестерина синаптических мембран с состоянием

сигнальных молекул (НАДФН-оксидазы, TRPV-каналов, кальциневрина, протеинкиназы С), расширяет наши представления о холестерине как о дирижере процессов внутриклеточной сигнализации. Содержание холестерина в синаптических мембранах и продукция оксистеролов может существенным образом изменяться не только при патологических состояниях, но и в процессе развития, старения и в результате изменения режима синаптической активности. Следовательно, изменения содержания холестерина и / или продукции оксистеролов вследствие физиологических или патологических причин могут существенно перестраивать функционирование синаптического аппарата. Результаты исследования будут интересны широкому кругу специалистов, занятых в области биофизики, физиологии, нейробиологии и фармакологии.

#### **Основные положения, выносимые на защиту**

1. Холестерин, в избытке содержащийся в синаптических мембранах и формирующий липидные рафты, требуется для эффективного протекания вызванного освобождения медиатора. Причем холестерин поверхностной мембраны важен для процессов экзоцитоза и вовлечения везикул в нейропередачу, тогда как везикулярный холестерин необходим для эндоцитоза и рециклирования везикул.

2. Мембранный холестерин ограничивает процессы спонтанного освобождения нейромедиатора экзоцитозом, сдерживая активность сигнального пути НАДФН-оксидаза / активные формы кислорода / TRPV-каналы /  $[Ca^{2+}]_i$  / кальциневрин. При этом механизм спонтанного освобождения (полный экзоцитоз или kiss-and-run), связанного с удалением мембранного холестерина, зависит от  $Ca^{2+}$ -фосфолипаза С независимой активности протеинкиназы С.

3. Холестерин синаптических мембран ограничивает процесс невезикулярного (неквантового) освобождения ацетилхолина зависимым от везикулярного транспортера ацетилхолина и экзо/эндоцитозного баланса путем.

4. Вызванное освобождение нейромедиатора, пресинаптические везикулярные процессы и состояние синаптических мембран обладают высокой чувствительностью к окислению мембранного холестерина и оксистеролу,  $5\alpha$ -холестан-3-ону.

### **Личный вклад автора**

Планирование, организация, выполнение экспериментов, анализ данных, подготовка материалов к публикации и написание статей проводилось при личном участии автора. Помощь в выполнении ряда экспериментов оказывали соавторы статей, сотрудники Казанского государственного медицинского университета (Зефирова А.Л., Гиниатуллин А.Р., Науменко Н.В., Захаров А.В.) и студенты (Касимов М.Р., Яковлева А.А., Кудряшова К.Е., Закирьянова Г.Ф.).

### **Достоверность полученных данных**

Достоверность результатов исследования основана на использовании современных и адекватных методов, статистической обработке полученных данных и на достаточном объеме выборок.

### **Апробация работы**

Результаты диссертационного исследования представлены и обсуждены на международной конференции «Механизмы нервных и нейроэндокринных регуляций» (Москва, 2008), XXI и XXII съездах физиологического общества им. И.П. Павлова (Калуга, 2010 и Волгоград, 2013), Всероссийской конференции «Физиологические механизмы адаптации растущего организма» (Казань, 2010), международной конференции «Рецепторы и внутриклеточная сигнализация» (Пушино, 2011), III и IV съездах физиологов СНГ, (Ялта, 2011 и Сочи-Дагомыс, 2014), Международном форуме «Ломоносов» (Москва, 2012), VII Сибирском физиологическом съезде (Красноярск, 2012), международном конгрессе «Нейронаука для медицины и психологии» (Судак, 2012), IV съезде биофизиков России (Нижний Новгород, 2012), Международном форуме Federation of European biochemical societies congress (St. Petersburg, 2013), международном симпозиуме «Biological mobility: new facts and hypotheses» (Пушино, 2014), IV международной конференции «Современные проблемы системной регуляции физиологических функций» (Москва, 2015).

### **Публикации**

Основные результаты диссертации представлены в 57 печатных работах, в том числе 18 статьях в ведущих научных рецензируемых журналах, определенных Высшей аттестационной комиссией, и 1 монографии, 1 главе в коллективной монографии.

### **Структура и объем диссертации**

Диссертация изложена на 277 страницах, включает введение, обзор литературы, описание методов исследования, полученные результаты и их обсуждение, заключение, выводы, список литературы, содержащий 483 источника. Работа иллюстрирована 74 рисунками и 2 таблицами.

## 2. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 2.1 Общие представления о нервно-мышечном синапсе

Современные представления об устройстве синаптического аппарата изначально были сформированы при изучении нервно-мышечного контакта позвоночных. Доступность этого синапса дает возможность исследовать универсальные процессы синаптической передачи и механизмы их регуляции (Зефилов, Петров, 2010а).

Мышечные волокна иннервируются мотонейронами, тела которых залегают в спинном мозге либо стволе мозга. Отдельный мотонейрон направляет аксон к мышце, разделяется на веточки, управляющие многими мышечными волокнами. Подходя к мышечному волокну, аксональная веточка формирует тонкие конечные веточки, которые не покрыты миелиновой оболочкой и укладываются в желобки на поверхности мышечной мембраны, а сверху прикрываются отростками шванновских клеток. У млекопитающих большинство мышечных волокон иннервируются через один синапс одним аксоном. Вследствие этого в нервно-мышечном соединении нет синаптической интеграции; каждый потенциал действия нервной терминали вызывает один потенциал действия в мышечном волокне (Добрецов и др. 1983; Зефилов, Петров, 2010а). Нервно-мышечный синапс, также как и центральные синапсы, включает в себя три элемента: пресинаптическую область нервного окончания, постсинаптическую область (специализированную область мышечного волокна к которой прилегает нервное окончание) - двигательную концевую пластинку и разделяющую их синаптическую щель (Eccles, 1963; Зефилов, Петров, 2010а) (рис.1).

Нервные терминали заполнены содержащими медиатор ацетилхолин синаптическими везикулами диаметром 35-50 нм. Многие везикулы прикрепляются к электронно-плотным полоскам на пресинаптической мембране, другие разбросаны в цитоплазме. Эти полоски, обозначаемые активными зонами (АЗ), являются сайтами, где везикулы сливаются с плазматической мембраной, освобождая ацетилхолин в синаптическую щель (Jahromi, Atwood, 1974). В нервных окончаниях присутствуют также большие по размеру электронно-плотные везикулы (гранулы), содержащие нейропептиды, (такие как кальцитонин ген-связанный пептид, вазоактивный интестинальный пептид и др.), митохондрии, микротрубочки, микрофиламенты,

цистерны эндоплазматического ретикулама (ЭПР) (Зефилов, Петров, 2010а).



Рис. 1. Строение нервно-мышечного синапса лягушки (Robertson, 1983; Зефилов, Петров, 2010а)

В желобке на постсинаптической мембране имеются инвагинации шириной 50-100 нм – складки, которые значительно увеличивают площадь постсинаптической мембраны, усиливая эффект выделения кванта медиатора (Robertson, 1983). В нервно-мышечном синапсе лягушке напротив каждой АЗ имеются обычно 2 складки (рис. 1), у человека – 7-8. В постсинаптических складках заякорены никотиновые ацетилхолиновые рецепторы (нАХР), группирующиеся с максимальной плотностью (10000 на  $\mu\text{м}^2$ ) в регионе устья (Perer, McMahan, 1972). Такая кластеризация рецепторов в значительной степени достигается с помощью каркасных белков. Ацетилхолин взаимодействует с рецепторами в течение короткого времени, и его концентрация быстро уменьшается в синаптической щели вследствие разрушения ацетилхолинэстеразой и диффузии во внесинаптические регионы (Letinsky, De Cino, 1980).

Синаптическая щель «пронизана» базальной мембраной, проникающей глубоко в полость постсинаптических складок. Морфологических различий базальной мембраны в синаптическом и экстрасинаптическом регионе обычно не обнаруживается. Однако синаптическая базальная мембрана биохимически специализирована, так как содержит ацетилхолинэстеразу, компоненты, отвечающие за адгезию нерва к мышце и за их

взаимодействие в процессе развития (агрин, гепарин сульфат протеогликан, ламинин А, S-ламинин, неурегулин, тенасцин, энтактин, перлекан,  $\alpha$ -дистрогликан). Подобная организация базальной мембраны обеспечивает устойчивость и надежность механической связи пре- и постсинаптических мембран при сокращении мышцы (Зефилов, Петров, 2010а; Singhal, Martin, 2011).

Покрывающая нервную терминаль шванновская клетка пальцевидными отростками разделяет терминаль на отсеки (Ross-Canada et al., 1983; Haydon, 2001). Шванновские клетки обеспечивают не только защиту терминали от химических и механических повреждений, но и выполняют другие функции (Sugiura, Lin, 2011). Они фагоцитируют нервную терминаль после повреждения аксона и служат проводниками роста новых терминалей. Шванновские клетки чувствительны к аксональному потенциалу действия, имеют рецепторы к нейромедиаторам и модуляторам (Georgiou et al., 1999), могут влиять на синаптическую передачу (Robitaille et al., 1998) и синтезировать / секретировать ацетилхолин после денервации. На тесную связь между нервными терминалями и шванновской клеткой указывает наличие щелевых контактов (Rash et al., 2001).

Во многих отношениях синапсы между нейронами сходны с нервно-мышечными соединениями. И в тех и в других нервная терминаль содержит везикулы, покрыта глиальными отростками; пре- и постсинаптические мембраны утолщены и специализированы на освобождение нейромедиатора и его рецепцию (Зефилов, Петров, 2010а). Особенности центральных синапсов являются малые размеры, меньший запас синаптических везикул, поэтому небольшое количество везикул освобождает медиатор в ответ на потенциал действия. В межнейрональных синапсах отсутствует базальная мембрана, а постсинаптическая мембрана не образует складок. Только небольшая часть межнейрональных синапсов использует ацетилхолин в качестве нейромедиатора; соответственно, механизмы биосинтеза, повторного захвата и инактивации медиатора, а также хеморецепции, в них будут другими. Тем не менее в центральных и периферических синапсах наблюдается значительная гомология на белковом уровне (компонентов машин экзо- и эндоцитоза, каналов, рецепторов, внутриклеточных регуляторных систем). Таким образом, общие принципы работы нервно-мышечного синапса могут быть приложимы и к работе межнейрональных синапсов (Волков и др. 2011; Зефилов, Петров, 2010а).

## 2.2 Синаптическая везикула и общие понятия о пулах везикул

В some нейронах формируются предшественники синаптических пузырьков, которые почкуются от мембран ЭПР и комплекса Гольджи. Потом везикулы-предшественники цепляются моторными протеинами, кинезинами, которые по рельсам из микротрубочек быстро доставляют их к нервным терминалям (Foletti et al., 1999; Queralt, Goldstein, 2001). Незрелые везикулы характеризуются относительно большими размерами, необычной формой и белковым составом. Прибыв в нервное окончание, предшественники претерпевают несколько циклов экзо-эндоцитоза во внесинаптическом регионе, в результате происходит настройка белкового интерфейса и формирование зрелой синаптической везикулы (рис. 2).

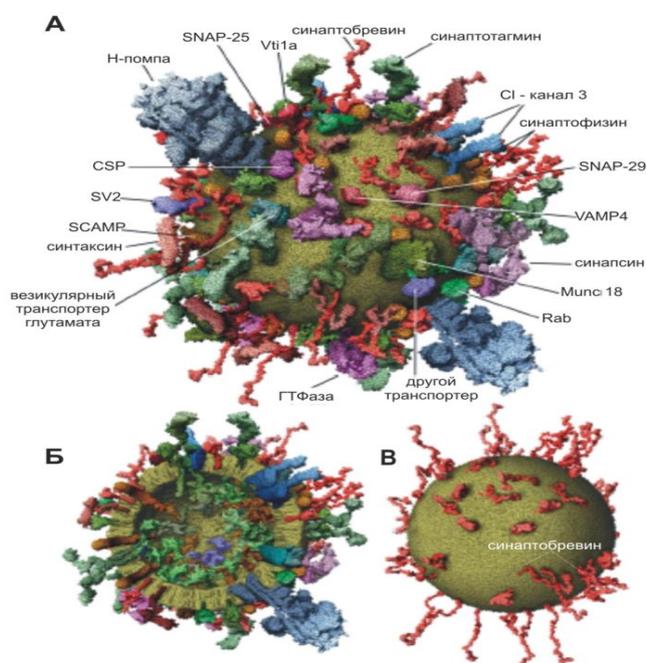


Рис. 2. Молекулярная модель синаптической везикулы (Takamori et al., 2006)

А – Трехмерная реконструкция везикулы. Б – вид везикулы в поперечном сечении, проходящим через ее середину. В – изображение везикулы, содержащей только синаптобревин (на одной везикуле обычно обнаруживается около 70 копий).

Важную роль в этом играют эндосомальные сортировочные станции (Matteoli et al., 1992, 2004). В некоторых случаях «отработавшие» везикулы (с «испорченными» белками) или везикулы, несущие нейротрофические сигналы (или вирусы), направляются при участии моторного белками динеина по аксону в тело нервной клетки (Queralt, Goldstein, 2001).

Синаптические везикулы содержат классические медиаторы, а также вспомогательные сигнальные молекулы (ко-медиаторы), например АТФ. Каждая синаптическая везикула составлена приблизительно из 10 000 фосфолипидов и 200 белков, по массе соотношение липиды : белки составляет 50% : 50% (рис. 2) (Jahn, Sudhof, 1993; Takamori et al., 2006). Везикулярные белки принадлежат к двум группам: транспортеры, опосредующие заправку медиатором (рис. 3) и перенос ионов ( $H^+$ ,  $Cl^-$ ,  $Zn^{2+}$ ) в полость везикулы; и белки-моторы, обеспечивающие движение везикулы. Везикулы содержат периферические мембранные белки (синапсины, рабфилин), белки, прикрепляющиеся к мембране через липидную группу (Rab3, CSP), и белки, пронизывающие один (синаптотагмины, синаптобrevины) или несколько (синаптофизины 1 и 2, синаптогирины, SV2s, SVOP, SCAMPs) раз мембрану (рис. 2). Многие протеины присутствуют в мембране в двух или более изоформах - синаптогирины, синаптотагмины, синаптобrevины, SV2, rab3, синапсины, и SCAMP (Зефиоров, Петров, 2010а).

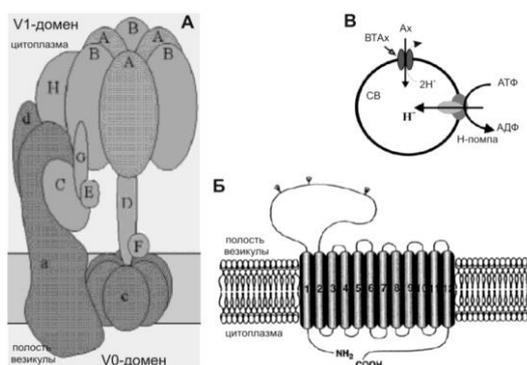


Рис. 3. Протонный насос и везикулярный транспортер ацетилхолина

А – Н-помпа состоит из двух частей (Morel, 2003): мембранной - V0 и цитоплазматической - V1. V1 домен состоит из 8 разных субъединиц (от А до Н). АТФ-связывающих субъединиц А и В содержится по 3 копии. V0 – домен включает по одной а и d –субъединице и гексамерное кольцо из протеолипидных с-субъединиц. АТФ гидролизуется тремя А-субъединицами, это вызывает поворот кольца из с-субъединиц V0-домена, а также D и F субъединиц V1 региона. Вращающиеся субъединицы иногда обозначают ротором. Поворот ротора вызывает транслокацию протонов, которые захватываются из цитоплазмы периферическим регионом гексамерного кольца. V1-домен может диссоциировать от V0. Б – Вторичная структура везикулярного транспортера ацетилхолина, включающая 12  $\alpha$ -спиральных пронизывающих мембрану доменов (Masson et al., 1999). В – Схема «заправки» везикул ацетилхолином.

Самый большой белок синаптических везикул (~1млн Дальтон) – это  $H^+$ -помпа. Обычно единственной копии этого насоса достаточно для функционирования везикулы (рис. 3). Насос составлен, по крайней мере, из 13 типов субъединиц (группирующихся в каталитический цитоплазматический V1 и мембранный V0 домены) и имеет размеры 14 x 14 x 24 нм, занимая 10% объема везикулы (Nishi, Forgac, 2002; Morel, 2003). Одна макромолекула насоса за миллисекунду формирует на мембране градиент  $H^+$  (в полости везикулы рН становится 5.2-5.5), достаточный для заправки нейромедиатором (Fykse, Fonnum, 1996). Везикулярный транспортер ацетилхолина в обмен на два  $H^+$  перемещает одну молекулу медиатора (рис. 3Б, В), в итоге в везикуле создается высокая концентрация ацетилхолина. Чем больше молекул транспортера (от 9 до 14 копий) в везикуле, тем обычно выше содержание медиатора в везикуле (Sudhof, 2004).

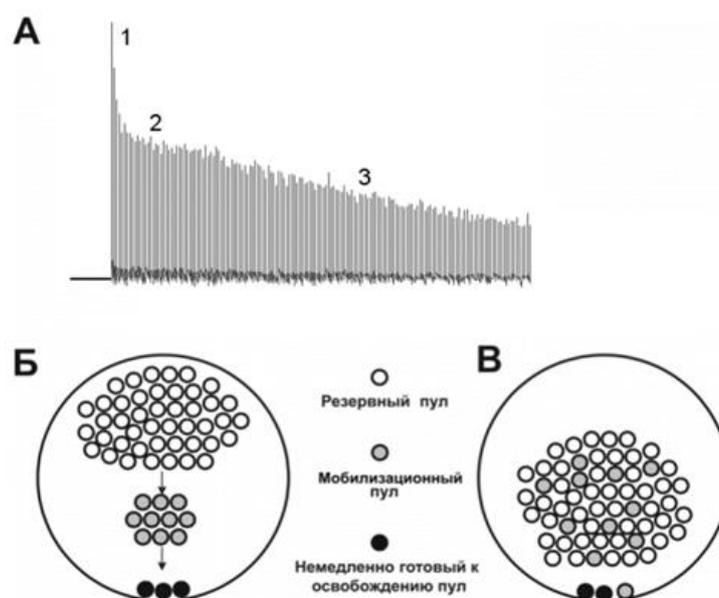


Рис. 4. Везикулярные пулы (Зефилов, 2007 с изменениями)

А- электрофизиологическое доказательство наличия трех различных везикулярных пулов. Динамика потенциалов концевой пластинки (ПКП) в нервно-мышечном синапсе лягушки при высокочастотном раздражении. Быстрый первоначальный спад амплитуды ПКП (1) отражает расходование небольшого по величине пула везикул, стабилизация амплитуды (2) – мобилизацию везикул из другого, несколько большего пула, а последующее медленное снижение (3)- расходование большого пула везикул. Б- схематическое изображение трех пулов, объясняющее электрофизиологические данные на А. Стрелками показано восполнение пулов при активности синапса. В - современные представления о распределении синаптических везикул разных пулов (Зефилов, Петров, 2010а).

В нервном окончании различных химических синапсов содержится от ста до нескольких сотен тысяч везикул, которые можно разделить на три пула (немедленно готовый к освобождению, рециклирующий (мобилизационный) и резервный), различающихся по величине, локализации и физиологической роли (Рис. 4) (Rizzoli, Betz, 2004; 2005; Зефирова, 2007; Зефирова, Петрова, 2010а). Готовый к освобождению пул составляют везикулы (1-2% от общей популяции), которые прикреплены к мембране активной зоны и немедленно используются при синаптической активности. Рециклирующий пул включает 5-20% всех везикул, быстро пополняющих немедленно готовый к освобождению пул по мере его расходования. Резервный пул – представлен везикулами (80-90% всех везикул), которые освобождаются только при интенсивной и длительной стимуляции после истощения рециклирующего пула (Richards et al., 2000, 2003; Зефирова, Петрова, 2010а). Некоторые авторы говорят о возможности совместного (параллельного) участия резервного и рециклирующего пулов в секреции медиатора (Зефирова и др., 2008а,б; Petrov et al., 2008; Захаров и др. 2012).

В естественных условиях многие синапсы транслируют следующие друг за другом высокочастотные пачки потенциалов действия. Это вызывает трату значительных запасов синаптических везикул. Однако опустошения популяции везикул в норме не наблюдается, так как одновременно с событиями экзоцитоза в нервных терминалях протекает формирование новых синаптических везикул эндоцитозом, которые направляются медиатором и доставляются в пулы для повторного участия в новом раунде экзоцитоза (Murthy, De Camilli, 2003, Зефирова, 2007). Совокупность этих событий обозначается рециклирование, а постоянный кругооборот везикул - везикулярный цикл (рис. 5) (Зефирова, Петрова, 2010а). При умеренной стимуляции освобождение медиатора обеспечивается в основном везикулами рециклирующего пула, без привлечения резервных везикул. Такая способность связана с тем, что в ходе активности везикулы рециклирующего пула подвергаются постоянному рециклированию: после экзоцитоза они быстро повторно образуются из поверхностной мембраны и затем заново участвуют в секреции медиатора (Зефирова, 2007; Зефирова, Петрова, 2010а).

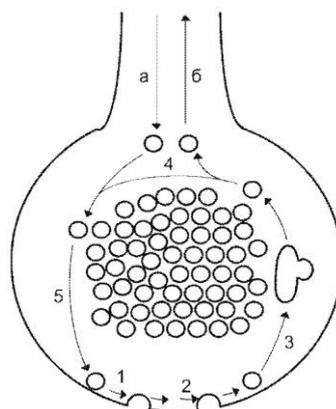


Рис. 5. Пресинаптический везикулярный цикл (Зефилов, 2007).

Везикулярный цикл включает экзоцитоз (1), эндоцитоз (2), иногда эндосомальную сортировку (3), внутриклеточный транспорт везикул с включением в везикулярные пулы (4) и последующую мобилизацию к пресинаптической мембране с подготовкой к экзоцитозу (5). В some нейронах образуются предшественники синаптических везикул и далее перемещаются в нервную терминаль (а). После определенного количества везикулярных циклов везикула направляется в тело нервной клетки для деградации (б) (Зефилов, 2007).

### 2.3 Активные зоны (АЗ) двигательных нервных окончаний

Пионерские исследования АЗ проведены на нервно-мышечном синапсе лягушки. Сам термин активная зона «*les zones actives*» был впервые предложен в 1970 Cousteaux и Pecot-Dechavassine для обозначения электронно-плотных пресинаптических полосок нервных терминалей амфибии. Ученые наблюдали появление контуров открытых синаптических везикул в области, прилегающей к плотной полоске, при фиксации нервно-мышечного препарата лягушки в момент раздражения двигательного нерва (Зефилов, Петров, 2010а). Позже при использовании метода замораживания-скалывания в области плотной полоски были обнаружены скопления крупных внутримембранных частиц, около которых наблюдаются углубления, являющиеся «отголосками» экзоцитоза (Dreyer et al., 1973; Heuser et al., 1979). Позднее эти частицы были идентифицированы как управляемые потенциалом  $\text{Ca}^{2+}$ -каналы и активируемые  $\text{Ca}^{2+}$   $\text{K}^{+}$ -каналы (Pumplin et al., 1981; Roberts et al., 1990; Robitaille et al., 1993; Evans, Zamponi, 2006). В целом, АЗ двигательного нервного окончания лягушки состоит из плотной полоски (длина 1-3 мкм, ширина 0.1 мкм), около которой сосредоточены  $\text{Ca}^{2+}$ -каналы,

$\text{Ca}^{2+}$ -активируемые  $\text{K}^+$ -каналы и 40-50 везикул, вытянувшихся в две шеренги (рис. 6А) (Pecot-Dechavassine, 1982).

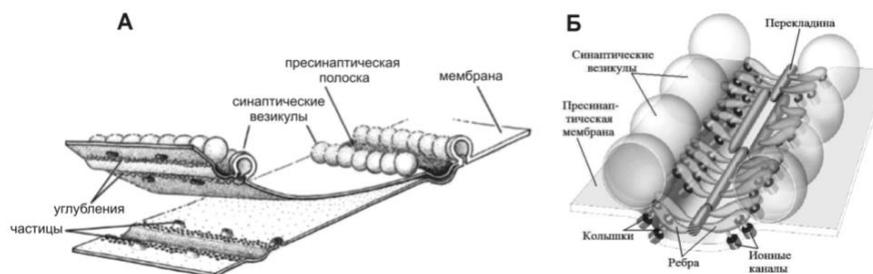


Рис. 6. Сайты экзоцитоза в нервно-мышечных контактах лягушки

А - Трехмерная реконструкция участка пресинаптической мембраны (метод замораживания – скалывания). На монослое пресинаптической мембраны, обращенном к цитоплазме, располагаются электронно-плотные ленты (полоски). По краям полоски (с обеих сторон) к мембране прикрепляются синаптические везикулы, в непосредственной близости от которых в мембране закорены электронно-плотные частицы –  $\text{Ca}^{2+}$ -каналы. В области АЗ наблюдаются углубления, отражающие процесс экзоцитоза синаптических везикул (Pecot-Dechavassine, 1982; Зефирова, Петров, 2010а). Б - молекулярная архитектура АЗ (электронно-микроскопическая томография) (Harlow et al., 2001 с изменениями).

В ходе электронно-микроскопического исследования Harlow и коллег (2001) было построено трехмерное изображение АЗ нервно-мышечного соединения лягушки (рис. 6Б). Были обнаружены строения из “балок”, расположенных вдоль полосок; к балкам крепились “ребра”, которые напрямую соединялись с синаптическими везикулами и через «крючки» взаимодействовали с интегральными макромолекулами, вероятно,  $\text{Ca}^{2+}$ -каналами. Обычно АЗ состояла из ~ 17 перекладин и 120 ребер (Zhai, Bellen, 2004).

Активные зоны в двигательных нервных окончаниях крыс и мышей иные (Зефирова, Петров, 2010а), что связано со структурными особенностями их нервно-мышечных контактов, которые формируются 3-4 нервными терминалями, содержащими по 3-5 расширений овальной формы (бутонов). В каждом бутоне (площадь – 5-10  $\mu\text{m}^2$ ) расположено от 10 до 20 АЗ (где докированы 0.3% всех везикул). Напротив каждой АЗ в мышечной мембране образуются 5-7 глубоких инвагинаций (складок). К каждой АЗ обычно прикреплены одна-две везикулы, вокруг которых в пресинаптической мембране концентрируется десяток  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов (рис. 7) (Nagwaney, et al., 2009). Столь

существенное снижение количества прикрепленных в АЗ везикул связано с увеличением площади и сопротивления постсинаптической мембраны, благодаря мембранным складкам (Зефилов, Петров, 2010а). Следует отметить, что один потенциал действия вызывает секрецию лишь 1-2 квантов из синаптического расширения, следовательно, только каждый десятый импульс вызывает экзоцитоз везикулы в отдельной АЗ (Slater, 2008).

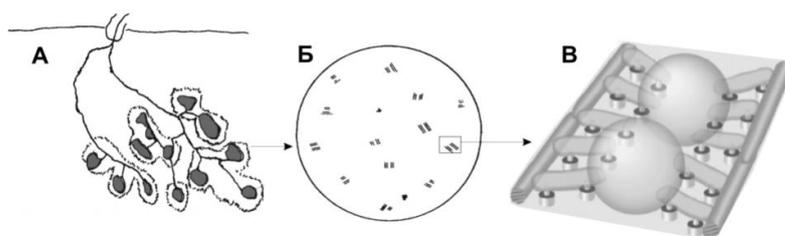


Рис. 7. Структура и распределение АЗ в двигательном нервном окончании мышцы (Slater, 2008, Nagwaney, et al., 2009, с изменениями).

А – аксон двигательного нерва, достигая мышечного волокна, ветвится на 3-5 терминалей, которые формируют несколько расширений, называемых синаптическими бутонами. Б - в одном бутоне могут локализоваться 10-20 АЗ. В – в каждой АЗ докированы одна или две везикулы (Зефилов, Петров, 2010а).

#### 2.4 Молекулярный механизм экзоцитоза

В нервной системе экзоцитоз отличается большой скоростью и сложностью регуляции со стороны многочисленных сигнальных каскадов и специфичных протеинов и липидов. Кроме того, синаптический экзоцитоз очень тесно связан с  $\text{Ca}^{2+}$  и более четко локализован (в АЗ), чем любой другой известный процесс слияния мембран (Зефилов, Петров, 2010а; Sudhof, 2004; Sudhof, Rizo 2011).

В АЗ осуществляются 4 основных процесса с участием везикул. Транспорт (мобилизация) везикул по направлению к АЗ завершается сцеплением (tethering) везикулы с цитоматриксом АЗ (1). Затем происходит прочная стыковка (докирование, 2) везикулы с АЗ: везикула точно локализуется напротив белков АЗ, обеспечивающих слияние мембран. Впоследствии везикула становится полностью компетентной к экзоцитозу и готова молниеносно ответить на приток  $\text{Ca}^{2+}$  (прайминг, 3). Праймированные везикулы «предохранены» специфичными факторами от неконтролируемого экзоцитоза, но способны быстро отреагировать на поступление  $\text{Ca}^{2+}$ .

В течение 0.2 мс после активации потенциал-зависимых  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов и увеличения  $[\text{Ca}^{2+}]$  в области АЗ происходит слияние мембран (4, собственно экзоцитоз) (Зефилов, Петров, 2010а). В широком смысле под экзоцитозом понимают весь комплекс реакций в АЗ (этапы сцепления, докиривания, прайминга и слияния), приводящий к освобождению медиатора; в узком смысле, экзоцитоз это только непосредственно стадия слияния.

Различают экзоцитоз с полным и неполным встраиванием мембраны везикулы в пресинаптическую мембрану. При «полном» варианте везикулярная мембрана уплощается в ходе слияния и становится частью пресинаптической мембраны, а при неполном экзоцитозе - между везикулой и пресинаптической мембраной формируется на короткое время пора слияния, проницаемая для молекул медиатора. После закрытия поры везикула либо «убегает», либо остается привязанной к пресинаптической мембране. Данный путь в шутку был назван «поцеловал и убежал» или «поцеловал и остался» («kiss and run» или «kiss and stay») (Sudhof, 2004; Зефилов, Петров, 2010а).

#### **2.4.1 Кратко о сцеплении и докиривании**

На первом этапе синаптические везикулы прикрепляются к белкам, формирующим “возвышения” над АЗ (Dresbach et al., 2001; Lenzi, Gersdorff, 2001). В центральных синапсах в состав возвышений входят белки синапсин и RIM (Phillips et al., 2001). RIM может «цеплять» синаптические везикулы через связывание с везикулярными белками Rab3a (Wang et al., 1997, 2002) и синаптотагмином (Schoch et al., 2002). Синапсины взаимодействуют с опорными белками цитоматрикса АЗ (актином, спектрином, нейрофиламентами) и в нефосфорилированном состоянии связываются с синаптическими везикулами через фосфолипид-связывающий сайт (Jovanovic et al., 2001). Возможно, возвышения облегчают первоначальное ориентирование (правильную посадку) везикулы в АЗ, что особенно важно при высокочастотной активности (Toonen et al., 2006; Becherer, Rettig, 2006). Большое значение сцепление имеет в синапсах сенсорной нервной системы, работающих в режиме проведения высокочастотных пачек импульсов. Здесь в прикрепление везикул вовлечены дополнительные белки (RIBEYE, piccolo, KIF3A, CtBP1, BRP) (Zanazzi, Matthews, 2009). Следует отметить, что сцепление синаптических везикул, скорее всего, не является обязательным в экзоцитозе синаптических везикул (Zhai, Bellen, 2004; Toonen et al., 2006; Зефилов, Петров, 2010а).

Докирование происходит с помощью взаимодействия везикулярных белков с белками пресинаптической мембраны (Зефилов, Петров, 2010а; Becherer, Rettig, 2006). Предполагают существование нескольких «цепочек» между везикулой и АЗ (рис. 8): синаптотагмин - SNAP-25 (Chieregatti et al., 2002), Rab3 - RIM -munc13 - синтаксин (Martelli et al., 2000; Hammarlund et al., 2008), Rab3а – рабфилин –SNAP25 (Tsuboi et al., 2007), MINT - Munc18 - синтаксин (Weimer, Jorgensen, 2003; Sudhof, 2004).

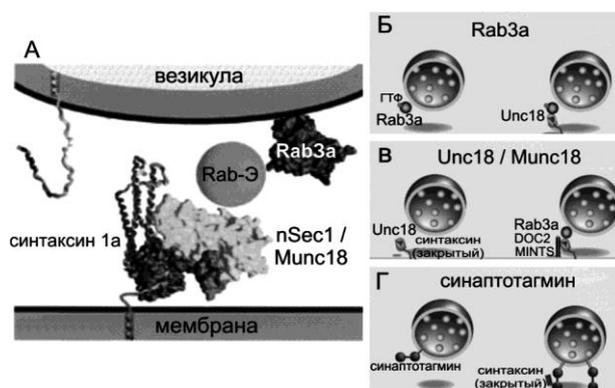


Рис. 8. Докирование синаптической везикулы (Weimer, Jorgensen, 2003)

А. - Белок nSec1 (названный Munc18 у млекопитающих, Unc18 у *Drosophila* и *C.elegans*) может прочно связываться и «камуфлировать» синтаксин 1а. Комплекс nSec1-синтаксин1а служит сайтом взаимодействия с прибывающей везикулой. Малая ГТФаза Rab3а, расположенная на поверхности везикулы, связывается со своим эффекторным белком (Rab-Э), который, в свою очередь, присоединяется к комплексу nSec1-синтаксин 1а. Б - Rab3а-ГТФаза способна напрямую присоединяться к комплексу unc18 - синтаксин. В - В докировании везикул могут участвовать белки Rab3а, Doc2 и MINT, последний соединяется одновременно с мембраной везикулы и nSec1 (Munc18). Г - Докирование везикул может облегчаться за счет взаимодействия везикулярного белка синаптотагмина с протеином АЗ синтаксином в закрытой конформации (Зефилов, Петров, 2010а).

#### 2.4.2 Прайминг и SNARE-комплекс

В слияния мембран задействованы SNARE-белки, обнаруженные на обеих мембранах и формирующие «плотно скрученный» комплекс (Chen, Sheller, 2001; Jahn et al., 2003). SNARE-белки характеризуются наличием в первичной структуре SNARE-мотива, включающего 70 аминокислотных звеньев. SNARE мотивы бывают 4-х сортов (R и Qa, Qb, Qc). Только когда 4 разных SNARE мотива собираются в 4-х спиральную

связку - «скручиваются», тогда формируется полноценный комплекс (рис. 9А). Формирующийся SNARE-комплекс может стягивать мембраны до их полного слияния (рис. 9Б), при этом скручивание SNARE-мотивов напоминает застегивание молнии на одежде (модель «застежки - молнии» мембранного слияния) (Зефилов, Петров, 2010а).

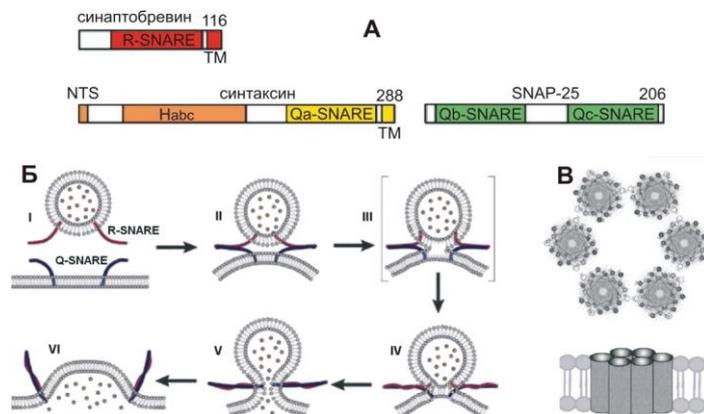


Рис 9. Роль SNARE-белков в слиянии мембран (Ungermann, Langosch, 2005).

А- Схематичное изображение доменной организации SNARE-белков. Б - Модель экзоцитоза синаптических везикул. (I) - R- и Q-SNARE мотивы не соединены друг с другом. (II) – происходит формирование SNARE-комплекса за счет связывания R и Q SNARE мотивов. (III) - SNARE-белки сильно перекручиваются, сокращая расстояние между мембранами до минимума. В итоге цитоплазматические монослои соседних мембран сливаются, везикула переходит в полу-слившееся нестабильное состояние (изображено в квадратных скобках). Впоследствии происходит формирование поры слияния (IV), которая может расширяться (V и VI). Возможно, везикулы ожидают своей судьбы, пребывая на стадии III или IV. В – Структурная модель поры слияния, формируемой трансмембранными сегментами синтаксинов. Спиральные сегменты шести молекул синтаксинов окружают пору слияния (Jackson, 2009). Для эффективного слияния везикулы необходимо формирование как минимум шести SNARE-комплексов, которые формируют «воротник» вокруг участка будущей поры. В естественных условиях реакцию слияния могут вести более десятка SNARE-комплексов (Зефилов, Петров, 2010а).

Основное значение в слиянии синаптических везикул имеют три SNARE белка (рис. 9А): на мембране активной зоны - синтаксин 1 (Qa-мотив) и SNAP-25 (с Qb- и Qc-мотивы), на везикулярной мембране - синаптобrevин (VAMP, с R-мотив) (Sollner et al., 1993). SNARE-белки, присутствующие на мембране везикулы, часто обозначают v-

SNARE (от слова vesicular). SNARE-белки (пресинаптические), на взаимодействие с которыми нацелены v-SNARE, называют t-SNARE (от слова «target») (Зефилов, Петров, 2010а; Rizo, Xu, 2015).

Предполагается, что при приближении мембран, происходящем с участием SNARE комплекса, везикула переводится в метастабильное состояние. В отношении его устройства есть несколько мнений (Jahn et al, 2003; Ungermann, Langosch, 2005; Jahn, Sheller, 2006). Первая модель “полуслившегося” состояния предполагает объединение только цитоплазматических монослоев мембран. Согласно второй - слияние мембран завершено формированием поры, которая закрыта до входа  $Ca^{2+}$  (рис. 9Б). В любом случае, метастабильное состояние может трансформироваться в открытую пору или возвращаться обратно в докированное состояние (депраймирование везикулы), когда SNARE комплекс разбирается (Sudhof, 2004; Ungermann, Langosch, 2005; Schaub et al., 2006). Процессы, обеспечивающие формирование SNARE комплекса, составляют этапы предслияния (прайминга) (Weimer, Jorgensen, 2003; Cheng et al., 2006; Rizo, Xu, 2015).

Наиболее медленным этапом сборки SNARE комплекса выступает связывание SNAP-25 и синтаксина (Nicholson et al., 1998). Для формирования SNARE комплекса необходим синтаксин в «открытой» конформации, а «в покое» синтаксин - закрыт (Dulubova et al., 1999). Синтаксин «замораживается» в закрытом состоянии цитозольным белком, названным Munc18 (у млекопитающих), nSec1 (у дрожжей), Unc18 (у *Drosophila* и *C.elegans*) – белки SM-семейства (Hata et al., 1993; Fisher et al., 2001). До начала образования SNARE-комплекса синтаксин должен освободиться от Munc18 (Dulubova et al., 1999, 2007). Однако для образования плотно скрученного SNARE-комплекса и сведения мембран близко друг к другу требуется, чтобы с синтаксином, уже взаимодействующим со SNAP-25, повторно соединился Munc18 (Rizo, Sudhof, 2002; Dulubova et al., 2007). Таким образом, Munc18 с одной стороны препятствует начальному этапу сборки SNARE-комплекса, однако с другой - катализирует последующую стадию «построения» SNARE-комплекса (рис. 10) (Rickman et al., 2007; Shen et al., 2007; Зефилов, Петров, 2010а; Rizo, Xu, 2015).

Отсоединение SM белка от синтаксина в закрытой конформации плотно регулируется. Белок Unc-13 у *C.elegans* (у млекопитающих аналог обозначается Munc13), связывающийся с диацилглицеролом, выталкивает Unc-18 из комплекса синтаксин-Unc18, и С-терминальный участок Unc13 стабилизирует синтаксин в

открытой конформации (Brose et al., 2000; Richmond, Broadie, 2002). Нокаут генов *Unc/Munc13-1* (у мышей, *C.elegans* и плодовых мушек) вызывает драматичное угнетение вызванного, синхронного освобождения медиатора (Augustin et al., 1999; Richmond et al., 1999; Basu et al., 2007). Причем, если у мышей повреждались одновременно два гена, кодирующих *Munc13-1* и *Munc13-2*, то исчезала и спонтанная секреция (Varoqueaux et al., 2002).

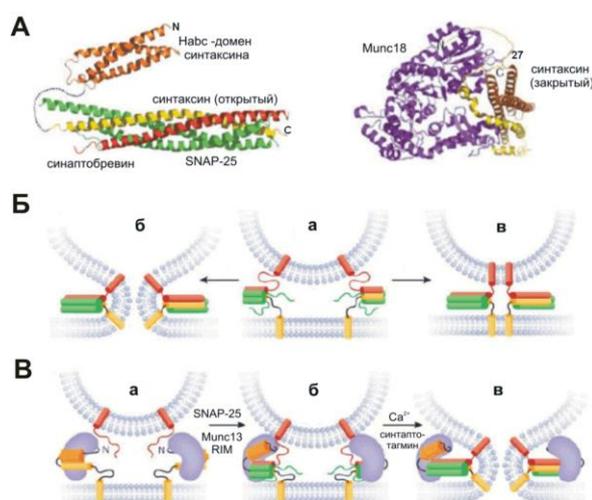


Рис. 10. Роль *Munc18-1* в функционировании SNARE-комплекса (Rizo, Rozenmund, 2008).

А- Слева - структуры SNARE комплекса и  $H_{abc}$ -домена синтаксина 1, который соединен со SNARE-мотивом с помощью связывающей последовательности. Справа - бинарный комплекс между *Munc18-1* и синтаксином-1 в закрытой конформации. Б - Частично собранный SNARE-комплекс (а) и его способность индуцировать слияние мембран при полной сборке (б) или оставаться полностью собранным между двумя мембранами (в), в случае если связь между SNARE-мотивами и трансмембранными регионами гибкая. В - Синтаксин-1 пребывает в закрытой конформации, которая стабилизируется *Munc18-1* (а). Затем *Munc18-1* вытесняется белком *Munc13-1* (при участии RIM), в результате синтаксин 1 переходит в открытую конформацию и начинает вовлекаться в формирование SNARE-комплекса. С частично собранным SNARE-комплексом (б) повторно взаимодействует *Munc18-1*, способствуя переходу SNARE-комплекса в полностью собранное состояние. При этом противоположные мембраны стягиваются, и, в ответ на вход  $Ca^{2+}$  и активацию синаптотагмина, происходит слияние мембран (в) (Зефиоров, Петров, 2010а).

Существует гипотеза, которая объясняет, как может происходить «активация» Munc13 белка. Попадая в АЗ, везикула связывается с помощью своего поверхностного белка Rab3a (ГТФаза) с белком RIM, входящим в цитоматрикс АЗ. Последний взаимодействует с Munc-13, который способствует переходу синтаксина в открытое состояние (Richmond, Broadie, 2002; Basu et al., 2007). Отсоединение Munc 18 от синтаксина может стимулироваться рядом протеинкиназ (Fletcher et al., 1999; Barclay et al., 2003), поскольку в фосфорилированном состоянии Munc18 имеет меньшее сродство к закрытому синтаксину (Craig et al., 2003).

Реакция слияния контролируется маленькими протеинами – комплексинами, которые способны взаимодействовать со SNARE-комплексом и внедряться в пазы между частично скрученными SNARE мотивами (Chen et al., 2002; Brunger, 2005). Дополнительная  $\alpha$ -спираль комплексина может выступать в качестве фактора, ингибирующего слияние, поскольку конкурирует со SNARE-мотивом синаптобrevина за связывание с синтаксином. N-концевой регион комплексина предотвращает подобное действие дополнительной  $\alpha$ -спирали и стабилизирует SNARE-комплекс. В целом, комплексина облегчают формирование «крепкого» SNARE-комплекса (максимально стягивающего мембраны), но «останавливают» финальную стадию слияния, переводя везикулу в режим ожидания стимула (Tokumaru et al., 2001; Schaub et al., 2006; Tang et al., 2006; Зефилов, Петров, 2010а). Комплексина играют важную роль в протекании  $\text{Ca}^{2+}$  вызванного синхронного экзоцитоза (Reim et al., 2001; Melia, 2007).

В прайминге синаптических везикул участвуют DOC2 белки, имеющие в своем составе два C2 домена. DOC2A и DOC2B реагируют на повышение внутриклеточного  $\text{Ca}^{2+}$ , после чего перемещаются к плазматической мембране и взаимодействуют с помощью C2-доменов ( $\text{Ca}^{2+}$ -зависимо) с фосфолипидами мембраны (Groffen et al., 2010), облегчая праймирование и расширение поры слияния (Fredrich et al., 2008).

Формирование SNARE-комплекса находится под контролем около нескольких десятков белков. Все три SNARE-белка (синтаксин, SNAP-25, синаптобrevин/VAMP), имеют своих специфичных эндогенных белков-ингибиторов (томозин, амизин, синаптофизины 1/2, спринг), которые предотвращают «несанкционированные» взаимодействия (Bacci et al., 2001; Gracheva et al., 2006; Зефилов, Петров, 2010а). С другой стороны, в нервном окончании присутствуют белки (Munc18, комплексина, DOC2, SV2), способствующие тонкой «настройке» собранного SNARE-комплекса. В

результате находится компромисс между «стабильностью» праймированной везикулы и ее готовностью слиться в ответ на «Ca<sup>2+</sup>-всплеск» (Tang et al., 2006; Shahin et al., 2008; Chang, Sudhof, 2009; Friedrich et al., 2010; Зефирова, Петров, 2010а).

На сегодняшний день представляется более вероятным, что SNARE белки являются важными, но не единственными компонентами машины слияния (Giraud et al., 2006; Зефирова, Петров, 2010а). Нокауты генов SNARE-белков показали, что экзоцитоз происходит и в их отсутствие, но в драматично ослабленной форме (Schoch et al., 2001 Washbourne et al., 2002). В синаптических контактах SNARE-комплекс в первую очередь необходим для быстрого вызванного Ca<sup>2+</sup> экзоцитоза. Интересно, что удаление гена Munc18-1 устраняет секрецию медиатора (экзоцитоз) полностью. Значит в синапсах Munc18-1 важнее для слияния, чем синаптобrevин или SNAP-25 (Rizo, Sudhof, 2002; Sudhof, 2004). Вероятно, этап приближения противоположащих мембран частично может быть осуществлен за счет других молекулярных механизмов и белков (Bruns, Jahn, 2002; Jahn et al., 2003; Sudhof, 2004; Зефирова, Петров, 2010а). Ряд авторов говорят о возможном участии V0-фрагмента H<sup>+</sup>-помпы синаптических везикул в Ca<sup>2+</sup> зависимом экзоцитозе, фазовых переходов мембран, индуцируемых Ca<sup>2+</sup>, изменений мембранного потенциала (Харакос, 2001; Nishi, Forgac, 2002; Morel, 2003; Weimer, Jorgensen, 2003; Зефирова, Петров, 2010а; Abdrakhmanov et al., 2013; Vavassori, Mayer, 2014).

### **2.4.3 Кальциевые сенсоры экзоцитоза**

Вход Ca<sup>2+</sup> через потенциал-активируемые Ca<sup>2+</sup>-каналы и последующее увеличение его концентрации является необходимым стимулом для запуска двух компонентов экзоцитоза синаптических везикул: быстрого синхронного освобождения с задержкой около 50 мкс от притока Ca<sup>2+</sup> и медленного асинхронного, продолжающегося ~ 1 с (Koh, Bellen, 2003; Зефирова, Петров, 2010а). В большинстве нервных терминалей наблюдается также спонтанное освобождение, которое вызывает множество постсинаптических эффектов, нацеленных на стабилизацию и контроль возбудимости постсинаптической мембраны. Например, спонтанная секреция медиатора, с одной стороны, предотвращает деградацию дендритных шипиков, а с другой - подавляет локальный синтез белков в дендритах (Sutton et al., 2006). Многие психоактивные соединения (каннабиноиды, кофеин, никотин, кетамин) модулируют спонтанное освобождение. Спонтанное

освобождение медиатора также зависит от  $\text{Ca}^{2+}$  и связано с активацией высокоаффинного  $\text{Ca}^{2+}$ -сенсора (Зефиоров, Григорьев, 2009; Xu et al., 2009).

Два белка синаптических везикул - синаптотагмин 1 и 2 – выступают в качестве сенсоров  $\text{Ca}^{2+}$  в ходе вызванного быстрого экзоцитоза (Chapman, 2002; Sorensen et al., 2003). Обычно нейроны экспрессируют синаптотагмины 1, хотя в мотонейронах синтезируются синаптотагмин 1 и 2 (Geppert et al., 1994; Koh, 2003; Leitzell, 2007). C2A- и C2B-домены синаптотагминов 1/2 связывают 3 и 2 иона Ca, соответственно (Stevens, Sullivan, 2003). Сродство C2-доменов к  $\text{Ca}^{2+}$  очень низкое (0.5-5мМ), но в  $10^3$  раз увеличивается при связывании с мембраной, так как отрицательно заряженные гидрофильные группы фосфолипидов облегчают взаимодействие с  $\text{Ca}^{2+}$  (Fernandez-Chacon et al., 2004). Синаптотагмин взаимодействует со SNARE-комплексом и перед входом  $\text{Ca}^{2+}$  действует как молекулярный «замок», ингибирующий слияние (Shin et al., 2003; Chen et al., 2005). Нокаут гена синаптотагмина 1 провоцирует увеличение спонтанного освобождения в гиппокампальных клетках (Kaeser, Regehr, 2014). При этом спонтанный экзоцитоз остается  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимым, но активируется более низкими концентрациями  $\text{Ca}^{2+}$ . Мутации, нарушающие связывание  $\text{Ca}^{2+}$  с синаптотагмином 1, устраняют как вызванный, так и спонтанный экзоцитоз. Таким образом, синаптотагмин 1, с одной стороны, сенсор синхронного вызванного экзоцитоза и спонтанного экзоцитоза, а с другой – блокатор более чувствительного к  $\text{Ca}^{2+}$  «запасного» сенсора спонтанного экзоцитоза. В синапсах коры мыши ~95% спонтанного экзоцитоза, вызывается связыванием  $\text{Ca}^{2+}$  с синаптотагмином 1 (Xu et al., 2009). Резервным сенсором асинхронного и спонтанного экзоцитоза может быть белок DOC2, взаимодействующий со SNARE комплексом в одинаковом с синаптотагмином регионе, однако имеющим в отличие от синаптотагмина значительно более высокое сродство к  $\text{Ca}^{2+}$  (Groffen et al., 2010; Kaeser, Regehr, 2014).

Механизм действия синаптотагмина связан со SNARE-опосредованным слиянием (рис. 11) (Bruns, Jahn, 2002; Diao et al., 2009; Sudhof, Rizo, 2011). Без входа  $\text{Ca}^{2+}$  синаптотагмин 1, связываясь с собранным SNARE-комплексом, занимает наиболее выгодное положение относительно  $\text{Ca}^{2+}$ -канала. Вход  $\text{Ca}^{2+}$  через канал и связывание  $\text{Ca}^{2+}$  с C2-доменами синаптотагмина запускает (1): изменение взаимодействия синаптотагмина со SNARE-комплексом (синаптотагмин соединяется с другим отрезком SNARE-комплекса), что вызывает удаление комплексов из углубления между

спиралями SNARE-комплекса, в результате везикула переходит в неустойчивое состояние; (2) притяжение гидрофобного региона C2-домена к отрицательно-заряженным фосфолипидам (в частности, фосфатидилсерину) мембранного перешейка везикула-АЗ. Фактически, синаптотагмин выполняет легкий точный «удар» по мембране, запускающий слияние (Fernandez-Chacon et al., 2004; Sudhof, 2004; Tang et al., 2006). Формирование комплекса  $\text{Ca}^{2+}$ -синаптотагмин-фосфатидилсерин может вести к дополнительному «накручиванию» SNAP-25 на синтаксин, что облегчает слияние (Bhalla et al., 2006). Вероятно, в случае асинхронного экзоцитоза SNARE-комплекс не стабилизирован комплексинами, и готовящиеся к слиянию мембраны недостаточно «стянуты» SNARE-белками (Tang et al., 2006).

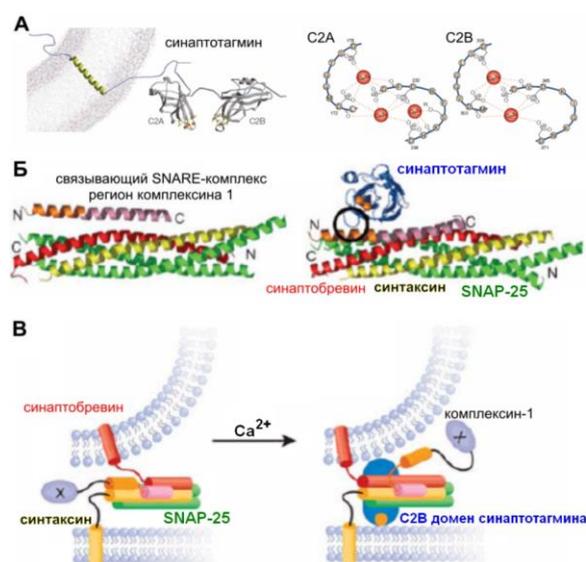


Рис. 11. Синаптотагмин. Взаимодействия с комплексинами и SNARE-комплексом (Charman, 2002; Rizo, Rozenmund, 2008 с изменениями; Зефилов, Петров, 2010а).

А - Доменная структура синаптотагмина I, содержащего два кальций связывающих домена (C2A и C2B). Справа - взаимодействие  $\text{Ca}^{2+}$  с C2-доменами. Б - Четырех спиральная связка SNARE-мотивов и фрагмент комплексина 1. Справа - наложение SNARE-комплекса, стабилизированного комплексинами-1, и синаптотагмина. Кружком обведен регион между C2B-доменом синаптотагмина и дополнительной спиралью комплексина-1. В- Слева - связывание дополнительной спирали комплексина с C-концом SNARE-комплекса ингибирует слияние. N-конец комплексина показан эллипсом с X- в центре, указывающим на неизвестность функции данного региона. Справа - при входе  $\text{Ca}^{2+}$  C2B-домен синаптотагмина вытесняет спираль комплексина, в итоге SNARE-комплекс может дополнительно «затянуться», облегчая слияние мембран.

В качестве  $\text{Ca}^{2+}$ -сенсоров для запуска асинхронного экзоцитоза синаптических везикул или освобождения электронно-плотных гранул могут выступать другие синаптотагмины (Grise et al., 2007; Melia, 2007). Кандидатами являются синаптотагмины 3, 6, 7, которые чувствительны к более низким (чем синаптотагмин 1 или 2) концентрациям  $\text{Ca}^{2+}$ , наблюдаемым после закрытия  $\text{Ca}^{2+}$ -канала (Sugita et al., 2002). Некоторые синаптотагмины могут  $\text{Ca}^{2+}$ -независимо контролировать экзоцитоз. Так, синаптотагмин-12, в ответ на фосфорилирование протеинкиназой A, ускоряет спонтанное освобождение медиатора из нервных окончаний гиппокампа (Maximov et al., 2007). Возможно, особенности экспрессии синаптотагминов определяют специфику  $\text{Ca}^{2+}$ -чувствительности экзоцитоза.

#### 2.4.4 Шапероны и экзоцитоз. Разборка SNARE комплекса

После слияния, но перед новым раундом экзоцитоза (Galli, Haucke, 2004), SNARE-комплекс разбирается при участии шаперона NSF (N-этилмалеимид-чувствительный фактор), который в клетке пребывает в виде гексамера. На первом этапе, SNARE-комплекс узнается ко-шапероном (помечает для шаперона цель)  $\alpha$ -SNAP, который дополнительно взаимодействует с мембраной. Затем, NSF узнает  $\alpha$ -SNAP и проникает к собранному SNARE-комплексу (субстрату). Это увеличивает АТФазную активность NSF, и он “осторожно” распутывает 4-х спиральную связку SNARE-мотивов (Scales et al., 2001; Зефилов, Петров, 2010а).

Вероятно, NSF может работать на разных стадиях везикулярного цикла. В соответствии с одной моделью, NSF разбирает SNARE-комплексы перед слиянием (Nichols et al., 1997). В этом случае синаптическая везикула и мембрана АЗ несут на своих поверхностях собранные SNARE-комплексы, оставшиеся от предыдущих раундов экзоцитоза (цис-SNARE-комплексы).  $\alpha$ -SNAP и NSF взаимодействуют с цис-SNARE-комплексами перед состыковкой в АЗ, в результате SNARE-комплекс разбирается, и на мембранах появляются SNARE-протеины. Теперь эти SNARE-белки могут образовывать новый, но уже не цис-, а транс-SNARE-комплекс. В этом случае синаптобrevин везикулы и белки АЗ, синтаксин и SNAP-25, образуют транс-SNARE-комплекс. После экзоцитоза ошибочно расположенные SNARE-белки могут соединяться с акцепторными протеинами, которые направляют SNARE-белки в корректный компартмент (Kuner et al., 2008). Эти данные согласуются с тем, что дуэт

SNAP-NSF намного эффективнее расплетает цис-SNARE-комплексы (Winter et al., 2009). Пребывание SNARE-комплексов в цис-состоянии может служить механизмом, предотвращающим неконтролируемые процессы экзоцитоза (Bar-On et al., 2009).

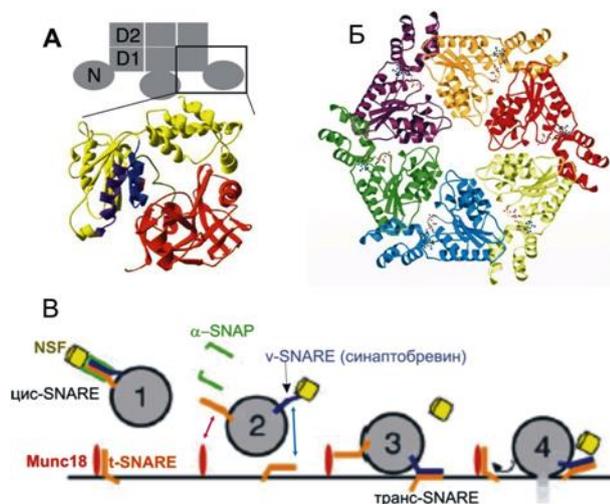


Рис. 12. Шаперон NSF и разборка SNARE-комплекса (Brunger, 2001; Kuner et al., 2008; Зефилов, Петров, 2010а)

А – Схема устройства NSF (показаны 3 субъединицы из 6). Мономер включает N-концевой регион (красный), D1(желтый) и D2-домены. Б – Гексамер D2-доменов NSF (Brunger, 2001). В- Модель действия NSF в цикле SNARE-белков в гигантских терминалях кальмара (Kuner et al., 2008 с изменениями). Везикулы содержат цис-SNARE комплекс, с которым связываются  $\alpha$ -SNAP и NSF (1).  $\alpha$ -SNAP и SNARE стимулируют АТФазную активность NSF, в результате SNARE-комплекс разбирается в течение 3-9 с (медленное действие NSF) (2). NSF может оставаться связанным с мембраной везикулы после отсоединения  $\alpha$ -SNAP. Освобожденные SNARE белки формируют транс-SNARE комплекс (3). Готовые к освобождению везикулы могут секретировать медиатор в ходе  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой реакции слияния (4), которая регулируется быстрой активностью NSF (менее 0.5 сек). Для ускорения сортировки эктопические SNARE белки (например, синтаксин и SNAP-25 на везикуле) могут связываться с акцепторными белками. Например, Munc18 (красный) соединяется с везикулярными t-SNARE белками (3). После слияния эктопические SNARE сортируются в корректный компартмент (показано стрелкой) (4). Образовавшийся SNARE комплекс попадает затем в синаптические везикулы в процессе эндоцитоза. NSF- желтый,  $\alpha$ -SNAP – зеленый, v-SNARE - синий, t-SNARE - оранжевый (Зефилов, Петров, 2010а).

Согласно другой гипотезе,  $\alpha$ -SNAP и NSF функционируют после экзоцитоза, но до эндоцитоза. При этом разделение v-(синаптобревин) и t-(синтаксин и SNAP-25) SNARE протеинов осуществляется, когда белки пребывают в поверхностной мембране (Littleton et al., 2001). После разъединения синтаксин и SNAP-25 локализуются в пресинаптической мембране, а синаптобревин эндоцитозом направляется в везикулу. NSF может действовать на SNARE-комплекс в ходе слияния, способствуя правильному скручиванию SNARE-белков и олигомеризации SNARE-комплексов вокруг места посадки везикулы (Tokumaru et al., 2001). Белок динамин, образующий сжимающийся воротник в области перешейка между образующейся везикулой и плазматической мембраной во время эндоцитоза, может взаимодействовать с t-SNARE. Это может обеспечивать закрытие поры слияния, не допуская коллапса (полного встраивания) везикулы в пресинаптическую мембрану. Раскручивая комплекс динамина и t-SNARE белков, NSF может управлять «судьбой» поры слияния (Peters et al., 2004). Возможно, некоторые изоформы NSF могут взаимодействовать со SNARE-комплексами перед слиянием или непосредственно после формирования / открытия поры, тогда везикула может снова перейти в докированное состояние или произойти смыкание поры, соответственно (May et al., 2001; Brunger, 2005). Осуществление kiss-and-run варианта освобождения в секреторных клетках может зависеть от фосфорилирования протеинкиназой С шаперона NSF (Cousin, Robinson, 2000; Matveeva et al., 2001; Зефирова, Петров, 2010а).

## 2.5 Эндоцитоз синаптических везикул

В пресинаптических нервных терминалях обнаружены несколько типов эндоцитоза. Однако образование большинства новых синаптических везикул (~90%) эндоцитозом, даже в ответ на единичные потенциалы действия, обязательно требует участие белка - клатрина (Girard et al., 2005; Granseth et al., 2006; Newton et al., 2006). В нервно-мышечных синапсах плодовой мушки нарушение легких цепей клатрина вызывает опустошение популяции синаптических везикул после длительного раздражения (Heerssen et al., 2008). Существуют два главных варианта клатринового эндоцитоза, характерные и для центральных и для периферических синаптических контактов (рис. 13): быстрый эндоцитоз (секунды - минута), протекающий на плоской поверхности мембраны, и медленный (минута и более, «объемный» от англ. «bulk»),

функционирующий на поверхности эндосомо-подобных структур и инвагинаций (Royle, Lagnado, 2003; Dittman, Ryan, 2009). Причем инвагинации в мембране формируются очень быстро и только в ответ на интенсивный экзоцитоз, а вот для образования из них везикул требуется значительное время (Clayton, Cousin, 2009). Возможно, в подобных компартаментах мембраны в процессе эндоцитоза осуществляется проверка белков. Белки с дефектами могут упаковываться в особые везикулы и транспортироваться в эндосомальные сортировочные станции (Wucherpfennig et al., 2003; Rizzoli, Betz, 2005), на территории которых они либо исправляются, либо адресуются в лизосомы для деградации. Это оберегает синаптический контакт от накопления поврежденных протеинов, которые могут усиленно образовываться при синаптической передаче, поскольку при экзо-эндоцитозе белки, вовлекаясь во многие взаимодействия, могут «ломаться» (Зефилов, Петров, 2010а).

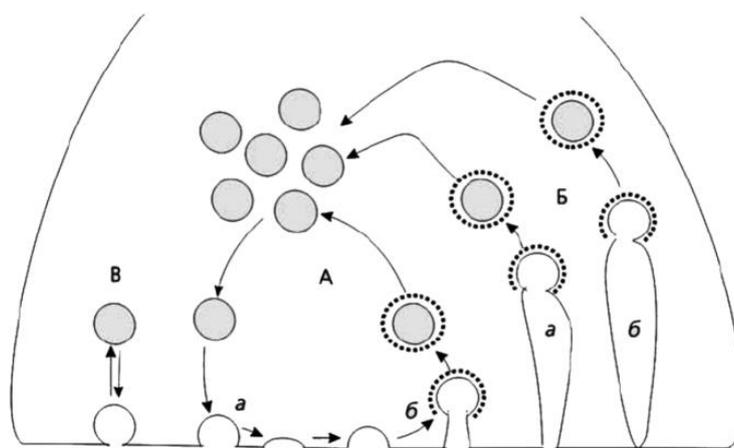


Рис.13. Варианты эндоцитоза синаптических везикул в нервном окончании (Зефилов, Петров, 2009)

А - после освобождения нейромедиатора экзоцитозом (*a*) при участии клатрина (пунктир) формируется новая везикула (*б*). Б – вслед за массивным экзоцитозом в пресинаптической мембране появляются инвагинации, размеры которых существенно превышают размеры везикулы (*a*). Эти инвагинации могут отделиться от поверхностной мембраны, формируя цистерны – эндосомоподобные образования (*б*), от которых почкуются новые пузырьки, напоминающие по размерам синаптические везикулы. В - «kiss and run» путь освобождения медиатора заключается в образовании поры слияния, которая вскоре закрывается и везикула «убегает» в глубь нервного окончания.

Некоторые авторы предполагают возможность сверх быстрого механизма образования везикул (kiss-and-run), не зависящего от молекул клатрина и протекающего в пределах миллисекунд (до 1 с) (Табл. 1). Возможно, небольшая популяция везикул при слабой синаптической активности может освобождать медиатор kiss-and-run путем (Ceccarelli et al., 1973). В этом случае между мембраной АЗ и везикулой образуется перешеек, внутри которого открывается пора слияния, пропускающая молекулы медиатора в синаптическую щель, но быстро закрывающаяся. Фактически, при подобном сценарии, эндоцитоз обозначает закрывание поры и отсоединение везикулы от АЗ (рис. 13) (Зефилов и др., 2004, 2006; Fesce et al., 1999; Harata et al., 2006; He, Wu, 2007; Rizzoli, 2014). Kiss and run путь был обнаружен (хотя косвенными методами) в некоторых синапсах (гиппокамп, чашеобразные нервные окончания слуховой системы) только в специфичных, обычно «экстремальных» условиях. Есть предположение, что после kiss and run везикулы могут быстро (1 с) сливаться с эндосомами, из которых клатрин-зависимый эндоцитоз за 3-5 с может формировать синаптические везикулы, компетентные для участия в следующем раунде экзоцитоза (Watanabe, 2015).

Табл. 1. Скоростные характеристики эндоцитоза (Зефилов, Петров, 2010а)

Объект	Эндоцитоз			Ссылки
	Kiss-and-run	быстрый	медленный	
синапсы гиппокампа	~3 с	10-15 с	~2-3 мин	Granseth et al., 2006 Balaji, Ryan, 2007 Zhu et al., 2009
нервно-мышечные синапсы лягушки		20-60 с	~5-10 мин	Зефилов и др. 2004 Зефилов и др. 2008а Richards et al., 2000
нервно-мышечные синапсы мыши	?	20-60 с	~2-5 мин	Зефилов и др. 2008б Reid et al., 2003 Tabares et al., 2007
биполярные нейроны сетчатки золотой рыбки	1-2 с	~15 с	~40-60 с	Jockusch et al., 2005 Llobet et al., 2003
сенсорные волосковые клетки саккуллюса лягушки	менее 1 с	~6 с	~30-50 с	Schnee et al., 2005 Paillart et al., 2003
Чашеобразные синапсы Хелда грызунов	менее 1 с	~15 с	~ 60-70 с	He et al. 2007 Wu, Wu, 2007 Renden, Gersdorff, 2007

Существуют смелые гипотезы о том, что опосредуемое kiss and run порционное выделение одного кванта (в этом случае пора закрывается настолько быстро, что запас медиатора в везикуле не успевает опустошиться) контролирует чувствительность постсинаптических рецепторов, способствуя их десенситизации. В частности, в гиппокампальных нервных окончаниях освобождение небольших (меньше чем квант) порций глутамата может ускорять десенситизацию AMPA-рецепторов (Richards, 2009). Kiss-and-run путь является главным механизмом секреции нейромодуляторов пептидной и белковой природы, содержащихся в электронно-плотных гранулах и располагающихся около АЗ (Li et al., 2005).

Белки синаптических везикул после экзоцитоза могут «уноситься» из синаптической мембраны латеральной диффузией и попадать в аксон, где также может протекать эндоцитоз, главное назначение которого поймать «сбежавшие» из синапса везикулярные белки. Конечно, аксональный эндоцитоз протекает с существенно меньшей эффективностью, чем синаптический, поэтому и белков, обеспечивающих эндоцитоз, в аксоне значительно меньше (Yao et al., 2003). Белки эндоцитоза могут покидать синапс и попадать в аксон вслед за везикулярными белками. Интересно, что перемещение эндоцитозных белков наблюдается практически сразу после освобождения медиатора экзоцитозом (Granseth et al., 2007). Образующиеся в ходе аксонального эндоцитоза везикулы сначала сливаются в эндосому, где происходит сортировка белков и формирование «надлежащей» белково-липидной композиции, из которой формируется новая компетентная к слиянию везикула (Dittman, Ryan, 2009).

### **2.5.1. Кратко о механизмах клатрин-опосредованного эндоцитоза**

Ключевой белок эндоцитоза, клатрин, напоминает «ногу с коленом», благодаря гибкости которого клатрин может приспосабливаться к разной геометрии мембраны (рис. 14). На конце «ноги» клатрина имеется структура в виде «ступни», которая при сборке клатринового покрытия ориентируется к мембране и участвует в распознавании адаптерных белков эндоцитоза (AP-2, AP-180, амфифизин, эпсин, аррестин). Противоположный конец «ноги» участвует в объединении мономеров клатрина в трискелию – «трехногий» тример. Отдельные трискелии могут соединяться в плоские или корзино-подобные решетки (рис. 14) (Royle, 2006; Jung, Haucke, 2007).

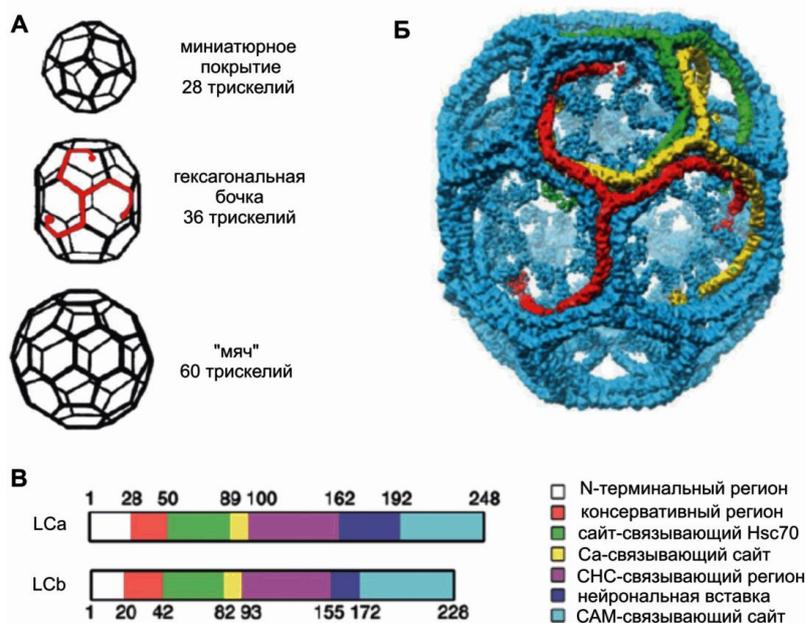


Рис. 14. Молекулярное строение клатрина и клатринового покрытия (Royle, 2006)

А - Примеры клатриновых решеток с различной геометрией. Б - Клатриновая гексагональная бочка (показаны только СНСs – тяжелые цепи клатрина). Три трискелии выделены, чтобы показать, как трискелии взаимодействуют в решетке. В - Схематическое изображение легких цепей клатрина LCa и LCb.

В ходе эндоцитоза сначала адаптерные белки (адаптируют клатрин к поверхности) соединяются с регионами поверхностной мембраны, после чего с адаптерными протеинами связываются трискелии клатрина (Granseth et al., 2007; Зефилов, Петров, 2009). Главный адаптерный протеин, AP-2, включает 4 субъединицы, разные по размеру: маленькую ( $\sigma_2$ ), среднюю ( $\mu_2$ ) и две большие ( $\alpha$ ,  $\beta_2$ ). Субъединицы образуют макромолекулярный комплекс, напоминающий голову с двумя гибкими симметрично расположенными придатками / ушками (рис. 15А) (Kirchhausen, 2000). Голова AP-2 прочно соединяется с фосфолипидами (точнее с фосфатидилинозитол-4,5-бифосфатами) мембраны, а также взаимодействует с определенными аминокислотными последовательностями (эндоцитозными мотивами) и целыми доменами некоторых поглощаемых белков. Когда AP-2 взаимодействует с мембраной его ушки (придатки) обращены к цитоплазме, а основание головы к мембране. Придатки AP-2 улавливают молекулы клатрина (в форме трискелей) из цитоплазмы (рис. 15А) (Grass et al., 2004). Для формирования клатринового покрывала требуется вовлечение дополнительных

факторов. Белок Eps15 (тетрамер) связывается одновременно с четырьмя адаптерными белками на мембране и опосредует концентрирование AP-2 в определенном регионе. Так создается платформа (Eps15+4AP-2») для крепления и начала монтажа клатриновой решетки (Mettlen et al., 2009). В ходе ее образования везикулярные липиды и белки «привлекают» адаптерные протеины, а формирующееся клатриновое покрытие с адаптерными белками — находит и секвестрирует везикулярные компоненты. Такой механизм делает покрытие молекулярным сортировщиком определенных белковых грузов (белков, входящих в состав везикул) (Зефирова, Петров, 2009).

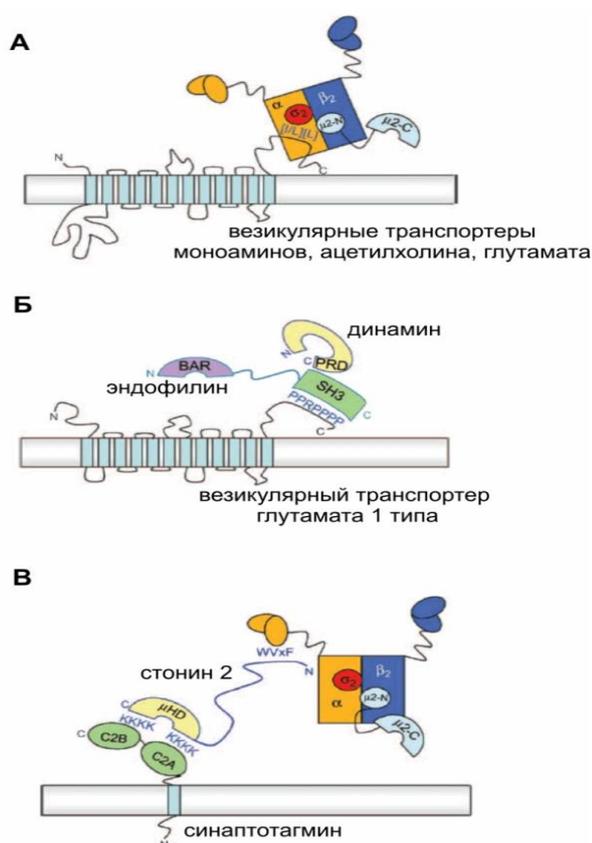


Рис. 15. Молекулярные механизмы сортировки некоторых везикулярных белков в ходе клатрин-опосредованного эндоцитоза (Jung, Haucke, 2007 с изменениями)

А – Узнавание мотивов типа D/ExxL[LI], принадлежащих везикулярным транспортерам медиаторов (моноаминов, ацетилхолина, глутамата -VMAT2, VAcChT, VGLUT1) с помощью AP-2. Б – Узнавание транспортера глутамата (VGLUT1) зависит от взаимодействия богатого пролином мотива (его цитоплазматического конца) с SH3 доменом белка эндオフィлина. Этот механизм действует совместно с показанным на А способом. В –  $\text{Ca}^{2+}$ -сенсор экзоцитоза синаптотагмин сортируется при помощи специального адаптера стонина 2, который впоследствии связывается с AP-2 (Зефирова, Петров, 2010а).

Начальный этап формирования клатриновой решетки требует участия белков AP-180 и эпсина, которые взаимодействуют с AP-2 (Рис. 16). Они связываются с фосфолипидами мембраны и некоторыми интегральными белками (везикулярным синаптобrevином). Кроме того, они содержат участки для прикрепления к клатрину, т.е. могут выступать в качестве моста между клатрином и компонентами синаптической везикулы (Jung, Haucke, 2007). Для AP-2 и эпсина характерны специфичные черты (Itoh, De Camilli, 2006). Монтаж клатринового покрытия происходит существенно быстрее, если участвуют одновременно AP-2 и AP-180. Ни один из адаптеров в одиночку не способен так ускорить сборку. Первоначальная посадка и ориентация AP-2 на «нужном» регионе мембраны происходит при участии эпсина. В ходе сборки покрытия эпсин вытесняется в краевые участки, где способствует искривлению мембраны в почку. AP-180 остается в пределах покрытия в ходе всего времени эндоцитоза (Jakobsson et al., 2008). Эпсин (и Eps15) обладает способностью узнавать белки, к которым пришит 75-членный пептид убиквинтин. Эта модификация осуществляется убиквинтин-лигазой и направляет грузы в лизосомы и протеосомы. Обычно убиквинтином метятся дефектные белки синаптических везикул, рецепторы, ионные каналы, которые необходимо разрушить (Зефилов, Петров, 2009).

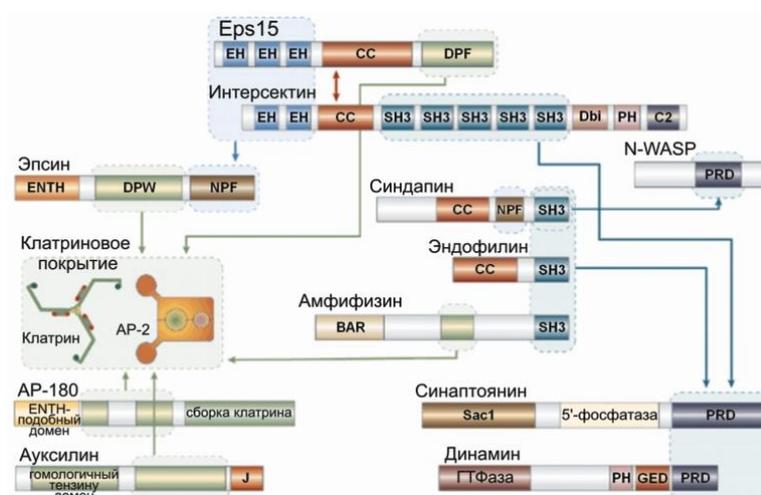


Рис. 16. Ключевые белки клатрин-опосредованного эндоцитоза синаптических везикул (Slepnev, De Camilli, 2000)

Стрелками указаны взаимодействия между доменами белков, вовлеченных в эндоцитоз. Некоторые белки связываются напрямую как с AP-2 (через его придаточные домены), так и тяжелой цепью клатрина. Многие из изображенных взаимодействий регулируются фосфорилированием и фосфатидилинозитол-4,5-бифосфатами (Зефилов, Петров, 2010а).

Таким образом, в ходе образования клатриновой решетки *in vivo* происходят взаимодействия AP-180, эпсина и Eps15 (Mousavi et al., 2004; Itoh, De Camilli, 2006; Andersson et al., 2008). Сначала к мембране присоединяются несколько молекул эпсинов, вслед за которыми рекрутируются AP-2, Eps15 и небольшое количество трискеллий клатрина. Eps15 формирует комплекс с несколькими молекулами AP-2 и AP-180. Образовавшийся макромолекулярный ансамбль стимулирует быстрое объединение трискеллий клатрина в решетку. По мере разрастания клатринового покрытия эпсин выталкивается на край покрытой клатрином мембраны. Концентрирование эпсинов по контуру клатриновой решетки способствует легкому искривлению мембраны и появлению ямок. Дальнейшее искривление мембраны (Рис. 17), ведущее к образованию глубоких покрытых клатрином ямок, осуществляют другие белки, эндофилин и амфифизин (Зефилов, Петров, 2009).

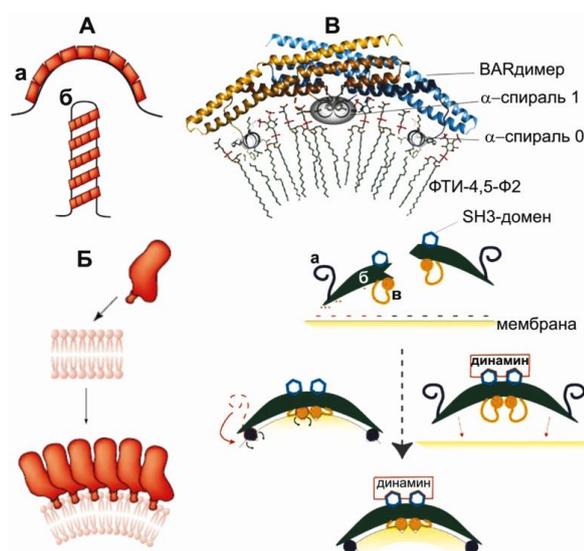


Рис. 17. Опосредованная белками деформация мембраны (Farsad, De Camilli, 2003; Gallop et al., 2005)

А - Белки при полимеризации образуют (а) агрегаты в виде сфер (например, адаптерные белки и клатрин) или (б) спиралей (динамин). Это приводит к искривлению мембраны и определяет ее форму. Б - Амфипатичная спираль некоторых белков (эпсина, эндофилина) проникает в зазоры между липидами и расталкивает их, в результате увеличивается площадь одного монослоя мембраны относительно другого и мембрана деформируется. В – сверху: взаимодействие N-BAR домена эндофилина с монослоем мембраны. Снизу: механизм функционирования N-BAR доменов эндофилина. N-BAR домен состоит из 3 частей: N-концевая α-спираль 0 (а), BAR-мономер (б), С-концевая внутренняя α-спираль 1(в).

Рис. 17 (продолжение)

Отрицательно заряженная поверхность мембраны притягивает мономеры эндофилина, следующее затем встраивание обоих  $\alpha$ -спиралей способствует деформации мембраны. Одновременно протекает димеризация BAR-доменов, стабилизирующая искривление. Запустившаяся деформация мембраны облегчает прикрепление следующих BAR-доменов. Связываясь с определенными белками,  $\alpha$ -спирали эндофилина могут действовать в роли сортировщиков (Зефиоров, Петров, 2010а).

Способность эписина, эндофилина и амфифизина искривлять мембрану зависит от присутствующей в их структуре амфифильной (имеющей гидрофильные и гидрофобные участки)  $\alpha$ -спирали (рис. 17). Когда эта спираль с помощью гидрофобного региона внедряется в цитоплазматический монослой мембраны, то происходит увеличение площади листка мембраны, следовательно, энергетические траты на образование мембранной почки резко снижаются (Gallop et al., 2005; Itoh, De Camilli, 2006). В сайтах активного эндоцитоза часто обнаруживается густая сеть актиновых филаментов, для которой характерна высокая динамичность (разборка-сборка). Вероятно, это связано со значением актина в затягивании покрытой клатрином почки вглубь клетки с помощью механизма векторной полимеризации (Merrifield et al., 2005).

Выделенные из клеток молекулы клатрина в пробирке могут спонтанно образовывать корзино-подобные решетки (самосборка) (рис. 18). Следовательно, искривленная форма клатринового полимера – свойство самого покрытия. Поэтому возможно, что полимеризация клатрина облегчает деформацию мембраны с образованием почки (McMahon, Gallop, 2005). Однако, в большинстве работ приводятся аргументы в пользу того, что само по себе формирование клатринового покрытия не вызывает искривление мембраны, покрытие пассивно прилаживается к образующемуся изгибу. Клатриновое «покрывало» необходимо для «фиксации и стабилизации» почкующейся мембраны. Функция клатрина в почковании мембран объясняется моделью «Броуновской защелки», согласно которой исходно ровная плазматическая мембрана деформируется в ходе тепловых (броуновских) колебаний и воздействия определенных белков (например, содержащих BAR-домен). Клатриновая решетка прилаживается к образующейся кривизне и «защелкивает» обращенные внутрь изгибы

мембраны, до тех пор пока не сформируется оптимальная для клатриновой корзины кривизна (Hinrichsen et al., 2006; Зефилов, Петров, 2009).

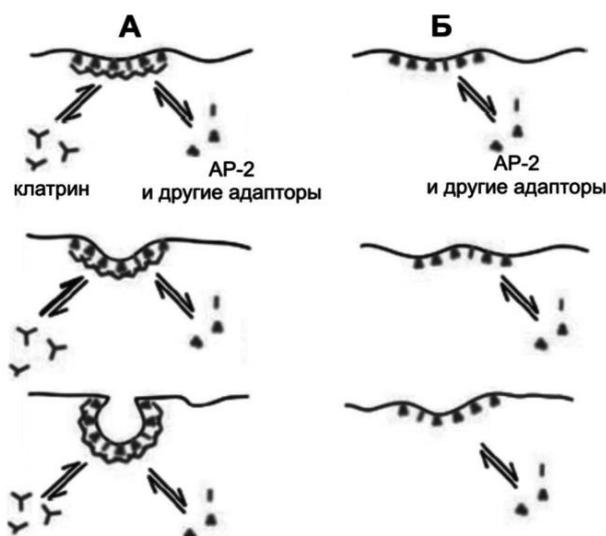


Рис. 18. Модель «Броуновской защелки» в формировании мембранной почки (Hinrichsen et al., 2006)

А - Эндоцитоз начинается с присоединения адаптеров (AP-2), дополнительных белков и клатрина к мембране. Мембрана изгибается за счет случайных тепловых колебаний (броуновское движение). Клатриновое покрытие может прилаживаться к новой кривизне мембраны и изменять свой размер, поскольку как клатрин, так и адаптеры могут относительно свободно переходить из растворенного состояния в состав полимера, и обратно. Клатрин легко полимеризуется в стабильные закрытые корзины, так как высокая кривизна клатриновой решетки энергетически более выгодная конфигурация полимера. Благодаря этому, клатриновое покрытие стабилизирует («защелкивает») направленные внутрь клетки выпячивания плазматической мембраны, деформация которой продолжается до момента достижения оптимальной кривизны. Б- В клетках, лишенных клатрина, молекулы AP-2 также высаживается на мембрану и «ловят» термальные флуктуации мембраны, но нарушена направленность процесса (Зефилов, Петров, 2010а).

Область соединения глубокой покрытой ямки с плазматической мембраной внешне напоминает «шею» (перешеек) - это сайт разделения мембран. В разделении задействованы, ряд белков, последовательные взаимодействия между которыми необходимы для осуществления реакции. В частности, в перешейке концентрируются эндофинин, амфифинин и динамин. Выделено несколько изоформ динамина, для

которых характерен разный паттерн экспрессии. Динамин 1 обнаруживается в мозгу, 2 — почти во всех тканях, 3 — исключительно в яичках. Динамины имеют ГТФазную активность (катализируют превращение ГТФ в ГДФ), связанную с одноименным доменом. В естественных условиях структурной единицей динамина является тетрамер, который формируется при взаимодействии ГТФазного домена одной молекулы с GED-домен (GTPase effector domain) другой по типу конец в конце (Рис. 19) (Praefcke, McMahon, 2004).

Поэтапно разделение мембран можно описать в виде следующей последовательности событий (Зефилов, Петров, 2009). 1) Сначала к покрытой клатрином глубокой почке присоединяется амфифизин, притягивающий тетрамеры динамина в ГДФ-загруженном состоянии. 2) Динамин дополнительно связывается с фосфолипидами мембраны, и (3) в молекуле динамина ГДФ заменяется на ГТФ. В результате динамин отделяется от клатриновой решетки, и (4) динамин (включающий ГТФ) формирует в области перешейка воротник в виде обруча или пружино-подобной спирали. 5) Объединение молекул динамина в десятки раз стимулирует собственную ГТФазную активность динамина, в ходе превращения ГТФ в ГДФ структура динаминового полимера быстро меняется, и покрытая клатрином везикула освобождается в цитоплазму. 7) Затем конструкции из ГДФ-динамина разделяются на отдельные тетрамеры, которые могут использоваться для следующей реакции отщепления.

Рассматриваются два варианта функционирования полимеров динамина в районе перешейка. Первый, динаминовое кольцо физически сжимается и отшнуровывает почку от мембраны («защемление»). Второй, динаминовая спираль вытягивается (расстояние между витками спирали возрастает примерно в два раза) при разрушении ГТФ и отрывает везикулу от поверхностной мембраны («выталкивание»). Таким путем, динамин служит механо-химическим ферментом, преобразующим в механическую работу энергию макроэргической связи остатка фосфорной кислоты в ГТФ (Рис. 19). Вероятно, динамин осуществляет отделение везикул, взаимодействуя с дополнительными белками. Например, некоторое усилие, облегчающее отрыв везикулы, может быть связано с полимеризацией актина, которая стимулируется динамином (Dittman, Ryan, 2009; Зефилов, Петров, 2009).

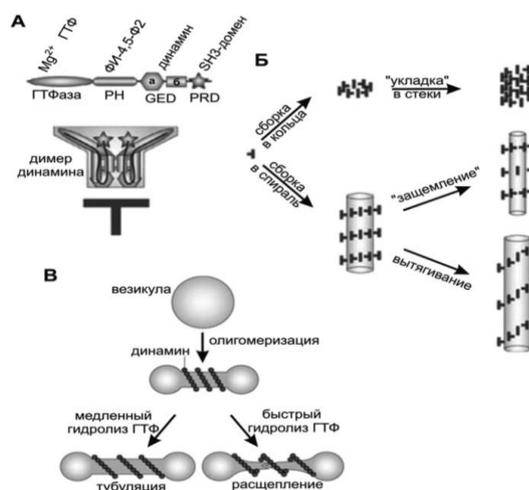


Рис.19. Модели олигомеризации динамина (Praefcke, McMahon, 2004).

А - Динамин состоит из 4 структурных блоков: ГТФазный домен (взаимодействующий с ГТФ и  $Mg^{2+}$ ), РН – гомологичный плекстрину домен (связывающийся с фосфатидилинозитол-4,5-бифосфатом), GED – эффекторный домен ГТФазы (участвующий в объединении молекул динамина в димер (через «б» - регион) и тетрамер (через «а» регион)), PRD – домен, обогащенный аминокислотой пролином, может взаимодействовать с белками, имеющими SH3-домен, например, амфифизином, эндофилином, интерсектином. Динамин может собираться в стабильные димеры / тетрамеры благодаря внутри- и межмолекулярным взаимодействиям между GED- и ГТФазными доменами. Строительный модуль динамина 1 выглядит как Т-образный брус из 2-х молекул, в котором РН-домены служат основанием. Б - Динамин в среде с низкой ионной силой или в присутствии аналогов ГТФ собирается в кольца, которые могут укладываться в стопки. Также динамин способен образовывать спирали, которые оплетают мембраны. Гидролиз ГТФ динамином ведет либо к уменьшению диаметра спирали динамина (сжатие, «защемление»), либо к увеличению шага спирали (то есть расстояния между витками). Таким образом, при разрушении ГТФ происходит либо «сжатие динаминового воротника», либо «растяжение динаминовой пружины». В - Связывание динамина с липидными везикулами, приводит к формированию спирали динамина на липидной трубке. В случае медленной несинхронной ГТФазной активности молекул динамина шаг между витками спирали увеличивается, растягивая липидную трубку, тогда как быстрая синхронная ГТФазная активность ведет к быстрому растягиванию спирали и разделению трубки. В первом случае происходит тубулирование везикулы, а во втором – ее деление на две части (Зефиоров, Петров, 2010а).

После отсоединения от поверхностной мембраны с везикулы быстро снимается покрывало из клатрина и адаптеров (рис. 20). В этом участвует белок теплового шока (шаперон) Hsc70. Сначала ко-шаперон (белок, показывающий шаперону мишень) ауксиллин соединяется с клатриновой решеткой на везикуле (Fotin et al., 2004). Затем комплекс ауксиллина с клатрином привлекает шаперон Hsc70 в АТФ загруженном состоянии. Hsc70-АТФ прикрепляется к клатриновому покрытию, что стимулирует АТФазную активность шаперона. После гидролиза АТФ АДФ-Hsc70 с большей силой начинает взаимодействовать с клатрином, меняя его структуру и способствуя диссоциации покрытия на отдельные трискелии (Meimaridou et al., 2009). Молекулы клатрина постоянно вступают в кратковременные взаимодействия с Hsc70 в цитоплазме. Это необходимо для предотвращения случайной полимеризации клатрина и вступления молекул клатрина в непродуктивные взаимодействия (Зефиоров, Петров, 2009).

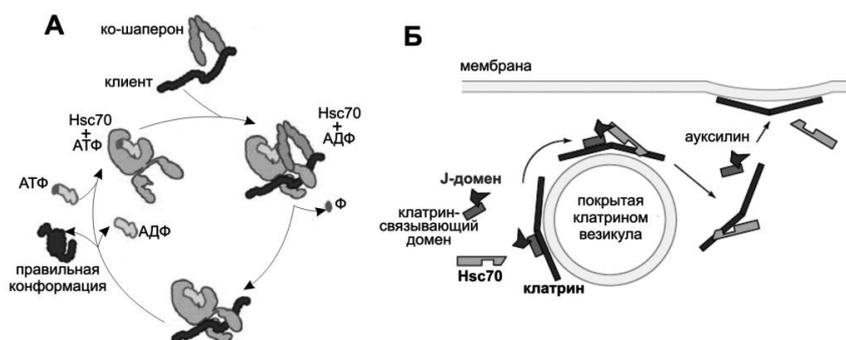


Рис. 20. Шаперон Hsc70 и его значение в эндоцитозе (Young et al., 2003; Meimaridou et al., 2009 с изменениями)

А – Белок с искаженной структурой (клиент) связывается ко-шапероном, который «показывает» его шаперону Hsc70. Шаперон соединяется с клиентом, а J-домен ко-шаперона стимулирует АТФазную активность Hsc70. В результате происходит прочное взаимодействие клиента с Hsc70. Впоследствии АДФ и клиент отделяются от Hsc70. Клиент может подвергаться нескольким циклам связывания и освобождения перед достижением правильной конформации. Б – Разборка клатриновой решетки. Ауксиллин присоединяется к клатрину в составе покрытия. Затем к ауксиллину крепится Hsc70, который с небольшой силой взаимодействует и с клатриновой трискелией. J-домен ауксиллина запускает гидролиз АТФ шапероном, в результате Hsc70 начинает крепко соединяться с клатрином и способствует его диссоциации от мембраны везикулы (вместе с Hsc70). В цитоплазме Hsc70 отпускает клатриновую трискелию, которая может заново участвовать в эндоцитозе (Зефиоров, Петров, 2010а).

Для удаления с мембраны везикулы покрытия из адаптерных протеинов необходимо дефосфорилировать фосфатидилинозитол-4,5-бифосфаты мембраны, поскольку на них крепятся адаптерные молекулы (рис. 21). Это катализирует фосфатаза фосфоинозитидов синаптоянин (Cremona, DeCamilli, 2001; Di Paolo G., De Cailli, 2004).

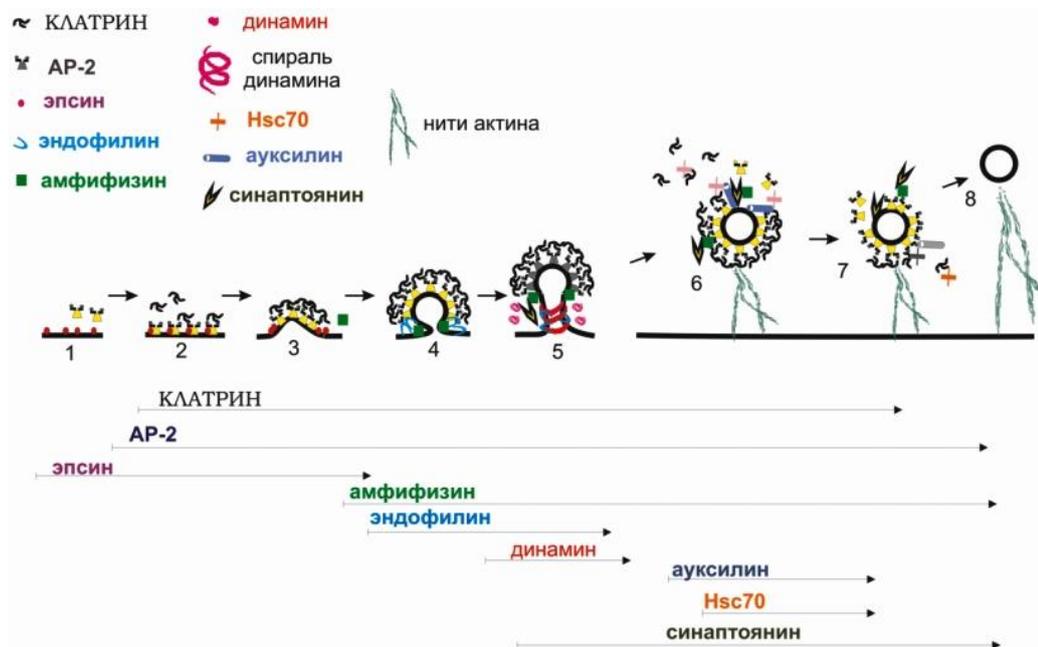


Рис. 21. Этапы и протеины клатрин-опосредованного быстрого типа эндоцитоза синаптических везикул (Зефилов, Петров, 2009)

(1) Сначала к пресинаптической мембране, обогащенной фосфатидилинозитол-4,5-бифосфатами, присоединяются молекулы эпсина, привлекающие из цитоплазмы адаптерные белки AP-2, AP-180 и Eps15. (2) Сформированный комплекс рекрутирует клатриновые трискелии и одновременно катализирует их объединение в покрытие (3). При участии эпсина, позднее эндофилина и амфифизина (4) фрагмент везикулярной мембраны, встроенный в плазматическую мембрану, деформируется. В итоге образуется глубокая инвагинация (ямка), покрытая клатриновой решеткой. Амфифизин способствует привлечению динамина в перешеек между почкой и поверхностной мембраной. В дальнейшем динамин собирается в воротник (5), сжимающий шейку почку до тех пор, пока покрытая клатрином почка не отрывается, замыкаясь в везикулу (6). Затем покрытие из клатрина и адаптеров снимается с помощью шаперона Hsc70 (ведет демонтаж клатринового покрытия) и фосфатазы синаптоянина (обеспечивает отсоединение адаптерных белков от мембраны). Векторная сборка нитей актина толкает везикулу вглубь клетки (8). Описанная модель существенно упрощена (Зефилов, Петров, 2009).

Помимо упомянутых белков в естественных условиях в функционирование клатрин-опосредованного эндоцитоза вовлекается еще более дюжины белков. Некоторые протеины длительное время ассоциируются с покрытыми клатрином ямками, а другие вступают в кратковременные взаимодействия на определенных этапах эндоцитоза. Аналогичные клатрин-опосредованному эндоцитозу механизмы задействованы в ходе отпочковывания везикул от эндосом, эндоплазматического ретикулума, комплекса Гольджи, лизосом (Зефилов, Петров, 2009, 2010а).

## **2.6 Мембранный холестерин и представления о рафтах**

По сравнению с фосфолипидами и сфинголипидами, стеролы вошли в состав липидома позднее. Их появление (около 2.5 млрд. лет назад) совпало с повышением уровня кислорода, когда возникла эукариотическая форма жизни. Клетки млекопитающих имеют главным образом один стерол – холестерин, в синтезе которого участвуют более 30 ферментов (Simons K., Samraio J.L., 2011; Петров, Зефилов, 2013, 2014). Холестерин - молекула с несимметричными поверхностями (рис. 22А): одна - гладкая ( $\alpha$ ), другая - шероховатая ( $\beta$ ) из-за наличия метильных групп и изооктильной цепи. Это дает возможность холестерину связываться с разными партнерами. Например, сфинголипиды взаимодействуют с  $\alpha$ -поверхностью, а трансмембранные белки с  $\beta$ -«лицом» (Fantini, Barrantes, 2009). Высокая концентрация холестерина характерна для плазматической мембраны, вследствие чего происходит возрастание толщины и жесткости липидного бислоя. Это создает условия для предпочтительной локализации белков с длинными трансмембранными гидрофобными участками в богатых холестерином мембранах (Simons, Gerl, 2010; Simons, Samraio, 2011; Петров, Зефилов, 2013).

Распределение холестерина между монослоями мембраны неравномерно: в синаптических мембранах цитоплазматический листок включает в 5-6 раз больше холестерина, чем внешний. В результате, наружный монослой существенно более текучий, чем внутренний. Нарушение подобной асимметрии наблюдается при нейродегенеративных заболеваниях, старении, хроническом применении статинов (Wood et al., 2011; Петров Зефилов, 2013).

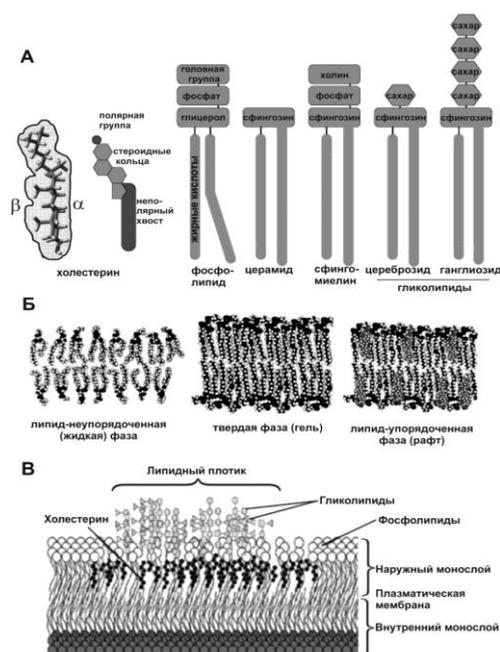


Рис. 22 Липиды и фазовые состояния мембран (van Meer et al., 2008; Fantini, Barrantes, 2009; Петров, Зефирова, 2013)

А – Основные классы липидов мембран. Холестерин имеет две поверхности (гладкую  $\alpha$  и неровную  $\beta$ ) и состоит из маленькой полярной головки, четырех стероидных колец и неполярного хвоста. Фосфолипиды построены из глицерола, к которому присоединены две ацильные цепи (из 16-18 углеродных атомов каждая, обычно одна ненасыщенная) и через остаток фосфорной кислоты гидрофильная головная группа (холин, этаноламин, серин, инозитол). В основу сфинголипидов входит многоатомный спирт сфингозин, к которому присоединяется насыщенная ацильная цепь из 16-26 атомов углерода, в итоге формируется керамид. К керамиду привязывается головная группа в виде холина (сфингомиелин), остатка сахара (цереброзид) или остатка сиаловых кислот (ганглиозид). Цереброзиды и ганглиозиды объединяют в группу гликолипидов. Б – Фазовые состояния в модельных мембранах. Ключевым фактором, определяющим текучесть мембраны, это наличие ненасыщенных углеводородных цепей. Фосфолипиды с ненасыщенными цепями образуют липид-неупорядоченную (жидкую) фазу, сфинголипиды с длинными насыщенными углеводородными цепями – твердую фазу (гель). Холестерин самостоятельно не формирует бислоя, но вместе со сфинголипидами создает липид-упорядоченную фазу, которая упорядочена как и гель, но подвижность ее компонентов выше. В – Схематическое изображение островка липид-упорядоченной фазы (липидного плотика) в наружном монослое плазматической мембраны.

Концепция липидных микродоменов. Фосфолипиды с ненасыщенными жирнокислотными цепями и сфинголипиды с длинными насыщенными ацильными цепями формируют в искусственной мембране 2 фазы - жидкую фосфолипидную и твердую (гель) сфинголипидную. При добавлении холестерина наблюдается образование липидупорядоченной фазы (Рис. 22), менее организованной и более эластичной, чем гель, но более упорядоченной и твердой, чем жидкий кристалл (Зефирова, Петрова, 2010б, Петрова, Зефирова, 2013). Организуют липидупорядоченную фазу сфинголипиды и холестерин: гидрофобный холестерин заполняет пространства между гидрофобными хвостами сфинголипидов, которые проникают из внешнего листка в цитоплазматический монослой, скрепляя мембрану (Simons, Samraio, 2011; Петрова, Зефирова, 2013). Предполагается, что в жидкой биологической мембране в наружном и внутреннем монослоях плавают островки липидупорядоченной фазы (липидные плотки или рафты) (рис. 22) (Bramshuber M. et al., 2010; Simons, Gerl, 2010; Петрова, Зефирова, 2013). Время жизни рафтов варьирует в широких пределах, самые мелкие «нанорафты» (из 30-40 липидов и 6-10 протеинов) существуют только около нескольких миллисекунд-секунд (Bramshuber et al., 2010). Возможно, нанорафты рождаются спонтанно как флуктуации. Увеличение содержания холестерина и сфинголипидов способствует слиянию нанорафтов с образованием микрометровых стабильных липидных платформ (рис. 23) (Honerkamp-Smith et al., 2009). Взаимодействие протеинов (за счет их связывания с одним и тем же внеклеточным лигандом или внутриклеточными каркасными белками), расположенных в соседних рафтах, может вести к появлению липидных платформ (Sengupta et al., 2007). Объединение рафтов часто является важным событием в функционировании клетки, в частности, мембранном транспорте, внутри- и внеклеточной сигнализации (Simons, Gerl, 2010). Возможно, при физиологической температуре в плазматической мембране рафты находятся в состоянии готовом к слиянию, которое контролируется составом мембран, динамикой актинового цитоскелета и внеклеточными лигандами (Петрова, Зефирова, 2013). Исследования локализуемых в рафтах GPI-заякоренных белков указали на зависимое от холестерина и актина / миозина перемещение компонентов рафтов. Было предположено, что формируемый актиновыми нитями примембранный каркас (наподобие «ограды») мешает диффузии белковых компонентов рафтов, направляя рафты по заданной траектории (Morone et al., 2006).

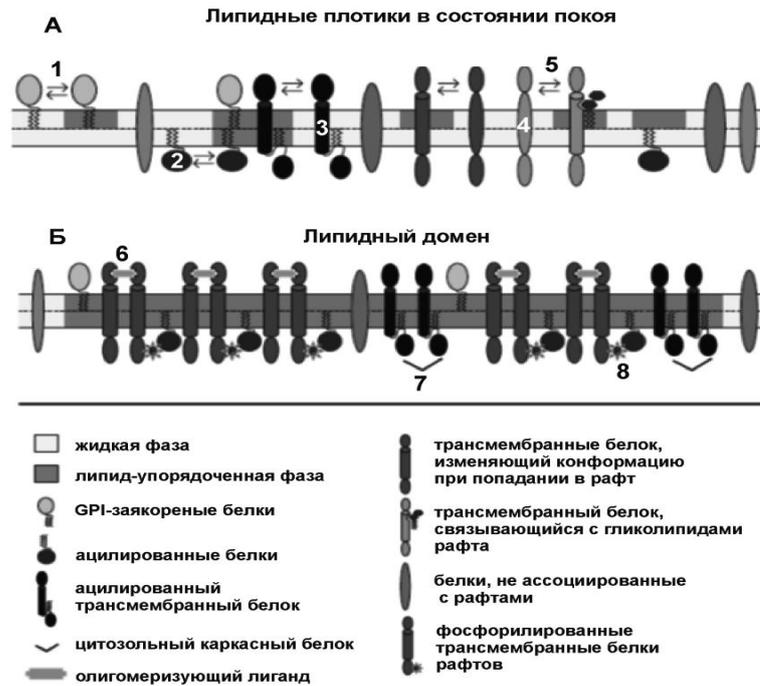


Рис. 23. Формирование липидных плотиков (Simons, Samraio, 2011; Петров, Зефирова, 2013)

А- В состоянии покоя липидные плотки представлены динамичными нанометровыми скоплениями липидов и белков, которые входят и выходят из состава рафта, задерживаются в плотике на короткое время. Большинство белков плотиков заякориваются в наружном монослое с помощью GPI-якоря (1), а во внутреннем посредством двойного ацилирования (2), или содержат ацильную цепь в дополнение к трансмембранному домену (3). Некоторые белки претерпевают конформационные изменения, при попадании в рафт (4) или в ответ на связывание с гликолипидами (5). Б – Внеклеточные лиганды (6) могут способствовать слиянию рафтов за счет взаимодействия одновременно с несколькими белками, расположенными изначально в разных липидных плотиках. Также склеивание рафтов может происходить за счет каркасных белков, связывающихся с цитоплазматическими доменами белков соседних рафтов (7). Фосфорилирование цитоплазматических регионов белков (8) плотиков протеинкиназами усиливает белок - белковые взаимодействия, в результате белки кластеризуются, что вызывает объединение рафтов в большой домен размером несколько сотен нанометров. Образовавшийся липидный домен может функционировать как сигнальная липидная платформа, объединяющая многочисленные сигнальные молекулы в одном регионе (Зефирова, Петров, 2013).

В нервной системе связь между организацией мембраны и клеточными процессами более выражена, чем в других тканях. Нейроны и, в меньшей степени, глия высоко поляризованные клетки, содержащие различные мембранные компартменты: аксон, дендриты, синаптическая мембрана, миелиновые муфты, перехваты Ранвье и т.п. Вероятно, это является одной из причин того, что нейрональные клетки исключительно богаты липидными плотиками, холестерином и сфинголипидами (Зефирова, Петров, 2010б, Петров, Зефирова, 2013). Сфинголипиды (в частности, гликолипиды) мозга, входящие в состав рафтов, характеризуются высокой степенью структурного разнообразия, и отдельные популяции нейронов, глиальных клеток и разные рафты одной клетки обогащены различными гликолипидами. В течение развития мозга и дифференциации нейронов наблюдается увеличение экспрессии и разнообразия гликолипидов (Петров, Зефирова, 2013). Нарушение синтеза сложных гликолипидов в нейронах вызывает драматичные неврологические/синаптические нарушения и гибель в течение 3 недель после рождения (Jennemann et al., 2005). В целом, липидный состав рафтов мозга отличается в зависимости от региона, типа клетки и стадии их развития. Отдельные рафты могут включать специфичные белковые компоненты (рецепторы, ионные каналы, белки экзо- и эндоцитоза, ферменты), которые на территории рафта создают сигнальные комплексы / специализированные компартменты (Петров, Зефирова, 2013; Rushworth et al., 2013).

Для исследования роли липидных рафтов широко применяются фармакологические подходы, изменяющие липидное зеркало мембран (Зефирова, Петров, 2010б; Dart, 2010). Стабильность плотиков нарушают агентами, удаляющими (метил-бета-циклодекстрин), окисляющими (холестерин оксидаза) мембранный холестерин или блокирующими его синтез (статины); используют сфингомиелазы, образующие церамид, самоорганизующийся в большие липидные платформы (Петров и др. 2013; Christian et al., 1997; Fantini, Barrantes, 2009; Petrov et al., 2014).

Клеточные мембраны содержат протеины, имеющие разную аффинность к рафтам, которая зависит от длины, аминокислотной последовательности и ковалентных модификаций белка. Например, пальмитилирование, которое является обратимым процессом, зачастую адресует протеин в плотик (рис. 23). Однако пальмитилирование не обязательно вызывает ассоциацию с рафтами: многие пальмитилированные белки постоянно проживают в неупорядоченной мембране

(например, трансферриновый рецептор). Другая модификация, способствующая направлению белка в рафты, - GPI-якорь (рис. 23). В целом, ~65% белков плазматической мембраны локализируются вне рафтов, остальные белки являются резидентами рафтов, из них 12% входят в состав рафтов за счет пальмитилирования, 11% необходимо привязывание GPI-якоря, механизм крепления других белков, возможно, опосредуется взаимодействием с холестерином и сфинголипидами (Simons, Gerl, 2010; Simons, Samraio, 2011; Петров, Зефилов, 2013).

### **2.6.1 Специализированные варианты рафтов - кавеолы**

Кавеолами названы фляжко-образные углубления плазматической мембраны глубиной 50-100 нм (рис. 24). Они представляют собой специфический вариант липидных плотиков и обнаружены во многих клетках, в том числе мышечных. В них концентрируются сигнальные молекулы (рецепторы ростовых факторов, различные протеинкиназы и малые ГТФазы, эндотелиальная изоформа NO-синтазы и другие). Также кавеолы тесно ассоциированы с цитоскелетными белками (рис. 24) (Bastiani, Parton, 2010; Петров, Зефилов, 2013). В кавеолах высоко содержание сфинголипидов (в частности, ганглиозидов GM1, GM3, GD3 и сфингомиелина) и холестерина, а также фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфатов (Fujita et al., 2009). Уменьшение концентрации холестерина вызывает уплощение кавеол и их разрушение вплоть до исчезновения. Искривление мембраны при образовании кавеол связано с олигомеризацией белков кавеолинов (18-20кДа), которые крепко связываются с холестерином и имеют шпилько-подобную структуру, облегчающую деформацию бислоя (рис. 24). Отдельную кавеолу формируют около 140-150 молекул кавеолинов. Описано 6 изоформ кавеолинов, аминокислотные последовательности которых закодированы 3 высоко консервативными генами CAV1, 2 и 3 (Bastiani, Parton, 2010; Петров, Зефилов, 2013). Существенная гомология первичной структуры характерна для кавеолинов 1 и 3, которые необходимы при формировании кавеол. Кавеолин 2 непосредственно не участвует в построении кавеол, но связывается с кавеолинами 1 и 3. Кавеолин-1 и 2 присутствуют во многих клетках и собираются в гетеромерные ансамбли, а кавеолин-3 обнаружен в глиальных и мышечных клетках, а также в периферических нервных волокнах (Gazzerro et al., 2010). В нервно-мышечном контакте с кавеолином 3 ассоциируются никотиновые ацетилхолиновые рецепторы, MusK киназа, Na-K АТФаза  $\alpha 2$  изоформа, а нокаут гена

кавеолина 3 нарушает кластеризацию ацетилхолиновых рецепторов (Hezel et al., 2010; Heiny et al., 2010). Кавеолин 3 входит в состав комплекса дистрофин-гликопротеины, участвующего во взаимодействии цитоскелета и внеклеточного матрикса, и поддерживающего, таким образом, стабильность плазматической мембраны мышечных клеток (Gazzerro et al., 2010).

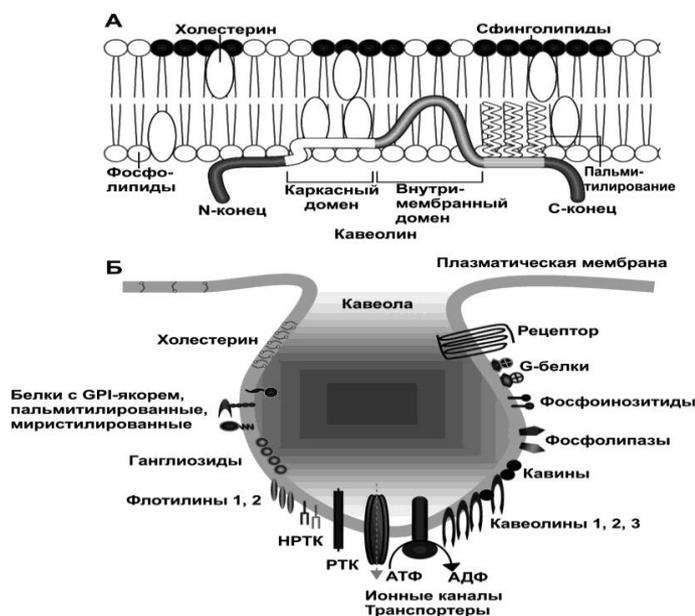


Рис. 24. Структура кавеол (Pani, Singh, 2009; Bastiani, Parton, 2010; Петров, Зефилов, 2013).

А – Кавеолин, его взаимодействие с мембраной. Кавеолы состоят из N-концевого, каркасного, внутримембранного, С-концевого доменов и пальмитилированного региона. Б – Кавеолы – чашеобразные инвагинации плазматической мембраны 60-80 нм в диаметре, обогащенные холестерином и сфинголипидами (в частности, ганглиозидами), а также белками кавеолинами и кавинами. В кавеолах расположены некоторые сигнальные молекулы, сопряженные с G-белками рецепторы, G-белки, фосфоинозитиды, фосфолипазы, рецепторные и нерцепторные тирозинкиназы (РТК и НРТК), а также ионные каналы и транспортеры (в том числе помпы) (Петров, Зефилов, 2013).

Кавеолин-3 состоит из 151 аминокислоты и содержит четыре домена: N-концевой, каркасный, трансмембранный и С-концевой (рис. 24). Трансмембранный домен формирует шпильку в сарколемме, в итоге N- и С-концы белка обращены в сторону цитоплазмы. Каркасный домен отвечает за гомоолигомеризацию, процесс который начинается в саркоплазматической сети и предшествует организации кавеолярных

комплексов 25-50 нм в диаметре. Эти структуры сливаются в плазматической мембране, образуя финальные кавеолы (Bastiani, Parton, 2010; Петров, Зефирова, 2013).

В организации и функционировании кавеол принимает участие кавиновый белковый комплекс из кавина-1 (PTRF), кавина-2 (SDR), кавина-3 (SRBC), кавина-4 (MURC) (Hill et al., 2008; Петров, Зефирова, 2013). Кавин-1 ассоциируется с кавеолином 1 и 3, а его исчезновение значительно уменьшает образование кавеол, увеличивает подвижность кавеолина и интенсивность его деградации, а также способствует ассоциации кавеолина с плоскими участками мембраны. Кавин-2 и 3 являются субстратами протеинкиназы C и задействованы в ее привлечении в кавеолу (Bastiani et al., 2009). Кавин-2 важен для искривления мембраны и возможно принимает участие в образовании кавеолярных инвагинаций, а кавин-3 регулирует эндоцитоз кавеол, его нокаут уменьшает интенсивность отсоединения кавеол и их внутриклеточный транспорт (Bastiani, Parton, 2010). В скелетных и сердечных мышцах особенно много экспрессируется кавина-4, который регулирует ERK1/2 сигнальный каскад и миогенез (Bastiani et al., 2009). Кавиновый комплекс включает 60-80 молекул кавинов, которые рекрутируются к плазматической мембране за счет взаимодействия кавина-1 и кавеолина. В целом множество низкоаффинных взаимодействий вызывает крепкое связывание кавинов с кавеолами, при этом нарушение структуры кавеол (например, при удалении холестерина) вызывает диссоциацию кавинов от мембраны. Взаимодействие кавеолина и кавина 1 может регулировать сборку (инвагинирование) и разборку (уплощение) кавеол при изменении мембранного натяжения (Hill et al., 2008).

Липидные плотки являются динамичными микродоменами, концентрирующими в нужном месте определенные молекулы, участвующие в меж- и внутриклеточной сигнализации. Исходя из накопленных экспериментальных данных, липидные рафты следующими способами задействованы в сигналинге. (1) Непосредственно определяют «тонкую» 3D-структуру сигнальных белков. (2) Влияют на эффективность проведения сигнала внутрь клетки, собирая в едином компартменте мембраны необходимые белково-липидные компоненты. (3) Ограждают сигнальные комплексы от действия «неблагоприятных факторов». Например, ограничивают доступ фосфатаз к фосфорилированным белкам-мишеням. (4) Объединение рафтов в сигнальные платформы позволяет интегрировать отдельные сигнальные события, что обеспечивает большую вариабельность и «слаженность» ответных реакций (Петров, Зефирова, 2013).

## 2.7. Метаболизм холестерина в нервной системе

### 2.7.1 Общие сведения об источниках мозгового холестерина

Холестерин - основной липидный компонент мозга (23-25% всего холестерина сосредоточено в мозге), содержание которого поддерживается на постоянном уровне 15-30 мг/г ткани, средний показатель в других тканях - 2-3 мг/г (Dietschy, 2009). В течение эволюции холестерин приобрел специфические функции в нервной системе. Обогащенные холестерином миелиновые муфты уменьшают проницаемость для ионов, позволяя электрическим импульсам распространяться вдоль аксонов с высокой скоростью. Изобилие холестерина в синаптических мембранах необходимо для формирования, стабилизации синаптического контакта и протекания нейротрансмиссии. Продукция холестерина является лимитирующим фактором роста нервных отростков (Vance, 2012; Петров, Зефилов, 2013).

В тканях за пределами нервной системы холестерин синтезируется как эндогенно (около 50-60%), так и захватывается из липопротеинов (с усвоенными из пищи липидами), циркулирующих в крови. Однако липопротеины плазмы не проникают (или очень слабо проникают) через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ), и практически весь (>96-97%) холестерин мозга образуется *de novo*, преимущественно в глиальных клетках (Dietschy, 2009). Только при нарушении ГЭБ наблюдается интенсивное проникновение стеролов из плазмы в мозг (Saeed et al., 2014). Частичное нарушение проницаемости ГЭБ может происходить в процессе старения. При нейродегенеративных заболеваниях наблюдается более драматичное повреждение ГЭБ, что способствует развитию патологии (Sagare et al., 2013; Elahy et al., 2015). Так, у мышей, дефицитных по перипитам, важным компонентам ГЭБ, возникает прогрессирующая с возрастом нейродегенерация (Sagare et al., 2013; Saeed et al., 2014).

Мозговой холестерин сосредоточен в двух основных пулах. Меньший по размеру относительно быстро метаболизирующийся пул (время жизни 5-10 месяцев, 8 мг/г) представлен холестерином плазматических мембран нейронов (10%) и глии (20%). Большая часть (70%) холестерина ЦНС содержится в миелине (40 мг/г) и метаболически стабильна (время жизни ~ 5 лет) (Russell et al., 2009). Максимум холестерина синтезируется в течение периода активной миелинизации (первые недели-месяцы постнатального развития) мозга олигодендроцитами. При этом олигодендроциты (за

счет экспрессии кетон-метаболизирующих ферментов) используют для синтеза холестерина кетоновые тела, концентрация которых в крови на порядок выше в период миелинизации. Если специфично нарушить синтез холестерина в олигодендроцитах, то они начнут захватывать холестерин из внеклеточных источников, но скорость миелинизации будет крайне медленной (Saher et al., 2005). После завершения миелинизации синтез холестерина снижается на 90% и в зрелом мозге протекает с низкой интенсивностью преимущественно в астроцитах, а также в 5 раз медленнее - в нейронах (Dietschy, 2009). Нейроны производят холестерин, необходимый для выживания, дифференциации аксонов и дендритов, формирования новых «неэффективных» синапсов. Стимулировать образование холестерина нейронами может мозговой нейротрофический фактор, BDNF (Numakawa et al., 2010). Для масштабного формирования функциональных синапсов (особенно пресинаптических частей, удаленных от сомы) требуется холестерин астроцитарного происхождения. Нейроны в культуре проявляют в 10 раз больше возбуждающей синаптической активности и образуют в 5-7 раз больше синапсов при наличии астроцитов, что частично связано с продукцией астроцитами холестерина. В целом, производство холестерина нейронами важно на ранних стадиях развития мозга, тогда как во взрослом организме синтез холестерина нейронами не является необходимым (Dietschy, 2009; Russell et al., 2009).

### **2.7.2 Регуляция синтеза холестерина**

Синтез холестерина начинается с превращения ацетилкоэнзима А (АсoА) ферментом ГМГсо-А синтетазой в 3-гидрокси-3-метилглутарил-соА (ГМГсоА), который затем конвертируется ГМГсоА-редуктазой в мевалонат. Последняя реакция составляет лимитирующий и необратимый этап биосинтеза холестерина, и ингибируется статинами. Существуют два пути синтеза холестерина (рис. 25). В нейронах преимущественно обнаруживаются стеролы, принадлежащие к «Kandutsch-Russel» пути (7-дегидрохолестерин, ланостерол), тогда как в астроцитах - к «Bloch» пути (десмостерол) (Leoni, Cassia, 2015). Образование холестерина протекает на территории эндоплазматического ретикулума (ЭПР). Причем здесь содержание холестерина подвержено более сильным колебаниям, чем в плазматической мембране, и именно холестерин ЭПР регулирует синтез холестерина.

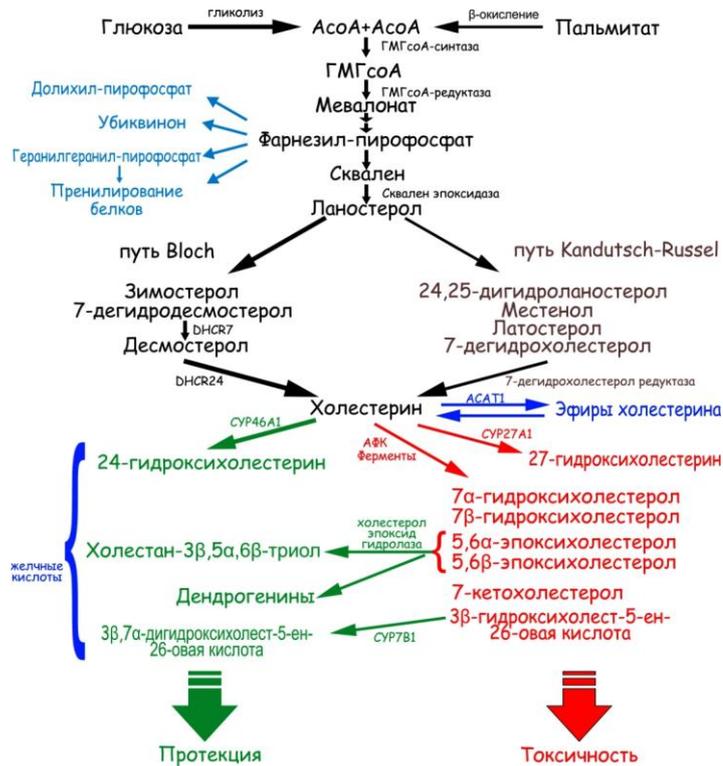


Рис. 25. Синтез холестерина и образование оксистеролов (Петров и др. 2016)

Холестерин образуется из ацетил-коэнзима А в ходе многоступенчатого ферментативного процесса. Известны два пути синтеза холестерина, Bloch и Kandutsch-Russel. Холестерин может депонироваться в виде эфиров холестерина или окисляться ферментативным и неферментативным путем с образование оксистеролов. Описано большое разнообразие оксистеролов, каждый из которых может иметь специфичные эффекты на клеточные процессы.

В ЭПР присутствует связанный с мембраной неактивный транскрипционный фактор SREBP-2 (белок, связывающий стерол-регуляторный элемент), связанный с неактивной протеазой SCAP (белок, активирующий SREBP расщеплением), содержащей холестерин-чувствительный домен. Когда холестерина много, комплекс SREBP-2 / SCAP удерживается в ЭПР молекулами INSIG-1 и -2 (инсулином активируемый ген). При снижении холестерина в ЭПР INSIG отсоединятся от комплекса SREBP-2/SCAP, в итоге комплекс направляется в аппарат Гольджи, где SREBP-2 расщепляется протеазой SCAP с образованием активного не связанного с мембраной N-терминального домена SREBP-2, проникающего в ядро и запускающего экспрессию более чем 30 генов, содержащих SRE (стерол-регуляторный элемент) в промотерном регионе и

ответственных за синтез холестерина (Рис. 26) (Dietschy, 2009; Anchisi et al., 2013; Martin et al., 2014; Leoni, Caccia, 2015).

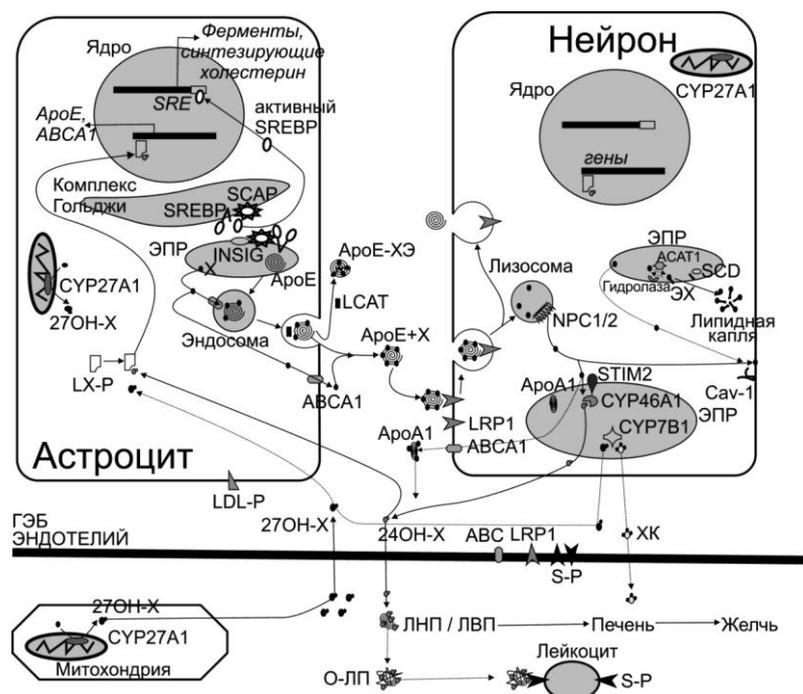


Рис. 26. Метаболизм холестерина в мозге. Нейрон-глиальные отношения (Петров и др. 2016)

Основное количество холестерина во взрослом мозге продуцируется астроцитами с помощью ферментов эндоплазматического ретикулума (ЭПР). Синтез холестерина регулируется белками INSIG, SREBP и SCAP. При высоком уровне холестерина все белки удерживаются в составе комплекса в ЭПР, а снижение холестерина вызывает распад комплекса, в результате SREBP и SCAP перемещаются в комплекс Гольджи, где протеаза SCAP отщепляет от SREBP активный транскрипционный фактор, проникающий в ядро и запускающий экспрессию генов, отвечающих за синтез и транспорт холестерина. На территории ЭПР собирается липопротеиновая частичка с ApoE, которая попадает в эндосомы и секретируется во внеклеточную среду. Вновь синтезированный холестерин может невезикулярным путем с помощью АТФ-связывающих кассетных транспортеров (ABCA1) транспортироваться из ЭПР в эндосомы или во внеклеточную среду. Инкрустированные холестерином ApoE частички взаимодействуют с рецепторами на нейронах (LRP1), захватываются эндоцитозом и направляются в лизосомы / поздние эндосомы. В эндолизосомах холестерин при участии белков NPC1/2 перемещается в плазматическую мембрану или ЭПР. В доставке холестерина в плазматическую мембрану принимает участие caveolin 1 (Cav-1).

Рис. 26 Продолжение

В ЭПР сосредоточен фермент СУР46А1, окисляющий холестерин до 24-гидроксихолестерина (24ОН-Х), способного проникать через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) и попадать в кровоток, где 24ОН-Х связывается с липопротеинами низкой и высокой плотности (ЛНП, ЛВП). Избыток 24ОН-Х в крови может окислять липопротеины плазмы (О-ЛП), которые с помощью рецептора для мусора (S-P) поглощаются лейкоцитах. 24ОН-Х связывается с цитоплазматическими LX-рецепторами астроцитов (и нейронов), затем комплекс 24ОН-Х / LX-рецептор проникает в ядро и запускает экспрессию генов АроЕ и ABCA1, способствующих доставке холестерина из астроцитов в нейроны. Часть холестерина в составе комплексов с АроА1 может выбрасываться из нейронов и перебрасываться через ГЭБ. Избыток холестерина в ЭПР подвергается этерификации при участии фермента АСАТ1, образующиеся эфиры холестерина откладываются в виде капель в цитоплазме. Фермент SCD поставляет мононенасыщенные жирные кислоты для этерификации холестерина. Образование эфиров холестерина (в составе АроЕ-частичек, АроЕ-ХЭ) во внеклеточной среде связано с ферментом LCAT, секретлируемым астроцитами. В митохондриях многих клеток (в частности, макрофагов) присутствует фермент СУР27А1, окисляющий холестерин до 27-гидроксихолестерина (27ОН-Х), который может проникать в мозг через ГЭБ и менее эффективно, чем 24ОН-Х, активировать LX-рецептор. 27ОН-Х может преобразовываться ферментом нейронов СУР7В1 в 7 $\alpha$ -гидрокси-3-оксо-4-холестеновую кислоту (ХК), выбрасывающуюся из мозга в циркуляцию. Хотя ГЭБ не пропускает холестерин крови в мозг, эндотелиальные клетки ГЭБ имеют ABC транспортеры, LRP1 и S-P, что указывает на существование путей взаимного влияния мозгового и периферического холестерина.

При дефиците SCAP наблюдается снижение на 30-40% содержания холестерина в мозге, сопровождаемое нарушением синаптической передачи (Suzuki et al., 2013). Мутация SCAP в астроцитах ведет к микроцефалии, моторным и поведенческим дефектам, которые могут быть снижены за счет увеличения потребления холестерина с пищей (Camargo et al., 2012). Отсутствие SCAP в Шванновских клетках вызывает задержку формирования миелина с типичными невропатическими симптомами, тремор и атактическая походка (Verheijen et al., 2009). Блокирование синтеза холестерина

снижает экспрессию ряда белков, образующих комплексы с холестерином, например, главных белков миелина (Saher et al., 2005).

Однажды синтезированный холестерин покидает ЭПР везикулярным и невезикулярным путями (при участии переносчиков), и направляется в плазматическую мембрану, в итоге в ЭПР поддерживается низкий уровень холестерина. Образование контакта между ЭПР и плазматической мембраной может выступать в качестве кратчайшего пути для транспорта липидов из мест синтеза к поверхности клетки (Peake, Vance, 2012; Anchisi et al., 2013).

### **2.7.3 Депонирование, эфиры холестерина**

Нейроны и другие клетки могут откладывать избыток холестерина посредством его перевода в эфиры холестерина с жирными кислотами (этерификации). Во взрослом мозге ~1% холестерина присутствует в виде эфиров (в составе липидных капель). Кратковременный пик этерификации (этерифицируется свыше 5% холестерина) наблюдается в отдельном регионе мозга в начале периода миелинизации. Эфиры холестерина могут выступать в роли резерва, который используется при миелинизации и формировании синаптических контактов. Накопление эфиров может быть связано с увеличением активности фермента ацетилкоэнзим-А холестерин ацилтрансферазы (ACAT1/SOAT1), вызванного повышением уровня холестерина в ЭПР. Ингибирование ACAT1 драматично (на 86%) снижает концентрацию эфиров холестерина. Нейротоксические компоненты и оксидативный стресс, наоборот, увеличивают активность ACAT1 (Bryleva et al., 2010). ACAT1 более активна в нейронах, чем в глиальных клетках. Однако в астроцитах ACAT1 активизируется при нарушении выброса холестерина или при перегрузке экзогенным холестерином (Karten et al., 2006). Фермент ЭПР стерол-СоА десатураза, катализирующий синтез мононенасыщенных жирных кислот из насыщенных жирных кислот, поставляет основной субстрат для этерификации холестерина (Anchisi et al., 2013).

В клетке эфиры холестерина постоянно разрушаются гидролазой. В норме уровень эфиров холестерина в мозге низкий и не превышает способности гидролазы переводить их в холестерин. В случае значительного повышения концентрации эфиров, гидролаза «не справляется», и эфиры холестерина образуют липидные капли в цитоплазме нейронов (Dietschy, 2009).

### 2.7.4 Межклеточный транспорт холестерина

Для трафика холестерина мозг использует свои собственные липопротеины, состоящие из аполипопротеинов (в основном «Е», 39 кДа) и липидов. Астроциты - главные производители холестерина и аполипопротеина Е (АроЕ), которые вместе с фосфолипидами собираются в липопротеиновые комплексы (АроЕ-частички) (рис. 26). Сердцевина липопротеиновых частиц собирается в ЭПР, а обогащение липидами АроЕ и секреция АроЕ-частичек осуществляется с помощью одного или нескольких АТФ-связывающих кассетных транспортеров (АВС), таких как АВСА1, АВСГ1 и АВСГ4 (Bu, 2009; Hayashi, 2011, Lane-Donovan et al., 2014). АВСА1 катализирует начальную стадию переноса липидов на «свободные» аполипопротеины, формируя «рождающиеся» частички, которые затем полностью «наполняются» липидами и выбрасываются из клетки во второй стадии процесса с участием АВСГ1/АВСА1 (Vaughan, Oram, 2006). Недостаточно обогащенные липидами частички (например, в результате дефицита АВСА1) быстрее катаболизируются, что сопровождается снижением уровня АроЕ в мозге. Инактивация АВСА1 в мозге вызывает астроглиоз и усиление экспрессии воспалительных генов, а также изменяет синаптическую передачу и сенсомоторное поведение (Karasinska et al., 2013).

Главными потребителями липопротеинов являются нейроны. Они захватывают липопротеины с помощью рецепторов, принадлежащих к семейству рецепторов липопротеинов низкой плотности: LDL-рецепторы и LDL-рецептор подобные протеины (LRP, LRP1B, LRP2/мегалин, LRP4, LRP5/6, LRP8/APOER2, LRP11/SORL1). Эти рецепторы также связывают белки, регулирующие развитие мозга (Sonic hedgehog, Wnt, релин), протеазы и ингибиторы протеаз ( $\alpha_2$ -макроглобин), переносчики витаминов, шапероны, медиаторы воспаления (Lane-Donovan et al., 2014). Основным мозговым рецептором, опосредующим захват АроЕ-частичек, является LRP1, для которого характерна высокая транспортная емкость за счет высокой скорости эндоцитозного рециклирования (рис. 26). LRP1 экспрессируется преимущественно в нейронах, а LDL-рецептор - в глии (Rushworth et al., 2013). Делеция LRP1 в нейронах ведет к глобальному дефекту метаболизма холестерина и нейродегенерации (Liu et al., 2010).

После рецептор-опосредованного эндоцитоза везикулы доставляют липидные частички в поздние эндосомы / лизосомы. Причем АроЕ сразу после эндоцитоза отделяется от липидных компонентов и не направляется в лизосомы, а возвращается

обратно на поверхность, то есть рециклирует (Рис. 26) (Rensen et al., 2000). Холестерин покидает поздние эндосомы / лизосомы при участии NPC1 и NPC2 белков, и направляется в плазматическую мембрану или мембрану ЭПР, содержание холестерина в которой, по принципу отрицательной обратной связи (через SREBP-2/SCAP/INSIG-1 путь), регулирует гены, вовлечённые в гомеостаз холестерина (Peake, Vance, 2012). Предполагается, что в полости эндолизосомы холестерин связывается с NPC2 (трансмембранный белок), затем взаимодействует с NPC1 (внутрилюменальный белок), в итоге холестерин оказывается огражденным от водной среды NPC1 и NPC2 белками, после чего перебрасывается в ЭПР или плазматическую мембрану (Vance, Karten, 2014).

Взаимодействие между ApoE-частичками и рецепторами запускает пути внутриклеточной сигнализации, что важно для нормального функционирования и выживания нейрона (Hayashi, 2011; Lane-Donovan et al., 2014). Например, синтез ApoE глиальными клетками более чем в 150 раз ускоряет репарацию нерва после повреждения (Ignatius et al., 1986).

### **2.7.5 Экскреция холестерина из мозга. Оксистеролы**

Около 1 г холестерина выводится у человека ежедневно: 0.5 г - в виде желчных кислот, - 0.5 г – как неметаболизированный холестерин или бактериальный метаболит копростанол. В мозге практически отсутствуют механизмы разрушения холестерина. Однако 0.02-0.04% (6-12 мг) мозгового холестерина удаляется каждый день (Dietschy, 2009), преимущественно, в форме 24-гидроксихолестерина (6-8 мг/день). 24-гидроксихолестерин (в гомогенате мозга, ~30 мкМ) проникает через ГЭБ (диффузией или при участии анионного транспортера, oatp2), в крови связывается с липопротеинами низкой плотности (концентрация в плазме ~50 нМ), поглощается гепатоцитами и выводится в составе желчи (Russell et al., 2009). Небольшая часть холестерина покидает мозг в виде ApoE/A-частиц через ГЭБ. Экспрессирующийся преимущественно в нейронах ABCA1 способен освобождать избыток холестерина в виде ApoA1-частичек, которые перебрасываются через ГЭБ при участии LRP1 и рецептора для мусора класса 1 В (SR1B) (Gosselet et al., 2014). Увеличение или снижение экспрессии ABCA1 в нейронах усиливает или снижает элиминацию холестерина, соответственно (Hayashi, 2011).

24-гидроксихолестерин продуцируется холестерин 24-гидроксилазой (CYP46A1), которая в норме экспрессируется в телах и дендритах некоторых нейронов (больших пирамидных клетках коры, гиппокампа, миндаля, скорлупы, таламуса, клетках Пуркинью) (Рис. 26) (Russell et al., 2009). При патологических состояниях и после травмы CYP46A1 может появиться в не-нейрональных клетках (астроциты, микроглия, макрофаги) (Anchisi et al., 2013). В мозге 24-гидроксихолестерин (как и другие оксистеролы) активирует ядерный Liver X (LX)-рецептор астроцитов и нейронов, усиливающий экспрессию белков, обеспечивающих синтез холестерина и его транспорт (ABCA1, ApoE). Следовательно, увеличение выведения холестерина из мозга способствует его синтезу в астроцитах и доставку нейронам. Увеличение же уровня холестерина в ЭПР может стимулировать CYP46A1 (Dietschy, 2009). Таким образом, в мозге формируется кругооборот продукции и экскреции холестерина. Если его остановить за счет мутации гена CYP46A1 (CYP46A1  $-/-$  мыши, у них содержание 24-гидроксихолестерина составляет 5% от уровня мышей дикого типа), то уровень мозгового холестерина не возрастает, так как на 40-50% уменьшается его производство (Russell et al., 2009). Сверх-экспрессия CYP46A1, увеличивающая продукцию 24-гидроксихолестерина, также не изменяет уровень холестерина, так как увеличивается его синтез (Hudry et al., 2010). Образование 24-гидроксихолестерина в нейронах подавляется этерификацией холестерина, поэтому удаление гена ACAT1, на 13% уменьшающее общее содержание холестерина в мозге, на 32% увеличивает уровень 24-гидроксихолестерина (Bryleva et al., 2010).

Повышение активности CYP46A1 наблюдается при стимуляции синаптической передачи. Уже через 30 мин синаптической активности в глутаматергическом синапсе уровень мембранного холестерина немного, но достоверно, снижается за счет освобождения во внеклеточное пространство 24-гидроксихолестерина. При этом происходит перемещение CYP46A1 от ЭПР к плазматической мембране, и активация фермента. Данный процесс зависит от повышения уровня цитозольного  $Ca^{2+}$  и функционирования белка ЭПР - STIM2, чувствительного к  $Ca^{2+}$  в полости ЭПР (Sodero et al., 2012). По мере старения в нейронах повышается продукция активных форм кислорода, которые усиливают экспрессию CYP46A1, в результате чего возникает прогрессирующая потеря холестерина синаптическими мембранами (Sodero et al., 2011).

Другой оксистерол 27-гидроксихолестерин – главный метаболит холестерина в системном кровотоке, где его концентрация в норме составляет 0.15-0.73 мкМ и в случае ряда патологий (например, атеросклероз) может достигать миллимолярного уровня (Marwarha, Ghribi, 2014). 27-гидроксихолестерин синтезируется из холестерина почти всеми клетками митохондриальным ферментом холестерин 27-гидроксилазой (CYP27A1) (рис. 26). Нейронами, астроцитами и олигодендроцитами 27-гидроксихолестерин образуется в очень низкой концентрации и выводится из мозга через ГЭБ (Brown, Jessup, 2009). Однако 27-гидроксихолестерин, продуцируемый периферическими тканями, может проникать в мозг (5 мг/день). В норме соотношение 27-гидроксихолестерин : 24-гидроксихолестерин составляет 1 : 8 во фронтальной коре, 1 : 5 в затылочной коре и 1 : 10 в базальных ядрах (Heverin et al., 2004). 27-гидроксихолестерин может конвертироваться в мозге оксистерол 7 $\alpha$ -гидролазой (CYP7B1) в 7 $\alpha$ -гидрокси-3-оксо-4-холестеновую кислоту, которая удаляется через ГЭБ (Dietschy, 2009). Интенсивное образование 27-гидроксихолестерина происходит при гиперхолестеринемии и оксидативном стрессе (Brown, Jessup, 2009). В случае оксидативного стресса существенная часть холестерина в мозге может конвертироваться в 27-гидроксихолестерин, который аккумулируется, увеличивая риск нейродегенерации (Marwarha, Ghribi, 2014).

Макрофаги могут в значительных количествах производить 25-гидроксихолестерин с помощью холестерин 25-гидролазы, локализованной в ЭПР. В тканях (в том числе, в мозге) экспрессия этого фермента повышается при индукции врожденного иммунного ответа, а образующийся 25-гидроксихолестерин имеет противовирусный эффект и способствует этерификации холестерина за счет усиления активности АСАТ1. В мозге концентрация 25-гидроксихолестерина составляет в норме около 1 мкМ и может локально повышаться при нейродегенеративных заболеваниях. Следует отметить, что 25-гидроксихолестерин может в следовых количествах синтезироваться CYP46A1 и CYP27A1, а метаболизируется при участии CYP7B1 (Lathe et al., 2014).

Холестерин синаптических мембран продолжительный период пребывает в поверхностной мембране (например, у мышей – от 5 до 12 месяцев) (Ando et al., 2002), в течение которого он может окисляться активными формами кислорода и амилоидным пептидом в комплексе с Cu<sup>2+</sup> (Puglielli et al., 2005). Одним из методических приемов,

направленных на окисление холестерина мембран, выступает использование бактериального фермента – холестерин оксидазы, переводящей холестерин в 4-холестен-3-он (Kreit, Sampson, 2009; Петров и др. 2013). В геноме млекопитающих нет гена, кодирующего холестерин оксидазу, однако примерно 1.5 % от общего холестерина мозга мыши или человека обнаруживается в виде 4-холестен-3-она. Концентрация данного оксистерола может возрастать при гипоксии, воспалении и некоторых нейродегенеративных заболеваниях, однако о его биологических эффектах данных практически нет (Puglielli et al., 2005; Yoshimoto et al., 2005). Этот оксистерол в модельных мембранах может влиять на фазовое состояние мембран и способность мембранного холестерина взаимодействовать с белками и липидами (Ahn, Sampson, 2004). Окисление около 10% холестерина синаптосомальных мембран холестерин оксидазой вызывало ингибирование приблизительно на 35% активности  $Ca^{2+}$ (  $Mg^{2+}$ ) АТФазы, при этом значительно возрастала текучесть мембран. Интересно, что активность  $Na^+/K^+$  АТФазы при этом не страдала (Wood et al., 1995). Существует предположение, что окисление мембранного холестерина является причинным фактором болезни Альцгеймера (Gamba et al., 2015).

Другой крайне скудно изученный оксистерол - 5 $\alpha$ -холестан-3-он, который является ранним интермедиатом в цепи реакций биосинтеза желчных кислот и стероидных гормонов (Nes, McKean, 1977). Усиленная продукция 5 $\alpha$ -холестан-3-она наблюдается при редком генетическом заболевании, церебротендинальном ксантоматозе, вызванном мутациями в гене стерол-27-гидролазы (Сур27А1). При этой патологии в тканях (особенно интенсивно в нервной) аккумулируется холестанол, и проявляются серьезные неврологические дисфункции и миопатия (Menkes et al., 1968, Båvner et al., 2010). Следует отметить, что холестанол присутствует в малых количествах во всех тканях здоровых животных и человека. 5 $\alpha$ -холестан-3-он образуется как промежуточный продукт на пути синтеза холестанола из холестерина, и он детектируется в следовых количествах в образцах плазмы крови пациентов с церебротендинальным ксантоматозом (Salen et al., 1972, DeBarber et al., 2011). Концентрация 5 $\alpha$ -холестан-3-она в крови мутантных мышей Сур27А -/- составляет ~ 200 нМ. Уровень этого оксистерола значительно ниже, чем 7 $\alpha$ -гидрокси производных холестерина (DeBarber et al., 2011), которые рассматриваются как главные факторы, опосредующие токсичность при данном заболевании (Björkhem, 2013). Однако нет

данных об эффектах 5 $\alpha$ -холестан-3-она на клеточные процессы, включая синаптическую передачу, которая также драматично нарушается при церебротендинальном ксантоматозе. При этом, 5 $\alpha$ -холестан-3-он вероятно может взаимодействовать с многочисленными белками, имеющими высокое сродство к холестерину, например, с протеином NPC2, экспрессирующемся в синапсе (Liou et al., 2006).

## **2.8 Холестерин и липидные плотки в регуляции синаптической передачи**

В последнее время достигнут серьезный научный прогресс в изучении роли различных протеинов и белок-белковых взаимодействий в механизмах экзо-эндоцитоза и транспорта везикул. И только сейчас исследователи начинают обращать пристальное внимание к проблеме значения липидов в функционировании нервного окончания. Это связано с тем, что в процессе везикулярного цикла происходят радикальные трансформации геометрии мембран, биохимические и структурные «метаморфозы» их липидов, меняется активность ряда ферментов, которые модифицируют липиды, способствуя протеканию к экзо-эндоцитозного цикла. Некоторые производные липидов стимулируют белки экзо- и эндоцитоза. Не менее важно, что сайты экзо- и эндоцитоза имеют уникальные композиции липидов (также как и белков), несмотря на многократные циклы слияния и восстановления везикул (Зефилов, Петров, 2010б).

### **2.8.1 Пресинаптические механизмы и холестерин**

Роль холестерина в пресинаптических процессах, обеспечивающих освобождение нейромедиатора, связана с тремя аспектами (Зефилов, Петров, 2010б): 1) холестерин непосредственно влияет на биофизические свойства мембран, 2) взаимодействует напрямую с белками, регулирующими экзо-эндоцитоз, 3) организует липидные рафты (рис. 27).

В ходе экзоцитоза происходят радикальные изменения кривизны мембран, которые определяются липидной композицией. Холестерин в избытке содержится в синаптических везикулах (40% от всех липидов) и поддерживает формирование сильно искривленных промежуточных мембранных структур в течение реакции слияния (Tong et al., 2009).

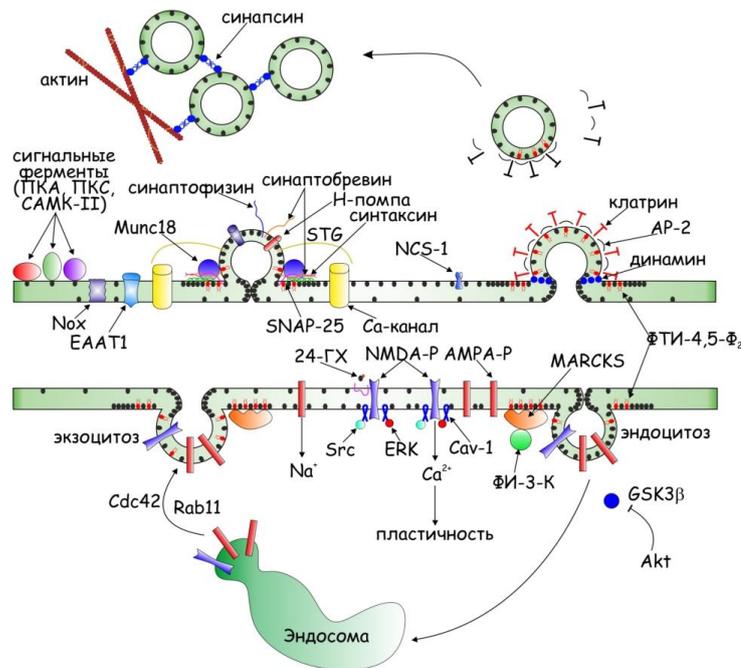


Рис. 27. Синаптическая передача: липид-белковые взаимодействия (Петров и др. 2016)

Нейромедиатор освобождается из синаптических везикул, которые сливаются (экзоцитоз) в специализированном регионе пресинаптической мембраны, активной зоне, в ответ на вход  $\text{Ca}^{2+}$  через потенциал-зависимые Са-каналы. Слияние везикул опосредуется белками, формирующими SNARE комплекс (синаптобревин, синтаксин, SNAP-25), и регулируется многими холестерин-связывающими белками (синаптотагмин/STG, Munc18, NCS-1) и сигнальными молекулами (протеинкиназами, НАДФН-оксидазой/Nox). После слияния белковые и липидные компоненты везикул подвергаются клатрин-опосредованному эндоцитозу. Большая часть синаптических везикул формирует резервный пул, который освобождает нейромедиатор только в период интенсивной длительной синаптической активности. Доставка этих везикул в сайты экзоцитоза зависит от актина и синапсина. В глутаматергическом синапсе освобождающийся нейромедиатор изменяет  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -проводимость постсинаптической мембраны, активируя AMPA/NMDA-рецепторы. Количество постсинаптических рецепторов зависит от экзо- и эндоцитозного трафика рецепторов, который управляется малыми ГТФазами (Rab11) и протеинкиназами (Cdc42, GSK3 $\beta$ , фосфоинозитол-3-киназа/ФИЗК). Зависимая от рецепторов сигнализация связана со многими белками (Src, ERK, Cav-1). На схеме изображены молекулы холестерина (черные) и их скопления, фосфатидилинозитол-4,5-бифосфаты (ФИ-4,5-Ф<sub>2</sub>, красные), и взаимодействующие с холестерином и ФИ-4,5-Ф<sub>2</sub> белки.

За счет способности к относительно легкому переходу между монослоями (флип-флопу) холестерин снижает «натяжение» мембран при деформациях, стабилизируя пору слияния. Холестерин способствует слиянию, благодаря взаимодействию с везикулярными (синаптофизин) и пресинаптическими (синтаксин-1) белками (Rohrbough, Broadie, 2005; Зефирова, Петров, 2010б; Adams et al., 2015).

В составе устойчивых к действию детергентов мембран (биохимически выделенная фракция, предположительно образующаяся из рафтов клеточных мембран) обнаруживаются ключевые белки везикул – протонная помпа, синаптотагмины, синаптофизины, SV2, а также белки экзоцитоза пресинаптической мембраны – синтаксин, SNAP-25, синаптобревин, Munc18, потенциал-зависимые  $Ca^{2+}$ -каналы (Jia et al., 2006). Предполагается, что на территории липидных рафтов сосредоточено 20-70% от всех SNARE белков пресинаптической мембраны, и чем выше концентрация SNARE-белков в рафтах, тем выше вероятность экзоцитоза (Петров, Зефирова, 2013). Накопление в рафтах SNAP-25 может происходить благодаря его пальмитилированию. Появление в рафтах синтаксина 1А может опосредоваться его прямым связыванием с холестерином или через взаимодействие со SNAP-25 (Murray, Tamm, 2011). Разные изоформы синтаксина холестерин-зависимо могут формировать в модельной мембране отдельные скопления. Это предполагает возможность формирования сайтов экзоцитоза с отличными свойствами (Sieber et al., 2006). Возможно, экзоцитоз может модулироваться слиянием / разделением отдельных рафтов. Например, с одной стороны, потенциал-управляемые  $Ca^{2+}$ -каналы и SNARE-белки, а с другой – белок NCS-1 (нейрональный  $Ca^{2+}$  сенсор-1), усиливающий активность  $Ca^{2+}$ -каналов, локализируются в разных микродоменах, слияние которых может облегчать экзоцитоз. Кроме того, истощение холестерина из синаптосомальных мембран, приводящее к разрушению рафтов, вызывает «рассеивание»  $Ca^{2+}$ -каналов по всей поверхности плазматической мембраны, а также угнетение нейросекреции (Taverna et al., 2007). В мембране фоторецепторных клеток  $Ca^{2+}$ -каналы L-типа не фиксированы, а двигаются внутри плотика (в пределах 100 нм от синаптической везикулы), который прилегает к активной зоне. Разрушение липидного микродомена существенно расширяет область диффузии  $Ca^{2+}$ -каналов и угнетает освобождение глутамата (Mercer et al., 2011). Мутации в гене синапс-специфичной церамидазы SLAB, приводящие к перераспределению холестерина в пресинаптической мембране, уменьшают на ~70% способность везикул к слиянию. В

рафтах могут концентрироваться анионные липиды, фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфаты, которые влияют на активность белков экзоцитоза и способность мембраны к деформации (Rohrbough, Broadie, 2005). Обогащенные холестерином мембраны могут многократно ускорять разборку шапероном NSF цис-SNARE-комплексов плазматических мембран в PC12 клетках, что может способствовать быстрому освобождению из «плена» активных SNARE-белков (Bar-On et al., 2009).

Существует предположение, что холестерин может требоваться для облегчения инвагинации мембраны при эндоцитозе (Rohrbough, Broadie, 2005; Зефирова, Петров, 2009) и участки мембраны, обогащенные холестерином, способны активировать белки, участвующие в эндоцитозе (Jia et al., 2006). Возможно, фосфоинозитиды рафтов вовлечены в запуск эндоцитоза и кластеризацию везикулярных белков (Rohrbough, Broadie, 2005). Также роль холестерина и рафтов в эндоцитозе может быть сопряжена с регулированием текучести мембран и зависимости гибкости мембран от их состава (Zefirov et al., 2006). Поскольку мембрана плотика более твердая, чем окружающая мембрана, то облегчается формирование изгибов, что должно «помогать» эндоцитозу фрагмента мембраны (Зефирова, Петров, 2010б).

### **2.8.2 Постсинаптические процессы и холестерин**

Изменения в количестве / составе постсинаптических рецепторов требуются для феноменов синаптической пластичности. Подобные изменения происходят за счет эндо- и экзоцитоза рецепторов, их латеральной диффузии между экстра- и синаптическими участками (Рис. 27). Трафик рецепторов контролируется как взаимодействием рецепторов с каркасными белками, так и липидной композицией мембраны. Также активность рецепторов и последующая сигнализация часто зависят от содержания мембранного холестерина. Многие из постсинаптических рецепторов локализируются в рафтах (Levitan et al., 2010; Петров, Зефирова, 2013). В целом, постсинаптическая плотность – массивный мульти-белковый комплекс, включающий молекулы, задействованные в постсинаптической сигнализации и пластичности – физически ассоциирована с рафтами (Hering et al., 2003; Suzuki et al., 2011). Поэтому диффузия рецепторных белков намного медленнее в синаптических сайтах, чем в экстрасинаптических регионах (Hering et al., 2003; Triller, Choquet, 2005; Fernandes et al.,

2010, Петров, Зефирова, 2013). Ниже приведены данные в отношении ионотропных глутаматных и ацетилхолиновых рецепторов.

Глутаматные AMPA-рецепторы – подтип глутаматных рецепторов, опосредующих большую часть возбуждающих синаптических связей в нервной системе (Зефирова, Ситдикова, 2010). Эти рецепторы постоянно перемещаются между плазматической мембраной и внутриклеточными компартментами. Регуляция трафика AMPA-рецепторов вовлечена в механизмы долговременной синаптической пластичности: эндоцитоз AMPA-рецепторов на продолжительное время снижает чувствительность постсинаптической мембраны к глутамату, а экзоцитоз рецепторов – наоборот (Czöndör, Thoumine, 2013; Петров, Зефирова, 2013). Большинство AMPA-рецепторов гиппокампальных и кортикальных нейронов локализуется в липидных плотиках (Hering et al., 2003), куда они доставляются с помощью каркасного белка GRIP, взаимодействующего с белком-резидентом рафтов Ephrin-B. Также AMPA-рецепторы могут ассоциироваться с ганглиозидами GM1 рафтов (Cole et al., 2010). Только ассоциированные с рафтами AMPA-рецепторы могут подвергаться тирозинному фосфорилированию Src киназой и киназой инсулинового рецептора, что вызывает их эндоцитоз, приводящий к долговременной синаптической депрессии (Hayashi et al., 2004). В первичной культуре нейронов гиппокампа белок плотиков кавеолин-1 снижает средство AMPA-рецепторов к агонисту (Gaudreault et al., 2004).

В целом, холестерин имеет двойное значение в трафике AMPA-рецепторов. Острое удаление холестерина подавляет токи через AMPA-рецепторы и их встраивание путем экзоцитоза, что ведет к уменьшению количества AMPA-рецепторов, снижению надежности синаптической передачи (Hou et al., 2008). Удаление холестерина / сфинголипидов в течение длительного времени увеличивает конститутивный эндоцитоз AMPA-рецепторов, также снижая их экспрессию на постсинаптической мембране (Hering et al., 2003). В нейронах со сниженным (~ на 25%) в ходе естественного старения уровнем холестерина наблюдается накопление AMPA-рецепторов на поверхности клетки вследствие нарушения их эндоцитоза и латеральной мобильности. Предполагается, что потеря холестерина ведет к отсоединению белка MARCKS от фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфатов мембраны, которые переводятся фосфоинозитол-3-киназой в фосфатидилинозитол-3,4,5-трифосфаты. Накопление последних стабилизирует F-актин, снижая подвижность постсинаптических AMPA-рецепторов, и

способствует активации Akt киназы, которая инактивирует GSK3 $\beta$ , участвующую в эндоцитозе AMPA-рецепторов (Martin et al., 2014).

Глутаматные NMDA-рецепторы – ключевой тип глутаматных рецепторов, задействованных в феноменах синаптической пластичности и кальциевом гомеостазе (Зефилов, Ситдикова, 2010; Петров, Зефилов, 2013). Активация глутаматных NMDA-рецепторов увеличивает число AMPA-рецепторов, ассоциированных с рафтами. По приблизительным оценкам, 90% NMDA-рецепторов ассоциировано с липидными плотиками и / или белками постсинаптической плотности, а 10% пребывают в жидкой мембране. Каркасный белок PSD-95, связывающийся с NMDA-рецепторами, также располагается во фракции липидных плотиков (Delint-Ramirez et al., 2010). Активация NMDA-рецепторов плотиков вызывает более значительный вход ионов Ca<sup>2+</sup> (Frank et al., 2004). В культуре нейронов при снижении концентрации холестерина экспрессия NMDA-рецепторов в плотиках снижается, при этом также ослабляется гибель нейронов, вызванная избыточной активацией NMDA-рецепторов (Liu et al., 2010). При ишемии или обучении происходит перемещение NMDA-рецепторов и PSD-95 из экстрасинаптических рафтов в область постсинаптической плотности, что запускается фосфорилированием NR2A и NR2B субъединиц рецептора тирозин-киназами Src семейства (Delint-Ramirez et al., 2010). Причем фосфорилирование активирует ионный канал рецептора, но способствует интернализации рецептора (Besshoh et al., 2007). Липидные плотики мембраны нейронов могут быстро изменяться в размерах, концентрируя в себе NMDA рецепторы. В физиологических условиях быстрому увеличению размеров рафтов, кластеризации в них NMDA рецепторов и увеличению амплитуды постсинаптических Ca<sup>2+</sup>-токов способствует фактор некроза опухолей альфа и фактор роста нервов, продуцируемые глиальными клетками (Wheeler et al., 2009). Сверх-экспрессия в культуре нейронов белка плотиков кавеолина 1, способствующая формированию рафтов, увеличивает экспрессию на мембране NMDA-рецепторов (Head et al., 2010, 2011). Белок вируса иммунодефицита gp120 способствует образованию больших стабильных липидных микродоменов на дендритах и перемещению в них NMDA-рецепторов, в итоге рецепторы теряют способность к латеральной диффузии, не интернализуются и увеличиваются поступление Ca<sup>2+</sup> в цитоплазму при их активации. Разрушение микродоменов устраняет эти эффекты (Xu et al., 2011).

Локализация NMDA-рецепторов в рафтах облегчает их олигомеризацию, а удаление холестерина угнетает вход  $\text{Ca}^{2+}$  через NMDA-рецепторы, способствует их десенситизации и ингибирует долговременную потенциацию в гиппокампе (Korinek et al., 2015). Наоборот, 24-гидроксихолестерин, действуя как аллостерический модулятор, в субмикромольных концентрациях потенцирует опосредуемый NMDA-рецепторами ответ, способствуя индукции долговременной потенциации в срезах гиппокампа. Интересно, что 25-гидроксихолестерин (в субмикромольной концентрации) препятствует развитию данного эффекта 24-гидроксихолестерина (Paul et al., 2013). Вход  $\text{Ca}^{2+}$  через NMDA-рецепторы может вызывать как феномены синаптической пластичности, так и гибель клетки (эксайтотоксичность), что зависит от величины потока  $\text{Ca}^{2+}$  и локализации рецепторов (в рафтах или нет, в синаптическом или экстраинаптическом регионе). NMDA-рецепторы рафтов взаимодействуют с кавеолином-1, что важно для активации сигнального пути Src-киназа/ERK киназа, способствующего выживанию нейронов. Поэтому локализованные в рафтах рецепторы в меньшей степени опосредуют эксайтотоксичность. При длительном воздействии агониста и ишемии происходит перемещение NMDA-рецепторов в жидкую фазу мембраны (Head et al., 2008; Stary et al., 2012). Сверх-активация экстраинаптических NMDA-рецепторов преимущественно вовлекается в эксайтотоксичность (Martin et al., 2014). В липидных плотиках располагается транспортер возбуждающих аминокислот (EAAT1-4), и удаление холестерина снижает опосредуемый транспортером  $\text{Na}^+$ -зависимый захват глутамата в глиальные и нейрональные клетки (Butchbach et al., 2004), способствуя эксайтотоксичности. Интересно, что активация NMDA-рецепторов вызывает быстрое снижение внутриклеточного содержания холестерина (возможно, рециклирующих эндосом), что ведет к активации Cdc42 и Rab11-зависимого трафика AMPA-рецепторов в постсинаптическую мембрану. Это способствует возникновению долговременной синаптической потенциации (Brachet et al., 2015).

Никотиновые ацетилхолиновые рецепторы (nAChR) широко распространены в центральной и периферической нервных системах (Зефилов, Ситдикова, 2010). Эффект активации синаптических nAChR критически зависит от их локализации (в пре- или постсинаптическом участке), также имеет значение позиция рецептора в определенном регионе мембраны. Предполагается обширное взаимодействие между трансмембранной белковой частью nAChR и определенными липидными молекулами (фосфолипиды,

холестерин, фосфатидная кислота), формирующими пояс вокруг рецептора (минимум из 45 липидов). Эти липиды относительно неподвижны (имеют в 50-100 раз меньший коэффициент латеральной диффузии), поскольку крепко связаны с рецептором. От состава липидного пояса nAChP зависит его ионная проницаемость (Fantini, Barrantes, 2009; Barrantes, 2014; Петров, Зефилов, 2013). Холестерин и анионные фосфолипиды облегчают открывание канала рецептора, тогда как жирные кислоты нарушают взаимодействие рецептора с холестерином и фосфолипидами, и ингибируют открывание канала. Наличие холестерина необходимо для поддержания корректной структуры рецептора и перехода между конформациями (Fantini, Barrantes, 2009). Хроническое применение препаратов, ингибирующих синтез холестерина (статинов), ведет к миастении, которая частично связана с нарушением функционирования nAChP (Grajales-Reyes G.E. et al., 2012).

В липидных плотиках нейронов ресничного ганглия (Brusés et al., 2001), гиппокампальных нейронов (Colón-Sáez, Yakel, 2011), постсинаптической области денервированных мышц мыши и искусственно выращенных нервно-мышечных синапсов обнаружены nAChP (Willmann et al., 2006). Большая часть молекул (рапсин, MuSK, SFKs,  $\alpha$ -дистробревин-2,  $\beta$ -дистрогликан, кавеолин 3), участвующих в кластеризации мышечных nAChP, также локализуется в рафтах. Перемещение nAChP концевой пластинки в рафты может стимулироваться агрином, нейротрофическим фактором, секретлируемым мотонейронами, а вызванное денервацией мышц рассеивание nAChP замедляется после встраивания дополнительного количества холестерина в постсинаптическую мембрану (Willmann et al., 2006). В нейронах цилиарного ганглия разрушение плотиков вызывает увеличение подвижности nAChP, их рассеивание и влияет на функционирование nAChP (Fernandes et al., 2010). Так, при дестабилизации плотиков происходит замедление десенситизации и увеличение аффинности к медиатору  $\alpha 7$ -nAChP гиппокампа (Colón-Sáez, Yakel, 2011). Хотя разрушение плотиков существенно не сказывается на кинетике работы мышечных nAChP дикого типа (Тараканова и др. 2011), токи через мутантную форму nAChP ( $\alpha$ C418W), с которой связано возникновение наследственного миастенического синдрома, усиливаются. В составе плотиков мутантные nAChP стабилизируются кавеолином-1 в неактивной форме, а при разрушении плотиков активность рецепторов возрастает (Báez-Pagán et al., 2008). Таким образом, в плотиках может содержаться неактивный пул рецепторов, который способен

освобождаться при изменении стабильности рафтов. Следует оговориться, что заякоривание некоторых nAChR (например,  $\alpha 3$ -типа) в постсинаптической мембране может происходить с помощью каркасных, цитоскелетных белков, белков микротрубочек и не зависеть от липидных плотиков (Fernandes et al., 2010). Сфинголипиды плотиков могут выступать в роли шаперонов, способствуя правильной сборке nAChR и их доставке в плазматическую мембрану. Ингибирование синтеза сфинголипидов в линии клеток млекопитающих вызывает накопление олигомеров nAChR в эндоплазматической сети (Baier et al., 2010).

Липидные плотики важны не только в процессах секреции медиатора, но и, весьма вероятно, играют существенную роль в концентрировании молекул медиатора у постсинаптической мембраны. Молекулы нейромедиаторов в очень высокой концентрации (свыше 600мМ) содержатся в синаптических везикулах, при этом создаются благоприятные условия для формирования нековалентных олигомеров (агрегатов) (Nag et al., 2008). После экзоцитоза концентрация медиатора в синаптической щели стремительно падает, и мономеры спонтанно освобождаются из агрегатов. Предполагается следующий сценарий событий. Подходя к постсинаптической мембране, агрегаты медиатора могут разрушаться при взаимодействии с ганглиозидами плотиков, в итоге освободившиеся отдельные молекулы связываются с рецепторами, разрушаются или захватываются обратно в нервное окончание. Кроме этого, мономеры медиатора, соединенные с липидами постсинаптической мембраны, могут направляться в сторону специфичных сайтов рецепторов, обладающих наибольшей аффинностью. Так, связывающий сайт ряда рецепторов (например, серотониновых) расположен в трансмембранной спирали (то есть спрятан в толще мембраны) и доступен только для молекул, которые концентрируются у поверхности мембраны. Обнаружено взаимодействие серотонина, ГАМК, глутамата с компонентами синаптических липидных плотиков, в частности сфингомиелином. Пептидные нейромодуляторы (лейцин энкефалин, альфа-меланоцит стимулирующий гормон, субстанция P), токсины тоже связываются с гликолипидами (Fantini, Barrantes, 2009; Петров, Зефирова, 2013).

Анализ литературных данных указывает на особую физиологическую роль эволюционно наиболее нового липида холестерина, который может вступать во

взаимодействия со сфинголипидами, формируя микродомены мембраны - липидные плотики (рафты). Рафты определяются как динамичные, обогащенные холестерином, сфинголипидами упорядоченные скопления со специфичными белками, которые могут объединяться за счет специфических липид-липидных, белок-липидных, белок-белковых взаимодействий. Клеточная мембрана представляет собой мозаику из рафтов, в которых протекают специфичные реакции. В физиологических условиях изменения стабильности плотиков, их количества, объединение или разделение рафтов управляют многими клеточными процессами. При слиянии рафтов создаются сигнальные платформы, на территории которых становится возможным взаимодействие сигнальных молекул и запуск сигнальных каскадов. Разрушение рафтов чревато нарушением компартментализации клеточных реакций и существенными изменениями в функционировании рецепторов и ионных каналов. Важное значение липидные плотики имеют в высокоспециализированных клетках (в частности, нейронах), для которых характерна сложная компартментализация и регуляция клеточных процессов. В пресинаптической мембране с холестерином и липидными плотиками могут взаимодействовать многие белки, вовлеченные в процессы экзо- и эндоцитоза синаптических везикул, которые лежат в основе секреции нейромедиатора. Рафты постсинаптической мембраны важны для обеспечения концентрирования медиатора, кластеризации и правильного функционирования постсинаптических рецепторов. В целом, изучение липидных плотиков представляет собой новое направление, развитие которого необходимо для детального понимания функционирования нейронов и синаптического аппарата.

### 3. МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

#### 3.1 Объект, растворы и реагенты

Эксперименты выполнены на нервно-мышечных препаратах лягушек (*Rana ridibunda*, кожно-грудинная мышца) и диафрагмальных мышцах лабораторных мышей и крыс. Эксперименты на лягушках проводились в осенне-зимний период. Исследование проведено с соблюдением правил по использованию лабораторных животных Казанского государственного медицинского университета и удовлетворяет правилам «по заботе и использованию лабораторных животных» (NIH Publication No. 85–23, revised 1996) и правилам AVMA эвтаназии лабораторных животных (2013).

Лягушек содержали в бассейнах с проточной дехлорированной водой в полутемном помещении при температуре 3-5С. Мыши и крысы содержались в условиях свободного доступа еды и воды, с циклом 12 часов свет / 12 часов темнота, с контролем температуры и влажности внешней среды. В экспериментах использовали самцов беспородных мышей с массой тела 22-25 г, и самцов крыс породы Вистар с массой тела – 120-150 г. После предварительной анестезии животные декапитировались (в случае лягушек также производили деструкцию спинного мозга), грудная клетка быстро вскрывалась, мышца быстро вынималась и погружалась в физиологический раствор. Все усилия были направлены на то, чтобы минимизировать страдания. Экспериментальные протоколы удовлетворяют требованиям директивы 86/609/ЕЕС и были утверждены этическим комитетом Казанского государственного медицинского университета.

Препараты погружались в заполненные сильгардом ванночки (объемом 3-4 мл) и растягивались с помощью микробулавок. Использовались растворы Рингера для холоднокровных (NaCl - 115.0, CaCl<sub>2</sub> - 1.8, KCl - 2.5, NaHCO<sub>3</sub> - 2.4, в mM; или NaCl - 113.0, CaCl<sub>2</sub> - 1.8, KCl - 2.5, NaHCO<sub>3</sub> -1.0, Hepes 5 в mM) и Кребса для мышек (NaCl-144.0, CaCl<sub>2</sub>-2.0, MgCl<sub>2</sub>-0.1, KCl-5.0, NaHCO<sub>3</sub>-24.0, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-1.0, глюкоза-11.0, или NaCl-129.0, CaCl<sub>2</sub>-2.0, KCl-5.0, MgSO<sub>4</sub>-1.0, NaHCO<sub>3</sub>-20.0, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-1.0, глюкоза-11.0, Hepes-3.0 в mM) и крыс (NaCl – 120; KCl – 5.0 mM; CaCl<sub>2</sub> – 2.0; MgCl<sub>2</sub> – 1.0, NaHCO<sub>3</sub> – 23.0; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 1.0; глюкоза - 11 mM). Растворы для теплокровных насыщались смесью 5% CO<sub>2</sub> и 95% O<sub>2</sub>. В течение эксперимента препараты постоянно перфузировались физиологическими растворами (скорость перфузии – 1 мл / мин, в ряде флуоресцентных

экспериментов скорость увеличивали до – 10 мл/мин), температура которых поддерживалась на уровне - 20-21С (для холоднокровных) и 23-24С (для теплокровных), а pH – на уровне 7.3-7.4. В применяемых растворах контролировалась осмолярность. В ряде экспериментов (электрофизиологических и оптических с использованием FM-красителей) мышечные волокна были поперечно рассечены, чтобы предотвратить мышечные сокращения и одновременно поддерживать физиологический уровень квантового освобождения ацетилхолина в нервно-мышечных синапсах (Glavinovi's, 1979; Lambert et al, 1981; Giniatullin, Giniatullin, 2003; Giniatullin et al., 2015).

Холестерин из поверхностных мембран удаляли с помощью метил- $\beta$ -циклодекстрина (МЦД, Sigma) в разных концентрациях (0.1 до 10 мМ). Комплексованный с МЦД холестерин («водорастворимый холестерин», 400 мкг/мл, Sigma) применялся для обогащения мембран холестерином. В экспериментах с МЦД и комплексом МЦД-холестерин контролировали осмотичность растворов. Пропионат натрия (20 и 40 мМ, Sigma) использовался для снижения цитоплазматического pH. Для поддержания осмолярности на постоянном уровне в экспериментах с пропионатом натрия, содержания NaCl в растворах уменьшали до 100 и 80 мМ, соответственно. ( $\pm$ )-Везамикол (Sigma) использовали для ингибирования везикулярного транспортера ацетилхолина. Активность ацетилхолинэстеразы в нервно-мышечных синапсах блокировали 10 мкМ армина (Институт органической химии, Москва), а никотиновых ацетилхолиновых рецепторов - d тубокурарином 1-10 мкМ (Sigma). Для блокирования эндоцитоза использовался миристилизованный динамин-ингибирующий пептид (75 мкМ, Tocris). Для окисления холестерина поверхностных мембран применяли бактериальный фермент холестерин оксидазу (1 ед. акт., *Streptomyces* sp., Sigma). Для блокирования генерации потенциалов действия применяли тетродотоксин (1мкМ, Sigma). В работе использовали антагонист активных форм кислорода - N-ацетил-L-цистеин (антиоксидант, 200 мкМ, Sigma), ингибитор TRPV-каналов и рианодиновых рецепторов - рутений красный (2 мкМ, Sigma), ингибитор инозитолтрифосфатных рецепторов и рианодиновых рецепторов - TMB8 (50 мкМ, Sigma), селективный блокатор TRPV1-каналов – капсазепин (10 мкМ, Sigma), ингибитор L-типа  $Ca^{2+}$  каналов – нифедипин (10 мкМ, Sigma), высокоаффинный  $Ca^{2+}$ -буфер ВАРТА-АМ (200 мкМ, Sigma), ингибитор кальциневрина - циклоспорин А (50 мкМ, Sigma), ингибитор фосфатаз (PP1, PP2A) - окадаиковая кислота (50 нМ, Sigma), ингибитор НАДФН-

оксидазы - апоцинин (200 мкМ, Sigma). Миристилизованный ингибирующий протеинкиназу С пептид (75 мкМ, Myr-RFARKGALRQKNV, Sigma) и хелеритрин хлорид (1 мкМ, Sigma) были использованы для специфичного блокирования протеинкиназы С. Компаунд 48/80 (100 мкМ, Sigma) и U-73122 (10 мкМ, Sigma) применялись для блокирования фосфолипазы С. NAC, апоцинин, рутений красный, TMB8, капсазепин, нифедипин, циклоспорин А, омега-3-линоленовая кислота, миристилизованный ингибирующий протеинкиназу С пептид, хелеритрин хлорид, компаунд 48/80, U-73122 апплицировались перед добавлением МЦД за 40-50 мин и содержались в наружном растворе в течение всего эксперимента. В ВАРТА-АМ препараты выдерживались в течение 2 часов, затем в течение 30 мин препарат перфузировался физиологическим раствором, только после этого осуществлялась обработка МЦД. В некоторых экспериментах, препараты были предварительно обработаны миристилизованным ингибирующим протеинкиназу С пептидом, который затем смывался перед обработкой МЦД. Оксистерол, 5 $\alpha$ -холестан-3-он (Sigma) был растворен в DMSO (диметилсульфоксид) так, что конечная концентрация DMSO в рабочем (физиологическом) растворе не превышала 0.001%, а концентрации 5 $\alpha$ -холестан-3-она составляла 200 нМ.

### 3.2 Электрофизиологические подходы

С помощью стандартной методики двух-микроэлектродной фиксации потенциала мембраны мышечных волокон регистрировали постсинаптические события - токи концевой пластинки (ТКП) и миниатюрные ТКП (МТКП)<sup>1</sup>. При этом использовали стеклянные микроэлектроды (диаметр кончика около 1 мкм), имеющие сопротивление 3-5 М $\Omega$  и заполненные 2.5 моль/л KCl. Синаптическая зона локализовалась между двумя электродами, разделенными дистанцией 200-300 мкм. Если для предотвращения мышечного сокращения использовали рассечение мышечных волокон, то при регистрации ТКП потенциал рассеченных мышц поддерживали на уровне -40 мВ (ток утечки варьировал в диапазоне 10-30 нА, <10% от амплитуд ТКП). До начала записи, рассеченная мышца омывалась, по крайней мере 40 мин, физиологическим раствором (Glavinovi's, 1979). Рассечение мышечного волокна не вызывает значительных изменений кабельных свойств мышцы и в комбинации с техникой фиксации потенциала

---

<sup>1</sup> Эксперименты выполнены совместно с к.б.н. Гиниатуллиным Артуром Рауфовичем

позволяет проводить долговременную и стабильную запись мультиквантовых ТКП (Lambert et al., 1981; Giniatullin et al., 2005, 2015).

ТКП вызывались сверхпороговой стимуляцией двигательного нерва через электроды, соединенные с экстраклеточным стимулятором DS 3 (Digitimer Ltd, Англия). Нерв подсасывали в силиконовую трубочку со стимулирующими электродами. Стимуляцию моторного нерва производили прямоугольными импульсами продолжительностью 0.1 мс. Использовались следующие протоколы стимуляции: двигательный нерв раздражали единичными импульсами (1 стимул в 20 с, 0.05 Гц) или высокочастотным шлейфом стимулов (20 стимулов в 1 с, 20 Гц, в течение 3 мин), или парной стимуляцией (с межимпульсными интервалами 5, 7, 10, 20, 50 мс). Записанные сигналы оцифровывались при частоте 50 Гц и анализировались с использованием компьютера. Записывающее оборудование включало усилитель Axoclamp 900 A (Molecular devices, США) и АЦД LA-II (Пушино, Россия). Отношение при парной стимуляции было получено при сравнении второго и первого ТКП, усредненных от более чем 12 реализаций.

В части экспериментов с помощью одного микроэлектрода регистрировали миниатюрные потенциалы концевой пластинки (МПКП). При этом использовали стандартные внутриклеточные микроэлектроды (сопротивление 3-5 МΩ), заполненные 2.5 М КСl. Записи были оцифрованы при 50 кГц, сохранены на компьютер и впоследствии анализировались для подсчета частоты МПКП. Оборудование для записи сигналов включало усилитель модели 1600 (A-M System, Carlsborg, США) и АЦП LA-II (Пушино, Россия). В экспериментах по исследованию МЦД на спонтанную секрецию (в частности, частоту МПКП) использовали тетродотоксин (1мкМ) для блокирования генерации потенциалов действия. В электрофизиологических экспериментах для регистрации и анализа данных использовалось оригинальное программное обеспечение, написанное к.б.н. Захаровым Андреем Викторовичем.

Неквантовую секрецию медиатора оценивали электрофизиологически, измеряя Н-эффект.<sup>2</sup> Свежевыделенные нервно-мышечные препараты инкубировались в течение 30 мин с необратимым ингибитором ацетилхолинэстеразы (армином), следующие 15 мин препарат промывался физиологическим раствором. В этих условиях освобождаемый невезикулярным путем ацетилхолин накапливается в синаптической щели и

---

<sup>2</sup> Эксперименты проведены совместно с к.б.н. Науменко Николаем Владимировичем

деполяризует постсинаптическую мембрану. Мембранный потенциал покоя измеряется в области концевой пластинки перед, и 10 мин после аппликации 10 мкМ (+) тубокурарина. Разница между двумя измерениями потенциала покоя обозначается как Н-эффект и используется как показатель некантовой секреции медиатора (Katz, Miledi, 1997; Vyskocil, Shes, 1977). В каждой серии экспериментов мембранный потенциал покоя был измерен в 20-30 поверхностных мышечных волокнах от 3 до 5 животных с использованием стеклянного микроэлектрода с сопротивлением кончика 8-12 МΩ.

### ***3.3. Флуоресцентные подходы***

Флуоресценцию регистрировали при использовании микроскопов OLYMPUS CX41 (со светодиодами FluoLed (Fraen microscopy) в качестве источников возбуждающего света и CCD видеокамерой DP71 (Olympus)), OLYMPUS BX51 WI (оснащенного конфокальной системой Disk speed unit (Olympus) и CCD камерой orca R2 (Hamamatsu)) и OLYMPUS BX51 WI (со светодиодными источниками возбуждающего света FluoLed (Fraen microscopy) и CCD камерой F-View II (Olympus), и DIC-оптикой (Olympus) для визуализации полупрозрачных объектов). Использовали объективы фирмы Olympus: UPLSAPO 10x2, UPLSAPO20x, LumPIFI 40xw, LumPIFI 60xw, UPlanSAPO 60x/1.20W и LUMPlanFI 100x/1.00W. Для регистрации и обработки изображений использовались программы Cell<sup>A</sup> (Olympus), Cell<sup>P</sup> (Olympus), Cell<sup>Sens</sup> (Olympus), ImagePro (Media Cybernetics), Image J (National Institutes of Health). Анализ интенсивности флуоресценции производили в относительных единицах (о.е.) с применением программного пакета ImagePro. Микроскопы оборудованы системой жизнеобеспечения препаратов: перфузия, термостатирование, микроманипуляторы для позиционирования электродов.

#### **3.3.1 Слежение за везикулярными процессами: эндоцитозные FM-красители**

В экспериментах применяли флуоресцентные метки – FM1-43 и FM2-10 (Molecular Probes) в концентрациях 3-5 мкМ и 20-25 мкМ, соответственно. Красители обратимо взаимодействуют с поверхностными мембранами и в ходе эндоцитоза захватываются внутрь вновь образующихся синаптических везикул («загружаются» в нервную терминаль) (Betz, Bewik, 1992; Зефилов и др., 2003). В результате в нервном окончании в области активных зон появляются флуоресцирующие пятна (рис. 28,

рис. 29), отражающие скопления (кластеры) синаптических везикул, поймавших краситель (Betz, Henkel, 1993). Очевидно, что интенсивность флуоресценции зависит как от количества везикул, вовлеченных в экзоцитоз, так и от интенсивности эндоцитоза синаптических везикул (Зефиоров и др. 2003).

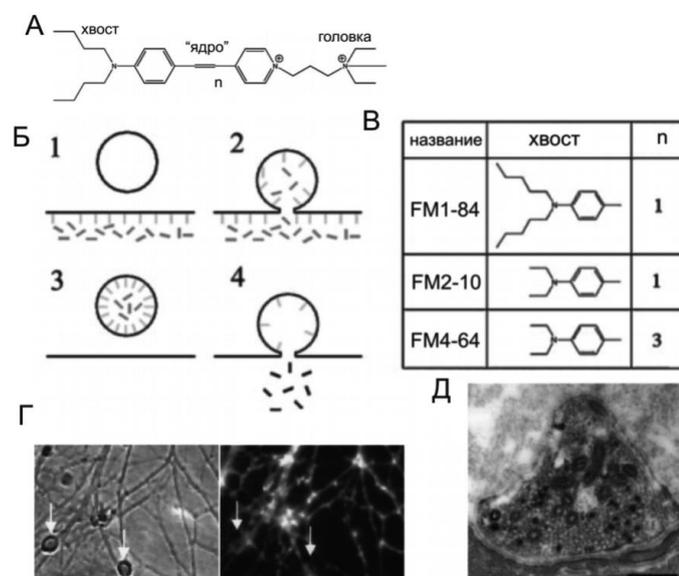


Рис. 28. Флуоресцентные FM-красители для изучения экзо- и эндоцитоза синаптических везикул (Cousin, Robinson, 2000; Rizzoli, Betz, 2004; Зефиоров, Петров, 2010a)

А - Структура FM1-43: хвост, ядро и головка. Б – схема типичного эксперимента с FM-красителем: 1 - маркер добавляется в физиологический раствор и проникает в синаптическую щель; 2 – после экзоцитоза при образовании новых везикул (эндоцитоз) происходит захват красителя в везикулы (загрузка в нервную терминаль); 3 – краситель удаляется из наружного раствора; 4 – при стимуляции экзоцитоза содержащие красителем везикулы сливаются с пресинаптической мембраной и вместе с нейромедиатором освобождают краситель (выгрузка FM-красителя) в синаптическую щель, отделившийся от мембраны краситель практически не флуоресцирует и уносится перфузией из ванночки. При выгрузке красителя в наружной среде может присутствовать тушитель, который взаимодействует с FM и мгновенно подавляет его флуоресценцию. В - примеры FM-красителей. Длина хвоста определяет силу связывания красителя с мембраной, а спектральные характеристики определяются количеством двойных связей в ядре. Г – Изображение культуры гранулярных клеток мозжечка в светлом поле (слева), стрелками обозначены тела клеток. Загрузка красителем FM1-43 того же самого региона (справа).

Рис. 28 (продолжение)

Флуоресценция красителя регистрируется в регионах аксонов, где протекает экзо-и эндоцитоз синаптических везикул. Д – Электронномикроскопическая фотография поперечного сечения двигательного нервного окончания лягушки, загруженного FM1-43 (стимуляцией 10 с, 30 Гц) и затем подвергнутого процедуре фотоконверсии. Захватившие FM1-43 везикулы выглядят черными. Шкала – 0.5 мкм (Зефилов, Петров, 2010а).

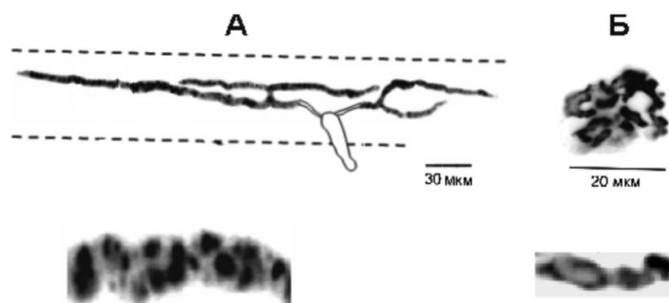


Рис. 29. Флуоресцентные инвертированные картины двигательных нервных окончаний лягушки и мышцы, загруженных FM1-43 (Зефилов и др. 2003 с изменениями)

А - нервное окончание кожно-грудинной мышцы. Видно пять нервных терминалей, сформированных одним аксоном. Расположение последнего сегмента миелина дорисовано. Пунктирными линиями указаны границы мышечного волокна. Б - нервное окончание диафрагмальной мышцы. Снизу представлены участки нервных терминалей при большом увеличении. Видны светящиеся пятна, образованные скоплениями синаптических везикул, захвативших краситель (Зефилов, Петров, 2010а). Изображение инвертировано.

В экспериментах обычно для «загрузки» красителя мы использовали длительное (1 или 3 мин) и иногда короткое (20 с) высокочастотное раздражение (20 Гц). В зависимости от дизайна эксперимента FM-красители присутствовали в омывающем препарат растворе разное время, обычно красители апплицировались на 10 мин, включая период до и после стимуляции. После процесса загрузки красителя для снижения фонового свечения нервно-мышечный препарат перфузировался 15-30 мин физиологическим раствором, содержащим 3 мкМ ADVASEP-7. Этот реагент ускоряет диссоциацию FM1-43 от поверхностных мембран и уменьшает неспецифическую флуоресценцию. Если нервные окончания предварительно были загружены красителем, то стимуляция (20 Гц, 5 мин или 2 Гц 10 мин) двигательного нерва приводит к

выделению из нервного окончания красителя вместе с медиатором в синаптическую щель при экзоцитозе везикул. В этом случае краситель «выгружается» из нервного окончания, а интенсивность свечения падает. Выгрузка красителя может происходить не только под влиянием стимуляции (вызванный экзоцитоз), но и при усилении спонтанного экзоцитоза (в частности, за счет удаления холестерина высокой дозой МЦД, 10 мМ). Следует отметить, что МЦД сам может связывать FM1-43 (Dason et al., 2010), и в этом случае МЦД действует как агент, ускоряющий диссоциацию FM1-43 от поверхностных мембран. Для предотвращения такого неспецифического влияния МЦД на кривые выгрузки, мы старались минимизировать неспецифичную флуоресценцию, применяя ADVASEP-7.

Для оценки влияния на эндоцитоз, препараты обрабатывались исследуемым агентом перед загрузкой FM-красителей. Для выявления эффектов на экзоцитоз, исследуемый реагент обычно апплицировался после отмывки препарата с ADVASEP-7 (Biotium), но перед началом повторного «выгружающего» краситель стимуляционного эпизода.<sup>3</sup>

Неспецифическую (фоновую) флуоресценцию оценивали в регионе без нервных терминалей как усредненную яркость флуоресценции в контуре, с площадью равной площади нервной терминали. Флуоресценцию нервного окончания определяли после вычитания фоновой флуоресценции (Петров и др. 2008; Petrov et al., 2008). При анализе динамик выгрузки значение исходной флуоресценции пятен принимали за 1.0 (100%). Интенсивность свечения оценивали как среднее свечение всех пикселей в контуре отдельной нервной терминали (свечение нервного окончания) или как среднее свечение всех пикселей в контуре отдельных пятен (свечение пятен). Профиль флуоресценции нервных окончаний высчитывали как среднюю яркость флуоресценции ряда (отрезка) пикселей вдоль продольного оси терминали (Зефилов и др. 2003). Для наблюдения флуоресценции использовали возбуждающий светофильтр – 480/20 нм (или 480/10 нм), дихроическое зеркало – 505 нм и эмиссионный светофильтр 535/40 (или 535/20 нм).

Для тушения флуоресценции FM1-43 и FM2-10 в ряде экспериментов использовали сульфородамин 101 (Sigma) в концентрации 5-7 мкМ (Pyle et al., 1999). Этот тушитель имеет малые размеры и при взаимодействии с флуоресцирующими

---

<sup>3</sup> Проведение части экспериментов с FM-красителями происходило при содействии студентов М.Р. Касимова, А.А. Яковлевой, Г.Ф. Закирьяновой, К.Е. Кудряшовой.

молекулами FM1-43 (FM2-10) по механизму FRET «ворует» их зеленую флуоресценцию, сам при этом начинает флуоресцировать в красном диапазоне (Петров и др. 2013). В некоторых экспериментах использовали тушитель SCAS (3-5 мкМ, Biotium), который драматично снижает фоновую флуоресценцию FM1-43 сразу после момента добавления в перфузионную среду.

В качестве дополнительной пробы для исследования эндоцитоза, мы использовали FM4-54 (5 мкМ), для которого характерна длинноволновая флуоресценция. Причем ее можно дифференцировать от зеленой флуоресценции FM1-43 при использовании соответствующего набора светофильтров. В некоторых экспериментах по исследованию эффектов 5 $\alpha$ -холестан-3-она, два FM-красителя, FM1-43 и FM4-64, были последовательно загружены в одни и те же нервные терминалы двумя эпизодами стимуляции (по 3 мин 20 Гц), разделенными 1.5 часовым интервалом. Сначала нервные терминалы были загружены FM1-43, промыты физиологическим раствором с ADVASEP-7, проперфузированы с 5 $\alpha$ -холестан-3-оном (или нормальным физиологическим раствором) и затем повторно загружены FM4-64 с последующим периодом промывки физиологическим раствором с ADVASEP-7. Флуоресценция FM4-64 наблюдалась при использовании возбуждающего светофильтра 480/10 нм, дихроического зеркала 660 нм и эмиссионного светофильтра 690 LP. В экспериментах по детекции флуоресценции FM4-64 в меченных двумя красителями терминалах, засветка от FM1-43 в красном канале (690LP фильтр) была сначала оценена при визуализации образца, загруженного только FM1-43 (около 5% от общего сигнала в зеленом канале). Значение усиления оптического сигнала в красном канале затем было уменьшено до уровня ниже порога для флуоресценции FM1-43 (Rea et al., 2004; Kasimov et al., 2015). Флуоресценция в зеленом канале регистрировалась после первой процедуры загрузки (FM1-43), но перед вторым эпизодом стимуляции, используемого для загрузки FM4-64. Таким образом, зеленая и красная флуоресценция указывали на количество синаптических везикул, подвергающихся циклам экзо-эндоцитоза в ответ на первый и второй эпизод стимуляции, соответственно. В этих экспериментах оценивалось отношение интенсивностей сигналов в красном и зеленом каналах.

### 3.3.2 Цитозольный уровень кальция

Для оценки динамики внутриклеточного уровня  $\text{Ca}^{2+}$  применяли мембранопроникающий краситель Fluo-4AM (Molecular Probes). Неионный детергент Pluronic F-127 добавлялся перед разведением аликвоты Fluo-4-AM в физиологическом растворе незадолго до начала эксперимента. Конечная концентрация индикатора в рабочем физиологическом растворе была 1 мкМ, а растворителя DMSO (диметилсульфоксида) и детергента Pluronic F-127 - не превышала 0,001%. Экспозиция препарата в физиологическом растворе (при 22°C) с индикатором (1 мкМ Fluo4-AM) длилась 10 мин. Впоследствии начиналась перфузия препарата физиологическим раствором, не содержащем краситель, а регистрация флуоресценции происходила через 40 мин. Для возбуждения флуоресценции область интереса, содержащую нервную терминаль, подвергали кратковременному облучению (~1 с) светом длиной волны 470-490 нм, а для детекции свечения использовали эмиссионный фильтр, с полосой пропускания более 515 нм. Анализ флуоресценции осуществлялся в синаптическом регионе.

### 3.3.3 Внеклеточный уровень ацетилхолина

Уровень ацетилхолина, освобожденного из нервно-мышечных препаратов с нативной ацетилхолинэстеразой, оценивался оптически с использованием AmplexRed Acetylcholine assay kit (Molecular Probes) (Tsai et al., 2007). Целая диафрагмальная мышца инкубировалась в ванночке (в условиях стоп-перфузии) в физиологическом растворе (0.4 мл), содержащем холин оксидазу (1 ед. акт. / мл), пероксидазу хрена (ПРХ, 2 ед. акт. / мл) и 400 мкМ AmplexRed реагента (10-cetyl-3,7-dihydroxyphenoxazine). Метод основывается на оптической детекции внеклеточного уровня холина, который освобождается при гидролизе ацетилхолина эндогенной ацетилхолинэстеразой. Холин оксидаза разлагает холин на бетаин и  $\text{H}_2\text{O}_2$ , последний вступает в реакцию с AmplexRed реагентом с образованием стабильно флуоресцирующего продукта - резорурфина. Эта реакция катализируется ПРХ. Флуоресценция резорурфина измерялась при освещении препарата возбуждающим светом  $535 \pm 10$  нм и эмиссия детектировалась при использовании светофильтра  $590 \pm 20$  нм (или 590 LP, пропускающего свет более 590 нм). Количество ацетилхолина оценивалось в мкМ / мл раствора ванночки / грамм мышечной ткани после сравнения с кривыми стандартами, полученными при

использовании заданных концентраций ацетилхолина. Для каждого измерения, мы делали коррекцию на фоновую флуоресценцию, вызванную базальной продукцией  $H_2O_2$ , не связанной с окислением холина. Растворы постоянно мешались в течение инкубации нервно-мышечного препарата и 20 мкл образцы собирались через определенные интервалы для флуоресцентного анализа. После флуоресцентных измерений каждая порция (образец) возвращался обратно в ванночку (Petrov et al., 2011).

### **3.3.4 Внеклеточный уровень пероксида водорода**

Уровень внеклеточного пероксида водорода, образованного препаратами, был оценен оптически с использованием набора Amplex Red Hydrogen Peroxide Kit (Molecular Probes). Этот набор содержит Amplex Red реагент и ПХР. Метод основан на том, что  $H_2O_2$  используется ПХР для окисления реагента Amplex Red в стабильно флуоресцирующее вещество - резорурфин (стехиометрия реакции 1 к 1). Для учета фоновой продукции  $H_2O_2$  целый нервно-мышечный препарат в контроле выдерживали 5 мин в растворе Рингера (общий объем 400 мкл), с растворенными 100 мкМ Amplex Red реагента и 0.2 ед. акт./мл ПХР. Затем препарат вынимался из этого раствора и погружался на следующие 5 мин в свежий раствор, содержащий МЦД (10 мМ) в дополнение к Amplex Red реагенту и ПХР. Эта обработка (с МЦД) повторялась еще раз, и после препарат помещался на 5 мин в раствор без МЦД. Перед началом записи интенсивности флуоресценции растворы инкубировались 45 мин при температуре 22-23°C в темном месте. Для калибровки осуществляли оценку флуоресценции растворов, с растворенными Amplex Red реагентом, ПХР и известными концентрациями пероксида водорода (от 0.01 до 1 мкМ). Фоновая флуоресценция, определялась в контрольных растворах без  $H_2O_2$  и вычиталась из каждого значения (Petrov et al., 2014).

### **3.3.5 Оценка количества окисленного холестерина оксидазой холестерина**

Данный подход связан с определением уровня  $H_2O_2$  в наружной среде.  $H_2O_2$  образуется как продукт в ходе реакции, осуществляемой холестерин оксидазой. Холестерин оксидаза переводит холестерин в 4-холестен-3-он, образуя эквивалентные количества  $H_2O_2$  (Kreit, Sampson, 2009). ПХР с помощью  $H_2O_2$  окисляет Amplex Red в резорурфин. Для учета фоновой продукции  $H_2O_2$  целый нервно-мышечный препарат лягушки в контроле в течение получаса инкубировали в растворе Рингера (2 мл),

включающем 400 мкМ Amplex Red и 2 ед. акт./мл ПХР. Впоследствии в данном растворе оценивали фоновую величину флуоресценции. В дальнейшем препарат на протяжении 30 мин перфузировался нормальным физиологическим раствором и затем его на 30 мин переносили в рабочий раствор, включающий в дополнение к Amplex Red и ПХР холестерин оксидазу (1 ед. акт. / мл). По истечении получаса раствор забирался на анализ. Для калибровки значений флуоресценции проводили измерения эмиссии растворов, содержащих Amplex Red, ПХР и заданные концентрации  $H_2O_2$ , а также сред, включающих Amplex Red, ПХР, холестерин оксидазу и определенные концентрации холестерина (Sigma), растворенного в DMSO (Петров и др. 2013).

### **3.3.6 Внутриклеточный уровень активных форм кислорода (АФК)**

Анализ образования АФК проводился с помощью мембранопроникающего красителя  $H_2DCFDA$  (2',7'-дихлородигидрофлуоресцеин диацетат, Molecular Probes, США), который возбуждался светом 470-490 нм. Для обнаружения флуоресценции применялся эмиссионный светофильтр с полосой пропускания более 515 нм. DMSO использовали для растворения  $H_2DCFDA$ , который затем делили на порции и хранили в при  $-20^{\circ}C$  в темном месте не более недели. Экспозиция препарата в растворе с  $H_2DCFDA$  (2 мкМ) длилась 15 мин при температуре 22-23C. С целью облегчения проникновения и растворения в физиологическом растворе красителя применяли Pluronic F-127 (Molecular Probes). Концентрация DMSO и Pluronic F-127 в финальном растворе не превышала 0.001%. Затем препарат интенсивно промывали нормальным физиологическим раствором без красителя на протяжении 30 мин, только после этого препарат освещали короткими вспышками (~1 с) возбуждающего света, поминутно детектируя флуоресценцию.

### **3.3.7 Оценка перекисного окисления липидов**

Для обнаружения окисления липидов использовался ратиометрический индикатор Image-iT Lipid peroxidation sensor (Molecular Probes), который в ответ на окисление липидов мембран изменяет флуоресценцию с красной (~590 нм) на зеленую (~510 нм). Таким образом, отношение красной и зеленой флуоресценции Image-iT Lipid peroxidation sensor является показателем перекисного окисления липидов. Препараты инкубировались в физиологическом растворе с индикатором (8 мкМ) в течение 30 мин

при комнатной температуре, затем промывались в течение 30 мин нормальным физиологическим раствором, после чего начиналась регистрации зеленой и красной флуоресценции с помощью микроскопа Olympus BX51WI, объектива с увеличением 100 и флуоресцентных кубов для изотиоцианата и Texas Red. Затем определялось отношение интенсивности красной (590 нм) и зеленой (510 нм) флуоресценции (Petrov et al., 2014; Giniatullin et al., 2015). В части экспериментов препараты были предварительно обработаны в течение 10 мин 10 мМ МЦД. В других экспериментах после регистрации флуоресценции в синаптическом районе начиналось воздействие МЦД (10 мМ), и детектировалось изменение флуоресценции. В некоторых случаях данные представлены как нормированные соотношения: отношение красной / зеленой флуоресценции в регионе интереса, содержащем нервные терминалы, до аппликации МЦД принималось за 1.0.

### 3.3.8 Оценка внутриклеточного pH

Флуоресцентный краситель BCECF AM (acetoxymethyl ester 2,7-bis(carboxyethyl)-5,6-carboxyfluorescein, Molecular probes) использовался как ратиометрический флуоресцентный сенсор pH для мониторинга внутриклеточной концентрации протонов (Wu et al., 1994; Fu et al., 1998; Petrov et al., 2011). Нервно-мышечные препараты инкубировались с 5 мкМ BCECF AM в течение 10-15 мин при комнатной температуре; затем краситель смывался, и препараты перфузировались нормальным физиологическим раствором в течение 30 мин для минимизации фоновой флуоресценции. Получаса отмывки достаточно для полного протекания внутри клеток реакции деэтерификации, в результате которой от красителя отщепляется эфирная группировка, и он оказывается пойманным в цитозоле клетки. Загруженные BCECF AM нервные терминалы освещались попеременно короткими (длительностью 1 с) вспышками света  $505 \pm 10$  нм («полезный» сигнал) и  $450 \pm 10$  нм (фоновая флуоресценция). Флуоресценция регистрировалась с использованием эмиссионного светофильтра, пропускающего свыше 530 нм, в синаптическом регионе, прилегающем к последнему миелиновому сегменту. Отношение флуоресценции при освещении возбуждающим светом двух волн J505/450 было посчитано для мониторинга изменений внутриклеточного pH. В завершении каждого эксперимента нервно-мышечный препарат перфузировался фосфатным буфером (150 мМ), содержащим 10 мМ нигерицина (Sigma) для уравнивания

внутри- и внеклеточного рН. Отношение эмиссии J505/450 было определено при последующих экспозициях препарата при разных рН (7.22, 7.19, 7.16 и 7.13) и взято для построения калибровочной шкалы. Дополнительное окрашивание с помощью красного флуоресцентного маркера FM4-64 (Invitrogen) помогало локализовать нервные терминалы для регистрации флуоресценции BCECF AM в синаптическом регионе (Petrov et al., 2011).

### **3.3.9 Идентификация холестерина в мембранах**

Для локализации холестерина использовали филипин III - флуоресцирующий антибиотик (Sigma), специфично и необратимо соединяющийся (соотношение 1 к 1) с мембранным холестерином (Orlandi, Fishman, 1998). Препараты на 1 час оставляли в растворе параформальдегида (3%), затем на 10 мин погружали в фосфатный буфер (PBS), включающий 1.5 мг/мл глицина, затем в течение 2 часов выдержали в растворе 0.05 мг/мл филипина III. После интенсивно на протяжении 2 часов перфузировали препарат раствором PBS, чтобы убрать фоновую флуоресценцию. Для регистрации флуоресценции использовали освещение ультрафиолетом (340-380 нм), эмиссионный фильтр (430-470 нм). Также филипин III использовали для оценки эффективности обработки препаратов МЦД и комплексованным с МЦД холестерином (Петров и др. 2011; Petrov et al., 2011).

### **3.3.10 Маркирование скоплений ганглиозидов GM1**

Ганглиозид GM1, хорошо известный компонент рафтов, который можно визуализировать с помощью субъединицы В холерного токсина. В целях идентификации липидных плотиков использовали флуоресцентно меченную (Alexa Fluor 488 или Alexa Fluor 555) субъединицу В холерного токсина (ХТ-В, из набора Vybrant lipid raft labeling kit, Molecular probes), которая необратимо связывается с пентасахаридными цепями молекул ганглиозида GM1 (Fujinaga et al., 1992). Причем молекула ХТ-В является пентавалентной по отношению к ганглиозиду GM1 и преимущественно связывается с ганглиозидами, локализованными в липидных рафтах (Schwan C. et al., 2011; Margheri G., et al., 2014). Мышцы инкубировали 15-20 мин в физиологическом растворе, с растворенной ХТ-В (1 мкг/мл), после 20 минут выдерживали в физиологическом растворе, в который были добавлены антитела против

ХТ-В (разведение 1:200 из набора Vybrant lipid raft labeling kit). Затем препараты промывались 30 мин физиологическим раствором, и начиналась регистрация флуоресценции. Антитела к ХТ-В добавлялись для перекрестной сшивки молекул ХТ-В в липидных рафтах в отдельные «заплатки» на плазматической мембране (Петров и др. 2011; Kasimov et al., 2015). Эти заплатки легко визуализировать с помощью флуоресцентной микроскопии. Флуоресценцию меченного Alexa Fluor 488 (или Alexa Fluor 555) ХТ-В возбуждали светом 480/15 нм (или 535/15 нм), и эмиссию регистрировали с использованием фильтра с полосой пропускания 505-545 нм (или 600-640 нм). Флуоресценцию определяли как среднее свечение от пикселей в синаптическом регионе.

### 3.3.11 Оценка фазовых свойств мембраны

22-NBD-холестерин (22-(N-(7-Nitrobenz-2-Oxa-1,3-Diazol-4-yl)Amino)-23,24-Bisnor-5-Cholen-3 $\beta$ -Ol, Molecular Probes) использовался как чувствительная к окружению метка, которая локализуется внутри мембраны. 22-NBD-холестерин реагирует на изменения фазовых свойств мембран, увеличивая флуоресценцию в ответ на перемещение из липидных рафтов во фракцию жидкой мембраны (Louira et al., 2001; Ostašov et al., 2013). Спектральные свойства 22-NBD-холестерина почти полностью не зависят от фазового состояния липидного бислоя (Ostašov et al., 2013). Для возбуждения 22-NBD-холестерина применяли свет длиной волны 480/15 нм, эмиссия детектировалась с помощью светофильтра с полосой пропускания 510-590 нм. 22-NBD-холестерин был растворен в чистом этаноле 10 мг/мл. Конечная концентрация этанола в физиологическом рабочем растворе не превышала 0.001%. Препараты инкубировались с 22-NBD-холестерином (0.2 мкМ) при комнатной температуре в течение 20 минут и затем перфузировались нормальным физиологическим раствором в течение 30 мин перед записью временного хода интенсивности флуоресценции в синаптическом регионе в контроле и в течение аппликации 5 $\alpha$ -холестан-3-она. В некоторых экспериментах дополнительное окрашивание красным FM4-64 помогало локализовать нервную терминаль для детекции флуоресценции 22-NBD-холестерина (Kasimov et al., 2015).

### 3.3.12 Маркирование никотиновых ацетилхолиновых рецепторов

В некоторых экспериментах с ХТ-В и 22-NBD-холестерином, постсинаптические никотиновые ацетилхолиновые рецепторы были помечены конъюгированным с родамином  $\alpha$ -бунгаротоксином.  $\alpha$ -Бунгаротоксин (30 нг/мл, Molecular Probes) апплицировался на 20 мин при комнатной температуре одновременно с антителами к ХТ-В или 22-NBD-холестерином. Флуоресценция  $\alpha$ -бунгаротоксина вызывалась светом длиной волны 555/15 нм, и эмиссия регистрировалась с помощью светофильтра с полосой пропускания 610-650 нм.

### 3.3.14 Иммуофлюоресценция

Для иммуофлюоресцентного окрашивания препараты фиксировались 3.7% р-формальдегидом в течение 30 мин при комнатной температуре. После фиксации препараты пермеабелизировались с помощью 1% Triton X-100, растворенного в фосфатном буфере (PBS), в течение 30 мин при комнатной температуре. После чего образцы погружались на 1 час также при комнатной температуре в блокирующий раствор следующего состава: 2% нормальной ослиной сыворотки, 0.1% Triton X-100, 0.05% Tween 20 и 1% бычьего сывороточного протеина (BSA) в фосфатном буфере. Впоследствии образцы инкубировались ночь с первичными антителами при 4°C. Затем мыщцы выдерживались с вторичными антителами в течение 1 часа при комнатной температуре в темноте. Образцы помещались на предметные стекла и покрывались средой для конфокальной микроскопии. Первичные антитела разводились в фосфатном буфере, содержащем 1% бычьего сывороточного протеина, 0.05% Triton X-100, 0.05% Tween 20, 1% нормальной ослиной сыворотки. Вторичные антитела разводились в фосфатном буфере, содержащем 0.05% Tween 20. После каждого этапа протокола окрашивания препараты троекратно промывались фосфатным буфером (в мМ: 3.2 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.5 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.3 KCl, 135 NaCl; pH 7.4) в течение 1 часа.

Первичные поликлональные антитела, кроличьи анти-синтаксин антитела (Abcam) в разведении 1:200, козлиные анти-синаптофизин антитела (Santa Cruz Biotchnology) в разведении 1:200, использовались для иммуномечения изолированных нервно-мышечных препаратов. Локализация первичных антител определялась при помощи флуоресцентных вторичных антител: ослиные анти-кроличьи антитела, конъюгированные с Alexa Fluor 647 (разведение 1:1000, Abcam) для детекции анти-

синтаксин антител и ослиные анти-козлиные антитела, конъюгированные с Alexa Fluor 488 (разведение 1:1000, Abcam) для обнаружения анти-синаптофизин антител. Флуоресцентного мечения не наблюдалось, если первичные или вторичные антитела не добавлялись, или если первичные антитела были предварительно инкубированы с соответствующим пептидом иммуногеном (крысиный синтаксин 1a пептид ab41452, Abcam, sc-7568 P, Santa Cruz Biotechnology). Флуоресценция AlexaFluor-488/Alexa Fluor 647 возбуждалась светом 470-490 нм / 590-650 нм, и эмиссия регистрировалась с использованием фильтров с полосами пропускания 505-545 нм / 663-738 нм.

В части экспериментов маркировались TRPV1-каналы и никотиновые ацетилхолиновые рецепторы. В этом случае использовались первичные кроличьи анти-TRPV1 антитела (1:200, Alomone Labs Ltd.), а вторичными для них антителами выступали меченные AlexaFluor-488 анти-кроличьи антитела (1:1000, Abcam). После инкубации в первичных антителах, но до добавления вторичных антител, фиксированные мышцы выдерживались в фосфатном буфере с конъюгированным с родамином  $\alpha$ -бунгаротоксином (1 нг/мл) при 4°C в течение 4-х часов. В некоторых экспериментах препараты инкубировались одновременно с первичными антителами и блокирующим пептидом (при разведении 1:1), EDAEVFKDSMVPGEK, соответствующим последовательности 824–838 аминокислотных остатков в TRPV1-белке крысы (Alomone Labs).

Изображения захватывались с использованием микроскопа Olympus BX51WI (с конфокальной приставкой Disk Speed Unit и объективом LumPlanPF 100xw). Анализ производился с помощью программы ImageJ 1.45 (НИН, США). Флуоресценция вторичных антител маркирована псевдоцветами на рисунках.

### **3.4 Статистическая обработка данных**

Статистическая обработка данных осуществлялась с использованием программных пакетов Origin Pro software (OriginLab Corp., США), GraphPad InStat program (Graph-Pad Software, Inc., США) и SAS 9.1 software (SAS Institute Inc., США). Данные представлены как среднее значение  $\pm$  стандартная ошибка, где n указывается как количество независимых экспериментов. Статистическая достоверность определялась с использованием t-теста Стьюдента или ANOVA. Различия принимались как достоверные при  $p < 0.05$ .

## 4. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

### 4.1 Холестерин и липидные плотки в нервно-мышечных синапсах

Холестерин - один из основных компонентов биологических мембран, который регулирует их фазовые свойства и активность многих мембранных белков. Особенно высокое содержание холестерина обнаружено в головном мозге, что частично связано с участием в формировании миелиновой оболочки. Предполагается, что в плазматических мембранах некоторые молекулы холестерина взаимодействуют со сфинголипидами с образованием липидных плотков, в состав которых могут входить многочисленные сигнальные белки и протеины, вовлеченные в везикулярный транспорт (Петров, Зефилов, 2013). Определение расположения липидных плотков может быть осуществлено с помощью специальных меток, избирательно соединяющихся с холестерином (Петров и др. 2011). Специфичными маркерными молекулами липидных плотков являются связанные с мембраной посредством гликозилфосфатидилинозитольного якоря протеины (Thy-1, флотилин), белок LAT, рецептор иммуноглобулина E, ганглиозиды GM1 (Owen et al., 2007). Наибольший интерес представляют ганглиозиды, поскольку их максимальная концентрация обнаруживается в нервных клетках позвоночных, где около 15% общего пула липидов представлено ганглиозидами. В нервной системе доминируют ганглиозиды GM1, которые входят в состав устойчивых к действию детергентов мембран синапсом, наряду с белками машины экзоцитоза и потенциал-зависимыми  $Ca^{2+}$ - каналами активных зон (Taverna et al., 2007; Sonnino et al., 2007; Jang et al., 2009; Петров и др. 2011). Выработка антител к ганглиозидам GM1 ведет к синдрому Джулиана-Барре, который проявляется в виде повреждения двигательных нервных терминалей и является основной причиной аутоиммунного острого паралича нервно-мышечной системы (Willison, Plomp, 2008).

#### 4.1.1 Локализация холестерина в синаптических мембранах

Для изучения распределения и оценки относительного содержания молекул холестерина в мембранах нервно-мышечного препарата применяли флуоресцентный антибиотик филиппин III, который необратимо взаимодействует с молекулами

мембранного холестерина в соотношении 1:1 (Gimpl, Gehrig-Burger, 2007). Маркирование исследованных нами нервно-мышечных препаратов лягушки и мыши с помощью филипина III показало, что максимальная флуоресценция наблюдается в синаптических регионах. Причем топография свечения указывает на преимущественную локализацию холестерина в мембранах нервного окончания (рис. 30).

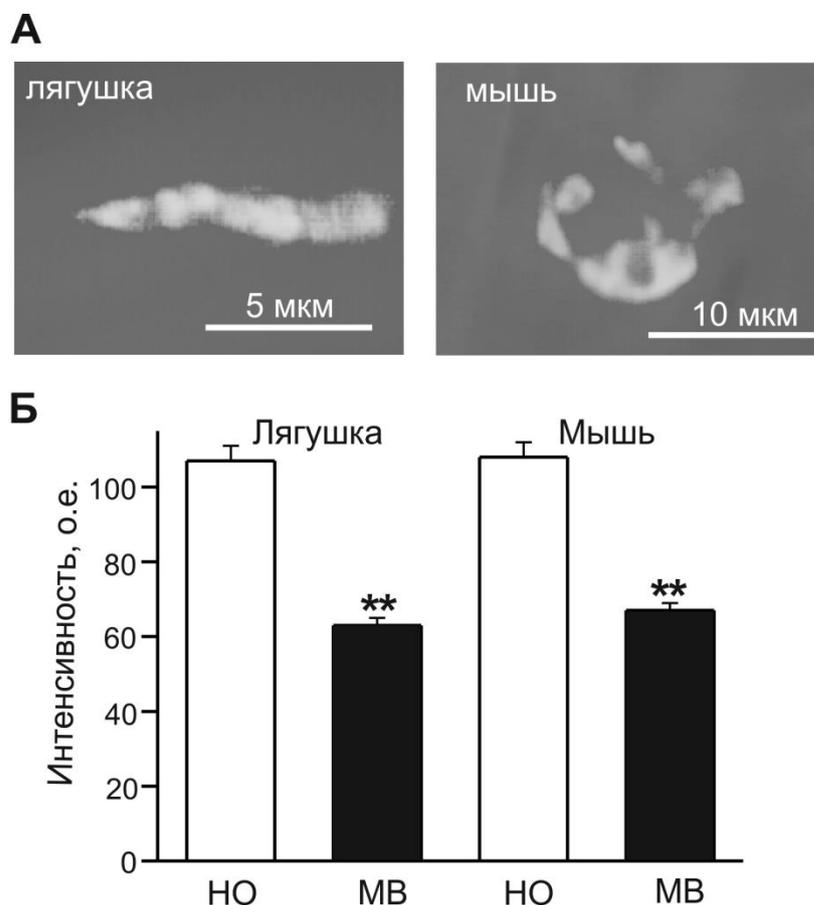


Рис. 30. Холестерин в нервно-мышечных синапсах лягушки и мыши

А – Флуоресценция предварительно фиксированных нервно-мышечных препаратов лягушки (виден участок терминали) и мыши, окрашенных филипином III, связывающимся с мембранным холестерином. Б – Интенсивность свечения филипина III в регионе, включающем нервные окончания (НО), и экстрасинаптическом участке, где расположены только мембраны мышечных волокон (МВ). По оси ординат – яркость свечения в о.е. Достоверность указана \*\*  $p < 0.01$ .

Интенсивность свечения филипина III в синаптических регионах лягушки и мыши была соответственно на  $41 \pm 2\%$  ( $n=10$ ,  $p < 0.01$ ) и  $39 \pm 2\%$  ( $n=10$ ,  $p < 0.01$ ) выше, чем флуоресценция мембран мышечных волокон (рис. 30, Б). Причем свечение в синаптическом регионе не было диффузным, а концентрировалось в ограниченных

областях в виде пятен и полосок (Рис. 1, А). Это было лучше выражено в препаратах лягушки, вероятно, из-за большей протяженности и специфичной архитектуры пресинаптической мембраны (Зефилов и др. 2003).

Таким образом, в нервно-мышечных препаратах холоднокровного и теплокровного животных содержание холестерина в синаптических мембранах существенно выше, чем в окружающей экстраинаптической мышечной мембране, и холестерин образует скопления в синаптической мембране. Последнее указывает на наличие обогащенных холестерином микродоменов в синаптическом регионе (Петров и др. 2011). Интересно, что мы не обнаружили существенной разницы между интенсивностью флуоресценции мембран нервно-мышечных препаратов лягушки и мыши.

#### **4.1.2 Идентификация липидных рафтов в синаптических мембранах**

Один из широко применяемых подходов, позволяющих визуализировать липидные плотки, является применение флуоресцентно-меченой субъединицы В холерного токсина (ХТ-В), содержащей 5 сайтов связывания ганглиозидов GM1, скопления которых наблюдаются в липидных рафтах (Fujinaga et al., 1992; Sonnino et al., 2007). Хотя единичные молекулы ганглиозида GM1 могут встречаться и в жидкой фазе мембраны, но ХТ-В преимущественно взаимодействует с GM1 молекулами, распределенными в липидных рафтах в виде скоплений (Schwan et al., 2011; Margheri, et al., 2014). Вероятно, ганглиозиды GM1 преимущественно локализуются в мембранах двигательных нервных окончаний и появление аутоиммунных анти-ганглиозид GM1 антител при синдроме Джулиана-Барре специфично нарушает освобождение нейромедиатора, угнетая главным образом вход  $Ca^{2+}$  в пресинаптическое нервное окончание (Buchwald et al., 2007; Zitman et al., 2010)

С помощью ХТ-В нам удалось идентифицировать липидные плотки в синаптической мембране. Судя по топологии свечения, большая часть флуоресценции исходила из пресинаптических участков. Яркость свечения регионов, содержащих нервные терминалы, окрашенные ХТ-В, была на  $45 \pm 4\%$  ( $n=5$ ,  $p < 0.05$ ) и  $60 \pm 3\%$  ( $n=5$ ,  $p < 0.05$ ) выше свечения мышечных волокон у лягушки и мыши, соответственно (рис. 31). При этом на флуоресцентных изображениях регионов нервных терминалов выделялись

относительно обширные яркие области, внутри которых наблюдалось неравномерное распределение флуоресценции в виде мелкой зернистости или полосок (рис. 31, а).

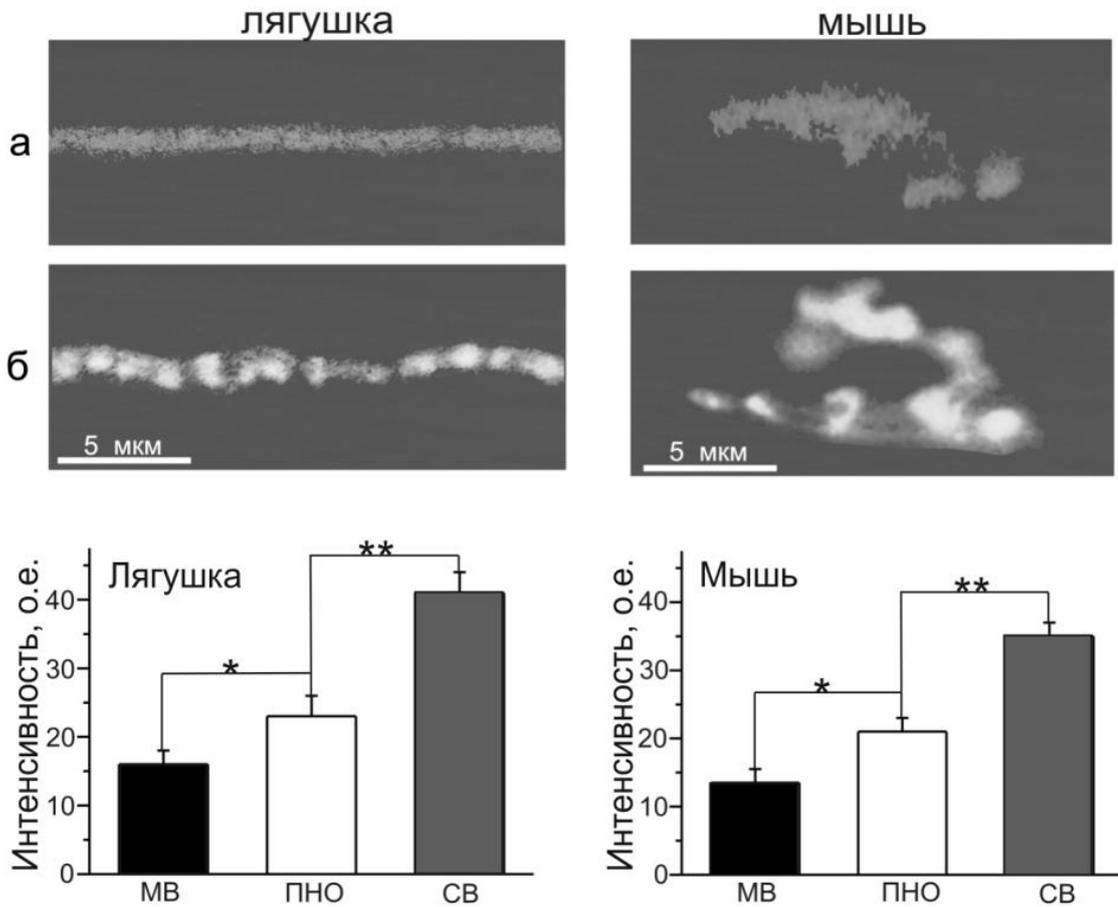


Рис. 31. Липидные плотики в мембранах нервно-мышечных препаратов

Сверху – Флуоресценция регионов двигательных нервных окончаний, окрашенных флуоресцентной субъединицей В холерного токсина (ХТ-В) для выявления липидных плотиков в поверхностных мембранах (а) и в мембранах синаптических везикул (б) лягушки и мыши, соответственно. Протоколы окраски липидных плотиков в поверхностных мембранах и мембранах синаптических везикул описаны в тексте. Снизу – Диаграммы интенсивности флуоресценции (в о.е.) ХТ-В в мембране мышечных волокон (МВ), в поверхностных мембранах нервных окончаний (ПНО) и мембранах эндоцитирующих синаптических везикул (СВ). Достоверность показана \*  $p < 0.05$  и \*\*  $p < 0.01$ .

Следовательно, в регионах, где локализуются двигательные нервные окончания, присутствуют скопления ганглиозидов GM1 (липидные плотики), и их содержание в этой области существенно выше, чем в окружающей мышечной мембране. Это

согласуется с биохимическими данными о высокой концентрации детергент-устойчивых мембран (модели липидных плотиков) в синаптосомальных мембранах, выделенных из мозга грызунов (Eckert et al., 2003). Обращает на себя внимание то, что окраска филипином III и ХТ-В дает сопоставимые количественные результаты: содержание холестерина и рафтов примерно на 40-60% выше в синаптическом регионе. Это может указывать на то, что для формирования рафтов требуются дополнительные молекулы синаптического холестерина (Петров и др. 2011).

Холестерин составляет около 40% всех липидов, формирующих синаптические везикулы (Takamori et al., 2006). Однако вопрос о существовании липидных рафтов в мембранах синаптических везикул в интактных нервных терминалях остается слабо изученным (Jang et al., 2009). Для выявления липидных плотиков в мембранах синаптических везикул, исходили из следующих соображений. При экзоцитозе фрагменты мембран синаптических везикул инкорпорируются в поверхностную мембрану и достаточно долго (несколько минут даже до 10-12 мин) контактируют с окружающей средой, следовательно, могут быть подвергнуты действию ХТ-В (Betz, Bewick, 1993; Петров и др., 2007, 2008; Petrov et al., 2008). Поэтому препарат погружали в раствор с ХТ-В и затем инициировали массивный экзоцитоз длительным высокочастотным (3 мин 20 Гц) раздражением двигательного нерва (при данном сценарии эксперимента антитела к ХТ-В не применялись). При маркировании липидных плотиков с помощью ХТ-В на фоне высокочастотной стимуляции в нервных окончаниях лягушки и мыши, наряду с характерным свечением плазматической мембраны, появляются яркие флуоресцирующие пятна (рис. 31, б). Причем флуоресценция этих пятен была существенно выше (на  $78 \pm 6\%$ ,  $p < 0.01$ ,  $n=8$  и  $67 \pm 6\%$ ,  $p < 0.01$ ,  $n=8$  в препаратах лягушки и мыши, соответственно) свечения поверхностных синаптических мембран. Это свидетельствует о связывании значительного количества ХТ-В с мембранными фрагментами синаптических везикул, которые захватились в нервное окончание эндоцитозом (рис. 31).

Таким образом, можно предположить, что мембраны синаптических везикул обогащены липидными рафтами в большей степени, чем поверхностные синаптические мембраны. Полученные данные согласуются с крайне высокой концентрацией холестерина в везикулярных мембранах (Takamori et al., 2006) и обнаружением локализации ряда белков синаптических везикул (синаптоагмина I, протонной помпы,

транспортеров нейромедиаторов) во фракциях устойчивых к действию детергентов мембран (Yoshinaka et al., 2004; Lv et al., 2008; de Juan-Sanz et al., 2014).

#### **4.1.3 Распределение липидных рафтов и синаптических везикул в нервных окончаниях**

Двойное окрашивание препаратов FM1-43 и маркером на липидные плотники (красным ХТ-В) применяли для исследования взаимного расположения липидных плотиков и регионов, содержащих скопления синаптических везикул, где интенсивно протекают процессы экзо- и эндоцитоза (Петров и др. 2011). Использовались два варианта двойного окрашивания нервно-мышечных препаратов лягушки и мыши.

В первом случае, нервные окончания сначала загружались FM1-43 с помощью стимуляции 3 мин 20 Гц (краситель присутствовал 3 мин во время стимуляции и 12 мин после завершения, затем следовал 40 мин период отмывки в физиологическом растворе с ADVASEP-7), после чего производилось окрашивание препаратов на липидные плотники (схема 1). В этом случае в нервных окончаниях появлялись светящиеся в зеленом спектре пятна (флуоресценция FM1-43), отражающие скопления синаптических везикул, а связавшиеся с плазматической мембраной молекулы ХТ-В флуоресцировали в красном диапазоне. Засветка FM1-43 в красном канале составила менее 5% и была убрана за счет снижения чувствительности CCD-видеокамеры. При сравнении картин и профилей флуоресценции FM1-43 и ХТ-В оказалось, что области свечения перекрывались (рис. 32, А, рис. 4, А). Другими словами, в нервных окончаниях лягушки и мыши регионам, содержащим высокую плотность окрашенных синаптических везикул, соответствовали зоны яркой флуоресценции ХТ-В в плазматической мембране нервных окончаний (рис. 32, а, рис. 33, а). Следовательно, сайты, где протекают процессы экзо- и эндоцитоза синаптических везикул, могут являться липидными микродоменами (плотиками).

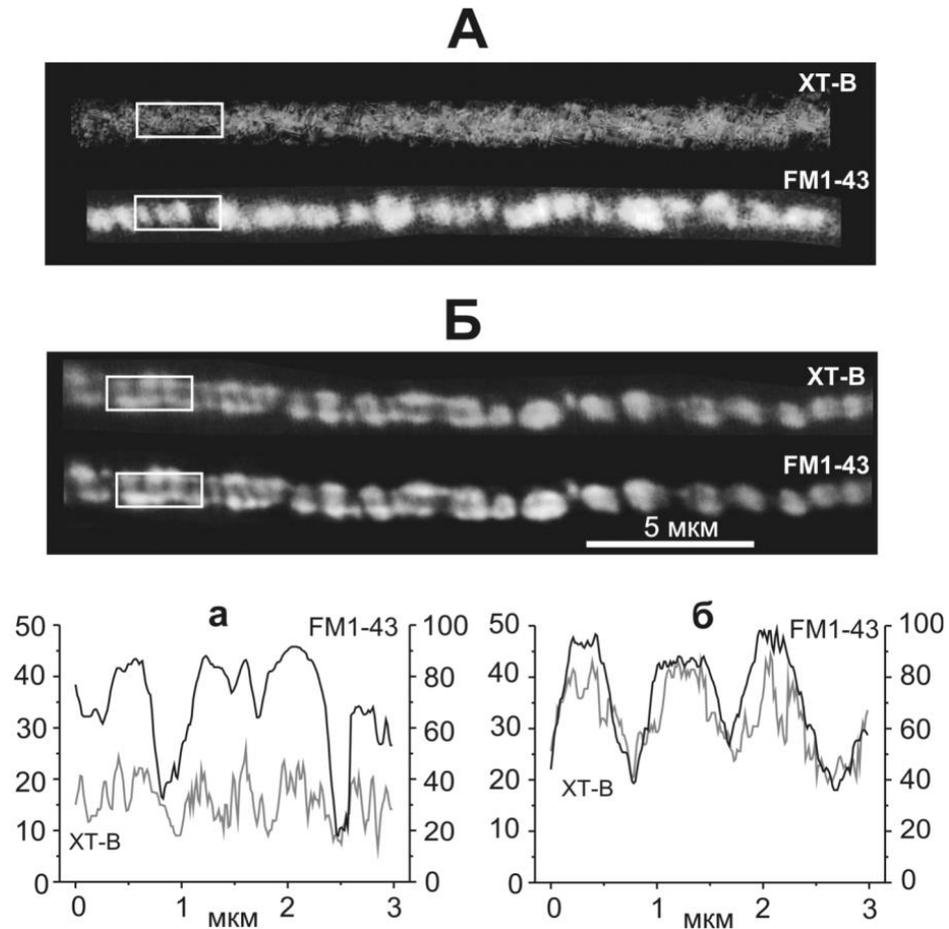


Рис. 32. Двойное окрашивание нервно-мышечных препаратов лягушки ХТ-В и FM1-43

А, Б – участки нервных терминалей, окрашенных в соответствии со схемами 1 и 2, соответственно (см. в тексте). А – показывает участок нервной терминали, с окрашенными липидными рафтами в поверхностной мембране нервного окончания (сверху, ХТ-В) и маркированными скоплениями синаптических везикул (снизу, FM1-43). Б – участок нервной терминали, где синаптические везикулы маркированы как меткой на липидные плотики (сверху), так и эндоцитозным красителем FM1-43 (снизу). На А и Б свечение мышечного волокна было вычтено. Внизу на а и б изображены профили сечения красителей (ХТ-В и FM1-43) в участках, показанных на А и Б. По осям ординат интенсивность свечения в о.е.: правые шкалы для ХТ-В, левые шкалы – для FM1-43. По осям абсцисс – расстояние в мкм.

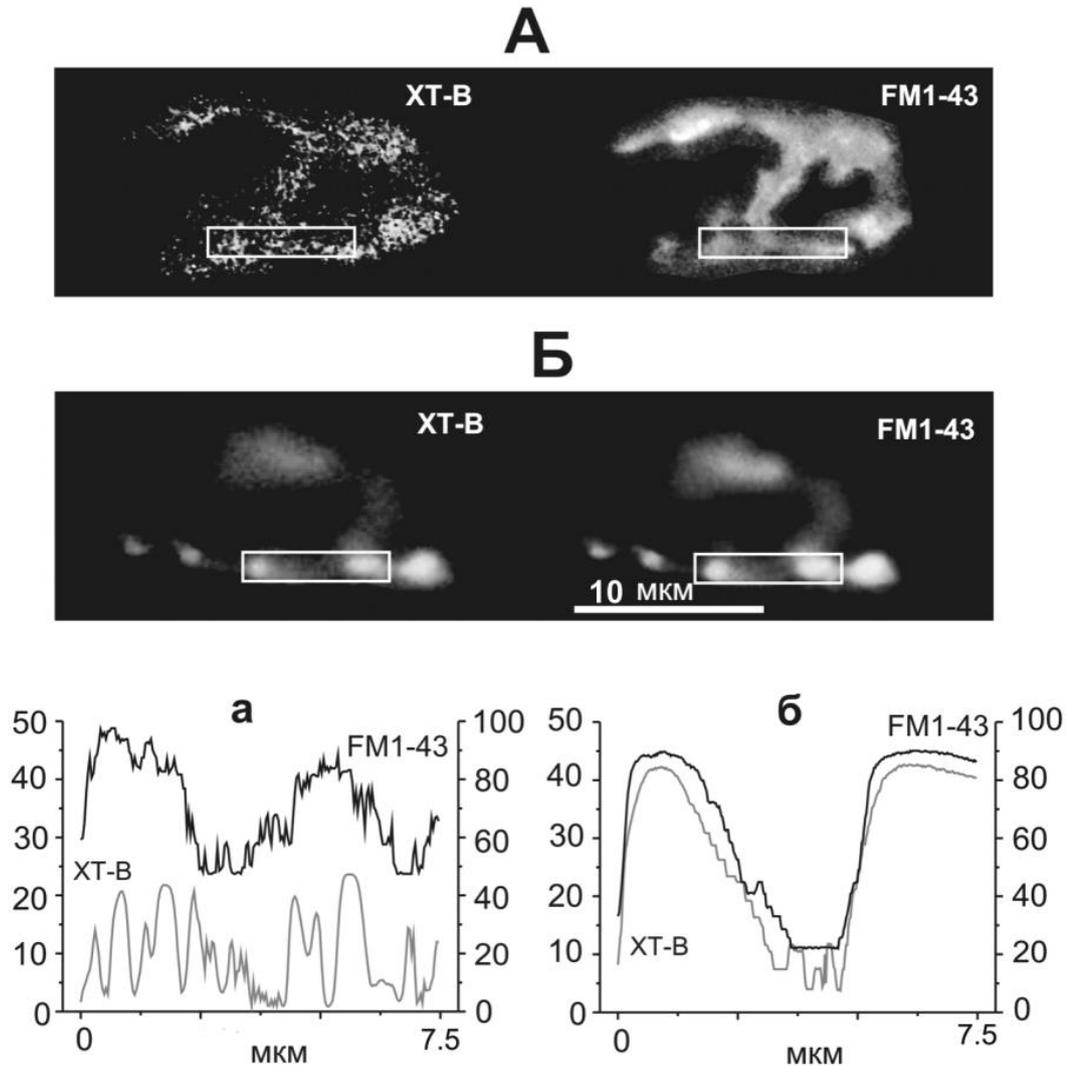


Рис. 33. Совместное окрашивание нервных окончаний мышцы XT-B и FM1-43

А, Б – нервные окончания, окрашенные в соответствии со схемами 1 и 2, соответственно (подробнее см. в тексте). А – демонстрирует распределение липидных плотиков в поверхностной мембране (XT-B, слева) и скоплений синаптических везикул, меченных FM1-43 (справа), в одном и том же нервном окончании. Б – синаптические везикулы окрашены маркером липидных плотиков (XT-B, слева) и эндоцитозным красителем FM1-43 (справа). На изображениях свечение мышечных волокон вычтено. Ниже, на а и б -профили флуоресценции XT-B и FM1-43 регионов, показанных на А и Б, соответственно. По осям ординат и абсцисс то же, что и на рис. 32.

При втором варианте, окрашивание производилось двумя красителями (FM1-43 и XT-B) одновременно на фоне длительного высокочастотного раздражения (20 Гц - 3 мин). При этом красители находились в омывающем препарат физиологическом

растворе, как во время стимуляции, так и в течение 12 мин после ее завершения (схема 2). В этом случае получали препарат, у которого синаптические везикулы окрашены эндоцитозным красителем FM1-43 и маркером на липидные плотики. Естественно, что при этом происходило связывание ХТ-В и с ганглиозидами GM1 плазматических мембран. Однако оказалось, что максимальное свечение ХТ-В регистрировалось в районах, расположенных внутри областей, содержащих помеченные FM1-43 синаптические везикулы (рис. 32, Б, рис. 33, Б). Это хорошо иллюстрирует близкое совпадение профилей свечения обоих красителей (рис. 32, б, рис. 33, б). Следовательно, по крайней мере большая часть мембран синаптических везикул состоит из обогащенных ганглиозидом GM1 микродоменов (липидных плотиков).

В следующей серии экспериментов, проведенной на нервно-мышечном синапсе мышцы, мы постарались ответить на вопрос: попадают ли меченные ХТ-В рафты пресинаптической мембраны в мембраны синаптических везикул в случае индукции экзо-эндоцитоза синаптических везикул стимуляцией двигательного нерва. Другими словами, смешиваются ли рафты пресинаптической и везикулярной мембран. Для этого мы сначала загружали красным FM4-64 синаптические везикулы (как описано ранее), затем окрашивали поверхностные мембраны зеленым ХТ-В (меченным Alexa488) и после этого подвергали нервно-мышечный препарат высокочастотной стимуляции (20 Гц), после чего наблюдали за свечением красного FM4-64 и зеленого ХТ-В. Оказалось, что выгрузка FM4-64 происходила (считали как падение флуоресценции во всем контуре нервного окончания, так и в отдельном флуоресцирующем пятне), а топография и интенсивность (вели подсчет как во всем контуре терминали, так и в отдельном пятне) свечения ХТ-В изменялись незначительно ( $p > 0.05$ ) как во время стимуляции (рис. 34), так и в последующие 20 мин (время, когда протекает только эндоцитоз). Это указывает на то, что меченные ХТ-В рафты поверхностных мембран не захватываются в синаптические везикулы в ходе компенсаторного экзоцитоза, то есть не смешиваются с везикулярными рафтами.

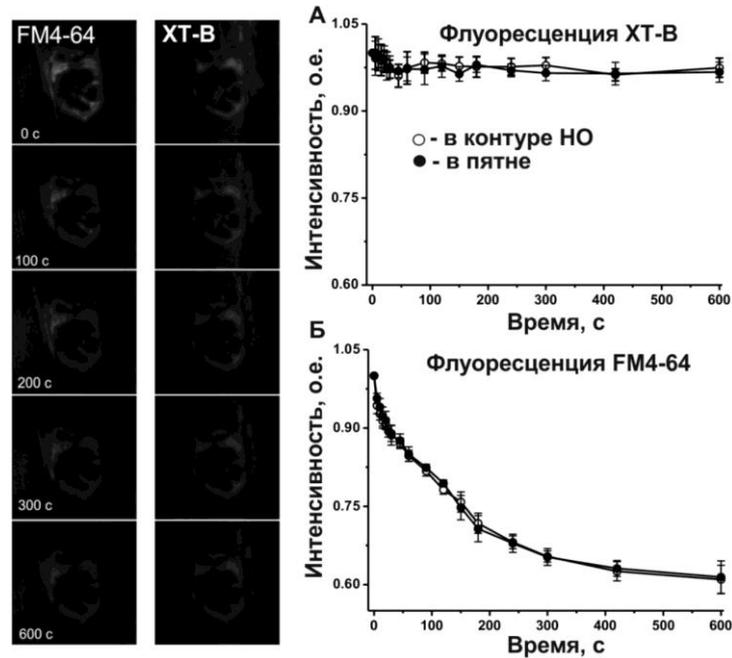


Рис. 34. Влияние стимуляции на флуоресценцию меченного зеленым ХТ-В и FM4-64

Слева: Флуоресцентные изображения в красном и зеленом каналах нервного окончания мышцы, синаптические везикулы которого предварительно загружены FM4-64, а поверхностные мембраны окрашены ХТ-В (конъюгированным с Alexa488), в течение высокочастотной стимуляции 20 Гц (в моменты времени – 0, 100, 200, 300, 600с после начала раздражения). Слева: Динамика интенсивности (в о.е.) зеленой флуоресценции ХТ-В (А) и красной флуоресценции FM4-64 (Б) при стимуляции двигательного нерва 20 Гц. Светлыми и темными кружочки обозначают значения флуоресценции в контуре нервного окончания и светящегося пятна, соответственно. Видно, что раздражение запускает выгрузку FM4-64 из синаптических везикул, тогда как флуоресценция ХТ-В, маркирующего липидные рафты, не изменяется, не смотря на то, что в ходе стимуляции в нервном окончании происходят процессы экзо- и эндоцитоза синаптических везикул. Кривые на А и Б построены по  $n=7$ .

#### 4.1.4 Распределение липидных рафтов и постсинаптических никотиновых ацетилхолиновых рецепторов

Для изучения распределения скоплений ганглиозидов GM1 и постсинаптических холинорецепторов в нервно-мышечных синапсах препараты (лягушка  $n=5$ , крыса  $n=5$ ) одновременно окрашивались зеленым ХТ-В и флуоресцентно-меченным  $\alpha$ -бунгаротоксином ( $\alpha$ БТ, красным). Последний селективно маркирует постсинаптические никотиновые ацетилхолиновые рецепторы, которые в нервно-мышечных синапсах

концентрируются в устьях постсинаптических складок, напротив активных зон нервных окончаний (Robitaille et al., 1996).

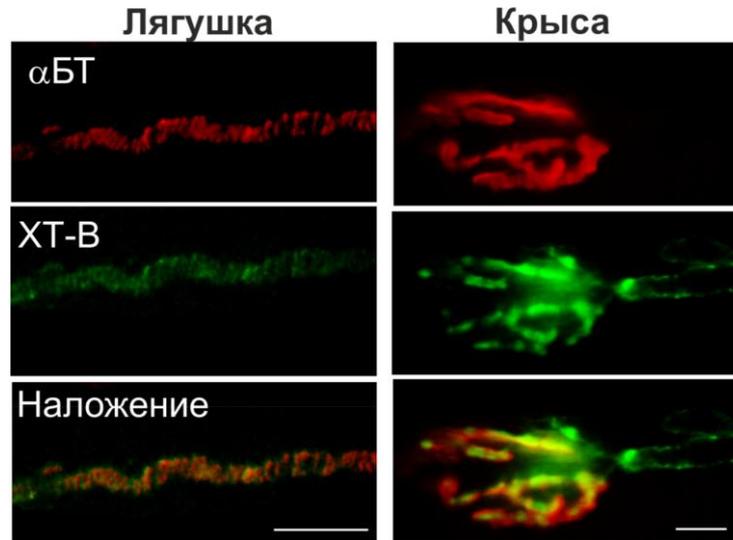


Рис. 35. Распределение никотиновых ацетилхолиновых рецепторов (нАхР) и скоплений ганглиозида GM1

Постсинаптические холинорецепторы были помечены флуоресцентным  $\alpha$ -бунгаротоксином ( $\alpha$ БТ, красный канал), а липидные рафты ХТ-В (зеленый канал) в нервно-мышечных препаратах лягушки и крысы. Нижние изображения, показывающие наложение красного и зеленого канала, иллюстрируют взаимное расположение нАхР и липидных рафтов.

В нервно-мышечных синапсах флуоресценция ХТ-В, которым были окрашены поверхностные мембраны, обычно достаточно хорошо колокализовалась с сигналами от меченного  $\alpha$ БТ. Однако, в синапсах лягушки часто яркая флуоресценция ХТ-В наблюдалась также в областях между полосками постсинаптических рецепторов, меченных  $\alpha$ -бунгаротоксином, указывая на локализацию рафтов в областях около активных зон (пери-активных зон) (рис. 35), где интенсивно протекают процессы эндоцитоза (Зефиоров, Петров, 2010а). В нервно-мышечных синапсах грызунов (мыши и крысы), распределение свечения ХТ-В было несколько более узким, что согласуется с окрашиванием преимущественно мембран двигательных нервных терминалей и регионов первичных постсинаптических складок (рис. 35). В пользу этого же говорит то, что при окрашивании ХТ-В визуализировались аксональные регионы, флуоресценция которых «перетекала» в сигнал от синаптической области (видно на рис. 35 на микрофотографии синапса крысы). В нервно-мышечных синапсах грызунов активные

зоны включают только 1-2 докированные синаптические везикул, поэтому имеют существенно меньшие размеры, чем в нервных окончаниях лягушки, активные зоны которых содержат несколько десятков докированных синаптических везикул, расположенных в два ряда (Pecot-Dechavassine, 1982; Slater, 2008). Поэтому для теплокровных животных наблюдаемый характер окрашивания (с использованием ХТ-В и  $\alpha$ БТ) говорит о расположении липидных рафтов не только в активных зонах, но и в окружающих регионах.

#### **4.1.5 Метил- $\beta$ -циклодекстрин (МЦД) как инструмент для исследования значения мембранного холестерина и липидных плотиков**

Метил- $\beta$ -циклодекстрин (МЦД) широко используется в исследованиях (в том числе, нейробиологических) как агент, удаляющий холестерин из плазматических мембран (Smith et al., 2010; Murray, Tamm, 2009, 2011; Teixeira et al., 2012; Dason et al., 2010, 2014; Petrov et al., 2011, 2014, 2015; Yue, Xu, 2015). Однако эффективность удаления холестерина с помощью МЦД не одинакова в различных образцах: МЦД оказывает существенно более выраженное влияние на культуры клеток, чем на многоклеточные препараты, выделенные из животных, где он обычно используется в концентрациях 10-15 мМ (Zidovetzki, Levitan, 2007). Мы протестировали влияние МЦД в разных концентрациях (0.1, 1 и 10 мМ) на содержание мембранного холестерина именно в синаптических регионах нервно-мышечных препаратов лягушки и мыши (рис. 36). Относительное содержание холестерина оценивали при окрашивании препаратов филипином III, после предварительной 20 мин экспозиции в физиологическом растворе с МЦД. Оказалось, что в концентрации 0.1 мМ МЦД не вызывает достоверных изменений флуоресценции филипина III в препаратах лягушки (лягушка  $99\pm 3\%$ ,  $p > 0.05$ ,  $n=10$ ) и мыши (мышь  $105\pm 3\%$ ,  $p > 0.05$ ,  $n=10$ ), по сравнению с контролем. Применение 1 мМ МЦД достоверно снижает интенсивность флуоресценции до  $79\pm 5\%$  ( $n=8$ ,  $p < 0.05$ ) и  $82\pm 4\%$  ( $n=12$ ,  $p < 0.05$ ) в нервно-мышечных препаратах лягушки и мыши, соответственно. МЦД в большой концентрации (10 мМ) вызывал драматичное уменьшение флуоресценции до  $55\pm 4\%$  ( $n=5$ ,  $p < 0.001$ ) и  $50\pm 5\%$  ( $n=5$ ,  $p < 0.001$ ) в мышцах лягушки и мыши, соответственно. Таким образом, 1 и 10 мМ МЦД эффективно удаляют холестерин из мембран нервно-мышечных препаратов. При этом МЦД имеет схожую эффективность в нервно-мышечных препаратах лягушки и мыши.

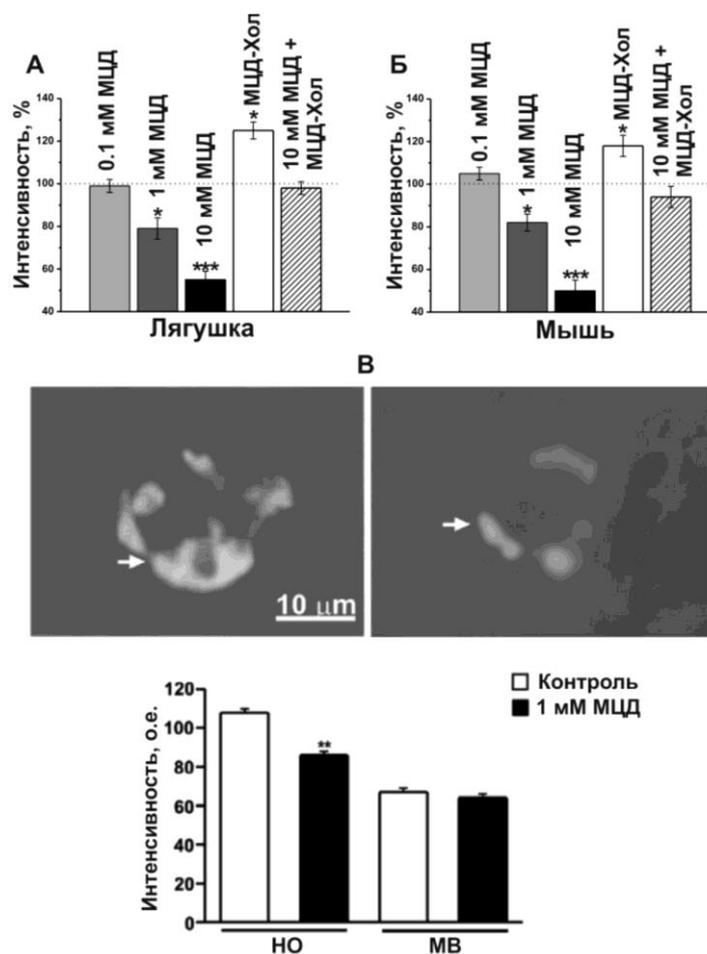


Рис. 36. Эффект метил- $\beta$ -циклодекстрина (МЦД) и комплекса МЦД-холестерин на содержание мембранного холестерина в нервно-мышечных синапсах

А, Б – Интенсивность флуоресценции филипина III, маркирующего холестерин, в синаптических регионах в % (за 100% принята флуоресценция в контроле, обозначено пунктирной линией): после 20 минутного воздействия МЦД (0.1, 1 и 10 мМ) или комплекса МЦД-холестерин (МЦД-Хол, 5мМ); или после последовательной инкубации препаратов сначала с 10 мМ МЦД (первые 20 мин), затем с 5 мМ МЦД-холестерина (следующие 20 мин) (обозначено как 10 мМ МЦД + МЦД-Хол). Наблюдения проведены в нервно-мышечных синапсах лягушки (А) и мыши (Б). В – Сверху, флуоресцентные микрофотографии препаратов, меченных филипином в контроле (слева) и после инкубации с 1 мМ МЦД (справа). Синаптическая область обозначена стрелкой. Внизу, количественный анализ флуоресценции в регионе нервного окончания (НО) и мышечного волокна (МВ) в контроле и после воздействия 1 мМ МЦД в препаратах мыши. Звездочки указывают статистическую достоверность различий между контрольной и обработанными холестерин-модифицирующими агентами группами при \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ .

Отсутствие изменений флуоресценции филипина после воздействия 0.1 мМ МЦД в нервно-мышечных синапсах может быть связано с тем, что в низких концентрациях МЦД способен переносить холестерин избирательно из мембран липидных рафтов в жидкую фазу мембраны. При этом холестерин более равномерно распределяется по мембране и не выходит во внутриклеточную среду (Zidovetzki, Levitan, 2007; Кравцова и др., 2015).

Интересно, что МЦД в концентрации 1 мМ не вызывал существенных изменений содержания мембранного холестерина в экстраинаптических регионах мышечных волокон (рис. 36). Возможно, это связано с более высоким уровнем холестерина в синаптическом регионе, поскольку МЦД эффективнее удаляет холестерин из обогащенных холестерином мембран (Zidovetzki, Levitan, 2007; Petrov et al., 2011).

Для восстановления уровня мембранного холестерина или насыщения мембран холестерином применяется комплексованный с МЦД холестерин, который апплицировался на 20 мин (Рис. 36). Предварительная обработка препарата 5 мМ комплекса МЦД-холестерин увеличивала флуоресценцию филипина (до  $125 \pm 4\%$ ,  $n=5$ ,  $p < 0.05$ /лягушка и  $118 \pm 5\%$ ,  $n=5$ ,  $p < 0.05$ /мышь). Обработка комплексом МЦД-холестерин препаратов, предварительно выдержанных в 10 мМ МЦД, предотвращает драматичное снижение интенсивности свечения филипина ( $98 \pm 3\%$ ,  $n=5$ ,  $p > 0.05$ /лягушка и  $94 \pm 5\%$ ,  $n=5$ ,  $p > 0.05$ /мышь), вызванное 10 мМ МЦД.

*Воздействие удаления мембранного холестерина на стабильность липидных плотиков.* Манипуляции с уровнем мембранного холестерина изменяют окрашивание ХТ-В нервно-мышечных синапсов как лягушки, так и мыши (рис. 37). Удаление холестерина с использованием 1 и 10 мМ МЦД уменьшало маркирование ХТ-В до  $78.6 \pm 3.2$  ( $n=5$ ,  $p < 0.05$ , лягушка) /  $88.2 \pm 3.0\%$  ( $n=5$ ,  $p < 0.05$ , мышь) и  $52.4 \pm 2.9$  ( $n=5$ ,  $p < 0.001$ , лягушка) /  $55.9 \pm 3.1\%$  ( $n=5$ ,  $p < 0.001$ , мышь). Напротив, в препаратах предварительно обработанных комплексом МЦД-холестерин, окрашивание ХТ-В было немного, но достоверно увеличено, флуоресценция в синаптическом регионе составила  $118.3 \pm 3.5$  ( $n=6$ ,  $p < 0.05$ , лягушка) /  $112.2 \pm 3\%$  ( $n=6$ ,  $p < 0.05$ , мышь) относительно контрольного окрашивания. Если после воздействия 10 мМ МЦД выдерживали препарат с 5 мМ комплекса МЦД-холестерин, то флуоресценция ХТ-В ( $99.7 \pm 3.4$ ,  $n=5$ ,  $p > 0.05$ , лягушка /  $97.2 \pm 3.8\%$ ,  $n=5$ ,  $p > 0.05$ , мышь) достоверно не отличалась от контрольной.

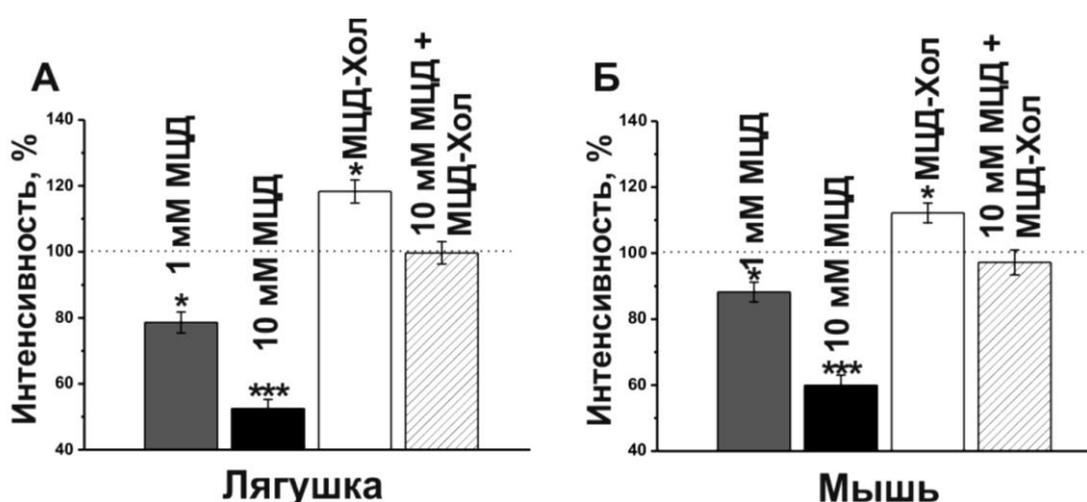


Рис. 37. Эффект метил- $\beta$ -циклодекстрина (МЦД) и комплекса МЦД-холестерин на окрашивание ХТ-В в нервно-мышечных синапсах

А, Б - Интенсивность флуоресценции ХТ-В, маркирующего скопления ганглиозидов GM1 (липидные рафты), в синаптических регионах в % (за 100% принята флуоресценция в контроле, обозначено пунктирной линией): после 20 минутного воздействия МЦД (1 и 10 мМ); или комплекса МЦД-холестерин (МЦД-Хол, 5мМ); или после последовательной инкубации препаратов сначала с 10 мМ МЦД (первые 20 мин), затем с 5 мМ МЦД-холестерина (следующие 20 мин) (обозначено как 10 мМ МЦД + МЦД-Хол). Наблюдения проведены в нервно-мышечных синапсах лягушки (А) и мыши (Б). Достоверность обозначена \*  $p < 0.05$ , \*\*\*  $p < 0.001$ .

Эти данные указывают (1) на изменения стабильности липидных рафтов в синаптических мембранах при изменении содержания мембранного холестерина и (2) на их обратимый характер. Это согласуется с представлениями о том, что снижение уровня холестерина уменьшает стабильность рафтов, тогда как повышение содержания холестерина, наоборот, увеличивает «количество» рафтов (Simons, Samraio, 2011; Петров, Зефирова, 2013). Следует отметить, что в нервно-мышечных синапсах холоднокровных и теплокровных животных эффекты разных доз МЦД (или комплекса МЦД-холестерин) на стабильность липидных рафтов (как и на содержание мембранного холестерина) имели схожую выраженность.

#### 4.1.6 Возможная роль сосредоточения холестерина и липидных плотиков в нервно-мышечных синапсах

Представленные экспериментальные данные свидетельствуют о высокой концентрации холестерина в синаптических мембранах нервно-мышечных контактов. Это согласуется с данными о наличии высоких концентраций холестерина в мембранах мозга (Vance, 2012; Зефирова, Петрова, 2010б). Причем распределение холестерина в синаптических мембранах оказалось гетерогенным. Поскольку с холестерином напрямую связываются многочисленные ключевые пресинаптические и цитозольные белки, участвующие в процессах экзо- и эндоцитоза (синтаксин 1А,  $Ca^{2+}$ -каналы P/Q-типа, динамин 1, AP-2) (Jang et al., 2009), то можно предположить, что холестерин пресинаптической мембраны выступает в роли фактора, определяющего локализацию сайтов экзоцитоза (активных зон) и эндоцитоза (пери-активных зон) (Lang, 2007; Зефирова, Петрова, 2009; Петрова и др. 2009). В иммунофлуоресцентных экспериментах с маркированием белка активной зоны синтаксина 1 нами было показано, что удаление существенных количеств холестерина (за счет 50 мин перфузии нервно-мышечного препарата лягушки 15 мМ МЦД) вызывает нарушение правильного распределения белка АЗ синтаксина 1 (рис. 38), указывая на дезорганизацию активных зон (Петрова, Зефирова, 2013).

В ходе исследования были идентифицированы липидные плотики на поверхностных синаптических мембранах, которые были распределены неравномерно. Окрашивание на липидные плотики резко подавлялось при удалении мембранного холестерина, что прямо указывает на роль мембранного холестерина в формировании синаптических рафтов. Исходя из сопоставления свечения ХТ-В и FM1-43, напрашивается вывод о присутствии липидных плотиков в поверхностной мембране нервного окончания в сайтах экзоцитоза и эндоцитоза (Зефирова и др. 2003). Это согласуется с данными о том, что белки машины экзо- и эндоцитоза, важные для слияния и почкования липиды, фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфаты, предпочитают встраиваться в липидные плотики (Di Paolo et al., 2004; Jang et al., 2009). То есть липидные плотики могут выполнять функцию «платформ» для сборки и активации белково-липидных комплексов, обеспечивающих экзо- и эндоцитоз синаптических везикул.

Эксперименты по одновременному окрашиванию образующихся в ходе эндоцитоза синаптических везикул с помощью ХТ-В и FM1-43 дали нам основания говорить о наличии липидных плотиков в мембранах синаптических везикул. Причем, судя по интенсивности свечения ХТ-В, содержание плотиков в везикулах может превышать их количество в пресинаптической мембране. Можно предположить, что липидные плотики в синаптических везикулах требуются для скрепления белковой композиции везикул (Зефиоров, Петров, 2009), а также сохранения этой композиции при образовании новой везикулы (рис. 38).

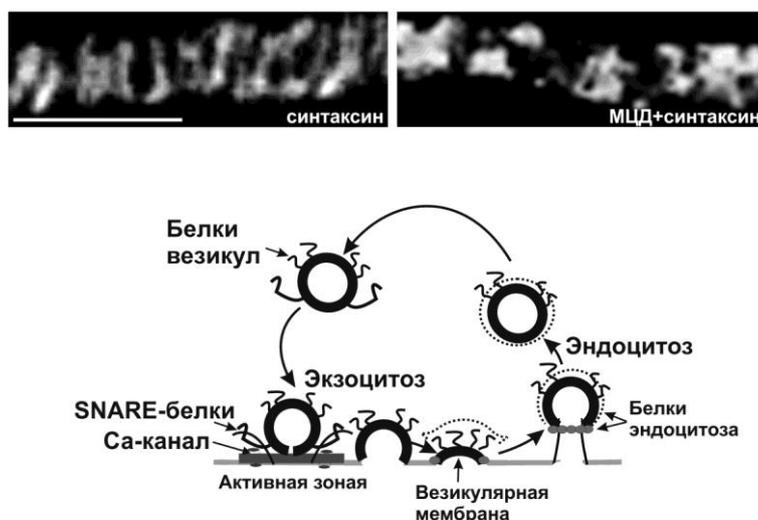


Рис. 38. Холестерин и липидные плотики в пресинаптическом нервном окончании

Предполагаемая роль липидных плотиков в экзо-эндоцитозном цикле синаптических везикул. С одной стороны, липидные плотики (серые толстые линии) участвуют в организации сайтов экзоцитоза (активной зоны), закрепляя белки экзоцитоза (SNARE-белки) и  $\text{Ca}^{2+}$ -каналы. С другой стороны, липидные плотики присутствуют в мембране синаптических везикул (черные толстые линии), что необходимо для предотвращения латеральной диффузии компонентов везикулярной мембраны после ее встраивания в пресинаптическую мембрану. Данный механизм способствует сохранению уникальной белково-липидной композиции везикул и эндоцитозу (Петров, Зефиоров, 2013). Сверху, участки нервных терминалей окрашены антителами против синтаксина в контроле (слева) и после длительного воздействия 15 мМ МЦД (справа). Изображения иллюстрируют дезорганизацию сайтов экзоцитоза (активных зон) при удалении холестерина из плазматической мембраны. Шкала – 5 мкм.

Исходя из изложенных результатов и литературных данных, можно объяснить как везикулярные мембраны и регионы пресинаптической мембраны, где протекают экзо - и эндоцитоз, сохраняют уникальные композиции белков и липидов, не смотря на многократные циклы слияния и образования новых везикул (рис. 38). Везикулярная мембрана составлена из липидных плотиков, в которых «проживают» определенные белки, а мембрана активной зоны представлена другими плотиками со своими специфичными протеинами, обеспечивающими экзоцитоз. В сайтах эндоцитоза также существуют липидные плотики, содержащие белки, вовлеченные в эндоцитоз, и резервные везикулярные белки. В ходе экзоцитоза везикулярные плотики встраиваются в пресинаптическую мембрану, но не рассеиваются по ней, а быстро мигрируют в область эндоцитоза, где из них образуются новые синаптические везикулы (Зефирова, Петров, 2009). Предполагается, что некоторые везикулярные белки могут обмениваться на аналогичные протеины, «запасенные» в плазматической мембране, что показано, например, для синаптоагмина I (Willig et al., 2006; Orazo et al., 2010). В следующей части нашей работы эта гипотеза получит новые доводы в свою поддержку.

В экстраинаптических мембранах скелетных мышечных волокон обнаружено относительно небольшое содержание холестерина и липидных плотиков. Подобную ситуацию можно объяснить тем, что поверхность мышечного волокна структурирована преимущественно с помощью каркасных и цитоскелетных белков, формирующих Т-трубочки. Возможно, в этом случае белковые механизмы частично заменяют холестерин и рафт-зависимые пути компарментализации мембраны. Более того, экстраинаптические мембраны мышечного волокна имеют существенно более простую латеральную организацию мембраны, чем пресинаптический регион, где в десятках нанометров друг от друга протекают различные процессы, и каждый этап везикулярного цикла имеет строго организованную в пространстве молекулярную машину. То есть проблема компарментализации мембранных процессов не так важна в функционировании мышечных волокон, как для нервного окончания (Петров и др. 2011). Вероятно, исключение составляет концевая пластинка, где кластеризуются постсинаптические рецепторы и сигнальные молекулы, а также обнаружен белок кавеол – кавеолин 3 (Heiny et al., 2010). В наших совместных исследованиях с сотрудниками Санкт-Петербургского государственного университета было показано, что длительная перфузия 0.1 мМ МЦД нервно-мышечных препаратов крыс устраняет локальную

гиперполяризацию мембраны концевой пластинки, за счет селективного снижения активности  $\alpha 2$ -изоформы  $\text{Na}^+ / \text{K}^+$  АТФазы без изменения внеклеточного уровня ацетилхолина (Кравцова и др. 2014).

## **4.2 Роль холестерина в вызванном экзоцитозе синаптических везикул и их рециклировании в нервно-мышечном синапсе лягушки**

Высокое содержание холестерина и липидных плотиков в синаптическом регионе может требоваться для протекания везикулярных процессов, обеспечивающих освобождение нейромедиатора в ответ на потенциал действия. Для исследования роли холестерина в протекании ключевых этапов везикулярного цикла, экзоцитоза, эндоцитоза и транспорта синаптических везикул, применяли комплекс электрофизиологических и оптических методов. Мембранный холестерин удаляли с использованием 20-30 мин аппликации 1 мМ МЦД, который удаляет примерно 20% холестерина синаптических мембран (рис. 36%) и также приблизительно на 20% снижает интенсивность окрашивания меткой на липидные рафты (рис. 37%).

### **4.2.1 Влияние 1мМ МЦД на спонтанную и вызванную одиночными потенциалами действия секрецию**

Эксперименты, представленные в этом разделе, выполнены на нервно-мышечных препаратах лягушки. МЦД в концентрации 1 мМ не изменял частоту и амплитуду МТКП. Средняя частота / амплитуда МТКП через 20 минут действия МЦД составила  $1.4 \pm 0.3 \text{ с}^{-1} / 1.53 \pm 0.07 \text{ нА}$  по сравнению с  $1.5 \pm 0.4 \text{ с}^{-1} / 1.57 \pm 0.08 \text{ нА}$  в контроле ( $n=5$ ;  $p > 0.05$ ). Косвенно это указывает на отсутствие существенных изменений чувствительности постсинаптических никотиновых ацетилхолиновых рецепторов. При низкочастотном раздражении двигательного нерва ( $0.05 \text{ имп/с}$ ) амплитуда ТКП через 20 минут аппликации МЦД снижалась до  $75 \pm 3\%$  ( $n=5$ ,  $p < 0.01$ ) от исходных значений (рис. 39) и оставалась на этом уровне, если аппликация МЦД продолжалась. Интересно отметить, что замена раствора с МЦД на нормальный раствор Рингера не приводила к восстановлению амплитуды ТКП до исходного уровня. Однако добавление на 20 мин комплекса МЦД-холестерин восстанавливало амплитуду ТКП до исходного уровня ( $98 \pm 4\%$ ,  $n=5$ ,  $p > 0.05$ ), на котором амплитуда поддерживалась после отмывки препарата от комплекса МЦД-холестерин. Все эти данные свидетельствует о том, что удаление

холестерина 1 мМ МЦД оказывает пресинаптическое действие, уменьшая на длительное время вызванную секрецию квантов медиатора в нервно-мышечном синапсе лягушки (Петров и др. 2009). Однако, если после удаления мембранного холестерина восстановить его содержание с помощью комплекса МЦД-холестерин, то вызванная секреция возвращается на прежний уровень. Это указывает на обратимость изменений в аппарате вызванной секреции при восстановлении оптимального уровня мембранного холестерина.

Схожая ситуация нами была обнаружена в нервно-мышечном синапсе мыши, где в условиях сниженной внеклеточной концентрации  $Ca^{2+}$  1 мМ МЦД не влиял на частоту и амплитуду МПКП, однако снижал квантовый состав ПКП (Тараканова О.И. и др. 2011). Можно думать, что удаление холестерина из пресинаптической мембраны приводит к угнетению процессов вызванного экзоцитоза синаптических везикул в двигательных нервных окончаниях (Петров и др. 2009).

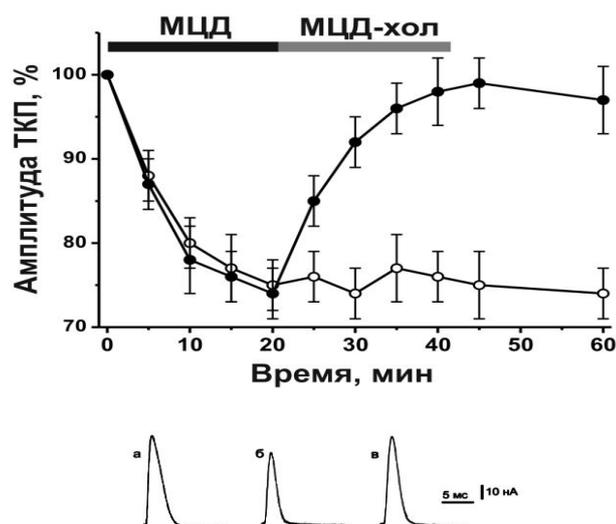


Рис. 39. Эффект метил- $\beta$ -циклодекстрина (МЦД) на амплитуду ТКП при низкочастотном раздражении

Сверху, динамика амплитуды ТКП в ответ на 20 мин аппликацию МЦД (1 мМ) в % (за 100% принят уровень до добавления МЦД). В одном случае после 20 мин экспозиции с МЦД препарат перфузировался нормальным физиологическим раствором (светлые кружки), в другом – добавлялся на 20 мин комплекс МЦД-холестерин (темные кружки). Графики построены исходя из  $n=5$ . Снизу, нативные ТКП, зарегистрированные в ответ на одиночные раздражения: в контроле (а) и после 20 минутной обработки МЦД (б), после 20 мин воздействия комплекса МЦД-холестерин (в).

#### 4.2.2 Эффекты МЦД на кинетику освобождения медиатора при длительном высокочастотном раздражении

В данных экспериментах использовали две серии длительного (3 мин) высокочастотного (20 имп/с) раздражения с интервалом между сериями в 30 мин. После окончания каждой серии двигательный нерв раздражали редкими импульсами (0.05 имп/с) для определения динамики восстановления амплитуды ТКП. В контрольных экспериментах раздражение моторного нерва 3 мин 20 Гц приводило к характерным изменениям амплитуды ТКП (рис. 40) (Петров и др. 2008; Petrov et al., 2008; Зефилов и др., 2008а,б).

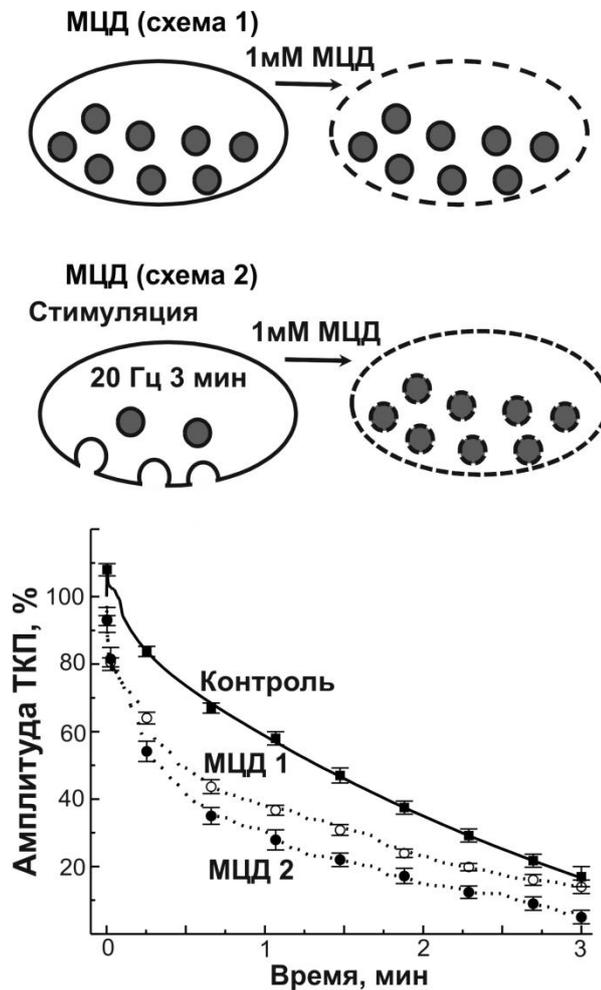


Рис. 40. Эффект метил- $\beta$ -циклодекстрина (МЦД) на амплитуду ТКП при длительном высокочастотном раздражении

Сверху, схемы экспериментов с МЦД. В первом случае (схема 1) препарат подвергался действию МЦД в покое в течение 30 мин, затем промывался нормальным физиологическим раствором (10-20 мин), после чего следовал эпизод стимуляции. В этих условиях холестерин удаляется преимущественно из поверхностных мембран.

Рис. 40 (продолжение)

При альтернативном протоколе эксперимента, во время аппликации МЦД производилось высокочастотное раздражение двигательного нерва (3 мин 20 Гц), вызывающее обнажение внеклеточной среде мембран многих синаптических везикул, которые подвергались действию МЦД. Снизу, динамика изменения амплитуды ТКП во время первой серии высокочастотного раздражения (20 имп/с). Черные квадраты – контроль; светлые кружки – МЦД действовал 30 мин до начала раздражения (МЦД 1); черные кружки – МЦД действовал как 20 мин до, так и во время высокочастотного раздражения (МЦД 2). По оси Y – амплитуда ТКП в % от исходной (до стимуляции); по оси X – время раздражения в минутах.

Вслед за коротким периодом облегчения происходило близкое к линейному падение амплитуды ТКП. Через 30 с раздражения амплитуда ТКП составляла  $72 \pm 2\%$  ( $p < 0.01$ ), а через 3 минуты -  $16 \pm 4\%$  ( $p < 0.001$ ,  $n=6$ ) от предстимуляционного уровня (рис. 40). Восстановление до исходного значения амплитуды ТКП наблюдалось в течение 1–4 мин (время полувосстановления  $\sim 27 \pm 7$  сек,  $n=6$ ). Повторная серия высокочастотного раздражения вызывала аналогичную динамику снижения амплитуды ТКП (рис. 41), что хорошо заметно на кумулятивных кривых амплитуды ТКП. В ответ на первую и вторую серии раздражений кумулятивные амплитуды ТКП были одинаковыми (рис. 41).

Для исследования эффектов МЦД на динамику секреции медиатора при длительном высокочастотном раздражении применяли два варианта экспериментов. В первом варианте (МЦД 1) нервно-мышечный препарат предварительно в течение 30 мин выдерживали в растворе, содержащем МЦД, а затем на протяжении 10 - 20 мин перфузировали обычным физиологическим раствором. После чего проводили две серии длительного высокочастотного раздражения с 30 мин интервалом (рис. 40, рис. 41). В отличие от контроля в препаратах, выдержанных в МЦД, в ответ на первую серию раздражений снижение амплитуды ТКП наблюдалось сразу после начала высокочастотной стимуляции, а депрессия амплитуды ТКП была более выраженной (рис. 40). Так, через 30 секунд раздражения амплитуда ТКП снизилась до  $49 \pm 3\%$  ( $p < 0.001$  по сравнению с контрольной динамикой), а через 3 минуты – составила  $14 \pm 2\%$  ( $p > 0.05$ ,  $n=5$ ). Восстановление амплитуды ТКП наблюдалось в интервале от 1 до 4 мин (полувосстановление около 25-35 с,  $p > 0.05$  по сравнению с контрольным).

Кумулятивная кривая амплитуды ТКП указывает на почти двукратное уменьшение количества освобождаемых квантов медиатора в процессе высокочастотного раздражения ( $p < 0.001$ ) по сравнению с контролем (рис. 41). Динамика снижения амплитуды ТКП в ответ на вторую серию высокочастотного раздражения, также как и в контрольных экспериментах, была идентичной первой (рис. 41). Таким образом, экстракция холестерина из поверхностной мембраны вызывает усиление депрессии секреции медиатора в процессе высокочастотной активности, а количество медиатора, освобождаемого на 2-ую серию раздражений, не меняется (по сравнению с 1-ой серией).

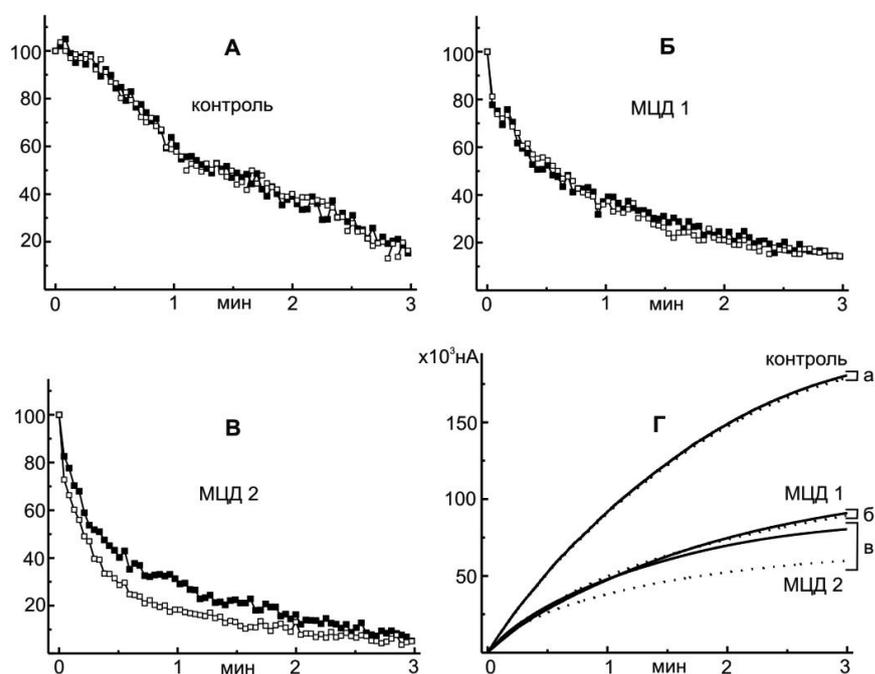


Рис. 41. Динамика амплитуд ТКП во время двух серий длительного высокочастотного раздражения

А, Б, В – Изменения амплитуды ТКП во время двух серий высокочастотного раздражения (20 имп/с) с интервалом в 30 мин, данные отдельных экспериментов. Черные квадраты – первая серия раздражений, светлые квадраты – вторая серия. А – контроль; Б – аппликация МЦД осуществлялась за 30 мин до 1-го эпизода высокочастотной стимуляции (МЦД 1); В – во время 30 мин экспозиции с МЦД препарат подвергался 1-му эпизоду стимуляции (МЦД 2). Г – Кумулятивные кривые амплитуды ТКП (сумма амплитуд) из А, Б, В. Сплошная линия соответствует первой серии высокочастотного раздражения, пунктирная – второй. По осям Y – амплитуда ТКП в % от исходной (до стимуляции) (А-В) или кумулятивная амплитуда ТКП в нА (Г); по осям X – время высокочастотного раздражения, в мин.

При втором протоколе эксперимента (МЦД 2) - МЦД присутствовал в омывающем препарате растворе 20 мин до первой серии высокочастотной стимуляции и еще 10 мин после. Такая схема эксперимента позволяет экстрагировать холестерин не только из пресинаптической мембраны, но и из мембран везикул (рис. 40). Оказалось, что в этом случае первая длительная высокочастотная серия приводила к еще более быстрому снижению амплитуды ТКП по сравнению с первым вариантом экспериментов (рис. 40). Через 30 с раздражения амплитуда ТКП падала до  $45 \pm 3\%$  ( $p > 0.05$  по сравнению с МЦД 1), а к 3 минуты стимуляции до  $-9 \pm 2\%$  ( $p < 0.05$ ,  $n=5$ ). Восстановление амплитуды ТКП после прекращения раздражения происходило несколько медленнее (в течение 3-6 мин), чем в контрольных условиях (время полувосстановления  $32 \pm 5$  с,  $p < 0.05$ ). Вторая серия высокочастотного раздражения вызывала более глубокую депрессию амплитуды ТКП по сравнению с первой серией (рис. 41). За 30 с стимуляции амплитуда ТКП снижалась до  $30 \pm 3\%$  ( $p < 0.05$  по сравнению с 1-м эпизодом стимуляции), а к 3 мин до  $-5 \pm 3\%$  ( $p < 0.05$ ). Кумулятивная амплитуда ТКП к концу второй серии раздражения была примерно на 25% меньше ( $p < 0.01$ ), чем к концу первой, что свидетельствует о прогрессирующем снижении суммарного количества освобожденного медиатора (рис. 41). После окончания второй серии высокочастотного раздражения восстановление амплитуды ТКП до исходного уровня не наблюдалось, и резко замедлялась динамика восстановления (время полувосстановления  $50 \pm 5$  с,  $p < 0.01$ ). Полученные данные позволяют считать, что «удаление» везикулярного холестерина тормозит восстановление секреции медиатора после длительного высокочастотного раздражения и усиливает выраженность депрессии на второй эпизод раздражения.

#### **4.2.3 Эффекты 1 мМ МЦД на эндоцитоз и экзоцитоз синаптических везикул**

МЦД может взаимодействовать с FM1-43 и, таким образом, выступать в роли агента, препятствующего связыванию FM1-43 с мембраной и/или способствующего его диссоциации от мембраны (Dason et al., 2010; Petrov et al., 2014). Для предотвращения искажений, которые могут быть вызваны влиянием МЦД на FM1-43, аппликации этих реагентов были разобщены во времени. В дополнение к этому, все нервно-мышечные препараты после загрузки FM1-43 или в процессе выгрузки красителя интенсивно перфузировались физиологическим раствором, содержащим ADVASEP-7,

сульфированный  $\beta$ -циклодекстрин, который способствует смыванию FM1-43 с поверхностных мембран (Петров и др., 2008; Petrov et al., 2008).

Загрузка красителя. Загрузку FM1-43 в нервные окончания производили в ответ на 2-ой эпизод высокочастотной стимуляции, следующий через 30 мин после первого. В контрольных условиях интенсивность свечения (рис. 42) загруженных красителем нервных окончаний (20 Гц, 3 мин) составила  $122 \pm 6$  о.е. ( $n=9$ ), свечение пятен  $146 \pm 5$  о.е. ( $n=9$ , кол-во пятен - 180). Анализ морфологии нервных окончания и флуоресцирующих пятен показал (рис. 42), что диаметр терминалей составляет  $1.3 \pm 0.2$  мкм ( $n=9$ , 50 терминалей), флуоресцирующие пятна (зачастую овальной формы) достаточно равномерно располагаются вдоль нервной терминали с интервалом 1-3 мкм. Предварительная экспозиция в течение 30 мин с МЦД существенно снижает интенсивность флуоресценции загруженных нервных терминалей (до  $61 \pm 5$  о.е.,  $p < 0.001$ ,  $n=9$ , рис. 42) и пятен (до  $76 \pm 4$  о.е.  $p < 0.001$ , кол-во пятен - 180, рис. 42). При этом морфология и размеры флуоресцирующих пятен были такими же, как и в контрольных препаратах (рис. 42). Если МЦД присутствовал в окружающем растворе не только перед стимуляцией, но и во время 1-го эпизода высокочастотной стимуляции (рис. 42), то это уменьшало захват FM 1-43 в 12 раз (рис. 42), по сравнению с контролем (интенсивности флуоресценции нервных окончаний -  $10 \pm 3$  о.е.,  $p < 0.001$ ,  $n=9$ , свечение пятен  $20 \pm 3$  о.е.,  $p < 0.001$ , кол-во пятен - 170). Наряду с уменьшением загрузки красителя происходило увеличение диаметра нервных терминалей до  $1.8 \pm 0.2$  мкм ( $n=9$ , нервных терминалей - 70,  $p < 0.05$ ), светящиеся пятна часто были расположены по краям терминалей, а между пятнами имелись значительные незагруженные красителем области (рис. 42). Эти данные свидетельствуют об уменьшении эндоцитоза синаптических везикул при удалении пресинаптического холестерина, а также о сильном угнетении эндоцитоза и нарушении кластеризации синаптических везикул при экстракции везикулярного холестерина (Петров и др. 2009).

Позднее наши данные о необходимости везикулярного холестерина в процессах эндоцитоза были подтверждены в исследованиях на нервно-мышечных синапсах дрозофилы и центральных синапсах (Dason et al., 2010; Yue, Xu, 2015). Также была показана значимость холестерина синаптических везикул в регулировании цитоскелета и кластеризации синаптических везикул (Dason et al., 2014).

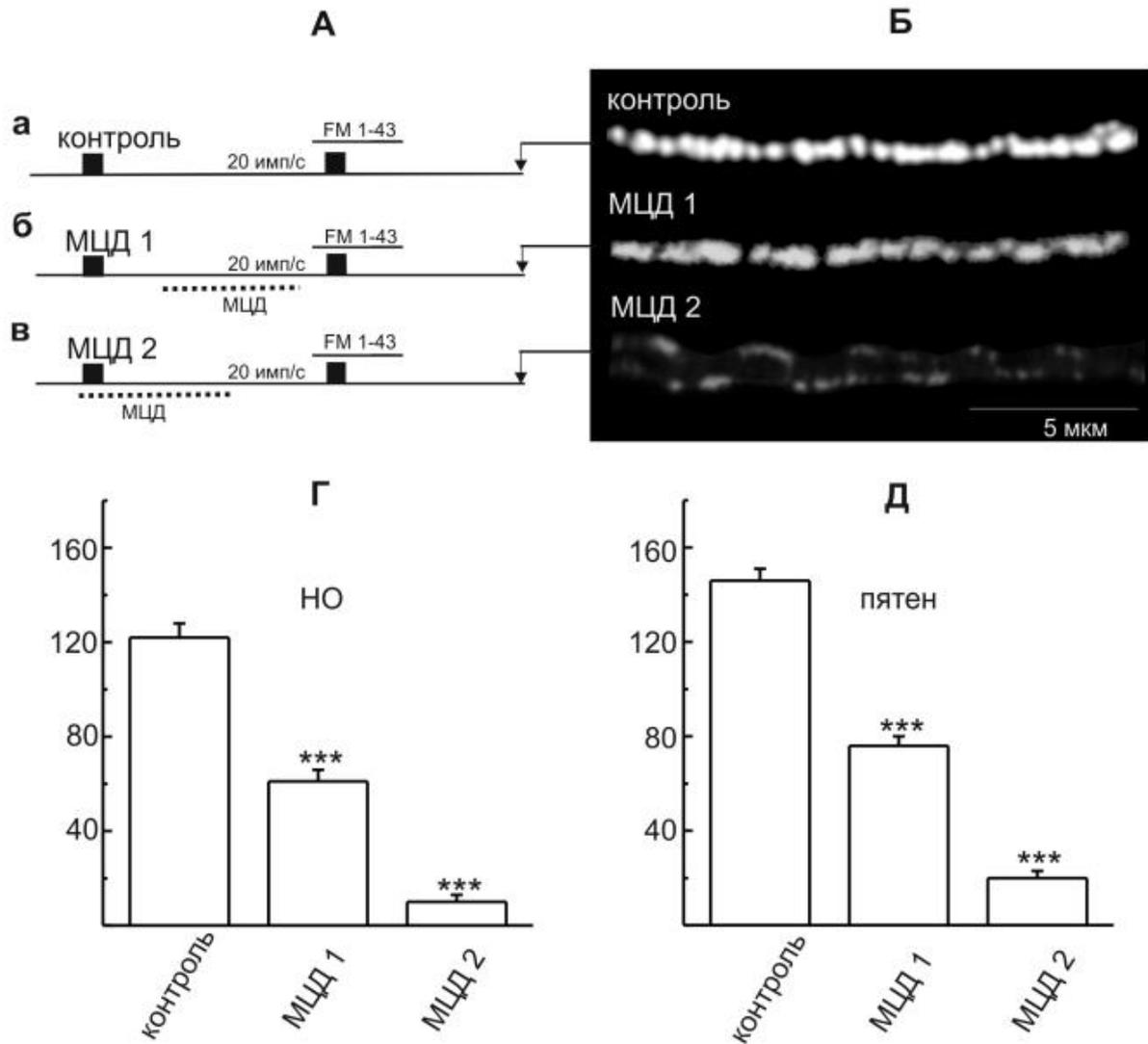


Рис. 42. Влияние МЦД на загрузку красителя FM1-43 в двигательные нервные окончания лягушки

А – схемы экспериментов: «контроль» (а), «МЦД 1» (б) и «МЦД 2» (в). Черный прямоугольник – раздражение 3 мин 20 имп/с. Время аппликации FM1-43 - сплошная линия, а МЦД - пунктирная линия. В случае реализации 1-го протокола (МЦД 1) удаляется холестерин из поверхностных синаптических мембран, а при осуществлении 2-го (МЦД 2) – и из мембран синаптических везикул. Стрелкой показано время регистрации картин флуоресценции. Б – Изображения флуоресцирующих участков двигательных нервных терминалей. Г и Д – Интенсивность флуоресценции в контуре нервных окончаний и в отдельных пятнах, соответственно. По оси ординат – интенсивность свечения, в о.е. Достоверность показана  $***p < 0.001$ .

*Выгрузка красителя.* Длительная высокочастотная (20 Гц) стимуляция нервно-мышечных препаратов, которые были предварительно загружены FM-красителем, в контроле сопровождается падением интенсивности флуоресценции, происходящим в две фазы, сначала быстро (за 15 с стимуляции на 18-22%), затем медленнее (рис. 43). Спустя 3 мин раздражения интенсивность флуоресценции снижалась до  $41 \pm 2\%$  ( $n=9$ ,  $p<0.001$  относительно исходного уровня). Если перед загрузкой FM1-43 нервно-мышечные препараты обрабатывались МЦД, то последующая выгрузка FM1-43 заметно замедлялась особенно вначале высокочастотной активности (рис. 43). Поэтому через 15 с стимуляции яркость свечения снижалась только до  $89 \pm 2\%$  ( $p<0.05$ ), а через 3 мин - до  $56 \pm 3\%$  ( $p<0.05$ ,  $n=9$ ). Резкие изменения выгрузки красителя наблюдались в том случае, когда МЦД присутствовал в растворе во время предшествующего загрузке эпизода высокочастотной стимуляции (рис. 43). В этом случае замедление скорости падения интенсивности свечения наблюдалось на всем протяжении периода длительного высокочастотного раздражения (рис. 43). Спустя 15 с стимуляции интенсивность свечения уменьшалась до  $95 \pm 2\%$  ( $p<0.01$  по сравнению с контрольной выгрузкой), а через 3 минуты - до  $73 \pm 2\%$  ( $p<0.001$ ,  $n=7$ ). Следует отметить, что изначальная загрузка в препаратах, подвергнутых действию МЦД, была ниже (см. раздел «загрузка красителя»). Однако, если производить сначала загрузку FM1-43, а потом воздействовать МЦД и после этого производить выгрузку с помощью высокочастотной стимуляции, то динамика снижения интенсивности свечения будет медленнее, чем в контроле и не будет отличаться от таковой в случае, когда препараты сначала обрабатывались МЦД, а потом загружались (рис. 43, А, схема г / МЦД 3). Следовательно, то обстоятельство, что предварительная обработка препаратов МЦД снижает последующую загрузку FM1-43, не изменяет характер (динамику) выгрузки FM-красителя, который указывает на относительный темп процессов экзоцитоза синаптических везикул, содержащих краситель.

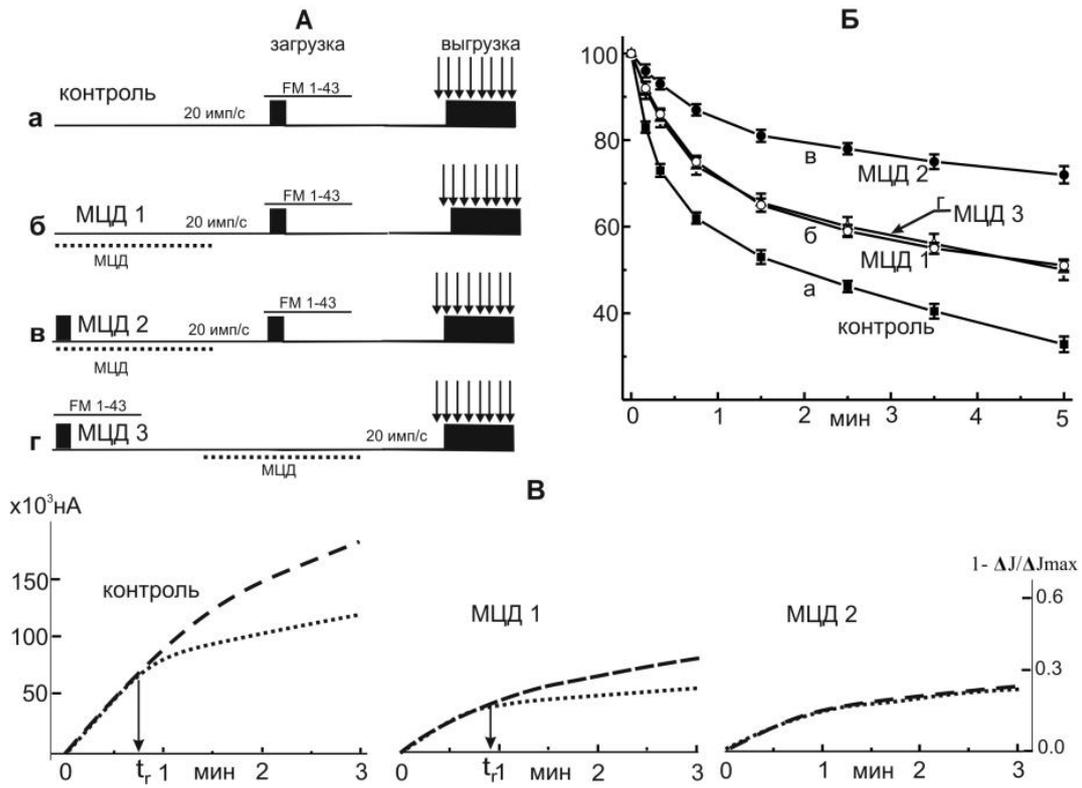


Рис. 43. Влияние МЦД на выгрузку маркера FM 1-43 и оценка времени рециклирования синаптических везикул

А – схемы экспериментов. Черные прямоугольники обозначают стимуляцию с частотой 20 Гц. С помощью одного из стимуляционных эпизодов осуществлялась загрузка FM1-43 в нервные окончания (апликация FM1-43 показана верхней чертой). Экспозиция (30 мин) с МЦД изображена нижней пунктирной линией. Последний черный прямоугольник показывает длительное высокочастотное раздражение с регистрацией (стрелки) снижения флуоресценции нервного окончания (выгрузки красителя). Б – кривые спада интенсивности свечения во время выгрузки красителя. Ось-Y – интенсивность свечения в процентах от исходного уровня до начала раздражения; ось-X – время раздражения в минутах. В – определение времени рециклирования в контроле, МЦД 1, МЦД 2. Прерывистые линии – кумулятивные кривые амплитуд ТКП из Рис. 41, Г. Пунктирные линии – перевернутые кривые выгрузки красителя из рис. 43, Б. Кривые были масштабированы и совмещены в начальной части. Время рециклирования – точка расхождения двух кривых ( $t_r$ ). Правая ось ординат – суммарная амплитуда ТКП (в нА), левая – уменьшение относительной флуоресценции ( $1 - \Delta J / \Delta J_{\max}$ ). По осям ординат – время стимуляции (в мин).

#### 4.2.4 Скорость везикулярного цикла и мембранный холестерин

Первоначально кривая выгрузки FM1-43 при высокочастотном раздражении характеризует количество слившихся с пресинаптической мембраной синаптических везикул, которые содержали краситель. Однако, после экзоцитоза синаптическая везикула вместе с медиатором теряет краситель, а вновь образованная посредством эндоцитоза везикула уже не содержит красителя. Экзоцитоз подобной синаптической везикулы приведет к выделению кванта медиатора, но не вызовет уменьшения свечения нервного окончания (Betz, Bewick, 1993; Петров и др., 2008; Зефиоров и др. 2008а,б). В то же время кумулятивная кривая амплитуд ТКП указывает на количество квантов медиатора, освободившихся из синаптических везикул (количество событий экзоцитоза). Поэтому при сопоставлении и масштабировании кривой потери красителя (перевернутая кривая динамики выгрузки красителя) и кумулятивной кривой амплитуды ТКП при длительной высокочастотной активности можно определить скорость везикулярного цикла (рециклирования синаптических везикул), т.е. время, через которое синаптическая везикула может повторно участвовать в секреции медиатора (Betz W., 1992; Петров и др. 2008; Petrov A.M. et al., 2008). Среднее время рециклирования везикул ( $t_r$ ) определяется моментом явного расхождения кривых, т.е. когда темп выгрузки красителя начинает отставать от темпа секреции медиатора (Рис. 43). В контрольных экспериментах  $t_r$  оказалось равным около 40-50 с. Это согласуется с временем, оцененным нами ранее (Петров и др. 2008; Зефиоров и др. 2008а,б; Petrov et al., 2008) При удалении холестерина из поверхностных мембран время расхождения кривых составляло  $t_r = 50-60$  с, т.е. скорость кругооборота синаптических везикул практически не изменялась. Однако при удалении холестерина из мембран синаптических везикул расхождения между кривыми не наблюдалось на протяжении всего периода высокочастотной стимуляции ( $t_r > 180$  сек), что свидетельствует о резком нарушении рециклирования везикул (Рис. 43).

#### 4.2.5 Роль пресинаптического и везикулярного холестерина в экзо- и эндоцитозе везикул в двигательном нервном окончании

Значение холестерина плазматической (пресинаптической) мембраны в процессах экзоцитоза синаптических везикул и секреции медиатора. Снижение секреции медиатора в ответ на одиночные раздражения при частичном удалении холестерина из

состава пресинаптической мембраны свидетельствует об угнетении экзоцитоза везикул. Экстракция холестерина из наружных мембран сопровождается более глубокой депрессией освобождения ацетилхолина при высокочастотном раздражении, в итоге за три минуты высокочастотной активности выделяется меньше квантов ацетилхолина, по сравнению с контролем. Удаление холестерина из поверхностных мембран вызывало приблизительно двух кратное снижение загрузки FM-красителя. Однако эти результаты не являются следствием нарушения эндоцитоза синаптических везикул. Снижение захвата красителя является следствием уменьшения на ~ 50% экзоцитоза везикул (числа квантов, освобожденного ацетилхолина) при 20 Гц стимуляции. То есть компенсаторный эндоцитоз протекает в нормальном режиме и полностью восстанавливает численность синаптических везикул до предстимуляционного уровня. Это положение подтверждается тем, что за первую и вторую серии высокочастотной стимуляции освобождается одинаковое количество медиатора, а время восстановления амплитуды ТКП не меняется. Кроме того, не меняется диаметр нервных окончаний и время рециклирования (около 1 мин) синаптических везикул, по сравнению с контролем. Обнаруженное угнетение выгрузки FM1-43 так же указывает на уменьшения событий экзоцитоза синаптических везикул, содержащих краситель.

В целом полученные результаты, говорят о том, что при удалении части холестерина из пресинаптической мембраны угнетается экзоцитоз и уменьшается популяция синаптических везикул, участвующих в нейротрансмиссии при высокочастотной активности, тогда как эндоцитоз и рециклирование протекают в неизменном режиме. Учитывая, что при удалении холестерина особенно значительно подавляется освобождение медиатора и выброс красителя в начале высокочастотной активности, можно предположить сокращение размера рециклирующего пула синаптических везикул. В ранее проведенных нами исследованиях показано избирательное подавление участия везикул рециклирующего пула в экзоцитозе при ритмической активности в условиях ингибирования пути гуанилатциклаза-протеинкиназа G1 (Petrov et al., 2008). Как и в случае многих сигнальных каскадов активность этого пути может зависеть от липидных рафтов (Петров, Зефилов, 2013).

Возможно, что холестерин пресинаптической мембраны вовлечен в работу белковых комплексов, участвующих в докировании и праймировании синаптических везикул. Холестерин может облегчать экзоцитоз синаптических везикул за счет

стабилизации поры слияния (Tong et al., 2009). Возможно поэтому снижение уровня холестерина в поверхностной мембране вызывает подавление вызванного освобождения нейромедиатора и способствует развитию депрессии при интенсивной длительной синаптической активности. Ранние данные говорят об участии мембранного холестерина в процессах слияния (экзоцитоза) гранул в нейроэндокринных клетках (Lang, 2007). Содержащие высокую концентрацию холестерина рафты могут выполнять роль сайтов для привлечения и активации SNARE-белков, обеспечивающих слияние синаптических везикул с пресинаптической мембраной (Rohrbough et al., 2004; Gil et al., 2005). Компонентами плотиков являются сфинголипиды и продукты их ферментативного расщепления (церамид, сфингозин), которые могут контролировать взаимодействия ряда белков (синтаксин, Munc18, синаптобревин), вовлеченных в экзоцитоз (Зефилов, Петров, 2010б).

В дополнение, влияние на экзоцитоз и освобождение нейромедиатора удаления холестерина может быть опосредовано снижением токов, образующих ПД и необходимых для передачи возбуждения вдоль аксона (Zamir, Charlton, 2006; Тараканов и др. 2011), и уменьшением активности потенциал-управляемых  $Ca^{2+}$  каналов, вход  $Ca^{2+}$  через которые стимулирует экзоцитоз (Taverna et al., 2004). Значение холестерина в синаптическом экзоцитозе может быть сопряжено с его влиянием на сигнальные молекулы (Petrov et al., 2014). Например, холестерин может требоваться для фоновой активности цАМФ-синтезирующих и цАМФ-зависимых ферментов, регулирующих экзоцитоз и доставку везикул в АЗ (Петров и др. 2008). В целом, каким образом холестерин пресинаптической мембраны контролирует машину вызванного экзоцитоза и вовлечение синаптических везикул в нейротрансдукцию является сложным и пока не решенным вопросом.

Холестерин везикулярных мембран и эндоцитоз. Используемый нами подход для частичного удаления холестерина из мембран синаптических везикул позволил впервые заключить, что везикулярный холестерин абсолютно необходим для эндоцитоза и повторного использования синаптических везикул в секреции медиатора. На это указывает несколько экспериментальных фактов. Во-первых, частичное истощение везикулярного холестерина очень сильно (в 6 раз по сравнению с удалением холестерина только из поверхностных мембран) снижало загрузку красителя (при уменьшении суммарного экзоцитоза синаптических везикул, судя по кумулятивной

кривой амплитуды ТКП, примерно на 10% по сравнению с процедурой вымывания холестерина только из плазматической мембраны). Во вторых, количество секретлируемого медиатора во время второй серии высокочастотной стимуляции было значительно снижено, по сравнению с первой серией, а восстановление секреции после второй серии раздражения резко замедлялось. Это свидетельствует о выраженных нарушениях восстановления везикулярных пулов в нервном окончании, вероятно, за счет угнетения эндоцитоза. В третьих, время рециклирования синаптических везикул резко возрастало. Известно, что наиболее длительным процессом везикулярного цикла является именно эндоцитоз. В четвертых, следствием блока эндоцитоза является накопление мембранного материала везикул в плазматической мембране (Петров и др. 2008), что, вероятно, привело к изменению морфологии пятен и расширению нервного окончания после удаления холестерина из везикулярных мембран.

Значение холестерина мембран синаптических везикул в протекании эндоцитоза может зависеть от роли холестерина в контроле текучести мембран. Изменение фазовых свойств мембран, вызванных удалением внеклеточного  $Ca^{2+}$ , блокирует синаптический эндоцитоз в двигательных нервных терминалях лягушки (Zefirov et al., 2006). Другая возможность заключается в том, что холестерин со сфинголипидами способен формировать в мембранах везикул рафты (Петров и др. 2011), внутри которых движение молекул (например, фосфатидилинозитолов и белков) сильно ограничено. Существование подобных липидных плотиков может препятствовать перемешиванию специфических везикулярных белков со специфическими белками пресинаптической мембраны. Следовательно, сортировка белков в ходе эндоцитоза упрощается. Регионы мембраны, концентрирующие холестерин и фосфоинозитиды, могут взаимодействовать и стимулировать некоторые протеины, участвующие в эндоцитозе и рециклировании (Rohrbough, Broadie, 2005; Петров и др. 2009; Зефилов, Петров, 2010б).

Четкое разделение эффектов удаления мембранного и везикулярного холестерина указывает на несмешиваемость и автономность двух пулов холестерина. Исходя из этого предположения, можно объяснить, почему специфичные белки активной зоны имеют постоянную локализацию и не смешиваются с везикулярными или другими белками плазматической мембраны, а также почему белки синаптических везикул (например, синаптофизин и синаптотагмин) после экзоцитоза не рассеиваются по

плазматической мембране, а избирательно захватываются во вновь образующиеся синаптические везикулы (Петров и др. 2009; Зефилов, Петров, 2009).

Полученные данные свидетельствуют о большом значении мембранного холестерина в везикулярном цикле. При снижении содержания этого липида в мембранах нервного окончания рециклирование синаптических везикул, обеспечивающее секрецию медиатора в условиях продолжительной активности, нарушается. Нами предлагается гипотеза о том, что холестерин плазматической мембраны играет существенную роль в процессах, обеспечивающих экзоцитоз синаптических везикул, тогда как холестерин в составе мембран везикул необходим для эффективного протекания процесса эндоцитоза (Петров и др. 2009; Зефилов, Петров, 2009, 2010; Петров, Зефилов, 2013; Petrov et al., 2011; 2014; 2015).

#### **4.3 Механизмы участия холестерина в контроле спонтанного экзоцитоза в нервно-мышечном синапсе лягушки**

Истощение мембранного холестерина, вызванное 10-15 мМ МЦД, резко усиливает спонтанное освобождение нейромедиатора в нервно-мышечных синапсах рака и центральных синапсах грызунов (Zamir, Charlton, 2006; Wasser, Kavalali, 2009; Teixeira et al., 2012). Механизм этого усиления не понятен. Не исключено, что при истощении пула мембранного холестерина происходит увеличение активности сигнальных молекул, находящихся в рафтах, ведущее к интенсификации спонтанного экзоцитоза. Согласуются с этим предположением данные об ослаблении эффектов удаления холестерина на спонтанное освобождение при ингибировании протеинкиназ А, С и кальций кальмодулин-зависимой киназы в центральных синапсах (Smith et al., 2010; Teixeira et al., 2012). Следует отметить, что при многих нейродегенеративных заболеваниях или хроническом воздействии статинов наблюдается снижение уровня холестерина в синаптических мембранах, что сопровождается усилением спонтанного экзоцитоза (Wasser et al., 2007; Martín et al., 2014). В рамках данного исследования для выявления роли холестерина в спонтанном экзоцитозе в нервно-мышечном синапсе лягушки мембранный холестерин удаляли с помощью 10 мМ МЦД и детектировали интенсивность спонтанного экзоцитоза с использованием электрофизиологического и оптического подходов. Также были применены оптические методы, позволяющие

детектировать изменения продукции АФК, состояния мембранных липидов и внутриклеточного  $\text{Ca}^{2+}$  (Petrov et al., 2014; 2015).

#### **4.3.1 МЦД (10 мМ) усиливает спонтанную секрецию медиатора и экзоцитоз синаптических везикул**

Для исследования эффекта обработки 10 мМ МЦД на спонтанную секрецию нейромедиатора, мы вначале записывали МПКП в контрольных условиях и затем на протяжении 10 мин аппликации МЦД. В контроле частота МПКП составляла –  $1.6 \pm 0.2$  имп/с ( $n=6$ ). Добавление МЦД вызывало быстрое увеличение частоты МПКП (рис. 44, А): через 10 мин действия частота составляла  $58.3 \pm 2.0$  имп/с ( $n=6$ ,  $p < 0.001$ ). После завершения аппликации МЦД, в течение отмывки препарата частота МПКП некоторое время сохранялась на повышенном уровне с последующим снижением к 15 мин до  $10.7 \pm 3.5$  имп/с ( $p < 0.01$ , по сравнению с контролем), и возвращение частоты МПКП к контрольному уровню происходило примерно спустя 1 час отмывки. Если комплекс МЦД-холестерин ( $n=6$ ) применялся непосредственно после аппликации МЦД, для восстановления уровня холестерина в мембранах, то тогда частота МПКП снижалась до исходного уровня (предшествующего добавлению МЦД) в течение 10 мин (рис. 44).

В предварительно загруженных FM1-43 двигательных нервных окончаниях (загружали с помощью стимуляции 3 мин 20 Гц, краситель присутствовал в растворе во время стимуляции и 5 мин после) в покое (в нормальном растворе Рингера без стимуляции) практически не детектируется снижение флуоресценции (Рис. 44, Б). Это свидетельствует о слабом освобождении флуоресцентного красителя в покое в результате спонтанного экзоцитоза. Однако добавление 10 мМ МЦД вызывает выраженное снижение флуоресценции FM1-43 (рис. 44, Б) до  $0.52 \pm 0.04$  ( $p < 0.001$ ,  $n=8$ ) через 10 мин. Относительно быстрая динамика выгрузки FM1-43 после обработки МЦД говорит о высокой интенсивности спонтанного экзоцитоза синаптических везикул при истощении мембранного холестерина. Для предварительной загрузки нервных терминалей FM1-43 использовалась длительная высокочастотная стимуляция, поэтому выраженная выгрузка красителя на фоне действия МЦД свидетельствует о том, что везикулы, ранее участвующие в вызванном потенциалами действия экзоцитозе и затем захватившие краситель в ходе эндоцитоза, вовлекаются в спонтанный экзоцитоз, индуцированный удалением холестерина мембран. Следует дополнить, что низкие дозы

МЦД (0.1 и 1 мМ) не вызывают как изменения частоты МПКП, так и флуоресценции FM1-43 в предварительно загруженных нервных терминалях (Петров и др., 2009, Petrov et al., 2011, 2014).

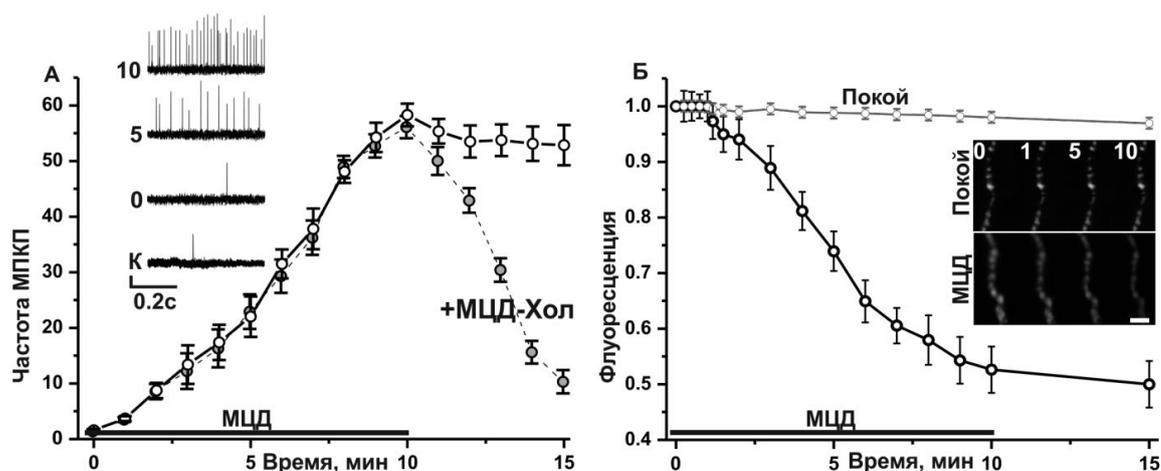


Рис. 44. Динамика спонтанной секреции медиатора и экзоцитоза синаптических везикул при истощении мембранного холестерина

А – Изменение частоты МПКП при 10 мин воздействия 10 мМ МЦД (светлые кружки), и когда комплекс МЦД-холестерин (5мМ) был применен немедленно после завершения аппликации МЦД (серые кружки). Обработка МЦД показана горизонтальной чертой. На вставке изображены треки, иллюстрирующие частоту МПКП в моменты времени до (контроль, К) и после начала действия МЦД (0, 5 и 10 мин в присутствии МЦД). Вертикальная шкала – 0.2 мВ. Б – Изменения флуоресценции нервных терминалей, предварительно загруженных FM1-43, в контроле и при аппликации МЦД. На вставке показаны флуоресцентные изображения участков нервных терминалей в покое и в разные моменты времени (в мин, указано сверху) действия МЦД. Шкала – 3 мкм. По оси ординат - частота МПКП в  $\text{с}^{-1}$  (на А) и нормированная к изначальному уровню до добавления МЦД флуоресценция (на В). По осям абсцисс - время в мин. Данные представлены среднее значение  $\pm$  стандартная ошибка.

#### 4.3.2 Истощение холестерина усиливает продукцию активных форм кислорода (АФК) во внутри- и внеклеточной среде, вызывая перекисное окисление липидов в синаптическом регионе

Удаление холестерина может вызывать изменения продукции АФК в различных типах клеток (Yang et al., 2006; Han et al., 2008; Jin et al., 2011; Odnoshivkina et al., 2015). Окраска препаратов с помощью мембранопроникающего маркера  $\text{H}_2\text{DCF}$ ,

реагирующего на внутриклеточную концентрацию АФК, показала увеличение продукции АФК под влиянием МЦД (рис. 45 А, Б). Так, флуоресценция  $H_2DCF$  в синаптическом регионе возрастала до  $1.21 \pm 0.03$  относительно исходной изолинии ( $p < 0.001$ ,  $n=8$ ) через 10 мин аппликации МЦД. Вызванное МЦД повышение флуоресценции  $H_2DCF$  полностью устранялось на фоне ингибирования НАДФН-оксидазы апоцинином (200 мкМ). В этом случае к 10 мин аппликации МЦД флуоресценция составляла –  $1.00 \pm 0.03$  относительно изолинии ( $p > 0.05$ ,  $n=8$ ). Таким образом, снижение содержания мембранного холестерина, вызванное обработкой 10 мМ МЦД, сопряжено с запуском продукции АФК и увеличением их внутриклеточной концентрации.

Ранее было показано, что активация НАДФН-оксидазы может сопровождаться увеличением внеклеточного уровня  $H_2O_2$ , который затем может проникать внутрь клетки (Miller et al., 2010; Odnoshivkina et al., 2015). Для детекции внеклеточного  $H_2O_2$  была использована реакция окисления эндогенным  $H_2O_2$  реагента AmplexRed в стабильно флуоресцирующий продукт резорурфин (рис. 45, В). В контрольном растворе (содержащим Amplex Red и пероксидазу хрена), 5 мин омывающем нервно-мышечный препарат, флуоресценция резорурфина составляла –  $51.1 \pm 1.0$  о.е. ( $n=6$ ; соответствует продукции примерно  $\sim 8.0 \times 10^{-5}$  мкг  $H_2O_2$  / на 1 мг сырого веса препарата). В начальные 5 мин действия МЦД флуоресценция раствора увеличивается до  $58.5 \pm 0.6$  о.е. ( $p < 0.05$ , соответствует образованию  $\sim 9.4 \times 10^{-5}$  мкг  $H_2O_2$  / мг). В последующие периоды, с 5 по 10 мин обработки МЦД и в отсутствии МЦД с 10 по 15 мин, флуоресценция снижается до уровней –  $51.6 \pm 1.1$  о.е. ( $p=0.83$  относительно контроля) и  $49.9 \pm 1.2$  о.е. ( $p=0.13$  относительно контроля), соответственно. Следовательно, в первые 5 мин аппликации МЦД происходит повышение продукции внеклеточного  $H_2O_2$  примерно на 17%. Ингибирование апоцинином НАДФН-оксидазы устраняло повышение флуоресценции резорурфина. Когда НАДФН-оксидаза была ингибирована, флуоресценция резорурфина в первые 5 мин действия МЦД составляла  $50.9 \pm 1.2$  о.е. ( $n=5$ ,  $p=0.25$  по сравнению со свечением до добавления МЦД,  $49.9 \pm 1.0$  о.е.).

Повышение продукции АФК, связанное с истощением мембранного холестерина, должно воздействовать на мембранные липиды, индуцируя процессы их перекисного окисления. Сопоставляется с этим обнаружение (с помощью Image-iT-Lipid-peroxidation сенсора) окисления липидов избирательно в синаптической области (рис. 45, Г).

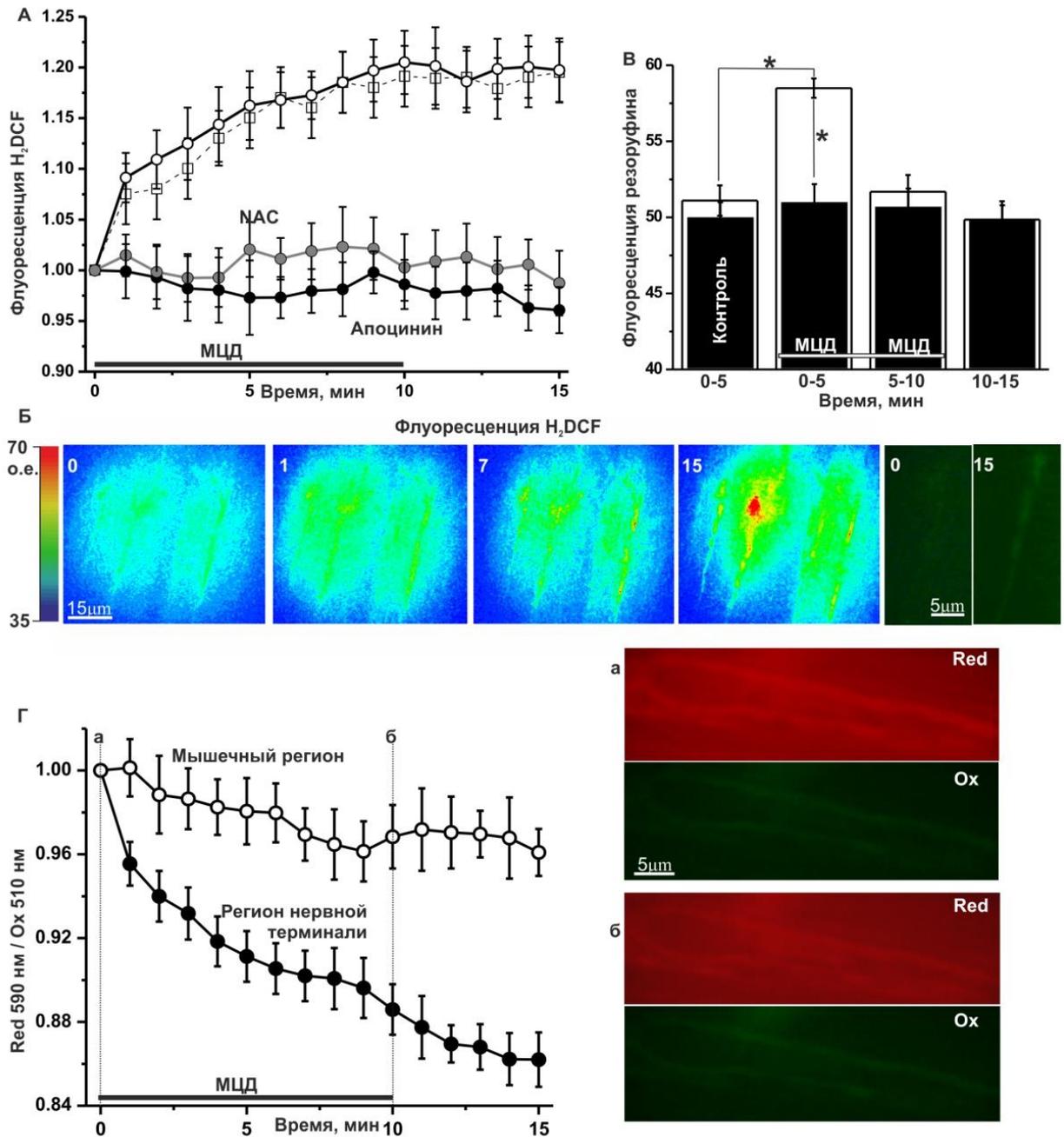


Рис. 45. Продукция АФК и удаление холестерина в нервно-мышечных синапсах лягушки

А – Изменения флуоресценции H<sub>2</sub>DCF в синаптическом регионе под воздействием МЦД (белые кружки) и влияние на эти изменения антагонистов АФК (антиоксиданта НАС, серые кружки; ингибитора НАДФН-оксидазы апоцинина, темные кружки) или TRPV1 антагониста (капсазепина, светлые квадратики). Ось-Y – флуоресценция в о.е., ось-X – время в минутах. Б – флуоресценция H<sub>2</sub>DCF (в псевдоцвете) в моменты времени 0, 1, 7, 15 мин от начала действия МЦД. Соответствующая шкала интенсивности представлена слева (о.е.).

Рис. 45 (продолжение)

Справа приведены увеличенные участки нативных изображений синаптических регионов до («0») и после («15» мин.) удаления мембранного холестерина. В – Флуоресценция резорурфина (показатель внеклеточного уровня  $H_2O_2$ , образованного за 5 мин). Светлые столбики показывают флуоресценцию до (с 0 по 5 мин), в течение (с 0 по 5, с 5 по 10) и после воздействия МЦД (с 10 по 15 мин); темные столбики иллюстрируют флуоресценцию в те же временные интервалы, но в условиях ингибирования НАДФН-оксидазы апоцинином. Звездочки обозначают статистическую значимость различий (\* $p < 0.05$ ). Г - Детекция вызванного МЦД окисления мембранных липидов в синаптическом (темные кружки) и мышечном (светлые кружки) регионах с использованием маркера «Image-iT-Lipid-peroxidation sensor». По оси ординат, нормированное соотношение красной и зеленой флуоресценции Image-iT сенсора (исходное соотношение взято за 1.0). Справа – изображения, иллюстрирующие красную (восстановленная форма) и зеленую (окисленная форма) флуоресценцию в регионе, содержащем нервную терминаль. Изображения показывают соотношение флуоресценции до (сверху, а) и после (снизу, б) обработки МЦД. Горизонтальные линии на А, С и Г обозначают периоды аппликации МЦД. Данные представлены средняя  $\pm$  стандартная ошибка.

Отношение флуоресценции (восстановленный 590 нм / окисленный 510 нм) в контроле в синаптическом и внесинаптическом регионах составило  $3.2 \pm 0.1$  и  $3.6 \pm 0.2$  ( $n=5$ ), соответственно. После добавления МЦД начиналось снижение отношения в синаптическом регионе, отражающее повышение зеленой флуоресценции относительно красной (рис 45, Г). Так, к 10 мин действия МЦД нормированное соотношение снизилось до  $0.89 \pm 0.01$  ( $p < 0.05$ ,  $n=5$ ). Во внесинаптическом регионе снижение отношения практически не наблюдалось (через 10 мин аппликации МЦД нормированное отношение составляло  $0.97 \pm 0.02$ ,  $p > 0.05$ ,  $n=5$ ). Если препарат предварительно обрабатывался 10 мМ МЦД, и только потом начиналась процедура окрашивания (рис. 45, Г), то отношение в синаптическом регионе было  $-2.6 \pm 0.2$  ( $p < 0.05$  по сравнению с контрольным препаратом до воздействия МЦД,  $n=4$ ), а во внесинаптическом –  $3.4 \pm 0.3$  ( $p=0.68$ ). Это указывает на окисление липидов преимущественно в синаптической области при удалении мембранного холестерина.

Использованные три подхода позволяют считать, что удаление мембранного холестерина (10 мМ МЦД) повышает уровень АФК во вне- и внутриклеточной среде за счет активации одного из главных АФК-продуцирующих мембранных ферментов - NADPH-оксидазы. Это согласуется с более ранним наблюдением, что активность NADPH-оксидазы может сдерживаться холестерином в клетках проксимальных канальцев почек (Han et al., 2008), хотя в некоторых типах клеток возможна противоположная ситуация (Odnoshivkina et al., 2015).

#### **4.3.3 АФК вовлечены в вызванное удалением холестерина усиление спонтанного освобождения медиатора и экзоцитоза**

Для проверки участия АФК в эффектах удаления холестерина на экзоцитоз был применен антиоксидант - N-ацетил-L-цистеин (NAC, 200 мкМ). NAC эффективно предотвращал повышение флуоресценции  $H_2DCF$ , вызванное истощением холестерина (рис. 46). На фоне действия NAC (после 45 мин прединкубации с антиоксидантом) к 10 мин аппликации МЦД флуоресценция составляла  $0.99 \pm 0.03$  ( $p > 0.05$ ,  $n=8$ ).

Сама по себе аппликация NAC не влияла на частоту МПКП ( $1.5 \pm 0.3$  Гц,  $n=6$ ,  $p > 0.05$  по сравнению с предшествующим аппликации уровнем), однако на его фоне эффект удаления холестерина на спонтанную секрецию был существенно меньше (рис 46А). Так, на фоне действия антиоксиданта частота МПКП к 10 мин аппликации МЦД составила  $16.0 \pm 3.1$  имп/с ( $p < 0.001$  по сравнению с аппликацией МЦД в одиночку,  $n=6$ ). Применение антиоксиданта замедляло снижение яркости флуоресценции предварительно загруженных FM1-43 нервных терминалей, вызванное МЦД (показатель экзоцитоза, рис 46, Б). Через 10 мин обработки МЦД флуоресценция снижалась только до  $74 \pm 2\%$  ( $p < 0.01$  по сравнению с контрольным эффектом МЦД,  $n=8$ ).

Полученные данные свидетельствуют о том, что АФК, продукция которых возрастает на фоне действия МЦД, стимулируют спонтанный экзоцитоз синаптических везикул и секрецию медиатора. Следует отметить, что обработка антиоксидантом ослабляет, но не полностью предотвращает эффект МЦД, указывая на частичную зависимость усиления освобождения медиатора, вызванного МЦД, от АФК.

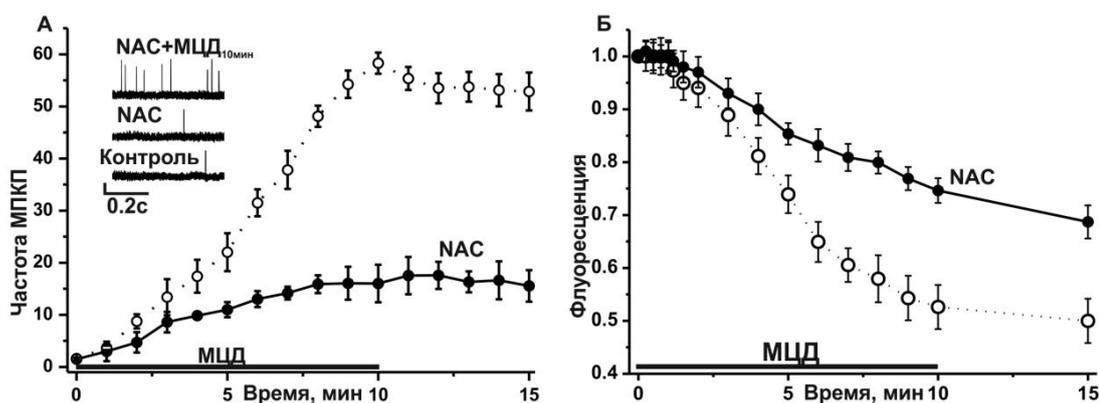


Рис. 46. Роль АФК в эффектах МЦД на спонтанную секрецию медиатора и экзоцитоз синаптических везикул

А – Изменение частоты МПКП под влиянием 10 мМ МЦД (10 мин аппликация) в контроле (из рис. 44, белые кружки), и когда АФК были хелатированы антиоксидантом NAC (темные кружки). На вставках показаны треки МПКП в контроле, через 40 мин перфузии NAC и после 10 мин аппликации МЦД в присутствии NAC. Б – Изменения флуоресценции нервных терминалей, предварительно загруженных FM1-43 в контроле (из рис. 44), при аппликации МЦД на фоне NAC. Обозначения те же, что и на Рис. 12. Данные представлены среднее значение  $\pm$  стандартная ошибка.

#### 4.3.4 АФК-зависимое увеличение внутриклеточной концентрации $\text{Ca}^{2+}$ под действием МЦД: источники $\text{Ca}^{2+}$

Процессы экзо-эндоцитоза и трафика синаптических везикул в нервных терминалях плотно регулируется цитозольным уровнем  $\text{Ca}^{2+}$ . Внутриклеточный уровень  $\text{Ca}^{2+}$  главным образом определяется его поступлением из окружающей среды через  $\text{Ca}^{2+}$ -каналы поверхностной мембраны и / или выходом из эндоплазматического ретикулаума при активации рианодиновых или инозитол-трифосфатных рецепторов (Зефилов, Петров, 2010; Kaeser, Regehr, 2014).

Возможно, повышенная продукция АФК, вызванная удалением мембранного холестерина, может воздействовать на  $\text{Ca}^{2+}$ -гомеостаз нервной терминали. Действительно, используя флуоресцентный  $\text{Ca}^{2+}$ -индикатор, нами было обнаружено увеличение цитозольного  $\text{Ca}^{2+}$  в регионе нервной терминали при удалении мембранного холестерина (рис. 47 А, Б). К 10 мин действия МЦД флуоресценция Fluo4 достигала  $1.17 \pm 0.02$  ( $p < 0.01$  относительно базовой линии,  $n=8$ ). На фоне действия антиоксиданта

(NAC) возрастание флуоресценции, вызванное МЦД, не происходило, наоборот, наблюдалась тенденция к ее снижению (Рис. 47, А).

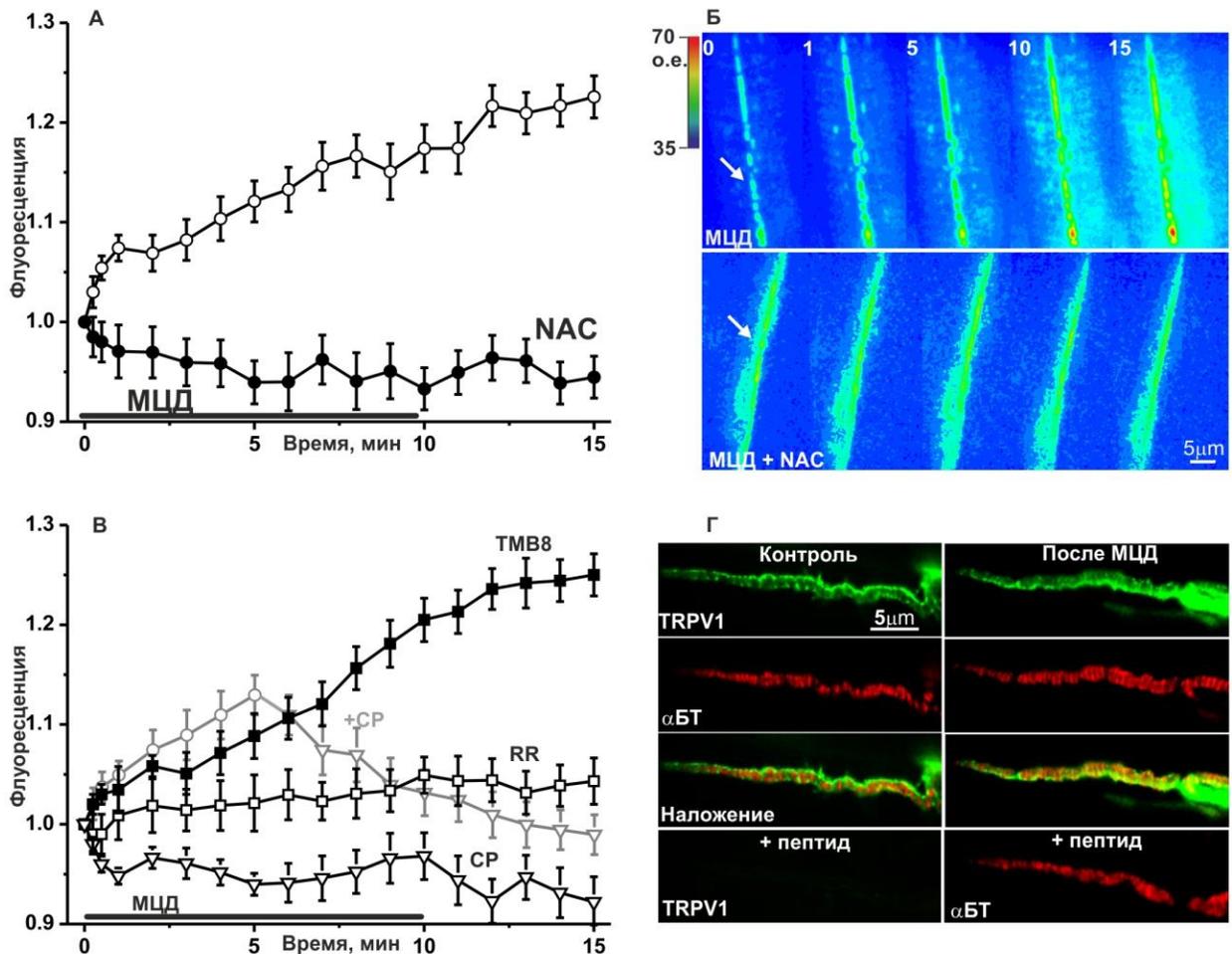


Рис. 47. Эффекты МЦД на цитоплазматический уровень кальция в регионе нервной терминали: зависимость действия МЦД от продукции АФК и кальциевых каналов

А, В – изменения во флуоресценции в нервно-мышечных синапсах под влиянием МЦД (светлые кружочки, А), и при хелатировании АФК с помощью NAC (темные кружочки, А) или ингибирования различных типов кальциевых каналов (В). TMV-8 использовали для ингибирования инозитол трифосфатных и рианодиновых рецепторов в эндоплазматическом ретикулуме (темные квадратики). Рутений красный (RR) апплицировали для ингибирования рианодиновых рецепторов и TRPV каналов (светлые квадратики). TRPV каналы ингибировали капсазепином (светлые треугольники). Серой линией (+CP) обозначены эксперименты, в которых капсазепин был апплицирован через 5 мин после начала действия МЦД. Представлены значения нормированной флуоресценции (начальная флуоресценция до добавления МЦД принята за 1.0).

Рис. 47 (продолжение)

Данные представлены средня  $\pm$  стандартная ошибка. Б – изображения, на которых показана флуоресценция Fluo4 (в псевдоцвете) в моменты времени «0», «1», «5», «10», «15» мин от начала аппликации МЦД в контроле (сверху) и на фоне НАС (снизу). Регионы, соответствующие расположению нервной терминали, отмечены стрелочками. Соответствующая шкала интенсивности показана слева (в о.е.). Г, иммунолокализация TRPV1 каналов в контроле (слева) и в обработанных МЦД (справа) нервно-мышечных препаратах. Флуоресцентные изображения препаратов, меченных одновременно анти-TRPV1 антителами (зеленый канал, вверху) и конъюгированным с родамином  $\alpha$ -бунгаротоксином (красный канал, второй ряд). Изображения в зеленом и красном каналах наложены (наложение) для иллюстрации относительного распределения TRPV1 каналов и постсинаптических ацетилхолиновых рецепторов (третий ряд). Нижний ряд показывает изображения контрольных препаратов, меченных специфичными анти-TRPV1-антителами (слева) и бунгаротоксином (справа), в присутствии специфического иммуногенного пептида.

Через 10 мин флуоресценция составляла  $0.93 \pm 0.02$  ( $p > 0.05$ ,  $n=8$ ). Такая же динамика наблюдалась при действии рутения красного (2 мкМ), эффективно блокирующего в данной концентрации рианодиновые рецепторы (Xu et al. 1999) и TRPV каналы (García-Martínez et al., 2000). При этом к 10 мин воздействия МЦД флуоресценция Fluo4 составляла  $1.05 \pm 0.02$  ( $p > 0.05$ ,  $n=8$ ). Однако применение ТМВ8 (50 мкМ), блокатора рианодиновых и инозитол-трифосфатных рецепторов (Simizu H. et al., 2008), не ослабляло эффект МЦД на флуоресценцию  $Ca^{2+}$ -индикатора (Рис. 47, В). В этом случае флуоресценция к 10 мин возрастала до  $1.20 \pm 0.02$  ( $p < 0.01$ ,  $n=6$ ). Также не угнетало эффект МЦД на  $[Ca^{2+}]_i$  использование ингибитора L-типа  $Ca^{2+}$  каналов 10 мкМ нифедипина (данные не показаны). При этом флуоресценция Fluo4 возрастала до  $1.19 \pm 0.03$  ( $n=5$ ,  $p < 0.01$ ).

Исходя из полученных данных мы предположили, что всплеск продукции АФК под влиянием МЦД стимулирует TRPV-каналы плазматической мембраны, способствуя проникновению  $Ca^{2+}$  в цитоплазму. Данное предположение было проверено в серии экспериментов со специфичным ингибитором TRPV1 каналов - капсазепином (10 мкМ). Капсазепин, не изменяя флуоресценцию Fluo4 в течение 30 мин действия, эффективно

устранял повышение флуоресценции в ответ на истощение мембранного холестерина. При этом через 10 мин воздействия МЦД – флуоресценция составляла  $0.96 \pm 0.02$  ( $p > 0.05$ ,  $n=6$ ). Если добавление капсазефина начиналось через 5 мин после начала действия МЦД (рис. 47, В), дальнейшее увеличение флуоресценции Fluo4 было предотвращено, и флуоресценция постепенно возвращалась к базальному уровню после 11-13 мин ( $p > 0.05$ ,  $n=6$ ).

Для ответа на вопрос - происходит ли генерация АФК вначале, а потом происходит возрастание входа ионов кальция, мы измеряли флуоресценцию  $H_2DCF$  (индикатор АФК) в присутствии ингибитора TRPV1. Капсазепин не предотвращал вызванное МЦД увеличение  $H_2DCF$  флуоресценции, которая после обработки МЦД достигала  $1.19 \pm 0.03$  ( $p < 0.05$ ,  $n=6$ ) от исходной базовой линии (рис. 45, А).

#### **4.3.5 Иммунофлуоресцентное мечение TRPV1-каналов в синаптическом регионе**

Для подтверждения, что TRPV1 каналы экспрессируются в нервно-мышечном синапсе лягушки, мы использовали иммунофлуоресцентное мечение специфичными анти-TRPV1 антителами против внутриклеточного С-концевого домена. Рис. 47, Г показывает иммунофлуоресцентную детекцию TRPV1 каналов в регионе нервной терминали. Флуоресценция имеет неправильный паттерн распределения внутри синаптического региона. Эти флуоресцентные пятна были главным образом локализованы в промежутках между полосками постсинаптических никотиновых ацетилхолиновых рецепторов (меченных  $\alpha$ -бунгаротоксином), что указывает на их расположение в областях около активной зоны (пери-активных зонах). Предобработка МЦД не нарушала окрашивания никотиновых ацетилхолиновых рецепторов, однако иммуномечение TRPV1 каналов расширялось на большие синаптические регионы и перекрытие TRPV1 каналов с полосками постсинаптических рецепторов становилось заметным. Если анти-TRPV1 антитела были применены совместно с блокирующим пептидом, то зеленая флуоресценция нервных терминалей была почти недетектируемой (рис. 47, Г). Средняя интенсивность зеленой флуоресценции была также драматично уменьшена в присутствии блокирующего пептида. Флуоресцентного мечения TRPV1 каналов не наблюдалось, если первичные или вторичные антитела не были добавлены.

Таким образом, иммунофлуоресцентный анализ показывает, что эндогенная экспрессия TRPV1 каналов в нервно-мышечном препарате лягушки неравномерная и преимущественно проявляется в синаптических регионах. Также показано, что обработка МЦД ведет к расширению TRPV1-позитивных регионов.

#### 4.3.6 Повышение внутриклеточного $Ca^{2+}$ опосредует эффекты МЦД на освобождение медиатора и экзоцитоз

Предварительная обработка мембранопроникающей формой высокоаффинного  $Ca^{2+}$  хелатора ВАРТА-АМ (200 мкМ) несколько снижала частоту МТКП (до  $1.1 \pm 0.1$  имп/с,  $p < 0.05$ ,  $n=6$ ) и резко уменьшала эффект МЦД на частоту МПКП (рис. 48, А, Б). К 10 мин действия МЦД частота МТКП составляла  $13.1 \pm 1.6$  имп/с ( $p < 0.01$  по сравнению с контрольным действием МЦД,  $n=6$ ). Схожая ситуация обнаруживалась, когда TRPV1-каналы были блокированы рутением красным или капсазепином (рис. 48, А, Б). Под влиянием рутения красного частота МПКП сильно снижалась до  $0.2 \pm 0.1$  имп/с ( $p < 0.001$ ,  $n=6$ ), и значительно ослаблялся эффект МЦД.

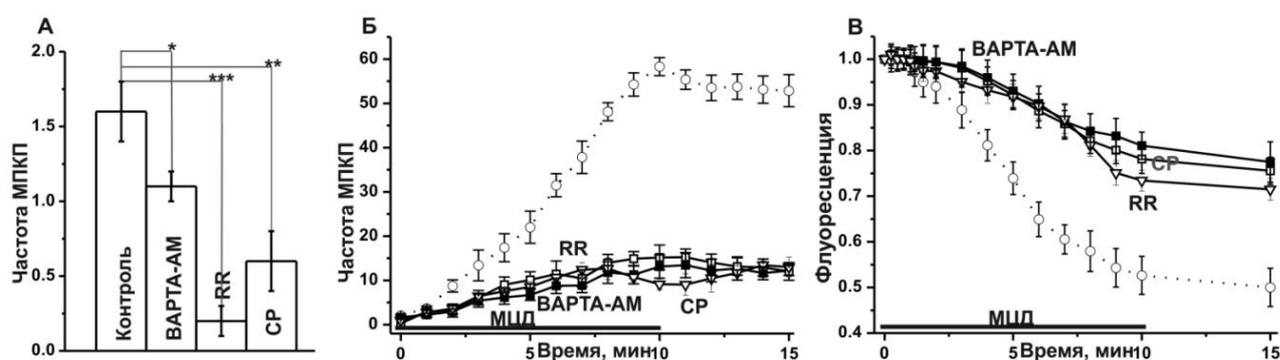


Рис. 48. Роль внутриклеточного кальция в эффектах МЦД на спонтанную секрецию медиатора и экзоцитоз синаптических везикул

А – частота МПКП (Гц) в контрольном растворе и после обработок ВАРТА-АМ, рутением красным, или капсазепином до добавления МЦД. Звездочки указывают достоверность различий (\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ ). Б - Изменение частоты МПКП при 10 мин воздействия МЦД в контроле (из рис. 44, белые кружки, пунктирная линия) и на фоне хелатирования внутриклеточного кальция ВАРТА-АМ (темные квадраты), или ингибирования TRPV каналов рутением красным (RR, светлые треугольники), или капсазепином (СР, светлые квадратики). В – Изменения флуоресценции нервных терминалей, предварительно загруженных FM1-43, при аппликации МЦД в контроле и на фоне хелатирования цитозольного  $Ca^{2+}$  (ВАРТА-АМ), или ингибирования TRPV каналов. Обозначения те же, что и на рис. 44.

В этом случае частота МПКП к 10 мин аппликации МЦД возрастала до  $15.2 \pm 1.7$  имп/с ( $p < 0.01$ ,  $n=6$ ). Капсазепин также снижал частоту МПКП в покое до  $0.6 \pm 0.2$  имп/с и препятствовал ее увеличению в ответ на удаление холестерина (через 10 мин от начала действия МЦД частота возрастала только до  $9.1 \pm 1.3$  имп/с,  $p < 0.01$ ,  $n=6$ ).

Как хелатирование ионов  $Ca^{2+}$ , так и воздействие блокаторов TRPV каналов (рутения красного и капсазепина) замедляет выгрузку FM1-43 (рис. 48, В), вызванную удалением мембранного холестерина. Так, к 10 мин обработки МЦД свечение FM1-43 снижается до  $0.81 \pm 0.03$  ( $p < 0.01$ ,  $n=6$ ) при предварительной экспозиции в ВАРТА-АМ, до  $0.78 \pm 0.03$  ( $p < 0.01$ ,  $n=6$ ) и  $0.73 \pm 0.02$  ( $p < 0.01$ ,  $n=6$ ) на фоне рутения красного и капсазепина, соответственно. Эти значения имеют значительные различия ( $p < 0.01$ ) по сравнению с уменьшением флуоресценции FM1-43 в контроле до  $0.52 \pm 0.04$ . Причем динамика выгрузки на фоне действия ВАРТА-АМ, рутения красного и капсазепина напоминает таковую при нейтрализации действия АФК антиоксидантом.

Возможно, удаление холестерина запускает продукцию АФК и образующиеся молекулы АФК, в свою очередь, активируют TRPV каналы, которые пропускают в цитоплазму  $Ca^{2+}$ , облегчая протекание спонтанного экзоцитоза. Следует отметить, что обработка антиоксидантами и применение  $Ca^{2+}$  антагонистов только частично уменьшают эффекты МЦД на освобождение нейромедиатора и выгрузку FM1-43.

#### **4.3.7 $Ca^{2+}$ зависимое-дефосфорилирование участвует в эффектах истощения мембранного холестерина на спонтанное освобождение и экзоцитоз**

Повышение цитозольного уровня кальция может активировать сигнальные ферменты, вовлеченные в регуляцию процессов экзо- и эндоцитоза синаптических везикул, например, кальциневрин (Зефиоров и др. 2006; Andresen MC et al., 2012; Гайдуков и др. 2013; Cheung, Cousin, 2013; Kaeser, Regehr, 2014; Wong et al., 2014). Ингибирование кальциневрина циклоспорином А (50 мкМ) уменьшало спонтанное освобождение в покое до  $0.7 \pm 0.2$  имп/с ( $n=6$ ,  $p < 0.05$ ) и значительно снижало увеличение частоты МПКП, вызванное удалением холестерина (рис. 49, А). В этих условиях, к 10 мин действия МЦД частота МПКП составила  $22.1 \pm 3.0$  имп/с ( $p < 0.01$ ,  $n=6$ ). Этот же ингибитор замедлял выгрузку FM1-43 (рис. 49, Б), индуцированную удалением холестерина. При этом флуоресценция снижалась до  $0.76 \pm 0.03$  ( $p < 0.01$ ,  $n=8$ ) к 10 мин действия МЦД.

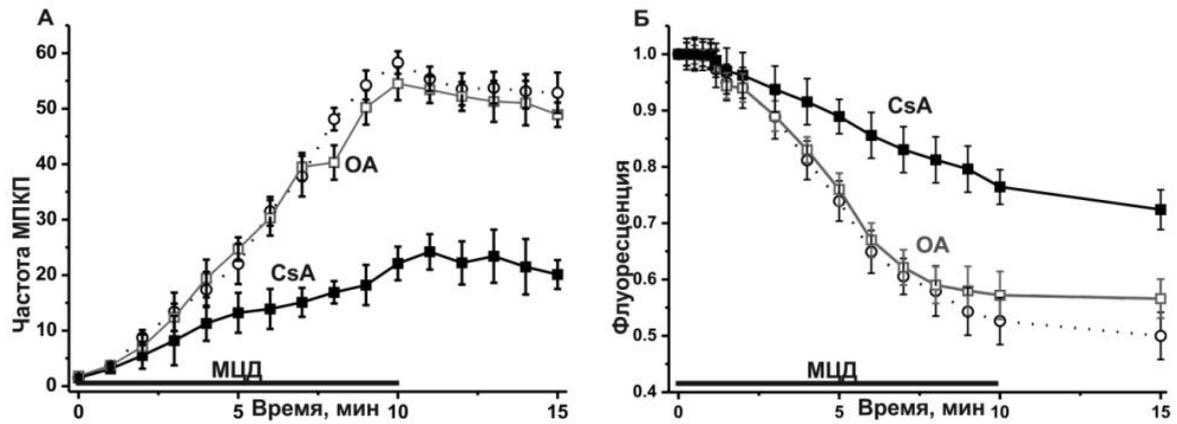


Рис. 49. Участие фосфатаз в эффектах МЦД на спонтанную секрецию медиатора и экзоцитоз синаптических везикул

А – Изменение частоты МПКП, вызванное 10 мин воздействием 10 мМ МЦД в контроле (из рис. 44, белые кружки) и на фоне блокирования циклоспорина А кальциневрина (CsA, темные квадраты), и окадаиковой кислоты фосфатаз PP1 и PP2A (OA, светлые квадраты). Б – Изменения флуоресценции нервных терминалей, предварительно загруженных FM1-43, при аппликации МЦД в контроле (из рис 44, белые кружки) и на фоне циклоспорина А или окадаиковой кислоты. Обозначения те же, что и на рис. 44.

Чтобы проверить, участвуют ли другие фосфатазы в опосредованном удалением холестерина усилении экзоцитоза, была применена окадаиковая кислота, которая в концентрации 50 нМ эффективно ингибирует только фосфатазы PP1 и PP2A, но не кальциневрин (Guatimosim et al., 2002). После 40 мин перфузии раствором с окадаиковой кислотой, частота МПКП была  $1.7 \pm 0.2$  ( $n=6$ ,  $p > 0.05$  по сравнению с контролем). Окадаиковая кислота достоверно не ослабляла увеличения частоты МПКП и не замедляла выгрузку, вызванные 10 мМ МЦД. Когда фосфатазы PP1 и PP2A были ингибированы, к 10 мин действия МЦД частота МПКП увеличивалась до  $54.5 \pm 3.0$  имп/с ( $p < 0.001$  по сравнению с действием циклоспорина А,  $n=6$ ), а флуоресценция FM1-43 снижалась до  $0.57 \pm 0.04$  имп/с ( $p < 0.001$ ,  $n=6$ ). Таким образом, вызванное МЦД повышение цитозольного уровня кальция может активировать кальциневрин, который, дефосфорилируя белки-мишени, способствует протеканию спонтанного экзоцитоза синаптических везикул.

### **4.3.8 Роль протеинкиназы C в индуцированном удалением мембранного холестерина экзоцитозе**

Протеинкиназы C участвуют в регуляции освобождения нейромедиатора во многих типах синаптических контактов (Гайдуков и др. 2012; Sun, Alkon, 2012). Мишенями этих протеинкиназ являются такие ключевые белки экзоцитоза как синаптотагмин, Munc18, SNAP-25, NSF (Leenders, Sheng, 2005). Активация или, наоборот, ингибирование протеинкиназы C могут наблюдаться при удалении мембранного холестерина в разных типах клеток. Истощение холестерина в T-лимфоцитах способствует транслокации протеинкиназы C- $\theta$  к плазматической мембране и ее активации (Kabouridis et al., 2000). Протеинкиназа C $\delta$  активируется в ходе применения статинов (снижающие синтез холестерина агенты) в промиелоцитных клетках (Sassano et al., 2012). С другой стороны, обогащение мембран холестерином вызывает ингибирование токов через KCNQ каналы в нейронах верхнего шейного ганглия, что опосредуется фосфорилированием протеинкиназой C. Этот эффект предотвращается, когда уровень холестерина восстанавливается (Lee et al., 2010). Возможно, холестерин может увеличивать активность протеинкиназы C, модулируя физико-химические свойства мембран (Armstrong, Zidovevetski, 2008). Ряд исследований указывают на возможность вовлечения протеинкиназы C в усиление экзоцитоза, вызванного удалением мембранного холестерина в центральных синапсах (Smith et al., 2010; Teixeira et al., 2012). Для тестирования роли протеинкиназы C в эффектах удаления мембранного холестерина были проведены серии экспериментов с мембранопроникающим пептидом (75 мкМ) - ингибитором протеинкиназы C (который специфично ингибирует кальций- и фосфолипид-зависимую протеинкиназу C в диапазоне концентраций 10-100 мкМ, Eichholtz et al., 1993) и хелеритрин хлоридом (1 мкМ).

#### **4.3.8.1 Эффекты ингибиторов протеинкиназы C на вызванное МЦД увеличение спонтанного освобождения и экзоцитоза**

Оказалось, что ингибирование протеинкиназы C снижало частоту МПКП (до  $0.7 \pm 0.2$  имп/с,  $n=7$ , ингибирующий пептид,  $p < 0.01$ ; до  $1.1 \pm 0.1$  имп/с,  $n=7$  хелеритрин хлорид,  $p < 0.05$ ) в контрольных условиях ( $1.6 \pm 0.2$  имп/с,  $n=7$ ), но драматично не изменяло эффектов МЦД на спонтанную секрецию (рис. 50 А, Б).

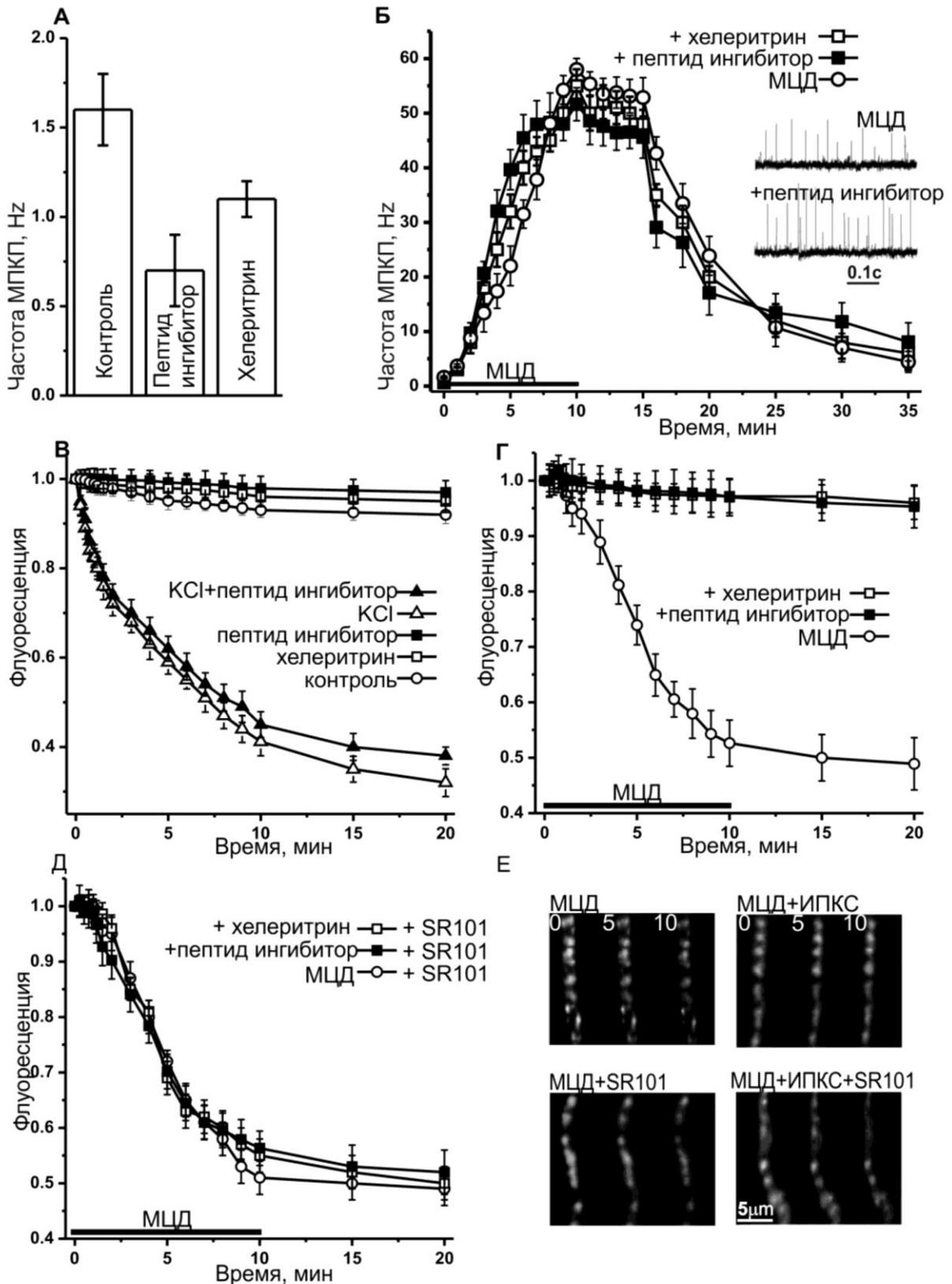


Рис. 50. Эффект истощения холестерина на частоту МПКП и выгрузку FM1-43: участие протеинкиназы С (ПКС)

А – Частота МПКП (в  $s^{-1}$ ) в покое и после экспозиции с ингибиторами ПКС (миристилизованным ингибиторным пептидом и хелеритрин хлоридом).

Рис. 50 (продолжение)

Б – Изменения частоты МПКП ( $\text{с}^{-1}$ ) в ответ на аппликацию МЦД (светлые кружочки) и в условиях действия ингибиторов ПКС (пептида – темные квадратики и хелеритрина – светлые квадратики). Время аппликации МЦД изображено горизонтальным черным сегментом. На вставке показаны примеры треков МПКП из экспериментов, представленных на Б для 5 мин обработки МЦД в контроле и при ингибировании ПКС пептидом. В-Д Уменьшение флуоресценции предварительно загруженных FM1-43 нервных терминалей: В – в контрольных условиях (светлые кружки), в течение инкубации с ингибиторами ПКС (пептидом – темные квадратики и хелеритрином – светлые квадратики), в ответ на аппликацию KCl (40 мМ) в контроле (светлые треугольники), и когда ПКС была блокирована (темные треугольники); Г – в результате обработки МЦД в контроле (светлые кружочки) и в условиях блокады ПКС (пептидом – темные квадратики, или хелеритрином – светлые квадратики); Д – показывает вызванное МЦД снижение FM1-43 флуоресценции (светлые кружки – в контроле, темные и светлые квадратики – при ингибировании ПКС пептидом и хелеритрином, соответственно) в экспериментах, в которых сульфородамин 101 (SR101) присутствовал во внеклеточном растворе. Е - Флуоресцентные изображения сегментов нервной терминали в различное время (0, 5 и 10 мин) в течение обработки МЦД в контроле и при ингибировании ПКС пептидом (ИПКС). Нижняя панель – в присутствии сульфородамина 101 в перфузионном растворе.

При ингибировании протеинкиназы С пептидом / хелеритрин хлоридом МЦД увеличивал частоту МПКП к 5 и 10 мин аппликации до  $39.6 \pm 3.6$  Гц ( $n=7$ ,  $p < 0.001$  по сравнению с исходной изолинией,  $p\# < 0.05$  по сравнению с контрольным действием МЦД) /  $32.0 \pm 3.1$  Гц ( $n=7$ ,  $p < 0.001$ ,  $p\# < 0.05$ ) и  $51.6 \pm 3.0$  Гц ( $p < 0.001$ ,  $p\# > 0.05$ ) /  $55.0 \pm 3.0$  ( $p < 0.001$ ,  $p\# > 0.05$ ), соответственно. Мы тестировали различные концентрации (от 10 до 150 мкМ) пептида-ингибитора ПКС и во всех случаях эффект МЦД проявлялся в виде существенного увеличения частоты МПКП (рис. 51).

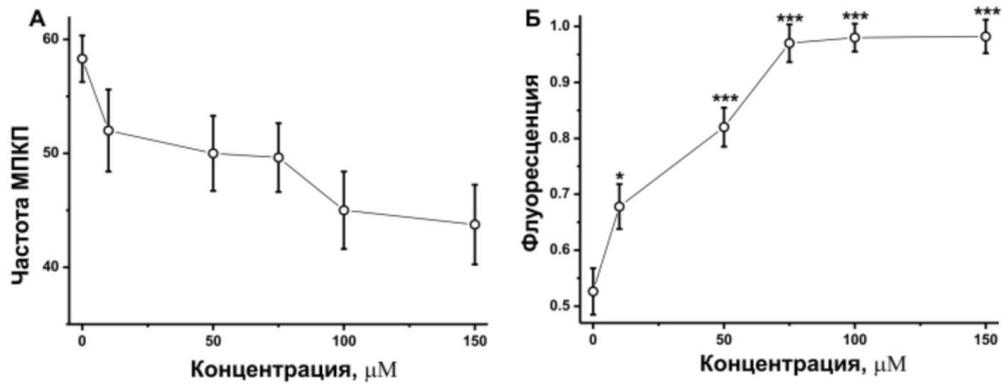


Рис. 51. Зависимость эффектов МЦД на частоту МПКП и выгрузку FM1-43 от дозы пептида ингибитора протеинкиназы С

А – частота МПКП (в с<sup>-1</sup>) к 10 мин действия МЦД, когда протеинкиназа С была блокирована с использованием разных концентраций ингибитора (0, 50, 75, 100 и 150 мкМ). Б – Флуоресценция нервных терминалей, предварительно загруженных FM1-43, после 10 мин аппликации МЦД, в тех же условиях, что и на А. Значение флуоресценции, близкое к 1.0, указывает на нарушение выгрузки. Достоверность показана относительно значения в точке 0 мкМ (то есть в случае, когда ингибитор не использовался) \* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.001$ .

В условиях покоя снижение флуоресценции в нервных терминалях, предварительно загруженных FM1-43, происходит очень медленно, но значительно ускоряется в ответ на аппликацию деполяризующего раствора, содержащего 40 мМ КСl (рис. 50В) и вызывающего массивный экзоцитоз (Зефилов и др. 2003). Это указывает на слабое освобождение красителя в покое посредством спонтанного экзоцитоза. Обработка препаратов ингибиторами протеинкиназы С немного снижает базальную тенденцию к уменьшению флуоресценции в предварительно загруженных нервных терминалях (рис. 50В). Неожиданно, вызванное МЦД снижение флуоресценции подавлялось при ингибировании протеинкиназы С (рис. 50, Г). Так, к 5 и 10 мин действия МЦД флуоресценция снижалась до  $0.98 \pm 0.03$  ( $n=7$ ,  $p > 0.05$  по сравнению с исходным уровнем) /  $0.98 \pm 0.02$  ( $n=7$ ,  $p > 0.05$ ) и  $0.97 \pm 0.03$  ( $p > 0.05$ ; ингибиторный пептид) /  $0.97 \pm 0.03$  ( $p > 0.05$ ; хелеритрин хлорид), соответственно. Если препараты были обработаны пептидом ингибитором протеинкиназы С только в период перед экспозицией с МЦД, то последующая вызванная МЦД выгрузка FM1-43 также была блокирована.

Эффект ингибиторного пептида на вызванную МЦД выгрузку красителя был доза-зависимым, и ингибитор в низких концентрациях (10 и 50 мкМ) имел менее выраженное влияние на уменьшение флуоресценции в ответ на экспозицию с МЦД (рис. 51). Необходимо упомянуть, что ингибирующий протеинкиназу С пептид не изменяет вызванную 40 мМ КСl выгрузку FM1-43 (рис. 50, В; в этих экспериментах тетродотоксин не добавлялся в перфузию). Это указывает на то, что ингибитор протеинкиназы С селективно нарушает только опосредованное МЦД снижение флуоресценции FM1-43.

В присутствии сульфородамина 101 (тушитель свечения FM1-43, обладает малым размерами, может проникать через поры слияния и взаимодействовать с флуоресцирующими молекулами FM1-43) во внеклеточном растворе снижение флуоресценции под влиянием МЦД происходило с одинаковой интенсивностью как в контроле, так и при ингибировании протеинкиназы С (рис. 50, Д, Е). В контроле добавление МЦД в присутствие сульфородамина 101 вызывало снижение флуоресценции до  $0.72 \pm 0.02$  ( $p < 0.001$ ,  $n=7$ ) и  $0.51 \pm 0.03$  ( $n=7$ ,  $p < 0.001$  по сравнению с исходным уровнем) к 5 и 10 мин, соответственно. Достоверных отличий от контрольного действия МЦД не было ( $p > 0.05$ ). В условиях ингибирования протеинкиназы С пептидом / хелеритрин хлоридом флуоресценция составляла  $0.7 \pm 0.03$  ( $p < 0.001$ ,  $n=7$ ) /  $0.69 \pm 0.03$  ( $p < 0.001$ ,  $n=7$ ) и  $0.56 \pm 0.03$  ( $p < 0.001$  относительно исходного уровня) /  $0.55 \pm 0.03$  ( $p < 0.001$  относительно исходного уровня) через 5 и 10 мин действия МЦД (отличий от контрольного действия МЦД нет,  $p > 0.05$ ). То есть сам сульфородамин 101, не влияя достоверно на выгрузку FM1-43, вызванную 10 мМ МЦД в контроле, позволяет «выявить» снижение флуоресценции в препаратах, обработанных ингибиторами протеинкиназы С.

#### **4.3.8.2 Зависимость эффектов МЦД на спонтанное освобождение / экзоцитоз от активности фосфолипазы С**

Активация протеинкиназы С при удалении мембранного холестерина может зависеть от активности фосфолипазы С (Sun, Alkon, 2012). Следует отметить, что ингибиторы фосфолипазы С часто имеют побочные эффекты. Мы тестировали эффекты компаунда 48/80 (100 мкМ, известно, что он ингибирует как фосфолипазу С, так и кальмодулин) и U-73122 (10 мкМ, который более специфично ингибирует сопряжение

G-протеина с активацией фосфолипазы C и гидролиз фосфоинозитидов до инозитол-3-фосфата). Однако, мы обнаружили, что ингибирование фосфолипазы C не приводило к эффектам, наблюдаемым при ингибировании ПКС (рис. 51).

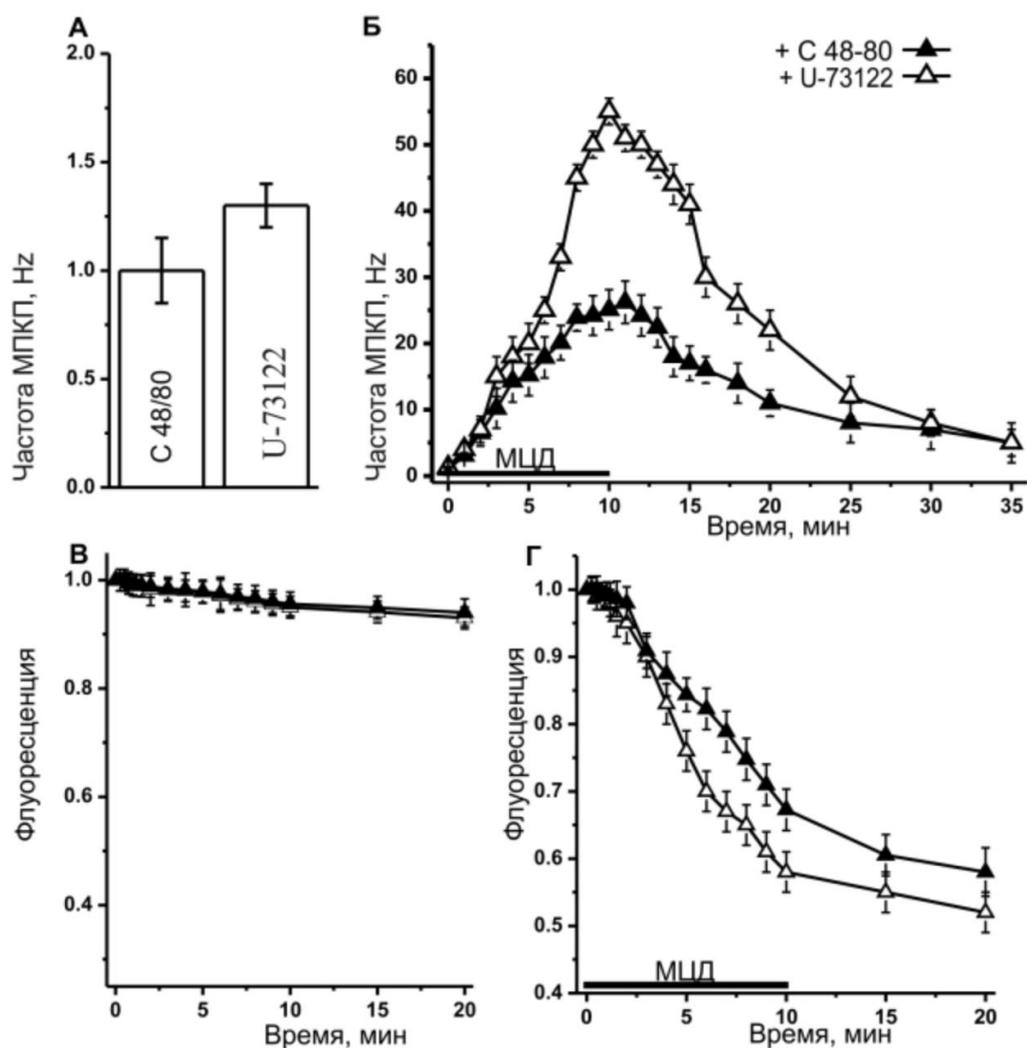


Рис. 52. Участие фосфолипазы C в эффектах удаления мембранного холестерина

А – частота МПКП ( $\text{с}^{-1}$ ) после воздействия ингибиторов фосфолипазы C (компаунда 48/80 и U-73122). Б – Изменения частоты МПКП ( $\text{в} \text{с}^{-1}$ ) в ответ на аппликацию МЦД при ингибировании фосфолипазы C компаундом 48/80 (темные треугольники) и U-73122 (светлые треугольники). В и Г – Уменьшение флуоресценции из предварительно загруженных FM1-43 нервных терминалей: В – в течение периода перфузии раствором с ингибитором фосфолипазы C (компаундом 48/80 - темные треугольник и U-73122 – светлые треугольники), Г – при аппликации МЦД в условиях ингибирования фосфолипазы C (компаундом 48/80 - темные треугольник и U-73122 – светлые треугольники).

Аппликация компаунда 48/80 вела к снижению частоты МПКП (до  $1.0 \pm 0.15$  имп/с,  $p < 0.05$ ) и не влияла на базальную тенденцию к снижению флуоресценции FM1-43. На фоне компаунда 48/80 эффекты МЦД на частоту МПКП и выгрузку FM1-43 были соразмерно (пропорционально) ослаблены. Так, к 5 и 10 мин действия МЦД – частота МПКП возрастала до  $15.2 \pm 3.1$  имп/с ( $n=7$ ,  $p < 0.01$  относительно исходного значения,  $\#p < 0.05$  относительно контрольного действия МЦД) и  $25.1 \pm 3$  имп/с ( $p < 0.001$ ,  $\#p < 0.001$ ), соответственно; тогда как падение флуоресценции FM1-43 происходило до  $0.84 \pm 0.02$  ( $n=7$ ,  $p < 0.01$ ,  $\#p < 0.05$ ) и  $0.67 \pm 0.03$  ( $p < 0.001$ ,  $\#p < 0.001$ ), соответственно. Подобное действие компаунда 48/80 напоминает эффекты ингибиторов пути НАДФН-оксидаза / АФК / TRPV-каналы / кальций / кальциневрин, и может быть связано с блокированием компаундом 48/80 кальмодулина, который необходим для активации кальциневрина.

Обработка U-73122 немного уменьшала частоту МПКП (до  $1.3 \pm 0.1$  имп/с,  $n=7$ ,  $p=0.05$ ) и не имела значительного влияния на вызванное МЦД увеличение частоты МПКП. Так, через 5 и 10 минут экспозиции МЦД частота МПКП достигала  $20.0 \pm 3.1$  имп/с ( $n=7$ ,  $p < 0.01$  относительно исходного значения,  $\#p > 0.05$  относительно контрольного действия МЦД) и  $55.0 \pm 2.0$  имп/с ( $p < 0.001$ ,  $\#p > 0.05$ ). Также динамика базальной флуоресценции FM1-43 и вызванной МЦД выгрузки FM1-43 были одинаковы в контрольных условиях и в обработанных U-73122 препаратах. Флуоресценция FM1-43 уменьшалась до  $0.76 \pm 0.03$  ( $n=7$ ,  $p < 0.01$ ,  $\#p > 0.05$ ) и  $0.58 \pm 0.03$  ( $p < 0.001$ ,  $\#p > 0.05$ ) через 5 и 10 мин аппликации МЦД. Таким образом, более специфичный ингибитор фосфолипазы С не оказывал влияния на эффекты 10 мМ МЦД на спонтанное освобождение ацетилхолина / экзоцитоз.

#### **4.3.9 Механизм холестерина-зависимого контроля спонтанного экзоцитоза синаптических везикул**

МЦД в концентрации 10 мМ широко используется для удаления холестерина и разрушения рафтов (Zamir, Charlton, 2006; Wasser, Kavalali, 2009; Dason et al., 2010, 2014; Smith et al., 2010; Texixeira et al., 2012; Rodrigues et al., 2013). В этой дозе МЦД уменьшает содержание холестерина в мембране на 40-50% (судя по снижению флуоресценции филипина в синаптических регионах), но не имеет эффектов на входное сопротивление мышечных волокон (Zamir, Charlton, 2006; Ormerod et al., 2012) или

кластеризацию никотиновых рецепторов в нервно-мышечных синапсах (Rodrigues et al., 2013).

Концентрация холестерина в мозге является биологической константой и регулируется, в первую очередь, содержанием самого холестерина (Brown, Goldstein, 1986). Однако при некоторых заболеваниях, старении и интенсивной синаптической активности уровень холестерина в синапсах может снижаться (Sodero. et al., 2011). Снижение холестерина может драматично влиять на синаптическую передачу, затрагивая как пресинаптические, так и постсинаптические процессы. В нервно-мышечных синапсах лягушки, мышцы и речного рака, синаптосомах, выделенных их мозга, гиппокампальных и мозжечковых синапсах присутствие холестерина важно для ограничения спонтанного освобождения медиатора и усиления вызванного освобождения (Zamir, Charlton, 2006; Wasser, Kavalali, 2009; Тараканова и др. 2011; Petrov et al., 2010, 2011; Teixeira et al., 2012). Исходя из потребности холестерина для осуществления реакции слияния, лежащей в основе любого типа экзоцитоза синаптических везикул (Tong et al., 2009; Rituper et al., 2012; Puchkov, Haucke, 2013), становится привлекательным предположение о том, что значение холестерина в контроле баланса спонтанного и вызванного экзоцитоза связано с сигнальными путями.

#### **4.3.9.1 Роль пути НАДФН-оксидаза / АФК / TRPV-каналы / кальциневрин**

Тесно связанными с холестерином сигнальными молекулами являются АФК. При этом удаление мембранного холестерина может иметь разнонаправленные эффекты на продукцию АФК (Jin et al., 2011). При истощении холестерина мембран обнаружено усиление активности мембранной НАДФН-оксидазы в клетках проксимальных канальцев почек (Han et al., 2008), а в эндотелиальных клетках аорты обнаружено ослабление образования  $H_2O_2$  под влиянием МЦД (Yang et al., 2006). С другой стороны, в культуре гиппокампальных нейронов крысы потеря холестерина в процессе старения связана с усиленной нейротрансдукцией и повышенной продукцией АФК НАДФН-оксидазой, что ведет к повышению экспрессии фермента холестерин-гидроксилазы (CYP46A1), окисляющий холестерин в 24-гидроксихолестерин, покидающий синаптические мембраны (Sodero et al., 2011). В нашей работе было обнаружено увеличение вне- и внутриклеточной концентрации пероксида водорода при удалении холестерина. Можно думать, что фермент НАДФН-оксидаза синтезирует и выделяет

$H_2O_2$  во внеклеточную среду, который затем поступает в цитозоль клетки (Jin et al., 2011). Это согласуется с нашими неопубликованными иммунофлуоресцентными данными, выявившими наличие одной из форм НАДФН-оксидазы (Nox2) в двигательных нервных окончаниях лягушки. До этого Nox2 изоформа была обнаружена в синапсосамах мышцы, где колокализовалась с белком синаптофизинном, маркирующим синаптические сайты (Tejada-Simon MV et al., 2005). Возможно, продукция АФК происходит неравномерно по длине нервной терминали, в результате формируются локальные «облака» АФК. С помощью окраски маркером  $H_2DCF$  нами было обнаружено увеличение флуоресценции в отдельных регионах нервного окончания, что указывает на существование локальных пулов АФК. Блокирование НАДФН-оксидазы апоцинином и хелатирование АФК с помощью антиоксиданта НАС препятствовало увеличению концентрации АФК при удалении холестерина. При этом на фоне действия антиоксиданта эффект МЦД на спонтанный экзоцитоз был существенно снижен.

Повышенная продукция АФК может воздействовать на многочисленные клеточные процессы, в том числе, напрямую влиять на сборку SNARE-комплекса, угнетая вызванный экзоцитоз (Giniatullin et al., 2005, 2006, 2015; Tsentsevitsky et al., 2011). Мы попытались обратить внимание на те мишени АФК, которые могут стимулировать спонтанный экзоцитоз. АФК могут влиять на  $Ca^{2+}$ -каналы возбудимых клеток, в том числе рианодиновые рецепторы, освобождающие  $Ca^{2+}$  из эндоплазматической сети, и TRPV-каналы, пропускающие ионы кальция из внешней среды в цитоплазму (Song et al., 2011). В нервно-мышечных синапсах лягушки потенциал-зависимые  $Ca^{2+}$ -каналы расположены около рианодиновых рецепторов внутриклеточных депо, и высокочастотная стимуляция запускает  $Ca^{2+}$ -вызванное освобождение  $Ca^{2+}$ , которое способствует асинхронному освобождению (Narita et al., 2000). Однако, в другом исследовании блокирование освобождения  $Ca^{2+}$  из эндоплазматической сети оказывало минимальный эффект на пресинаптический  $Ca^{2+}$ -сигнал и асинхронную секрецию, указывая на несущественное значение выделения  $Ca^{2+}$  из внутриклеточных депо (Carter et al., 2002). В пресинаптических терминалах С-волокон в ядре одиночного пути имеются TRPV1 каналы, вход кальция при активации которых избирательно усиливает спонтанный и подавляет синхронный экзоцитоз синаптических везикул (Andersen et al., 2012). Применение тетра-бутил-гидропероксида, как донора АФК, значительно увеличивает частоту спонтанных возбуждающих

постсинаптических сигналов в нейронах желатинозной субстанции, и это усиление подавляется антагонистом TRPV1 каналов (капсазепином) (Nishio et al., 2013). Ранее иммуногистохимически было показано, что в двигательных нервных терминалях мышцы экспрессируются TRPV1 каналы (Thyagarajan et al. 2009), активация которых может подавлять вызванную секрецию (Thyagarajan et al. 2014). В данном исследовании иммунофлуоресцентный анализ показал, что в нервных терминалях лягушки экспрессируются TRPV1 каналы, причем преимущественно в регионе вокруг активных зон, лежащих напротив кластеров (в виде полосок) постсинаптических ацетилхолиновых рецепторов (Robitaille et al., 1996). Более того, распределение TRPV1 каналов становилось более широким после удаления холестерина. Это может отражать нарушение кластеризации каналов и / или встраивания дополнительных каналов в плазматическую мембрану в результате экзоцитоза синаптических везикул, содержащих TRPV1 каналы (Goswami et al., 2010).

Нами было обнаружено увеличение цитоплазматического уровня ионов кальция при удалении холестерина, которое не происходило на фоне антиоксиданта и угнеталось при ингибировании TRPV каналов. При этом на фоне как хелатирования ионов  $Ca^{2+}$ , так и блокирования TRPV каналов существенно снижалось опосредуемое МЦД усиление спонтанного экзоцитоза. Все эти данные указывают на то, что мембранный холестерин в естественных условиях сдерживает продукцию АФК и, таким путем, препятствует активации TRPV каналов плазматической мембраны, вход кальция через которые усиливает спонтанный экзоцитоз синаптических везикул.

В предыдущих исследованиях было обнаружено, что экзогенная аппликация  $H_2O_2$  в низких микромолярных концентрациях не влияла на частоту МТКП, а в высоких (100-300 мкМ) - угнетала частоту МТКП в нервно-мышечном контакте лягушки (Giniatullin, Giniatullin, 2003). Последнее может быть связано с влиянием экзогенной АФК непосредственно на белки экзоцитоза (в частности, SNAP-25), что угнетает их функциональную активность (Giniatullin et al., 2006). Можно думать, что при удалении мембранного холестерина эффективная концентрация АФК создается только в определенных областях, где локализуются TRPV каналы. Не исключено, что при нормальном содержании холестерина TRPV каналы обладают слабой чувствительностью к АФК, тогда как истощение холестерина вызывает повышение их чувствительности (Levitan et al., 2014). Так, в НЕК-клетках, экспрессирующих TRPV1-

каналы, обогащение холестерином (но не его диастереоизомером эпихолестерином) приводило к ингибированию токов через TRPV1 каналы, вызванных капсаицином (Picazo-Juarez et al., 2011).

Следует отметить, что мы обнаружили только транзиторное увеличение АФК вслед за аппликацией МЦД (главным образом, в первые 5 мин экспозиции), тогда как внутриклеточный кальций и спонтанный экзоцитоз продолжали возрастать в течение всего периода аппликации МЦД. Это предполагает, что АФК требуются только в начальной фазе, но не впоследствии. Возможно, однажды повысившись, АФК активируют TRPV каналы, которые продолжают опосредовать увеличение цитозольного кальция в последующий период. Это подтверждается уменьшением уровня цитозольного кальция после острого добавления блокатора TRPV каналов в течение периода действия МЦД. Скоротечный всплеск АФК может увеличивать чувствительность TRPV1 каналов через ковалентную модификацию цистеинов, что вызывает стойкую модуляцию их активности (Chuang, Lin, 2009). Однако временной профиль внутриклеточной динамики кальция не точно соответствует динамике освобождения нейромедиатора (в первые несколько минут после обработки МЦД, кальций продолжает немного возрастать, а освобождение нейромедиатора не изменяется значительно), что указывает на существование других факторов наряду с цитозольным кальцием, которые определяют освобождение нейромедиатора, вызванное удалением холестерина. В дополнение, увеличивающийся цитозольный кальций может замедлять или ингибировать эндоцитоз синаптических везикул (von Gersdorff, Matthews, 1994; Leitz, Kavalali, 2011). Также длительная обработка МЦД может нарушать эндоцитоз и рециклирование синаптических везикул, уменьшая размер пула везикул, способных к повторному экзоцитозу (Петров и др. 2009; Dason et al., 2010; Petrov et al., 2011).

В ряде работ была показана зависимость эффектов удаления мембранного холестерина от активности протеинкиназ, в частности протеинкиназ А и С, кальмодулин-зависимой протеинкиназы (Smith A.J. et al., 2010; Teixeira et al., 2012). Однако роль кальций / кальмодулин активируемой фосфатазы кальциневрина в усилении спонтанного экзоцитоза при удалении холестерина не была исследована. Кальциневрин (фосфатаза PP2B) способен дефосфорилировать белки, вовлеченные в пресинаптический везикулярный цикл (динамин, амфифизин, синаптоянин, эпсин, Eps15, Arf6, фосфоинозитол-5-киназу), и участвует в запуске эндоцитоза (Geung, Cousin

2013) и контроле экзоцитоза (Jensen, Edwards, 2012; Marra et al., 2012; Гайдуков и др. 2013; Wong et al., 2014). Возможность зависимой от TRPV1 каналов активации кальциневрина была обнаружена в пресинаптических нервных окончаниях гиппокампа, где кальциневрин индуцировал долговременную депрессию (Jensen, Edwards, 2012), и двигательных нервных терминалях *Drosophila* (Wong et al., 2014). В нашем исследовании оказалось, что на фоне ингибирования кальциневрина усиление экзоцитоза при удалении холестерина было существенно меньше. В то время как омега-3 жирная кислота (в наномолярной концентрации, блокирующая фосфатазы PP1 и PP2A) не изменяла эффекты МЦД. Следовательно, именно активность кальциневрина важна для поддержания протекания спонтанного экзоцитоза на высоком уровне при снижении содержания холестерина в мембране. Возможно, активация кальциневрина увеличивает количество везикул, вовлекающихся в индуцируемый удалением холестерина экзоцитоз. В гиппокампальных синапсах ингибирование кальциневрина резко снижало фракцию функционирующих синаптических везикул (Marra et al., 2012), а нокаут гена кальциневрина увеличивал размер «отдыхающего» (резервного) пула, который не участвует в синаптической передаче в обычных условиях (Kim, Ryan, 2010). Другая возможность заключается в том, что активность кальциневрина требуется для эффективного протекания эндоцитоза с образованием функциональных везикул, имеющих высокую способность к слиянию (Rose et al., 2013).

Таким образом, можно предположить существование следующего каскада событий, участвующего в поддержании высокого уровня спонтанной секреции и экзоцитоза при истощении мембранного холестерина. Удаление мембранного холестерина активирует НАДФН-оксидазу, синтезирующую АФК, которые воздействуют на TRPV каналы, впускающие кальций в цитозоль. Кальций связывается с кальмодулином и активирует фосфатазу кальциневрин, дефосфорилирующую белки, вовлеченные в поддержание спонтанного экзоцитоза. Для поддержания высокого уровня экзоцитоза необходима соответствующая доставка синаптических везикул в сайты экзоцитоза и компенсаторный эндоцитоз. Возможно, активация кальциневрина способствует протеканию этих этапов везикулярного цикла (рис. 53).

Следует отметить, что при всех используемых воздействиях усиление экзоцитоза при истощении мембранного холестерина полностью не устранялось. Так, на фоне антиоксиданта,  $Ca^{2+}$ -хелатора, рутения красного, капсазепина и циклоспорина А

эффекты МЦД на частоту МПКП и выгрузку красителя ослаблялись на 65-75%. Это указывает на существование параллельно функционирующего механизма (или механизмов), усиливающего экзоцитоз при снижении уровня мембранного холестерина. Возможно, свой вклад в эффекты удаления холестерина вносят изменения биофизических свойств мембран и поры слияния, динамики цитоскелета, активности белков механизма слияния, протеинкиназ и фосфолипаз, малых ГТФаз и др. (Zamir, Charlton, 2006; Wasser, Kavalali, 2009; Smith et al., 2010; Teixeira G et al., 2012; Hissa et al., 2013; Petrov et al., 2014, 2015).

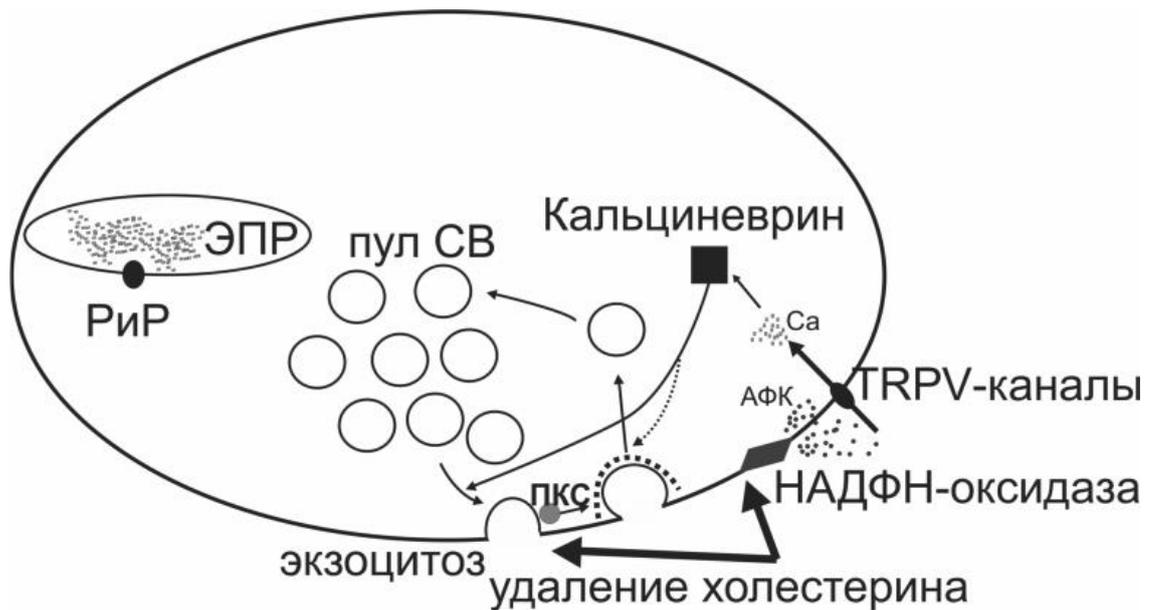


Рис. 53. Предполагаемый АФК-зависимый путь воздействия удаления холестерина на спонтанный экзоцитоз синаптических везикул

Снижение уровня мембранного холестерина усиливает активность мембранного фермента НАДФН-оксидазы, которая продуцирует АФК. В результате содержание АФК увеличивается как во вне-, так и во внутриклеточной среде. Это ведет к активации TRPV каналов плазматической мембраны, которые впускают кальций в цитоплазму. Повышение цитоплазматического кальция способствует поддержанию спонтанного экзоцитоза на повышенном уровне. Кальций может активировать фосфатазу кальциневрин, которая, дефосфорилируя белки, участвующие в везикулярном цикле, способствует вовлечению синаптических везикул в спонтанный экзоцитоз и облегчает эндоцитоз. Следует оговориться, что обнаруженный механизм функционирует наряду с другими, поскольку удаление холестерина потенцирует спонтанный экзоцитоз, хотя и значительно слабее, и при блокаде элементов пути НАДФН-оксидаза – АФК – TRPV-каналы –  $\text{Ca}^{2+}$  – кальциневрин.

Следует отметить, что усиление спонтанного экзоцитоза наблюдается только при значительном истощении холестерина (10 мМ МЦД). В естественных условиях такое может происходить при сверхвысокой синаптической активности. Следовательно, активация пути НАДФН-оксидаза / АФК / TRPV1 каналы, обнаруженная нами при удалении мембранного холестерина, может быть показателем усиленной нейротрансмиссии. Последующая интенсификация спонтанного экзоцитоза может ограничивать вызванную синаптическую передачу через истощение запаса синаптических везикул, десенситизацию рецепторов и ингибирование белкового синтеза в синапсе (Kavalali, 2015). Возможно, таким путем может формироваться холестерин-зависимая отрицательная обратная связь, способная угнетать вызванный экзоцитоз, усиливая спонтанный экзоцитоз.

#### **4.3.9.2 Связь механизма экзоцитоза, вызванного удалением холестерина, с активностью протеинкиназы С**

Предполагается, что протеинкиназа С вовлечена в вызванное МЦД усиление спонтанного экзоцитоза в мозжечковых синапсах и синаптосомах (Smith et al., 2010; Teixeira et al., 2012). Однако при ингибировании протеинкиназы С с помощью мембранопроникающего пептида или хелеритрин хлорида драматического изменения эффектов МЦД на частоту МПКП не было обнаружено. Только в начальный период действия МЦД (до 7-8 мин) частота МПКП увеличивалась быстрее, когда протеинкиназа С была блокирована. Неожиданные результаты дали эксперименты с FM1-43, которые указали на отсутствие выгрузки маркера, несмотря на повышенную частоту МПКП. Это можно объяснить, если предположить протекание секреции медиатора по механизму kiss-and-run, при котором между везикулой и пресинаптической мембраной формируется скоротечная белковая пора, непроницаемая для молекул красителя, но свободно пропускающая молекулы нейромедиатора (Петров и др. 2013). Гипотетически, kiss-and-run путь может обеспечивать более быстрое усиление спонтанного освобождения после аппликации МЦД, что мы и наблюдали при ингибировании протеинкиназы С. Для проверки этой гипотезы было использовано вещество сульфородамин 101, которое, обладая малыми размерами и гидрофильностью, может проникать через пору слияния и тушить флуоресценцию FM1-43 (Winterer et al., 2006; Петров и др. 2013). Действительно, в присутствии сульфородамина 101 во

внеклеточном растворе снижение флуоресценции под влиянием МЦД происходило с одинаковой скоростью, как в контроле, так и при ингибировании протеинкиназы С. Хотя сам сульфородамин101 не влиял на выгрузку FM1-43, вызванную 10 мМ МЦД. Таким образом, можно предположить, что активность протеинкиназы С при удалении мембранного холестерина необходима для протекания процессов «полного» экзоцитоза, сопровождающегося встраиванием везикулярной мембраны в пресинаптическую. Возможно, в этом случае протеинкиназа С действует через фосфорилирование белков экзоцитоза (например, SNAP-25 и Munc18 (Leenders, Sheng, 2005)) или прямое взаимодействие с этими белками. Интересно отметить, что в недавнем нашем исследовании kiss-and-run механизм освобождения медиатора начинали использовать везикулы рециклирующего пула после ферментативного окисления небольшой части мембранного холестерина (Петров и др. 2013). Это еще раз указывает на роль холестерина в регуляции типа экзоцитоза синаптических везикул.

Протеинкиназа С может активироваться диацилглицеролом (продукт расщепления фосфолипидов фосфолипазой С), кальцием, активными формами кислорода и другими факторами (Гайдуков и др. 2012; Sun, Alkon, 2012). Для тестирования значения фосфолипазы С в эффектах МЦД, мы использовали компаунд 48/80, ингибитор фосфолипазы С и кальмодулина, и U-73122. Эффекты МЦД на частоту МПКП и выгрузку красителя были пропорционально ослаблены компаундом 48/80 и не изменялись U-73122. В случае применения компаунда 48/80, наблюдаемые эффекты могут быть связаны с ингибированием кальмодулина, который участвует в эффектах МЦД на спонтанный экзоцитоз. Подобные результаты были получены в наших предыдущих экспериментах, когда внутриклеточный кальций был хелатирован или ингибировали кальций-кальмодулин зависимую фосфатазу 2В, кальциневрин (Petrov et al., 2014). Таким образом, тип вызванного МЦД экзоцитоза (полный или kiss and run) определяется кальций- и фосфолипаза С-независимой активацией протеинкиназы С. Следует отметить, что поскольку ингибирование продукции АФК и антиоксидант не имели аналогичного ингибиторам протеинкиназы С эффекта на вызванное МЦД усиление спонтанного экзоцитоза, то, следовательно, активация протеинкиназы С при действии МЦД происходит АФК-независимо. Удаление холестерина может вести к усилению kiss-and-run экзоцитоза, но одновременная активация протеинкиназы С переводит экзоцитоз в «полный» вариант (рис. 53). Это согласуется с недавно

полученными данными о том, что снижение уровня холестерина способствует увеличению длительности полуслившегося состояния у праймированной везикулы и препятствует, таким путем, быстрому слиянию (Kreutzberger et al., 2015). Дальнейшие эксперименты требуются для идентификации детального механизма этого феномена и задействованной специфической изоформы протеинкиназы C. Существует более десятка форм протеинкиназ C, ряд из них не требуют кальция для своей активации и располагаются в связи с мембраной в неактивном состоянии. Возможно, удаление холестерина вызывает переход одной из изоформ протеинкиназ C в активное, не связанное с мембраной состояние, что не зависит от  $Ca^{2+}$ , фосфолипазы C и АФК (Petrov et al., 2015).

#### **4.4 Холестерин и невезикулярное освобождение нейромедиатора в нервно-мышечном синапсе крысы. Связь невезикулярного освобождения с процессами экзо- и эндоцитоза**

Помимо освобождения нейромедиатора из синаптических везикул в ходе экзоцитоза, существует невезикулярное освобождение нейромедиатора, которое участвует в модуляции чувствительности постсинаптических рецепторов, везикулярной секреции, развития и регенерации синаптических контактов, а также уровня мембранного потенциала покоя (Vizi, Vyskocil, 1979; Urazaev et al., 2000; Malomouzh et al., 2003). Значение холестерина в невезикулярном освобождении нейромедиатора слабо изучено. В данной главе, мы с помощью электрофизиологических, оптических и биохимических подходов исследовали влияние удаления холестерина 1 мМ МЦД на невезикулярное освобождение ацетилхолина в нервно-мышечных синапсах крысы. Поскольку процессы невезикулярного и везикулярного освобождения могут быть сопряжены между собой, попутно, мы проверили значение холестерина в процессах вызванного экзоцитоза и эндоцитоза в нервно-мышечных синапсах крысы (Petrov et al., 2011).

##### **4.4.1 Влияние 1 мМ МЦД на спонтанное освобождение и вызванную секрецию медиатора при редкой и высокочастотной стимуляции**

В начале каждого эксперимента двигательные нервы стимулировали (с низкой частотой 0.05 Гц) сверхпороговыми стимулами. Амплитуда ТКП флуктуировала в

течение первых 5-6 мин стимуляции и затем стабилизировалась на постоянном уровне. Перфузия 1 mM МЦД вызывала уменьшение амплитуды ТКП, которая стабилизировалась через 20 мин воздействия МЦД на уровне  $80.0 \pm 2.8\%$  ( $n=5$ ,  $p<0.05$ ) по сравнению со значением до аппликации (Рис. 54, А, Б). Обработка 1 mM МЦД не вызывала изменений амплитуды и частоты МТКП (Табл. 2).

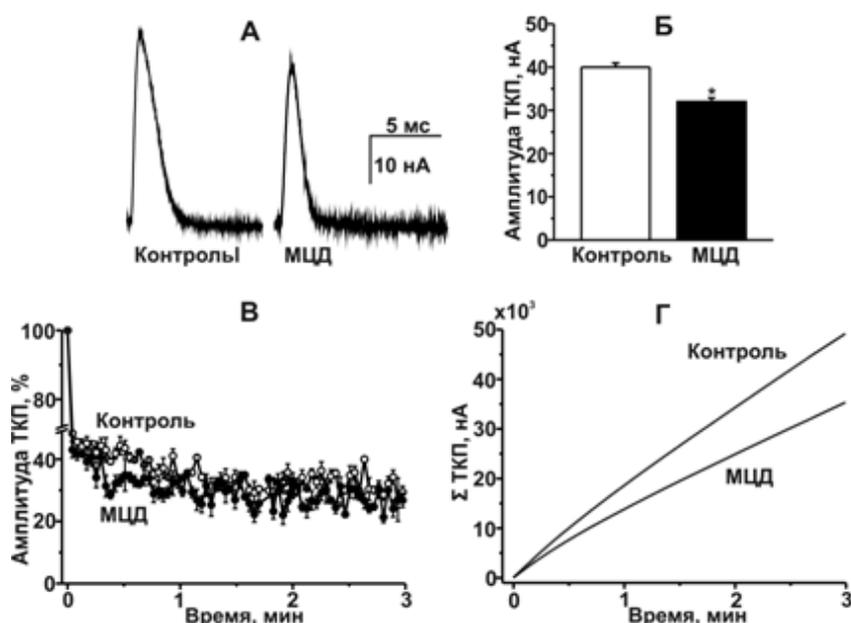


Рис. 54. Эффект 1 mM метил-β-циклодекстрина (МЦД) на амплитуду токов концевой пластинки (ТКП), вызванных низкочастотной (А, Б) и высокочастотной стимуляцией (В, Г) двигательного нерва

А – представлены ТКП, вызванные сверхпороговой стимуляцией с частотой 0.05 Гц, после того как их амплитуда стабилизировалась на постоянном уровне (контроль) и после 30 мин аппликации 1 mM МЦД. Б – Амплитуды ТКП в контроле и после обработки МЦД при одиночной стимуляции. Статистически достоверно ( $p<0.05$ ) МЦД уменьшает амплитуду ТКП по сравнению с контролем. В – Изменение амплитуды ТКП в течение высокочастотной стимуляции (20 Гц) двигательного нерва. Видно, что после начального быстрого падения амплитуда стабилизируется и сохраняется приблизительно на одном уровне в течение оставшегося периода стимуляции (светлые кружки). После периода покоя нервно-мышечные препараты перфузировались в течение 30 мин раствором с МЦД и затем повторно стимулировались с высокой частотой в присутствии МЦД (темные кружочки). На графике показана амплитуда (в процентах от первого ТКП в начале эпизода стимуляции) каждого 70-го ТКП  $\pm$  стандартная ошибка. Г – Кумулятивные амплитуды ТКП (сумма амплитуд ТКП).

Рис. 54 (продолжение)

Разница в наклонах кривых указывает на снижение амплитуд ТКП под воздействием обработки МЦД при ритмической стимуляции (20Гц).

Табл. 2. Амплитуда и частота миниатюрных токов концевой пластинки (МТКП) в контроле и после аппликаций реагентов (Petrov et al., 2011)

	Амплитуда МПКП, нА	Частота МПКП, с <sup>-1</sup>
Контроль	0.93±0.04	1.40±0.05
МЦД	0.92±0.03	1.36±0.07
Везамикол	0.94±0.04	1.45±0.08
Пропионат натрия	0.90±0.04	1.61±0.08

В таблице значения представлены среднее ± стандартная ошибка, n=5 для каждого среднего (n - количество разных животных). Все измерения были выполнены через 30 мин инкубации в контрольном растворе или растворе с 1мМ МЦД, или 10 мкМ везамикола, или 40 мМ пропионата натрия. Потенциал удерживался на уровне – 55 мВ. Критерий one-way ANOVA не выявил статистических различий между группами.

Как показано на рис. 54, В высокочастотная стимуляция двигательного нерва в течение 3-х мин приводила к закономерным изменениям амплитуды ТКП: короткий период быстрого снижения амплитуды, сменялся длительным стационарным периодом, когда амплитуда оставалась относительно постоянной. Так, амплитуда ТКП снижалась на 54.6±2.4% от исходного значения уже после 0.3 с высокочастотной стимуляции и на 67.8±2.2% (n=6) к концу 3-ей мин стимуляции. Подобные изменения амплитуды ТКП наблюдались, когда препараты были стимулированы с высокой частотой после 30 мин аппликации 1мМ МЦД (рис. 54, В).

Для оценки количества квантов ацетилхолина, освобожденных из двигательных нервных окончаний в процессе высокочастотной стимуляции в контроле и после обработки МЦД, использовали метод «кумулятивных амплитуд ТКП» (описан подробно в Петров и др. 2008; Petrov A.M. et al., 2008). Сравнение значений этих амплитуд к концу 3-ей мин высокочастотного раздражения указывает на снижение примерно на 27% освобождения нейромедиатора в синапсах, предварительно подвергнутых действию МЦД, по сравнению с контрольными препаратами (рис. 54, Г).

#### 4.4.2 Протекание эндо- и экзоцитоза синаптических везикул после частичного удаления мембранного холестерина

Загрузка FM2-10. В контроле и в случае предварительной обработки МЦД загрузка осуществлялась с помощью второго эпизода стимуляции 20 Гц 3 мин, первый стимуляционный шлейф подавался в период аппликации МЦД (рис. 55, А:б). В контрольных экспериментах (рис. 55, А: а) интенсивность флуоресценции в загруженных FM2-10 (с помощью стимуляции 3 мин 20 Гц) нервных терминалях была  $158 \pm 4$  о.е. ( $n=7$ , принято за 100%). Флуоресценция была примерно на 88% ниже,  $19 \pm 2$  о.е. ( $n=7$ ,  $p < 0.0001$ ; рис. 55, Б, В) в нервных окончаниях предварительно обработанных МЦД за 30 мин до загрузки FM2-10 (рис. 55, А: б). В этих экспериментах в течение 3-х мин после аппликации МЦД препарат интенсивно промывался. Увеличение периода отмывки до 20 мин между аппликациями МЦД и FM2-10 не изменяла результатов эксперимента. Действительно, интенсивность флуоресценции в этих условиях была примерно на 86% ниже, чем в контроле ( $n=5$ ,  $p < 0.001$ ) и не отличалась ( $p > 0.05$ ) от результатов экспериментов с короткой (3 мин) продолжительностью отмывки от МЦД.

Яркость флуоресценции была только примерно на 20% ниже контрольного значения ( $126 \pm 3$  о.е.,  $n=6$ ,  $p < 0.01$ ), если нервно-мышечные препараты не стимулировались в течение обработки МЦД. Это хорошо согласуется с электрофизиологическими данными о снижении вызванного освобождения медиатора в ходе высокочастотной стимуляции в предварительно обработанных МЦД препаратах (рис. 54, Г).

В целом, результаты указывают на то, что обработка МЦД во время стимуляции вызывает значительные и стойкие изменения в эндоцитозе синаптических везикул в нервно-мышечных синапсах крысы. В этом случае мембраны синаптических везикул, встроенные в пресинаптическую мембрану, оказываются подверженными холестерин-экстрагирующему действию МЦД, присутствующему во внеклеточном растворе. Эти данные согласуются с результатами, полученными в экспериментах на нервно-мышечных синапсах лягушек (Петров А.М. и др. 2009, Petrov A.M. et al., 2010), плодовых мушек (Dason et al., 2010) и центральных синапсах (Yue, Xu, 2015), где была показана важность холестерина синаптических везикул для протекания эндоцитоза и рециклирования.

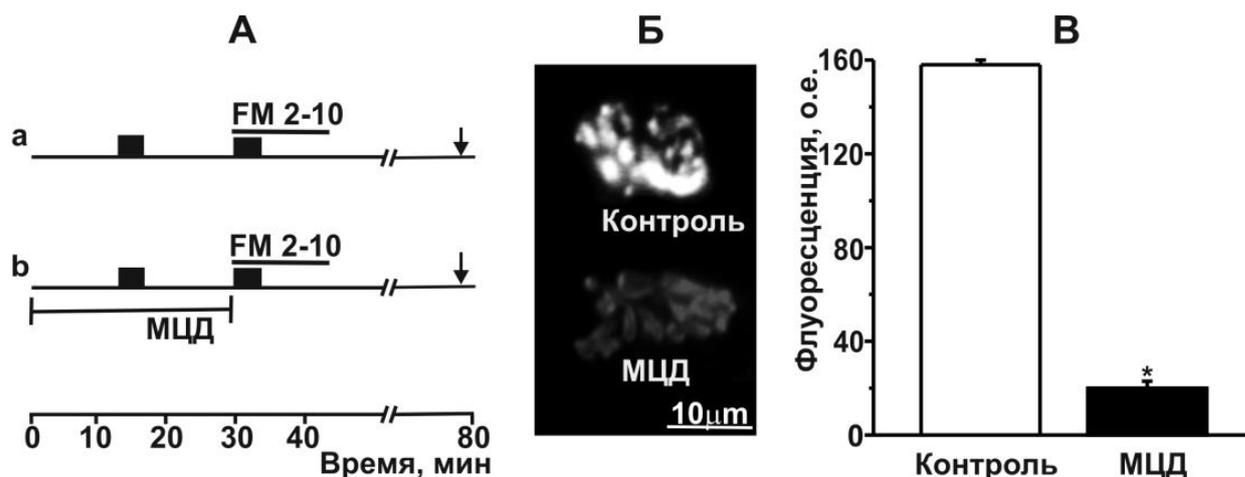


Рис. 55. Эффект 1 мМ метил-β-циклодекстрина (МЦД) на эндоцитоз синаптических везикул в двигательных нервных окончаниях

А – показан дизайн экспериментов. Нервы препаратов стимулировались в течение 3-х мин с частотой 20 Гц, начиная с 12 мин инкубации в нормальном физиологическом растворе (первый черный столбик, а-контроль) и в растворе с МЦД (б). После 30 мин инкубации в МЦД препараты промывались в течение 3-х мин физиологическим раствором, затем перфузировались физиологическим раствором с FM2-10 и стимулировались второй раз в течение 3 мин с частотой 20 Гц (второй черный столбик) для загрузки красителя в нервные терминалы. Присутствие FM2-10 в ванночке (в течение 13 мин) изображено верхней горизонтальной чертой, а эпизоды ритмической стимуляции – черными столбиками. Измерение флуоресценции (захват изображений показан стрелочками справа) производилось после 30 мин периода отмывки препарата физиологическим раствором для уменьшения фоновой флуоресценции поверхностных мембран. Б – Флуоресцентные изображения нервных терминалей, загруженных FM2-10. Очевидно снижение флуоресценции в нервных терминалях препаратов, обработанных МЦД, по сравнению с контрольными препаратами. В – Интенсивность флуоресценции была примерно на 88% ниже в подвергнутых действию МЦД препаратах относительно контрольных. Звездочка (\*) указывает на статистическую разницу между контрольной и обработанной МЦД группами на уровне  $p < 0.001$ .

Выгрузка красителя. В загруженных FM2-10 нервных терминалях последующая высокочастотная стимуляция (3 мин 20 Гц) двигательного нерва в отсутствие красителя в ванночке (как показано на рис. 56, А) вызывала моно-экспоненциальное уменьшение

интенсивности флуоресценции нервных окончаний в контроле и в обработанных МЦД препаратах. Анализ с помощью критерия repeated-ANOVA выявил существенное отличие динамик выгрузки ( $p < 0.001$ ). В контроле снижение флуоресценции было уже достоверным к 10 с стимуляции ( $p < 0.001$ ), и флуоресценция уменьшалась на 38% ( $p < 0.001$ ,  $n=6$ ) к концу 3 мин стимуляции, по сравнению со значением до стимуляции. В обработанных МЦД препаратах снижение флуоресценции также было значимым уже к 10 с ( $n=5$ ,  $p < 0.05$ ), и к концу 3 мин стимуляции флуоресценция снижалась только на 28% ( $p < 0.001$ ), по сравнению с уровнем до начала раздражения. Падение флуоресценции было достоверно ( $p < 0.001$ , на рис. 56Б обозначено звездочками) медленнее к 45 с стимуляции в обработанных МЦД препаратах (по сравнению с контрольными), и разница увеличивалась по мере продолжения стимуляции.

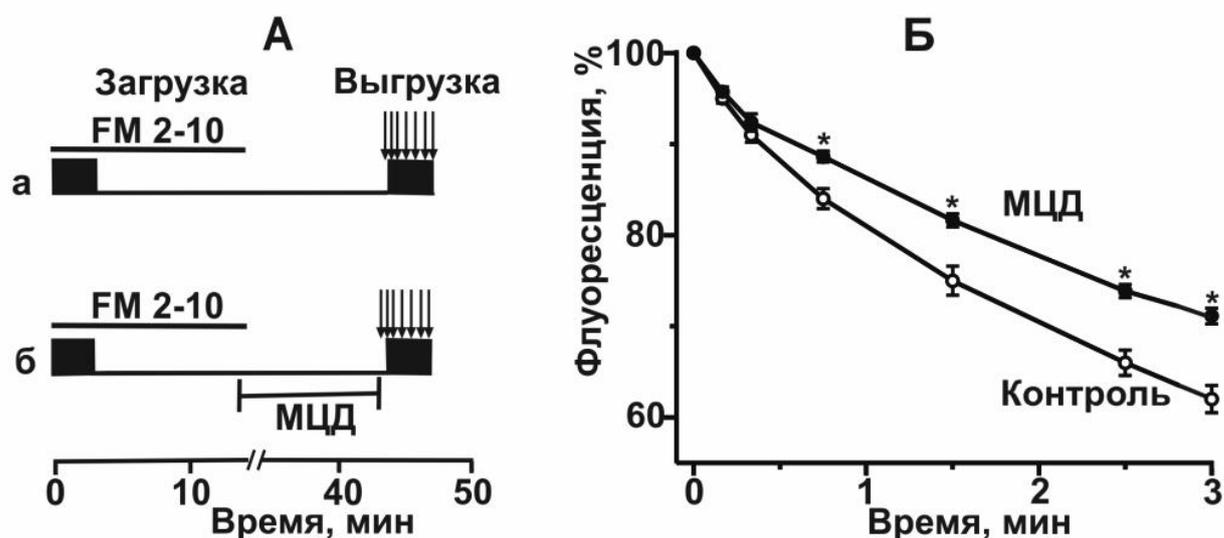


Рис. 56. Эффект 1 мМ метил-β-циклодекстрина (МЦД) на выгрузку красителя FM2-10

А – показаны схемы экспериментов. Нервно-мышечные препараты были простимулированы в течение 3 мин с частотой 20 Гц для загрузки FM2-10 в нервные терминалы. Присутствие FM2-10 в ванночке (на протяжении 13 мин) изображено горизонтальной линией; эпизод ритмического раздражения показан черным столбиком (слева). После загрузки красителя препараты инкубировались в течение 30 мин в физиологическом растворе (а - контроль) или в растворе с МЦД (б). Измерение флуоресценции осуществлялись непосредственно перед, и на протяжении второго эпизода стимуляции (черный столбик справа), используемого для выгрузки красителя. Захват каждого изображения обозначен стрелкой над вторым черным столбиком.

Рис. 56 (продолжение)

Б – Однажды захваченные в нервные терминали молекулы FM2-10 «убегают» из синаптических везикул во время второго эпизода ритмической стимуляции, как в контроле, так и в препаратах, обработанных МЦД. Начальная флуоресценция, измеренная в обеих группах, до стимуляции составляла  $159 \pm 5$  о.е. ( $n=5$ ) и  $157 \pm 4$  о.е. ( $n=5$ ,  $p > 0.05$ ), соответственно. Это указывает на то, что обработка 1 мМ МЦД не влияет на спонтанный экзоцитоз синаптических везикул. На этом графике флуоресценция представлена в процентном соотношении от исходной флуоресценции загруженных FM2-10 препаратов (до стимуляции). Снижение флуоресценции становилось статистически достоверным относительно базолинии, начиная с 10 с в обеих группах. После 3-х мин стимуляции флуоресценция уменьшалась на 38% в контрольной группе и на 28% в группе, обработанных МЦД препаратами. Это свидетельствует о существенном снижении скорости выгрузки после воздействия МЦД. Звездочками (\*) обозначена статистически достоверная разница между контролем и обработкой МЦД на уровне  $p < 0.001$ .

Важно отметить, что степень снижения экзоцитоза в препаратах, подвергнутых действию МЦД, была существенно слабее, по сравнению с более сильным эффектом МЦД на эндоцитоз, который фактически нарушался (для сравнения рис. 55, В и рис. 56, Б к 3 мин стимуляции). Таким образом, полученные результаты говорят о том, что в нервно-мышечных синапсах лягушки (Петров и др. 2009) и в двигательных нервных окончаниях крысы для эффективного протекания экзоцитоза при ритмической активности важен холестерин поверхностных мембран, а в процессе эндоцитоза строго необходим холестерин синаптических везикул (Petrov et al., 2011; Зефирова, Петров, 2013).

#### **4.4.3 Изменение Н-эффекта (показатель невезикулярного освобождения) под действием МЦД в покое и при ритмической стимуляции двигательного нерва**

Схемы экспериментов представлены на рис. 57А, а результаты иллюстрируются рис 57Б. В контроле величина Н-эффекта составила  $5.3 \pm 0.6$  мВ ( $n=5$ , рис. 57, Ва). Это согласуется ранними данными (Nikolsky et al., 1994; Mukhtarov et al., 2000; Malomouzh et al., 2003). Добавление МЦД до перфузии мышцы раствором с ингибитором

ацетилхолинэстеразы (армином, рис. 57, Аб) значительно увеличивало величину Н-эффекта (до  $10.4 \pm 0.7$  мВ,  $n=4$ ,  $P < 0.01$ , рис. 57, Бб). Н-эффект оставался повышенным ( $9.9 \pm 0.6$  мВ,  $n=4$ ,  $P < 0.01$ , рис. 57, Бв), когда МЦД и армин апплицировались одновременно.

Обработка препарата 1 мМ МЦД до аппликации армина не изменяла мембранный потенциал покоя волокон и чувствительности постсинаптической мембраны к ацетилхолину, судя по отсутствию влияния 1мМ МЦД на амплитуду МТКП (табл. 2). Действительно, мембранный потенциал был  $73.2 \pm 0.6$  мВ ( $n=3$ ) в контроле и  $73.7 \pm 0.5$  мВ ( $n=4$ ,  $p > 0.05$ ) после 30 мин инкубации мышцы с МЦД. Кроме того, 1мМ МЦД не изменял частоту МТКП ( $p > 0.05$ , табл. 2). Это предполагает, что наблюдаемое увеличение Н-эффекта может быть связано с усилением активности транспортных систем, обеспечивающих невезикулярное освобождение ацетилхолина, и угнетением эндоцитоза синаптических везикул из-за обработки МЦД, в случае, если данные транспортные системы локализуются в синаптических везикулах или захватываются вглубь нервного окончания эндоцитозом. Эта гипотеза подтверждается экспериментами с мембранопроникающим динамин-ингибирующим пептидом, который специфично блокирует клатрин-опосредованный эндоцитоз (Shupliakov et al., 1997). Амплитуда Н-эффекта увеличивалась до  $12.6 \pm 0.5$  мВ ( $n=4$ ,  $P < 0.001$ ) в препаратах, подвергнутых действию динамин-ингибирующего пептида.

Стимуляция двигательного нерва с частотой 20 Гц в течение 3 мин за 30 мин до аппликации ингибитора ацетилхолинэстеразы армина (Рис. 57, Аг) значительно снижала амплитуду Н-эффекта ( $3.0 \pm 0.1$  мВ,  $n=5$ ,  $P < 0.05$ ; Рис. 57, Бг). Если двигательный нерв стимулировался высокой частотой, когда МЦД присутствовал в ванночке и угнетал эндоцитоз (рис. 57, Ад), то величина Н-эффекта сильно (в 5 раз) увеличивалась (до  $15.0 \pm 0.4$  мВ,  $n=4$ ,  $P < 0.001$ ), по сравнению с синапсами, стимулированными в отсутствие МЦД. Это указывает на связь процессов эндоцитоза с невезикулярным освобождением нейромедиатора. Вызванный высокочастотной стимуляцией компенсаторный эндоцитоз может захватывать с поверхностной мембраны транспортные системы, вовлеченные в невезикулярное освобождение, снижая последующее невезикулярное освобождение. С другой стороны, стимуляция встраивания фрагментов мембран синаптических везикул при блокированном эндоцитозе, наоборот, может способствовать накоплению подобных

транспортных систем, при условии, что они содержатся в мембранах синаптических везикул.

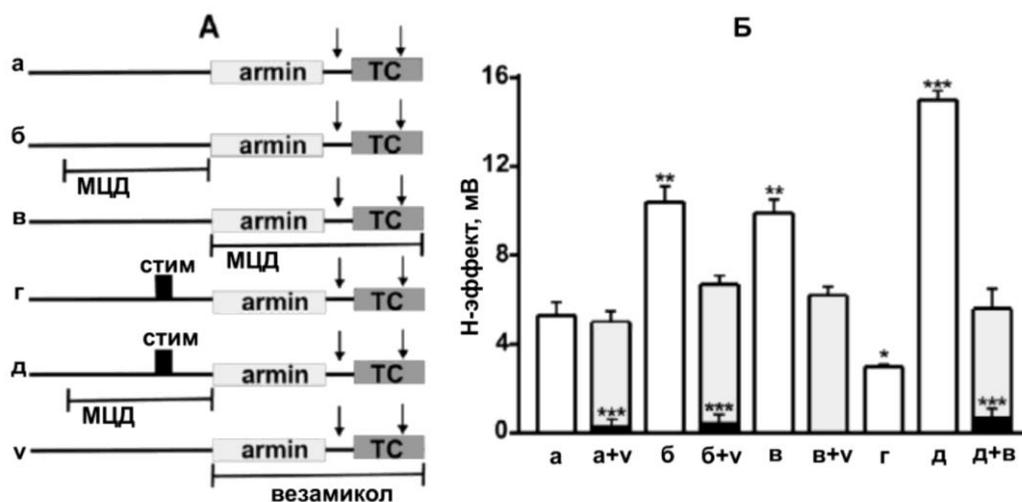


Рис. 57. Эффект электрической стимуляции и 1мМ метил- $\beta$ -циклодекстрина (МЦД) на Н-эффект

А – изображен дизайн экспериментов. Н-эффект – это гиперполяризация концевой пластинки вслед за ингибированием никотиновых ацетилхолиновых рецепторов (+)-тубокурарином (ТС, темно серые прямоугольники) в нервно-мышечных препаратах, предварительно обработанных армином в течение 30 мин (светло серые прямоугольники) для необратимого ингибирования ацетилхолинэстеразы. Для оценки Н-эффекта, мембранный потенциал покоя был измерен перед и после 10 мин аппликации ТС (как показано стрелками). Измерения Н-эффекта позволяют оценить некантовое освобождение ацетилхолина из двигательных нервных терминалей (Vyskocil et al., 2009). В представленных экспериментах мы использовали по одиночке и в комбинации следующие воздействия (за исключением контроля – а, где эти воздействия не применялись): аппликацию 1 мМ МЦД, 5 и 10 мкМ ( $\pm$ )-везамикола (как показано линией на в), ритмическую стимуляцию (20 Гц, 3 мин) нерва (черные прямоугольники на г и д). Б – Аппликация МЦД перед (б) и в течение (в) ингибирования ацетилхолинэстеразы армином увеличивала Н-эффект в два раза, по сравнению с контролем (а). Электрическая стимуляция нерва (г) уменьшала Н-эффект примерно на 43%. Однако сочетание стимуляции и аппликации МЦД (д) вызывало значительное, в три-четыре раза, увеличение Н-эффекта. В сериях с ингибированием везикулярного транспортера ацетилхолина везамиколом, мы тестировали 2 концентрации блокатора на контрольных синапсах и в комбинации с МЦД и стимуляцией.

Рис. 57 (продолжение)

Эффект двух концентраций наложен на график, серые столбики соответствуют действию 5 мкМ везамикола, а черные – 10 мкМ везамикола. Было обнаружено, что 5 мкМ везамикола (серые столбики) хотя неэффективны в контрольных препаратах (а+v;  $p=0.079$ ), но полностью предотвращают увеличение Н-эффекта, вызванного МЦД (б+v, в+v) или МЦД со стимуляцией (д+v). Увеличение концентрации везамикола в два раза полностью устраняло Н-эффект в экспериментальных условиях (черные столбики; а+v, б+v; д+v).

#### **4.4.4 Н-эффект в условиях ингибирования везикулярного транспортера ацетилхолина везамиколом**

Ингибирование везикулярного транспортера ацетилхолина (ВТАх) 5 мкМ везамикола полностью предотвращало вызванное МЦД увеличение Н-эффекта. В этих экспериментах везамикол присутствовал в ванночке в течение инкубации мышц с армином и при последующем добавлении тубокурарина (рис. 57 Аv). Везамикол устранял влияние на Н-эффект аппликаций МЦД, которые происходили как до, так и во время ингибирования ацетилхолинэстеразы. Амплитуды Н-эффектов ( $6.7 \pm 0.4$  мВ,  $n=4$  или  $6.2 \pm 0.4$  мВ,  $n=3$ , соответственно; Рис. 57 Б, столбики “б+v” и “в+v”) не отличались, по сравнению с контрольным значением ( $p > 0.05$ ). Также везамикол предотвращал увеличение Н-эффекта в результате высокочастотной стимуляции препаратов в присутствии МЦД ( $p < 0.05$ ). В этих условиях, амплитуда Н-эффекта была  $5.6 \pm 0.9$  мВ ( $n=4$ ;  $p > 0.05$  по сравнению с контролем (а) и  $p < 0.001$  по сравнению со стимулированными обработанными МЦД препаратами (д), рис. 57 Б, столбик «д+v»).

Добавление 5 мкМ везамикола не изменяло ( $p=0.079$ ) Н-эффект в контрольных мышцах (не обработанных МЦД, Рис. 57 Ба+v, серая колонка, рис. 58 В). Однако уменьшение Н-эффекта было статистически достоверно, когда везамикол был использован в концентрации 6.5 мкМ ( $n=3$ ,  $p < 0.05$ ) или 8 мкМ ( $n=3$ ,  $p < 0.01$ , рис. 58 В), и Н-эффект был полностью устранен 10 мкМ везамикола ( $n=3$ ,  $p < 0.001$ , Рис. 58В и рис. 57 Ба+v, темные столбцы). Это указывает на ингибирование невезикулярного освобождения ацетилхолина везамиколом доза-зависимым способом. Соответственно, 10 мкМ везамикола полностью устраняли Н-эффект ( $p < 0.001$ ) в обработанных МЦД

препаратах, как стимулированных, так и не стимулированных (черные колонки д+v и б+v на рис.57, Б).

Таким образом, усиление невезикулярного освобождения ацетилхолина в нервно-мышечных синапсах крысы при удалении мембранного холестерина зависит от активности блокируемой везикулом транспортной системы.

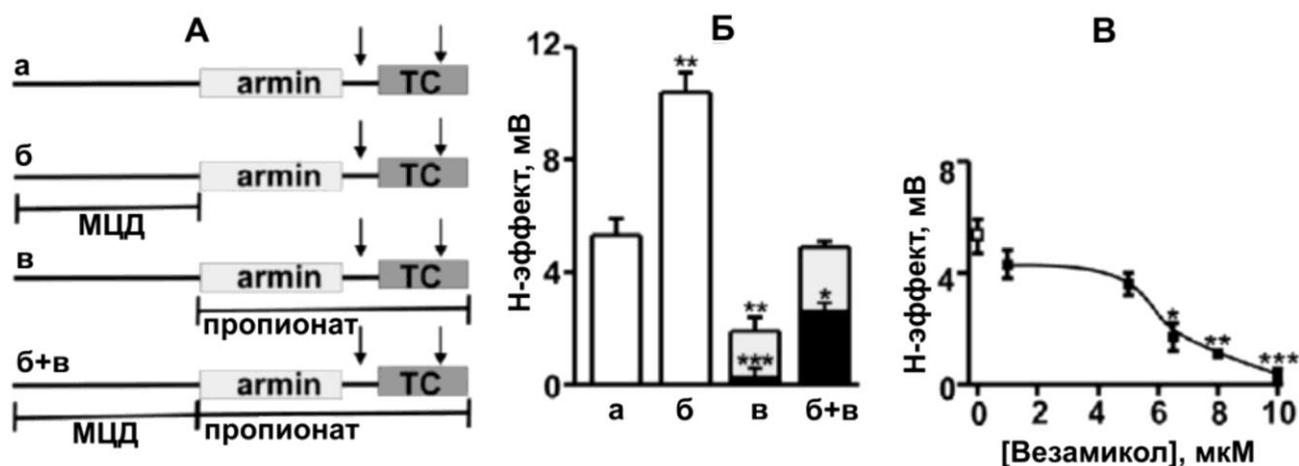


Рис. 58. Влияние пропионата натрия на Н-эффект и кривая доза-зависимости везамикола

А – Иллюстрирует дизайн экспериментов (обозначения те же, что и на рис. 57, А). В этих экспериментах мы использовали в одиночку или в комбинации следующие воздействия: аппликации 1 мМ МЦД, 20 или 40 мМ пропионата натрия (показано линейными сегментами на б, в, б+v; Аа - контроль). Б – Пропионат натрия, который закисляет цитоплазму, уменьшал Н-эффект как в контроле, так и в стимулированных нервно-мышечных синапсах. Эффективность пропионата зависела от применяемой концентрации, 20 мМ (серые столбики) или 40 мМ (черные столбики). Эффекты этих концентраций наложены на графике. В концентрации 20 мМ (в, серый столбик), пропионат уменьшал Н-эффект на 34%, тогда как в высокой концентрации (40 мМ) он полностью предотвращал Н-эффект (в; черный столбик). Пропионат, в обеих концентрациях, полностью предотвращал увеличение Н-эффекта, вызванное аппликацией МЦД (б+v). В – Эффект разных концентраций везамикола на Н-эффект. 1 и 5 мкМ везамикола не изменяли Н-эффект ( $p=0.189$  и  $p=0.079$ , соответственно) по сравнению с контрольным значением (показано как светлые квадраты). 6.5 и 8 мкМ везамикола снижали Н-эффект, а 10 мкМ везамикола фактически устраняли его. Звездочки показывают статистическую значимость различий между контрольной и подвергнутыми действию реагентов группами (\* $p<0.05$ ; \*\* $p<0.01$ ; \*\*\* $p<0.001$ ).

#### 4.4.5 Влияние МЦД на цитоплазматический pH в синаптическом регионе

Изменения флуоресценции красителя BCECF, загруженного в нервно-мышечные препараты, отражает изменения внутриклеточного pH (Wu et al., 1994). Наблюдения и анализ велись в регионе, где располагаются нервные терминалы. Добавление в ванночку МЦД вызывает достоверное уменьшение отношения флуоресценции J505/450 BCECF, начиная с первой минуты аппликации реагента ( $p < 0.001$ , рис. 59, А), и отношение уменьшается примерно на 25% к 30 мин инкубации, по сравнению с контролем ( $p < 0.001$ ,  $n=7$ , рис. 59А контроль – светлые кружочки, МЦД – темные кружочки). Высокочастотная стимуляция двигательного нерва, начинающаяся с 10 мин аппликации в МЦД, ускоряет снижение отношения флуоресценции J505/450, которое уменьшается на 32% к концу 30 мин периода инкубации с МЦД ( $n=7$ ,  $p < 0.0001$ , рис. 59А, открытые треугольники). Наблюдаемые изменения в J505/450 указывают на снижение цитоплазматического pH под влиянием МЦД. Снижение pH становится более значительным, когда двигательные нервы подвергаются эпизоду высокочастотной стимуляции.

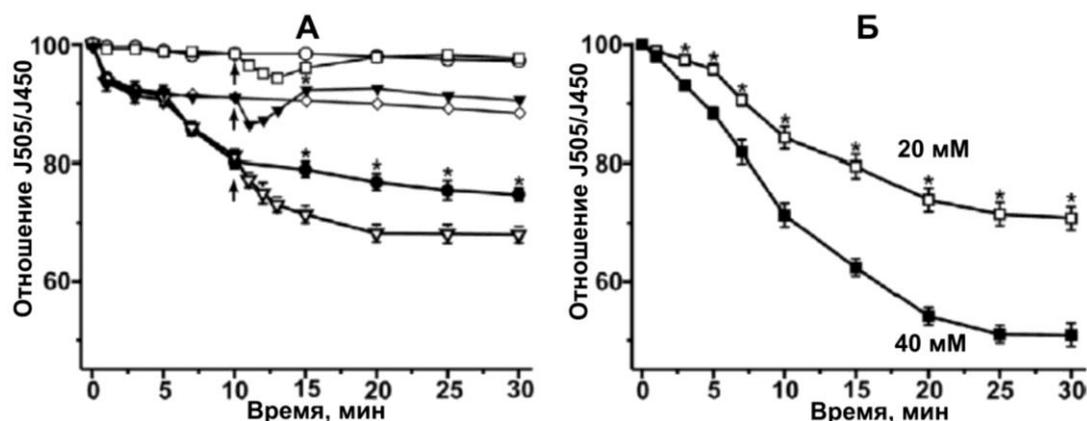


Рис. 59. Изменения цитоплазматического pH при инкубации с 1 мМ метил-β-циклодекстрина (МЦД), 5 мкМ везамикола и пропионатом натрия

Нервно-мышечные препараты были выдержаны в BCECF-AM (pH чувствительный флуоресцентный индикатор, мембранопроникающая форма) в течение 15 мин. После 30 мин периода отмывки регистрировалась флуоресценция в синаптическом регионе. Отношение эмиссии J505/450 BCECF в момент первого измерения (до аппликации МЦД) принималось за 100%. Последующие значения эмиссионного отношения J505/450 представлены в процентах ± стандартная ошибка. Некоторые ошибки не видны на графике, так как их значения меньше 4%. Стимуляция 20 Гц 3 мин показана стрелками.

Рис. 59 (продолжение)

А - Отношение эмиссии J505/450 немного уменьшается после 7.5 мин инкубации ( $p < 0.05$ ) в контроле (светлые кружки), и к 30 мин отношение составляло 97% от базолинии ( $p < 0.05$ , не показано). Высокочастотная стимуляция в контроле вызывала слабое кратковременное уменьшение отношения J505/450 (светлые квадратики; уменьшение было статистически значимым на протяжении интервала с 11 по 15 мин, по сравнению со значением до стимуляции,  $p < 0.001$ , не показано). Добавление МЦД постепенно уменьшало отношение J505/450 (темные кружки; снижение становилось статистически значимым после 1 минуты обработки, не показано). Высокочастотная стимуляция (3 мин 20 Гц) нерва способствовала снижению отношения J505/450 в препаратах, обработанных МЦД (светлые треугольники; снижение было статистически значимым по отношению к нестимулированным обработанным МЦД препаратам,  $p < 0.05$ , не показано). В присутствии везамикола, снижение J505/450 отношения, вызванного обработкой МЦД только или в сочетании высокочастотной стимуляцией, было в три-четыре раза ниже ( $p < 0.001$ ; светлые ромбики, МЦД+везамикол; темные треугольники, МЦД + стимуляция + везамикол), чем в препаратах, обработанных только МЦД. Звездочки указывают статистически значимую разницу между отношениями J505/450 в нестимулированных и стимулированных группах ( $p < 0.001$ ). Б – Пропионат натрия (20 мМ, светлые квадратики; 40 мМ темные квадратики) при внеклеточной аппликации снижает внутриклеточный рН. В обоих случаях пропионат постепенно уменьшает отношение J505/450. При этом эффект 40 мМ существенно более выраженный. Звездочки показывают статистически достоверную разницу между эффектами 20 и 40 мМ пропионата на уровне  $p < 0.001$ .

Эффект МЦД на цитоплазматический рН был существенно слабее в присутствии 5 мкМ везамикола. Действительно, J505/450 отношение уменьшалось только на  $11.0 \pm 0.7\%$  ( $n=5$ ) при аппликации МЦД на фоне действия везамикола ( $p < 0.001$ , рис. 59 А). В этих условиях высокочастотное раздражение двигательного нерва уменьшало J505/450 отношение только на  $8.8 \pm 0.6\%$  к 30 мин аппликации МЦД ( $n=5$ ,  $p < 0.001$ , рис. 59А). Эти данные указывают на уменьшение в 3-раза закисления цитоплазмы, сопряженного с высокочастотной стимуляцией в присутствии МЦД, при блокировании ВТАх. Это согласуется с гипотезой, что протон-зависимый чувствительный к

везамиколу белок, содержащийся в синаптических везикулах (вероятно, ВТАх), отвечает за усиление невезикулярного освобождения ацетилхолина при частичном удалении мембранного холестерина. Возможно, увеличение количества ВТАх в пресинаптической мембране вследствие обработки МЦД вызывает усиление обмена свободного ацетилхолина в цитоплазме нервной терминали на экстраклеточные протоны через пресинаптическую мембрану. Следует отметить, что везамикол не полностью (хотя сильно) устранял эффекты МЦД на цитоплазматический рН. Это указывает на вовлечение других транспортных везамикол-независимых систем в ацидификацию цитоплазмы в ответ на удаление холестерина.

Интересно отметить, что как в контроле, так и в случае воздействия МЦД на фоне везамикола в период высокочастотной стимуляции наблюдалось временное обратимое снижение J505/450 отношения, которое после прекращения 3-х мин стимуляции (или уже со 2-ой мин стимуляции) начинало увеличиваться в течение последующих 5-6 мин. Это указывает на связь процессов экзо- и эндоцитоза синаптических везикул с регулированием цитоплазматической концентрации протонов. Это согласуется с данными о том, что стимуляция вызывает двухфазное изменение рН нервного окончания: сначала наблюдается закисление, а потом, наоборот, алкализация. Последняя связана с активностью везикулярной Н-помпы, которая после экзоцитоза оказывается в пресинаптической мембране и до момента эндоцитоза выкачивает протоны из цитоплазмы (Zhang et al., 2010).

#### **4.4.6 Эффект уменьшения внутриклеточного рН на Н-эффект**

В дальнейшем мы исследовали чувствительность к протонам механизма невезикулярного освобождения ацетилхолина, используя пропионат для снижения рН цитоплазмы и Н-эффект как показатель невезикулярного освобождения (Puttagunta et al., 1992).

Внутриклеточный рН был оценен с помощью детекции отношения флуоресценции J505/450 маркера BCECF в синаптическом регионе. Аппликации 20 и 40 мМ пропионата натрия значительно снижали отношение J505/450, которое становилось статистически значительным к 3 мин аппликации 20 мМ пропионата ( $p < 0.001$ ) и даже к 1 мин, когда концентрация пропионата была увеличена до 40 мМ ( $p < 0.05$ ). К 30 мин инкубации в растворе с 20 или 40 мМ пропионата отношение

J505/450 в загруженных ВСЕСF препаратах снижалось на  $30\pm 1\%$  ( $n=5$ ,  $p<0.001$ ) или  $49.1\pm 1\%$  ( $n=5$ ,  $p<0.001$ ), соответственно. При этом по нашим оценкам, снижение рН в аксоплазме при действии 20 и 40 мМ пропионата происходило на 0.05 и 0.09 единиц, соответственно (рис. 59, Б). Это согласуется с ранее полученными данными о том, что 30 мМ пропионата снижает рН в клетках переднего гипоталамуса крысы на 0.06 единиц (Puttagunta et al., 1992).

Выявлено, что Н-эффект снижался до  $1.9\pm 0.5$  мВ ( $n=4$ ,  $P<0.01$ ) и  $0.1\pm 0.1$  мВ ( $n=3$ ,  $P<0.001$ ) после 30 мин экспозиции нервно-мышечных препаратов в 20 и 40 мМ пропионат натрия (рис. 58, Бв; серые столбики – 20 мМ, черные столбики – 40 мМ). Как ожидалось, применение 20 мМ пропионата натрия полностью предотвращало увеличение Н-эффекта, вызванное аппликацией МЦД, а использование 40 мМ пропионата даже уменьшало Н-эффект, по сравнению с контролем. Так, амплитуда Н-эффекта при действии 20 мМ или 40 мМ пропионата была  $4.9\pm 0.2$  мВ ( $n=3$ ,  $p>0.05$ , по сравнению с контролем (а),  $\#p<0.001$ , по сравнению с обработкой МЦД (б)) или  $2.9\pm 0.1$  мВ ( $n=4$ ,  $p<0.05$ ,  $\#p<0.001$ , рис. 58, Вб+в), соответственно. Основываясь на том, что 40 мМ пропионата не влияют на амплитуду МТКП, можно говорить об отсутствии влияния закисления цитоплазмы на чувствительность постсинаптической мембраны к ацетилхолину (Табл. 2).

Таким образом, закисление цитоплазмы подавляет увеличение невезикулярного освобождения ацетилхолина, вызываемое удалением холестерина. Это согласуется с предположением, что система, обеспечивающая возрастание невезикулярной секреции, транспортирует протоны внутрь нервного окончания в обмен на ацетилхолин.

#### **4.4.7 Эффекты МЦД, стимуляции и везамикола на внеклеточный уровень ацетилхолина**

Для оценки невезикулярного освобождения ацетилхолина широко используется Н-эффект, хотя это непрямой способ и сопряжен с ингибированием ацетилхолинэстеразы. Мы выполнили серии экспериментов с оптической детекцией освобождения ацетилхолина из нервно-мышечного препарата диафрагмы (рис. 60).

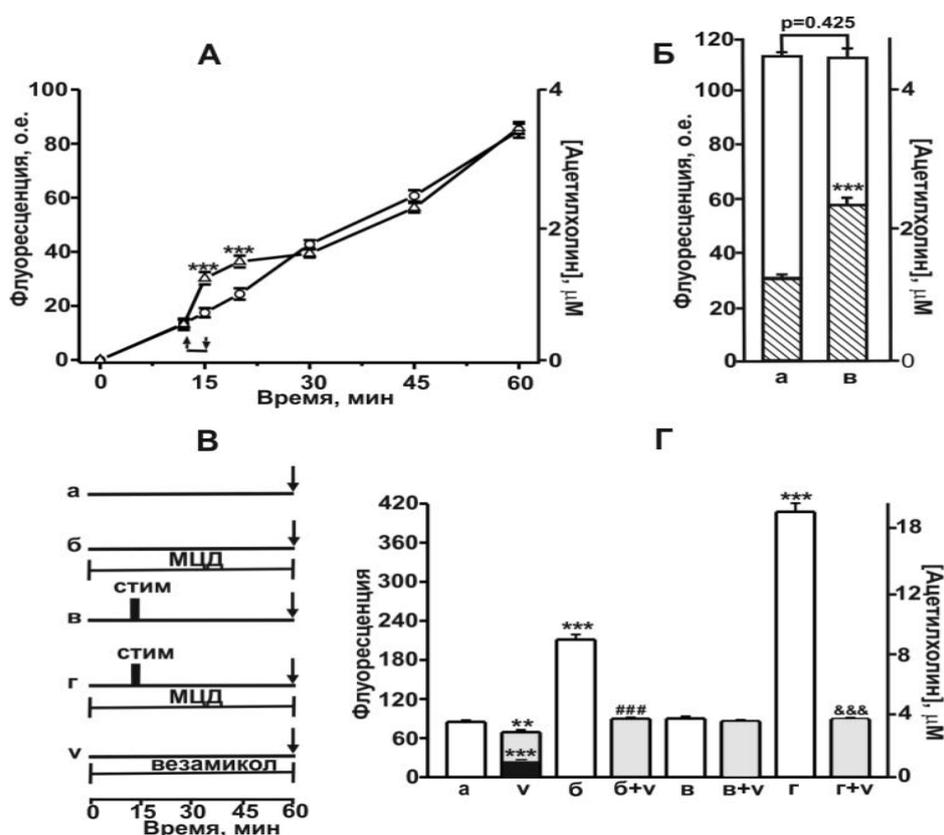


Рис. 60. Эффект электрической стимуляции, 1 мМ метил- $\beta$ -циклодекстрина (МЦД) и везамикола на внеклеточный уровень ацетилхолина

В экспериментах измеряли флуоресценцию резорфина в разные моменты времени (от 0 до 60 мин на А, и к 60 мин на Г) для оценки концентрации ацетилхолина в микрованночке. Б – каждая мышца инкубировалась 15 мин в ванночке (заштрихованный сегмент столбца) и затем помещалась в новый раствор, где выдерживалась еще 45 мин (незаштрихованный сегмент). В обоих растворах флуоресценцию оценивали с задержкой в 1 час, что позволяет реакциям окисления холина и образования резорфина протекать полностью. Это было сделано для большей уверенности в том, что все молекулы нейромедиатора, освобожденные из нервных терминалей, будут учтены. Флуоресценция сравнивалась со стандартными кривыми флуоресценции резорфина, полученными при использовании растворов с известными концентрациями ацетилхолина. Это позволило оценить количество ацетилхолина (в мкМ), накапливающегося в 1 мл раствора ванночки, нормализованного на грамм мышечной ткани (правые оси Y на А, Б и Г). А – иллюстрирует увеличение флуоресценции резорфина, измеренной в контроле (кружочки, без стимуляции) и стимулированных нервно-мышечных препаратах (треугольники). Стимуляция 20 Гц производилась с 12 до 15 мин инкубации (показано горизонтальной линией между стрелками).

Рис. 60 (продолжение)

Возрастание флуоресценции было усилено стимуляцией и длилось в течение 5 мин (указано звездочками), затем рост флуоресценции замедлялся, и она достигала одинаковых значений в обеих группах. Б – Каждый столбец представляет конечную флуоресценцию в растворах, в которых были инкубированы контрольные (а) и стимулированные (в) препараты. Нижняя часть каждого столбика (заштрихованная) показывает флуоресценцию, образовавшуюся в результате 1-ой 15 мин инкубации (это время включает эпизод стимуляции в случае «в»). Как ожидалось, стимуляция увеличивает флуоресценцию в два раза. Верхняя (нештрихованная) часть каждого столбика показывает количество ацетилхолина, накопившегося в течение последующей 45 мин инкубации. Видно, что флуоресценция в контроле на 34% ( $p < 0.001$ ) превосходит флуоресценцию, накопившуюся в растворах с препаратами, которые были простимулированы перед инкубацией. Однако общая флуоресценция, аккумулированная за 60 мин инкубации, одинакова в обеих группах. Это согласуется с данными экспериментов, представленных на А. В – показаны схемы экспериментов, результаты которых представлены на Г. Флуоресценция измерялась к 60 мин инкубации (указано стрелкой). Использовались, за исключением контроля, по отдельности или в комбинации, следующие воздействия: аппликация МЦД, 5 и 10 мкМ везамикола (изображены линиями), и стимуляция 20 Гц 3 мин (черные прямоугольники). Г – Аппликация МЦД (б) увеличивает флуоресценцию к 60 мин инкубации примерно в 2.5 раза, по сравнению с контролем (а), тогда как стимуляция 20 Гц 3 мин не изменяет флуоресценции (в). Однако если обработанные МЦД препараты подвергались ритмической стимуляции, флуоресценция увеличивалась больше чем в 4 раза (г). Следовательно, частичное истощение мембранного холестерина увеличивает невезикулярное освобождение ацетилхолина в микрованночку. Ингибитор ВГАх (везамикол) в концентрации 5 или 10 мкМ уменьшал флуоресценцию на 20% или в 4 раза, соответственно (v; серые столбики – 5 мкМ; черные столбики – 10 мкМ). 5 мкМ везамикола полностью предотвращали увеличение флуоресценции, вызванное МЦД (б+v) или МЦД+стимуляция (г+v). Звездочками обозначена статистическая достоверность различий между контролем и остальными группами (\*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ). Статистическая значимость различий на уровне  $p < 0.001$  между б и б+v обозначена- ###, а между г и г+v - &&&.

Флуоресценция в контрольном растворе возрастала линейно на протяжении 60 мин инкубации препарата и достигала величины, соответствующей 3.4 мкМ ацетилхолина ( $84.4 \pm 2.6$  о.е.,  $n=5$ ) (рис. 60, А). Более быстрое, чем в контроле, увеличение флуоресценции наблюдалось вскоре после стимуляции нервно-мышечного препарата в течение 3 мин с частотой 20 Гц (стимуляция осуществлялась в период с 12 по 15 мин инкубации в смеси реагентов, необходимых для детекции ацетилхолина). К 20 мин инкубации стимулированных препаратов увеличение флуоресценции становилось медленнее, и уровень флуоресценции в контрольных и стимулированных препаратах не отличался в период, начиная с 30 до 60 мин инкубации ( $p > 0.05$ ) (рис. 60, А). Это на первый взгляд, противоречит тому факту, что в результате высокочастотной стимуляции освобождается существенное количество квантов ацетилхолина. Мы предполагаем, что увеличение освобождения нейромедиатора в течение высокочастотной стимуляции может впоследствии сменяться периодом снижения невезикулярного освобождения, возможно из-за дефицита доступного нейромедиатора или снижения активности транспортных систем, вовлеченных в невезикулярную секрецию. Действительно, количество ацетилхолина, освобожденного из стимулированных препаратов между 0 и 15 мин (этот период включает отрезок стимуляции) в 2 раза выше, чем в контрольных препаратах за то же время ( $n=4$ ,  $p < 0.001$ , рис. 60, Б). После прекращения стимуляции освобождение ацетилхолина становится медленнее на протяжении последующих 45 мин инкубации, в итоге, выделяется на 34% меньше ацетилхолина, чем в нестимулированных препаратах ( $n=4$ ,  $p < 0.001$ ). В итоге, общее количество медиатора, освобождаемого в ванночку из контрольных и стимулированных препаратов, остается одинаковым к концу 60 мин периода инкубации ( $p > 0.05$ , рис. 60, Б).

Аппликация МЦД в течение 60 мин (рис. 60, Вб) увеличивала флуоресценцию на 150% ( $n=5$ ,  $p < 0,001$ , рис. 60, Гб), указывая на накопление ацетилхолина в растворе. Это увеличение становилось более значительным, почти в 4.8 раза ( $n=5$ ,  $p < 0,001$ , рис. 60, Гв), если во время обработки МЦД препараты были подвергнуты стимуляции высокой частотой (Рис. 60, Вв). Эти результаты согласуются с данными по регистрации Н-эффекта. Везамикол (5 мкМ) немного уменьшал флуоресценцию ( $69.0 \pm 3.6$  о.е.,  $n=5$ ,  $p < 0.01$ ), по сравнению с контролем. Следовательно, реагент в данной концентрации способен уменьшать освобождение ацетилхолина в ванночке (рис. 60, Гв, серые

столбики). Увеличение концентрации везамикола в два раза (10 мкМ) вызывало сильное снижение флуоресценции ( $n=5$ ,  $24.2 \pm 2.5$  о.е.,  $p < 0.001$ , рис. 60, Гv, черные столбики). Везамикол (5 мкМ) полностью предотвращал увеличение флуоресценции, вызванное аппликацией МЦД в одиночку (рис. 60, Гб+v;  $n=5$ ) или совместно с эпизодом стимуляции (рис. 60, Гв+v;  $n=5$ ). Эффекты везамикола на флуоресценцию ацетилхолина сопоставимы с ранее описанными измерениями Н-эффекта.

#### **4.4.8 Значение холестерина в невезикулярном освобождении медиатора. Связь некантового освобождения и рециклирования синаптических везикул**

Полученные нами ранее данные о загрузке и выгрузке флуоресцентного красителя FM1-43, и динамике секреции медиатора свидетельствуют о том, что в двигательных нервных окончаниях лягушки удаление холестерина из синаптических мембран (поверхностных мембран и мембран синаптических везикул) с помощью 1 мМ МЦД подавляет эндоцитоз, тогда как интенсивность экзоцитоза при этом уменьшается в существенно меньшей степени (Петров и др., 2009; Petrov et al., 2010). Естественно, что в длительной перспективе нарушение эндоцитоза приведет к опустошению везикулярных пулов и драматичному угнетению экзоцитоза.

В нервных окончаниях диафрагмы крысы обнаружилась идентичная ситуация. При удалении холестерина из плазматической мембраны и мембран синаптических везикул, интенсивность вызванного экзоцитоза и квантовой секреции медиатора снижалась примерно на 20%, тогда как эндоцитоз угнетался на почти 90%. При этом уменьшение вызванного экзоцитоза связано как с уменьшением числа доступных для экзоцитоза везикул, вследствие нарушения механизма рециклирования, так и непосредственно с ослаблением вызванного экзоцитоза (Petrov et al., 2010; 2011). На существование последнего эффекта, указывает снижение амплитуды ТКП (в условиях низкочастотной стимуляции) при действии МЦД, тогда как частота и амплитуда МТКП не изменялись. Следовательно, при действии 1 мМ МЦД происходят изменения исключительно вызванного, но не спонтанного экзоцитоза. Увеличение концентрации МЦД до 10-15 мМ вызывает усиление спонтанного экзоцитоза в нервно-мышечных синапсах (Zamir, Charlton, 2006; Тараканова и др. 2011; Petrov et al., 2014, 2015).

Мы предполагаем, что в условиях частичного удаления мембранного холестерина (1 мМ МЦД) существенно более высокая интенсивность встраивания мембран

синаптических везикул (экзоцитоз), по сравнению с отпочкованием мембран в ходе эндоцитоза, ведет к накоплению везикулярных компонентов в пресинаптической мембране. Если предположить, что невезикулярное выделение опосредуется белком синаптических везикул – транспортером ацетилхолина (Edwards et al., 1985; Vyskocil, 1985; Zemkova et al., 1990), то блокирование эндоцитоза должно привести к увеличению невезикулярной секреции.

Представления об участии ВТАх в невезикулярном освобождении базируются на факте, что ингибирование этого транспортера везамиколом уменьшает Н-эффект в нервно-мышечных синапсах мыши (Edwards et al., 1995). В дополнение, увеличение вызванного и спонтанного освобождения ацетилхолина сопровождается увеличением Н-эффекта (Vizi, Vyskocil, 1979; Zemkova et al., 1990), указывая на корреляцию между квантовой и неквантовой секрецией. Если же стимуляция диафрагмального нерва мыши или лягушки проводилась в растворе, не содержащем  $Ca^{2+}$  (когда экзоцитоз блокирован), то увеличения интенсивности неквантового освобождения не наблюдалось (Katz, Miledi, 1981; Vyskocil et al., 1983). Однако существует много фактов и о том, что регуляция квантового и неквантового освобождения имеет свои специфичные пути регуляции (Vyskocil et al., 2009). Кроме того, при фосфорилировании С-концевого домена ВТАх протеинкиназой С везамикол, широко используемый для блокирования ВТАх, может терять свой ингибирующий эффект (Barbosa et al., 1997). Это может затруднять интерпретацию результатов.

В целом, до нашей работы не было исследовано влияние удаления холестерина на неквантовую секрецию, а также не исследовался вопрос о связи нарушений эндоцитоза синаптических везикул и невезикулярного освобождения. Хотя предположение о зависимости невезикулярного освобождения от эндоцитоза можно было сделать, анализируя некоторые данные. Так, нами было обнаружено, что в нервном окончании лягушки увеличение активности цГМФ-сигнального пути ведет к существенному ускорению эндоцитоза и рециклирования синаптических везикул, тогда как блокада гуанилатциклазы или протеинкиназы G1 замедляет эндоцитоз и рециклирование (Петров и др. 2007; Petrov et al., 2008). В двигательном нервно-мышечном синапсе крысы неквантовая секреция снижается при усилении синтеза цГМФ (когда эндоцитоз ускорен), и возрастает при блокаде гуанилатциклазы (когда эндоцитоз замедлен) (Mukhtarov et al.; 2000).

Было оценено, что за счет невезикулярного пути выделяются основные количества медиатора в синаптическую щель в условиях покоя (Mitchell, Silver, 1963; Fletcher, Forrester, 1975). В этих условиях небольшая часть ацетилхолина (около 2%) освобождается в ходе спонтанного экзоцитоза, который происходит с низкой частотой ( $\sim 1 \text{ c}^{-1}$ ). Мембрана каждой слившейся с пресинаптической мембраной синаптической везикулы содержит около 10 копий молекул транспортеров медиатора (Takamori et al., 2006), часть времени до эндоцитоза везикулярной мембраны эти молекулы транспортера пребывают в поверхностной мембране. В покое спонтанный экзоцитоз сопровождается компенсаторным эндоцитозом, что обеспечивает поддержание постоянного уровня транспортеров нейромедиатора (компонентов мембран везикул) в поверхностной мембране.

В наших экспериментах, после воздействия МЦД в покое, наблюдалось 2-х кратное увеличение Н-эффекта и внеклеточного уровня ацетилхолина. Специфический ингибитор клатрин-опосредованного эндоцитоза (динамин-ингибирующий пептид) также двух-кратно увеличивал Н-эффект. Возможно, при истощении мембранного холестерина встраивание мембран спонтанно экзоцитировавших везикул не сопровождается должным рециклированием везикул, что вызывает накопление молекул ВТАх в пресинаптической мембране и увеличение невезикулярного освобождения. Другое объяснение, что 1 мМ разрушает рафты в пресинаптической мембране и везикулярных мембранах, встроившихся в ходе спонтанного экзоцитоза в поверхностную мембрану, в итоге часть ВТАх «убегает» из везикулярной мембраны и не захватывается эндоцитозом в нервное окончание. Возможно, снижение стабильности рафтов может усиливать активность ВТАх.

Впоследствии предположение о связи невезикулярного освобождения и экзо-эндоцитоза синаптических везикул было проверено в серии экспериментов с высокочастотной стимуляцией двигательного нерва. Мы показали, что Н-эффект и концентрация внеклеточного ацетилхолина уменьшается после стимуляции. Это согласуется с ранними наблюдениями Zemkova и коллег (1990), где показано быстрое уменьшение неквантовой секреции, и даже ее прекращение через 2-5 минут после завершения стимуляции. Это указывает на то, что усиление эндоцитоза после высокочастотной стимуляции, восстанавливающее популяцию синаптических везикул, может отвечать за этот феномен. Действительно, увеличение амплитуды ТКП после

тетануса, по крайней мере частично, связано с увеличением числа ВТАх в мембране вновь образованных синаптических везикул (Lima Rde et al., 2010). Следовательно, в ходе эндоцитоза, вызванного высокочастотной стимуляцией, в норме из пресинаптической мембраны изымаются дополнительные молекулы ВТАх и затем захватываются в рециклирующую везикулу. Это может вести к снижению невезикулярного освобождения ацетилхолина.

Если во время обработки МЦД, блокирующей эндоцитоз, проводилась продолжительная высокочастотная стимуляция, вызывающая экзоцитоз существенного количества синаптических везикул, то в последующем невезикулярное освобождение ацетилхолина увеличивалось почти в 5 раз, судя по возрастанию Н-эффекта и внеклеточного уровня ацетилхолина. Это может указывать на возрастание в поверхностной мембране молекул (например, ВТАх), ранее входивших в состав синаптических везикул и опосредствующих невезикулярную секрецию ацетилхолина.

Известно, что ВТАх обменивает молекулу ацетилхолина на пару протонов, поэтому более кислая среда внутри синаптических везикул способствует транспорту ацетилхолина из аксоплазмы во внутривезикулярное пространство (Anderson et al., 1983). В ходе экзоцитоза в мембрану встраиваются ВТАх, и если они остаются физиологически активными, то они должны перебрасывать ацетилхолин в синаптическую щель, а протоны - в цитоплазму (Usdin et al., 1995). Обычно внеклеточная жидкость имеет рН 7.4 ( $[H^+]=40nM$ ), ограничивая количество доступных протонов и замедляя активность ВТАх (Nguyen, Parson, 1995). Однако экзоцитоз нейромедиатора сопровождается выходом дополнительных протонов из синаптических везикул и вызывает кратковременное закисление синаптической щели (Palmer et al., 2003; Cho, von Gersdorff, 2014; Du et al., 2014). Показано, что протонная помпа, встроенная в пресинаптическую мембрану в течение экзоцитоза синаптических везикул, продолжает выбрасывать протоны из цитоплазмы (Zhang et al., 2010). В дополнение к этому, синаптическая активность стимулирует работу  $Na^+/H^+$  обменника пресинаптической мембраны, что ведет к выбрасыванию протонов в синаптическую щель в обмен на натрий (Caldwell et al., 2013). Мембранные липиды функционируют как протонные буферы, связывая  $H^+$  из объема раствора своими анионными головными группами (Haines, 1983). Так, может создаваться протонный градиент, который движет

протон-зависимым транспортом и должен поддерживать активность ВТАх в пресинаптической мембране.

С другой стороны, вызванное ВТАх увеличение невезикулярной секреции должно вызывать переброс протонов в цитоплазму, понижая рН внутри терминали. Как ожидалось, обработка МЦД, увеличивающая невезикулярное освобождение, снижала внутриклеточный рН, и это снижение было существенно более выраженное, если на фоне действия МЦД массивный экзоцитоз стимулировался за счет высокочастотной длительной стимуляции нерва. Это согласуется с данными о корреляции снижения цитоплазматического рН и увеличения невезикулярного освобождения глутамата из синапсом крысы (Tarasenko et al., 2010).

Если ВТАх, встроенные в пресинаптическую мембрану, обеспечивают невезикулярное освобождение ацетилхолина, следовательно, последнее будет зависеть от концентрации субстратов ВТАх, в частности, протонов в аксоплазме. Так, закисление внутриклеточной среды, делающее транслокацию протонов энергетически менее выгодным событием (Fu et al., 1998), должно негативно сказываться на переносе ацетилхолина везикулярным транспортером. Аппликация 20 мМ пропионата натрия, уменьшающая внутриклеточный рН (Puttagunta et al., 1992), снижает невезикулярное освобождение, а 40 мМ пропионата натрия полностью устраняет его. Более того, опосредованное пропионатом натрия закисление цитозоля полностью предотвращает увеличение Н-эффекта, вызванное стимуляцией в присутствии МЦД. Это согласуется с ранними наблюдениями Edwards et al. (1985), что внеклеточное защелачивание уменьшает невезикулярное освобождение, судя по амплитуде Н-эффекта и данным радиоэнзиматического анализа.

Результаты наших экспериментов с ( $\pm$ )-везамиколом, мощным ингибитором ВТАх (Andreson et al., 1983), указали на роль ВТАх в механизме вызванного МЦД усиления невезикулярного освобождения. В наших условиях 5 мкМ везамикола, хотя статистически не уменьшали Н-эффект ( $p=0.079$ ), но снижали внеклеточное содержание ацетилхолина на 20%. В дополнение, 5 мкМ везамикола полностью предотвращали потенцирующее действие МЦД на невезикулярное освобождение (судя по Н-эффекту и оценке внеклеточного уровня ацетилхолина) как в нестимулированных, так и стимулированных препаратах. В концентрации 6.5 мкМ или 8 мкМ везамикол имел статистически достоверный эффект и уменьшал Н-эффект; 10 мкМ везамикола

полностью устраняли Н-эффект в контрольных, обработанных МЦД стимулированных и нестимулированных препаратах. Кроме этого, 10 мкМ везамикола снижали внеклеточную концентрацию ацетилхолина в 4 раза. В исследовании использовался ( $\pm$ )-везамикол, состоящий из менее эффективного (+) и более мощного (-) энантиомеров (Estrella et al., 1988). Это может объяснить, почему в наших условиях были эффективны большие концентрации везамикола для ингибирования Н-эффекта, по сравнению с другими исследованиями (Edwards et al., 1985). Кроме того, эффективность везамикола может зависеть от фосфорилирования ВТАх протеинкиназой С (Barbosa et al., 1997), что варьирует в зависимости от типа и состояния синаптического контакта. К тому же, недавно нами было показано, что удаление существенной части мембранного холестерина может способствовать активации протеинкиназы С (Petrov et al., 2015)

Как пресинаптическая мембрана, так и мембраны синаптических везикул содержат обогащенные холестерином микродомены, формирующие липидные рафты (Зефиоров, Петров, 2011; Петров и др., 2011). Вероятно, по крайней мере, некоторые молекулы ВТАх являются резидентами рафтов. Удаление холестерина 1 мМ МЦД может дестабилизировать липидные рафты, вызывая изменения фармакологических свойств мембранных белков (Zidovetzki, Levitan, 2007). Возможно, удаление холестерина может, через изменения липидных микродоменов, увеличивать активность ВТАх и их чувствительность к действию везамикола. Последним можно объяснить тот факт, что 5 мкМ везамикола, не изменяя базальную невезикулярную секрецию, предотвращали увеличение Н-эффекта под влиянием МЦД.

Результаты этого исследования указывают на вовлечение ВТАх в механизм невезикулярного освобождения ацетилхолина и строгую зависимость этого варианта секреции от мембранного холестерина. С одной стороны, мембранный холестерин может ингибировать активность ВТАх и угнетать невезикулярное освобождение. С другой стороны, удаление небольшой части мембранного холестерина из мембран синаптических везикул, может ингибировать процесс эндоцитоза синаптических везикул, что приводит к накоплению мембранных компонентов везикулярной мембраны в пресинаптической мембране. Увеличение уровня ВТАх, совместно с увеличением их активности, в поверхностной мембране в этих условиях вызывает увеличение невезикулярного освобождения ацетилхолина, что сопровождается закислением внутриклеточной среды нервной терминали (Petrov et al., 2011). Эти протоны могут

использоваться для повторного закисления синаптических везикул протонной помпой, локализованной в мембране синаптических везикул, а также управлять другими рН – зависимыми пресинаптическими процессами (Diering, Numata, 2014; Huang et al., 2015).

Следует упомянуть, что в недавнем исследовании (Malomouzh et al., 2014) с применением ингибитора эндоцитоза динасора, наоборот, было обнаружено небольшое снижение невезикулярного освобождения в нервно-мышечном синапсе мышцы в покое (без стимуляции). Эти результаты можно объяснить тем, что динасор имеет много неспецифичных эффектов помимо блокады белка эндоцитоза динамина. В частности, в низкой дозе он ингибирует  $H^+$ -АТФазу, что, естественно, может снижать протонный градиент между синаптической щелью и цитоплазмой нервного окончания (Preta et al., 2015), так как протонная помпа после экзоцитоза, но до эндоцитоза в этом случае перестает поставлять протоны во внеклеточную среду (Zhang et al., 2010). Это должно снизить активность ВТАх, встроенного в мембрану, и вызвать снижение невезикулярного освобождения. Также динасор может вызывать дестабилизацию и ремоделирование цитоскелета, нарушая организацию липидных рафтов (Yamada et al., 2009).

Можно предположить, что механизм некантовой секреции из диафрагмального нервного окончания крысы частично связан с кантовой секрецией (везикулярным циклом) и представляет собой перемещение медиатора везикулярным транспортером ацетилхолина. В естественных условиях постоянно происходит слияние мембран везикул с пресинаптической мембраной, и вплоть до эндоцитоза везикулярные компоненты обнажены внеклеточной среде. При этом сценарии невезикулярное освобождение может являться следствием работы системы загрузки ацетилхолина в синаптические везикулы, мембранные фрагменты которых встроены в пресинаптическую мембрану нервного окончания. Вероятно, в норме некантовая секреция ацетилхолина из двигательных нервных окончаний обеспечивается несколькими механизмами (Vyskocil et al., 2009).

#### **4.5 Влияние ферментативного окисления холестерина на везикулярный цикл в нервно-мышечных синапсах лягушки**

Мембранный холестерин продолжительный период пребывает в плазматической мембране и может окисляться активными формами кислорода или ферментативным

путем. Окисление холестерина в синаптических мембранах может усиливаться при интенсификации синаптической активности (Ando et al., 2002; Martín et al., 2014; Egawa et al., 2015). Для изучения последствий окисления мембранного холестерина на синаптическую передачу использовали бактериальный фермент холестерин оксидаза, превращающую холестерин в 4-холестен-3-он (Ahn, Sampson, 2004), который может длительное время (в отсутствие акцепторов во внеклеточной среде) присутствовать в мембране (Neuvonen et al., 2014). Хотя в эукариотических клетках отсутствует холестерин оксидаза, 4-холестен-3-он обнаруживается в тканях животных (около 1.5% от мембранного холестерина в мозге). Предполагается, что амилоидный пептид, в комплексе с ионами меди, может иметь холестерин-оксидазную активность, поэтому по мере развития болезни Альцгеймера происходит накопление 4-холестен-3-она (Puglielli et al., 2005). Интересно, что потребление 4-холестен-3-она может иметь терапевтический эффект при ожирении, заболеваниях печени и кератинизации у модельных животных (Suzuki et al., 1998; Neuvonen et al., 2014). Однако о механизмах действия и эффектах этого оксистерола на нейротрансдукцию известно крайне мало.

Абсолютное большинство работ по изучению роли холестерина в синаптической передаче выполнено с использованием МЦД в качестве инструмента, изменяющего уровень мембранного холестерина (Петров и др. 2009, Тараканова и др. 2011; Tong et al., 2009; Zamir, Charlton, 2006; Linetti et al., 2010; Dason et al., 2010, 2014; Petrov et al., 2011, 2014, 2015; Smith et al., 2010). В представленной ниже части в электрофизиологических и оптических экспериментах, проведенных на нервно-мышечных препаратах лягушки, мы окисляли эндогенный холестерин мембран бактериальным ферментом (Петров и др. 2013).

#### **4.5.1 Холестерин оксидаза эффективно окисляет холестерин мембран в нервно-мышечном препарате и снижает стабильность липидных рафтов**

Инкубация мышцы 30 мин в физиологическом растворе, содержащем ПХР и реагент AmplexRed, вызывала появление флуоресценции в растворе –  $26 \pm 11$  о.е. ( $n = 5$ ). Это соответствует базальной продукции  $H_2O_2$  около 10-15 нМ (рис. 61). В случае 30 мин воздействия на мышцу 1 ед. акт. / мл холестерин оксидазы в присутствии ПХР и реагента Amplex Red детектировалась существенно более высокая флуоресценция раствора –  $141 \pm 11$  о.е. ( $n = 5$ ,  $p < 0.01$ ), эквивалентная продукции примерно 100-110 нМ

$H_2O_2$  (то есть за полчаса в дополнении к 10-15 нМ  $H_2O_2$ , появляющимся в результате эндогенной продукции, под действием холестерин оксидазы синтезируется примерно 90-95 нМ  $H_2O_2$ ). В ходе реакции, катализируемой холестерин оксидазой, образуются одинаковые количества 4-холестен-3-она и  $H_2O_2$  (Kreit, Sampson, 2009). Следовательно, получасовая обработка препарата холестерин оксидазой ведет к окислению около 90-95 нМ холестерина (0.007 мг холестерина на 1 г веса нервно-мышечного препарата). Это заключение было проверено другим подходом. Так, *in vitro* в растворе, включающем помимо холестерин оксидазы, ПХР и реагента Amplex Red, еще холестерин в концентрации 90 нМ, появляется флуоресценция -  $113.2 \pm 5.3$  о.е. ( $n = 4$ ), что близко к значению флуоресценции, регистрируемой при действии холестерин оксидазы на препарат, за вычетом фоновой флуоресценции ( $140.8 - 25.7 = 115.1$ ). Полученные данные свидетельствуют о том, что холестерин оксидаза эффективно окисляет холестерин в нервно-мышечном препарате лягушки, однако окислительной модификации подвергается небольшая часть холестерина.

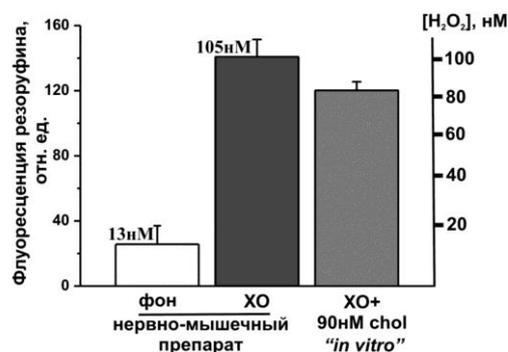


Рис. 61. Оценка эффективности окисления мембранного холестерина бактериальной холестерин оксидазой

Для количественной оценки степени окисления мембранного холестерина были использованы Amplex Red реагент и ПХР, которые реагируют на образующийся  $H_2O_2$  в ходе реакции, катализируемой холестерин оксидазой (ХО), с образованием флуоресцентного продукта резорурфина. Сначала определяли фоновую продукцию  $H_2O_2$ , затем уровень  $H_2O_2$  после инкубации препарата с ХО. Также была оценена флуоресценция, возникающая в растворе при окислении ХО заданной концентрации холестерина в пробирке.

В данной серии с мечением ХТ-В усиление CCD-видеокамеры было ниже, чем в других экспериментах с ХТ-В, поэтому абсолютные числовые значения иные. В

контрольных мышцах флуоресценция нервных окончаний, меченных ХТ-В, была –  $23.3 \pm 1.2$  о.е., что примерно на 40-50% ( $n = 5$ ,  $p < 0.05$ ) больше флуоресценции экстраинаптических мышечных регионов (рис. 62А). Если окрашивание ХТ-В производили через 30 мин воздействия холестерин оксидазы, то флуоресценция экстраинаптических мышечных мембран не изменялась, а свечение регионов нервных терминалей снижалось до  $17.5 \pm 1.0$  о.е. ( $n = 5$ ,  $p < 0.05$ ). Это на 1/4 ниже флуоресценции в контроле (рис. 62Б). Таким образом, можно предположить нарушение стабильности липидных плотиков в двигательных нервных окончаниях под влиянием холестерин оксидазы (Петров и др. 2013). Позднее в исследовании, выполненном на фибробластах, была продемонстрирована способность холестерин оксидазы нарушать фазовые свойства мембраны, снижая упорядоченность латеральной организации (Neuvonen et al., 2014).

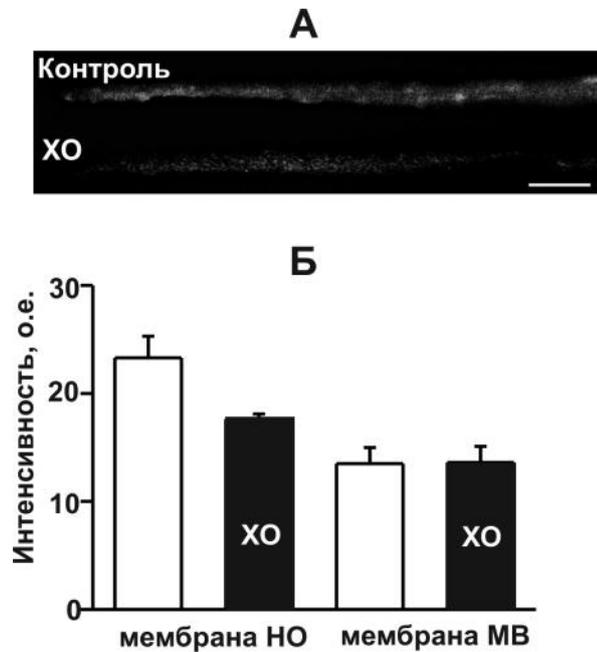


Рис. 62. Окисление холестерина угнетает окрашивание синаптических мембран на липидные плотики

А — флуоресценция участков нервных терминалей, окрашенных конъюгированной с флуоресцентной меткой субъединицей В холерного токсина (ХТ-В) в контроле и после получасовой инкубации с холестерин оксидазой (ХО). Свечение мышечных волокон вычтено. Шкала – 5 мкм. Б — Интенсивность флуоресценции мембран нервного окончания (НО) и мышечных волокон (МВ) в контроле (светлые столбики), и после обработки ХО (черные столбики).

#### 4.5.2 Влияние окисления холестерина на спонтанное и вызванное освобождение нейромедиатора

В целях оценки эффектов холестерин оксидазы (1 ед. акт. / мл) на спонтанную секрецию медиатора регистрировались МТКП. Воздействие холестерин оксидазы в течение 30 мин не оказывало достоверного влияния на частоту МТКП. Обработка нервно-мышечного препарата холестерин оксидазой не влияла на амплитуду и время нарастания, но увеличивала время полуспада МТКП - до  $133.0 \pm 8.1 \%$  ( $n = 7, p < 0.05$ ). Изменение времени полуспада МТКП может указывать на наличие постсинаптических эффектов холестерин оксидазы. Следует отметить, что увеличение концентрации холестерин оксидазы до 2 ед. акт. / мл приводило к увеличению частоты МТКП с  $1.5 \pm 0.2 \text{ с}^{-1}$  до  $3.3 \pm 0.3 \text{ с}^{-1}$  ( $n=6, p < 0.05$ ). Данное воздействие холестерин оксидазы может быть связано с выходом оксистерола из состава мембран (Steck, Lange, 2010) и снижением концентрации холестерина в мембране (Petrov et al., 2014). Однако данный феномен не является предметом данной работы.

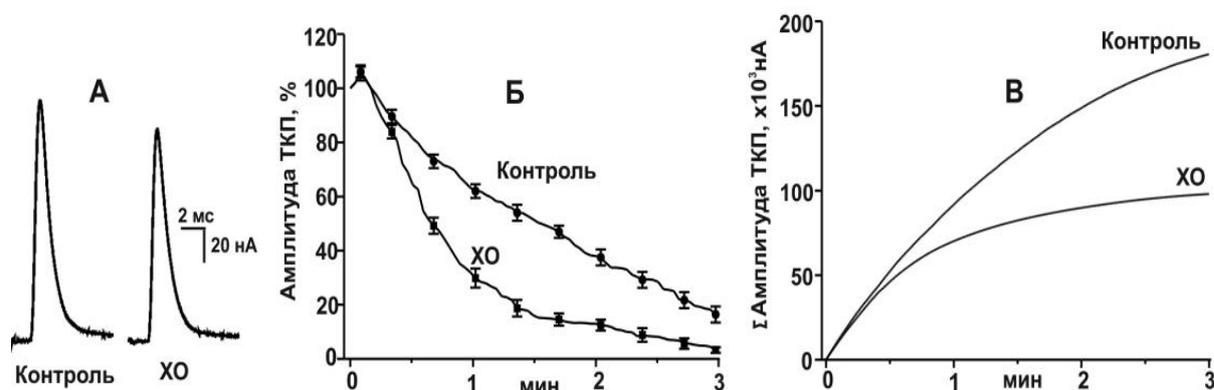


Рис. 63. Влияние окисления холестерина на вызванную секрецию медиатора при низко- и высокочастотной активности

А - нативные ТКП при редком раздражении (0.05 Гц) в контроле и после 30 мин инкубации в холестерин оксидазе (ХО). Б — динамика амплитуды ТКП в течение 3 мин стимуляции с частотой 20 Гц (квадратиками показаны средние значения каждого 360 сигнала). В — кумулятивные кривые амплитуд ТКП, построенные на основании данных, представленных на Б. По осям Y – амплитуда ТКП в % от амплитуды ТКП до стимуляции (Б) или кумулятивная амплитуда ТКП в нА (В); оси X – время от начала стимуляции в мин.

Для оценки вызванной секреции медиатора регистрировали ТКП в ответ на раздражение двигательного нерва. В этом случае 30 мин обработка препарата холестерин оксидазой приводила к достоверному снижению амплитуды ТКП до  $89.0 \pm 4.1 \%$  ( $n = 7$ ,  $p < 0.05$ ) от исходных значений, также увеличивалось время полуспада - до  $110.2 \pm 3.1 \%$  ( $p < 0.05$ ) (Рис. 63 А).

В контрольных экспериментах длительное (3 мин) высокочастотное (20 Гц) раздражение двигательного нерва сопровождалось характерными изменениями амплитуды ТКП (Зефилов А.Л. и др. 2008; Петров и др. 2008; Захаров А.В. и др. 2012; Petrov A.M. et al., 2008). Наблюдалось постепенное, почти линейное, снижение амплитуды ТКП. Через 20 с раздражения амплитуда составляла  $89.5 \pm 1.5 \%$  ( $n = 6$ ,  $p < 0.05$ ) от исходной величины, а через 1 и 3 минуты —  $62.5 \pm 1.6 \%$  ( $p < 0.001$ ) и  $16.1 \pm 4.0 \%$  ( $p < 0.001$ ), соответственно (рис. 63, Б).

После предварительной экспозиции нервно-мышечных препаратов в течение 30 мин в растворе с ферментом динамика амплитуды ТКП при высокочастотном раздражении значительно изменялась. Как и в контроле в препаратах, выдержанных в холестерин оксидазе, в ответ на высокочастотное раздражение в течение первых 20 с стимуляции наблюдалось только небольшое угнетение секреции медиатора - амплитуда ТКП уменьшалась до 87-92% от исходной. Впоследствии регистрировалось быстрое ее снижение, и депрессия амплитуды была существенно более выраженной по сравнению с контрольной депрессией (рис. 63Б). Через 1 и 3 мин амплитуда ТКП снижалась до —  $28.0 \pm 3.5\%$  ( $n = 7$ ,  $p < 0.001$  по сравнению с контрольной динамикой) и  $4.1 \pm 1.0\%$  ( $p < 0.001$ ), соответственно.

Уменьшение амплитуды ТКП в ходе высокочастотной стимуляции вызвано снижением числа порций нейромедиатора, выделяемых на каждый следующий потенциал действия. Поэтому величина, получающаяся при сложении амплитуд ТКП, пропорциональна числу освобожденных квантов за время стимуляции (Захаров А.В. и др. 2012; Betz, Bewick, 1993; Petrov A.M. et al., 2008). Кумулятивная кривая амплитуды ТКП (рис. 63, В) показывает примерно двукратное (~ на 46 %) уменьшение количества освобождаемых квантов медиатора в процессе высокочастотного раздражения в препаратах, подвергшихся действию холестерин оксидазы, по сравнению с контролем.

Ранее на нервно-мышечных синапсах лягушек нами было обнаружено, что  $H_2O_2$  в низких концентрациях (до 300 нМ) не имеет эффектов на освобождение медиатора и

амплитудно-временные параметры МТКП и ТКП (Giniatullin, Giniatullin, 2003, Giniatullin A.R. et al., 2005, 2015). На этом основании можно считать, что вышеописанные эффекты 1 ед. акт. / мл холестерин оксидазы обусловлены окислением холестерина, а не действием  $H_2O_2$ .

Таким образом, окисление холестерина плазматической мембраны снижает вероятность экзоцитоза в ответ на одиночные раздражения и усиливает депрессию секреции медиатора в процессе высокочастотной активности.

#### **4.5.3 Эффекты холестерин оксидазы на эндо- и экзоцитоз синаптических везикул**

Окисление холестерина уменьшает загрузку красителя FM1-43 в нервные окончания и вызывает рассеивание кластеров синаптических везикул. В контрольных условиях (рис. 64, А) интенсивность свечения загруженных красителем нервных окончаний (с помощью стимуляции 20 Гц, 3 мин) составила  $120.1 \pm 5.1$  о.е. ( $n = 7$ ), диаметр нервных терминалей был  $1.3 \pm 0.15$  мкм (кол-во терминалей - 115), а пятна флуоресценции (яркость их свечения -  $145.2 \pm 4.1$  о.е.), обычно овальной формы, были относительно равномерно расположены вдоль терминали с интервалом 1-3 мкм (Зефиоров и др. 2003) (рис. 64, Б). После предварительного (30 мин) действия холестерин оксидазы загрузка FM1-43 была существенно меньше, интенсивность флуоресценции нервных окончаний составляла –  $40.0 \pm 4.1$  о.е. ( $n = 6$ ,  $p < 0.001$ ) (рис. 64, Б, В). При этом диаметр нервных терминалей не отличался от контрольного. Эти данные свидетельствуют об уменьшении количества вновь образовавшихся эндоцитозом синаптических везикул при окислении мембранного холестерина. Одной из причин угнетения эндоцитоза в этом случае, вероятно, является ослабление экзоцитоза, вызванного высокочастотной длительной стимуляцией (рис. 63, В) (Петров и др. 2013).

Интересно отметить, что в предварительно загруженных FM1-43 нервных окончаниях после получасовой обработки нервно-мышечного препарата холестерин оксидазой происходило изменение морфологии пятен (рис. 64, А). Светящиеся пятна расширялись (с  $1.3 \pm 0.3$  до  $3.1 \pm 0.5$  мкм в диаметре,  $n=10$ , кол-во терминалей - 150), в результате рядом расположенные светящиеся группы пятен сливались (рис. 64, Б). При этом средняя флуоресценция в пятне несколько уменьшалась (с  $145.1 \pm 4.2$  о.е. до  $128.2 \pm 4.1$  о.е.,  $p < 0.05$ ,  $n=10$ ), тогда как свечение в границах нервной терминали оставалось

неизменным (значение до и после обработки холестерин оксидазой –  $120.1 \pm 5.1$  о.е. и  $118.4 \pm 5.1$  о.е.,  $n = 10$ ). То есть под влиянием холестерин оксидазы происходит «диффузия» свечения, исходящего от содержащих FM1-43 везикул, что указывает на рассеивание кластеров синаптических везикул.

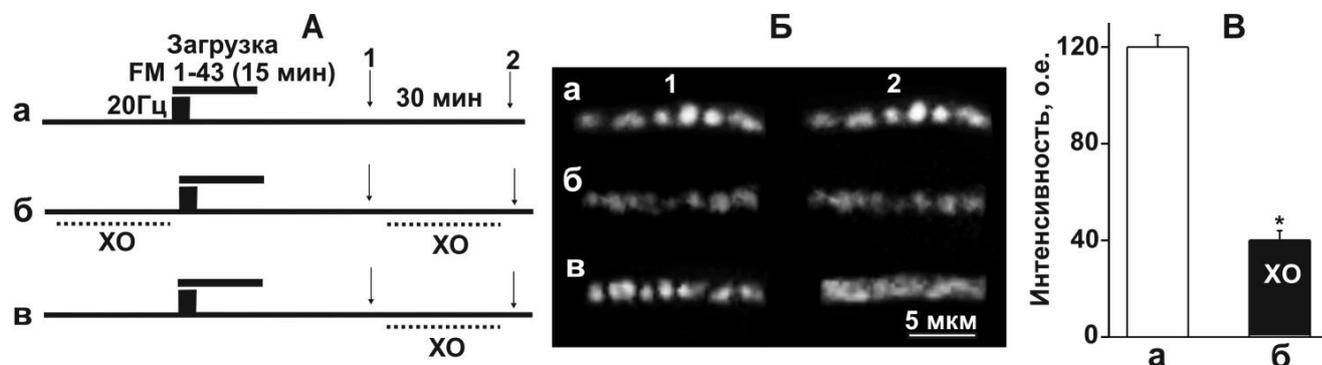


Рис. 64. Эффекты окисления холестерина на загрузку FM1-43 в нервные окончания

А — схемы экспериментов. Черными прямоугольниками обозначена стимуляция 3 мин 20 Гц, толстой чертой (сверху) — аппликация FM1-43, пунктирной линией (снизу) — период инкубации с холестерин оксидазой (ХО), стрелками с индексами 1 и 2 показаны моменты регистрации флуоресценции. Б — изображения участков нервных терминалей, снятые в моменты 1 и 2. В — Значения интенсивности флуоресценции нервных окончаний, загруженных FM1-43, в соответствии с протоколами, изображенными на «а» и «б». Достоверность обозначена \*  $p < 0.001$ .

*Окисление холестерина замедляет выгрузку красителя FM1-43, особенно в начале высокочастотного раздражения.* В контроле при длительной высокочастотной стимуляции нерва в предварительно загруженных нервных окончаниях (рис. 65 А) снижение интенсивности флуоресценции пятен происходило в две фазы – 1) в первые 15 с быстро (на ~20%), 2) после медленнее. Спустя 1 и 3 мин раздражения флуоресценция уменьшалась до  $59.1 \pm 2.1$  ( $p < 0.001$ ) и  $42.0 \pm 2.2$  % ( $p < 0.001$ ,  $n = 10$ ), соответственно (рис. 65 Б, В). Обработка нервно-мышечного препарата холестерин оксидазой после загрузки терминалей красителем (рис. 65 А) полностью предотвращала выгрузку красителя вначале высокочастотной стимуляции: через 15 с стимуляции свечение составляло –  $99.1 \pm 1.0$  % ( $p > 0.05$  от исходного уровня) (рис. 65 Б, В). Однако спустя 20-30 с после начала стимуляции происходило уменьшение флуоресценции, хотя и менее выраженное, чем в контроле. Так, через 1 и 3 мин стимуляции яркость свечения

снижалась до  $87.1 \pm 1.5\%$  ( $p < 0.01$ , относительно контрольной кривой) и  $76.0 \pm 1.7\%$  ( $p < 0.01$ ,  $n = 10$ ).

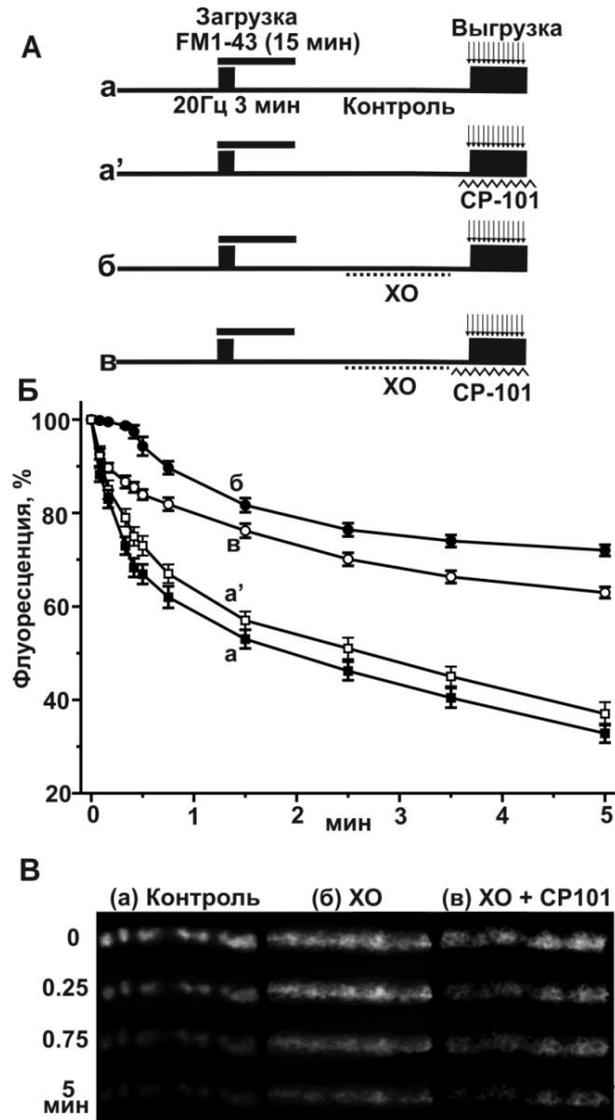


Рис. 65. Влияние окисления холестерина на выгрузку FM1-43 из двигательных нервных окончаний

А — схемы экспериментов, обозначения те же, что и на рис. 64, А. Зигзагообразной линией изображена аппликация сульфородамина 101 (CP-101). Б — Динамика снижения флуоресценции (выгрузки красителя) при стимуляции (20 Гц) предварительно загруженных FM1-43 нервных терминалей. По оси Y — флуоресценции в % (флуоресценция до начала стимуляции - 100%); по оси X — время раздражения в минутах. В — флуоресцентные изображения нервных окончаний. Сбоку - время раздражения в минутах.

Таким образом, после обработки холестерин оксидазой за 3 мин 20 Гц раздражения выделяется на ~ 60 % меньше маркера FM1-43 по сравнению с контролем. Следовательно, окисление холестерина угнетает экзоцитоз синаптических везикул при длительной высокочастотной стимуляции.

Инкубация предварительно загруженного препарата в растворе с повышенным содержанием ионов калия (40 мМ), вызывающего постоянную деполяризацию (Зефиоров и др. 2005), приводит к усилению экзоцитоза синаптических везикул. В итоге через одну минуту действия гиперкалиевого раствора интенсивность флуоресценции снижается до  $75.8 \pm 5 \%$  ( $n=7$ ,  $p<0.05$ ), а к 10 мин – до  $41.9 \pm 3.6\%$  ( $p<0.05$ ). Если загруженное нервное окончание подвергается влиянию холестерин оксидазы, то последующая перфузия гиперкалиевым раствором приводит к значительно меньшим изменениям флуоресценции нервных окончаний, по сравнению с контролем. Так, через минуту стимуляции экзоцитоза гиперкалиевым раствором флуоресценция обработанных холестерин оксидазой нервных терминалей уменьшалась только до  $93.4 \pm 2.4\%$  ( $n=7$ ,  $p<0.05$  по сравнению с контрольной кривой), а через 10 мин – до  $77,1 \pm 1.9\%$  ( $p<0.05$ ). Следует отметить, что после применения холестерин оксидазы выгрузка FM1-43 была особенно замедлена в начальный период действия гиперкалиевого раствора. Таким образом, окисление холестерина угнетает экзоцитоз синаптических везикул, вызванный стойкой деполяризацией пресинаптической мембраны, при применении раствора с повышенным содержанием калия.

Сульфородамин 101 - водорастворимая молекула малого размера (около 1 нм в диаметре), которая способна взаимодействовать с FM1-43, встроенным в мембрану, и моментально тушить флуоресценцию последнего по механизму FRET (Pyle et al., 1999, Winterer et al., 2006). В контроле наличие сульфородамина 101 во внеклеточной среде (рис. 65, А) не оказывало значительного влияния на динамику снижения флуоресценции FM1-43. Так, в первые 15 с высокочастотной стимуляции флуоресценция снижалась на 15-20 %, а к 1 мин и 3 мин раздражения до –  $65.0 \pm 2.1\%$  ( $p>0.05$  относительно контрольной кривой выгрузки) и  $47 \pm 2.3\%$  ( $p>0.05$ ,  $n = 7$ ), соответственно (рис. 65, Б). Если предварительно загруженные нервные окончания подвергались обработке холестерин оксидазой в течение 30 мин, после чего начиналась перфузия раствором, содержащим сульфородамин 101 (рис. 65А), то характер падения флуоресценции FM1-43 при стимуляции существенно изменялся (Рис. 65, Б, В). Вначале 20 Гц раздражения

наблюдалось резкое уменьшение зеленой флуоресценции FM1-43: через 15 с флуоресценция понижалась до  $88.1 \pm 1.0$  % ( $p < 0.01$  относительно кривой выгрузки после воздействия холестерин оксидазы,  $n = 7$ ). Затем снижение флуоресценции замедлялось, в результате к 1 и 3 мин раздражения свечение FM1-43 составило  $80.0 \pm 1.2$  и  $68.1 \pm 1.5$  %, соответственно. Таким образом, сульфородамин 101 (тушитель FM1-43), не влияя на выгрузку в контроле, устраняет замедление снижения флуоресценции нервного окончания в начале высокочастотного раздражения после окисления мембранного холестерина.

#### **4.5.4 Рециклирующий пул везикул и окисление мембранного холестерина**

В нервно-мышечном синапсе лягушки рециклирующий пул синаптических везикул составляет 10-20 % от общего количества везикул и продолжительное время может поддерживать нейротрансдукцию при стимуляции с частотой 1-2 Гц, однако быстро в течение 20-30 с истощается в ответ на высокочастотную стимуляцию (20-30 Гц) (Richards et al., 2000, 2003; Petrov et al., 2008).

В данной серии экспериментов исследовали влияние холестерин оксидазы на процессы экзо- и эндоцитоза везикул рециклирующего пула. При этом использовался эндоцитозный маркер FM2-10, который менее гидрофобный, чем FM1-43, и поэтому быстрее диссоциирует от поверхностных мембран (Betz et al., 1992; Richards et al., 2000). Для селективной загрузки красителя в везикулы рециклирующего пула экзоцитоз везикул вызывали 20 с залпом стимуляции 20 Гц, в течение которой в наружном растворе присутствовал FM2-10 (рис. 66, А). После завершения стимуляции нервно-мышечный препарат перфузировался физиологическим раствором. В контроле флуоресценция нервных окончаний, загруженных описанным способом, составила  $20.2 \pm 2.0$  о.е. ( $n = 12$ ) (рис. 66, Б). Предварительная получасовая обработка препарата холестерин оксидазой практически полностью предотвращала загрузку FM2-10, в этом случае интенсивность флуоресценции оценивалась в  $3.2 \pm 2.0$  о.е. ( $n = 6$ ,  $p < 0.001$ ).

Нервные окончания, с загруженным рециклирующим пулом, в дальнейшем подвергались низкочастотной стимуляции (2 Гц), при этом регистрировалось снижение интенсивности свечения, характеризующее экзоцитоз окрашенных везикул и потерю ими красителя. В контроле стимуляция с частотой 2 Гц приводила сначала к быстрому уменьшению флуоресценции пятен: через 1 мин раздражения яркость снижалась до

$64.0 \pm 5.5\%$  ( $n = 9$ ) (рис. 66, В). Впоследствии падение интенсивности свечения замедлялось, в итоге к 10 мин раздражения флуоресценция уменьшалась до  $30.9 \pm 5\%$ . Обработка предварительно загруженных FM2-10 препаратов холестерин оксидазой существенно замедляла выгрузку маркера.

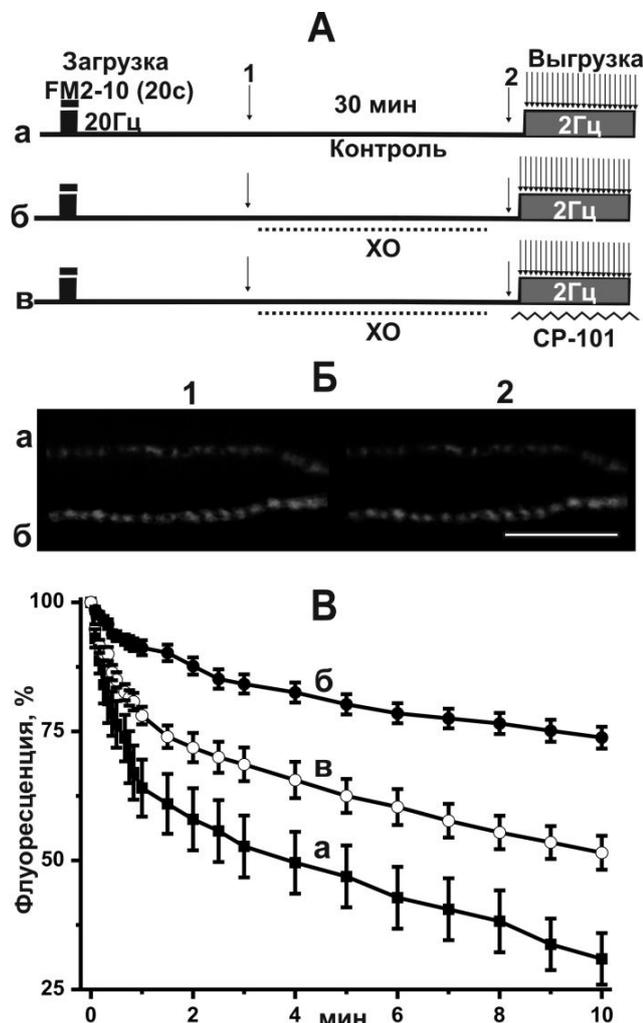


Рис. 66. Влияние окисления холестерина на функционирование синаптических везикул рециклирующего пула

А - схемы экспериментов, обозначения те же, что и на рис. 64, А. Зигзагообразной линией изображена аппликация сульфородамина 101 (CP-101). Серые прямоугольники показывают стимуляцию с частотой 2 Гц. Б — изображения участков нервных терминалей до (1) и после 30 мин инкубации (2) в физиологическом растворе (а) или растворе с холестерин оксидазой (ХО) (б). Шкала – 10 мкм. В — Временной ход уменьшения флуоресценции нервных терминалей (выгрузка красителя FM2-10) в ответ на стимуляцию 2 Гц. По оси Y — флуоресценции в % (флуоресценция до начала стимуляции - 100% ); по оси X – время раздражения в мин.

В течение 1 мин стимуляции яркость флуоресценции снизилась только до  $91.2 \pm 1.4\%$  ( $p < 0.001$  относительно контрольной кривой выгрузки), а к 10 мин раздражения интенсивность свечения составила –  $73.8 \pm 2.1\%$  ( $p < 0.001$ ,  $n = 10$ ) (рис. 66 В). Интересно отметить, что после воздействия холестерин оксидазы увеличения площади пятен, указывающие на рассеивание везикул рециклирующего пула, не наблюдалось (рис. 66 Б).

Если после ферментативного окисления холестерина производить выгрузку красителя в присутствии сульфородамина 101 во внеклеточном растворе (рис. 66 А), то снижение яркости флуоресценции нервного окончания происходит достоверно быстрее. Так, через 1 мин раздражения флуоресценция уменьшается до  $78.1 \pm 1.7\%$  ( $p < 0.01$  относительно эффекта холестерин оксидазы), а к 10 мин – до  $51.5 \pm 2.0\%$  ( $p < 0.01$ ,  $n = 8$ ) (рис. 66 В).

Таким образом, окисление холестерина воздействует на механизм освобождения медиатора везикулами рециклирующего пула. При этом везикулы этого пула не рассеиваются внутри нервного окончания после воздействия холестерин оксидазы.

#### **4.5.5 Влияние окисления холестерина на этапы везикулярного цикла в нервно-мышечном синапсе. Возможные механизмы**

Как уже было показано, холестерин пресинаптической мембраны участвует в процессах экзоцитоза синаптических везикул. При этом с одной стороны холестерин может непосредственно связываться с белками экзоцитоза, такими как синаптобревин, синтаксин (Taverna et al., 2004; Jia et al., 2006, Murray, Tamm, 2009; Tong et al. 2009). С другой стороны, холестерин со сфинголипидами формирует липидные плотки в сайтах экзоцитоза, которые могут быть сайтами, где концентрируются и активируются SNARE белки (Зефилов А.Л., Петров А.М., 2010; Петров и др., 2011). Ранее нами было показано, что частичное вытеснение холестерина 1 мМ МЦД из мембраны нервных окончаний приводит к снижению вызванного освобождения медиатора и усиливает депрессию в ходе 20 Гц стимуляции (Петров и др. 2009; Petrov et al., 2011; Тараканова и др., 2011).

Окисление мембранного холестерина может повышать его подвижность, в результате он может покидать мембрану (Lange Y, Steck TL, 2010), поэтому содержание мембранного холестерина может снижаться и нарушаться стабильность рафтов. В соответствии с этим сценарием холестерин оксидаза работает как МЦД. Однако в

клеточных мембранах продукт окисления холестерина, в отсутствие акцепторов (например, липопротеинов высокой плотности, МЦД) во внеклеточной среде не покидает мембрану (Neuvonen et al., 2014). Появление окисленного варианта холестерина в модельных мембранах (4-холестен-3-она) сказывается на способности холестерина взаимодействовать с белками и липидами. Возможно, 4-холестен-3-он может изменять фазовое состояние мембран (Ahn, Sampson, 2004). В нашем исследовании окрашивание препарата на скопления ганглиозидов GM1 выявило избирательное снижение количества липидных плотиков в регионе нервного окончания после обработки холестерин оксидазой. Позднее данные о том, что холестерин оксидаза может способствовать разрушению липид-упорядоченной фазы и экспансии липид-неупорядоченной фазы в мембране, были получены при исследовании фибробластов. Причем образуемый холестерин оксидазой 4-холестен-3-он может вызывать длительный дефект организации мембраны (Neuvonen et al., 2014). Нарушение липидных рафтов может быть причиной угнетения секреции медиатора и экзоцитоза синаптических везикул в ответ на одиночные раздражения при окислении холестерина плазматической мембраны. Угнетение экзоцитоза было более выраженным при высокочастотном раздражении, начиная с 20-30 с высокочастотного раздражения. Учитывая, что у лягушки в освобождение медиатора после 20-30 с стимуляции с частотой 20 Гц вовлекаются преимущественно везикулы резервного пула (Зефилов и др. 2008а; Захаров и др. 2012; Richards et al., 2000; Petrov et al., 2008), можно предположить нарушение доставки везикул резервного пула в сайты экзоцитоза после воздействия холестерин оксидазы. Сниженная скорость выгрузки FM-красителя после 20-30 с раздражения (20 Гц), то же свидетельствует об ослаблении транспорта синаптических везикул в готовый к освобождению пул.

В состав липидных плотиков входят многие сигнальные молекулы, поэтому при разрушении плотиков происходит изменение внутриклеточной сигнализации (активация ряда протеинкиназ), и как следствие, перестройка цитоскелета (Gaffield et al., 2006; Smith et al., 2010; Dason et al., 2014; Petrov et al., 2014, 2015). Возможно, что нарушение транспорта везикул связано с нарушением цитоскелета, в естественных условиях не позволяющего везикулам «разбегаться» в стороны и обеспечивающего формирование кластера везикул резервного пула в нервно-мышечном синапсе лягушки. В пользу этого говорит расширение кластеров синаптических везикул после обработки холестерин

оксидазой, указывающее на удаление части везикул от сайтов экзоцитоза в активной зоне. В нервно-мышечном синапсе лягушки и гиппокампальных синапсах схожее нарушение кластеризации везикул, ведущее к расширению областей свечения FM1-43 и угнетению выделения медиатора в ответ на высокочастотную стимуляцию, наблюдается под действием ингибитора фосфатаз ооадаиковой кислоты в высокой концентрации (Betz, Henkel, 1994; Henkel et al., 1996; Gaffield et al., 2006). Увеличение размеров свяющихся пятен, отражающее рассеивание кластеров везикул, может происходить за счет избыточной активации различных протеинкиназ. Так, рассеивание скоплений синаптических везикул наблюдается на фоне фосфорилирования MAP- или циклин-зависимой киназами синапсинов – белков, участвующих в организации межвезикулярных взаимодействий (Monaldi et al., 2010). Интересно отметить, что «расплывание» пятен после инкубации в холестерин оксидазе не наблюдалось, если в нервном окончании с помощью красителя FM2-10 был маркирован избирательно рециклирующий пул везикул. На этом основании можно сделать предположение о нарушении кластеризации везикул только резервного пула при окислении мембранного холестерина.

Окисление холестерина и kiss-and-run механизм освобождения медиатора. После обработки холестерин оксидазой в впервые 20 с высокочастотной активности динамика секреции медиатора не отличается от контрольной. Однако в подвергшихся действию холестерин оксидазы препаратах выгрузки красителя FM1-43 в первые 20 с высокочастотной стимуляции не происходит. Другими словами, после окисления холестерина, вначале высокочастотной активности, освобождение медиатора из синаптических везикул происходит, тогда как молекул флуоресцентного красителя, имеющего время диссоциации от мембраны порядка десятка секунд, нет. Объяснить наблюдаемый феномен можно, если предположить, что работающие вначале высокочастотной стимуляции везикулы рециклирующего пула освобождают медиатор через короткоживущую белковую пору (kiss-and-run механизм), которая препятствует латеральной диффузии липофильных молекул FM1-43. Так, предположение о наличии kiss-and-run механизма в двигательных нервных окончаниях лягушки и терминалях гиппокампа были сделаны на основании того, что гиперосмотические растворы сахарозы увеличивают спонтанную секрецию медиатора, которая не сопровождается выгрузкой FM1-43 (Зефилов и др. 2004; Stevens, Williams, 2000). Возможными

кандидатами на роль порообразующих протеинов являются — синтаксин, синаптобревин и V0-часть протонной помпы (Morel, 2003; Jackson, Chapman, 2008). Подтверждают сказанное результаты экспериментов с сульфородамином 101. Это вещество, благодаря своим малым размерам, может проникать через поры с диаметром более 1.5 нм. По всей видимости, молекулы сульфородамина 101, проникая в полость везикулы через короткоживущую пору, связываются с молекулами FM1-43, встроенными в мембрану синаптических везикул, и тушат зеленое свечение красителя (Winterer et al., 2006). Это существенно ускоряет снижение интенсивности зеленой флуоресценции FM1-43 в начале высокочастотной стимуляции в препаратах, обработанных холестерин оксидазой (но не в контрольных).

Для верификации высказанных предположений были проведены дополнительные эксперименты с более гидрофильным красителем FM2-10, которым загружался рециклирующий пул. Предварительная обработка холестерин оксидазой практически полностью предотвращала захват FM2-10 в нервное окончание. Это указывает на осуществление освобождения медиатора в течение 20 с высокочастотной стимуляции через пору, непроницаемую для молекул FM2-10. В случае, если предварительно загруженные FM2-10 препараты подвергались действию холестерин оксидазы, то последующая выгрузка красителя, вызванная низкочастотной стимуляцией (2Гц) и стимулирующая экзоцитоз везикул избирательно рециклирующего пула, происходила намного медленнее, чем в контроле. При этом на фоне сульфородамина 101 снижение флуоресценции FM2-10 существенно ускорялось. Это также указывает на тушение эмиссии молекул FM2-10, встроенных в мембраны везикул, молекулами сульфородамина 101, проникающими при экзоцитозе сквозь пору в полость везикулы.

До сих пор ведутся дискуссии о существовании kiss-and-run механизма освобождения медиатора в пресинаптических нервных окончаниях в физиологических условиях (Зефилов, Петров, 2010а; Granseth et al., 2009; Watanabe et al., 2013; Watanabe, 2015; Petrov et al., 2015). Изменения механизма освобождения медиатора под влиянием холестерин оксидазы могут быть связаны с изменениями во внутриклеточной сигнализации. Предполагается, что фосфорилирование (например, протеинкиназой С) шаперона NSF, обеспечивающего разборку SNARE-комплекса, или комплексинов, стабилизирующих SNARE комплекс, может регулировать механизм экзоцитоза (Matveeva et al., 2001, Зефилов, Петров, 2010а), связанный со скоротечным

формированием поры слияния. Кроме того, миозин II, участвующий в хромаффинных клетках в расширении поры слияния, также имеет несколько сайтов для фосфорилирования протеинкиназами (Neco et al., 2008). Молекула холестерина важна для стабилизации поры слияния и напрямую взаимодействует с трансмембранными доменами синаптобrevина, формирующего пору (Tong et al., 2009). Возможно, окисление холестерина резко замедляет расширение поры слияния, увеличивает длительность ее существования и вероятность закрытия, запуская kiss-and-run механизм. Причем при окислении мембранного холестерина kiss-and-run механизм использует только часть везикул. Это может быть связано с тем, что везикулы рециклирующего пула имеют уникальную белково-липидную композицию (Rey et al., 2015), позволяющую им в некоторых условиях освобождать медиатор через скоротечную пору слияния.

Следует отметить, что выгрузка FM1-43 и FM2-10 из нервных окончаний, обработанных холестерин оксидазой, происходит частично, и значительная часть красителя остается в нервных окончаниях, тогда как на фоне сульфородамина 101 наблюдается более значительное снижение флуоресценции обоих красителей. Возможно, везикулы рециклирующего пула, освободившие медиатор, вначале высокочастотной стимуляции длительное время занимают сайты экзоцитоза, и везикулы резервного пула доставляются в собственные сайты экзоцитоза. Это говорит в пользу гипотезы о существовании отдельных сайтов экзоцитоза и путей рециклирования для везикул рециклирующего и резервного пулов (Петров и др., 2008; Захаров и др. 2012; Petrov et al., 2008).

***Окисление холестерина и эндоцитоз синаптических везикул.*** Предварительное ферментативное окисление холестерина мембран приводило почти к трехкратному уменьшению захвата красителя FM1-43, вызванного длительной высокочастотной стимуляцией. Однако данное снижение интенсивности процессов эндоцитоза можно полностью объяснить изменениями в интенсивности и механизме экзоцитоза синаптических везикул. Во-первых, угнетение процессов экзоцитоза при длительной высокочастотной стимуляции под действием холестерин оксидазы (примерно на 46%) должно привести к эквивалентному уменьшению загрузки маркера. Кроме того, если везикулы рециклирующего пула, составляющие 10-20% от общей популяции синаптических везикул (Richards et al., 2000; Rizzoli, Betz, 2005, Захаров и др. 2012),

освобождают медиатор через формируемую на короткое время пору слияния (kiss-and-run механизм), следовательно, не захватывают FM1-43, то загрузка красителя в нервные окончания при высокочастотной активности будет еще меньше. Отсюда можно предположить, что окисление холестерина пресинаптической мембраны не имеет существенного влияния на механизмы эндоцитоза синаптических везикул непосредственно. Это согласуется с ранее полученными в нашей лаборатории данными о незначительном влиянии удаления холестерина из пресинаптической мембраны на эндоцитоз синаптических везикул, протекание которого зависит от везикулярного холестерина (Петров и др. 2009; Petrov et al., 2011).

Итак, окисление небольшого количества холестерина дестабилизирует липидные плотники в двигательных нервных окончаниях и вызывает существенные изменения в синаптической передаче. Снижается вероятность экзоцитоза синаптических везикул, и угнетается транспортировка везикул резервного пула в сайты экзоцитоза, вероятно, вследствие нарушения их кластеризации. Также предполагается, что везикулы рециклирующего пула начинают использовать kiss-and-run механизм освобождения медиатора. Следовательно, не только наличие холестерина (Петров и др. 2009; Taverna et al., 2004, 2007; Zamir, Charlton, 2006; Tong et al., 2009; Linetti et al., 2010; Petrov et al., 2011, 2014, 2015), но и состояние холестерина может влиять на процессы экзоцитоза и доставки везикул в активную зону.

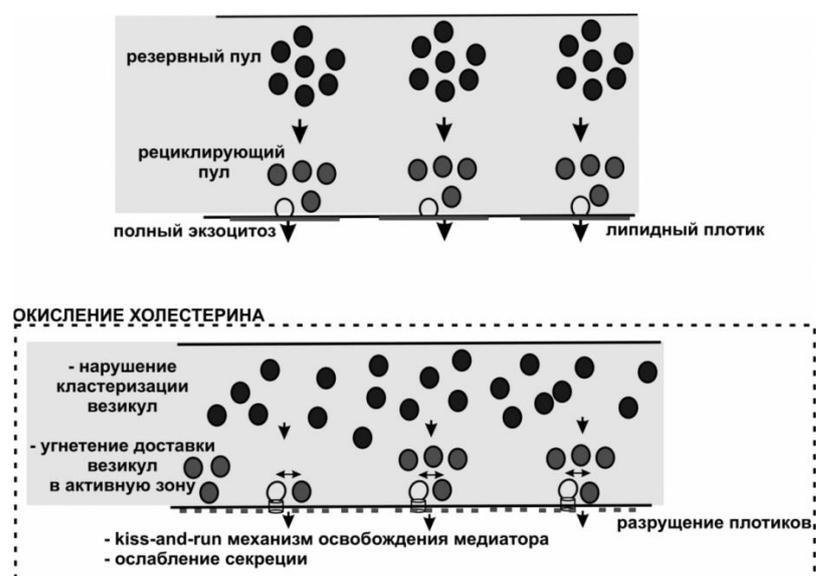


Рис. 67. Изменение функционирования пулов синаптических везикул при окислении мембранного холестерина

Полученные в работе данные впервые указывают на изменения в пресинаптическом везикулярном цикле, вызванные появлением окисленной формы холестерина. Учитывая, что в естественных условиях окисление холестерина постоянно происходит в синаптических мембранах (Puglielli et al., 2005), можно рассматривать 4-холестен-3-он как новый потенциальный эндогенный регулятор цикла синаптических везикул. Молекулярные механизмы обнаруженных эффектов окисления мембранного холестерина на пресинаптический везикулярный цикл требуют дальнейших исследований (Петров и др. 2013).

#### **4.6 Влияние окистерола, 5 $\alpha$ -холестан-3-она, на экзо-эндоцитозный цикл синаптических везикул в нервно-мышечном синапсе мышцы**

Окистеролы, образуемые из мембранного холестерина, обнаружены в нейрональных мембранах, и их количество существенно изменяется при многих нейродегенеративных заболеваниях (Leoni, Caccia, 2011). Однако очень мало известно об эффектах продуктов окисления холестерина на синаптическую передачу (Петров, Зефирова, 2013, 2014). Последние данные указывают на то, что некоторые окистеролы потенциально могут модулировать нейротрансмиссию. В частности, обнаружено, что 24-гидроксихолестерин является мощным эндогенным аллостерическим модулятором глутаматных NMDA-рецепторов (Paul et al., 2013). Нами показано, что ферментативное окисление холестерина до 4-холестен-3-она воздействует на экзоцитоз и поведение пулов синаптических везикул (Петров и др. 2013). В случае редкого генетического заболевания, церебротендинального ксантоматоза (вызванного мутацией в гене стерол-27-гидроксилазы, CYP27A1), наблюдается накопление холестеранола в тканях (особенно в мозге) и, как следствие, серьезные неврологические дисфункции и миопатия (Menkes et al., 1968, Våvner et al., 2010). Холестеранол присутствует в малых количествах во всех тканях здоровых животных и людей. 5 $\alpha$ -холестан-3-он синтезируется как промежуточный продукт на пути образования холестеранола из холестерина, и он детектируется в следовых концентрациях в плазме крови пациентов с церебротендинальным ксантоматозом (Salen, Polito, 1972; DeBarber, et al., 2011). Концентрация 5 $\alpha$ -холестан-3-она в плазме мутантных мышей, лишенных CYP27A (-/-) составляет 200 нМ. Уровень этого окистерола значительно ниже, чем 7-гидрокси производных холестерина (DeBarber, et al., 2011), которые рассматриваются как главные

факторы, ответственные за токсичность (Björkhem, 2013). Данные об эффектах 5 $\alpha$ -холестан-3-она на клеточные процессы, включая синаптическую передачу, которая драматично нарушается при церебротендинальном ксантоматозе, отсутствуют.

В рамках представленной главы мы исследовали с помощью оптических и электрофизиологических методов влияние 5 $\alpha$ -холестан-3-она в наномолярной концентрации на свойства синаптических мембран и нейротрансмиссию в нервно-мышечном препарате диафрагмы мыши. Также была изучена зависимость эффектов 5 $\alpha$ -холестан-3-она от содержания мембранного холестерина.

#### **4.6.1 5 $\alpha$ -Холестан-3-он изменяет свойства синаптических мембран**

Мы исследовали вопрос, может ли 5 $\alpha$ -холестан-3-он нарушать стабильность липидных рафтов в нервно-мышечном синапсе мыши, используя меченную субъединицу В холерного токсина (ХТ-В) и специфический лиганд никотинового ацетилхолинового рецептора –  $\alpha$ -бунгаротоксин ( $\alpha$ БТ). Флуоресцентные пятна наблюдались в синаптических регионах окрашенных ХТ-В препаратов. Меченные ХТ-В пятна колокализовались с  $\alpha$ БТ-окрашенными участками в интактных препаратах, но распределение ХТ-В было несколько более узким, что указывает на локализацию в мембране двигательных нервных окончаний и первичных постсинаптических складок (рис. 68А). Колокализация оставалась без изменений в мышцах, обработанных 5 $\alpha$ -холестан-3-оном в течение 20 мин, но флуоресценция ХТ-В значительно уменьшалась. В контроле средняя интенсивность флуоресценции пятен была  $83.6 \pm 3.8$  о.е. ( $n=7$ , 64 мышечных волокна) и после обработки 5 $\alpha$ -холестан-3-оном уменьшалась до  $48.4 \pm 4.5$  ( $n=7$ , 69 мышечных волокон,  $p<0.01$  по сравнению с контролем), т.е. на более чем 40% (рис. 64 Б). Важно, что ХТ-В имеет пять центров связывания для ганглиозида GM1 и может селективно взаимодействовать с GM1-молекулами, преимущественно локализованными в рафтах (Schwan et al., 2011, Margheri et al., 2014). Таким образом, значительное уменьшение окрашивания ХТ-В после воздействия 5 $\alpha$ -холестан-3-она может быть вызвано разрушением рафтов, что ведет к «утечке» GM1 молекул в синаптическую мембрану без рафтов (нарушение их кластеризации) или к снижению содержания GM1 ганглиозидов в поверхностной мембране.

Поскольку ХТ-В может в небольшой степени связываться с гликозилированными поверхностными белками (Blank et al., 2007), то он имеет ограниченную специфичность

для GM1 ганглиозидов. Для дополнительной проверки гипотезы о влиянии 5 $\alpha$ -холестан-3-она на фазовые свойства мембраны, мы использовали мечение 22-NBD-холестерином. 22-NBD-холестерин – это чувствительная к окружению метка, которая реагирует на фазовые изменения мембранных липидов, увеличивая интенсивность флуоресценции в ответ на смену микроокружения в направлении от липид-упорядоченного (рафты) к неупорядоченному (не рафты) состоянию мембраны (Loura et al., 2001, Ostasov et al., 2013). Флуоресцентные полоски 22-NBD-холестерина визуализировались в мембране мышечных волокон, и его флуоресценция, наблюдавшаяся в синаптическом регионе, имела сходства с окрашиванием  $\alpha$ БТ. Хотя следует отметить, что в синапсе флуоресценция 22-NBD-холестерина была более широко распространена, чем  $\alpha$ БТ (рис. 68, В). Добавление 5 $\alpha$ -холестан-3-она вызывало постепенное увеличение флуоресценции в синаптическом регионе (рис. 68, Г): в итоге в течение 20 мин аппликации оксистерола флуоресценция увеличивалась до  $124 \pm 4.3\%$  относительно исходного значения ( $n=7$  мышей,  $p < 0.05$  по сравнению с исходным значением и контрольной кривой). Это увеличение флуоресценции предполагает нарушение стабильности липидных рафтов в течение 20 мин аппликации 5 $\alpha$ -холестан-3-она.

Для исследования локализации белка активной зоны синтаксина 1 и белка синаптических везикул синаптофизина, мы использовали иммуномечение специфичными антителами. Рис. 68 Д показывает иммунохимическую детекцию синтаксина 1 (красный) и синаптофизина (зеленый канал) в нервных терминалях с помощью конфокальной микроскопии. Флуоресценция обоих каналов имеет специфичный нерегулярный характер распределения в пределах синаптического региона. Красная и зеленая флуоресценция в основном были колокализованы в контрольных нервных терминалях, но иммуноэкпрессия синаптофизина распространялась на большие синаптические области. Это было вполне ожидаемо, так как синтаксин 1 - белок активной зоны, а синаптофизин концентрируется в мембранах синаптических везикул, формирующих «облачко» над активной зоной. Предварительная обработка 5 $\alpha$ -холестан-3-оном ( $n=5$  мышей) не нарушала мечение синтаксина или синаптофизина, и выраженность перекрывания в распределении этих двух белков была подобной той, что наблюдалась в контроле ( $n=5$ ). Это указывает на отсутствие значительных изменений в организации активной зоны под воздействием 5 $\alpha$ -холестан-3-она.

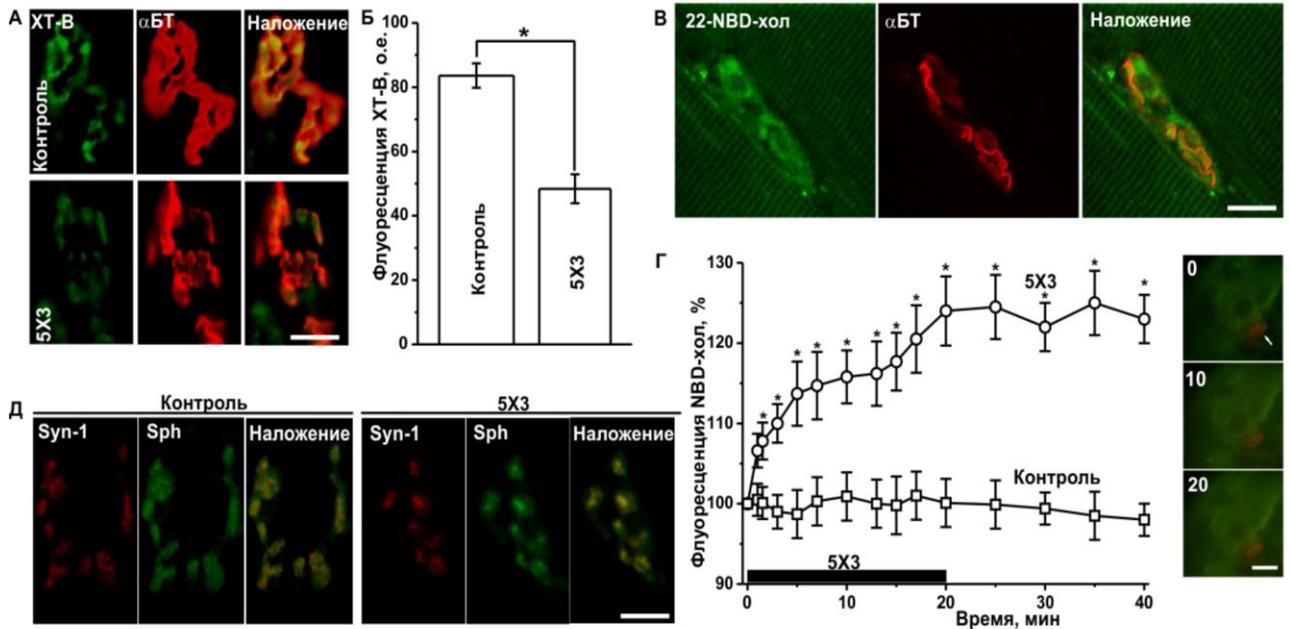


Рис. 68. Влияния 5α-холестан-3-она (5X3) на синаптическую мембрану

А – Двойное окрашивание нервно-мышечных синапсов субъединицей В холерного токсина, меченного Alexa-488 (зеленый канал, ХТ-В), и конъюгированным с родамином α-бунгаротоксином (αБТ, красный) в контроле и после предварительной обработки 5X3. Наложение изображений в зеленом и красном каналах иллюстрирует относительное распределение пресинаптических липидных плотиков (меченных ХТ-В) и постсинаптических ацетилхолиновых рецепторов (меченных БТ). Шкала – 15 мкм. Б – Флуоресценция (в о.е.) ХТ-В в синаптическом регионе в контроле и после обработки 5X3. Звездочки обозначают достоверность различий (\*  $p < 0.01$ ). В – Флуоресцентные изображения нервно-мышечных синапсов, меченных одновременно 22-NBD холестерином (зеленый) и αБТ (красный). Третье изображение представляет перекрывание изображений в зеленом и красном каналах. Шкала – 15 мкм. Г – Изменения флуоресценции 22-NBD-холестерина в нервно-мышечных синапсах в покое (открытые квадратики) и в условиях аппликации 5X3 (открытые кружки). Аппликация 5X3 показана тонкой линией. Увеличение флуоресценции 22-NBD-холестерина указывает на изменение фазы мембраны (с липид-упорядоченной на липид-неупорядоченную). Ось Y – флуоресценция в % (исходная флуоресценция перед добавлением 5X3 принята за 100%). Звездочки обозначают достоверность различий (\*  $p < 0.05$ ). Справа, флуоресцентные изображения 22-NBD-холестерина в синаптическом регионе в моменты времени перед (0) и после 10 и 20 мин действия 5X3. Последний миелиновый сегмент окрашен FM4-64 (красный) и обозначен стрелкой. Шкала, 5 мкм.

Рис. 68 (продолжение)

Д – Иммунолокализация синтаксина 1 (Syn-1, белок активной зоны) и синаптофизина (Sph, белок синаптических везикул) в контроле (слева) и в обработанных 5X3 нервно-мышечных синапсах (справа). Флуоресцентные изображения препаратов, одновременно меченных анти-Syn-1 (красный) и анти-Sph (зеленый) антителами. Изображения в красном и зеленых каналах наложены для иллюстрации относительного распределения белка активной зоны и везикулярного белка. Шкала, 15 мкм.

#### **4.6.2 5 $\alpha$ -Холестан-3-он подавляет освобождение нейромедиатора при низкой и высокой частоте стимуляции, не влияя на спонтанное освобождение**

Для исследования эффектов 200нМ 5 $\alpha$ -холестан-3-она на спонтанное освобождение мы сначала записывали МТКП в контрольных условиях, затем в течение 20 мин перфузии раствором с 5 $\alpha$ -холестан-3-оном (рис. 69, Аа). Амплитуда и частота МТКП в контроле были  $4.3 \pm 0.3$  нА и  $1.8 \pm 0.4$  с<sup>-1</sup> (n=6), соответственно (рис. 69 Аб и Ав). Амплитуда и частота не изменялись при обработке 5 $\alpha$ -холестан-3-оном ( $4.2 \pm 0.2$  нА и  $1.9 \pm 0.4$  с<sup>-1</sup>, после 20 мин аппликации 5X3, n=6, p>0.05) и оставались неизменными после отмывки 5 $\alpha$ -холестан-3-она. Однако, под воздействием 5 $\alpha$ -холестан-3-она происходило необратимое снижение амплитуды ТКП до  $70 \pm 5\%$  (n=5, p<0.05 по сравнению с контролем) (рис. 69 Ба и Бб). Этот эффект проявлялся в течение 10 мин после начала аппликации 5 $\alpha$ -холестан-3-она, достигал плато к 20 мин и сохранялся в течение, по крайней мере, 1 часа. Это предполагает, что 5 $\alpha$ -холестан-3-он ингибирует вызванную, но не спонтанную секрецию нейромедиатора.

Для дальнейшего исследования влияния 5 $\alpha$ -холестан-3-она на синаптическую передачу мы изучали кратковременную синаптическую пластичность в препаратах, обработанных 5 $\alpha$ -холестан-3-оном, используя парное раздражение двигательного нерва с интервалами в диапазоне 5 - 50 мс между импульсами (рис. 69 В). Увеличение или уменьшение амплитуды второго ТКП по отношению к первому отражает облегчение (фасилитацию) или депрессию, соответственно. Контрольные синапсы характеризовались небольшим (4-6%) увеличением амплитуды второго ТКП. Такое облегчение при парной стимуляции хорошо согласуется с ранее полученными данными (Hong et al., 1989, Liu et al., 2011). Подобный же протокол парной стимуляции вызывал немного более сильное облегчение в обработанных 5 $\alpha$ -холестан-3-оном синапсах.

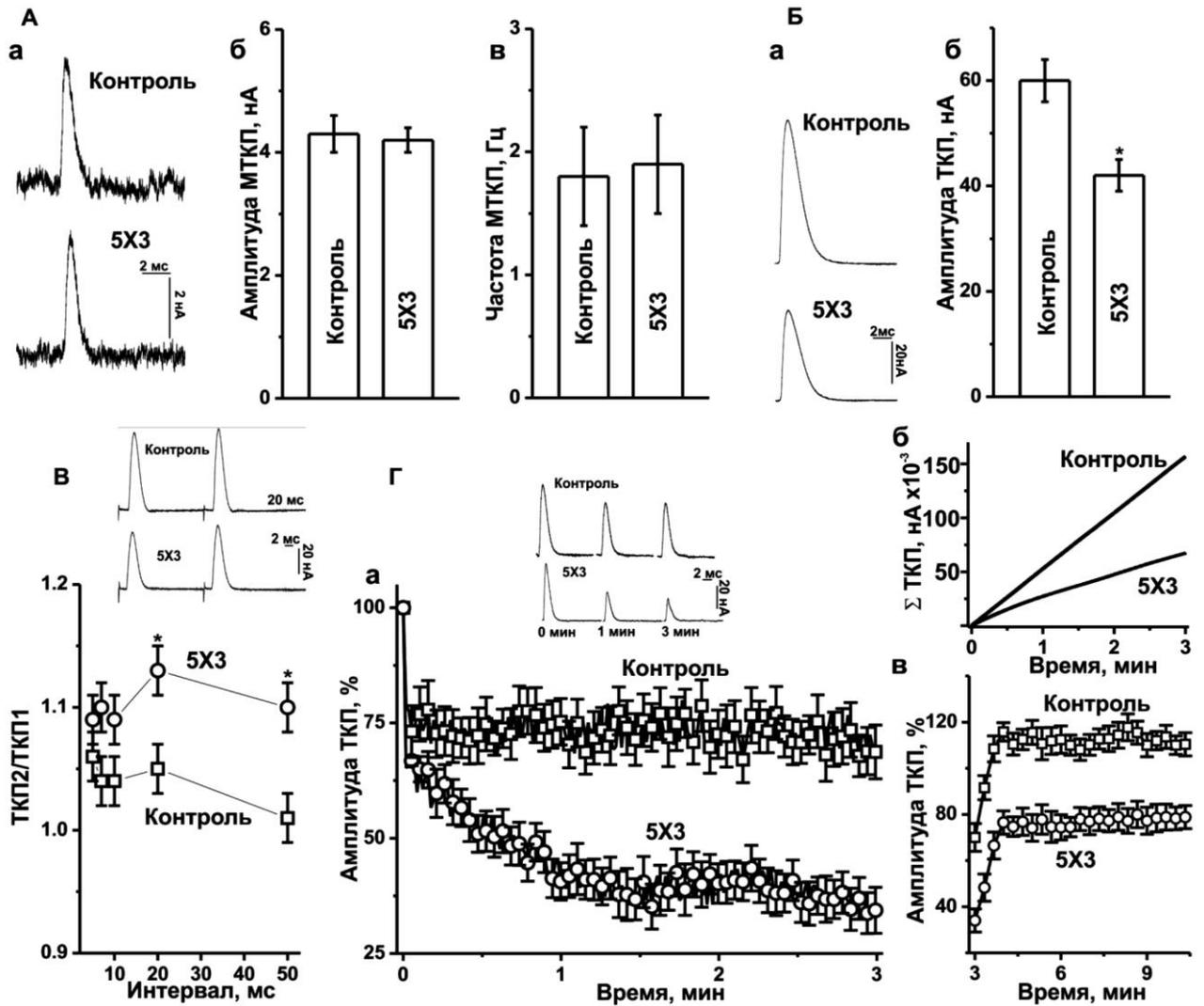


Рис. 69. Эффекты 5α-холестан-3-она (5X3) на спонтанное и вызванное освобождение нейромедиатора

А - 5X3 не влиял на спонтанное освобождение. а, примеры МТКП, записанных в контрольных условиях и после 20 мин аппликации 5X3. б и в, количественный анализ амплитуды (в нА) и частоты (в  $\text{с}^{-1}$ ) МТКП. В препаратах, обработанных 5X3, амплитуда и частота МТКП была такой же, как в контроле. Б – уменьшение освобождения нейромедиатора в ответ на одиночный стимул в нервно-мышечных синапсах под влиянием 5X3. а, Примеры ТКП, записанных перед и после 20 мин экспозиции 5X3. б, Амплитуда ТКП (в нА), запускаемая низкочастотной стимуляцией (0.05 Гц) в контроле и после 20 мин действия 5X3. Звездочки обозначают достоверность различий (\* $p < 0.05$ ). В – Облегчение ТКП при парной стимуляции в контроле и в обработанных 5X3 препаратах. Сверху, примеры ТКП, записанных при парном раздражении с межимпульсным интервалом равным 20 мс.

Рис. 69 (продолжение)

Внизу, отношение амплитуды второго к первому ТКП (ТКП2/ТКП1), построенное как функция от длительности межимпульсных интервалов. После воздействия 5ХЗ облегчение при парной стимуляции становится более выраженным, чем в контроле. Звездочки обозначают достоверность различий (\*  $p < 0.05$ ). Г – Изменение синаптической передачи в течение и после высокочастотной стимуляции в обработанных 5ХЗ нервно-мышечных синапсах. а, Изменения в амплитуде ТКП, вызванные высокочастотной стимуляцией (3 мин, 20 Гц), в контроле (светлые квадратики) и после обработки 5ХЗ в течение 20 мин перед началом эпизода стимуляции (светлые кружочки). Сверху, представлены ТКП в контроле и в обработанных 5ХЗ синапсах в моменты времени 0, 1 и 3 мин от начала стимуляции двигательного нерва с частотой 20 Гц. б, Кумулятивные кривые амплитуды ТКП (в нА) в течение высокочастотной стимуляции. Отличие в наклоне кривых показывает, что предварительная обработка 5ХЗ уменьшает амплитуды ТКП вызванные стимуляцией (3 мин 20Гц). в, Восстановление амплитуды ТКП после высокочастотной стимуляции (3 мин 20Гц). Временная шкала начинается с 3 мин, когда стимуляционный шлейф был завершен. Y (на а и в): изменение амплитуды ТКП в процентах (начальная амплитуда до стимуляции принята за 100%).

Например, отношение амплитуд второго к первому ТКП было  $1.05 \pm 0.02$  ( $n=5$ , 15 мышечных волокон) в контроле, и  $1.13 \pm 0.02$  ( $n=5$ , 15 мышечных волокон,  $p < 0.05$ ) в препаратах после воздействия 5 $\alpha$ -холестан-3-она. Эти изменения в облегчении при парной стимуляции указывают на уменьшение исходной вероятности освобождения медиатора после воздействия 5 $\alpha$ -холестан-3-она.

Высокочастотная стимуляция 3 мин 20 Гц вызывает двухфазное изменение амплитуды ТКП (Рис. 69 Га). В контрольных условиях, в течение 0.4 с, амплитуда быстро уменьшается, и затем остается на относительно постоянном уровне («плато») около 70-75% ( $n=6$ ,  $p < 0.01$ ) от предстимуляционного значения на протяжении оставшегося периода стимуляции. После обработки 5 $\alpha$ -холестан-3-оном фаза плато исчезала. Сразу после начального быстрого снижения, амплитуда ТКП продолжала уменьшаться с медленной скоростью. В результате, после 1 и 3 мин стимуляции амплитуда ТКП уменьшалась до  $42 \pm 5\%$  ( $n=6$ ,  $p < 0.01$  относительно контрольной кривой) и  $34 \pm 5\%$  ( $p < 0.001$  относительно контрольной кривой), соответственно. Суммация

амплитуды ТКП в течение ритмической активности позволила нам сравнить общее количество квантов освобожденного нейромедиатора (Betz, Bewick, 1993; Petrov et al., 2008) в контроле и после воздействия 5 $\alpha$ -холестан-3-она (Рис. 69, Гб). Кумулятивная амплитуда ТКП была значительно уменьшена (на 48%,  $p < 0.01$  после 1 мин и на 57% после 3-х мин стимуляции,  $p < 0.001$ ) в обработанных 5 $\alpha$ -холестан-3-оном препаратах, по сравнению с контролем. Таким образом, 5 $\alpha$ -холестан-3-он значительно ускоряет развитие синаптической депрессии в течение длительной стимуляции 20 Гц.

В дополнение, 5 $\alpha$ -холестан-3-он нарушает восстановление амплитуды ТКП после высокочастотной стимуляции (рис. 69, Гв). В контрольных экспериментах мы наблюдали посттетаническую потенциацию амплитуды ТКП. Через 1 минуту после завершения высокочастотной стимуляции амплитуда ТКП в ответ на одиночный стимул была  $116 \pm 4\%$  ( $n=5$ ,  $p < 0.05$  относительно значения перед высокочастотным раздражением) и оставалось на этом уровне в течение последующих 10 минут. В обработанных 5 $\alpha$ -холестан-3-оном препаратах амплитуда ТКП полностью не восстанавливалась и поддерживалась на уровне 74-78% ( $n=5$ ,  $p < 0.01$  относительно контроля). Это медленное и частичное восстановление амплитуды ТКП указывает на то, что 5 $\alpha$ -холестан-3-он уменьшает доставку к активной зоне способных к слиянию везикул и / или вероятность их освобождения.

#### **4.6.3 5 $\alpha$ -Холестан-3-он снижает интенсивность эндоцитоза синаптических везикул, вызванного высокочастотной стимуляцией**

Нервные терминалы были загружены FM1-43 посредством стимуляции в течение 1 или 3 мин с частотой 20 Гц (рис. 70, А). Одновременно записывались ТКП. Средняя флуоресценция пятен была  $30.3 \pm 2.1$  о.е. ( $n=8$ ) или  $65.7 \pm 3.5$  о.е. ( $n=8$ ) после окрашивания с помощью относительно короткой (1 мин) или длительной (3 мин) стимуляции, соответственно. Таким образом, 3-х минутная стимуляция вызывала захват в  $\sim 2.17$  раз большего количества красителя ( $p < 0.001$ ), чем 1 мин стимуляция. Однако после 3-х мин стимуляции кумулятивная амплитуда ТКП была примерно в 2.96 раз больше ( $p < 0.001$ ), чем после 1 мин стимуляции.

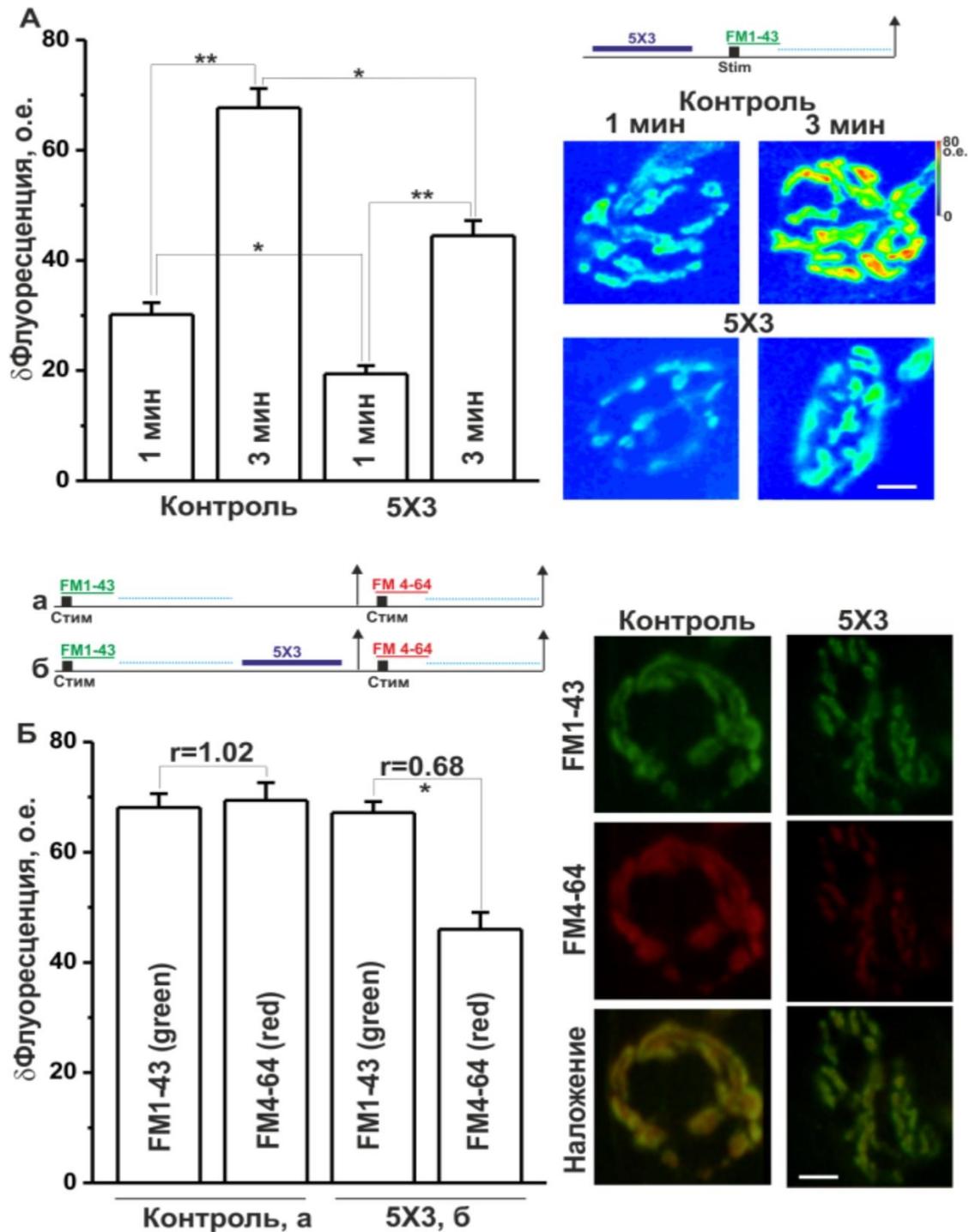


Рис. 70. Уменьшение загрузки FM-красителей после обработки 5 $\alpha$ -холестан-3-оном

А- Загрузка FM1-43 (флуоресценция FM1-43 в о.е.), вызванная высокочастотной стимуляцией (20 Гц, 1 или 3 мин) в контроле или после предварительной экспозиции с 5X3. В мышцах после воздействия 5-холестан-3-она (5X3) загрузка FM1-43 в нервные терминалы была существенно ослаблена. Звездочки обозначают достоверность различий (\* $p < 0.01$ , \*\* $p < 0.001$ ).

Рис. 70 (продолжение)

Сверху справа, схемы экспериментов: краситель присутствовал (апликация FM1-43 обозначена горизонтальной зеленой линией) в ванночке (10 мин) в течение и после эпизода стимуляции (черный столбик), который длился 1 мин или 3 мин. Измерение флуоресценции (захват изображений показан стрелкой) выполнялось после 30 мин отмывки (обозначено синей пунктирной линией) в физиологическом растворе с ADVASEP-7 для уменьшения фоновой флуоресценции. Шкала соответствующей интенсивности приведена справа в о.е. Шкала масштаба – 10  $\mu\text{м}$ . Б – Изменения загрузки красителя в одном нервно-мышечном контакте после апликации 5 $\alpha$ -холестан-3-она. Сверху слева, дизайн экспериментов (детали подписи см. на А): одна и та же мышца была последовательно загружена FM1-43 и FM4-64 с помощью 2-х эпизодов стимуляции (3 мин 20Гц), разделенных интервалом в 1.5 часа. Вначале нервные терминалы были загружены FM1-43, промыты физиологическим раствором с ADVASEP-7 и потом нормальным физиологическим раствором (а) или раствором с 5X3 (б), затем загружены FM4-64, промыты физиологическим раствором с ADVASEP-7. Регистрация флуоресценции FM1-43 и FM4-64 происходила после первой и второй процедуры загрузки, соответственно. Для детекции флуоресценции FM4-64 настройки чувствительности были подобраны таким образом, чтобы удалить проникновение флуоресценции от FM1-43 в красный канал. Внизу слева, интенсивности (в о.е.) флуоресценции FM1-43 и FM4-64 в контроле (а) и в препаратах, обработанных 5X3 (б). Звездочки указывают на достоверность различий (\* $p < 0.01$ ). Отношение флуоресценции FM4-64 к FM1-43 обозначено над столбиками. Справа, сверху-вниз: флуоресцентные изображения нервных терминалей мышц, предварительно загруженных зеленым FM1-43 в результате первого эпизода стимуляции; те же терминалы после загрузки красным FM4-64 с помощью второго эпизода стимуляции; перекрытие флуоресценции FM1-43 и FM4-64. Шкала – 10  $\mu\text{м}$ . В отличие от контроля, 5X3 уменьшает пул синаптических везикул, который захватывает FM4-64 (через участие в экзо-эндоцитозном цикле) в результате второго эпизода стимуляции.

Различие между степенью загрузки красителя и освобождением нейромедиатора вероятно происходит из-за того, что некоторые везикулы повторно участвуют в рециклировании в течение 3 мин стимуляции. Это ведет к недооценке количества

везикул, захвативших краситель (Betz, Bewick, 1993). Популяция везикул, рециклирующихся в течение 3 мин стимуляции, выраженная как фракция от общего числа везикул, освободивших нейромедиатор, приблизительно может быть оценена как 27% ( $2.96-2.17=0.79$ ;  $0.79*100/2.96=26.7\%$ ). После 1 мин стимуляции доля таких везикул, вероятно, очень маленькая, так как среднее время рециклирования, оцененное в нервно-мышечных синапсах мыши при стимуляции 20 Гц, также около 1 мин (Зефилов и др., 2008б; Захаров и др. 2012).

После обработки 5 $\alpha$ -холестан-3-оном загрузка нервных терминалей FM1-43, вызванная 1 и 3 мин стимуляцией, была снижена приблизительно на 36 или 32%, соответственно, относительно контрольных значений (рис. 70, А). Среднее значение флуоресценции пятен было  $19.4\pm 1.5$  о.е. ( $n=8$ ,  $p<0.01$  по сравнению с контролем, 1 мин 20 Гц) или  $44.5\pm 2.7$  о.е. ( $n=8$ ,  $p<0.01$  по сравнению с контролем, 3 мин 20 Гц). Следовательно, нервная терминаль захватывает в 2.28 раза больше красителя в результате 3 мин, чем 1 мин стимуляции. Исходя из кумулятивной амплитуды ТКП, в 2.47 раза больше квантов медиатора освобождается в течение 3-х мин, чем 1-но мин стимуляции. Таким путем, популяции рециклирующихся везикул при 3-х мин стимуляции может быть оценена в 8% ( $2.47-2.28=0.19$ ;  $0.19*100/2.27=8.4\%$ ). Эти результаты показывают, что 5 $\alpha$ -холестан-3-он уменьшает загрузку красителя эндоцитозом и количество везикул, рециклирующихся на протяжении длительной стимуляции. Это ослабление эндоцитоза синаптических везикул может быть объяснено снижением освобождения нейромедиатора экзоцитозом в течение «загружающего» эпизода стимуляции (Reid et al., 1999; Petrov et al., 2008).

Для оценки влияния 5 $\alpha$ -холестан-3-она на загрузку красителя в одной и той же нервной терминали (рис. 70, Б), мы использовали протокол с двумя последовательными эпизодами загрузки двумя различными FM-красителями (см. методы). Вначале, FM1-43 был загружен первым эпизодом стимуляции (3 мин 20 Гц), и получившееся значение зеленой флуоресценции было измерено. Затем, FM4-64 был загружен вторым эпизодом стимуляции (также 3 мин 20 Гц), и его красная флуоресценция была оценена. Отношение красной флуоресценции FM4-64 к зеленой флуоресценции FM1-43 является индикатором соотношения количества синаптических везикул, захвативших краситель в результате второго эпизода стимуляции, по сравнению с везикулами, загруженными первым эпизодом стимуляции. Если 5 $\alpha$ -холестан-3-он был апплицирован после первой,

но перед второй процедурой загрузки FM-красителя, тогда это соотношение существенно уменьшалось до  $0.68 \pm 0.04$  ( $n=8$ ,  $p < 0.01$  по сравнению с контролем, когда 5 $\alpha$ -холестан-3-он не добавлялся,  $1.02 \pm 0.05$ ,  $n=8$ ). В обработанных 5 $\alpha$ -холестан-3-оном нервно-мышечных препаратах, площадь FM4-64 флуоресцентных пятен (образованных в результате второго эпизода стимуляции) была обычно меньше, чем площадь FM1-43 флуоресцирующих пятен (образовавшихся за счет первой стимуляции). Эти данные указывают на то, что в одном и том же нервном окончании популяция синаптических везикул, участвующих в экзо-эндоцитозном цикле в течение высокочастотной стимуляции, значительно уменьшается после воздействия 5 $\alpha$ -холестан-3-она.

#### **4.6.4 5 $\alpha$ -Холестан-3-он ослабляет экзоцитоз синаптических везикул при высокочастотной стимуляции**

Стимуляция двигательного нерва вызывает уменьшение флуоресценции FM1-43 из предварительно загруженных нервных терминалей (выгрузка красителя, рис. 71, А). Флуоресценция снижалась до  $71.6 \pm 2.2\%$  ( $n=8$ ,  $p < 0.01$  относительно исходного значения) и  $48.7 \pm 3.1\%$  ( $p < 0.001$ ) после 2 и 10 мин стимуляции, соответственно (рис. 71, Б). Обработка 5 $\alpha$ -холестан-3-оном значительно замедляет выгрузку FM1-43. Флуоресценция уменьшается до  $85.4 \pm 2.5\%$  ( $n=8$ ,  $p < 0.05$  относительно контрольной кривой) и  $75.6 \pm 3.2$  ( $p < 0.001$ ) после 2 и 10 мин стимуляции, соответственно. В обработанных 5 $\alpha$ -холестан-3-оном препаратах снижение свечения в течение 3 мин было примерно на 50% меньше ( $p < 0.001$ ), чем в контрольных. Таким образом, 5 $\alpha$ -холестан-3-он подавляет вовлечение содержащих краситель везикул в экзоцитоз на протяжении высокочастотной стимуляции. В этих экспериментах 5 $\alpha$ -холестан-3-он апплицировался после загрузки FM1-43, а форма и интенсивность свечения FM1-43 пятен были стабильны в течение всего периода аппликации 5 $\alpha$ -холестан-3-она, указывая на то, что реагент не влияет на спонтанную потерю красителя.

В некоторых экспериментах нервные терминали были сначала обработаны 5 $\alpha$ -холестан-3-оном, а затем загружены FM1-43 и повторно стимулировались после 30 мин отмывки (рис. 71). В этом случае, исходная загрузка FM1-43 была значительно меньше, чем в контроле (см. 4.6.3), а выраженность выгрузки была меньше, чем в контрольных препаратах и препаратах, которые были обработаны 5 $\alpha$ -холестан-3-он после загрузки FM1-43.

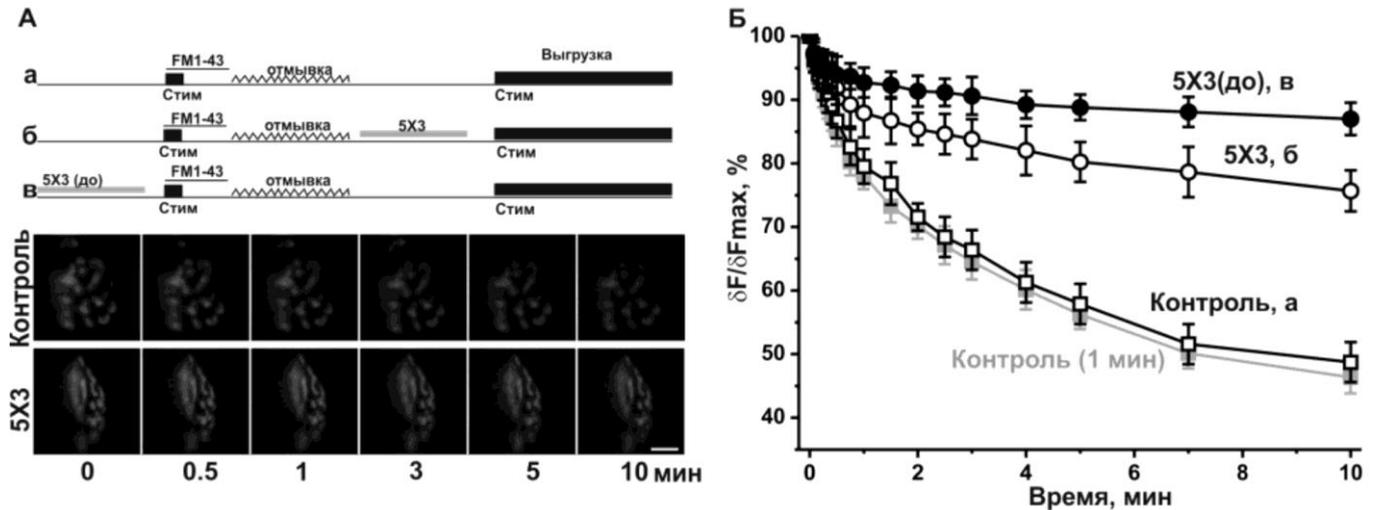


Рис. 71. Изменения в кинетике выгрузки FM1-43 в нервных терминалях, обработанных 5 $\alpha$ -холестан-3-оном (5X3)

А, сверху, протоколы загрузки – выгрузки FM1-43. Нервно-мышечные препараты были загружены FM1-43 (верхняя горизонтальная линия) стимуляцией 20Гц 3 мин, промыты в растворе, содержащем ADVASEP-7 (зигзагообразная линия), выдержаны в растворе с 5X3 (серая толстая линия) или без него, и затем повторно подвергнуты стимуляции с частотой 20Гц. В некоторых случаях 5X3 апплицировался до процедуры загрузки. Стимуляция показана черным столбиком. Внизу, флуоресцентные изображения нервных терминалей в покое (0) и в различные моменты времени (в мин, 0.5, 1, 3, 5, 10) в течение выгружающей краситель стимуляции в контроле (а) и после обработки 5X3 (б). Шкала, 10 мкм. Б – Снижение флуоресценции нервных терминалей в ходе стимуляции 20 Гц в контроле (светлые квадратики, а) и после предварительного воздействия 5X3 на препараты, загруженные FM1-43 (светлые кружки, б). В некоторых экспериментах препараты были перфузированы в течение 20 мин с 5X3 перед процедурой загрузки FM1-43 (темные кружки, в). В этих условиях начальная загрузка FM1-43 значительно меньше, чем в контроле. Однако это не может объяснить существенно более медленную выгрузку FM1-43, поскольку нервные терминали с исходно низкой флуоресценцией (из-за уменьшения длительности «загружающего» стимуляционного эпизода с 3 до 1 мин) имели схожую с контрольной кинетику выгрузки (светло серые квадратики). Y-ось: относительная интенсивность флуоресценции ( $F/F_{max}$ ), где 100% отражает флуоресценцию перед эпизодом стимуляции.

Флуоресценция уменьшалась до  $91.3 \pm 2.4$  ( $n=8$ ,  $p < 0.001$  относительно контроля) и  $87.0 \pm 2.5\%$  ( $p < 0.001$  относительно контроля,  $p < 0.05$  относительно синапсов, обработанных 5 $\alpha$ -холестан-3-он после загрузки) через 2 и 10 мин стимуляции, соответственно. Следует отметить, что в мышцах с изначально меньшей загрузкой FM1-43 (вследствие уменьшения длительности «загружающего» эпизода стимуляции с 3 до 1 мин) изменений выгрузки FM1-43 не было обнаружено (рис. 71Б, кривая отмечена «Контроль (1мин)»). Возможно, что после добавления 5 $\alpha$ -холестан-3-она в течение длительного времени сохраняется его эффект, включающий не только подавление экзоцитоза, но и снижение компетентности к слиянию вновь сформированных синаптических везикул. Это согласуется с отсутствием полного восстановления амплитуды ТКП после высокочастотной стимуляции.

#### **4.6.5 5 $\alpha$ -Холестан-3-он не изменяет время рециклирования синаптических везикул**

Кривая выгрузки FM1-43 является индикатором экзоцитоза синаптических везикул. После экзоцитоза синаптической везикулы, краситель и нейромедиатор теряются из нервной терминали, и вновь сформированные везикулы содержат следовые количества или не содержат красителя. Экзоцитоз таких везикул в течение продолжающейся стимуляции вызовет освобождение нейромедиатора, но не уменьшение флуоресценции FM1-43. Кумулятивная кривая амплитуды ТКП показывает количество нейромедиатора, освобожденного экзоцитозом (события экзоцитоза). Таким образом, сравнение (и масштабирование) инвертированной кривой потери красителя с кумулятивной кривой амплитуды ТКП позволяет определить среднее время везикулярного цикла / рециклирования (Betz, Bewick, 1993, Reid B. et al., 1999; Petrov et al., 2008). Среднее время рециклирования везикул определялось как момент явного расхождения кривых, когда скорость выгрузки FM1-43 начинала отставать относительно интенсивности освобождения нейромедиатора (рис. 72 А, Б). В обработанных 5 $\alpha$ -холестан-3-оном нервно-мышечных препаратах это расхождение наблюдалось после 50-60 с от начала стимуляции, как в контроле. Это указывает на отсутствие изменений в скорости рециклирования.

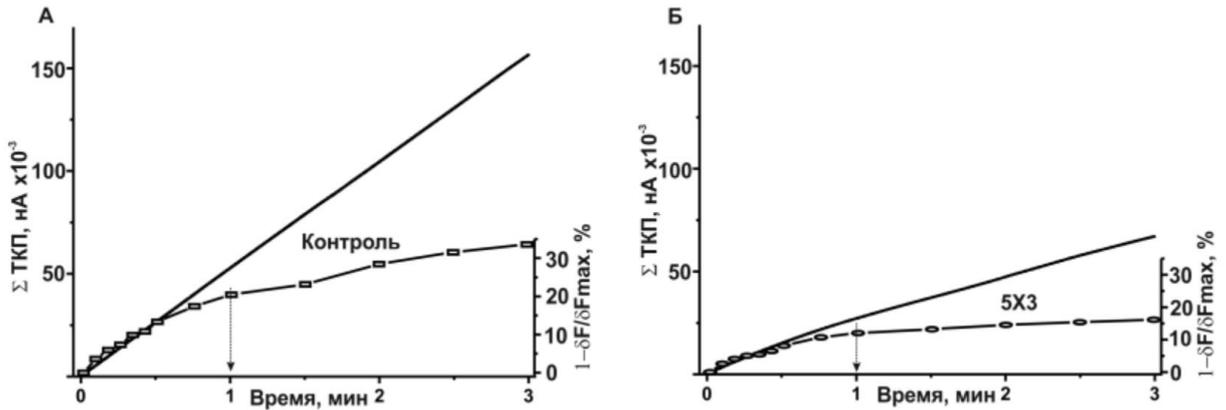


Рис. 72. Влияние 5α-холестан-3-она (5X3) на время рециклирования синаптических везикул

А, Б – Оценка времени рециклирования в течение 20 Гц стимуляции (3 мин) в контроле (А) и после предобработки 5X3 (Б). Инвертированные кривые выгрузки (из рис. 71 Б, контроль и 5X3) были масштабированы и наложены на кумулятивные кривые амплитуды ТКП (из рис. 69, Гб). Среднее время рециклирования было определено как точка, где расхождение двух кривых становится очевидным (показано стрелкой). Обработка 5X3 не изменяет расхождение кривых, которое происходит через 50-60 с после начала 20Гц стимуляции.

#### 4.6.6 Эффекты 5α-холестан-3-она на свойства мембран и экзоцитоз зависят от исходного уровня холестерина в плазматических мембранах

При использовании филипина III и ХТ-В было показано, что с помощью МЦД и комплекса МЦД-холестерин можно изменять мембранное содержание холестерина (рис. 36) и стабильность липидных плотиков (рис. 37). МЦД дозозависимо уменьшает содержание холестерина в мембране и окрашивание на скопления ганглиозидов GM1 (липидные плотики). Наоборот, применение комплекса МЦД-холестерин способствует насыщению мембран холестерином и усилению окрашивания нервно-мышечных препаратов на липидные плотики. В дальнейших экспериментах применялась последовательная обработка препаратов холестерин-изменяющим агентом и 5α-холестан-3-оном, при этом сначала производили манипуляцию с уровнем мембранного холестерина, затем добавляли 5α-холестан-3-он в перфузионную среду (рис. 73).

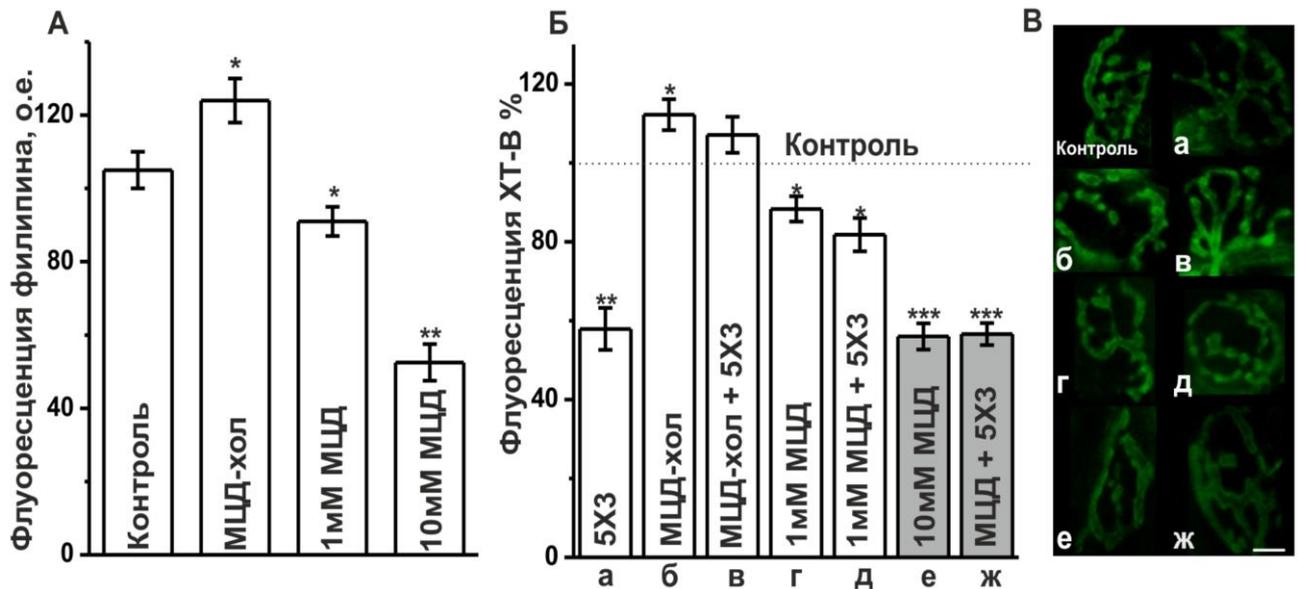


Рис. 73. Мембранный холестерин, липидные рафты и  $5\alpha$ -холестан-3-он (5X3)

А- Оценка изменений содержания мембранного холестерина с помощью антибиотика филипина III в нервно-мышечных синапсах мышцы после воздействия комплекса МЦД-холестерин (МЦД-хол), 1 мМ и 10 мМ МЦД. Флуоресценция приведена в о.е. Звездочки обозначают достоверность относительно контрольного свечения (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.001$ ). Количественный анализ флуоресценции показывает, что комплекс МЦД-холестерин немного увеличивает уровень холестерина в мембранах, тогда как МЦД вызывает частичное истощение мембранного холестерина (особенно эффективна высокая доза МЦД – 10 мМ). Б – Манипуляции с холестерином изменяют маркирование липидных рафтов. Флуоресценция (в % от контрольного значения) ХТ-В в синаптических регионах нервно-мышечных контактов, предварительно обработанных комплексом МЦД-холестерин (б) или МЦД (1мМ (г) или 10 мМ (е)). В некоторых экспериментах, после насыщения холестерином (в) и его удаления (1 мМ МЦД (д) или 10 мМ МЦД (ж)), нервно-мышечный препарат перфузировался 5X3 и затем маркировался ХТ-В. Столбик «а» показывает действие 5X3 в одиночку. Интенсивность флуоресценции в контрольных препаратах показана пунктирной линией. Звездочки показывают статистически достоверную разницу по сравнению с контролем (\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ). В – Флуоресцентные изображения синаптических регионов, меченных ХТ-В в контроле, после экспозиции с комплексом МЦД-холестерин (б) или МЦД (г- 1мМ, е- 10 мМ), после обработки 5X3 в одиночку (а), или совместно с предварительной обработкой комплексом МЦД-холестерин (в) или МЦД (д - 1мМ, ж – 10 мМ). Шкала – 10 мкм

Рис. 73 (продолжение)

Снижение или увеличение содержания мембранного холестерина имеет противоположный эффект на окрашивание ХТ-В. Однако только удаление значительного количества холестерина 10 мМ МЦД сильно снижает мечение рафтов примерно до такой же степени, что и 5ХЗ. Из рисунка видно, что манипуляции с содержанием холестерина, которые выполнены перед аппликацией 5ХЗ, подавляют какое-либо дополнительное воздействие 5ХЗ на мечение ХТ-В.

5 $\alpha$ -Холестан-3-он драматично уменьшал окраску ХТ-В синаптических мембран в нервно-мышечных препаратах до  $48.4 \pm 4.5$  о.е. ( $n=7$ ,  $p < 0.01$  относительно контроля –  $83.6 \pm 3.8$  о.е.,  $n=7$ ) (рис. 73 А, Б). Однако, если предварительно препараты были обработаны агентом, изменяющим содержание мембранного холестерина, как увеличивающим (МЦД-холестерин), так и уменьшающим (МЦД 1 и 10 мМ), то аппликация 5 $\alpha$ -холестан-3-она не вызывала дополнительного существенного изменения (уменьшения) окрашивания ХТ-В (по сравнению с действием холестерин-изменяющего агента в одиночку). В частности, флуоресценция составила  $89.5 \pm 4.0$  о.е. в условиях предобработки МЦД-холестерин ( $n = 5$ , 45 мышечных волокон,  $p > 0.05$ , относительно контрольного действия МЦД-холестерин  $93.8 \pm 3.4$  о.е.);  $68.4 \pm 3.5$  о.е. в условиях предобработки 1 мМ МЦД ( $n = 5$ , 47 мышечных волокон,  $p > 0.05$ , относительно контрольного действия 1мМ МЦД  $73.8 \pm 2.7$  о.е.);  $47.3 \pm 2.4$  о.е. в условиях предобработки 10 мМ МЦД ( $n=5$ , 44 мышечных волокна,  $p > 0.05$ , относительно контрольного действия 10 мМ МЦД  $46.8 \pm 2.8$  о.е.). Эти результаты указывают, что изменения стабильности липидных рафтов (вследствие воздействия на мембранный холестерин) предотвращают вызванное 5 $\alpha$ -холестан-3-оном разрушение липидных рафтов. Парадоксально, даже слабое удаление холестерина (1мМ МЦД), которое вызывает только слабое нарушение рафтов, спасает нервно-мышечные синапсы от сильного дестабилизирующего рафты действия 5 $\alpha$ -холестан-3-она.

Дальнейшие эксперименты были выполнены для оценки зависимости от мембранного холестерина эффектов 5 $\alpha$ -холестан-3-она на экзоцитоз синаптических везикул в течение высокочастотной стимуляции (рис. 74 А). Выгрузка красителя была ускорена (рис. 74 Б), когда предварительно загруженный FM1-43 нервно-мышечный

препарат подвергался действию комплекса МЦД-холестерин (400 мкг/мл в течение 20 мин до стимуляции), насыщающего плазматические мембраны холестерином.

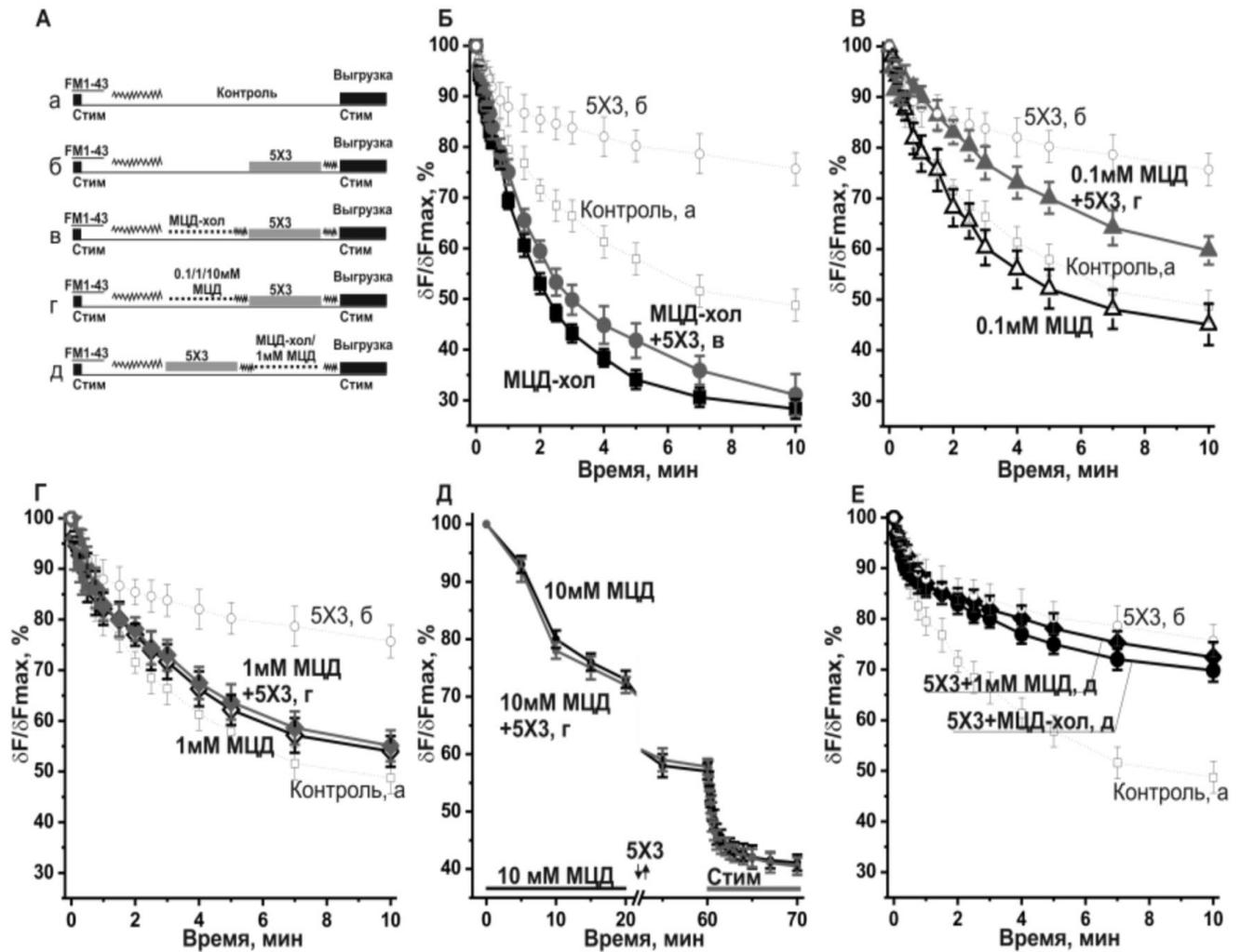


Рис. 74. Зависимость от холестерина эффектов  $5\alpha$ -холестан-3она (5X3) на выгрузку FM1-43

А – Дизайн экспериментов (обозначения те же, что и на рис. 71), результаты которых представлены на Б, В, Г, Д и Е. Препараты были загружены FM1-43 стимуляцией 20 Гц, промыты, выдержаны с 5X3 и / или комплексом МЦД-холестерин / МЦД (0,1, 1, 10 мМ) и затем повторно простимулированы с частотой 20 Гц. Аппликации комплекса МЦД-холестерин или МЦД, которые производились как перед, так и после экспозиции с 5X3, показаны пунктирными линиями. Б – Кривые выгрузки, характерные для препаратов, обработанных МЦД-холестерином в одиночку (темные квадратики) или совместно с последующей аппликацией 5X3 (серые кружочки, в). Перед началом перфузии 5X3 препараты были обработаны комплексом МЦД-холестерин, предназначенным для обогащения поверхностных мембран холестерином.

Рис. 74 (продолжение)

В, Г – Кинетика выгрузки после предобработки 5X3 (г: серые треугольники, В; серые ромбики, Г) и без нее (светлые треугольники, В; светлые ромбики, Г) в мышцах, которые были предварительно инкубированы в физиологическом растворе с МЦД (0.1 мМ, В; 1мМ, Г) до воздействия 5X3. Д – Временной ход изменений флуоресценции в нервных терминалях в течение аппликации 10 мМ МЦД (20 мин) и последующей стимуляции с частотой 20 Гц. Горизонтальная черная или серая линия показывает аппликацию МЦД или стимуляцию 20 Гц, соответственно. В период между аппликацией МЦД и стимуляцией двигательного нерва препараты перфузировались физиологическим раствором с 5X3 (серая кривая, г) или без него (черная кривая). Y-ось показывает относительную интенсивность флуоресценции, где 100% - это флуоресценция перед добавлением 10 мМ МЦД. Таким образом, если манипуляции с уровнем мембранного холестерина выполнялись перед аппликацией 5X3, то собственный эффект 5X3 был существенно подавлен. Е – В этих экспериментах (д) 5X3 добавлялся перед экспозицией с комплексом МЦД-холестерин (темные кружки) или 1 мМ МЦД (темные ромбики). В подобных условиях эффект 5X3 на выгрузку FM1-43 был почти полностью сохранен. Контрольная кривая (а, без воздействия 5X3 и холестерин-изменяющих агентов, светлые квадратики) и кривая, иллюстрирующая эффект 5X3 в одиночку (б, светлые кружочки), показаны на Б, В, Г и Е в виде светло серых тонких кривых. На Б, В, Г, Е: Y-ось такая же как на рис. 71, Б.

Флуоресценция уменьшалась до  $53 \pm 2\%$  ( $n=5$ ,  $p < 0.01$  по сравнению с контрольной выгрузкой) и  $28 \pm 2\%$  ( $p < 0.01$  по сравнению с контрольной выгрузкой) после 2 и 10 мин стимуляции. В обработанных 5 $\alpha$ -холестан-3-оном препаратах, мембраны которых были предварительно обогащены холестерином, выгрузка была такой же, как и в контрольных синапсах, подвергнутых действию только комплекса МЦД-холестерин. Так, через 2 и 10 мин стимуляции флуоресценция уменьшалась до  $59 \pm 4\%$  ( $n=5$ ,  $p > 0.05$  относительно МЦД-холестерин) и  $31 \pm 4\%$  ( $p > 0.05$  относительно МЦД-холестерин).

В другой серии экспериментов, для удаления холестерина и разрушения рафтов, мы применяли МЦД (0.1, 1 или 10 мМ) в течение 20 мин после загрузки FM1-43. Мы обнаружили, что предварительная обработка 0.1 мМ МЦД не изменяет динамики выгрузки FM1-43 (рис. 74, В): после стимуляции 20 Гц в течение 2 и 10 мин,

флуоресценция уменьшалась до  $68 \pm 4\%$  ( $n=5$ ,  $p>0.05$  относительно контроля) и  $45 \pm 4\%$  ( $p>0.05$  относительно контроля), соответственно. В препаратах, обработанных 0.1 мМ МЦД, 5 $\alpha$ -холестан-3-он только слабо подавлял выгрузку FM1-43: после 2 и 10 мин стимуляции флуоресценция снижалась до  $83 \pm 2\%$  ( $n=5$ ,  $p>0.05$  относительно действия 5 $\alpha$ -холестан-3-она в одиночку) и  $60 \pm 3\%$  ( $p<0.01$  относительно действия 5 $\alpha$ -холестан-3-она в одиночку).

Удаление холестерина с помощью 1 мМ МЦД несколько уменьшало скорость выгрузки FM1-43 (рис. 74, Г). После 2 и 10 мин стимуляции флуоресценция уменьшалась до  $77 \pm 2\%$  ( $n=6$ ,  $p=0.049$  относительно контроля) и  $54 \pm 3\%$  ( $p=0.078$  относительно контроля). Интересно, что 5 $\alpha$ -холестан-3-он не ингибировал выгрузку FM1-43 из нервно-мышечных синапсов, обработанных 1 мМ МЦД: флуоресценция снижалась до  $78 \pm 2\%$  ( $n=6$ ,  $p>0.05$  относительно действия 1 мМ МЦД;  $p^\#<0.05$  относительно препаратов, обработанных только 5 $\alpha$ -холестан-3-оном) и  $55 \pm 3\%$  ( $p>0.05$ ;  $p^\#<0.05$ ) через 2 и 10 мин стимуляции 20 Гц, соответственно.

Удаление холестерина 10 мМ МЦД вызывало значительное уменьшение флуоресценции FM1-43 до  $73 \pm 2\%$  (к 20 мин) от исходного значения ( $n=5$ ,  $p<0.001$  относительно значения до аппликации МЦД). Это указывает на драматичное увеличение интенсивности спонтанного экзоцитоза, когда существенные количества холестерина удаляются из мембраны (Petrov et al. 2014, 2015). Затем нервные терминалы с остаточной флуоресценцией FM1-43 были обработаны 5 $\alpha$ -холестан-3-оном и после простимулированы с частотой 20 Гц. В этих условиях скорость выгрузки оставшегося красителя была уменьшенной в одинаковой степени в обработанных 5 $\alpha$ -холестан-3-оном и не обработанных им препаратах (рис. 74, Д).

Итак, разнонаправленные изменения уровня мембранного холестерина противодействуют вызванному 5 $\alpha$ -холестан-3-оном угнетению экзоцитоза синаптических везикул в течение высокочастотной стимуляции, тогда как сами манипуляции с холестерином (насыщение или истощение) приводят к противоположным изменениям (усилению или ослаблению) экзоцитоза синаптических везикул.

Интересно, что когда аппликация 5 $\alpha$ -холестан-3-она предшествует обработке комплексом МЦД-холестерин ( $n=6$ ) или МЦД (1 мМ,  $n=6$ ), тогда скорость выгрузки FM1-43 остается сильно уменьшенной (рис. 74, Е). Значительных различий в выгрузке

FM1-43 между мышцами, обработанными только 5 $\alpha$ -холестан-3-оном и в соединении с последующей экспозицией с МЦД-холестерином или МЦД, не наблюдается ( $p > 0.05$ ).

Таким образом, эксперименты, описанные в данной секции, показывают, что оптимальное содержание мембранного холестерина, определяющее стабильность липидных плотиков, требуется исключительно для запуска (индукции) эффектов 5 $\alpha$ -холестан-3-она, но не после. Возможно, однажды холестерин-зависимо провзаимодействовав с плазматической мембраной, 5 $\alpha$ -холестан-3-он инициирует события, влияющие холестерин-независимым путем на поведение липидных рафтов и экзоцитоз синаптических везикул.

#### **4.6.7 Возможные механизмы влияния 5 $\alpha$ -холестан-3-она на цикл синаптических везикул и состояние синаптических мембран**

В данном исследовании мы показали, что 5 $\alpha$ -холестан-3-он имеет выраженный эффект на синаптическую передачу, ослабляя вызванное освобождение нейромедиатора из пресинаптических нервных окончаний. Уменьшение амплитуды ТКП в ответ на единичные стимулы, без изменений амплитуды МТКП, указывают на селективное ингибирование вызванного потенциалом-действия экзоцитоза синаптических везикул. Наблюдаемое изменение парного облегчения свидетельствует об уменьшении исходной вероятности освобождения медиатора (Liu et al., 2011). Более выраженная депрессия амплитуды ТКП в течение высокочастотной активности и значительное замедление выгрузки FM1-43 говорят о том, что вызванный экзоцитоз и мобилизация синаптических везикул к активной зоне ослаблены (Reid et al., 1999, 2003; Petrov et al., 2008).

Уменьшение общего количества синаптических везикул, которые подвергаются экзоцитозу в течение высокочастотной стимуляции, ведет к последующему уменьшению зависимого от синаптической активности захвата FM красителей (загрузок FM1-43 и FM4-64) посредством компенсаторного эндоцитоза. При этом среднее время рециклирования синаптических везикул остается неизменным, но популяция активно рециклирующих синаптических везикул снижается. В целом, эти данные указывают, что 5 $\alpha$ -холестан-3-он уменьшает размер функционального пула синаптических везикул, который вовлекается в освобождение нейромедиатора в течение высокочастотной стимуляции. Снижение как количества загруженного FM4-64, так и площади

флуоресцирующих FM4-64-пятен, наблюдаемые после обработки 5 $\alpha$ -холестан-3-оном, подтверждают уменьшение размера «активного пула синаптических везикул». Важно отметить, что как амплитуда ТКП, так и выгрузка FM1-43 были необратимо снижены предварительной экспозицией с 5 $\alpha$ -холестан-3-оном. В дополнение, предварительная обработка 5 $\alpha$ -холестан-3-оном не только устраняет посттетаническую потенциацию после высокочастотной активности, но и значительно подавляет восстановление амплитуды ТКП. Возможно, 5 $\alpha$ -холестан-3-он крепко связывается с оксистерол-связывающими белками и по этой, или по другим причинам, не полностью удаляется из мембран при отмывке. Таким образом, 5 $\alpha$ -холестан-3-он может опосредовать долговременные изменения как вызванной синаптической передачи, так и феноменов кратковременной синаптической пластичности.

Несмотря на выраженные эффекты на вызванный экзоцитоз, спонтанное освобождение не изменялось при действии 5 $\alpha$ -холестан-3-она. Это согласуется с данными, что некоторые фармакологические манипуляции (например, острое удаление холестерина или ингибирование синтеза холестерина) воздействуют на спонтанный и вызванный экзоцитоз противоположным образом. Ряд исследований строго указывают на существование специфических путей регуляции спонтанного экзоцитоза (Zamir, Charlton, 2006; Ramirez, Kavalali, 2011; Teixeira et al., 2012; Petrov A.M. et al., 2014, 2015). Кроме того некоторые исследования предполагают, что спонтанно сливающиеся везикулы происходят из пула синаптических везикул, который отделен от рециклирующего пула, обеспечивающего вызванную синаптическую передачу при физиологических условиях активности (Fredj, Burrone, 2009; Ramirez, Kavalali, 2011, Alabi, Tsien, 2012).

5 $\alpha$ -Холестан-3-он и мембранные свойства. 22-NBD-холестерин исключен из обогащенной холестерином фазы в модельных липидных бислоях (из фосфатидилхолина / холестерина) и в мембранах живых клеток. Интенсивность флуоресценции 22-NBD-холестерина значительно падает в ответ на формирование L $\alpha$  (липид-упорядоченной) фазы, что может быть связано с сильным самотушением флуоресценции (Loura et al., 2001, Ostašov et al., 2013). Однако спектральные свойства 22-NBD-холестерина почти полностью не зависят от фазового состояния бислоя (Ostašov et al., 2013). Следовательно, увеличение флуоресценции 22-NBD-холестерина в течение аппликации 5 $\alpha$ -холестан-3-она может быть вызвано снижением стабильности

липид-упорядоченной фазы (рафтов) и расширением липид-неупорядоченной фазы. Это согласуется с наблюдением уменьшения окрашивания синаптических регионов ХТ-В, которая преимущественно связывается с ганглиозидами GM1, входящими в состав рафтов (Schwan et al., 2011). Более того, ХТ-В имеет высокую аффинность к GM1-молекулам, погруженным в модельные мембраны с липидной композицией, напоминающей таковую в рафтах (Margheri et al., 2014). В соответствии с этим сценарием, вызванное 5 $\alpha$ -холестан-3-оном ослабление окраски ХТ-В может происходить из-за «утечки» GM1-ганглиозидов в регионы липид-неупорядоченной фазы плазматической мембраны. Удаление холестерина с помощью острой обработки 10 мМ МЦД (30 мин) также драматично снижало интенсивность свечения филипина и ХТ-В в сенсорных нейронах тройничного ганглия, указывая на нарушение рафтов (Gnanasekaran et al., 2011). Возможно, что молекулы 5 $\alpha$ -холестан-3-она способны эффективно встраиваться в липидные рафты, снижая их стабильность. В зависимости от позиции атома кислорода, оксистеролы могут ускорять или ингибировать формирование мембранных микродоменов (Mackrill, 2011; Filomenko et al., 2015). Однако, известный разрушающий рафты агент МЦД, действуя в существенно более высоких концентрациях (0.1, 1 мМ), вызывает существенно менее значительные нарушения окрашивания ХТ-В, по сравнению с 200 нМ 5 $\alpha$ -холестан-3-она. Другая возможность заключается в том, что 5 $\alpha$ -холестан-3-он влияет на поведение мембранных фаз через сигнальные пути и оксистерол-связывающие белки, которые могут регулировать формирование липидных рафтов (Weber-Boyvatt et al., 2013). Нарушение стабильности рафтов может оказывать существенное влияние на синаптическую передачу, подавляя экзоцитоз в течение низко- и высокочастотной активности (Петров и др., 2009, 2013; Zamir, Charlton, 2006; Teixeira et al., 2012; Petrov et al., 2011, 2014). Следует отметить, что эффекты удаления значительного количества холестерина и разрушения рафтов под влиянием 10 мМ МЦД имеют специфичные черты, которые можно объяснить прямой потребностью в холестерине для клеточных процессов. В частности, 10 мМ МЦД сильно увеличивают спонтанное освобождение в нервно-мышечных и центральных синапсах (Zamir, Charlton, 2006; Teixeira et al., 2012; Ramirez, Kavalali, 2011; Petrov et al., 2014, 2015).

Интересно, что в обработанных 5 $\alpha$ -холестан-3-оном мышцах распределение пресинаптических (белка активной зоны - синтаксина 1, белка синаптических везикул - синаптофизина) и постсинаптического (никотинового ацетилхолинового рецептора)

компонентов было нормальным, указывая на отсутствие нарушений структуры нервно-мышечного синапса под влиянием 5 $\alpha$ -холестан-3-она.

Холестерин-зависимость эффектов 5 $\alpha$ -холестан-3-она. Манипуляции с уровнем мембранного холестерина ведут к изменениям мембранных свойств, в частности стабильности липидных плотиков. Увеличение содержания мембранного холестерина, думается, способствует коалесценции (слиянию) и увеличению стабильности липидных рафтов, тогда как удаление даже небольшого количества холестерина имеет противоположные эффекты (Simons, Samraio, 2011). Мы обнаружили, что острое насыщение мембран холестерином или, наоборот, удаление холестерина ингибирует влияние 5 $\alpha$ -холестан-3-она на окрашивание ХТ-В и выгрузку FM1-43. Возможно, что 5 $\alpha$ -холестан-3-он влияет на стабильность рафтов и цикл синаптических везикул, связываясь с молекулами-мишенями рафт/холестерин-зависимым способом, поэтому любые изменения в упаковке липидов мембраны / содержании холестерина (включая удаление даже небольшой части холестерина) предотвращают действие 5 $\alpha$ -холестан-3-она. Однако скорость выгрузки FM1-43 оставалась значительно уменьшенной, когда манипуляции с уровнем мембранного холестерина производились после обработки 5 $\alpha$ -холестан-3-оном (т.е. эффект 5 $\alpha$ -холестан-3-она сохранялся). Это указывает на то, что развитие эффекта 5 $\alpha$ -холестан-3-она не зависит от мембранного холестерина. Возможно, однажды активировавшись, мишень (рецептор) 5 $\alpha$ -холестан-3-она вызывает изменения синаптической передачи. Локализация и свойства различных рецепторов часто зависят от их ассоциации с липидными рафтами (и/или мембранным холестерином), и модификации рафтов могут изменять взаимодействия рецепторов с соответствующими лигандами (Петров, Зефирова, 2013, 2014; Gnanasekaran et al., 2011; Sebastião et al., 2013; Giniatullin et al., 2015).

Молекулярный механизм действия 5 $\alpha$ -холестан-3-она на цикл синаптических везикул остается неизученным. 5 $\alpha$ -Холестан-3-он эффективен в наномолярных концентрациях, это предполагает существование специфического высоко-аффинного связывающего сайта, через который 5 $\alpha$ -холестан-3-он может влиять на свойства мембраны и внутриклеточную сигнализацию. Возможно, что оксистерол-связывающие белки участвуют в клеточном ответе на 5 $\alpha$ -холестан-3-он. Эти белки локализованы в рафтах и вовлекаются в клеточную сигнализацию, организацию мембранных контактных сайтов (через одновременное связывание двух противоположных мембран)

и латеральных микродоменов (Weber-Boyvat et al., 2013). Большинство оксистерол-связывающих белков заякорены в мембране с помощью короткого пептидного мотива, названного FFAT, который взаимодействует с VAMP-ассоциированными белками (Loewen, et al., 2003), а также они имеют фосфоинозитолфосфат-нацеленный гомологичный плекстрину (PH) домен, связывающийся с фосфоинозитами (Vihervaara et al., 2011). Это предполагает молекулярную основу для способности оксистерол-связывающих белков взаимодействовать с мембранами синаптических везикул. В дополнение, оксистерол-связывающие белки могут взаимодействовать с Rab-ГТФазами, управляющими везикулярным траффиком (Rocha et al., 2009), и могут быть скаффолдами для сигнальных комплексов, включающих фосфатазы фосфоинозитидов, протеинфосфатазы и киназы (Weber-Boyvat et al., 2013). В аппарате Гольджи клеток HeLa показана важность оксистерол-связывающих белков в определении локализации SNARE-белков, опосредующих слияние (Nishimura et al., 2013).

Основываясь на полученных результатах, мы предполагаем, что 5 $\alpha$ -холестан-3-он, действуя в наномолярных концентрациях, подавляет синаптическую передачу в нервно-мышечном синапсе мыши, ингибируя вызванное освобождение нейромедиатора и уменьшая размер пула синаптических везикул, который вовлекается в освобождение нейромедиатора во время высокочастотной активности, хотя время рециклирования синаптических везикул не изменяется. Похоже, что этот оксистерол также действует на свойства синаптических мембран, приводя к уменьшению стабильности рафтов. Описанные эффекты 5 $\alpha$ -холестан-3-она очень чувствительны к содержанию в мембране холестерина, и изменения нативного уровня холестерина заметно ослабляет влияние 5 $\alpha$ -холестан-3-она на выгрузку FM1-43 и окрашивание ХТ-В. Возможно, что 5 $\alpha$ -холестан-3-он регулирует экзоцитоз/траффик синаптических везикул и свойства синаптических мембран, связываясь с одним или несколькими специфичными сайтами, чья аффинность зависит от уровня мембранного холестерина. Дальнейшие исследования необходимы для определения молекулярных мишеней и сигнальных путей, участвующих в эффектах 5 $\alpha$ -холестан-3-она.

## 5. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Холестерин является облигатным компонентом мембран эукариотических клеток, от его содержания зависят как биофизические свойства мембран, так и функционирование сигнальных молекул и транспортных систем (Simons, Samraio, 2011; Петров, Зефирова, 2013). Одним из самых богатых холестерином органов является мозг, что связано не только с присутствием холестерина в миелиновых оболочках, но и с его высокой концентрацией в нейрональных мембранах и мембранах синаптических везикул (Dietschy, 2009; Vance, 2012). В данном исследовании мы обнаружили высокий уровень холестерина в периферических нервно-мышечных синапсах, где он распределялся неравномерно и участвовал в формировании скоплений ганглиозидов GM1 (липидных плотиков). Липидные плотики располагались в сайтах экзо- и эндоцитоза синаптических везикул, а также были выявлены в мембранах синаптических везикул. Вероятно, липидные плотики и холестерин участвуют в организации молекулярных машин экзо- и эндоцитоза. Особенно важную роль могут иметь плотики везикулярных мембран, поскольку они могут способствовать сохранению уникальной белково-липидной композиции мембран везикул, несмотря на многократные циклы встраивания и почкования от поверхностной мембраны.

Гипотеза о роли холестерина и липидных плотиков в пресинаптических процессах нашла свое подтверждение в экспериментах с частичным истощением мембранного холестерина. Оказалось, что удаление небольшой части холестерина из поверхностных мембран (снижающее стабильность липидных рафтов в синаптическом регионе), не влияя на спонтанную секрецию, уменьшало вызванное освобождение нейромедиатора при низко- и более выражено при высокочастотной синаптической активности. В последнем случае, помимо ослабления экзоцитоза наблюдалось угнетение процессов, обеспечивающих пополнение сайтов экзоцитоза новыми везикулами. Примечательно, что при этом не было выявлено нарушений эндоцитоза и рециклирования синаптических везикул. Следовательно, в данной ситуации угнетение нейротрансмиссии можно объяснить снижением популяции синаптических везикул, вовлекающихся в освобождение медиатора. Если же холестерин частично удалялся не только из плазматической мембраны, но и из мембран рециклирующих везикул, то в дополнение к

вышеописанным эффектам происходило блокирование эндоцитоза и рециклирования синаптических везикул, сопровождаемое увеличением площади мембраны нервного окончания и дополнительным угнетением экзоцитоза, за счет истощения запасов везикул. Таким образом, мы впервые показали, что холестерин пресинаптической и везикулярной мембраны требуется для протекания разных этапов везикулярного цикла: пресинаптический холестерин важен для эффективного экзоцитоза и увеличения популяции везикул, обеспечивающих нейротрансдукцию, а везикулярный необходим для эндоцитоза и рециклирования везикул. Позднее эти данные нашли подтверждение в исследованиях на плодовых мушках (Dason et al., 2010; 2014) и центральных синапсах теплокровных (Yue, Xu, 2015). Четкое разделение эффектов удаления холестерина из пресинаптических и везикулярных мембран может указывать на несмешиваемость пулов пресинаптического и везикулярного холестерина, что потенциально должно облегчить протекание везикулярного цикла.

Удаление более существенной части мембранного холестерина еще больше нарушает вызванный экзоцитоз, однако резко усиливает спонтанное освобождение нейромедиатора (Zamir, Charlton, 2006; Wasser, Kavalali, 2009; Тараканова и др. 2011; Teixeira et al., 2012). Мы впервые выяснили механизм, обеспечивающий, в значительной степени, интенсификацию спонтанного экзоцитоза. Оказалось, что истощение мембранного холестерина стимулирует продукцию АФК НАДФН-оксидазой, локально образующиеся АФК вызывают перекисное окисление липидов синаптических мембран и активируют расположенные около сайтов экзоцитоза TRPV-каналы, вход  $Ca^{2+}$  через которые стимулирует кальмодулин-зависимую фосфатазу, кальциневрин, что способствует усиленному протеканию спонтанного экзоцитоза. Также впервые нами было показано, что тип спонтанного экзоцитоза, вызываемого удалением мембранного холестерина, зависит от активности протеинкиназы С. Блокирование протеинкиназы С (но не хелатирование внутриклеточного  $Ca^{2+}$  или ингибирование фосфолипазы С) способствовало протеканию освобождения медиатора через скоротечную пору слияния (kiss-and-run путь). Мы предполагаем, что удаление холестерина вызывает  $Ca^{2+}$ - и фосфолипаза С-независимую активацию протеинкиназы С, что требуется «полного» встраивания везикулярной мембраны в пресинаптическую в ходе экзоцитоза. Таким образом, содержание холестерина в синаптических мембранах регулирует активность важных сигнальных молекул, поэтому может влиять на многие аспекты

функционирования синаптического аппарата. Например, недавно в наших исследованиях была обнаружена существенная роль холестерина в пуринергической регуляции синаптической передачи и поддержании активности локализованной в синапсе  $\alpha 2$ -изоформы  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  АТФазы (Giniatullin et al., 2015; Kravtsova et al., 2015).

Другой вид освобождения нейромедиатора, участвующий в модуляции чувствительности постсинаптических рецепторов, квантовой секреции и развития синапсов, основывается на невезикулярном (неквантовом) освобождении нейромедиатора (Vyskocil et al., 2009). Нами впервые было показано, что удаление небольшой части холестерина поверхностных мембран увеличивает невезикулярное освобождение, сопровождаемое закислением аксоплазмы. Причем эффект существенно потенцируется в условиях, когда, на фоне стимуляции экзоцитоза, процесс эндоцитоза блокирован за счет частичного удаления везикулярного холестерина. В целом, индуцируемое удалением холестерина невезикулярное освобождение ацетилхолина опосредуется активацией везамикол- и рН-зависимого транспортера, присутствие которого на поверхностной мембране зависит от экзо- и эндоцитоза синаптических везикул. Возможно, холестерин управляет невезикулярным освобождением, действуя через везикулярный транспортер ацетилхолина. Таким образом, холестерин синаптических мембран выступает связующим звеном между везикулярными процессами и невезикулярной (неквантовой) секрецией.

Не только насыщение мембран холестерином оказывает влияние на функционирование синаптического аппарата, но и состояние холестерина имеет значение. В биологических мембранах холестерин может подвергаться окислительной модификации, в результате образующиеся оксистеролы могут изменять биофизические свойства бислоя или «убегать» из мембран, взаимодействуя затем с оксистерол-связывающими белками и рецепторами (Steck, Lange, 2010; Olkkonen, 2013; Marwarha, Ghribi, 2015). Мы впервые описали изменения цикла синаптических везикул при воздействии бактериального фермента холестерин оксидазы. Оказалось, что окисление небольшой части мембранного холестерина способствует освобождению нейромедиатора везикулами рециклирующего пула через короткоживущую пору слияния, тогда как в этих условиях экзоцитоз везикул резервного пула протекает с полным встраиванием в пресинаптическую мембрану, но существенно ослаблен, вероятно, в результате нарушения кластеризации везикул. Хотя применяемый нами

фермент не обнаружен в клетках животных, амилоидный пептид в комплексе с  $\text{Cu}^{2+}$  обладает холестерин оксидазной активностью (Puglielli et al., 2005). Более того, продукт ферментативной реакции 4-холестен-3-он обнаруживается в мембранах мозга в норме, и его концентрация существенно повышается при некоторых патологиях, в частности болезни Альцгеймера (Puglielli et al., 2005; Gamba et al., 2015). Следовательно, можно предположить, что обнаруженные эффекты окисления мембранного холестерина имеют место в физиологических и/или патофизиологических условиях.

Метаболизм холестерина тесно связан с продукцией оксистеролов, некоторые из которых имеют либо токсические, либо протекторные эффекты (Hughes et al., 2013; Leoni, Saccia, 2013; Петров и др. 2016). Однако о влиянии оксистеролов на синаптическую коммуникацию известно крайне мало. Нам впервые удалось обнаружить высокую биологическую активность оксистерола, 5 $\alpha$ -холестан-3-она, усиленное образование которого наблюдается при редком генетическом заболевании церебротендинальном ксантоматозе, сопровождающимся нейродегенерацией и миастений. В наномолярной концентрации 5 $\alpha$ -холестан-3-он, не изменяя спонтанного освобождения, угнетал вызванную секрецию при низко- и высокочастотной активности, а также нарушал кратковременную синаптическую пластичность. Угнетение нейротрансмиссии под влиянием 5 $\alpha$ -холестан-3-она было связано с уменьшением пула синаптических везикул, активно вовлекающихся в освобождение медиатора при высокочастотной активности, хотя время рециклирования синаптических везикул при этом не изменялось. Также нами было показано, что этот оксистерол может влиять на свойства синаптических мембран, снижая стабильность липидных рафтов. Интересно, что эффекты 5 $\alpha$ -холестан-3-она были очень чувствительны к содержанию мембранного холестерина, и любые отклонения от нативного уровня холестерина (и в сторону увеличения, и в сторону уменьшения) существенно ослабляли эффекты 5 $\alpha$ -холестан-3-она. Это указывает на существование 5 $\alpha$ -холестан-3-он-связывающего «рецептора» (сайта), аффинность и/или функционирование которого зависит от мембранного холестерина.

В целом, мембранный холестерин, в избытке присутствующий в нервно-мышечном синапсе и организующий здесь липидные плотки, способствует протеканию всех этапов везикулярного цикла, обеспечивающих вызванное освобождение нейромедиатора, но ограничивает невезикулярное и спонтанное освобождение

нейромедиатора, а также активность ряда сигнальных путей, участвующих в регуляции экзоцитоза. Причем наиболее холестерин-чувствительными процессами являются эндоцитоз и рециклирование везикул, вызванное и невезикулярное освобождение медиатора. Важно, что пресинаптические процессы зависят не только от содержания холестерина, но и от его состояния (окисленное или нет). Окисление холестерина или экзогенный оксистерол (5 $\alpha$ -холестан-3-он), не затрагивая спонтанное освобождение, воздействуют на процессы вызванного экзоцитоза и поведение пулов синаптических везикул, а также стабильность синаптических рафтов.

Таким образом, изменения мембранного содержания холестерина, продукции оксистеролов, происходящие в физиологических и патологических условиях, могут существенно изменять функционирование синаптического аппарата, в том числе синаптическую передачу и пластичность.

## 6. ВЫВОДЫ

1. Холестерин в высокой концентрации содержится в синаптических мембранах нервно-мышечных препаратов, где участвует в организации скоплений ганглиозидов GM1 (липидных плотиков). Липидные плотики поверхностных мембран располагаются поблизости от сайтов экзо- и эндоцитоза, особенно высокое содержание липидных плотиков выявлено в мембранах рециклирующих синаптических везикул двигательных нервных окончаний лягушки и мыши.

2. Удаление небольшой части холестерина из поверхностных мембран, не влияя на спонтанное освобождение ацетилхолина, угнетает вызванную секрецию в ответ на низко- и особенно выражено на высокочастотную стимуляцию в нервно-мышечном синапсе лягушки. Депрессия секреции медиатора при высокочастотной активности связана не только с угнетением этапа экзоцитоза, но и со снижением популяции везикул, активно участвующих в нейротрансмиссии. При этом время везикулярного цикла не изменяется.

3. Частичное удаление холестерина, не только из наружных мембран, но и из мембран рециклирующих везикул, в дополнение к описанным в выводе 2 эффектам, ведет к нарушению процессов эндоцитоза и рециклирования синаптических везикул в нервно-мышечном синапсе лягушки, что вторично угнетает освобождение нейромедиатора вследствие истощения популяции везикул при синаптической активности.

4. Удаление существенной части холестерина резко усиливает спонтанный экзоцитоз синаптических везикул, что в значительной степени вызвано увеличением продукции активных форм кислорода (АФК) НАДФН-оксидазой в нервно-мышечном синапсе лягушки. Образовавшиеся АФК стимулируют расположенные около сайтов экзоцитоза TRPV1-каналы, вход  $Ca^{2+}$  через которые активирует кальмодулин-зависимую фосфатазу кальциневрин, участвующую в интенсификации спонтанного экзоцитоза.

5. Механизм связанного с удалением холестерина усиления спонтанного экзоцитоза в нервно-мышечном синапсе лягушки зависит от протеинкиназы C, поскольку ее блокирование (но не фосфолипазы C или хелатирование  $Ca^{2+}$ )

способствует протеканию спонтанного экзоцитоза через скоротечную пору слияния (kiss-and-run путь).

6. Удаление небольшой части холестерина (из поверхностных и везикулярных мембран) усиливает невезикулярное освобождение ацетилхолина и ведет к закислению аксоплазмы, что определяется двумя механизмами в нервно-мышечном синапсе крысы. Активацией везамикол- и рН чувствительного транспортера ацетилхолина, и его усиленной доставкой в пресинаптическую мембрану в ходе стимуляции экзоцитоза при заблокированном (за счет удаления холестерина) эндоцитозе синаптических везикул.

7. Окисление части мембранного холестерина бактериальным ферментом холестерин оксидазой ведет к дестабилизации скоплений ганглиозидов GM1 в синаптической мембране, угнетает вызванное освобождение медиатора и изменяет пресинаптические везикулярные процессы в двигательном нервном окончании лягушки. Везикулы рециклирующего пула начинают освобождать нейромедиатор через скоротечную пору слияния (kiss-and-run путь), а доставка везикул резервного пула в сайты экзоцитоза резко ослабляется, что сопровождается нарушением их кластеризации. В результате окисление холестерина значительно подавляет освобождение нейромедиатора в течение длительной высокочастотной активности.

8. Оксистерол, 5 $\alpha$ -холестан-3-он в наномолярной концентрации не влияет на спонтанное освобождение медиатора, но разрушает липидные плотки в синаптическом регионе и угнетает вызванное освобождение нейромедиатора при низко- и высокочастотной стимуляции в нервно-мышечном синапсе мыши. В последнем случае его действие связано с уменьшением популяции синаптических везикул, активно вовлекающихся в синаптическую передачу. Причем эффекты 5 $\alpha$ -холестан-3-она на состояние мембран и экзоцитоз значительно ослабляются при изменении исходного содержания мембранного холестерина (как в сторону увеличения, так и уменьшения).

## 7. СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- АЗ – активная зона  
 АТФ – аденозинтрифосфат  
 АФК – активные формы кислорода  
 αБТ -α-бунгаротоксин  
 ВТАх – везикулярный транспортер ацетилхолина  
 ГТФ - гуанозинтрифосфат  
 ГЭБ – гематоэнцефалический барьер  
 МПКП – миниатюрный потенциал концевой пластинки  
 МТКП – миниатюрный ток концевой пластинки  
 МЦД- метил-β-циклодекстрин  
 НАДНФ - никотинамидадениндинуклеотидфосфат  
 нАхР – никотиновый ацетилхолиновый рецептор  
 о.е. – относительные единицы  
 ПД – потенциал действия  
 ПКП – потенциал концевой пластинки  
 ПКС – протеинкиназа С  
 ПХР – пероксидаза хрена  
 ТКП – ток концевой пластинки  
 ФИ-4,5-Ф2 - фосфатидилинозитол-4,5-бифосфат  
 ХО – холестерин оксидаза  
 ХТ-В – флуоресцентно-меченая субъединица В холерного токсина  
 цАМФ – циклический аденозинмонофосфат  
 цГМФ – циклический гуанозинмонофосфат  
 ЦНС – центральная нервная система  
 ЭПР – эндоплазматический ретикулум  
 АР – адаптерные белки  
 Са<sup>2+</sup> - кальций  
 GPI – гликозил-фосфатидилинозитол  
 Н<sub>2</sub>О<sub>2</sub> – пероксид водорода  
 NSF - N-этилмалеимид-чувствительный белок слияния

## 8. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Балабан П. М. Клеточные механизмы пластичности поведения в простых нервных системах / П. М. Балабан // Росс. Физиол. журн. им. Сеченова. – 2007. – Т. 93. - № 5. – С. 521-530.
2. Волков М. Е. Изучение везикулярного цикла в нервных образованиях соматической мускулатуры дождевого червя (*Lumbricus terrestris*) / М. Е. Волков, А. М. Петров, Е. М. Волков, А. Л. Зефирова // Цитология. - 2011. – Т. 53. - № 10. - С. 37-43.
3. Гайдуков А. Е. Участие базальной и кальций активируемой протеинкиназы С в секреции медиатора в моторных синапсах мышцы / А.Е. Гайдуков, А. А. Марченкова, О. П. Балежина // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. - 2012. – Т. 153. - № 6. - С. 795-799.
4. Гайдуков А. Е. Кальций-зависимая фосфатаза кальцинейрин тормозит вызванную секрецию медиатора в нервно-мышечных синапсах мышцы / А. Е. Гайдуков, Е. О. Тарасова, О. П. Балежина // Нейрохимия. – 2013. – Т. 30. - №1. - С. 35-40.
5. Добрецов М. Г. Формирование нервных окончаний в фазных мышцах лягушки / М.Г. Добрецов, А. Л. Зефирова, Р. С. Куртасанов, И. А. Халилов, И. М. Виноградова // Нейрофизиология. - 1983. - Т.15. - №1. - С.89-107.
6. Захаров А. В. Экспериментальное и модельное исследование механизма рециклирования синаптических везикул / А. В. Захаров, А. М. Петров, Н. В. Котов, А. Л. Зефирова // Биофизика. - 2012. - Т.57. - №. 4. – С. 670-682.
7. Зефирова А. Л. Прижизненное флуоресцентное исследование двигательного нервного окончания лягушки с использованием эндоцитозного маркера FM 1-43 / А. Л. Зефирова, П. Н. Григорьев, А. М. Петров, М. Г. Минлебаев, Г.Ф. Ситдикова // Цитология. – 2003. – Т. 45. - №12. - С. 1163-1171.
8. Зефирова А. Л. "Kiss-and-run" механизм квантовой секреции медиатора в нервно-мышечном синапсе лягушки. / А. Л. Зефирова, М. М. Абдрахманов, П. Н. Григорьев // Бюлл. экспер. биол. и мед. – 2004 – Т. 137. - № 2. – С. 124-128.
9. Зефирова А. Л. Эффекты гиперкалиевых растворов и кофеина на процессы экзо-эндоцитоза синаптических везикул в двигательном нервном окончании лягушки / А. Л. Зефирова, М. М. Абдрахманов, П. Н. Григорьев // Росс. Физиол. журн. им. Сеченова. – 2005. – Т. 91. - № 7. – С. 821-831.

10. Зефирова А. Л. Внутриклеточный кальций и механизмы эндоцитоза синаптических везикул в двигательном нервном окончании лягушки / А. Л. Зефирова, М. М. Абдрахманов, П. Н. Григорьев, А. М. Петров // Цитология. – 2006. – Т. 48. - № 1. – С.34-41.
11. Зефирова А. Л. Везикулярный цикл в пресинаптическом нервном окончании. / А. Л. Зефирова // Рос. Физиол. Журнал. – 2007 – Т.93. - № 5. - С. 554-563.
12. Зефирова А. Л. Особенности кругооборота синаптических везикул в двигательных нервных окончаниях лягушки и мыши / А. Л. Зефирова, А. В. Захаров, Р. Д. Мухамедзянов, А. М. Петров // Журнал эволюционной биохимии и физиологии. – 2008. – Т. 44. - № 6. – С. 603-612.
13. Зефирова А. Л. Везикулярный цикл в двигательных нервных окончаниях диафрагмы мыши / А. Л. Зефирова, А. В. Захаров, Р. Д. Мухамедзянов, А. М. Петров, Г. Ф. Ситдикова // Российский физиологический журнал. – 2008. – Т. 94. - № 2. – С. 129-141.
14. Зефирова А. Л. Эндоцитоз в нервной системе / А. Л. Зефирова, А. М. Петров // Природа. - 2009. - №. 9. - С. 12-20.
15. Зефирова А. Л. Чувствительность внутриклеточных Са-связывающих сайтов экзо- и эндоцитоза синаптических везикул к ионам Sr, Ва и Mg / А. Л. Зефирова, П. Н. Григорьев // Росс. Физиол. журн. им. Сеченова.- 2009. - Т. 95. - №3. - С. 262-272.
16. Зефирова А. Л., Липиды в процессах экзо- и эндоцитоза синаптических везикул / А. Л. Зефирова, А. М. Петров // Росс. физиол. журнал им. И.М. Сеченова. – 2010. - Т. 96. - № 8. - С.753-765.
17. Зефирова А. Л. Синаптическая везикула и механизм освобождения медиатора (экзо-эндоцитозный везикулярный цикл) / А. Л. Зефирова, А. М. Петров // Казань: Арт-кафе. - 2010. - 324с. + 32 цветные вкладки.
18. Зефирова А. Л. Ионные каналы возбудимой клетки (структура, функция, патология) / А. Л. Зефирова, Г. Ф. Ситдикова // Казань: Арт-кафе. - 2010. - 271 с.
19. Кравцова В. В, Роль холестерина в поддержании электрогенеза концевых пластинок диафрагмы крысы / В. В. Кравцова, А. М. Петров, А. Н. Васильев, А. Л. Зефирова, И. И. Кривой // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2014. - Т. 158. - № 9 - С. 275- 279.

20. Магазаник Л. Г. Исследование строения ионных каналов рецепторов глутамата и механизмов их блокады органическими катионами / Л. Г. Магазаник, Д. Б. Тихонов, К. В. Большаков, В. Е. Гмиро, С. Л. Булдакова, М. В. Самойлова // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. – 2001. – Т. 87. - № 8. –С. 1026-1039.
21. Петров А. М. цГМФ-зависимая регуляция рециклирования синаптических везикул. / А. М. Петров, А. Р. Гиниатуллин, А. Л. Зефирова // Неврологический вестник. – 2007. – Т. 39. - № 1. – С. 207-208.
22. Петров А. М. Роль сигнального каскада цАМФ в кругообороте синаптических везикул двигательного нервного окончания лягушки / А. М. Петров, А. Р. Гиниатуллин, А. Л. Зефирова // Нейрохимия. – 2008. – Т. 25. - № 3. – С. 202-210.
23. Петров А. М. Роль холестерина в процессах экзо-и эндоцитоза в двигательном нервном окончании лягушки / А. М. Петров, М. Р. Касимов, А. Р. Гиниатуллин, О. И. Тараканова, А. Л. Зефирова // Рос. Физиол. журнал им. И.М. Сеченова. - 2009. – Т. 95. - № 7. – С. 762-772.
24. Петров А. М. Холестерин и липидные плотки в плазматической мембране нервного окончания и мембране синаптических везикул / А. М. Петров, К. Е. Кудряшова, Ю. Г. Одношивкина, А. Л. Зефирова // Нейрохимия. – 2011. - Т. 28. - № 1. – С. 19-25.
25. Петров А. М. Холестерин и липидные плотки биологических мембран. Роль в секреции, рецепции и функционировании ионных каналов / А. М. Петров, А. Л. Зефирова // Успехи физиологических наук. – 2013. – Т. 44. - № 1. – С. 17-38.
26. Петров А. М. Эффекты окисления мембранного холестерина на везикулярный цикл в двигательном нервном окончании лягушки *Rana Ridibunda*/ А. М. Петров, М. Р. Касимов, А. Р. Гиниатуллин, А. Л. Зефирова // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. – 2013. - Т.99. - № 2. – С. 93-108.
27. Петров А. М. «Холестерин-зависимая регуляция секреции, рецепции и функционирования ионных каналов» / А. М. Петров, А. Л. Зефирова // «Избранные главы фундаментальной и трансляционной медицины» / отв. Ред. Р.И. Жданов. – Казань: Изд-во Казан. Ун-та. - 2014. – С.169-201.
28. Петров А. М. Роль мембранного холестерина в эффектах активации бета2-адренорецепторов предсердий мыши / А. М. Петров, Ю. Г. Одношивкина, А. Л. Зефирова // Доклады академии наук. - 2014. - Т. 454. - №1. - С. 107-110.

29. Петров А.М. Холестерин мозга и синаптические дисфункции при нейродегенеративных заболеваниях / А.М. Петров, М.Р. Касимов, А.Л. Зефирова // *Acta Naturae*. – 2016. – №1. – в печати.
30. Тараканова О. И. Роль мембранного холестерина в процессах секреции медиатора из двигательных нервных окончаний / О. И. Тараканова, А. М. Петров, А. Л. Зефирова // *Доклады Академии наук*. – 2011. - Т. 438, № 2. – С. 1-3.
31. Харакоз Д. П. О возможной физиологической роли фазового перехода «жидкое-твердое» в биологических мембранах / Д. П. Харакоз // *Усп. биол. химии*. – 2001. – Т. 41. – С.333-364.
32. Abdrakhmanov M. M. Depolarization-induced calcium-independent synaptic vesicle exo- and endocytosis at frog motor nerve terminals. / M. M. Abdrakhmanov, A. M. Petrov, P. N. Grigoryev, A. L. Zefirov // *Acta Naturae*. – 2013. – Vol. 5. - № 4. – P. 77-82.
33. Adams D. J. Architecture of the Synaptophysin/Synaptobrevin Complex: Structural Evidence for an Entropic Clustering Function at the Synapse / D. J. Adams, C. P. Arthur, M. H. Stowell // *Sci Rep*. - 2015. – Vol. 5. – P.13659.
34. Ahn K. W. Cholesterol oxidase senses subtle changes in lipid bilayer structure. / K. W. Ahn, N. S. Sampson // *Biochemistry*. – 2004. – Vol. 43. - № 3. – P. 827-836.
35. Alabi A. A. Synaptic vesicle pools and dynamics Cold Spring / A. A. Alabi, R. W. Tsien // *Harb. Perspect. Biol*. – 2012. – Vol. 4. - № 8. – P. a013680
36. Alabi A. A. Perspectives on kiss-and-run: role in exocytosis endocytosis, and neurotransmission / A. A. Alabi, R. W. Tsien // *Annu. Rev. Physiol*. – 2013. – Vol. 75. - P. 393-422.
37. Anchisi L. Cholesterol homeostasis: a key to prevent or slow down neurodegeneration. / L. Anchisi, S. Dessì, A. Pani, A. Mandas // *Front Physiol*. - 2013. - Vol. 3. - P. 1-12.
38. Anderson D. C. Pharmacological characterization of the acetylcholine transport system in purified Torpedo electric organ synaptic vesicles. / D. C. Anderson, S. C. King, S. M. Parsons // *Mol. Pharmacol*. – 1983. – Vol. 24. – P. 48-54.
39. Andersson F. Perturbation of syndapin/PACSIN impairs synaptic vesicle recycling evoked by intense stimulation / F. Andersson, J. Jakobsson, P. Löw, O. Shupliakov, L. Brodin // *J Neurosci*. - 2008 – Vol. 28. P.3925-3933.

40. Ando S. Turnover of synaptic membranes: age-related changes and modulation by dietary restriction. / S. Ando, Y. Tanaka, Y. Toyoda nee Ono, K. Kon, S. Kawashima // *J. Neurosci Res.* – 2002. – Vol. 70. - № 3. – P. 290-297.
41. Andresen M. C. The unsilent majority-TRPV1 drives "spontaneous" transmission of unmyelinated primary afferents within cardiorespiratory NTS. / M. C. Andresen, M. E. Hofmann, J. A. Fawley // *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* – 2012. – Vol. 303 – P. 1207-1216.
42. Armstrong D. Amplification of diacylglycerol activation of protein kinase C by cholesterol / D. Armstrong, R. Zidovevetski // *Biophysical J.* – 2008. – Vol. 94. - P. 4700-4710.
43. Augustin J., Rosenmund C., Sudhof T.C., Brose N. Munc13-1 is essential for fusion competence of glutamatergic synaptic vesicle / J. Augustin, C. Rosenmund, T. C. Sudhof, N. Brose // *Nature.* -1999. – Vol. 400. – P.457-461.
44. Aureli M. Lipid membrane domains in the brain / M. Aureli, S. Grassi, S. Prioni, S. Sonnino, A. Prinetti // *Biochim Biophys Acta.* – 2015. – Vol. 1851, № 8. – P.1006-1016.
45. Bacci A. Chronic blockade of glutamate receptors enhances presynaptic release and downregulates the interaction between synaptophysin-synaptobrevin / A. Bacci A, S. Coco, E. Pravettoni, U. Schenk, S. Armano, C. Frassoni, C. Verderio, P. De Camilli, M. Matteoli // *J. Neurosci.* – 2001. – Vol. 21. – P. 6588-6596.
46. Báez-Pagán C.A. Potential role of caveolin-1-positive domains in the regulation of the acetylcholine receptor's activatable pool: implications in the pathogenesis of a novel congenital myasthenic syndrome / C.A. Báez-Pagán, Y. Martínez-Ortiz, J.D. Otero-Cruz, I.K. Salgado-Villanueva, G. Velázquez, A. Ortiz-Acevedo, O. Quesada, W.I. Silva, J.A. Lasalde-Dominicci // *Channels (Austin).* - 2008. - Vol. 2. - № 3. - P. 180-190.
47. Baier C.J. Cholesterol modulation of nicotinic acetylcholine receptor surface mobility / C.J. Baier, C.E. Gallegos, V. Levi, F.J. Barrantes // *Eur. Biophys J.* - 2010. - Vol. 39. - № 2. - P. 213-227.
48. Balaji J. Single-vesicle imaging reveals that synaptic vesicle exocytosis and endocytosis are coupled by a single stochastic mode / J. Balaji, T. A. Ryan // *PNAS.* – 2007. – Vol. 104. – P. 20576-20581.
49. Barbosa J Jr, Clarizia AD, Gomez MV, Romano-Silva MA, Prado VF, Prado MA. Effect of protein kinase C activation on the release of [3H]acetylcholine in the presence of

- vesamicol / J. Jr. Barbosa, A. D. Clarizia, M. V. Gomez, M. A. Romano-Silva, V. F. Prado, M. A. Prado // *J. Neurochem.* – 1997. – Vol. 69. - № 6. - 2608-2611.
50. Barclay J. W. Phosphorylation of Munc 18 by protein kinase C regulates the kinetics of exocytosis / J. W. Barclay, T. J. Craig, R. J. Fisher, L. F. Ciufo, G. J. Evans, A. Morgan, R. D. Burgoyne // *J. Biol. Chem.* – 2003. – Vol. 278. – P.10538-10545.
51. Bar-On D. Evaluation of the heterogeneous reactivity of the syntaxin molecules on the inner leaflet of the plasma membrane / D. Bar-On, M. Gutman, A. Mezer, U. Ashery, T. Lang, E. Nachliel // *J. Neurosci.* – 2009. – Vol. 29. – P.12292-12301.
52. Barrantes F. J. Cell-surface translational dynamics of nicotinic acetylcholine receptors / F.J. Barrantes // *Front Synaptic Neurosci.* – 2014. – Vol. 6. – P.25.
53. Bastiani M. MURC/Cavin-4 and cavin family members form tissue-specific caveolar complexes / M. Bastiani, L. Liu, M.M. Hill, M.P. Jedrychowski, S.J. Nixon, H.P. Lo, D. Abankwa, R. Luetterforst, M. Fernandez-Rojo, M.R. Breen, S.P. Gygi, J. Vinten, P.J. Walser, K. N. North, J.F. Hancock, P.F. Pilch, R.G. Parton // *J. Cell Biol.* - 2009. - Vol. 185. - № 7. - P. 1259-1273.
54. Bastiani M. Caveolae at a glance / M. Bastiani, R.G. Parton // *J. of Cell Sci.* - 2010. - Vol. 123. - P. 3831-3836.
55. Basu J. Munc13-1 C1 domain activation lowers the energy barrier for synaptic vesicle fusion / J. Basu, A. Betz, N. Brose, C. Rosenmund // *J. Neurosci.* – 2007. – Vol. 27. – P. 1200-1210.
56. Båvner A. On the mechanism of accumulation of cholestanol in the brain of mice with a disruption of sterol 27-hydroxylase / A. Båvner, M. Shafaati, M. Hansson, M. Olin, S. Shpitzen, V. Meiner, E. Leitersdorf, I. Björkhem // *J. Lipid Res.* – 2010. – Vol. 51. - № 9. - P. 2722-2730.
57. Becherer U. Vesicle pools, docking, priming and release / U. Becherer, J. Rettig // *Cell Tissue Res.* – 2006. – Vol. 326. – P.393-407.
58. Besshoh S. Developmental changes in the association of NMDA receptors with lipid rafts / S. Besshoh, S. Chen, I.R. Brown, J.W. Gurd // *J. Neurosci. Res.* - 2007. - Vol. 85. - № 9. - P.1876-1883.
59. Betz W. J. Activity-dependent fluorescent staining and destaining of living vertebrate motor nerve terminals. / W. J. Betz, F. Mao, G. S. Bewick // *J Neurosci* – 1992. – Vol. 12. – P. 363-375.

60. Betz W.J. Optical monitoring of transmitter release and synaptic vesicle recycling at the frog neuromuscular junction / W.J. Betz, G.S. Bewick // *J. Physiol.* – 1993. – Vol. 460. – P. 287-309.
61. Betz W. J. Okadaic acid disrupts clusters of synaptic vesicles in frog motor nerve terminals. / W. J. Betz, A. W. Henkel // *J. Cell Biol.* – 1994. – Vol. 124. - № 5. – P. 843-854.
62. Bhalla A. Ca(2+)-synaptotagmin directly regulates t-SNARE function during reconstituted membrane fusion. / A. Bhalla, M. C. Chicka, W. C. Tucker, E. R. Chapman // *Nat Struct Mol Biol.* – 2006. – Vol. 13. - № 4. – P. 323-330.
63. Birks R. The fine structure of the neuromuscular junction of the frog / R. Birks, H. E. Huxley, B. Katz // *J. Physiol.* – 1960. – Vol. 150. – P. 134-144.
64. Björkhem I. Cerebrotendinous xanthomatosis / I. Björkhem // *Curr. Opin. Lipidol.* – 2013. - Vol. 24. - P. 283-287.
65. Blank N. Cholera toxin binds to lipid rafts but has a limited specificity for ganglioside GM1 / N. Blank, M. Schiller, S. Krienke, G. Wabnitz, A.D. Ho, H.M. Lorenz // *Immunol. Cell Biol.* – 2007. – Vol. 85. - P. 378-382.
66. Brachet A. LTP-triggered cholesterol redistribution activates Cdc42 and drives AMPA receptor synaptic delivery. / A. Brachet, S. Norwood, J. F. Brouwers, E. Palomer, J. B. Helms, C. G. Dotti, J. A. Esteban // *J Cell Biol.* - 2015. - Vol. 208. - № 6. - P. 791-806.
67. Brameshuber M. Imaging of mobile long-lived nanoplateforms in the live cell plasma membrane / M. Brameshuber, J. Weghuber, V. Ruprecht, I. Gombos, I. Horváth, L. Vigh, P. Eckerstorfer, E. Kiss, H. Stockinger, G.J. Schütz // *J. Biol. Chem.* - 2010. - V. 285. - № 53. - P.41765-41771.
68. Brose N. Regulation of transmitter release by unc-13 and its homologues / N. Brose, C. Rossmund, J. Rettig // *Curr. Opin. Neurobiol.* – 2000. – Vol. 10. – P.303-311.
69. Brown A. J. Oxysterols: Sources, cellular storage and metabolism, and new insights into their roles in cholesterol homeostasis. / A. J. Brown, W. Jessup // *Mol Aspects Med.* - 2009. - Vol. 30. - № 3. - P. 111-122.
70. Brown M. S. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. / M. S. Brown, J. L. Goldstein // *Science* – 1986. – Vol. 232. – P. 34-47.
71. Brunger A. T. Structure of proteins involved in synaptic vesicle fusion in neurons. / A. T. Brunger // *Annu Rev Biophys Biomol Struct.* – 2001. – Vol. 30. – P. 157-171.

72. Brunger A.T. Structure and function of SNARE and SNARE-interacting proteins / A. T. Brunger // *Q Rev. Biophys.* – 2005. – Vol. 38. – P.1-47.
73. Bruns D. Molecular determinant of exocytosis / D. Bruns, R. Jahn // *J. Physiol.* – 2002. – Vol. 443. – P.333-338.
74. Brusés J.L. Membrane lipid rafts are necessary for the maintenance of the (alpha)7 nicotinic acetylcholine receptor in somatic spines of ciliary neurons / J.L. Brusés, N. Chauvet, U. Rutishauser // *J. Neurosci.* - 2001. - V. 21. - № 2. - P. 504-512.
75. Bryleva E. Y. ACAT1 gene ablation increases 24(S)-hydroxycholesterol content in the brain and ameliorates amyloid pathology in mice with AD. / E. Y. Bryleva, M. A. Rogers, C. C. Chang, F. Buen, B. T. Harris, E. Rousselet, N. G. Seidah, S. Oddo, F. M. LaFerla, T. A. Spencer, W. F. Hickey, T. Y. Chang // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* - 2010. - Vol. 107. - P. 3081-3086.
76. Butchbach M. E. Association of excitatory amino acid transporters, especially EAAT2, with cholesterol-rich lipid raft microdomains: importance for excitatory amino acid transporter localization and function. / M. E. Butchbach, G. Tian, H. Guo, C. L. Lin // *J Biol Chem.* - 2004. - Vol. 279. - № 33. - P. 34388-34396.
77. Caldwell L. Presynaptic pH and vesicle fusion in *Drosophila* larvae neurons / L. Caldwell, P. Harries, S. Sydlik, C.J.Schwiening // *Synapse.* – 2013. – Vol. 67. - №11. – P.729-740.
78. Camargo N. High-fat diet ameliorates neurological deficits caused by defective astrocyte lipid metabolism. / N. Camargo, J. F. Brouwers, M. Loos, D. H. Gutmann, A. B. Smit, M. H. Verheijen // *FASEB J.* - 2012. - Vol. 26. - № 10. - P. 4302-4315.
79. Carter A. G. Assessing the role of calcium-induced calcium release in short-term presynaptic plasticity at excitatory central synapses. / A. G. Carter, K. E. Vogt, K. A. Foster W. G. Regehr // *J Neurosci* – 2002. – Vol. 22. – P. 21–28.
80. Ceccarelli B. Turnover of transmitter and synaptic vesicles at the frog neuromuscular junction / B. Ceccarelli, W. P. Hurlbut, A. Mauro // *J Cell Biol.* – 1973. – Vol. 57. – P.499-524.
81. Chang W. P. SV2 renders primed synaptic vesicles competent for Ca<sup>2+</sup> -induced exocytosis / W. P. Chang, T. C. Südhof // *J. Neurosci.* – 2009. – Vol. 29. – P.883-897.
82. Chapman E.R. Synaptotagmin: a Ca<sup>(2+)</sup> sensor that triggers exocytosis? / E. R. Chapman // *Nat Rev Mol Cell Biol.* – 2002. – Vol. 3. – P.498-508.

83. Chen Y.A. SNARE-mediated membrane fusion / Y. A. Chen, R. H. Sheller // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* – 2001. – Vol. 2. – P. 98-106.
84. Chen X. Three-dimensional structure of the complexin/SNARE complex / X. Chen, D. R. Tomchick, E. Kovrigin // *Neuron.* – 2002. – Vol. 33. – P.397-409.
85. Chen X. Are neuronal SNARE proteins Ca<sup>2+</sup> sensors? / X. Chen, J. Tang, T. C. Sudhof, J. Rizo // *J. Mol. Biol.* – 2005. – Vol. 347, № 1. – P.145-158.
86. Chen X. SNARE-mediated lipid mixing depends on the physical state of the vesicle / X. Chen, D. Araç, T. M. Wang, C. J. Gilpin, J. Zimmerberg, J. Rizo // *Biophys. J.* – 2006. – Vol. 90. – P. 2062-2074.
87. Cheung G. Synaptic vesicle generation from activity-dependent bulk endosomes requires calcium and calcineurin. / G. Cheung, M. A. Cousin // *J Neurosci* – 2013. – Vol. 33. – P. 3370-3379.
88. Chieriegatti E., Witkin J.W., Baldini G. SNAP25 and synaptotagmin 1 function in Ca<sup>2+</sup>-dependent reversible docking of granules to the plasma membrane // *Traffic.* – 2002. – Vol. 3. – P.496-511.
89. Christian A. E. Use cyclodextrins for manipulating cellular cholesterol content. / A. E. Christian, M. P. Haynes, M. C. Phillips, G. H. Rothblat // *J Lipid Res.* – 1997. – Vol. 38. – P.2264-2272.
90. Cho S. Proton-mediated block of Ca<sup>2+</sup> channels during multivesicular release regulates short-term plasticity at an auditory hair cell synapse / S. Cho, H. von Gersdorff // *J. Neurosci.* – 2014. – Vol. 34. - № 48. – P. 15877-15887.
91. Chuang H. H. Oxidative challenges sensitize the capsaicin receptor by covalent cysteine modification. / H. H. Chuang, S. Lin // *Proc Natl Acad Sci U S A* – 2009. – Vol. 106. – P. 20097-20102.
92. Clayton E. L. The molecular physiology of activity-dependent bulk endocytosis of synaptic vesicles / E. L. Clayton, M. A. Cousin // *J. Neurochem.* – 2009. - Vol. 111. - P. 901-914.
93. Cole A. A. Co-segregation of AMPA receptors with G(M1) ganglioside in synaptosomal membrane subfractions / A. A. Cole, A. Dosemeci, T. S. Reese // *Biochem J.* - 2010. - V. 427. - № 3. - P. 535-540.

94. Colón-Sáez J. O. The  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptor function in hippocampal neurons is regulated by the lipid composition of the plasma membrane / J. O. Colón-Sáez, J. L. Yakel // *J. Physiol.* - 2011. - V. 589. - № Pt 13. - P. 3163-3174.
95. Cousin, M.A. Two mechanism of synaptic vesicle recycling in rat brain nerve terminal / M.A Cousin, P.J. Robinson / *M. A. Cousin // J. Neurochem.* – 2000. – Vol. 75. – P.1645-1653.
96. Couteaux R. Synaptic vesicles and pouches at the level of "active zones" of the neuromuscular junction / R. Couteaux, M. Pécot-Dechavassine // *C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D.* – 1970. – Vol. 271. – P.2346-2349.
97. Gracheva E. O. Tomosyn inhibits synaptic vesicle priming in *Caenorhabditis elegans* / E. O. Gracheva, A. O. Burdina, A. M. Holgado, M. Berthelot-Grosjean, B. D. Ackley, G. Hadwiger, M. L. Nonet, R. M. Weimer, J. E. Richmond // *PLoS Biol.* – 2006. – Vol. 4. - P. e261.
98. Craig T. G. Physiological regulation of Munc18/nSec1 phosphorylation on serine-313 / T. G. Craig, G. J. Evans, A. Morgan // *J. Neurochem.* – 2003. – Vol. 86. – P.1450-1457.
99. Cremona O. Phosphoinositides in membrane traffic at the synapse / O. Cremona, P. J. DeCamilli // *J. Cell Sci.* – 2001. – Vol. 114, № 6. – P.1041-1052.
100. Groffen A. J. Verhage M. Doc2b is a high-affinity  $Ca^{2+}$  sensor for spontaneous neurotransmitter release / A. J. Groffen, S. Martens, R. Díez Arazola, L. N. Cornelisse, N. Lozovaya, A. P. de Jong, N. A. Goriounova, R. L. Habets, Y. Takai, J. G. Borst, N. Brose, H. T. McMahon // *Science.* – 2010 – Vol. 327. - P. 1614-1618.
101. Darios F. B. Phospholipases and fatty acid signalling in exocytosis. / F. Darios, E. Connall, B. Davletov // *J. Physiol.* – 2007. – Vol. 585.3. – P. 699-704.
102. Dart C. Lipid microdomains and the regulation of ion channel function / C. Dart // *J. Physiol.* - 2010. - V. 588. - № Pt 17. - P. 3169-3178.
103. Dason J. S. Vesicular sterols are essential for vesicle cycling / J.S. Dason, A.J. Smith, L. Marin, M.P. Charlton // *J. Neurosci.* – Vol. 30. – №. 47. – P.15856-15865.
104. Dason J. S. Cholesterol and F-actin are required for clustering of recycling synaptic vesicle proteins in the presynaptic plasma membrane. /J. S. Dason, A. J. Smith, L. Marin, M. P. Charlton // *J Physiol* – 2014. – Vol. 592. – P. 621-633.
105. DeBarber A.E. Profiling sterols in cerebrotendinous xanthomatosis: utility of Girard derivatization and high resolution exact mass LC-ESI-MS(n) analysis / A. E. DeBarber, Y. Sandler, A.S. Pappu, L.S. Merkens, P.B. Duell, S.R. Lear, S.K. Erickson, R.D. Steiner //

- J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci. – 2011. – Vol. 879. - № 17-18. - P. 1384-1392.
106. Delint-Ramirez I. In vivo composition of NMDA receptor signaling complexes differs between membrane subdomains and is modulated by PSD-95 and PSD-93 / I. Delint-Ramirez, E. Fernández, A. Bayés, E. Kicsi, N.H. Komiyama, S.G. Grant // J. Neurosci. - 2010. - V. 30. - № 24. - P. 8162-8170.
107. Diao J. C2AB: a molecular glue for lipid vesicles with a negatively charged surface / J. Diao, T. Y. Yoon, Z. Su, Y. K. Shin, T. Ha // Langmuir. – 2009. – Vol. 25. – P.7177-7180.
108. G.H. Endosomal pH in neuronal signaling and synaptic transmission: role of Na(+)/H(+) exchanger NHE5 / G.H. Diering, M. Numata // Front Physiol. – 2014. – Vol. 4. – P.412.
109. Dietschy J.M. Central nervous system: cholesterol turnover, brain development and neurodegeneration. / J. M. Dietschy // Biol Chem. - 2009. - Vol. 390. - № 4. - P. 287-293.
110. Di Paolo G. Impaired PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> synthesis in nerve terminals produces defects in synaptic vesicle trafficking / G. Di Paolo, H. S. Moskowitz, K. Gipson, M. R. Wenk, S. Voronov, M. Obayashi, R. Flavell, R. M. Fitzsimonds, T. A. Ryan, P. De Camilli // Nature. – 2004. – Vol. 431. – P.415-422.
111. Di Paolo G. Phospholipides in cell regulation and membrane dynamics. / G. Di Paolo, P. De Cailli // Nature. – 2006. – Vol. 443. – P. 651-657.
112. Dittman J. Molecular circuitry of endocytosis at nerve terminals / J. Dittman, T. A. Ryan // Annu. Rev. Cell Dev. Biol. – 2009. – Vol. 25. – P. 133-160.
113. Dresbach T. The presynaptic cytomatrix of brain synapses / T. Dresbach, B. Qualmann, M. M. Kessels, C. C. Garner, E. D. Gundelfinger // Cell Mol. Life Sci. – 2001. – Vol. 58. – P.94-116.
114. Dreyer F. Ultrastructure of the "active zone" in the frog neuromuscular junction / F. Dreyer, K. Peper, K. Akert, C. Sandri, H. Moor // Brain Res. – 1973. – Vol. 62. – P.373-380.
115. Du J. Protons are a neurotransmitter that regulates synaptic plasticity in the lateral amygdala / J. Du, L.R. Reznikov, M.P. Price, X.M. Zha, Y. Lu, T.O. Moninger, J.A. Wemmie, M.J.Welsh // Proc Natl Acad Sci U S A. – 2014. – Vol. 111. – № 24. – P.8961-8966.

116. Dulubova I. A conformational switch in syntaxin during exocytosis / I. Dulubova, S. Sugita, S. Hill, M. Hosaka, I. Fernandez, T. C. Südhof, J. A. Rizo // *EMBO J.* – 1999. – Vol. 18. – P.4372-4382.
117. Dulubova I. Munc18-1 binds directly to the neuronal SNARE complex / I. Dulubova, M. Khvotchev, S. Liu, I. Huryeva, T. C. Südhof, J. Rizo // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 2007. – Vol.104. - № 8. – P.2697-2702.
118. Eccles J.C. The physiology of synapses / J. C. Eccles // Springer-Verlag Berlin Gottingen-Heidelberg. – 1963. – 396 p.
119. Edwards C. Is an acetylcholine transport system responsible for nonquantal release of acetylcholine at the rodent myoneural junction? / C. Edwards, V. Doležal, S. Tuček, H. Zemková, F. Vyskočil // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 1985. – Vol. 82. – P. 3514-3518.
120. Egawa J. Membrane/lipid rafts and neurobiology: Age-related changes in membrane lipids and loss of neuronal function / J. Egawa, M.L. Pearn, B. P. Lemkuil, P. M. Patel, B. P. Head // *J Physiol.* – 2015. - Sep 1. doi: 10.1113/JP270590.
121. Eichholtz T. A myristoylated pseudosubstrate peptide, a novel protein kinase C inhibitor / T. Eichholtz, , D.B. de Bont, , J. de Widt, , R.M. Liskamp, H.L. Ploegh // *J Biol Chem.* – 1993. – Vol. 268. - P. 1982-1986.
122. Elahy M. Blood-brain barrier dysfunction developed during normal aging is associated with inflammation and loss of tight junctions but not with leukocyte recruitment. / M. Elahy, C. Jackaman, J. CL. Mamo, V. Lam, S. S. Dhaliwal, C. Giles, D. Nelson, R. Takechi // *Immunity and Ageing.* - 2015. - Vol.12. - P. 2.
123. Estrella D. A further study of the neuromuscular effects of vesamicol (AH5183) and of its enantiomer specificity. / D. Estrella, K. L. Green, C. Prior, J. Dempster, R. F. Halliwell, R. S. Jacobs, S. M. Parsons, R. L. Parsons, I. G. Marshall // *Br J Pharmacol.* – 1988. – Vol. 93. – P. 759–768.
124. Evans R. M. Presynaptic Ca<sup>2+</sup> channels – integration centers for neuronal signaling pathway / R. M. Evans, G. W. Zamponi // *Trends Neurosci.* – 2006. – Vol. 29. – P.617-624.
125. Fantini J. Sphingolipid/cholesterol regulation of neurotransmitter receptor conformation and function / J. Fantini, F. J. Barrantes // *Biochim. Biophys. Acta.* - 2009. - V. 1788. - № 11. - P. 2345-2361.
126. Farsad K. Mechanisms of membrane deformation / K. Farsad, P. De Camilli // *Curr Opin Cell Biol.* – 2003. – Vol. 15. - P. 372-381.

127. Fernandes C.C. Lateral mobility of nicotinic acetylcholine receptors on neurons is determined by receptor composition, local domain, and cell type / C.C. Fernandes, D.K. Berg, D. Gómez-Varela. // *J. Neurosci.* - 2010. - V. 30. - № 26. - P. 8841-8851.
128. Fesce F. Peeping at the vesicle kiss / F. Fesce, J. Meldolesi // *Nature Cell Biol.* – 1999. – Vol. 1. – P.E3-E4.
129. Filomenko R. Oxysterols: Influence on plasma membrane rafts microdomains and development of ocular diseases / R. Filomenko, C. Fourgeux, L. Bretillon, S. Gambert-Nicot // *Steroids.* – 2015. – Vol. 99. – P. 259-265.
130. Fisher R. J. Control of fusion pore dynamics during exocytosis by Munc18 / R. J. Fisher, J. Pevsner, R. G. Burgoyne // *Science.* – 2001. – Vol. 291. – P.875-878.
131. Fletcher A. I. Regulation of exocytosis by cyclin dependent kinase 5 via phosphorylation of Munc18 / A. I. Fletcher, R. Shuang, D. R. Giovannucci, L. Zhang, M. A. Bittner, E. L. Stuenkel // *J. Biol. (Lond) Chem.* – 1999. – Vol. 274. – P.4027-4035.
132. Fletcher P. The effect of curare on the release of acetylcholine from mammalian motor nerve terminals and an estimate of quantum content. / P. Fletcher, T. Forrester // *J Physiol.* – 1975. – Vol. 251. P. 131-144.
133. Foletti D. L. Generation and maintenance of neuronal polarity: mechanisms of transport and targeting / D. L. Foletti, R. Prekeris, R. H. Scheller // *Neuron.* – 1999. – V. 23. – P. 641-644.
134. Fotin A. Molecular model for complete clathrin lattice from electron cryomicroscopy / A. Fotin, Y. Cheng, P. Sliz, N. Grigorieff, S. C. Harrison, T. Kirchhausen, T. Walz // *Nature.* – 2004. – Vol. 432. – P.537-579.
135. Fowler M.W. Synaptic vesicle pools: Principles, properties and limitations / M.W. Fowler, K. Staras // *Exp Cell Res.* – 2015. – Vol. 335. - № 2. – P. 150-156.
136. Frank C. Cholesterol perturbing agents inhibit NMDA-dependent calcium influx in rat hippocampal primary culture / C. Frank, A.M. Giammarioli, R. Pepponi, C. Fiorentini, S. Rufini // *FEBS Lett.* - 2004. - V. 566. - P. 25-29.
137. Fredj N. B. A resting pool of vesicles is responsible for spontaneous vesicle fusion at the synapse / N. B. Fredj, J. Burrone // *Nat. Neurosci.* – 2009. – Vol. 12. - P. 751–775.
138. Friedrich R. DOC2B, C2 domains, and calcium: A tale of intricate interactions / R. Friedrich, A. Yeheskel, U. Ashery // *Mol Neurobiol.* – 2010. – Vol, 41.- P.42-51.

139. Fu W. M. Release of acetylcholine from embryonic myocytes in *Xenopus* cell cultures. / W. M. Fu, H. C. Liou, Y. H. Chen, S. M. Wang // *J Physiol (Lond)*. – 1998. – Vol. 509. – P. 497-506.
140. Fujita A. distinct pool of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate in caveolae revealed by a nanoscale labeling technique / A. Fujita, J. Cheng, K. Tauchi-Sato, T. Takenawa, T. Fujimoto // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. - 2009. - V. 106. - № 23. - P.9256-9261.
141. Fujinaga Y. Gangliosides that associate with lipid rafts mediate transport of cholera and related toxins from the plasma membrane to endoplasmic reticulum. / Y. Fujinaga, A. A. Wolf, C. Rodighiero, H. Wheeler, B. Tsai, L. Allen, M. G. Jobling, W. J. Betz, G. S. Bewick // *Science*. - 1992. - V. 255. - № 5041. - P. 200-203.
142. Fykse E.M., Fonnum F. Amino acid neurotransmission: dynamics of vesicular uptake // *Neurochem. Res*. – 1996. –Vol. 21. – P.1053-1060.
143. Gabbi C. Action mechanisms of Liver X Receptors. / Gabbi C, Warner M, Gustafsson JÅ. // *Biochem Biophys Res Commun*. – 2014. – Vol. 446. - №3. – P. 647-650.
144. Gaffield M. A. Mobility of synaptic vesicles in different pools in resting and stimulated frog motor nerve terminals./ M. A. Gaffield, S. O. Rizzoli, W. J. Betz // *Neuron*. - 2006. – Vol. 51. - № 3. – P. 317-325.
145. Galli T. Cycling of synaptic vesicles: how far? how fast? / T. Galli, V. Haucke // *Sci. STKE*. – 2004. – Vol. 19. – P.1-12.
146. Gallop J. L. Endophilin and CtBP/BARS are not acyl transferases in endocytosis or Golgi fission / J. L. Gallop, P. J. Blutler, T. McMahon // *Nature*. – 2005. – Vol. 438. – P.675-678.
147. Gamba P. Oxidized cholesterol as the driving force behind the development of Alzheimer's disease / P. Gamba, G. Testa, S. Gargiulo, E. Staurengi, G. Poli, G. Leonarduzzi // *Front Aging Neurosci*. – 2015. – Vol. 7. – P. 119.
148. García-Martínez C. Identification of an aspartic residue in the P-loop of the vanilloid receptor that modulates pore properties. / C. García-Martínez, C. Morenilla-Palao, R. Planells-Cases, J. M. Merino, A. Ferrer-Montiel // *J BiolChem* – 2000. – Vol. 275. – P. 32552-32558.
149. Gaudreault S.B. The caveolin scaffolding domain modifies 2-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionate receptor binding properties by inhibiting phospholipase A2 activity /S.B. Gaudreault, C. Chabot, J.P. Gratton, J. Poirier // *J. Biol. Chem*. - 2004. - V. 279. - № 1. - P. 356-362.

150. Gazzo E. Caveolinopathies: from the biology of caveolin-3 to human diseases / E. Gazzo, F. Sotgia, C. Bruno, M.P. Lisanti, C. Minetti // *Eur. J. Hum. Genet.* - 2010. - V. 18. - № 2. - P.137-145.
151. Georgiou J. Muscarinic control of cytoskeleton in perisynaptic glia / J. Georgiou, R. Robitaille, M. P. Charlton // *J Neurosci.* – 1999. – Vol. 19. - P.3836-3846.
152. Geppert M. Synaptotagmin I: A major Ca<sup>2+</sup> sensor for transmitter release at a central synapse / M. Geppert M, Y. Goda, R. E. Hammer, C. Li, T. W. Rosahl, C. F. Stevens, T. C. Südhof // *Cell* – 1994. – V. 79. – P.717-727.
153. Gil C. Synaptic proteins and SNARE complexes are localized in lipid rafts from rat brain synaptosomes. / C. Gil, A. Soler-Jover, J. Blasi, J. Aguilera // *Biochem Biophys Res Commun.* – 2005. – Vol. 329. – P. 117-124.
154. Giniatullin A. R. Dual action of hydrogen peroxide on synaptic transmission at the frog neuromuscular junction. / A. R. Giniatullin, R. A. Giniatullin // *J. Physiol.* – 2003. – Vol. 552.1 – P. 283-293.
155. Giniatullin A.R. Reactive oxygen species contribute to the presynaptic action of extracellular ATP at the frog neuromuscular junction. / A.R. Giniatullin, S.N. Grishin, E.R. Sharifullina, A.M. Petrov, A.L. Zefirov, R.A. Giniatullin // *J. Physiol.* – 2005. – Vol. 565. - P. 229-242.
156. Giniatullin A. R. SNAP25 is a pre-synaptic target for the depressant action of reactive oxygen species on transmitter release. / A. R. Giniatullin, F. Darios, A. Shakirzyanova, B. Davletov, R. Giniatullin // *J Neurochem* – 2006. – Vol. 98. – P. 1789-1797.
157. Giniatullin A. The involvement of P2Y<sub>12</sub> receptors, NADPH oxidase, and lipid rafts in the action of extracellular ATP on synaptic transmission at the frog neuromuscular junction / A. Giniatullin, A. Petrov, R. Giniatullin // *Neuroscience.* – 2015. - Vol. 285. - P. 324-332.
158. Girard M. Non-stoichiometric relationship between clathrin heavy and light chains revealed by quantitative comparative proteomics of clathrin-coated vesicles from brain and liver / M. Girard, P. D. Allaire, P. S. McPherson, F. Blondeau // *Mol Cell Proteomics.* – 2005. - Vol. 4. – P. 1145-1154.
159. Giraudo C. G. A clamping mechanism involved in SNARE-dependent exocytosis / C. G. Giraudo, W. S. Eng, T. J. Melia, J. E. Rothman // *Science.* – 2006. – Vol. 313. – P.676-680.

160. Glavinovi'c M. I. Voltage clamping of unparalysed cut rat diaphragm for study of transmitter release. / M. I. Glavinovi'c // *J. Physiol.* – 1979. – Vol. 290. – P. 467-480.
161. Gnanasekaran A. Lipid rafts control P2X3 receptor distribution and function in trigeminal sensory neurons of a transgenic migraine mouse model / A. Gnanasekaran, M. Sundukova, A.M. van den Maagdenberg, E. Fabbretti, A. Nistri // *Mol. Pain.* – 2011. – Vol. 7. – P. 1-13.
162. Gosselet F. Effects of oxysterols on the blood-brain barrier: implications for Alzheimer's disease. / F. Gosselet, J. Saint-Pol, L. Fenart // *Biochem Biophys Res Commun.* - 2014. - Vol. 446. - № 3. - P. 687-691.
163. Goswami C. TRPV1 acts as a synaptic protein and regulates vesicle recycling. / C. Goswami, N. Rademacher, K. H. Smalla, V. Kalscheuer, H. H. Ropers, E. D. Gundelfinger, T. Hucho // *J Cell Sci* – 2010. – Vol. 123. – P. 2045-2057.
164. Grajales-Reyes G.E. Transgenic mouse model reveals an unsuspected role of the acetylcholine receptor in statin-induced neuromuscular adverse drug reactions / G.E. Grajales-Reyes, C.A. Báez-Pagán, H. Zhu, J.G. Grajales-Reyes, M. Delgado-Vélez, W.F. García-Beltrán, V.A. Luciano, O. Quesada, R. Ramírez, C.M. Gómez, J.A. Lasalde-Dominicci // *Pharmacogenomics J.* - 2012. – Vol. 13. - №3. – P. 362-368.
165. Granseth B. Clathrin-mediated endocytosis is dominant mechanism of vesicle retrieval at hippocampal synapses / B. Granseth, B. Odermatt, S. J. Royle, L. Lagnado // *Neuron.* -2006. – Vol. 51. – P.773-786.
166. Granseth B. Clathrin-mediated endocytosis: the physiological mechanism of vesicle retrieval at hippocampal synapses / B. Granseth, B. Odermatt, S. J. Royle, L. Lagnado // *J Physiol.* – 2007. – Vol. 585. – P.681-686.
167. Granseth B. Comment on "The dynamic control of kiss-and-run and vesicular reuse probed with single nanoparticles" / B. Granseth, B. Odermatt, S. J. Royle, L. Lagnado // *Science.* – 2009. - Vol. 325. - №5947. – P.1499.
168. Grass I. Recognition of a basic AP-2 binding motif within the C2B domain of synaptotagmin is dependent on multimerization / I. Grass, S. Thiel, S. Höning, V. Haucke // *J. Biol Chem.* – 2004. – Vol. 279. – P. 54872-54880.
169. Grise F. Distinct roles of the C2A and the C2B domain of the vesicular Ca sensor synaptotagmin 9 in endocrine beta-cell / F. Grise F, N. Taib, C. Monterrat, V. Lagrée, J. Lang // *J. Biochem.* – 2007. –Vol. 403. – P.483-492.

170. Guatimosim C. Okadaic acid disrupts synaptic vesicle trafficking in a ribbon-type synapse. / C. Guatimosim, C. Hull, H. Von Gersdorff, M. A. Prado // *J Neurochem* – 2002. – Vol. 82. – P. 1047-1057.
171. Haines T. H. 1983 Anionic lipid headgroups as a proton-conducting pathway along the surface of membranes: a hypothesis. / T. H. Haines // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 1983. – Vol. 80. – P. 160-164.
172. Hammarlund M. CAPS and syntaxin dock dense core vesicles to the plasma membrane in neurons / M. Hammarlund, S. Watanabe, K. Schuske, E. M. Jorgensen // *J Cell Biol.* – 2008. – Vol. 180. – P. 483-491.
173. Han W. Lipid rafts keep NADPH oxidase in the inactive state in human renal proximal tubule cells. / W. Han, H. Li, V. A. Villar, A. M. Pascua, M. I. Dajani, X. Wang, A. Natarajan, M. T. Quinn, R. A. Felder, P. A. Jose, P. Yu // *Hypertension* – 2008. – Vol. 51. – P. 481-487.
174. Harlow M. L. The architecture of active zone material at the frog's neuromuscular junction / M. L. Harlow, D. Ress, A. Stoschek, R. M. Marshall, U. J. McMahan // *Nature.* – 2001. – Vol. 409. – P.479-484.
175. Hata Y. Synaptic vesicle fusion complex contains onc-18 homologue bound to syntaxin / Y. Hata, C. A. Slaughter, T. C. Sudhof // *Nature.* – 1993. – Vol. 366. – P.347-351.
176. Hayashi H. Lipid metabolism and glial lipoproteins in the central nervous system. / H. Hayashi // *Biol. Pharm. Bull.* - 2011. - Vol. 34. - № 4. - P. 453-461.
177. Hayashi T. Tyrosine phosphorylation and regulation of the AMPA receptor by SRC family tyrosine kinases / T. Hayashi, R.L. Huganir // *J. Neurosci.* - 2004. - V. 24. - № 27. - P. 6152-6160.
178. Haydon P.G. GLIA: listening and talking to the synapse / P. G. Haydon // *Nat Rev Neurosci.* – 2001. – Vol. 2. – P. 185-193.
179. He L. The debate on the kiss-and-run fusion at synapses /L. He, L. G. Wu // *Trends Neurosci.* – 2007. – Vol. 30. – P.447-455.
180. Head B. P. Caveolin-1 expression is essential for N-methyl-D-aspartate receptor-mediated Src and extracellular signal-regulated kinase 1/2 activation and protection of primary neurons from ischemic cell death / B.P. Head, H.H. Patel, Y.M. Tsutsumi, Y. Hu, T. Mejia, R.C. Mora, P.A. Insel, D.M. Roth, J.C. Drummond, P.M. Patel // *FASEB J.* – 2008. – Vol. 22. - №3. – P. 828-840.

181. Head B. P. Loss of caveolin-1 accelerates neurodegeneration and aging. / B. P. Head, J. N. Peart, M. Panneerselvam, T. Yokoyama, M. L. Pearn, I. R. Niesman, J. A. Bonds, J. M. Schilling, A. Miyanohara, J. Headrick // PLoS One. - 2010. - Vol. 5 - № 12. - P. e15697.
182. Head B. P. Neuron-targeted caveolin-1 protein enhances signaling and promotes arborization of primary neurons / B.P. Head, Y. Hu, J.C. Finley, M.D. Saldana, J.A. Bonds, A. Miyanohara, I.R. Niesman, S.S. Ali, F. Murray, P.A. Insel, D.M. Roth, H.H. Patel, P.M. Patel // J. Biol. Chem. - 2011. - V. 286. - № 38. - P. 33310-33321.
183. Heerssen H. Clathrin dependence of synaptic-vesicle formation at the Drosophila neuromuscular junction / H. Heerssen, R. D. Fetter, G. W. Davis // Curr Biol. – 2008. – Vol. 18. – P.401-409.
184. Heiny J. A. The nicotinic acetylcholine receptor and the Na,K-ATPase alpha2 isoform interact to regulate membrane electrogenesis in skeletal muscle / J. A. Heiny, V.V. Kravtsova, F. Mandel, T.L. Radzyukevich, B. Benziane, A. V. Prokofiev, S. E. Pedersen, A. V. Chibalin, I. I. Krivoi // J Biol Chem. – 2010. – Vol. 285. -№ 37. – P.28614-28626.
185. Henkel A. W. Synaptic vesicle movements monitored by fluorescence recovery after photobleaching in nerve terminals stained with FM1-43. J. / A. W. Henkel, L. L. Simpson, R. M. Ridge, W. J. Betz // Neurosci. - 1996. – Vol. 16. - № 12. – P. 3960-3967.
186. Hering H. Lipid rafts in the maintenance of synapses, dendritic spines, and surface AMPA receptor stability / H. Hering, C.C. Lin, M. Sheng // J. Neurosci. - 2003. - V. 23. - № 8. - P. 3262-3271.
187. Heuser J. E. Synaptic vesicle exocytosis captured by quick freezing and correlated with quantal transmitter release. / J. E. Heuser J, T. S. Reese, M. J. Dennis, L. Jan // J. Cell Biol. – 1979. – Vol. 81. – P. 275-300.
188. Heverin M. Changes in the levels of cerebral and extracerebral sterols in the brain of patients with Alzheimer's disease. / M. Heverin, N. Bogdanovic, D. Lütjohann, T. Bayer, I. Pikuleva, L. Bretillon, U. Diczfalussy, B. Winblad, I. Björkhem // J Lipid Res. - 2004. - Vol. 45. - № 1. - P. 186-193.
189. Hezel M. Caveolin-3 promotes nicotinic acetylcholine receptor clustering and regulates neuromuscular junction activity / M. Hezel, W.C. de Groat, F. Galbiati // Mol Biol Cell. – 2010. – Vol. 21. - №2. – P.302-310.
190. Hill M. M. PTRF-Cavin, a conserved cytoplasmic protein required for caveola formation and function /M. M. Hill, M. Bastiani, R. Luetterforst, M. Kirkham, A. Kirkham, S.

- J. Nixon, P. Walser, D. Abankwa, V.M. Oorschot, S. Martin, J. F. Hancock, R. G. Parton // *Cell*. - 2008. - V. 132. - № 1. - P.113-124.
191. Hinrichsen L. Bending a membrane: how clathrin affects budding / L. Hinrichsen, A. Meyerholz, S. Groos, E. J. Ungewickell // *Proc Natl Acad Sci*. – 2006. – Vol. 103. – P.8715-8720.
192. Hissa B. Membrane cholesterol removal changes mechanical properties of cells and induces secretion of a specific pool of lysosomes / B. Hissa, B. Pontes, P.M. Roma, A.P. Alves, C.D. Rocha, T.M. Valverde, P.H. Aguiar, F.P. Almeida, A.J. Guimarães, C. Guatimosim, A.M. Silva, M.C. Fernandes, N.W. Andrews, N.B. Viana, O.N. Mesquita, U. Agero, L.O. Andrade // *PLoS One*. – 2013. – Vol. 8. - № 12. – P.e82988.
193. Honerkamp-Smith A. R. An introduction to critical points for biophysicists; observations of compositional heterogeneity in lipid membranes / A. R. Honerkamp-Smith, S. L. Veatch, S. L. Keller // *Biochim. Biophys. Acta*. - 2009. - V. 1788. - № 1. - P. 53-63.
194. Hong S.J. Use of geophagotoxin II (mu-conotoxin) for the study of neuromuscular transmission in mouse / S.J. Hong, C.C. Chang // *Br. J. Pharmacol*. – 1989. – Vol. 97. - P. 934-940.
195. Hou Q. Regulation of AMPA receptor localization in lipid rafts / Q. Hou, Y. Huang, S. Amato, S. H. Snyder, R. L. Huganir, H. Y. Man // *Mol. Cell Neurosci*. - 2008. - V. 38. - № 2. - P. 213-223.
196. Hu H. The major cholesterol metabolite cholestane-3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,6 $\beta$ -triol functions as an endogenous neuroprotectant / H. Hu, Y. Zhou, T. Leng, A. Liu, Y. Wang, X. You, J. Chen, L. Tang, W. Chen, P. Qiu, W. Yin, Y. Huang, J. Zhang, L. Wang, H. Sang, G. Yan // *J. Neurosci*. 2014. – Vol. 34. - № 34. – P. 11426-11438.
197. Huang Y. Two aspects of ASIC function: Synaptic plasticity and neuronal injury / Y. Huang, N. Jiang, J. Li, Y.H. Ji, Z.G. Xiong, X.M. Zha // *Neuropharmacology*. – 2015. – Vol. 94. – P. 42-48.
198. Hudry E. Adeno-associated virus gene therapy with cholesterol 24-hydroxylase reduces the amyloid pathology before or after the onset of amyloid plaques in mouse models of Alzheimer's disease. / E. Hudry, D. Van Dam, W. Kulik, P. P. De Deyn, F. S. Stet, O. Ahouansou, A. Benraiss, A. Delacourte, P. Bougnères, P. Aubourg // *Mol. Ther*. - 2010. - Vol. 18. - № 1. - P. 44-53.

199. Hughes TM, Rosano C, Evans RW, Kuller LH. Brain cholesterol metabolism, oxysterols, and dementia / T.M. Hughes, C. Rosano, R.W. Evans, L.H. Kuller // *J Alzheimers Dis.* – 2013. – Vol. 33. - №4. – P. 891-911.
200. Ignatius M. J. Expression of apolipoprotein E during nerve degeneration and regeneration. / M. J. Ignatius, P. J. Gebicke-Härter, J. H. Skene, J. W. Schilling, K. H. Weisgraber, R. W. Mahley, E. M. Shooter // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* - 1986. - Vol. 83. - P. 1125-1129.
201. Itoh T. BAR, F-BAR (EFC) and ENTH/ANTH domains in the regulation of membrane-cytosol interfaces and membrane curvature / T. Itoh, P. De Camilli // *Biochim Biophys Acta.* – 2006. – Vol. 1761. – P.897-912.
202. Jackson M. B. The fusion pores of Ca(2+)-triggered exocytosis. / M B. Jackson, E. R. Chapman // *Nat. Struct. Mol. Biol.* - 2008. – Vol. 15. - № 7. – P. 684-689.
203. Jackson M.B. Minimum membrane bending energies of fusion pores / M. B. Jackson // *J Membr Biol.* -2009. – Vol. 231. – P. 101-15.
204. Jahn R. Synaptic vesicle traffic: rush hour in the nerve terminal / R. Jahn, T. C. Südhof // *J. Neurochem.* – 1993. – V. 61. – P.12-21.
205. Jahn R. Membrane fusion / R. Jahn, T. Lang, T. C. Südhof // *Cell.* – 2003. – Vol. 112. – P.519-533.
206. Jahn R. SNAREs – engines for membrane fusion / R. Jahn, R. H. Sheller // *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* – 2006. – Vol. 7. – P. 631-643.
207. Jahromi S. S. Three-dimensional ultrastructure of the crayfish neuromuscular apparatus / S. S. Jahromi, H. L. Atwood // *J. Cell Biol.* – 1974. – V. 63. – P.599-613.
208. Jakobsson J. Role of epsin 1 in synaptic vesicle endocytosis / J. Jakobsson, H. Gad, F. Andersson, P. Löw, O. Shupliakov, L. Brodin // *Proc Natl Acad Sci.* – 2008. – Vol. 105. – P.6445-6450.
209. Jang D. J. The role of lipid binding for the targeting of synaptic proteins into synaptic vesicles. / D. J. Jang, S. W. Park, B. K. Kaang // *BMB Rep.* - 2009. - V. 42. - № 1. - P. 1-5.
210. Jeitner T.M. Oxysterol derivatives of cholesterol in neurodegenerative disorders / T. M. Jeitner, I. Voloshyna, A. B. Reiss // *Curr Med Chem.* – 2011. – Vol.18. - №10. – P.1515-1525.
211. Jennemann R. Cell-specific deletion of glucosylceramide synthase in brain leads to severe neural defects after birth. / R. Jennemann, R. Sandhoff, S. Wang, E. Kiss, N. Gretz,

- C. Zuliani, A. Martin-Villalba, R. Jäger, H. Schorle, M. Kenzelmann // Proc Natl Acad Sci USA. - 2005. - Vol. 102. - № 35. - P. 12459-12464.
212. Jensen T. Calcineurin is required for TRPV1-induced long-term depression of hippocampal interneurons. / T. Jensen, J. G. Edwards // Neurosci Let – 2012. – Vol. 510. – P. 82-87.
213. Jia J. Y. Quantitative proteomics analysis of detergent-resistant membranes from chemical synapses: evidence for cholesterol as spatial organizer of synaptic vesicle cycling / J. Y. Jia, S. Lamer, M. Schümann, M. R. Schmidt, E. Krause, V. Haucke // Mol Cell Proteomics. – 2006. – Vol. 5. – P. 2060-2071.
214. Jin S. Lipid raft redox signaling: molecular mechanisms in health and disease. / S. Jin, F. Zhou, F. Katirai, P. L. Li // Antioxid Redox Signal – 2011. – Vol. 15. – P. 1043-1083.
215. Jockusch W. J. Clathrin-dependent and clathrin-independent retrieval of synaptic vesicles in retinal bipolar cells / W. J. Jockusch, G. J. Praefcke, H. T. McMahon, L. Lagnado // Neuron. – 2005. – Vol. 46. – P.869-878.
216. Jung N. Clathrin-mediated endocytosis at synapses / N. Jung, V. Haucke // Traffic. – 2007. – Vol. 8. - P.1129-36.
217. Kabouridis P.S. Cholesterol depletion disrupts lipid rafts and modulates the activity of multiple signaling pathways in T lymphocytes / P.S. Kabouridis, J. Janzen, A.L. Magee, S.C. Ley // Eur. J. Immunol. – 2000. – Vol. 30. - P. 954-963.
218. Kaeser P. S. Molecular mechanisms for synchronous, asynchronous and spontaneous neurotransmitter release. / P. S. Kaeser, W. G. Regehr // Annu Rev Physiol – 2014. – Vol. 76. – P. 26.1-26.31.
219. Karasinska J. M. ABCA1 influences neuroinflammation and neuronal death. / J. M. Karasinska, W. de Haan, S. Franciosi, P. Ruddle, J. Fan, J. K. Kruit, S. Stukas, D. Lütjohann, D. H. Gutmann, C. L. Wellington // Neurobiol Dis. - 2013. - Vol. 54. - P. 445-455.
220. Karten B. The Niemann-Pick C1 protein in recycling endosomes of presynaptic nerve terminals. / B. Karten, R. B. Campenot, D. E. Vance, J. E. Vance // J. Lipid Res. - 2006. - Vol. 47. - P. 504-514.
221. Kasimov M. R. Effects of 5 $\alpha$ -cholestan-3-one on the synaptic vesicle cycle at the mouse neuromuscular junction. / M.R. Kasimov, A.R. Giniatullin, Zefirov, A.M. Petrov // Biochim Biophys Acta. – 2015. – Vol. 1851. - № 5. – P. 674-685.

222. Katz B. Transmitter leakage from motor nerve endings. / B. Katz, R. Miledi // Proc R Soc Lond B Biol Sci. – 1977. – Vol. 196. – P.59-72.
223. Katz B. Does the motor nerve impulse evoke 'non-quantal' transmitter release? / B. Katz, R. Miledi // Proc R Soc Lond B Biol Sci. – 1981. - Vol. 212.- № 1186. P.131-137.
224. Kavalali E. T. The mechanisms and functions of spontaneous neurotransmitter release. / E. T. Kavalali // Nat Rev Neurosci. – 2015. – Vol. 16. – № 1. – P. 5-16.
225. Kim, S. H. CDK5 serves as a major control point in neurotransmitter release. /S. H. Kim, T. A. Ryan // Neuron – 2010. – Vol. 67. – P. 797–809.
226. Kirchhausen T. Clathrin adaptors really adapt. / T. Kirchhausen // Cell. – 2002. – Vol. 109. - № 4. – P. 413-466.
227. Koh T.-W. Synaptotagmin 1, Ca<sup>2+</sup> sensor for neurotransmitter release / T.-W. Koh, H. J. T.-W. Bellen // TRENDS in Neurosci. – 2003. – Vol. 28, № 8. – P.413-422.
228. Korinek M. Cholesterol modulates open probability and desensitization of NMDA receptors. / M. Korinek, V. Vyklicky, J. Borovska, K. Lichnerova, M. Kaniakova, B. Krausova, J. Krusek, A. Balik, T. Smejkalova, M. Horak // J Physiol. - 2015. – Vol. 593. - № 10. – P. 2279-2293.
229. Kreilau F. Evidence for altered cholesterol metabolism in Huntington's disease post mortem brain tissue / F. Kreilau, A.S. Spiro, C. A. McLean, B. Garner, A. M. Jenner // Neuropathol Appl Neurobiol. – 2015. – in print.
230. Kreit J. Cholesterol oxidase: physiological functions. / J. Kreit, N. S. Sampson // FEBS J. - 2009. – Vol. 276. - № 23. – P. 6844-6856.
231. Kreutzberger A.J. High cholesterol obviates a prolonged hemifusion intermediate in fast SNARE-mediated membrane fusion / A.J. Kreutzberger, V. Kiessling, L.K. Tamm // Biophys J. – 2015. – Vol. 109. - № 2. – P. 319-329.
232. Kuner T. Photolysis of a caged peptide reveals rapid action of N-ethylmaleimide sensitive factor before neurotransmitter release / T. Kuner, Y. Li, K. R. Gee, L.F. Bonewald, G.J. Augustine // Proc Natl Acad Sci. – 2008. – Vol. 105. – P. 347-352.
233. Kuver R. Mechanisms of oxysterol-induced disease: insights from the biliary system / R. Kuver // Clin. Lipidol. – 2012. – Vol. 7. - P. 537-548.
234. Lane-Donovan C. More than cholesterol transporters: lipoprotein receptors in CNS function and neurodegeneration. / C. Lane-Donovan, G. T. Philips, J. Herz // Neuron. - 2014. - Vol. 83. - № 4. - P. 771-787.

235. Lang T. SNARE proteins and 'membrane rafts'. / T. Lang // *J. Physiol.* – 2007. – Vol. 585. - № 3. – P. 693-698.
236. Lathe R. Atherosclerosis and Alzheimer--diseases with a common cause? Inflammation, oxysterols, vasculature. / R. Lathe, A. Sapronova, Y. Kotelevtsev // *BMC Geriatrics.* - 2014. - Vol. 14. - P. 36.
237. Lee S.Y. Cholesterol inhibits M-type K channels via protein kinase C –dependent phosphorylation in sympathetic neurons / S.Y. Lee, H.K. Choi, S.T. Kim, S. Chung, M.K. Park, J.H. Cho, W.K. Ho, H. Cho // *J. Biol. Chem.* – 2010. – Vol. 285. - P. 10939-10950.
238. Leenders A.G. Modulation of neurotransmitter release by the second messenger-activated protein kinases: implication for presynaptic plasticity / A.G. Leenders, Z.H. Sheng // *Pharmacol. Ther.* – 2005. – 105. - P. 69-84.
239. Leitz J. Ca(2) influx slows single synaptic vesicle endocytosis. / J. Leitz, E. T. Kavalali // *J Neurosci* – 2011. – Vol. 31. – P. 16318–16326.
240. Leitzell K. Synaptotagmin: is 2 better than 1? / K. Leitzell // *J Neurosci.* – 2007 – Vol. 27. - № 16. – P. 4231-4232.
241. Lima Rde F. Quantal release of acetylcholine in mice with reduced levels of the vesicular acetylcholine transporter. / F. Lima Rde, V. F. Prado, M. A. Prado, C. Kushmerick // *J Neurochem.* – 2010. – Vol. 113. – P. 943-951.
242. Linetti A. Cholesterol reduction impairs exocytosis of synaptic vesicles. / A. Linetti, A. Fratangeli, E. Taverna, P. Valnegri, M. Francolini, V. Cappello, M. Matteoli, M. Passafaro, P. Rosa // *J Cell Sci.* – 2010. – Vol. 123 - Pt 4. – P.595-605.
243. Linsenhardt A.J. Different oxysterols have opposing actions at N-methyl-D-aspartate receptors / A.J. Linsenhardt, A. Taylor, C.M. Emmett, J.J. Doherty, K. Krishnan, D.F. Covey, S.M. Paul, C.F. Zorumski, S. Mennerick // *Neuropharmacology.* – 2014. – Vol. 85. - P. 232-242.
244. Lenzi D. Structure suggests function: the case for synaptic ribbons as exocytosis nanomachines / D. Lenzi, H. Gersdorff // *Bioessays.* – 2001. – Vol. 23. – P.831-840.
245. Leoni V. Oxysterols as biomarkers in neurodegenerative diseases / V. Leoni, C. Caccia // *Chem. Phys. Lipids.* – 2011. – Vol. 164. - № 6. - P. 515-524.
246. Leoni V. The impairment of cholesterol metabolism in Huntington disease. / V. Leoni, C. Caccia // *Biochim Biophys Acta.* - 2015. – Vol. 1851. - № 8. – P. 1095-1105.

247. Letinsky M. S. Histological staining of preand postsynaptic components of amphibian neuromuscular junction / M. S. Letinsky, P. DeCino // *J. Neurocytol.* – 1980. – Vol. 9. – P.305-320.
248. Littleton J. T. SNARE-complex disassembly by NSF follows synaptic-vesicle fusion / J. T. Littleton, R. J. Barnard, S. A. Titus, J. Slind, E. R. Chapman, B. Ganetzky // *Proc Natl Acad Sci.* – 2001. – Vol. 98. – P. 12233-12238.
249. Levitan I. Cholesterol and ion channels / I. Levitan, Y. Fang, A. Rosenhouse-Dantsker, V. Romanenko // *Subcell Biochem.* - 2010. - V. 51. - P. 509-549.
250. Levitan I. Cholesterol binding to ion channels / I. Levitan, D. K. Singh, A. Rosenhouse-Dantsker // *Front Physiol.* – 2014. – Vol. 5. – P. 65.
251. Li Z. Synaptic vesicle recycling studied in transgenic mice expressing synaptotHluorin / Z. Li, J. Burrone, W. J. Tyler, K. N. Hartman, D. F. Albeanu, V. N. Murthy // *Proc Natl Acad Sci.* -2005. – Vol. 102. – P.6131-6136.
252. Liu Q. Neuronal LRP1 knockout in adult mice leads to impaired brain lipid metabolism and progressive, age-dependent synapse loss and neurodegeneration / Q. Liu, J. Trotter, J. Zhang, P. Peters, H Cheng, J. Bao, X. Han, E.J. Weeber, G. Bu // *J. Neurosci.* - 2010. - V. 30. - № 50. - P. 17068-17078.
253. Liu Y. The role of synaptobrevin1/VAMP1 in Ca<sup>2+</sup>-triggered neurotransmitter release at the mouse neuromuscular junction / Y. Liu, Y. Sugiura, W. Lin // *J. Physiol.* – 2011. – Vol. 589. - P. 1603-1618.
254. Llobet A. Exocytosis at the ribbon synapse of retinal bipolar cells studied in patches of presynaptic membrane / A. Llobet, A. Cooke, L. Lagnado // *J Neurosci.* – 2003. – Vol. 23. – P. 2706-2714.
255. Loewen C.J. A conserved ER targeting motif in three families of lipid binding proteins and in Opi1p binds VAP / C.J. Loewen, A. Roy, T.P. Levine // *EMBO J.* – 2003. – Vol. 22. - P. 2025-2035.
256. Loura L.M. Exclusion of a cholesterol analog from the cholesterol-rich phase in model membranes / L.M. Loura, A. Fedorov, M. Prieto // *Biochim. Biophys. Acta.* - 2001. – Vol. 1511. - P. 236-243.
257. Mackrill J.J. Oxysterols and calcium signal transduction / J.J. Mackrill // *Chem. Phys. Lipids* – 2011. – Vol. 164. - P. 488-495.

258. Malomouzh A. I. Glutamate regulation of non-quantal release of acetylcholine in the rat neuromuscular junction. / A. I. Malomouzh, M. R. Mukhtarov, E. E. Nikolsky, F. Vyskocil, E. M. Lieberman, A. K. Urazaev // *J Neurochem* – 2003. – Vol. 85. – P. 206-213.
259. Malomouzh A.I. The effect of dynasore, a blocker of dynamin-dependent endocytosis, on spontaneous quantal and non-quantal release of acetylcholine in murine neuromuscular junctions / A.I. Malomouzh, A.R. Mukhitov, S.E. Proskurina, F. Vyskocil, E.E. Nikolsky // *Dokl Biol Sci.* – 2014. – Vol. 459. – P. 330-333.
260. Margheri G. The  $\beta$ -subunit of cholera toxin has a high affinity for ganglioside GM1 embedded into solid supported lipid membranes with a lipid raft-like composition / G. Margheri, R. D'Agostino, S. Trigari, S. Sottini, M. Del Rosso // *Lipids.* – 2014. – Vol. 49. - P. 203-206.
261. Marra V. A preferentially segregated recycling vesicle pool of limited size supports neurotransmission in native central synapses. / V. Marra, J. J. Burden, J. R. Thorpe, I. T. Smith, S. L. Smith, M. Hausser, T. Branco, K. Staras // *Neuron* – 2012. – Vol. 76. – P. 579–589.
262. Martelli A. M. Rab3A and RAb3D control the total granule number and the fraction of granules docked at the plasma membrane in PC12 cells / A. M. Martelli, G. Baldini, G. Tabellini // *Traffic.* – 2000. – Vol. 1. – P.976-986.
263. Martín M. G. Cholesterol in brain disease: sometimes determinant and frequently implicated. / M. G. Martín, F. Pfrieger, C. G. Dotti // *EMBO Rep.* – 2014. – Vol. 15. - № 10. – P. 1036-1052.
264. Marwarha G. Does the oxysterol 27-hydroxycholesterol underlie Alzheimer's disease-Parkinson's disease overlap? / G. Marwarha, O. Ghribi // *Exp Gerontol.* - 2015. - Vol 68. – P.13-18.
265. Masson J. Neurotransmitter Transporters in the Central Nervous System / J. Masson, C. Sagné, M. Hamon, S. E. Mestikawy // *Pharmacological Reviews.* – 1999. - Vol. 51. - № 3. – P. 439-464.
266. Matteoli M. Exo-endocytotic recycling of synaptic vesicles in developing processes of cultured hippocampal neurons / M. Matteoli, K. Takei, M. S. Perin, T. C. Südhof, P. De Camilli. // *J. Cell Biol.* – 1992. – V. 117. – P.849 – 861.

267. Matteoli M. Vesicle turnover in developing neurons: how to build a presynaptic terminal / M. Matteoli, S. Coco, U. Schenk, C. Verderio // *TRENDS in Cell Biol.* – 2004. – Vol. 14, № 3. – P.133-140.
268. Matveeva E. A. Phosphorylation of the N-ethylmaleimide-sensitive factor is associated with depolarization-dependent neurotransmitter release from synaptosomes / E. A. Matveeva, S. W. Whiteheart, T. C. Vanaman, J. T. Slevin // *J. Biol. Chem.* – 2001. – Vol. 276. – P.12174-12181.
269. Maximov A. Synaptotagmin-12, a synaptic vesicle phosphoprotein that modulates spontaneous neurotransmitter release / A. Maximov, O. H. Shin, X. Liu, T. C. Sudhof // *J. Cell Biol.* – 2007. – Vol. 176. – P.113-124.
270. May A. P. Unraveling the mechanism of the synaptic vesicle transport ATPase NSF, the N-ethylmaleimide-sensitive factor / A. P. May, S. W. Whiteheart, W. I. Weis // *J. Biol. Chem.* – 2001. – Vol. 276. – P.21991-21994.
271. McMahon H. T. Membrane curvature and mechanisms of dynamic cell membrane remodeling / H. T. McMahon, J. L. Gallop // *Nature.* – 2005. – Vol. 438. – P.590-596.
272. Meimaridou E. From hatching to dispatching: the multiple cellular roles of the Hsp70 molecular chaperone machinery / E. Meimaridou, S. B. Gooljar, J. P. Chapple // *J Mol Endocrinol.* – 2009. – Vol. 42. – P.1-9.
273. Melia T.J. Putting the clamp on membrane fusion: how complexin sets the stage for calcium-mediated exocytosis / T. J. Melia // *FEBS lett.* – 2007. – Vol. 581. – P.2131-2139.
274. Menkes J.H. Cerebrotendinous xanthomatosis. The storage of cholestanol within the nervous system / J.H. Menkes, J.R. Schimschock, P.D. Swanson // *Arch Neurol.* – 1968. – Vol. 19. - № 40. - P. 47-53.
275. Mercer A. J. Lateral mobility of presynaptic L-type calcium channels at photoreceptor ribbon synapses / A. J. Mercer, M. Chen, W. B. Thoreson // *J. Neurosci.* - 2011. - V. 31. - № 12. - P. 4397-4406.
276. Merrifield C. J. Coupling between clathrin-coated-pits invagination, cortactin recruitment, and membrane scission observed in living cells / C. J. Merrifield, D. Perrais, D. Zenisek // *Cell.* – 2005. – Vol. 121. – P. 593-606.
277. Mettlen M. Endocytic accessory proteins are functionally distinguished by their differential effects on the maturation of clathrin-coated pits. / M. Mettlen, M. Stoerber,

- D. Loerke, C. N. Antonescu, G. Danuser, S. L. Schmid // *Mol Biol Cell.* – 2009. – Vol. 20. - № 14. – P. 3251-3260.
278. Miller E. W. Aquaporin-3 mediates hydrogen peroxide uptake to regulate downstream intracellular signaling. / E. W. Miller, B. C. Dickinson, C. J. Chang // *Proc Natl Acad Sci USA* – 2010. – Vol. 107. – P. 15681-15686.
279. Mitchell J. F. The spontaneous release of acetylcholine from the denervated hemidiaphragm of the rat. / J. F. Mitchell, A. Silver // *J Physiol* – 1963. – Vol. 165. – P.117-129.
280. Monaldi I. The highly conserved synapsin domain E mediates synapsin dimerization and phospholipid vesicle clustering. / I. Monaldi, M. Vassalli, A. Bachi, S. Giovedì, E. Millo, F. Valtorta, R. Raiteri, F. Benfenati, A. Fassio // *Biochem. J.* – 2010. – Vol. 426. - № 1. – P. 55-64.
281. Morel N. Neurotransmitter release: the dark side of the vacuolar-H<sup>+</sup>ATPase / N. Morel // *Biol. Cell.* – 2003. – Vol. 95. – P.453-457.
282. Morone N. Three-dimensional reconstruction of the membrane skeleton at the plasma membrane interface by electron tomography / N. Morone, T. Fujiwara, K. Murase, R. S. Kasai, H. Ike, S. Yuasa, J. Usukura, A. Kusumi // *J. Cell Biol.* - 2006. - V. 174. - № 6. - P. 851-862.
283. Mousavi S. A. Clathrin-dependent endocytosis / S. A. Mousavi, L. Malerod, T. Berg, R. Kjekken // *Biochem. J.* – 2004. – Vol. 377. – P.1-16.
284. Mukhtarov M. R. Effect of nitric oxide and NO synthase inhibition on nonquantal acetylcholine release in the rat diaphragm. / M. R. Mukhtarov, A. Kh. Urazaev, E. Nikolsky, F. Vyskočil // *Eur J Neurosci.* – 2000. – Vol. 12. – P. 980-986.
285. Murray D. H. Clustering of syntaxin-1A in model membranes is modulated by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and cholesterol. / D. H. Murray, L. K. Tamm // *Biochemistry.* – 2009. – Vol. 48. - № 21. - P. 4617-4625.
286. Murray D. H. Molecular mechanism of cholesterol- and polyphosphoinositide-mediated syntaxin clustering / D.H. Murray, L.K. Tamm // *Biochemistry.* - 2011. - V. 50. - № 42. - P. 9014-9022.
287. Murthy N.V. DeCamilli P. Cell biology of the presynaptic terminal / N. V. Murthy, P. DeCamilli // *Annu. Rev. Neurosci.* – 2003. – Vol. 26. – P.701-728.

288. Nag S. Intermolecular association provides specific optical and NMR signatures for serotonin at intravesicular concentrations / S. Nag, J. Balaji, P. K. Madhu, S. Maiti // *Biophys. J.* - 2008. - V. 94. - P. 4145–4153.
289. Nagwaney S. Macromolecular connections of active zone material to docked synaptic vesicles and presynaptic membrane at neuromuscular junctions of mouse / S. Nagwaney, M. L. Harlow, J. H. Jung, J. A. Szule, D. Ress, J. Xu, R. M. Marshall, U. J. McMahan // *J Comp Neurol.* – 2009. – Vol. 513. – P.457-468.
290. Narita K. Functional coupling of Ca<sup>2+</sup> channels to ryanodine receptors at presynaptic terminals: amplification of exocytosis and plasticity. / K. Narita, T. Akita, J. Hachisuka, S. Huang, K. Ochi, K. Kuba // *J Gen Physiol* – 2000. – Vol. 115. – P. 519–532.
291. Neco P. Myosin II contributes to fusion pore expansion during exocytosis / P. Neco, C. Fernández-Peruchena, S. Navas, L. M. Gutiérrez, G. A. de Toledo, E. Alés. // *J. of Biol. Chem.* – 2008. – Vol. 283. – P. 10949-10957.
292. Neher E. Merits and Limitations of Vesicle Pool Models in View of Heterogeneous Populations of Synaptic Vesicles/ E. Neher // *Neuron.* - 2015. – Vol. 87. - №6. – P. 1131-1142.
293. Neuvonen M. Enzymatic oxidation of cholesterol: properties and functional effects of cholesterol in cell membranes / M. Neuvonen, M. Manna, S. Morkkila, M. Javanainen, T. Rog, Z. Liu, R. Bittman, I. Vattulainen, E. Ikonen // *PLoS One.* – 2014. – Vol. 9. - № 8. – P. e103743.
294. Newton J. Inhibition of dynamin completely blocks compensatory synaptic vesicle endocytosis / J. Newton, T. Kirchhausen, V. N. Murthy // *PNAS.* – 2006. – Vol. 103. – P.17955-17960.
295. Nguyen M. L. Effects of Internal pH on the Acetylcholine Transporter of Synaptic Vesicles. / M. L. Nguyen, S. M. Parsons // *J Neurochem.* – 1995. – Vol. 64. – P. 1137–1142.
296. Nikolsky E.E. The dependence of non-quantal acetylcholine release on the choline-uptake system in the mouse diaphragm / E.E. Nikolsky, V.A. Voronin, T.I. Oranska, F. Vyskocil // *Pflugers Arch.* – 1991. – Vol. 418. – P. 74-78.
297. Nikolsky E.E. Role of non-quantal acetylcholine release in surplus polarization of mouse diaphragm fibres at the endplate zone / E.E. Nikolsky, H. Zemková, V.A. Voronin, F. Vyskocil // *J Physiol.* – 1994. – Vol. 477. - № Pt 3. – P. 497-502.

298. Nichols B. J. Homotypic vacuolar fusion mediated by t- and v-SNAREs / B. J. Nichols, C. Ungermann, H. R. Pelham, W. T. Wickner, A. Haas // *Nature*. – 1997. – Vol. 387. – P.199-202.
299. Nicholson K. L. Regulation of SNARE complex assembly by an N-terminal domain of the t SNARE / K. L. Nicholson, M. Munson, R. B. Miller, T. J. Filip, R. Fairman, F. M. Hughson // *Struc. Biol.* – 1998. – V. 5. – P.793-802.
300. Nishi T. The vacuolar (H<sup>+</sup>)-ATPases – nature's most versatile proton pumps / T. Nishi, M. Forgac // *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* – 2002. – V. 3. – P.94-103.
301. Nishimura T. Oxysterol-binding protein (OSBP) is required for the perinuclear localization of intra-Golgi v-SNAREs / T. Nishimura, Y. Uchida, R. Yachi, T. Kudlyk, V. Lupashin, T. Inoue, T. Taguchi, H. Arai // *Mol Biol Cell*. – 2013. – Vol. 22. – P. 3534-3544.
302. Nishio N. Reactive oxygen species enhance excitatory synaptic transmission in rat spinal dorsal horn neurons by activating TRPA1 and TRPV1 channels. / Nishio N, Tanicuchi W, Sugimura YK, Takiguchi N, Yamanaka M, Kiyoyuki Y, Yamada H, Miyazaki N, Yoshida M & Nakatsuka T // *Neurosci* – 2013. – Vol. 247. – P. 201–212.
303. Numakawa T. BDNF function and intracellular signaling in neurons. / T. Numakawa, S. Suzuki, E. Kumamaru, N. Adachi, M. Richards, H. Kunugi // *Histol Histopathol.* - 2010. - Vol. 25. - № 2. - P. 237-258.
304. Odnoshivkina U.G.  $\beta$ 2-adrenoceptor agonist-evoked reactive oxygen species generation in mouse atria: implication in delayed inotropic effect. / U.G. Odnoshivkina, V.I. Sytchev, L.F. Nurullin, A.R. Giniatullin, A.L. Zefirov, A.M. Petrov // *Eur J Pharmacol.* – 2015. - Vol. 765. – P. 140-153.
305. Opazo F. Limited intermixing of synaptic vesicle components upon vesicle recycling. / F. Opazo, A. Punge, J. Bückers, P. Hoopmann, L. Kastrup, S. W. Hell, S. O. Rizzoli. // *Traffic*. - 2010. - V. 11. - № 6. - P.800-812.
306. Orlandi P. A. Filipin-dependent inhibition of cholera toxin: evidence for toxin internalization and activation through caveolae-like domains. / P. A. Orlandi, P. H. Fishman // *J. Cell Biol.* - 1998. – Vol. 141. - № 4. - P. 905-915.
307. Ormerod K. G. Cholesterol-independent effects of methyl- $\beta$ -cyclodextrin on chemical synapses / K. G. Ormerod, T. P. Rogasevskaia, J. R. Coorsen, A. J. Mercier // *PLoS One*. – 2012. – Vol. 7. – P. e36395.

308. Ostašov P. FLIM studies of 22- and 25-NBD-cholesterol in living HEK293 cells: plasma membrane change induced by cholesterol depletion / P. Ostašov, J. Sýkora, J. Brejchová, A. Olžýňská, M. Hof, P. Svoboda // *Chem Phys Lipids*. - 2013. - Vol. 62 - № 9. - P. 167-168.
309. Owen D. M. Optical techniques for imaging membrane lipid microdomains in living cells. / D. M. Owen, M. A. A. Neil, P. M. W. French, A. I. Magee // *Seminars in Cell and Development Biology*. - 2007. - Vol. 18. - P. 591 - 598.
310. Paillart C. Endocytosis and vesicle recycling at a ribbon synapse / C. Paillart, J. Li, G. Matthews, P. Sterling // *J Neurosci*. - 2003. - Vol. 23. - P. 4092-4099.
311. Palmer M. J. Synaptic cleft acidification and modulation of short-term depression by exocytosed protons in retinal bipolar cells. / M. J. Palmer, C. Hull, J. Vigh, H. von Gersdorff // *J Neurosci*. - 2003. - Vol. 23. - P. 11332-11341.
312. Pani B. Lipid rafts/caveolae as microdomains of calcium signaling / B. Pani, B.B. Singh // *Cell Calcium*. - 2009. - Vol. 45. - №. 6. - P. 625-633.
313. Paul S.M. The major brain cholesterol metabolite 24(S)-hydroxycholesterol is a potent allosteric modulator of N-methyl-D-aspartate receptors / S.M. Paul, J.J. Doherty, A.J. Robichaud, G.M. Belfort, B.Y. Chow, R.S. Hammond, D.C. Crawford, A.J. Linsenhardt, H.J. Shu, Y. Izumi, S.J. Mennerick, C.F. Zorumski // *J Neurosci*. - 2013. - Vol. 33. №. 44. - P. 17290-17300.
314. Peake K. B. Normalization of cholesterol homeostasis by 2-hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin in neurons and glia from Niemann-Pick C1 (NPC1)-deficient mice. / K. B. Peake, J. E. Vance // *J. Biol. Chem*. - 2012. - Vol. 287. - P. 9290-9298.
315. Pecot-Dechavassine M. Membrane events captured by cooling and related to transmitter release at frog neuromuscular junction / M. Pecot-Dechavassine // *Neurosci. Lett*. - 1982. - Vol. 10. - P.378-379.
316. Peper K. Distribution of acetylcholine receptor in the vicinity of nerve terminals on skeletal muscle of the frog / K. Peper, U. J. McMahon // *Proc. Roy. Soc. Lond*. - 1972. - Vol. B181. - P.431-440.
317. Peters C. Mutual control of membrane fission and fusion proteins / C. Peters, T. L. Baars, S. Bühler, A. Mayer // *Cell*. - 2004. - Vol. 119. - P. 667-678.

318. Petrov A. M. The role of cGMP-dependent signaling pathway in synaptic vesicle cycle at the frog motor nerve terminals / A. M. Petrov, A. R. Giniatullin, G. F. Sitdikova, A. L. Zefirov // *J. Neurosci.* – Vol. 2008. – Vol. 28, № 49. – P.13216-13222.
319. Petrov A.M. Increased non-quantal release of acetylcholine after inhibition of endocytosis by methyl- $\beta$ -cyclodextrin: the role of vesicular acetylcholine transporter. / A. M. Petrov, N.V. Naumenko, K.V. Uzinskaya, A.R. Giniatullin, A.K. Urazaev, A.L. Zefirov // *Neurosci.* – 2011. – Vol. 186. - P. 1-12.
320. Petrov A.M. Role of membrane cholesterol in spontaneous exocytosis at frog neuromuscular synapses: ROS calcium interplay / A.M. Petrov, A.A. Yakovleva, A.L. Zefirov // *J. Physiol.* – 2014. – Vol.592. - P. 4995-5009.
321. Petrov A.M. Inhibition of protein kinase C affects on mode of synaptic vesicle exocytosis due to cholesterol depletion / A.M. Petrov, G.F. Zakyrganova, A.A. Yakovleva, A.L. Zefirov // *Biochem Biophys Res Commun.* – 2015. - Vol. 456. - № 1. - P. 145-150.
322. Phillips G.R. The presynaptic particle web: ultrastructure, composition, dissolution, and reconstitutions / G. R. Phillips // *Neuron.* – 2001. – V. 32. – P.63-67.
323. Picato-Juares G. Identification of a binding motif in the S5 Helix that confers cholesterol sensitivity to the TRPV1 ion channel. / G. Picato-Juares, S. Romero-Suarez, A. Nieto-Posadas, I. Llorente, A. Jara-Oseguera, M. Biggs, T. J. McIntosh, S. A. Simon, E. Ladron-de-Guevara, L. Islas, T. Rosenbaum // *J Biol Chem* – 2011. – Vol. 286. – P. 24966-24976.
324. Praefcke G. J. The dynamin superfamily: universal membrane tubulation and fission molecules? / G. J. Praefcke, H. T. McMahon // *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* – 2004. – Vol. 5. – P.133-147.
325. Preta G. Dynasore - not just a dynamin inhibitor / G. Preta, J.G. Cronin, I.M. Sheldon // *Cell Commun Signal.* – 2015. - Vol.13. – P. 24.
326. Puchkov D. Greasing the synaptic vesicle cycle by membrane lipids. / D. Puchkov, V. Haucke // *Trends Cell Biol* – 2013. – Vol. 23. – P. 493-503.
327. Puglielli L. Alzheimer disease beta-amyloid activity mimics cholesterol oxidase. / L. Puglielli, A. L. Friedlich, K. D. Setchell, S. Nagano, C. Opazo, R. A. Cherny, K. J. Barnham, J. D. Wade, S. Melov, D. M. Kovacs, A. I. Bush // *J. Clin. Invest.* – 2005. – Vol. 115. - № 9. – P. 2556-2563.

328. Pumplin D. W. Are the presynaptic membrane particles the calcium channels? / D. W. Pumplin, T. S. Reese, R. Llinás // *Proc Natl Acad Sci.* – 1981. – Vol. 78. – P. 7210-7213.
329. Puttagunta A. L. Intracellular pH and growth hormone-releasing factor-stimulated adenosine 3'5'-monophosphate, intracellular calcium and growth hormone release from rat anterior pituitary cells. / A. L. Puttagunta, C. L. Chik, M. Girard, L. O'Brien, A. K. Ho // *J Endocrinology* – 1992. – Vol. 135. – P. 343-352.
330. Pyle J. L. Visualization of synaptic activity in hippocampal slices with FM1-43 enabled by fluorescence quenching. / J. L. Pyle, E. T. Kavalali, S. Choi, R. W. Tsien // *Neuron.* – 1999. – Vol. 24. - № 4. – P. 803-808.
331. Queralt A. A. Linkers, packages and pathways: new concepys in axonal transport / A. A. Queralt, L. S. B. Goldstein // *Curr. Opin. in Neurobiol.* – 2001. – Vol. 11. – P.550-557.
332. Ramirez D.M. Differential regulation of spontaneous and evoked neurotransmitter release at central synapses / D.M. Ramirez , E.T. Kavalali // *Curr. Opin. Neurobiol.* – 2011. – Vol. 21. - P. 275-282.
333. Rash J. E. Cell-specific expression of connexins and evidence of restricted gap junctional coupling between glial cells and between neurons / J. E. Rash, T. Yasumura, F. E. Dudek, J. I. Nagy // *J Neurosci.* – 2001. – Vol. 21. – P.1983-2000.
334. Rea R. Streamlined synaptic vesicle cycle in cone photoreceptor terminals / R. Rea, J. Li, A. Dharia, E. S. Levitan, P. Sterling, R. H. Kramer // *Neuron.* – 2004. – Vol. 41. – P.755-766.
335. Reid B. Synaptic vesicle dynamics in rat fast and slow motor nerve terminals / B. Reid, C. R. Slater, G. S. Bewick // *J Neurosci.* – 1999. - Vol. 19. – P.2511-2521.
336. Reid B. Activity-depend plasticity of transmitter release from nerve terminals in rat fast and slow muscles / B. Reid, V. N. Martinov, A. Njå, T. Lømo, G. S. Bewick // *J. Neurosci.* – 2003. –Vol. 23, № 28. – P.9340-9348.
337. Reim K. Complexins regulate a late step in Ca-dependent neurotransmitter release / K. Reim, M. Mansour, F. Varoqueaux, H. T. McMahon, T. C. Südhof, N. Brose, C. Rosenmund // *Cell.* – 2001. – Vol. 104. – P.71-81.
338. Renden R. Synaptic vesicle endocytosis at a CNS nerve terminal: faster kinetics at physiological temperatures and increased endocytotic capacity during maturation / R. Renden, H. von Gersdorff // *J Neurophysiol.* – 2007. – Vol. 98. – P. 3349-3359.

339. Rensen P. C. Apolipoprotein E is resistant to intracellular degradation in vitro and in vivo. Evidence for retroendocytosis. / P. C. Rensen, M. C. Jong, L. C. van Vark, H. van der Boom, W. L. Hendriks, T. J. van Berkel, E. A. Biessen, L. M. Havekes // *J Biol Chem.* - 2000. - Vol. 275. - № 12. - P. 8564-8571.
340. Richards D. A. Two endocytic recycling routes selectively fill two vesicle pools in frog motor nerve terminal / D. A. Richards, C. Guatimosim, Betz W.J // *Neuron.* - 2000. - V. 27. - P.551-559.
341. Richards D. A. Synaptic vesicle pools at the frog neuromuscular junction / D. A. Richards, C. Guatimosim, S. O. Rizzoli, W. J. Betz // *Neuron.* - 2003. - Vol.39. - P.529-541.
342. Richards D.A. Vesicular release mode shapes the postsynaptic response at hippocampal synapses / D. A. Richards // *J Physiol.* - 2009. - Vol. 587. - P. 5073-5080.
343. Richmond E. J. Unc13 is required for synaptic vesicle fusion in *C. elegans* / E. J. Richmond, W. S. Davis, E. M. Jorgensen // *Nat. Neurosci.* - 1999. - Vol. 2. - P.959-964.
344. Richmond E. J. The synaptic vesicle cycle: exocytosis and endocytosis in *Drosophila* and *C. elegans* / E. J. Richmond, K. S. Broadie // *Curr. Opin. Neurobiol.* - 2002. - Vol. 12. - P.499-507.
345. Rickman C. Functionally and spatially distinct modes of MUNC18-syntaxin 1 interaction / C. Rickman, C. N. Medine, A. Bergmann, R. R. Duncan // *J. Biol. Chem.* - 2007. - Vol. 282, № 16. - P.12097-12103.
346. Rituper B. Cholesterol and regulated exocytosis: a requirement for unitary exocytotic events / B. Rituper, A. Flašker, A. Guček, H.H. Chowdhury, R. Zorec // *Cell Calcium.* - 2012. - Vol. 52. - P. 250-258.
347. Rizo J. SNAREs and Munc 18 in synaptic vesicle fusion / J. Rizo, T. C. Sudhof // *Nature Rev.* - 2002. - Vol. 3. - P.641-653.
348. Rizo J. Synaptic vesicle fusion / J. Rizo, C Rosenmund // *Nat Struct Mol Biol.* - 2008. - Vol. - 15. - P. 665-674.
349. Rizo J. The Synaptic Vesicle Release Machinery / J. Rizo, J. Xu // *Annu Rev Biophys.* - 2015. - Vol. 44. - P. 339-367.
350. Rizzoli S. O. The structural organization of the readily releasable pool of synaptic vesicles / S.O. Rizzoli, W.J. Betz // *Science.* - 2004. - Vol. 303. - № 5666. - P. 2037-2039.

351. Rizzoli S. O. Synaptic vesicle pools / S. O. Rizzoli, W. J. Betz // *Nature rev. Neurosci.* – 2005. – Vol. 6. – P.57-69
352. Rizzoli S. O. Synaptic vesicle recycling: steps and principles / S. O. Rizzoli // *EMBO J.* – 2014. – Vol. 33. - № 8. – P. 788-822.
353. Roberts W. M. Colocalization of ion channels involved in frequency selectivity and synaptic transmission at presynaptic active zones of hair cells / W. M. Roberts, R. A. Jacobs, A. J. Hudspeth // *J Neurosci.* – 1990. – Vol. 10. – P. 3664-3684.
354. Robertson J.D. The ultrastructure of reptilian myoneural junction / J. D. Robertson // *Ann. Rev. Biochem.* – 1983. – Vol. 52. – P.871-926.
355. Robitaille R. Functional co-localization of calcium and calcium-gated potassium channels in control of transmitter release / R. Robitaille, M. L. Garcia, G. J. Kaczorowski, M. P. Charlton // *Neuron.* – 1993. – V. 11. – P.645-655.
356. Robitaille R. Localization of L-type Ca<sup>2+</sup> channels at perisynaptic glial cells of the frog neuromuscular junction. / R. Robitaille, M. J. Bourque, S. Vandaele // *J Neurosci* 1996. – Vol. 16. – P. 148-158.
357. Robitaille R. Modulation of synaptic efficacy and synaptic depression by glial cells at the frog neuromuscular junction / R Robitaille // *Neuron.* – 1998. – Vol. 21. – P. 847-855.
358. Rocha N. Cholesterol sensor ORP1L contacts the ER protein VAP to control Rab7-RILP-p150 Glued and late endosome positioning / N. Rocha, C. Kuijl, R. van der Kant, L. Janssen, D. Houben, H. Janssen, W. Zwart, J. Neefjes // *J. Cell Biol.* – 2009. – Vol. 185. - P. 1209-1225.
359. Rodrigues H.A. Membrane cholesterol regulates different modes of synaptic vesicle release and retrieval at the frog neuromuscular junction. / H.A. Rodrigues, R.F. Lima, M.D. Fonseca, E.A. Amaral, P.M. Martinelli, L.A. Naves, M.V. Gomez, C. Kushmerick, M.A. Prado, C. Guatimosim // *Eur. J. Neurosci.* – 2013. - Vol. 38. - P. 2978-2987.
360. Rohrbough J. Ceramidase Regulates Synaptic Vesicle Exocytosis and Trafficking. / J. Rohrbough, E. Rushton, L. Palanker, E. Woodruff, H. J. G. Matthies, U. Acharya, K. J. Acharya, K. Broadie // *J. Neurosci.* – 2004. – Vol. 24. - № 36. – P. 7789-7803. 2004.
361. Rohrbough J. Lipid regulation of the synaptic vesicle cycle. / J. Rohrbough, K. Broadie // *Nature rev. Neurosci.* – 2005. – Vol. 6. – P. 139-150.

362. Rose T. Developmental refinement of vesicle cycling at Shaffer collateral synapses. / T. Rose, P. Schoenenberger, K. Jezek, T. G. Oertner // *Neuron* – 2013. – Vol. 77. – P. 1109–1121.
363. Ross-Canada G., Becker R.P., Pappas G. Synaptic vesicles and nerve-muscle preparation is resinless section // *J. Neurocyt.* – 1983. – V. 12. – P.817-830.
364. Royle S. J. Endocytosis at the synaptic terminal / S. J. Royle, L. Lagnado // *J. Physiol.* – 2003. – Vol. 553. – P.345-355.
365. Royle S. J. The cellular functions of clathrin / S. J. Royle // *Cell Mol Life Sci.* – 2006. – Vol. 63. – P. 1823-1832.
366. Rushworth J. V. Prion protein-mediated toxicity of amyloid- $\beta$  oligomers requires lipid rafts and the transmembrane LRP1. / J. V. Rushworth, H. H. Griffiths, N. T. Watt, N. M. Hooper // *J Biol Chem.* - 2013. - Vol. 288. - № 13. - P. 8935-8951.
367. Russell D. W. Cholesterol 24-hydroxylase: an enzyme of cholesterol turnover in the brain / D. W. Russell, R. W. Halford, D. M. Ramirez, R. Shah, T. Kotti // *Annu. Rev. Biochem.* - 2009. - V. 78. - P. 1017-1040.
368. Saeed A .A. Effects of a disrupted blood-brain barrier on cholesterol homeostasis in the brain. / A. A Saeed, G. Genové, T. Li, D. Lütjohann, M. Olin, N. Mast, I. A. Pikuleva, P. Crick, Y. Wang, W. Griffiths // *J Biol Chem.* - 2014. - V. 289. - № 34. - P. 23712-23722.
369. Sagare A. P. Pericyte loss influences Alzheimer-like neurodegeneration in mice. / A. P. Sagare, R. D. Bell, Z. Zhao, Q. Ma, E. A. Winkler, A. Ramanathan, B. V. Zlokovic // *Nat. Commun.* - 2013. -Vol. 4. - P. 2932.
370. Saher G. High cholesterol level is essential for myelin membrane growth. / G. Saher, B. Brügger, C. Lappe-Siefke, W. Möbius, R. Tozawa, M. C. Wehr, F. Wieland, S. Ishibashi, K. A. Nave // *Nature Neuroscience.* - 2005. - V. 8. - № 4. - P.468-475.
371. Salen G. Biosynthesis of 5-cholestan-3-ol in cerebrotendinous xanthomatosis / G. Salen, A. Polito // *J. Clin. Invest.* – 1972. – Vol. 51. - № 1. - P. 134-140.
372. Sassano A. Statin-dependent activation of protein kinase C delta (PKC $\delta$ ) in APL cell and induction of leukemic cell differentiation / A. Sassano, J.K. Altman, L.I. Gordon, L.C. Plataniias // *Leul. Lymphoma.* – 2012. – Vol. 53. - P. 1779-1784.
373. Scales S. J. The ionic layer is required for efficient dissociation of the SNARE complex by  $\alpha$ SNAP and NSF / S. J. Scales, B. Y. Yoo, R. H. Scheller // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2001. – Vol. 98. – P.14262-14267.

374. Schaub J. R. Hemifusion arrest by complexin is relieved by Ca<sup>2+</sup>-synaptotagmin 1 / J. R. Schaub, X. Lu, B. Doneske, Y. K. Shin, J. A. McNew. // Nat. Struct. Mol. Biol. – 2006. – Vol. 13. – P.748-750.
375. Schnee M. E. Auditory hair cell-afferent fiber synapses are specialized to operate at their best frequencies / M. E. Schnee, D. M. Lawton, D. N. Furness, T. A. Benke, A. J. Ricci // Neuron. – 2005. – Vol. 47. – P. 243-254
376. Schoch S. SNARE function analyzed in synaptobrevin/VAMP knockout mice / S. Schoch, F. Deák, A. Königstorfer, M. Mozhayeva, Y. Sara, T. C. Südhof, E. T. Kavalali // Science. – 2001. – Vol. 294. – P.1117-1122.
377. Schoch S. RIM1 $\alpha$  forms a protein scaffold for regulating neurotransmitter release / S. Schoch, P. E. Castillo, T. Jo, K. Mukherjee, M. Geppert, Y. Wang, F. Schmitz, R. C. Malenka, T. C. Südhof. // Nature. – 2002. – Vol. 415. – P.321-326.
378. Schwan C. Cholesterol- and sphingolipid-rich microdomains are essential for microtubule-based membrane protrusions induced by Clostridium difficile transferase (CDT) / C. Schwan, T. Nölke, A.S. Kruppke, D.M. Schubert, A.E. Lang, K. Aktories // J. Biol. Chem. – 2011. – Vol. 286. - P. 29356-29365.
379. Searl T. Acetylcholine recycling and release at rat motor nerve terminals studied using (-)-vesamicol and troxpyrrolium. / T. Searl, C. Prior, I. G. Marshall // J Physiol – 1991. – Vol. 444. – P. 99-116.
380. Sebastião A.M. Lipid rafts, synaptic transmission and plasticity: impact in age-related neurodegenerative diseases / A.M. Sebastião, M. Colino-Oliveira, N. Assaife-Lopes, R.B. Dias, J.A. Ribeiro // Neuropharmacology. – 2013. – Vol. 64. - P. 97-107.
381. Segatto M. Cholesterol homeostasis failure in the brain: implications for synaptic dysfunction and cognitive decline / M. Segatto, L. Leboffe, L. Trapani, V.Pallottini // Curr Med Chem. – 2014. Vol. 21. - №24. – P. 2788-2802.
382. Sengupta P. Lipid rafts, fluid/fluid phase separation, and their relevance to plasma membrane structure and function / P. Sengupta, B. Baird, D. Holowka // Semin. Cell Dev. Biol. - 2007. - V. 18. - № 5. - P. 583-590.
383. Shahin V. Synaptotagmin perturbs the structure of phospholipid bilayers / V. Shahin, D. Datta, E. Hui, R. M. Henderson, E. R. Chapman, J. M. Edwardson // Biochemistry. – 2008. – Vol. 47. – P.2143-2152.

384. Shen J. Selective activation of cognate SNAREpins by Sec1/Munc18 proteins / J. Shen, D. C. Tareste, F. Paumet, J. E. Rothman, T. J. Melia // *Cell*. – 2007. – Vol. 3. – P.183-195.
385. Shimizu H. Use-dependent amplification of presynaptic Ca<sup>2+</sup> signaling by axonal ryanodine receptors at the hippocampal mossy fiber synapse. / H. Shimizu, M. Fukaya, M. Yamasaki, M. Watanabe, T. Manabe, H. Kamiya // *Proc Natl Acad Sci U S A* – 2008. – Vol. 105. – P. 11998-12003.
386. Shin O. H. Binding to the Ca<sup>2+</sup> binding site of the synaptotagmin 1 C2B domain triggers fast exocytosis without stimulating SNARE interactions / O. H. Shin, J. S. Rhee, J. Tang, S. Sugita, C. Rosenmund, T. C. Südhof.// *Neuron*. – 2003. – Vol. 37. – P.99-108.
387. Shupliakov O. Synaptic Vesicle Endocytosis Impaired by Disruption of Dynamin-SH3 Domain Interactions. / O. Shupliakov, P. Löw, D. Grabs, H. Gad, H. Chen, C. David, K. Takei, P. De Camilli, L. Brodin // *Science* – 1997. – Vol. 276. – P. 259-263.
388. Sieber J. J. The SNARE motif is essential for the formation of syntaxin clusters in the plasma membrane. / J. J. Sieber, K. I. Willig, R. Heintzmann, S. W. Hell, T. Lang // *Biophys J*. – 2006. – V. 90. – № 8. – P. 2843-2851.
389. Simons K. Revitalizing membrane rafts: new tools and insights / K. Simons, M. J. Gerl // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* – 2010. – V. 11. – № 10. – P. 688-699.
390. Simons K. Membrane organization and lipid rafts / K. Simons, J.L. Sampaio // *Cold Spring Harb Perspect Biol.* – 2011. – Vol. 3. – № 10. – P. a004697.
391. Singhal N. Role of extracellular matrix proteins and their receptors in the development of the vertebrate neuromuscular junction / N. Singhal, P.T. Martin // *Dev Neurobiol.* – 2011. – Vol. 71. – №11. – P.982-1005.
392. Slater C.R. Structural factors influencing the efficacy of neuromuscular transmission / C. R. Slater // *Ann N Y Acad Sci.* – 2008. – Vol. 1132. – P. 1-12.
393. Slepnev V. I. Accessory factors in clathrin-dependent synaptic vesicle endocytosis / V. I. Slepnev, P. De Camilli // *Nat Rev Neurosci.* – 2000. – Vol. 1. – P.161-172.
394. Smith A.J. Cholesterol-dependent kinase activity regulates transmitter release from cerebellar synapses / A.J. Smith, S. Sugita, M.P. Charlton // *J. Neurosci.* – 2010. – Vol. 30. – P. 6116-6121.
395. Sodero A.O. Cellular stress from excitatory neurotransmission contributes to cholesterol loss in hippocampal neurons aging in vitro / A.O. Sodero, C. Weissmann, M.D. Ledesmac, C.G. Dotti // *Neurobiol. Aging.* – 2011. – Vol.32. – P. 1043–1053.

396. Sodero A. O. Cholesterol loss during glutamate-mediated excitotoxicity. / A. O. Sodero, J. Vriens, D. Ghosh, D. Stegner, A. Brachet, M. Pallotto, M. Sassoè-Pognetto, J. F. Brouwers, J. B. Helms, B. Nieswandt // *EMBO J.* - 2012. - V. 31. - № 7. - P. 1764-1773.
397. Sollner T.A., Bennett M.K., Whiteheart S.W. Protein assembly-disassembly pathway in vitro that may correspond to sequential steps of synaptic vesicle docking, activation, and fusion / T. A. Sollner, M. K. Bennett, S. W. Whiteheart // *Cell.* – 1993. - Vol. 75. - P.409-418.
398. Song M. Y. Role of reactive oxygen species and redox in regulating the function of transient receptor potential channels. / M. Y. Song, A. Makino, J. X. Yuan JX // *Antioxid Redox Signal* – 2011. – Vol. 15. – P. 1549-1565.
399. Sonnino S. Gangliosides as components of lipid membrane domains / S. Sonnino, L. Mauri, V. Chigorno, A. Prinetti // *Glycobiology.* - 2007. - V. 17. - № 1. - P. 1R-13R.
400. Sorensen J. B. Examining Synaptotagmin 1 function in dense core vesicle exocytosis under direct control of Ca<sup>2+</sup> / J. B. Sorensen, F. R. Chacon, T. C. Sudhof, E. Neher // *J. Gen. Physiol.* – 2003. – Vol. 122. – P.165-276.
401. Strydom C. M. Caveolins: targeting pro-survival signaling in the heart and brain. / C. M. Strydom, Y. M. Tsutsumi, P. M. Patel, B. P. Head, H. H. Patel, D. M. Roth // *Front Physiol.* - 2012. - Vol. 3. - P. 393.
402. Steck T.L. Cell cholesterol homeostasis: mediation by active cholesterol / T.L. Steck, Y. Lange // *Trends Cell Biol.* – 2010. – Vol. 20. - № 11. – P. 680-687.
403. Stelmashook E. V. Role of zinc and copper ions in the pathogenetic mechanisms of Alzheimer's and Parkinson's diseases / E.V. Stelmashook, N.K. Isaev, E.E. Genrikhs, G.A. Amelkina, L.G. Khaspekov, V.G. Skrebitsky, S.N. Illarioshkin // *Biochemistry (Mosc).* – 2014. – Vol. 79. – Vol. 5. – P. 391-396.
404. Stevens C. F. "Kiss and run" exocytosis at hippocampal synapses. / C. F. Stevens, J. H. Williams // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* – 2000. – Vol. 97. - № 23. – P. 12828-12833.
405. Stevens C. F. The synaptotagmin C2A domain is part of the calcium sensor controlling fast synaptic transmission / C. F. Stevens, J. M. Sullivan // *Neuron.* – 2003. – Vol. 39. - № 2. – P.299-308.
406. Sudhof T.C. The synaptic vesicle cycle / T. C. Sudhof // *Annu. Rev. Neurosci.* – 2004. – Vol. 27. – P.509-547.
407. Sudhof T.C. Synaptic vesicle exocytosis / T.C. Sudhof, J. Rizo // *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* – 2011. – Vol. 3. – P. a005637.

408. Sugita S. Synaptotagmins form a hierarchy of exocytotic Ca<sup>2+</sup> sensors with distinct Ca<sup>2+</sup> affinities / S. Sugita, O. H. Shin, W. Han, Y. Lao, T. C. Südhof // *EMBO. J.* – 2002. – Vol. 21. – P.270-280.
409. Sugiura Y. Neuron-glia interactions: the roles of Schwann cells in neuromuscular synapse formation and function / Y. Sugiura, W. Lin // *Biosci Rep.* – 2011. – Vol. 31. - № 5. – P. 295-302.
410. Sun M.K. Activation of protein kinase C isozymes for the treatment of dementias. / M.K. Sun, D.L. Alkon // *Adv. Pharmacol.* – 2012. – Vol. 64. - P. 273-302.
411. Suzuki K. The cholesterol metabolite cholest-4-en-3-one and its 3-oxo derivatives suppress body weight gain, body fat accumulation and serum lipid concentration in mice / K. Suzuki, T. Shimizu, T. Nakata // *Bioorg Med Chem Lett.* – 1998. – Vol. 8. - №16. – P.2133-2138.
412. Suzuki R. Reduction of the cholesterol sensor SCAP in the brains of mice causes impaired synaptic transmission and altered cognitive function. / R. Suzuki, H. A. Ferris, M. J. Chee, E. Maratos-Flier, C. R. Kahn // *PLoS Biol.* - 2013. - V. 11. - № 4. - P. e1001532.
413. Suzuki T. Association of membrane rafts and postsynaptic density: proteomics, biochemical, and ultrastructural analyses. / T. Suzuki, J. Zhang, S. Miyazawa, Q. Liu, M. R. Farzan, W. D. Yao // *J. Neurochem.* - 2011. - V. 119. - № 1. - P. 64-77.
414. Sutton M. A. Miniature neurotransmission stabilizes synaptic function via tonic suppression of local dendritic protein synthesis / M. A. Sutton, H. T. Ito, P. Cressy, C. Kempf, J. C. Woo, E. M. Schuman // *Cell.* – 2006. – Vol. 125. – P. 785-799.
415. Tabares L. Monitoring synaptic function at the neuromuscular junction of a mouse expressing synaptotagmin. / L. Tabares L, R. Ruiz, P. Linares-Clemente, M. A. Gaffield, G. Alvarez de Toledo, R. Fernandez-Chacón, W. J. Betz // *J Neurosci.* – 2007. – Vol. 27. - № 20. – P. 5422-5430.
416. Takamori S. Molecular anatomy of a trafficking organelle / S. Takamori, M. Holt, K. Stenius, E. A. Lemke, M. Grønborg, D. Riedel, H. Urlaub, S. Schenck, B. Brügger, P. Ringler, S. A. Müller, B. Rammner, F. Gräter, J. S. Hub, B. L. De Groot, G. Mieskes, Y. Moriyama, J. Klingauf, H. Grubmüller, J. Heuser, F. Wieland, R. Jahn // *Cell.* – 2006. – Vol. 127. – P.831-846.

417. Tang J. A complexin/synaptotagmin 1 switch controls fast synaptic vesicle exocytosis / J. Tang, A. Maximov, O. H. Shin, H. Dai, J. Rizo, T. C. Südhof. // *Cell*. – 2006. – Vol. 126. – P.1175-1187.
418. Tarasenko A. S. Cholesterol depletion from the plasma membrane impairs proton and glutamate storage in synaptic vesicles of nerve terminals. / A. S. Tarasenko, R. V. Sivko, N. V. Krisanova, N. H. Himmelreich, T. A. Borisova // *J Mol Neurosci*. - 2010. - Vol. 41. - № 3. - P. 358-367.
419. Taverna E. Role of lipid microdomains in P/Q-type calcium channel (Cav2.1) clustering and function in presynaptic membranes. / E. Taverna, E. Saba, J. Rowe, M. Francolini, F. Clementi, P. Rosa // *J. Biol. Chem.* – 2004. – Vol. 279. – P. 5127-5134.
420. Taverna E. Localization of synaptic proteins involved in neurosecretion in different membrane microdomains / E. Taverna, E. Saba, A. Linetti, R. Longhi, A. Jeromin, M. Righi, F. Clementi, P. Rosa // *J. Neurochem.* - 2007. - V. 100. - № 3. - P. 664-677.
421. Teixeira G. Cholesterol as a key player in the balance of evoked and spontaneous glutamate release in rat brain cortical synaptosomes / G. Teixeira, L.B Vieira, M.V. Gomez, C. Guatimosim // *Neurochem. Int.* – 2012. – Vol. 61. - P. 1151-1159.
422. Tejada-Simon M. V. Synaptic localization of a functional NADPH oxidase in the mouse hippocampus. / M. V. Tejada-Simon, F. Serrano, L. E. Villasana, B. I. Kanterewicz, G. Y. Wu, M. T. Quinn, E. Klann // *Mol Cell Neurosci* – 2005. – Vol. 29. – P. 97–106.
423. Thyagarajan B. Capsaicin protects mouse neuromuscular junctions from the neuroparalytic effects of botulinum neurotoxin a. / B. Thyagarajan, N. Krivitskaya, J. G. Potian, K. Hognason, C. C. Garcia, J. J. McArdle // *J Pharmacol Exp Ther* – 2009. – Vol. 331. – P. 361-71.
424. Thyagarajan B. Capsaicin modulates acetylcholine release at the myoneural junction / B. Thyagarajan, J.G. Potian, P. Baskaran, J.J. McArdle // *Eur J Pharmacol*. – 2014. – Vol. 744. – P. 211-219.
425. Tokumaru H. SNARE complex oligomerization by synaphin/complexin is essential for synaptic vesicle exocytosis / H. Tokumaru, K. Umayahara, L. L. Pellegrini, T. Ishizuka, H. Saisu, H. Betz, G. J. Augustine, T. Abe // *Cell*. – 2001. –Vol. 104. – P.421-432.
426. Tong J. A scissors mechanism for stimulation of SNARE-mediated lipid mixing by cholesterol. / J. Tong, P. P. Borbat, J. H. Freed, Y. K. Shin // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. – 2009. – Vol. 106. - № 13. – P. 5141-5146.

427. Toonen R. F. Dissecting docking and tethering of secretory vesicles at the target membrane / R. F. Toonen, O. Kochubey, H. de Wit, A. Gulyas-Kovacs, B. Konijnenburg, J. B. Sørensen, J. Klingauf, M. Verhage. // *Embo J.* – 2006. – Vol. 25. – P.3725-3737.
428. Triller A. Surface trafficking of receptors between synaptic and extrasynaptic membranes: and yet they do move! / A. Triller, D. Choquet // *Trends Neurosci.* - 2005. - V. 28. - № 3. - P. 133-139.
429. Truckenbrodt S. Spontaneous vesicle recycling in the synaptic bouton / S. Truckenbrodt, S.O. Rizzoli // *Front Cell Neurosci.* – 2014. – Vol. 8. – P.409.
430. Tsai K. J. G-CSF rescues the memory impairment of animal models of Alzheimer's disease. / K. J. Tsai, Y. C. Tsai, C. K. Shen // *J Exp Med* – 2007. – Vol. 204. – P. 1273-1280.
431. Tsentsevitsky A. Opposite modulation of time course of quantal release in two parts of the same synapse by reactive oxygen species / A. Tsentsevitsky, E. Nikolsky, R. Giniatullin, E. Bukharaeva // *Neuroscience.* – 2011. – Vol.189. – P. 93-99.
432. Tsuboi T. The polybasic sequence in the C2B domain of rabphilin is required for vesicle docking step in PC12 cells / T. Tsuboi, E. Kanno, M. Fukuda // *J. Neurochem.* – 2007. – Vol. 100. – P.770-779.
433. Ungermann C. Function of SNAREs in intracellular membrane fusion and lipid bilayer mixing / C. Ungermann, D. Langosch // *J. Cell Sci.* – 2005. – Vol. 118. – P.3819-3838.
434. Urazaev A. Kh. Carbachol and acetylcholine delay the early postdenervation depolarization of muscle fibres through M1-cholinergic receptors. / A. Kh. Urazaev, N. V. Naumenko, G. I. Poletayev, E. E. Nikolsky, F. Vyskočil // *Neurosci Res* - 2000. – Vol. 37. – P. 255-263.
435. Usdin T. B. Molecular biology of the vesicular ACh transporter. / T. B. Usdin, L. E. Eiden, T. I. Bonner, J. D. Erickson // *Trends Neurosci* – 1995. – Vol. 18. – P. 218-224.
436. Vance J.E. Dysregulation of cholesterol balance in the brain: contribution to neurodegenerative diseases. / J. E. Vance // *Disease Models and Mechanisms.* - 2012. - V. 5. - P. 746-755.
437. Vance J. E. Niemann-Pick C disease and mobilization of lysosomal cholesterol by cyclodextrin. / J. E. Vance, B. Karten // *J Lipid Res.* - 2014. - Vol. 55. - № 8. - P. 1609-1621.
438. Van Meer G. Membrane lipids: where they are and how they behave. / G. Van Meer, D.R. Voelker, G.W. Feigenson // *Nature.* – 2008. – Vol. 9 – P. 112-124.

439. Vaughan A. M. ABCA1 and ABCG1 or ABCG4 act sequentially to remove cellular cholesterol and generate cholesterol-rich HDL. / A. M. Vaughan, J. F. Oram // *J Lipid Res.* - 2006. - Vol. 47. - № 11. - P. 2433-2443.
440. Vavassori S. A new life for an old pump: V-ATPase and neurotransmitter release / S. Vavassori, A. Mayer // *J Cell Biol.* – 2014. – Vol. 205. - № 1. – P.7-9.
441. Verheijen M. H. SCAP is required for timely and proper myelin membrane synthesis. / M. H. Verheijen, N. Camargo, V. Verdier, K. Nadra, A. S. de Preux Charles, J. J. Médard, A. Luoma, M. Crowther, H. Inouye, H. Shimano. // *Proc Natl Acad Sci USA.* - 2009. - Vol. 106. - № 50. - P. 21383-21388.
442. Vihervaara T. Cytoplasmic oxysterol-binding proteins: sterol sensors or transporters? / T. Vihervaara, M. Jansen, R.L. Uronen, Y. Ohsaki, E. Ikonen, V.M. Olkkonen // *Chem. Phys. Lipids.* – 2011. – Vol. 164. - P. 443-450.
443. Vizi E. S. Changes in total and quantal release of acetylcholine in the mouse diaphragm during activation and inhibition of membrane ATPase. / E. S. Vizi, F. Vyskočil // *J Physiol (Lond)* – 1979. – Vol. 286. – P. 1-14.
444. von Gersdorff H. Inhibition of endocytosis by elevated internal calcium in a synaptic terminal. / H. von Gersdorff, G. Matthews // *Nature.* – 1994. – Vol. 370. – P. 652–655.
445. Vyskočil F. Non-quantal release of transmitter at mouse neuromuscular junction and its dependence on the activity of Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> ATP-ase. / F. Vyskočil, P. Illés // *Pflügers Arch* – 1977. – Vol. 370. – P. 295-297.
446. Vyskocil F. An analysis of the mechanisms underlying the non-quantal release of acetylcholine at the mouse neuromuscular junction / F. Vyskocil, E. Nikolsky, C. Edwards // *Neuroscience.* – 1983. – Vol. 9. - № 2. – P.429-435.
447. Vyskočil F. Inhibition of non-quantal acetylcholine leakage by 2(4-phenylpiperidine)cyclohexanol in the mouse diaphragm. / F. Vyskočil // *Neurosci Lett* – 1985. – Vol. 59. – P. 277-280.
448. Vyskocil F. Non-quantal acetylcholine release at the neuromuscular junction / F. Vyskocil, A.I. Malomouzh, E.E.Nikolsky // *Physiol Res.* – 2009. – Vol. 58. - №6. – P. 763-784.
449. Wang Y. RIM: is a putative Rab3a-effector in regulating synaptic vesicle fusion / Y. Wang, M. Okamoto, F. Schmitz, K. Hofmann, T. C. Südhof.// *Nature.* – 1997. – Vol. 388. – P.593-598.

450. Wang Y. A family of RIM-binding proteins regulated by alternative splicing: implications for the genesis of synaptic active zones / Y. Wang, X. Liu, T. Biederer, T. C. Sudhof // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 2002. – Vol. 99. – P.14464-14469.
451. Washbourne P. Genetic ablation on the t-SNARE SNAP-25 distinguishes mechanism of neuroexocytosis / P. Washbourne, P. M. Thompson, M. Carta, E. T. Costa, J. R. Mathews, G. Lopez-Bendito, Z. Molnár, M. W. Becher, C. F. Valenzuela, L. D. Partridge, M. C. Wilson. // *Nat. Neurosci.* – 2002. – Vol. 5. – P.19-26.
452. Wasser C.R. Leaky synapses: regulation of spontaneous neurotransmission in central synapses / C.R. Wasser, E.T. Kavalali // *Neuroscience.* – 2009. – Vol. 158. - P. 177-188.
453. Watanabe S. Ultrafast endocytosis at mouse hippocampal synapses / S. Watanabe, B.R. Rost, M. Camacho-Pérez, M.W. Davis, B. Söhl-Kielczynski, C. Rosenmund, E.M. Jorgensen // *Nature.* - 2013. – Vol. 504. - №7479. – P.242-247.
454. Watanabe S. Slow or fast? A tale of synaptic vesicle recycling / S. Watanabe // *Science.* - 2015. – Vol. 350. - № 6256. – P.47-46.
455. Weber-Boyvatt M. Oxysterol-binding proteins: functions in cell regulation beyond lipid metabolism / M. Weber-Boyvatt, W. Zhong, D. Yan, V.M. Olkkonen // *Biochem. Pharmacol.* – 2013. – Vol. 86. - P. 89-95.
456. Weimer M. R. Controversies in synaptic vesicle exocytosis / M. R. Weimer, E. M. Jorgensen // *J. Cell Science.* – 2003. – V. 116. – P.3661-3666.
457. Wheeler D. Tumor necrosis factor-alpha-induced neutral sphingomyelinase-2 modulates synaptic plasticity by controlling the membrane insertion of NMDA receptors / D. Wheeler, E. Knapp, V. V. Bandaru, Y. Wang, D. Knorr, C. Poirier, M. P. Mattson, J. D. Geiger, N J. Haughey // *J. Neurochem.* - 2009. - Vol. 109. - № 5. - P. 1237-1249.
458. Willig K. I. STED microscopy reveals that synaptotagmin remains clustered after synaptic vesicle exocytosis. / K. I. Willig, S. O. Rizzoli, V. Westphal, R. Jahn, S. W. Hell // *Nature.* - 2006. - Vol. 440. - № 7086. - P. 935-939.
459. Willmann R. Cholesterol and lipid microdomains stabilize the postsynapse at the neuromuscular junction / R. Willmann, S. Pun, L. Stallmach, G. Sadasivam, A. F. Santos, P. Caroni, C. Fuhrer // *EMBO J.* - 2006. - V. 25. - № 17. - P. 4050-4060.
460. Winter U. A conserved membrane attachment site in alpha-SNAP facilitates N-ethylmaleimide-sensitive factor (NSF)-driven SNARE complex disassembly / U. Winter, X. Chen, D. Fasshauer // *J Biol Chem.* – 2009. – Vol. 284. – P. 31817-31826.

461. Winterer J. Direct monitoring of vesicular release and uptake in brain slices by multiphoton excitation of the styryl FM 1-43 / J. Winterer, P.K. Stanton, W. Müller // *Biotechniques*. – 2006. – Vol. 40. - P. 343-351.
462. Wong C.O. A TRPV channel in *Drosophila* motor neurons regulates presynaptic resting Ca<sup>2+</sup> levels, synapse growth, and synaptic transmission / C. O. Wong, K. Chen, Y. Q. Lin, Y. Chao, L. Duraine, Z. Lu, W. H. Yoon, J. M. Sullivan, G. T. Broadhead, C. J. Sumner, T. E. Lloyd, G. T. Macleod, H. J. Bellen, K. Venkatachalam // *Neuron*. – 2014. – Vol. 84. - № 4. – P. 764-777.
463. Wood W.G. Cholesterol asymmetry in synaptic plasma membranes / W.G. Wood, U. Igbavboa, W. E. Müller, G. P. Eckert // *J. Neurochem*. - 2011. - V. 116. - № 5. - P. 684-689.
464. Wu M. L. DIDS-sensitive pHi regulation in single rat cardiac myocytes in nominally HCO<sub>3</sub>-free conditions. / M. L. Wu, M. L. Tsai, Y. Z. Tseng // *Circ Res* – 1994. – Vol. 75. – P. 123-132.
465. Wu W. Rapid bulk endocytosis and its kinetics of fission pore closure at a central synapse / W. Wu, L. G. Wu // *Proc Natl Acad Sci*. – 2007. – Vol. 104. – P.10234-10239.
466. Wucherpfennig T. Role of *Drosophila* Rab5 during endosomal trafficking at the synapse and evoked transmitter release / T. Wucherpfennig, M. W. Brauningner, M. G. Gaitan // *J. Cell Biol*. – 2003. – Vol. 161.- P.609-624.
467. Xu H. The human immunodeficiency virus coat protein gp120 promotes forward trafficking and surface clustering of NMDA receptors in membrane microdomains / H. Xu, M. Bae, L. B. Tovar-y-Romo, N. Patel, V. V. Bandaru, D. Pomerantz, J. P. Steiner, N. J. Haughey // *J. Neurosci*. - 2011. - V. 31. - № 47. - P. 17074-17090.
468. Xu J. Synaptotagmin-1 functions as a Ca<sup>2+</sup> sensor for spontaneous release / J. Xu, Z. P. Pang, O. H. Shin, T. C. Südhof // *Nat Neurosci*. – 2009. – Vol. 12. – P. 759-766.
469. Xu L. Ruthenium red modifies the cardiac and skeletal muscle Ca<sup>2+</sup> release channels (ryanodine receptors) by multiple mechanisms. / L. Xu, A. Tripathy, D. A. Pasek, G. Meissner // *J Biol Chem* – 1999. – Vol. 274. – P. 32680–32691.
470. Yamada H, Stabilization of actin bundles by a dynamin 1/cortactin ring complex is necessary for growth cone filopodia / H. Yamada, T. Abe, A. Satoh, N. Okazaki, S. Tago, K. Kobayashi, Y. Yoshida, Y. Oda, M. Watanabe, K. Tomizawa, H. Matsui, K. Takei // *J Neurosci*. – 2013. – Vol. 33. - №10. – P. 4514-4526.

471. Yang B. Lipid rafts mediate H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pro-survival effects in cultured endothelial cells. / B. Yang, T. N. Oo, V. Rizzo // *Faseb J.* – 2006. – Vol. 20. – P. 1501–1503.
472. Yao P. J. Heterogeneity of endocytic proteins: distribution of clathrin adaptor proteins in neurons and glia / P. J. Yao, P. Zhang, M. P. Mattson, K. Furukawa // *Neuroscience.* – 2003. – Vol. 121. – P. 25-37.
473. Young J. C. More than folding: localized functions of cytosolic chaperones / J. C. Young, J. M. Barral, U. Hartl // *TRENDS Biochem. Sci.* – 2003. – Vol. 28, № 10. – P. 541-547.
474. Yue H.Y. Cholesterol regulates multiple forms of vesicle endocytosis at a mammalian central synapse / H.Y. Yue, J. Xu // *J Neurochem.* – 2015. – Vol. 134. - №2. – P. 247-260.
475. Zamir O. Cholesterol and synaptic transmitter release at crayfish neuromuscular junctions / O. Zamir, M.P. Charlton // *J. Physiol.* – 2006. – Vol. 571. P. 83-99.
476. Zanazzi G. The molecular architecture of ribbon presynaptic terminals / G. Zanazzi, G. Matthews // *Mol Neurobiol.* – 2009. – Vol. 39. – P. 130-148.
477. Zefirov A. Localization of active zones / A. Zefirov, T. Benish, N. Fatkullin, S. Cheranov, R. Khazipov // *Nature.* – 1995. – Vol. 376. – № 6539. – P. 393-394.
478. Zefirov A. L. The role of intra & extracellular calcium in recycling of synaptic vesicle at frog motor nerve endings / A. L. Zefirov, M. M. Abdrakhmanov, M. A. Mukhamedyarov, P. N. Grigoryev // *Neurosci.* – 2006. – Vol. 143. – P. 905-910.
479. Zemkova H. The effects of nerve terminal activity on non-quantal release of acetylcholine at the mouse neuromuscular junction. / H. Zemkova, F. Vyskočil, C. Edwards // *J Physiol (Lond).* – 1990. – Vol. 423. – P. 631-640.
480. Zhai R. G. The Architecture of the Active Zone in Preynaptic Nerve Terminal / R. G. Zhai, H. J. Bellen // *J. Physiology.* – 2004. – Vol. 19. – P. 262-270.
481. Zhu Y. Two pathway of synaptic vesicle retrieved revealed by single-vesicle imaging / Y. Zhu, Y. Li, R. W. Tsien // *Neuron.* – 2009. – Vol. 61. – P. 397-411.
482. Zidovetzki R. Use of cyclodextrins to manipulate plasma membrane cholesterol content: evidence, misconceptions and control strategies / R. Zidovetzki, I. Levitan // *Biochim Biophys Acta.* – 2007. – Vol. 1768. - № 6. – P. 1311-1324.
483. Zitman F. M. P. Total ganglioside ablation at mouse motor nerve terminals after neurotransmitter release level / F. M. P. Zitman, B. Todorov, K. Furukawa, H. J. Willison, J. J. Plomp // *Synapse.* – 2010. – Vol. 64. – P. 335-338.