There

Петров Алексей Михайлович

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

03.01.02 - биофизика

03.03.01 - физиология

Автореферат на соискание ученой степени доктора биологических наук Работа выполнена на кафедре нормальной физиологии Государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Казанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный консультант: **Зефиров Андрей Львович**, доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент РАН, заведующий кафедрой нормальной физиологии ГБОУ ВПО Казанский государственный медицинский университет Минздрава России

Официальные оппоненты:

Магазаник Лев Гиршевич, доктор биологических наук, профессор, член-корреспондент РАН, главный научный сотрудник Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, лаборатория биофизики синаптических процессов, г. Санкт-Петербург

Шаронова Ирина Николаевна, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории функциональной синаптологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научный центр неврологии», г. Москва

Никитин Владимир Павлович, доктор медицинских наук, главный научный сотрудник лаборатории функциональной нейрохимии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт нормальной физиологии им. П.К. Анохина», г. Москва

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», г. Москва

Защита состоится «15» июня 2016 г. в 11 часов на заседании диссертационного совета Д002.005.01 при Казанском институте биохимии и биофизики КазНЦ РАН по адресу: 420111 г. Казань, ул. Лобачевского, д. 2/31, а/я 30, тел/факс.: (843)2927347, e-mail: dissovet@kibb.knc.ru

С диссертацией можно ознакомиться в Центральной научной библиотеке Казанского научного центра РАН. Электронная версия автореферата размещена на официальном сайте КИББ КазНЦ РАН http://www.kibb.knc.ru

Автореферат разослан « » марта 2016г.

Ученый секретарь

диссертационного

совета, к.б.н.

Lonot

Пономарёва Анастасия Анатольевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования. Химическая синаптическая передача является одним из самых сложно регулируемых процессов, который основывается на освобождении медиатора в ходе экзоцитоза синаптических везикул (Магазаник и др., 2001; Балабан, 2007; Зефиров, Петров, 2010; Südhof, 2014). Для поддержания экзоцитоза необходимо образование новых везикул путем эндоцитоза, заполнение их медиатором и доставка к сайтам экзоцитоза (активным зонам, АЗ). Следовательно, при синаптической активности в нервных окончаниях протекает везикулярный экзо-эндоцитозный цикл (Betz et al., 1992; Зефиров, 2007). Везикулярный цикл точно скоординирован в пространстве, а изменения отдельных его этапов задействовано в контроле эффективности нейропередачи (Zefirov et al., 1995; Südhof, 2004; Rohrbough, Broadie, 2005; Зефиров, Петров, 2010). Особым вариантом везикулярного цикла, существование которого в естественных условиях ставится под сомнение, является образование между везикулой и АЗ поры, которая закрывается вскоре после освобождения медиатора (путь «kiss-and-run» / «поцеловал-и-убежал») (Зефиров и др. 2004; Alabi, Tsien, 2013; Watanabe et al., 2013). Синаптические везикулы функционально неоднородны: некоторые (1-2%) прикреплены к АЗ и способны молниеносно освобождать медиатор; другие (10-20%, рециклирующий пул) быстро доставляются в АЗ и могут многократно подвергаться экзо-эндоцитозным циклам, поддерживая нейропередачу длительное время при умеренной активности; третьи (80-90%, резервный пул) «неохотно» участвуют в экзоцитозе только в условиях сильной стимуляции (Зефиров, 2007; Захаров и др. 2012; Rizzoli, Betz, 2005). Включение того или иного везикулярного пула в процесс освобождения медиатора является важным механизмом обеспечения синаптической пластичности (Neher, 2015; Fowler, Staras, 2015).

Помимо вызванного потенциалами действия (ПД) экзоцитоза существует спонтанный экзоцитоз, который, по-видимому, имеет специфичные пути регуляции (Kaeser, Regehr, 2014; Truckenbrodt, Rizzoli, 2014). Секреция медиатора может осуществляться и невезикулярным путем при участии белковой транспортной системы (Katz, Miledi, 1977; Nikolsky et al., 1991, 1994). Спонтанное и невезикулярное освобождение медиатора модулируют вызванный экзоцитоз, влияют на чувствительность постсинаптических рецепторов и формирование синапсов (Vyskocil et al., 2009; Kaeser, Regehr, 2014).

В ходе везикулярного цикла происходят радикальные изменения геометрии мембраны, для осуществления которых потенциально требуется холестерин. Кроме того,

многие белки, вовлеченные в экзо-эндоцитоз, перенос молекул нейромедиатора и сигнализацию, напрямую могут связываться с холестерином или локализоваться в обогащенных холестерином микродоменах – рафтах или липидных плотиках (Зефиров, Петров, 2010б, 2013; Puchkov, Haucke, 2013; Segatto et al., 2014). Поэтому изменение уровня холестерина в мембране может существенно и всеобъемлюще изменять функционирование синаптического аппарата. Исследования в данной области имеют не только фундаментальное значение для понимания механизмов синаптической коммуникации, но и потенциальный практико-ориентированный аспект, поскольку снижение содержания холестерина в синаптических мембранах происходит в результате увеличения нейрональной активности, в ходе старения и при многих нейродегенеративных заболеваниях (Sodero et al., 2011, 2012; Martin et al., 2014). Одним из главных механизмов уменьшения уровня холестерина является его окисление, в результате образуются оксистеролы, способные покидать мембраны и обладающие высокой биологической активностью. Следует отметить, что концентрации различных оксистеролов часто претерпевают значительные изменения при сменах режима синаптической активности и старении, что может влиять на выживаемость нейронов (Leoni, Caccia, 2011; Sodero et al., 2012; Björkhem, 2013; Hughes et al., 2013; 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-β-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 экзоэндоцитоз 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 (5α-холестан-Зона) 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 5α-холестан-Зона 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 нейропередачу, 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 расшифрован НАДФН-оксидаза / активные формы кислорода (АФК) / TRPV-каналы / ${\rm Ca}^{2^+}$ / 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 ${\rm Ca}^{2+}$ / фосфолипаза ${\rm C}$ -независимой активности протеинкиназы ${\rm C}$.

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, 5α-холестан-3она, который в наномолярной концентрации, не затрагивая спонтанную секрецию, угнетал
вызванный экзоцитоз, уменьшал популяцию синаптических везикул, активно вовлекаемых в
нейропередачу, 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-холестен-3-он) и 5α-холестан-3-она на свойства синаптических мембран и везикулярные указывают возможную роль оксистеролов процессы на 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, протеикиназы 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 изобилии 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 C независимой активности протеинкиназы C.

- 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, 5α-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 выполнение ряда экспериментов оказывали соавторы статей, сотрудники Казанского государственного медицинского университета (Зефиров 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 XXI и XXII съездах физиологического общества им. И.П. Павлова (Калуга, 2010 и Волгоград, 2013), международной конференции «Рецепторы и внутриклеточная сигнализация» (Пущино, 2011), III и IV съездах физиологов СНГ, (Ялта, 2011 и Сочи-VII Дагомыс, 2014), Сибирском физиологическом съезде (Красноярск, 2012), международном конгрессе «Нейронаука для медицины и психологии» (Судак, 2012), IV съезде биофизиков России (Нижний Новгород, 2012), Federation of European biochemical societies congress (St. Petersburg, 2013), международном симпозиуме «Biological mobility: new facts and hypotheses» (Пущино, 2014), IV международной конференции «Современные проблемы системной регуляции физиологических функций» (Москва, 2015) и др.

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.

ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты выполнены на нервно-мышечных препаратах лягушек (Rana ridibunda, кожно-грудинная мышца), диафрагмальных мышцах лабораторных мышей и крыс. Исследование проведено с соблюдением правил по использованию лабораторных животных. В работе использовали электрофизиологические и оптические методики. С помощью двухмикроэлектродной фиксации потенциала мембраны мышечных волокон записывали токи концевой пластинки (ТКП) и миниатюрные ТКП (МТКП). С помощью одномикроэлектродного внутриклеточного отведения оценивали миниатюрные потенциалы концевой пластинки (МПКП) и Н-эффект. Для слежения за везикулярными процессами использовали FM-красители (FM1-43, FM2-10, FM4-64), которые обратимо взаимодействуют с поверхностными мембранами и захватываются в синаптические везикулы («загрузка») в ходе эндоцитоза, вызванного 20Гц стимуляцией. Стимуляция экзоцитоза приводит к выделению из нервного окончания FM-красителей вместе с медиатором в синаптическую щель, при этом флуоресценция падает («выгрузка»). В работе использовали индикаторы, позволяющие следить за цитозольным Ca²⁺ (Fluo4-AM), вне- и внутриклеточными уровнями АФК (Amplex Red Hydrogen Peroxide Kit, H2DCFDA), перекисным окислением липидов (Image-iT Lipid peroxidation sensor), внеклеточным содержанием ацетилхолина (AmplexRed Acetylcholine assay kit), цитозольным рН (BCEFCF-AM). Для выявления холестерина, скоплений ганглиозидов GM1, оценки свойств мембран применялись филипин III, флуоресцентно-меченные субъединицы В холерного токсина, 22-NBD-холестерин, соответственно. Иммунофлуоресценцию использовали ДЛЯ анализа распределения синаптических белков. Статистическая обработка данных осуществлялась с использованием программных пакетов Origin Pro, GraphPad InStat и SAS 9.1. Данные представлены в виде среднего значения \pm стандартная ошибка, n - количество независимых экспериментов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Холестерин и липидные плотики в нервно-мышечных синапсах. Маркирование фиксированных нервно-мышечных препаратов лягушки (n=10) и мыши (n=10) с помощью антибиотика филипина III, необратимо связывающегося 1 к 1 с холестерином, показало (рис. 1A, Б), что флуоресценция в синаптических регионах примерно на 40% выше (p<0.01), чем в мембранах мышечных волокон. Это указывает на высокое содержание холестерина в синаптических мембранах, где он может формировать рафты. Используя меченную

флуоресцентной группой субъединицу В холерного (XT-B), токсина которая преимущественно связывается со скоплениями ганглиозидов GM1 в рафтах (Margheri, et al., 2014), удалось обнаружить рафты в интактных поверхностных синаптических мембранах (рис. 1Ba, Г). Флуоресценция синаптических регионов была на 45±4% и 60±3% выше (p<0.05) свечения мышечных волокон у лягушки (n=5) и мыши (n=5), соответственно. Для выявления рафтов в мембранах синаптических везикул в период экспозиции с ХТ-В нерв препарата стимулировали (3 мин 20 Гц), провоцируя массивный экзоцитоз, который ведет к обнажению везикулярной мембраны (на несколько минут, Petrov et al., 2008) внеклеточной среде до момента эндоцитоза. При этом в нервных окончаниях появлялись пятна (рис. 1Вб), флуоресценция которых была на 60-80% выше (p<0.01; лягушка n=8, мышь n=8), чем в поверхностных синаптических мембранах (рис. 1Г). Это указывает на изобилие скоплений ганглиозидов GM1 в мембранах синаптических везикул, которые захватились в нервное окончание эндоцитозом. Интересно отметить, что при стимуляции экзо-эндоцитоза в синапсах, с меченными ХТ-В поверхностными мембранами, формирования пятен ХТ-В не происходило. Возможно, рафты пресинаптической мембраны слабо захватываются эндоцитозом, поскольку не смешиваются с рафтами синаптических везикул.

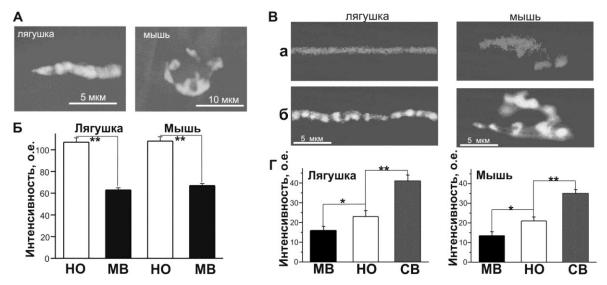


Рис. 1. Окраска филипином III (A, Б) и XT-В (B, Γ) нервно-мышечных синапсов лягушки и мыши. Б, Γ - флуоресценция (в о.е.) в регионе нервного окончания — НО, в экстрасинаптической мышечной (MB) и везикулярной (CB) мембранах. В - маркирование XT-В поверхностных мембран (а) и мембран синаптических везикул (б).

Двойное окрашивание XT-B и FM1-43 показало (рис. 2A, B), что в областях скоплений синаптических везикул (метились FM1-43 перед окраской XT-B), где интенсивно

протекают экзо- и эндоцитоз (Betz, Bewick, 1993), сосредотачивается флуоресценция маркера рафтов (XT-B). Если апплицировать XT-B и FM1-43 одновременно и стимулировать (3 мин, 20 Гц) препарат, то в нервных окончаниях появлялись пятна флуоресценции XT-B и FM1-43, которые совпадали (рис. 2Б, Г). Следовательно, большая часть мембран рециклирующих синаптических везикул состоит из обогащенных ганглиозидом GM1 участков (рафтов).

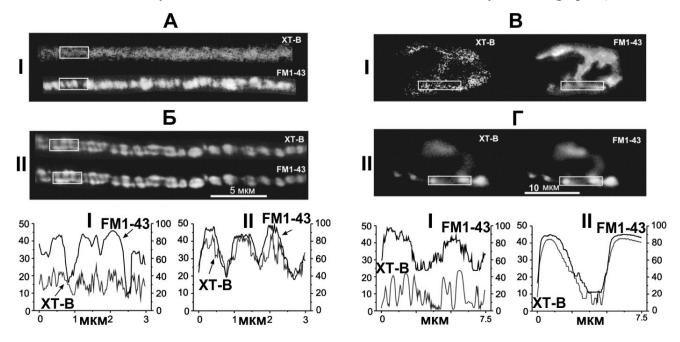


Рис. 2. Двойное окрашивание нервно-мышечных препаратов лягушки (A, Б) и мыши (B, Г) XT-В и FM1-43. Показано маркирование XT-В поверхностных (A, В) и везикулярных (Б, Г) мембран; мышечный фон вычтен. FM1-43 метились скопления синаптических везикул. І и ІІ – профили флуоресценции (в о.е.) XT-В (левая Y-ось) и FM1-43 (правя Y-ось) в выделенных прямоугольниками сегментах на А/В и Б/Г, соответственно.

Удаление холестерина с помощью МЦД 1 мМ / 10 мМ снижало содержание холестерина (судя по флуоресценции филипина) на ~ 20% / 50% в синаптических регионах (лягушка, n=8 / 5; мышь, n=12 / 5), а флуоресценцию ХТ-В - на 10-20% / 40-50% (лягушка, n=5 / 5; мышь, n= 5 / 5). После 10 мМ МЦД уровень холестерина и свечение ХТ-В полностью восстанавливались, если инкубировать препарат с 5 мМ комплексованного с МЦД холестерина (лягушка, n=5; мышь, n=5). Сам по себе комплекс МЦД-холестерин на ~ 10-20% повышал флуоресценцию филипина (лягушка, n=5; мышь, n=5) и ХТ-В (лягушка, n=6; мышь, n=6). Эти данные указывают на снижение стабильности липидных рафтов в синаптических мембранах при частичном удалении холестерина и на обратимый характер этого эффекта при восстановлении уровня холестерина.

Роль холестерина в вызванном экзоцитозе синаптических везикул и их рециклировании в нервно-мышечном синапсе лягушки. В экспериментах, приведенных в этом разделе, использовали 1мМ МЦД. МЦД не изменял (р>0.05, n=5) амплитуду и частоту МТКП, но уменьшал до 75 ± 3% (n=5, p<0.01) амплитуду ТКП в ответ на одиночные стимулы (0.05 Гц). Удаление МЦД из раствора не приводило к восстановлению амплитуды ТКП (рис. 3A). Однако добавление комплекса МЦД-холестерин восстанавливало амплитуду ТКП (98±4%, n=5, p>0.05; рис. 3A, МЦД-Хол). Эти данные свидетельствует об угнетении вызванной секреции при снижении холестерина в плазматической мембране. Схожая ситуация нами была обнаружена в нервно-мышечном синапсе мыши, где в условиях сниженной [Са²⁺]₀ 1мМ МЦД снижал квантовый состав ПКП (Тараканова и др. 2011).

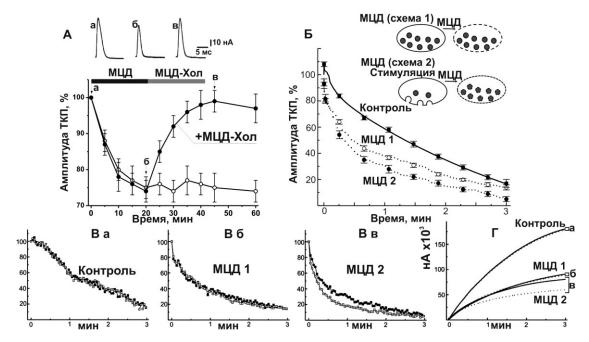


Рис. 3. Эффект 1мМ МЦД на амплитуду ТКП при низко- (А) и высокочастотном (Б-Г) раздражении. А, сверху - ТКП в моменты а, б, в (указаны стрелками). Линиями показаны аппликации МЦД и МЦД-холестерина. Б - в течение инкубации с МЦД препарат пребывал в покое (с последующей перфузией раствором Рингера без МЦД и затем стимулировался, схема 1) или стимулировался (схема 2). Во время 20Гц-стимуляции регистрировались ТКП. Прерывистой линией обозначены мембраны, из которых удаляется холестерин. В - динамика амплитуд ТКП (отдельные эксперименты) при 1-ом и 2-ом эпизодах стимуляции - черные и светлые квадратики. В случае «МЦД 2» во время 1-ой стимуляции МЦД присутствовал в растворе. Оси Y- в % (от исходного уровня до аппликации МЦД (А) или 20Гц стимуляции (Б, В)). Г, кумулятивная кривая ТКП (в нА) во время двух серий раздражения 3 мин 20 Гц. Сплошная линия соответствует 1-ой серии раздражения, пунктирная — 2-ой.

После удаления холестерина из поверхностных мембран (схема 1 / «МЦД 1», рис. 3Б, Вб) высокочастотная (20 Гц) стимуляция вызывала более быстрое снижение амплитуды ТКП (n=5), в результате кумулятивная амплитуда ТКП (указывает на суммарное количество освобожденного медиатора, рис. 3Гб) к 3 мин стимуляции была почти в 2 раза меньше (p<0.001). Если на фоне экспозиции в МЦД производить 20Гц стимуляцию, то холестерин должен удаляться и из мембран экзоцитирующих везикул (схема 2 / «МЦД 2», рис. 3Б, Вв). При этом депрессия амплитуды ТКП была еще более глубокой (p<0.01, n=5).

В контроле 2-ой эпизод стимуляции (3 мин, 20 Γ ц, n=6), следующий через 30 мин после 1-го, не изменял динамику снижения амплитуды ТКП (рис. 3Ва), поэтому кумулятивная амплитуда ТКП в ответ на 1-ую и 2-ую серии раздражений была одинаковой (рис. 3 Γ a). После обработки МЦД (схема 1) две стимуляции также вызывали идентичную депрессию амплитуды ТКП (рис. 3Вб, Γ б). Если МЦД присутствовал во время 1-ой стимуляции (и еще 10 мин после) (схема 2), то в течение 2-го эпизода активности угнетение амплитуды ТКП происходило быстрее, чем при 1-ом эпизоде (рис. 3Вв). В итоге, суммарная амплитуда ТКП во время 2-ой серии раздражений была на ~25% меньше (р<0.01), чем во время 1-ой (рис. 3 Γ в). После прекращения 2-ой 20 Γ ц стимуляции восстановление амплитуды ТКП происходило одинаково в контроле ($t_{1/2}$ - 27 ±7 с) и при удалении холестерина из поверхностных мембран ($t_{1/2}$ - 28 ±6 c, p>0.05), а при вымывании холестерина и из мембран везикул восстановление нарушалось ($t_{1/2}$ - 50 ±5 c, p<0.01).

Итак, удаление холестерина из плазматической мембраны вызывает усиление депрессии секреции в процессе высокочастотной активности, а количество медиатора, освобождаемого на 2-ую серию раздражений, не меняется. Одновременное удаление холестерина и из мембран везикул усиливает выраженность депрессии на 2-ую серию раздражений и нарушает восстановление секреции после высокочастотного раздражения.

Эксперименты с исследованием эндо- и экзоцитоза синаптических везикул были спланированы таким образом, чтобы разобщить во времени аппликации МЦД и маркера FM1-43, поскольку МЦД может выступать в роли агента, облегчающего диссоциацию FM1-43 от мембраны (Dason et al., 2010; Petrov et al., 2014). Загрузку FM1-43 производили в ответ на 2-ой эпизод стимуляции (3 мин 20Гц) (рис. 4A). Предварительная обработка МЦД (схема 1) снижает флуоресценцию FM1-43 на \sim 50% (p<0.001, n=9), морфология пятен в этом случае не изменяется (рис. 4). Если МЦД присутствует во время 1-го эпизода стимуляции (схема 2), то флуоресценция снижается на \sim 90% (p<0.001, n=9), увеличивается диаметр терминалей (с

 1.3 ± 0.2 до 1.8 ± 0.2 мкм, p<0.05) и изменяется расположение пятен (рис. 4). Эти данные говорят об уменьшении эндоцитоза везикул при удалении части холестерина поверхностных мембран, а также о нарушении эндоцитоза при экстракции везикулярного холестерина.

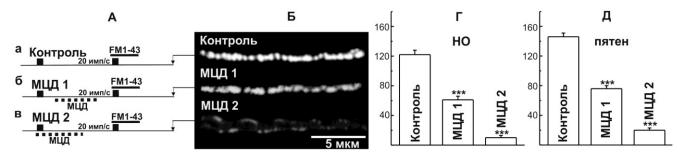


Рис. 4. Влияние МЦД на загрузку красителя FM1-43. А – схемы экспериментов: показаны эпизоды стимуляции (темные прямоугольники сверху), аппликации FM1-43 и МЦД. Б – участки нервных терминалей, загруженных FM1-43, исходя из схем на А. Г и Д – флуоресценции (в о.е.) в контуре нервных окончаний и в отдельных пятнах, соответственно.

Обработка МЦД поверхностных мембран (рис. 5Аб, Бб) заметно замедляла (особенно вначале) выгрузку FM1-43 из синаптических везикул (n=9, p<0.05). Еще большее угнетение выгрузки (на всем протяжении раздражения) происходило (n=9, p<0.01), если во время предшествующей аппликации МЦД производилась стимуляция (рис. 5Ав, Бв). Если производить сначала загрузку FM1-43, потом воздействовать МЦД и производить выгрузку, то динамика снижения флуоресценции будет все также медленнее, чем в контроле (рис. 5, Аг, Бг). Следовательно, то обстоятельство, что предварительная обработка препаратов МЦД снижает последующую загрузку FM1-43, не может быть причиной замедления выгрузки.

Отставание темпа выгрузки FM1-43 от секреции медиатора происходит вследствие повторного участия везикул, уже освободивших краситель, в секреции медиатора. Сравнивая кумулятивную кривую ТКП и перевернутые кривые выгрузки FM1-43 (рис. 5В), можно оценить время (t_r) рециклирования везикул (Betz, Bewick, 1993; Petrov et al., 2008; Захаров и др. 2012). Обработка плазматических мембран МЦД (МЦД 1) не изменяет t_r (50-60c, p>0.05), а удаление холестерина из мембран синаптических везикул (МЦД 2) нарушает рециклирование (t_r > 180 c, p<0.001).

Таким образом, холестерин плазматических мембран, не изменяя времени рециклирования везикул, способствует эффективному протеканию экзоцитоза и вовлечению большего количества синаптических везикул в нейропередачу, тогда как везикулярный холестерин необходим для образования везикул путем эндоцитоза и их рециклирования, что

требуется для поддержания размера популяции везикул в ходе активности. Четкое разделение эффектов удаления мембранного и везикулярного холестерина указывает на автономность (несмешиваемость) двух пулов холестерина.

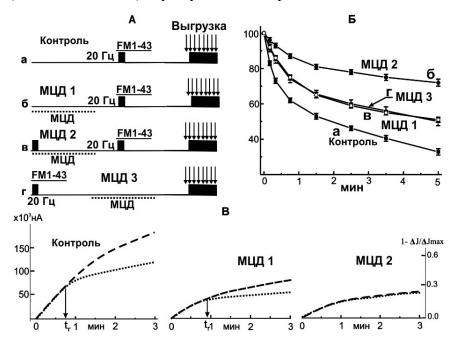


Рис. 5. Влияние МЦД на выгрузку маркера FM 1-43 (A, Б) и оценка времени рециклирования (t_r на B). А – схемы экспериментов: 20 Гц стимуляция – прямоугольники, стрелки - регистрация флуоресценции в ходе стимуляции. Б – кривые спада флуоресценции (в % от исходного уровня) во время стимуляции. В – прерывистые линии – кумулятивные кривые амплитуд ТКП из рис. 3Г. Пунктирные линии – перевернутые масштабированные кривые выгрузки из Б. Левая Y-ось – суммарная амплитуда ТКП (в нА), правая Y-ось – уменьшение относительной флуоресценции ($1-\Delta J/\Delta J_{max}$).

Холестерин в контроле спонтанного экзоцитоза в нервно-мышечном синапсе лягушки: АФК-зависимый механизм. Истощение мембранного холестерина 10-15 мМ МЦД резко усиливает спонтанное освобождение нейромедиатора в нервно-мышечных и центральных синапсах (Zamir, Charlton, 2006; Wasser , Kavalali, 2009; Тараканов и др. 2011; Теіхеіга et al., 2012). Механизм этого усиления не понятен. В экспериментах мы использовали 10 мМ МЦД, который к 10 мин аппликации увеличивал частоту МПКП с 1.6±0.2 с⁻¹ до 58.3±2.0 с⁻¹ (n=6, p<0.001). Применение комплекса МЦД-холестерин (n=6) после аппликации МЦД способствовало быстрому снижению частоты МПКП до исходного уровня в течение 7-8 мин. Добавление 10 мМ МЦД вызывало выгрузку FМ1-43 (р<0.001, n=8). Для предварительной загрузки FМ1-43 использовалась стимуляция 3 мин 20 Гц.

поэтому выгрузка FM1-43, связанная с действием МЦД, свидетельствует о вовлечении в спонтанный экзоцитоз тех же везикул, что и в вызванный ПД экзоцитоз.

Удаление холестерина может вызывать разнонаправленные изменения продукции АФК в различных клетках (Han et al., 2008; Odnoshivkina et al., 2015). Окраска с помощью маркера H₂DCF показала увеличение внутриклеточного уровня АФК в синаптическом регионе (p<0.001, n=8) под влиянием МЦД (рис. 6A, Б), которое устранялось ингибитором НАДФН-оксидазы апоцинином (200 мкМ, n=8) и антиоксидантом N-ацетил-L-цистеином (NAC, 200 мкМ, n=8). Активация НАДФН-оксидазы может сопровождаться увеличением внеклеточного уровня H₂O₂, который затем проникает в клетку (Miller et al., 2010).

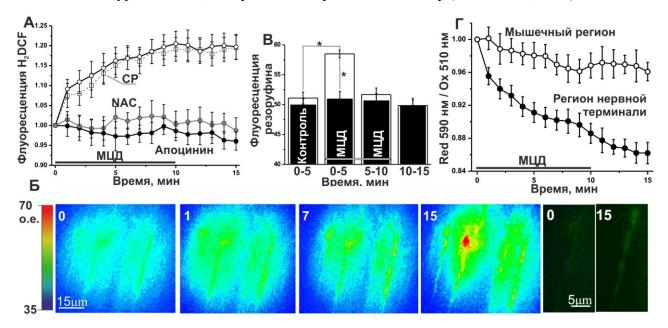


Рис. 6. Внутри- (A, Б) и внеклеточное (B) образование АФК, перекисное окисление липидов (Γ) усиливаются 10 мМ МЦД. А – нормированная флуоресценция H_2DCF в синаптическом регионе под воздействием МЦД в одиночку (белые кружки) и на фоне антагонистов АФК (NAC, апоцинина), или блокатора TRPV1 каналов (капсазепина, CP). Б - флуоресценция H_2DCF (в псевдоцвете) в моменты 0, 1, 7, 15 мин от добавления МЦД. Справа - увеличенные участки изображений «0» и «15». В – флуоресценция резоруфина (показатель $[H_2O_2]_0$, образованного за 5 мин). Светлые столбики - флуоресценция до (с 0 по 5 мин), в течение (с 0 по 5, с 5 по 10) и после воздействия (с 10 по 15 мин) МЦД; темные столбики — на фоне апоцинина. Γ — детекция перекисного окисления липидов в синаптическом и мышечном регионах с использованием Image-iT-Lipid-peroxidation маркера. По оси Y, нормированное отношение красной и зеленой флуоресценции Image-iT сенсора (исходное отношение взято за 1.0).

Используя реакцию превращения реагента AmplexRed (при окислении эндогенным H_2O_2) во флуоресцирующий продукт резоруфин (рис. 6В), было обнаружено увеличение $[H_2O_2]_0$ в первые 5 мин аппликации МЦД (~ на 17%, p<0.05, n=6) , которое предотвращалось апоцинином (n=5). Вызванная МЦД продукция АФК вела к снижению соотношения флуоресценции 590 нм / 510 нм Image-iT-lipid-peroxidation маркера избирательно в синаптическом регионе (n=5, p<0.05), указывая на перекисное окисление липидов (рис. 6Г).

Аппликация антиоксиданта NAC (рис. 7A, Б), не влияя на частоту МПКП (n=6), резко ослабляла эффект МЦД на частоту МПКП (n=6, p<0.001) и выгрузку FM1-43 (p<0.01, n=8). Следовательно, вызванная МЦД продукция АФК стимулирует спонтанный экзоцитоз синаптических везикул и секрецию медиатора.

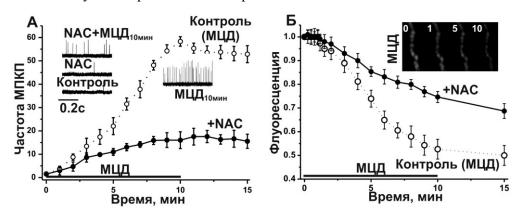


Рис. 7. Влияние антиоксиданта на эффекты МЦД на частоту МПКП (A, в c⁻¹) и выгрузку FM1-43 (Б). На вставке (А) - МПКП в контроле, через 40 мин перфузии с NAC и после 10 мин аппликации МЦД в присутствии NAC (NAC+МЦД_{10мин}) и без (МЦД_{10мин}). На вставке (Б) - участок терминали в разные моменты времени (мин) действия МЦД. Пунктирными линиями (на A и Б) показано контрольное действие МЦД.

Используя флуоресцентный Ca^{2+} -индикатор, Fluo4, в регионе нервной терминали нами было обнаружено увеличение цитозольного Ca^{2+} (р<0.01, n=8) при удалении мембранного холестерина (рис. 8A-B), которое блокировалось антиоксидантом (NAC, n=8), 2 мкМ рутения красного (ингибитор рианодиновых рецепторов и TRPV-каналов, n=8), 10 мкМ капсазепина (ингибитор TRPV1 каналов, n=6), но не 50 мкМ TMB8 (ингибитор рианодиновых и инозитол-трифосфатных рецепторов, n=6) или 10 мкМ нифедипина (ингибитор Ca^{2+} каналов L-типа). Если добавление капсазепина начиналось через 5 мин после аппликации МЦД, дальнейшее увеличение флуоресценции Fluo4 было предотвращено (n=6). Важно, что капсазепин (n=6) не устранял вызванного МЦД увеличения H_2DCF

флуоресценции (рис. 6A). Таким образом, под влиянием МЦД сначала увеличивается продукция АФК, что ведет к активации TRPV1-каналов и входу Ca^{2+} в цитозоль. Иммунофлуоресцентное мечение показало неравномерное распределение TRPV1-каналов в синаптическом регионе преимущественно между полосками никотиновых ацетилхолиновых рецепторов (нAxP), то есть в областях около активной зоны. Предобработка МЦД вела к расширению TRPV1-позитивных регионов (рис. 8 Γ).

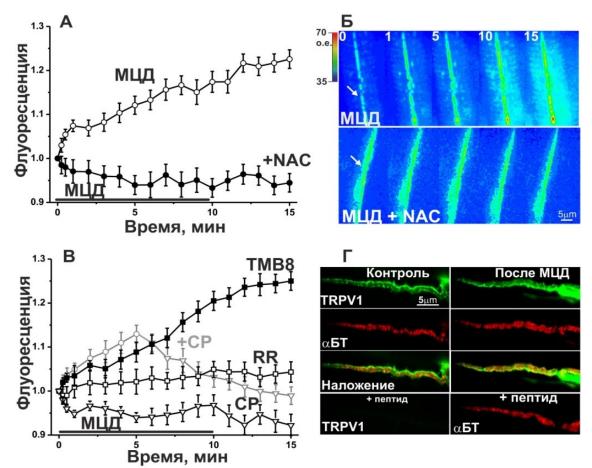


Рис. 8. Эффекты МЦД на цитоплазматический Ca^{2+} в регионе нервной терминали: зависимость от АФК и Ca^{2+} каналов. А, В – изменения нормированной флуоресценции Fluo4 под влиянием МЦД в одиночку (МЦД), на фоне антиоксиданта (+NAC) или ингибиторов Ca^{2+} каналов (ТМВ-8, рутения красного /RR, капсазепина/СР). Серой линией (+СР) обозначены эксперименты, в которых СР добавлялся через 5 мин после МЦД. Б – флуоресценция Fluo4 (в псевдоцвете) в моменты «0», «1», «5», «10», «15» мин от добавления МЦД в контроле (сверху) и на фоне NAC (снизу). Г, иммунолокализация TRPV1 каналов и нАхР, меченных α -бунгаротоксином (α -БТ), в контроле (слева) и после обработки МЦД (справа). Нижний ряд - изображения контрольных препаратов, меченных анти-TRPV1-антителами и α БТ (справа) в присутствии иммуногенного пептида.

Хелатирование Ca^{2+} 200 мкМ ВАРТА-АМ / ингибирование TRPV-каналов рутением красным или / каспазепином со схожей эффективностью уменьшали эффект МЦД (рис. 9А-В) на частоту МПКП (p<0.01, n=6 / 6 / 6) и выгрузку FM1-43 (p<0.01, n=6 / 6 / 6). Следовательно, опосредованное TRPV-каналами возрастание $[Ca^{2+}]_i$ вовлечено в усиление экзоцитоза при удалении холестерина.

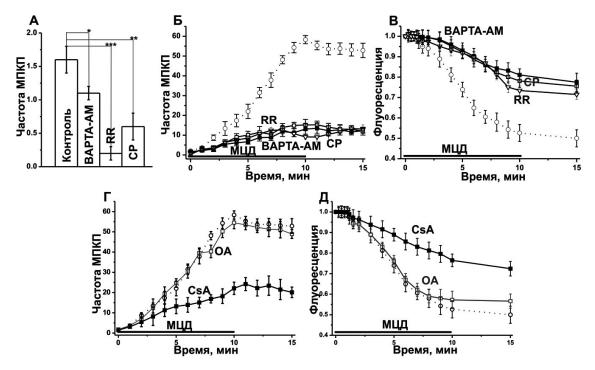


Рис. 9. Роль Ca^{2+} и фосфатаз в эффектах МЦД на частоту МПКП и выгрузку FM1-43. А – частота МПКП (c^{-1}) в контроле и после обработок ВАРТА-АМ, рутением красным (RR), капсазепином (CP). Изменение частоты МТКП (Б, Γ) и флуоресценции FM1-43 (В, Д) при воздействием МЦД в контроле (белые кружки) и на фоне ВАРТА-АМ, рутения красного, капсазепина (Б, В), или циклоспорина А /СsA, окадаиковой кислотой /ОА (Γ , Д).

Повышение $[Ca^{2+}]_i$, может активировать энзимы, вовлеченные в регуляцию экзо- и эндоцитоза синаптических везикул, например, фосфатазу PP2B - кальциневрин (Cheung, Cousin, 2013). Ингибирование кальциневрина 50 мкМ циклоспорина А снижало увеличение частоты МПКП (p<0.01, n=6) и выгрузку FM1-43 (p<0.01, n=8), вызванные МЦД (рис. 9Г, Д). Блокирование фосфатаз PP1 и PP2A 50 нМ окадаиковой кислоты (Guatimosim et al., 2002) не изменяло эффектов МЦД (n=6 / 6). Значит запускаемое МЦД повышение Ca^{2+} , активируя кальциневрин, способствует протеканию спонтанного экзоцитоза синаптических везикул.

Следует отметить, что обработка антиоксидантами, применение Ca²⁺-антагонистов и ингибитора кальциневрина значительно уменьшают эффекты МЦД, но не устраняют их.

Следовательно, наряду с обнаруженным путем НАДФН-оксидаза / $A\Phi K$ / TRPV-каналы / Ca^{2+} / кальциневрин, и другие механизмы могут вызывать усиление экзоцитоза.

Роль протеинкиназы С (ПКС) в экзоцитозе, связанном с удалением мембранного холестерина. Мишенями ПКС являются ключевые белки экзоцитоза (Leenders, Sheng, 2005), а ее активация или ингибирование может наблюдаться при удалении холестерина (Kabouridis et al., 2000; Lee et al., 2010). Ингибирование ПКС мембранопроникающим пептидом (75 мкМ Муг-RFARKGALRQKNV) / хелеритрин хлоридом (1 мкМ) значительно не изменяло эффектов МЦД (рис. 10А-Г) на частоту МПКП (n=7/7), однако предотвращало выгрузку FM1-43 из предварительно загруженных красителем нервных окончаний (р<0.001, n=7/7). Причем ингибирование ПКС не влияло на выгрузку FM1-43 в ответ на добавление деполяризующего раствора 40 мМ КСl (n=6) (рис. 10В).

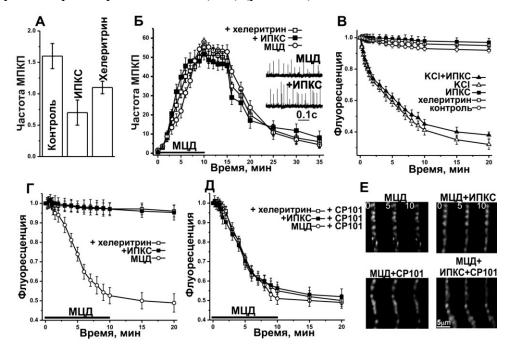


Рис. 10. Участие ПКС в эффектах МЦД. А – Частота МПКП (с⁻¹) в покое и после экспозиции с ингибиторами ПКС: хелеритрином и пептидным ингибитором (ИПКС). Б – Изменения частоты МПКП в ответ на аппликацию МЦД в одиночку и в условиях действия ингибиторов ПКС. На вставке - треки МПКП из экспериментов, представленных на Б для 5 мин обработки МЦД. В-Д - динамика флуоресценции FM1-43. В – в покое (контроль), в течение инкубации с ингибиторами ПКС, в ответ на 40 мМ КСІ (в контроле, и когда ПКС была блокирована / «КСІ+ИПКС»). Г – под действием МЦД в контроле и при блокаде ПКС. Д – то же, что и на Г, но в присутствии сульфородамин 101 (СР101). Е - изображения участков терминалей в 0, 5 и 10 мин в течение обработки МЦД в одиночку и при ингибировании ПКС пептидом. Нижние панели – в присутствие СР101.

Возможно, удаление холестерина при блокированной ПКС способствует освобождению медиатора через скоротечную пору слияния (kiss-and-run), непроницаемую для FM1-43. Это подтвердилось в опытах с сульфородамином 101 (СР101), который может проникать через поры и тушить флуоресценцию FM1-43 (Winterer et al., 2006). В присутствии СР101 во внеклеточном растворе снижение флуоресценции под влиянием МЦД происходило с одинаковой интенсивностью (Рис. 10Д, Е) в контроле (n=7) и при ингибировании ПКС пептидом / хелеритрином (p>0.05, n=7/7). Активация ПКС при удалении холестерина может зависеть от активности фосфолипазы С (ФЛС) (Sun, Alkon, 2012). Однако ингибирование ФЛС 100 мкМ компаунда 48/80 или 10 мкМ U-73122 не приводило к эффектам, наблюдаемым при ингибировании ПКС. U-73122 не изменял эффектов МЦД (p>0.05, n=7/7), а компаунд 48/80 пропорционально ослаблял влияние МЦД на частоту МПКП / выгрузку FM1-43 (p<0.01, n=7/7). Подобное действие компаунда 48/80 напоминает эффекты ингибитора кальциневрина и, вероятно, связано с блокированием компаундом кальмодулина, необходимого для активации кальциневрина. Таким образом, тип сопряженного с удалением холестерина экзоцитоза (полный / kiss and run) определяется $A\Phi K$, Ca^{2+} - и $\Phi Л C$ -независимой активацией ПКС, и удаление холестерина может вести к усилению kiss-and-run экзоцитоза, но одновременная активация ПКС переводит экзоцитоз в полный вариант.

Холестерин и невезикулярное освобождение нейромедиатора в нервномышечном синапсе крысы: связь с процессами экзо- и эндоцитоза. Холестерин удаляли 1 мМ МЦД. Поскольку процессы невезикулярного и везикулярного освобождения могут быть сопряжены, мы вначале проверили значение холестерина в процессах вызванного экзо- и эндоцитоза в нервно-мышечных синапсах крысы.

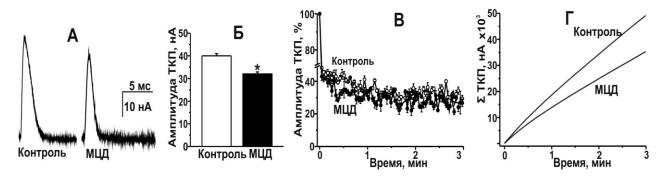
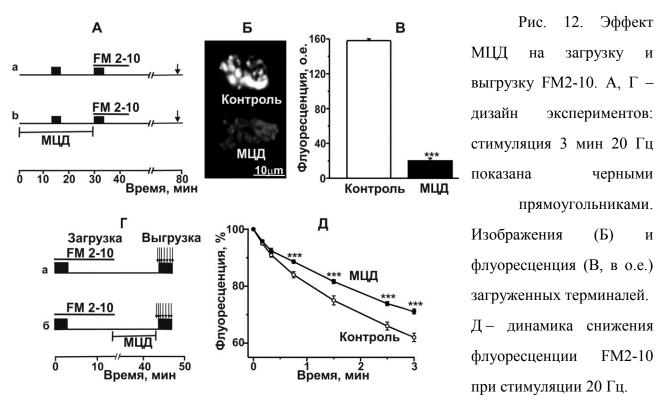


Рис.11. Эффект МЦД на амплитуду ТКП при низко- (A, Б) и высокочастотной стимуляции (B, Γ). Нативные ТКП (A), их амплитуда (Б) в контроле и после аппликации МЦД. В – Амплитуды ТКП (в %, показан каждый 70-й сигнал) в течение стимуляции (3 мин 20 Γ ц). Γ – Кумулятивные амплитуды ТКП из В.

МЦД снижал амплитуду ТКП до $80.0\pm2.8\%$ (n=5, p<0.05) (рис. 11A, Б), не влияя на амплитуду и частоту МТКП. В ходе стимуляции 3 мин 20 Гц в препаратах, обработанных МЦД, освобождалось на $\sim 27\%$ (n=6, p<0.01) меньше медиатора, судя по кумулятивным амплитудам ТКП (рис. 11B, Γ).

Обработка поверхностных мембран МЦД снижала загрузку FM2-10 на $\sim 20\%$ (n=6, p<0.01). Если же во время экспозиции МЦД производилась стимуляция (3 мин 20 Гц), то последующая загрузка 2-м эпизодом стимуляции была подавлена на $\sim 90\%$ (n=7, p<0.001) (рис. 12A-B). Под влиянием МЦД происходило замедление выгрузки FM2-10 (n=5, p<0.001), поэтому к 3 мин стимуляции освобождалось на 25% меньше красителя (рис. 12 Γ , Д).



Полученные данные хорошо согласуется с экспериментами на нервно-мышечном препарате лягушки и указывают на то, что удаление части холестерина из поверхностных мембран подавляет вовлечение везикул в экзоцитоз, а удаление части холестерина из везикулярных мембран (во время экспозиции с МЦД производится стимуляция) нарушает эндоцитоз. Важно отметить, что в случае действия 1мМ МЦД во время стимуляции степень снижения экзоцитоза существенно слабее, чем угнетения эндоцитоза.

Изменение Н-эффекта под действием МЦД в покое и при ритмической стимуляции двигательного нерва. Добавление МЦД, не изменяя мембранный потенциал покоя (n=4, p>0.05), почти в 2 раза увеличивало Н-эффект (рис. 13Aб/в, n=4/4, p<0.01), который является показателем невезикулярного освобождения ацетилхолина (Vyskocil et al.,

2009). Это предполагает усиление активности белков, обеспечивающих невезикулярное освобождение. Если подобные белки локализуются в везикулах, то угнетение эндоцитоза изза обработки МЦД может увеличить их экспрессию на пресинаптической мембране. Так, динамин-ингибирующий пептид (75 мкМ, Myr-QVPSRPNRAP), останавливающий клатринопосредованный эндоцитоз, более чем в 2 раза увеличивал H-эффект (n=4, P<0.001).



величина Н-эффекта: серые и черные столбики соответствуют действию 5 и 10 мкМ везамикола (на A), или 20 и 40 мМ пропионата (на B). Б – Эффект разных концентраций везамикола на Н-эффект. Г, Д - отношение эмиссии J505/450 BCECF (в % от исходного значения). Ошибки < 4% не видны. Начало стимуляции 20 Гц 3 мин показано стрелкой. Уменьшение отношения говорит о снижении внутриклеточного рН.

В контроле стимуляция с 20 Гц 3 мин снижала Н-эффект (n=5, P<0.05; рис. 13, Аг). Если же во время стимуляции присутствовал МЦД, нарушая эндоцитоз, то Н-эффект возрастал в 5 раз (n=4, P<0.001; рис. 13Ад). Вызванный стимуляцией компенсаторный

эндоцитоз может захватывать с поверхностной мембраны белки, опосредующие невезикулярное освобождение, тем самым, снижая невезикулярное освобождение. Тогда стимуляция экзоцитоза мембран везикул при блокированном эндоцитозе будет, наоборот, способствовать невезикулярному освобождению медиатора.

Ингибирование везикулярного транспортера ацетилхолина (ВТАх) 5 мкМ везамикола, не влияя на Н-эффект в контрольных мышцах (рис. 13Аа+v, n=4), предотвращало вызванное МЦД (в том числе сопряженное со стимуляцией) увеличение Н-эффекта (рис. 13А "б+v" / "в+v" / «д+v» - n=4/3/4, p<0.01). В больших концентрациях (6.5 / 8 / 10 мкМ) везамикол угнетал, вплоть до устранения, Н-эффект (n=3/3/3, p<0.05/0.01/0.001) в контрольных препаратах (рис. 13Аа, Б). В дополнение, везамикол 10 мкМ (д+v / б+v на рис. 13Б) устранял Н-эффект (n=4/4, p<0.001) в обработанных МЦД препаратах. Следовательно, усиление невезикулярного освобождения при удалении холестерина зависит от активности блокируемого везамиколом белка.

Применение ратиометрической метки ВСЕСF (рис. 13Г) позволило выявить снижение цитоплазматического рН (отношения J505/450) в синаптическом регионе под влиянием МЦД (n=7, p<0.001), которое существенно усиливалось стимуляцией (n=7, p<0.001; рис. 13Г, МЦД+стим) и ослаблялось 5 мкм везамикола (n=5, p<0.001; рис. 13Г, МЦД+v). Усиленный стимуляцией эффект МЦД на рН_i также угнетался везамиколом (n=5, p<0.001; рис. 13Г, МЦД+стим+v). Это согласуется с гипотезой о том, что транспортирующий Н⁺ в аскоплазму чувствительный к везамиколу белок, содержащийся в синаптических везикулах (вероятно, ВТАх), отвечает за усиление невезикулярного освобождения при действии МЦД. Везамикол не полностью устранял эффекты МЦД на рН_i, что указывает на вовлечение везамиколнезависимых систем в ацидификацию цитоплазмы.

Добавление пропионата натрия 20 и 40 мМ, приводящее к снижению [рН]_і (рис. 13Д) примерно на 0.05 и 0.09 единиц (n=5/5, p<0.001), снижало Н-эффект в покое (n=4/3, p<0.01) и предотвращало влияние на него МЦД (n=3/4, p<0.001; рис. 13В). Пропионат натрия (40 мМ) не влиял на амплитуду МПКП. Следовательно, закисление цитоплазмы подавляет увеличение невезикулярного освобождения, вызываемое удалением холестерина. Это согласуется с предположением, что невезикулярная секреция опосредуется ВТАх, активность которого падает при уменьшении внутриклеточного рН.

Измерение Н-эффекта - непрямой способ, сопряженный с ингибированием ацетилхолинэстеразы, поэтому мы выполнили эксперименты с оптической детекцией

ацетилхолина с помощью Amplex red acetylcholine assay kit (рис. 14). Оказалось, что в течение 60 мин инкубации из стимулированных (3 мин 20 Гц) и нет препаратов выделяется в итоге одинаковое количество ацетилхолина (n=6, p>0.05). Хотя во время стимуляции освобождается существенное количество медиатора, после ее завершения возрастание уровня ацетилхолина замедляется (n=4, p<0.001), по сравнению с нестимулированными препаратами (рис. 14A, Б).

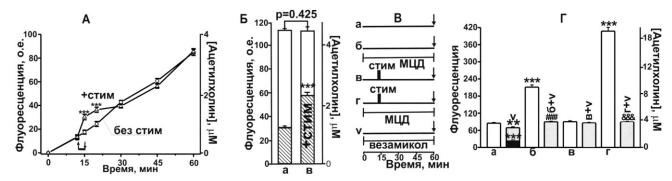


Рис. 14. Эффект стимуляции, МЦД и везамикола на внеклеточный ацетилхолин. В экспериментах измеряли флуоресценцию резоруфина в разные моменты времени (от 0 до 60 мин на A, и к 60 мин на Г) для оценки концентрации ацетилхолина в микрованночке. В – схемы экспериментов: стимуляция – черные прямоугольники (на в, г). На A эпизод стимуляции показан стрелками (соответствует схеме «в»). Б – флуоресценция, накопленная в первые 15 мин (этот период включает эпизод стимуляции в случае «в», заштрихованный сегмент) и последующие 45 мин (незаштрихованный сегмент) инкубации в ванночке. Г - 5 и 10 мкм везамикола - серые и черные столбики; статистическая значимость различий * - между «а» и остальными группами, ### - между б и б+v, &&& - между г и г+v.

Это согласуется с данными о снижении невезикулярного освобождения после стимуляции (Zemkova et al., 1990). Возможно, в ходе компенсаторного эндоцитоза из пресинаптической мембраны захватываются дополнительные молекулы BTAx, в итоге формируются синаптические везикулы, содержащие больше копий BTAx (Lima Rde et al., 2010).

МЦД (рис., 14Вб/г, Γ б/г) увеличивал уровень ацетилхолина (n=5, p<0.001) особенно сильно в сочетании со стимуляцией 3 мин 20 Γ ц (n=5, p<0.001). Везамикол 5 / 10 мкМ на \sim 18% / 69% уменьшал концентрацию ацетилхолина в покое (n=5/5, p<0,01; рис. 14Γ v). Везамикол 5 мкМ предотвращал увеличение ацетилхолина (рис. 14Γ б+v/г+v), вызванное МЦД в одиночку или совместно со стимуляцией (n=5/5). Эффекты везамикола на флуоресценцию ацетилхолина сопоставимы с ранее описанными измерениями H-эффекта.

Полученные результаты указывают на вовлечение ВТАх в механизм невезикулярного освобождения ацетилхолина и строгую зависимость этого варианта секреции от мембранного холестерина. С одной стороны, холестерин может угнетать невезикулярное освобождение, ингибируя ВТАх. С другой, — удаление небольшой части холестерина из мембран везикул, нарушая эндоцитоз, может вести к накоплению ВТАх в пресинаптической мембране. Увеличение уровня ВТАх в поверхностной мембране, совместно с увеличением его активности, увеличивает невезикулярного освобождения ацетилхолина, что сопровождается закислением внутриклеточной среды нервной терминали.

Влияние ферментативного окисления холестерина на везикулярный цикл в нервно-мышечных синапсах лягушки. Бактериальный фермент - холестерин оксидазу (1 ед. акт./мл, XO), катализирующую образование 4-холестен-3-она и H₂O₂ (в соотношении 1 : 1; Kreit, Sampson, 2009), апплицировали на 30 мин. В ходе этой аппликации образуется ~ 90-100 нМ H₂O₂ (n=5; определено с помощью Amplex red H₂O₂ assay kit, эндогенная продукция H₂O₂ предварительно оценена и вычтена, n=5), следовательно, окисляются эквивалентные количества холестерина. В пробирке с экзогенным холестерином (90 нМ) и XO измерение H₂O₂ дает близкие значения флуоресценции (n=4). ХО снижает окрашивание XT-В на ~25% (n=5, p<0.05) избирательно в синаптическом регионе. Таким образом, XO окисляет в нервномышечном препарате часть холестерина и, вероятно, снижает стабильность рафтов. В исследованиях на фибробластах также было показано снижение упорядоченности латеральной организации мембраны под влиянием XO (Neuvonen et al., 2014).

XO, не изменяя амплитуды и частоты МТКП (n=7, p>0.05), снижает амплитуду ТКП в ответ на единичные ПД на \sim 10% (n=7, p<0.05) и сильно подавляет секрецию при стимуляции 3 мин 20 Γ ц (кумулятивная амплитуда ТКП снижается на \sim 46%, n=7, p<0.001) (рис. 15).

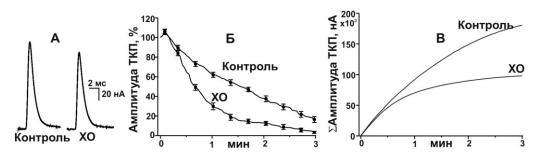
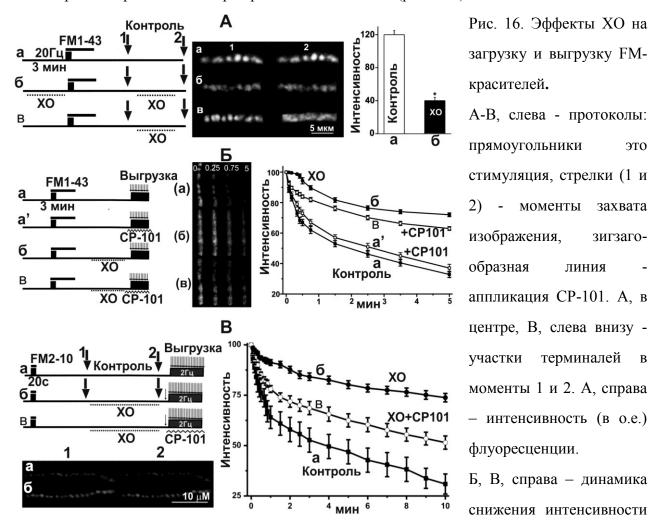


Рис. 15. Влияние XO на вызванную секрецию медиатора. А - ТКП при редком раздражении в контроле и после инкубации с XO. Б - амплитуды ТКП при стимуляции 3 мин 20 Гц (квадратиками показан каждый 360 сигнал). В — кумулятивные кривые амплитуд ТКП из Б, указывающие на существенное снижение секреции медиатора после воздействия XO.

Ранее было показано, что концентрации H_2O_2 до 300 нМ не изменяют освобождение нейромедиатора из моторных нервных терминалей лягушки (Giniatullin, Giniatullin, 2003), поэтому эффекты XO обусловлены окислением холестерина, а не H_2O_2 .

ХО снижает загрузку FM1-43 почти на 70% (n=6, p<0.001), не изменяя размер терминали, а также вызывает расширение (c 1.3 ± 0.15 до 3.1 ± 0.5 мкм, n=10, p<0.01) флуоресцирующих пятен в предварительно загруженных (стимуляцией 3 мин 20 Гц) нервных терминалях (рис. 16A). Эти данные свидетельствуют о сильном уменьшении захвата красителя эндоцитозом (частично является следствием ослабления экзоцитоза) и рассеивании кластеров синаптических везикул. ХО значительно замедляла выгрузку (рис. 16Б) особенно заметно в первые 20 с стимуляции, в итоге за 3 мин раздражения освобождалось на $\sim 60\%$ меньше FM1-43 (n=10, p<0.001). Следовательно, ХО сильно угнетает выделение FM1-43 экзоцитозом, особенно в стартовый период раздражения. Однако в этот период секреция медиатора протекает интенсивно (рис. 15Б).



флуоресценции (в %) при стимуляции 20 Гц (Б) или 2 Гц (В). Б, в центре - изображения участков терминалей в ходе стимуляции, сверху – указано время раздражения (в мин).

Вероятно, везикулы, освобождающие медиатор в это время, формируют скоротечную пору слияния, которая не пропускает FM1-43 (kiss-and-run), в итоге он не «выгружается» и не «загружается». В пользу этого также говорит более существенное угнетение загрузки FM1-43 (рис. 16A), по сравнению с ослаблением секреции медиатора (рис. 15B). Предположение о kiss-and-run подтвердили эксперименты с CP-101 (рис. 16Б), на фоне которого выгрузка FM1-43 в контроле не изменялась (n=7, p>0.05), но начальное замедление выгрузки, вызванное XO, исчезало (n=7, p<0.01).

В первые 20-30 с высокочастотной стимуляции в нейропередаче участвуют везикулы рециклирующего пула (Richards et al., 2000; Petrov et al., 2008), поэтому вероятно XO изменяет механизм экзоцитоза именно этих везикул. С использованием FM2-10 (быстрее диссоциирует от мембран, чем FM1-43, Richards et al., 2000) 20 с залпом 20 Гц-стимуляции загружался избирательно рециклирующий пул (рис. 16В). ХО практически устраняла загрузку этого пула (n=6, p<0.001). Если обрабатывать XO предварительно загруженные FM2-10 терминали, то расширения пятен не наблюдается (рис.16В), а выгрузка 2 Гц-стимуляцией, мобилизующая только везикулы рециклирующего пула, существенно подавляется (к 1 мин освобождается на ~80% меньше FM2-10, n=10, p<0.01). СР101 значительно ускоряет выгрузку FM2-10, нарушенную XO (n=8, p<0.01; рис. 16В).

Таким образом, окисление части холестерина дестабилизирует липидные плотики и вызывает существенные изменения в синаптической передаче. Угнетается экзоцитоз и мобилизация везикул резервного пула в сайты экзоцитоза, вероятно, вследствие нарушения их кластеризации. Везикулы рециклирующего пула начинают использовать kiss-and-run механизм освобождения медиатора.

Влияние оксистерола, 5*а*-холестан-3-она (5X3), на экзо-эндоцитозный цикл синаптических везикул в нервно-мышечном синапсе мыши. Накопление 5X3 в тканях и появление его в крови (у модельных мышей в концентрации 200 нМ) наблюдается в случае церебротендинального ксантоматоза, сопровождаемого серьезными неврологическими нарушениями и миопатией (Båvner et al., 2010; DeBarber, et al., 2011). Однако данных о биологической активности 5X3 нет. Мы применяли 20 мин инкубацию препаратов с 200 нМ 5X3. 5X3, не влияя на колокализацию свечения *а*БТ и XT-B, на ~ 42% (n=7, p<0.01) снижал флуоресценцию последнего (рис. 17A, Б). Добавление 5X3 увеличивало флуоресценцию 22-NBD-холестерина на ~ 25% (n=7, p<0.05), указывая на увеличение текучести синаптической

мембраны (рис. 17В, Г). Таким образом, 5Х3 способствует разрушению рафтов, однако иммунофлуоресцентное (n=5) мечение синтаксина 1 (пресинаптический SNARE-белок экзоцитоза) и синаптофизина (белок синаптических везикул) не выявило нарушений их распределения в двигательных нервных окончаниях (рис. 17Д).

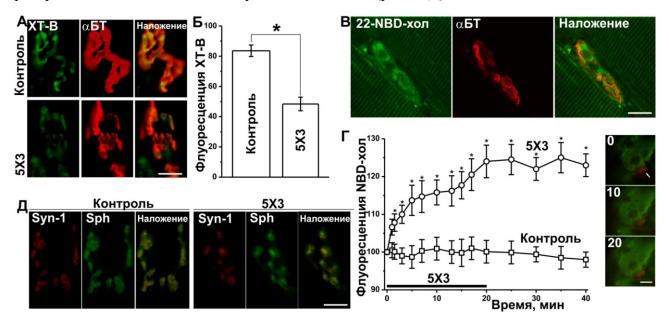


Рис. 17. Влияния 5X3 на синаптические мембраны. А – окрашивание XT-В (зеленый канал, XT-В), и а-бунгаротоксином (аБТ, красный) в контроле и после 5X3. Б – флуоресценция (в о.е.) XT-В в синаптическом регионе. В – окраска 22-NBD холестерином (зеленый) и аБТ (красный). Г - флуоресценция 22-NBD-холестерина (в %) в контроле и при добавлении 5X3. Справа, флуоресценция 22-NBD-холестерина в синаптическом регионе перед (0) и после 10 и 20 мин действия 5X3. Миелиновый сегмент окрашен красным FM4-64 (стрелка). Д – Иммунолокализация синтаксина 1 (Syn-1) и синаптофизина (Sph) в контроле (слева) и после 5X3 (справа). Шкала – 15 мкм (A, B, Д) и 5 мкм (Г).

5X3, не изменяя частоты и амплитуды МТКП (n=6, p>0.05; рис. 18A), необратимо снижал амплитуду ТКП до $70 \pm 5\%$ (n=5, p<0.05; рис. 18Б) и немного усиливал облегчение при парной стимуляции (на $\sim 8\%$ при межимпульсном интервале 20 мс, n=5, p<0.05; рис. 18В). Это указывает на уменьшение исходной вероятности вызванного освобождения после воздействия 5X3. 5X3 усиливал развитие депрессии амплитуды ТКП при стимуляции 20Γ ц (рис. 18Γ a), в итоге к 1/3 мин раздражения, судя по кумулятивной амплитуде ТКП (рис. 18Γ 6), освобождалось на $\sim 48/57\%$ меньше медиатора (p<0.01, n=6). В дополнение, 5X3

нарушал восстановление амплитуды ТКП (рис. 18Гв) после стимуляции 3 мин 20 Гц (n=5, p<0.01).

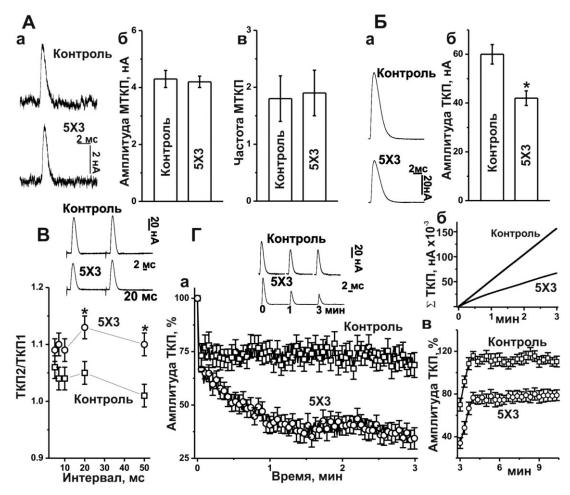
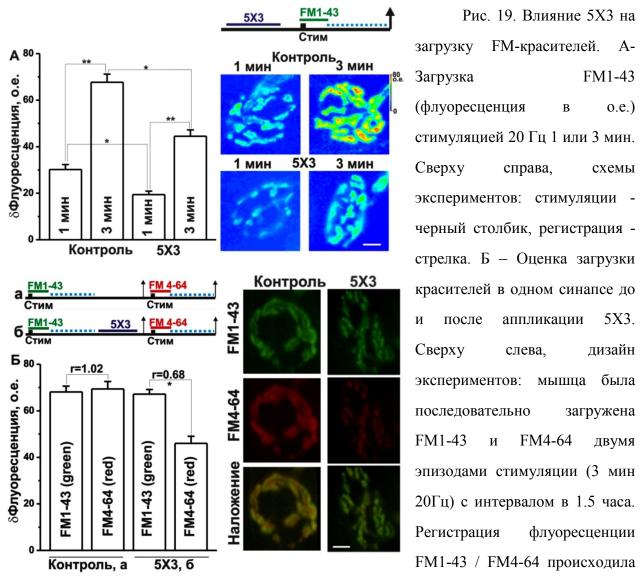


Рис. 18. Эффекты 5X3 на спонтанное и вызванное освобождение медиатора. А – а, МТКП в контроле и после 5X3; б и в, амплитуда (в нА) и частота (в с⁻¹) МТКП. Б – а, ТКП в контроле и после 5X3 в ответ на единичные ПД; б, амплитуда ТКП (в нА). В – облегчение ТКП при парной стимуляции в контроле и после 5X3. Сверху, ТКП в ответ на стимуляцию с межимпульсным интервалом 20 мс. Внизу, отношение амплитуды второго к первому ТКП (ТКП2/ТКП1), построенное как функция от длительности межимпульсных интервалов. Г – изменение ТКП в течение и после стимуляции 3 мин 20 Гц. а, Амплитуда ТКП при 20 Гц стимуляции. Сверху, ТКП в контроле и после 5X3 в моменты 0, 1 и 3 мин стимуляции. б, Кумулятивные кривые амплитуды ТКП (в нА) при 20 Гц раздражении. в, Восстановление амплитуды ТКП после стимуляции 3 мин 20Гц. Ось-Х начинается с 3 мин, когда 20 Гц стимуляция была завершена.

В контроле 3-х мин стимуляция (20 Γ ц) вызывала захват в \sim 2.17 раз большего количества FM1-43 (p<0.001, n=8), чем 1 мин стимуляция (n=8) (рис. 19A). Тогда как

кумулятивная кривая амплитуды ТКП после 3-х мин стимуляции была примерно в 2.96 раз больше (р<0.001), чем после 1 мин стимуляции (рис. 18Гб). Различие между степенью загрузки и освобождением медиатора происходит из-за повторного участия части везикул в рециклировании в течение 3 мин стимуляции (Betz, Bewick, 1993). Популяция везикул, рециклирующих за 3 мин стимуляции, выраженная как фракция от общего числа везикул, освободивших медиатор, может быть оценена в $\sim 27\%$ (2.96-2.17=0.79; 0.79*100/2.96=26.7%). После 1 мин стимуляции доля таких везикул незначительная, так как время рециклирования при стимуляции 20 Γ ц \sim 1 мин (Зефиров и др., 2008; Захаров и др. 2012).



после 1-ой / 2-ой процедуры загрузки. Для детекции FM4-64 настройки чувствительности были подобраны таким образом, чтобы удалить проникновение флуоресценции от FM1-43 в красный канал. Внизу слева, интенсивности флуоресценции (в о.е.), отношение флуоресценции FM4-64 к FM1-43 обозначено над столбиками. Справа, сверху-вниз: изображения нервных терминалей. Шкала – 10 µм (А, Б).

5X3 снижает загрузку FM1-43 на ~36 / 32% в ответ на 20 Гц стимуляцию 1 / 3 мин (n=8/8, p<0.01; рис. 19A), и оцененная доля рециклирующих в течение 3 мин везикул сокращается до 8% (p<0.001). С использованием протокола с двумя последовательными эпизодами загрузки двумя различными FM-красителями (зеленым FM1-43 и красным FM4-64) было показано ослабление ~33 % (n=8, p<0.01) загрузки красителя (сопровождалось снижением площади флуоресцирующих пятен) в одну и ту же нервную терминаль после воздействия 5X3 (рис. 19Б).

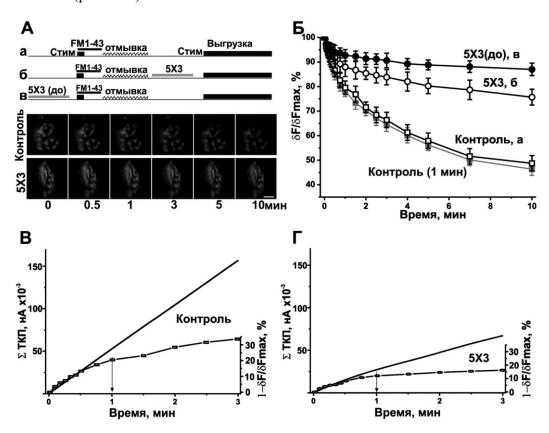


Рис. 20. Влияние 5X3 на выгрузку FM1-43 и время рециклирования. А, сверху, протоколы экспериментов: стимуляция — черный прямоугольник. Внизу, изображения синапса в покое (0) и при стимуляции 0.5, 1, 3, 5, 10 мин. Шкала, 10 мкм. Б — Снижение флуоресценции (в %) в ходе 20 Гц стимуляции. В некоторых экспериментах обработка 5X3 предшествовала загрузке (в), которая впоследствии была значительно меньше, чем в контроле. Однако это не может объяснить более медленную выгрузку FM1-43, поскольку терминали с исходно низкой флуоресценцией (из-за уменьшения длительности «загружающей» стимуляции с 3 до 1 мин) имели схожую с контрольной кинетику выгрузки («Контроль 1 мин»). В, Г - Инвертированные кривые выгрузки (из Б) масштабированы и наложены на кумулятивные кривые амплитуды ТКП (из рис. 18Гб). Среднее время рециклирования показано стрелкой.

Полученные данные указывают, что популяция синаптических везикул, которые участвуют в экзо-эндоцитозном цикле в течение высокочастотной стимуляции, значительно уменьшается после 5X3.

5X3 значительно замедлял выгрузку FM1-43 (к 3 мин стимуляции снижение флуоресценции было на ~50% меньше, n=8, p<0.001). Если нервные терминали были сначала обработаны 5X3 и затем загружены FM1-43, и повторно стимулировались (рис. 20A, Б), то выгрузка подавлялась еще сильнее (n=8, p<0.05). Вероятно, эффект однажды добавленного 5X3 длительно сохраняется и состоит не только в подавлении экзоцитоза, но и снижении компетенции к слиянию вновь сформированных везикул. Это согласуется с отсутствием восстановления амплитуды ТКП после высокочастотной стимуляции (рис. 18Гв). Однако 5X3 не влиял (р>0.05) на время рециклирования синаптических везикул, которое сохранялось на уровне 50-60 с (рис. 20Г).

В дальнейших экспериментах применялась последовательная обработка препаратов сначала холестерин-изменяющим агентом, а потом 5X3. Обработка препаратов как МЦД (1 и 10 мМ / n=5 и 5), так и комплексом МЦД-холестерин (5 мМ, n=5), снижающая или увеличивающая мембранный холестерин, предотвращала развитие собственного эффекта 5X3 на окрашивание мембран XT-B (рис. 21). То есть изменения содержания холестерина предотвращают вызванное 5X3 разрушение рафтов. Парадоксально, даже удаление холестерина 1мМ МЦД, которое в отдельности вызывает только слабое нарушение рафтов, «спасает» синапсы от сильного дестабилизирующего рафты действия 5X3.

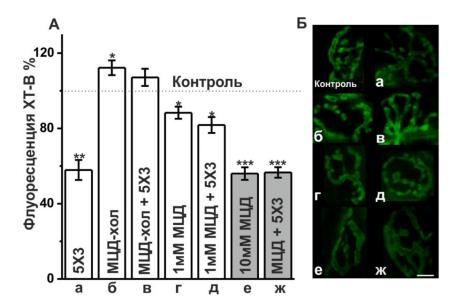


Рис. 21. Манипуляции с мембранным холестерином и влияние 5X3 на окрашивание XT-В. А – флуоресценция XT-В в синаптических регионах (в % от контрольного значения). Препараты предварительно обрабатывались комплексом МЦД-холестерин (в) или МЦД (1Мм (д) или 10 мМ (ж)), а

потом 5X3. Также показаны эффекты 5X3 (a), МЦД-холестерина (б), МЦД (г, е) в одиночку. Б –изображения синаптических регионов, меченных XT-В. Шкала – 10 мкм.

Изменения уровня мембранного холестерина (с помощью МЦД-холестерина/n=5, и МЦД 0.1, 1, 10 мМ/ n=5/6/5) противодействовали вызванному 5X3 угнетению экзоцитоза синаптических везикул в течение 20Гц стимуляции (рис. 22Б-Д), тогда как сами манипуляции с холестерином (насыщение или истощение) приводили к противоположным изменениям (усилению или ослаблению) экзоцитоза синаптических везикул. Если аппликация 5X3 предшествовала обработке комплексом МЦД-холестерин (n=6) или МЦД (1 мМ, n=6), тогда скорость выгрузки FM1-43 оставалась значительно уменьшенной (рис. 22Е).

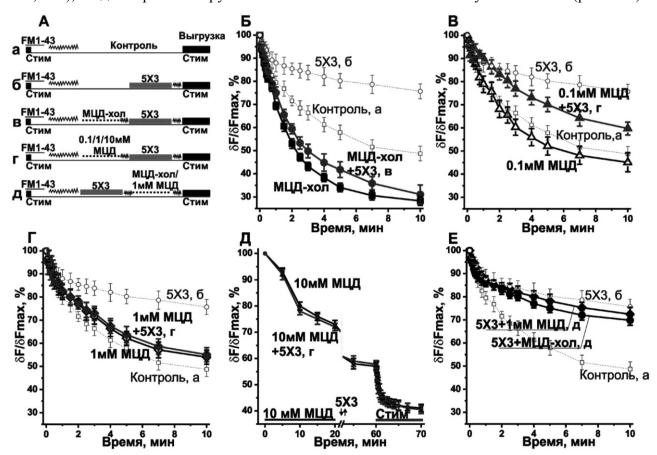


Рис. 22. Зависимость от холестерина эффектов 5X3 на выгрузку FM1-43. А – Дизайн экспериментов, результаты которых представлены на Б, В, Г, Д и Е. Б-Г – выгрузка FM1-43 из нервных терминалей, которые сначала обрабатывались МЦД-холестерином / МЦД 0.1, 1 мМ, а потом 5X3. Д – флуоресценция в терминалях в течение аппликации 10 мМ МЦД (20 мин) и последующей стимуляции с частотой 20 Гц. Горизонтальные линии показывают аппликацию МЦД и 20 Гц-стимуляцию. Добавление 5X3 показано стрелками. Е – в этих экспериментах (Ад) 5X3 добавлялся перед обработкой комплексом МЦД-холестерин или 1 мМ МЦД. Контрольная кривая (а, без воздействий 5X3 и холестерин-изменяющих агентов, светлые квадратики) и кривая, иллюстрирующая эффект 5X3 в одиночку (б, светлые кружочки), показаны на Б-Г и Е в виде светло серых тонких кривых.

В данном случае различий в выгрузке FM1-43 между мышцами, обработанными только 5X3 и в соединении с последующей экспозицией с МЦД-холестерином или МЦД, не наблюдалось (p>0.05). Следовательно, оптимальное содержание холестерина, определяющее стабильность рафтов, требуется исключительно для запуска эффектов 5X3, но не после.

Таким образом, 5X3, действуя в наномолярной концентрации, 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. Вероятно, что этот оксистерол также действует на свойства синаптических мембран, приводя к уменьшению стабильности рафтов. Описанные эффекты 5X3 очень чувствительны к содержанию в мембране холестерина, и изменения нативного уровня холестерина заметно ослабляют влияние 5а-холестан-3-она на выгрузку FM1-43 и окрашивание XT-В. Возможно, что 5а-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.

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, Sampaio, 2011; Петров, Зефиров, 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 выраженно 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 нейропередачи 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 нейропередачу, 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; Теіхеіга 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 Ca²⁺ через которые стимулирует кальмодулин-зависимую кальциневрин, что способствует усиленному протеканию спонтанного фосфатазу, экзоцитоза. Также впервые нами было показано, что тип спонтанного экзоцитоза, вызываемого удалением мембранного холестерина, зависит от активности протеинкиназы С. Блокирование протеинкиназы C (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 Са²⁺- 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 а2-изоформы Na⁺/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.

He 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 Cu²⁺ 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, Caccia, 2013; Петров и др. 2016). Однако о влиянии оксистеролов на синаптическую коммуникацию известно крайне мало. Нам впервые удалось обнаружить высокую биологическую активность оксистерола, 5*a*-холестан-3-она, усиленное образование которого наблюдается при редком генетическом заболевании церебротендинальном ксантоматозе, сопровождающимся нейродегенерацией и миастенией. В наномолярной концентрации 5*a*-холестан-3-он, не изменяя спонтанного освобождения, угнетал вызванную секрецию при низко- и высокочастотной активности, а также нарушал кратковременную синаптическую пластичность. Угнетение нейропередачи под влиянием 5*a*-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 5а-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 5а-холестан-3-она. Это указывает на существование 5а-холестан-3-он-связывающего «рецептора» (сайта), аффинность и/ или функционирование которого зависит от мембранного холестерина.

В целом, мембранный холестерин, в изобилии присутствующий в нервно-мышечном синапсе и организующий здесь липидные плотики, 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 (5д-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.

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 выраженно 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 нейропередаче. 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 нервномышечном 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 Ca²⁺ 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 Ca²⁺) 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 блокированном (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, 5α-холестан-3-он в наномолярной концентрации не влияет на спонтанное освобождение медиатора, но разрушает липидные плотики 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 5α-холестан-3-она на состояние мембран и экзоцитоз значительно ослабляются при изменении исходного содержания мембранного холестерина (как в сторону увеличения, так и уменьшения).

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО МАТЕРИАЛАМ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в журналах, рекомендованных ВАК

- 1. Зефиров А.Л. Особенности кругооборота синаптических везикул в двигательных нервных окончаниях лягушки и мыши / А.Л. Зефиров, А.В. Захаров, Р.Д. Мухаметзянов, **А.М. Петров** // **Журнал эволюционной биохимии и физиологии**. − 2008. − Т. 44. № 6. − С. 603-612.
- 2. Зефиров А.Л. Везикулярный цикл в двигательных нервных окончаниях диафрагмы мыши / А.Л. Зефиров, А.В. Захаров, Р.Д. Мухамедзянов, **А.М. Петров**, Г.Ф. Ситдикова // **Российский физиологический журнал им. Сеченова**. − 2008. − Т. 94. № 2. − С. 129-141.
- 3. **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 // **Journal of Neuroscience**. − 2008. − V. 28, № 49. − P. 13216-13222.
- 4. **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. Зефиров // **Российский физиологический журнал им. Сеченова.** 2009. − Т. 95. № 7. − С. 762-772.
- 5. Зефиров А.Л. Эндоцитоз в нервной системе / А.Л. Зефиров, **А.М. Петров** // **Природа.** 2009. №. 9. С. 12-20.

- 6. Зефиров А.Л. Липиды в процессах экзо- и эндоцитоза синаптических везикул / А.Л. Зефиров, **А.М. Петров** // **Российский физиологический журнал им. Сеченова.** − 2010. Т. 96. № 8. С. 753-765.
- 7. **Petrov A.M.** Increased non-quantal release of acetylcholine after inhibition of endocytosis by methyl-β-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 // **Neuroscience.** 2011. V. 186. P. 1-12.
- 8. **Петров А.М.** Холестерин и липидные плотики в плазматической мембране нервного окончания и мембране синаптических везикул / **А.М. Петров**, К.Е. Кудряшова, Ю.Г. Одношивкина, А.Л. Зефиров // **Нейрохимия.** − 2011. Т. 28. № 1. − С. 19-25.
- 9. Тараканова О.И. Роль мембранного холестерина в процессах секреции медиатора из двигательных нервных окончаний / О.И. Тараканова, **А.М. Петров**, А.Л. Зефиров // Доклады **Академии наук.** − 2011. Т. 438. № 2. − С. 1-3.
- 10. Захаров А.В. Экспериментальное и модельное исследование механизма рециклирования синаптических везикул / А.В. Захаров, **А.М. Петров**, Н.В. Котов, А.Л. Зефиров // **Биофизика.** 2012. Т.57. №. 4. С. 670-682.
- 11. **Петров А.М.** Холестерин и липидные плотики биологических мембран. Роль в секреции, рецепции и функционировании ионных каналов / А.М. Петров, А.Л. Зефиров // **Успехи физиологических наук.** − 2013. − Т. 44. № 1. − С. 17-38.
- 12. **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. Зефиров // **Российский физиологический журнал им. Сеченова.** − 2013. Т.99. № 2. С. 93-108.
- 13. Abdrakhmanov M.M. Depolarization-induced calcium-independent synaptic vesicle exoand endocytosis at frog motor nerve terminals / M.M. Abdrakhmanov, A.M. Petrov, P.N. Grigoryev, A.L. Zefirov // Acta Naturae. − 2013. − V. 5. № 4. − P. 77-82.
- 14. Кравцова В.В. Роль холестерина в поддержании электрогенеза концевых пластинок диафрагмы крысы / В.В. Кравцова, **А.М. Петров**, А.Н. Васильев, А.Л. Зефиров, И.И. Кривой // **Бюллетень экспериментальной биологии и медицины**. − 2014. Т. 158. № 9. С. 275-279.

- 15. **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 // **Journal of Physiology**. 2014. V. 592. P. 4995-5009.
- 16. Giniatullin A. The involvement of P2Y12 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. V. 285. P. 324-32.
- 17. Kasimov M.R. Effects of 5α -cholestan-3-one on the synaptic vesicle cycle at the mouse neuromuscular junction. / M.R. Kasimov, A.R. Giniatullin, Zefirov, A.M. Petrov // Biochimica et Biophysica Acta (BBA) Molecular and Cell Biology of Lipids. 2015. V. 1851. N_2 5. P. 674-685.
- 18. **Petrov A.M.** Inhibition of protein kinase C affects on mode of synaptic vesicle exocytosis due to cholesterol depletion / **A.M. Petrov**, G.F. Zakyrjanova, A.A. Yakovleva, A.L. Zefirov // **Biochemical and Biophysical Research Communications.** − 2015. V. 456. № 1. P. 145-150.

Работы, опубликованные в материалах конференций и иных научных изданиях

- 1. Зефиров А.Л. Синаптическая везикула и механизм освобождения медиатора (экзоэндоцитозный везикулярный цикл) / А.Л. Зефиров, **А.М. Петров** // Казань: Арт-кафе, 2010. — 324 с. + 32 цветные вкладки.
- 2. **Петров А.М.** Холестерин-зависимая регуляция секреции, рецепции и функционирования ионных каналов / **А.М. Петров**, А.Л. Зефиров // «Избранные главы фундаментальной и трансляционной медицины» отв. Ред. Р.И. Жданов. Казань: Изд-во Казан. Ун-та, 2014. С. 169-201.
- 3. Зефиров А.Л. Механизм сопряжения квантовой и неквантовой секреции медиатора в двигательном нервном окончании диафрагмы крысы / А.Л. Зефиров, **А.М. Петров,** Н.В. Науменко, А.Р. Гиниатуллин, О.И. Тараканова, Ю.Г. Одношивкина // Труды научного совета по экспериментальной и прикладной физиологии «Системная саморегуляция функций организма». Москва, 2011. Т. 16. С. 175-188.
- 4. **Петров А.М.** Островки холестерина в биологических мембранах: роль в межклеточной коммуникации / **А.М. Петров**, А.Л. Зефиров // Сборник Российского фонда фундаментальных исследований: биология и медицинская наука. 2013. С. 102-115.

- 5. **Петров А.М.** Мембранный холестерин и эндоцитоз синаптических везикул / **А.М. Петров**, М.Р. Касимов, А.Л. Зефиров // Тезисы международной конференции «Механизмы нервных и нейроэндокринных регуляций». Москва, 2008. С. 87-88.
- 6. **Петров А.М.** Эффект М-β-ЦД на эндоцитоз синаптических везикул / **А.М. Петров**, М.Р. Касимов, А.Л. Зефиров // Материалы Всероссийской научно-теоретической конференции «Физиологические механизмы адаптации растущего организма». Казань, 2008. С. 115-116.
- 7. Гиниатуллин А.Р. АФК опосредуемый механизм модуляции процесса передачи возбуждения в нервно-мышечном синапсе лягушки: роль холестерола нервного окончания / А.Р. Гиниатуллин, **А.М. Петров**, А.Н. Акулов, Р.И. Шаймуратов, А.Л. Зефиров // Сборник статей международной конференции "Рецепция и внутриклеточная сигнализация". Пущино, 2009. Т.1. С. 191-197.
- 8. **Петров А.М.** Идентификация липидных плотиков в двигательных нервных окончаниях / **А.М. Петров** // Материалы XV Всероссийской научно-практической конференции «Молодые ученые в медицине». Казань, 2010. С. 290-291.
- 9. **Петров А.М.** Липидные плотики в двигательных нервных окончаниях / **А.М. Петров**, К.Е. Кудряшова, Ю.Г. Одношивкина, А.Л. Зефиров // Тезисы XXI съезда физиологического общества им. И.П. Павлова. - Калуга, 2010. - С. 476.
- 10. Узинская К.В. Везикулярный транспортер ацетилхолина в механизме неквантового освобождения / К.В. Узинская, **А.М. Петров**, Н.В. Науменко, А.Л. Зефиров // Тезисы XXI съезда физиологического общества им. И.П. Павлова. Калуга, 2010. С. 629-630.
- 11. Тараканова О.И. Холестерин в экзоцитозе синаптических везикул / О.И. Тараканова, **А.М. Петров**, А.Р. Гиниатуллин, Р.Д. Мухамедзянов, А.Л. Зефиров // Тезисы XXI съезда физиологического общества им. И.П. Павлова. Калуга, 2010. С. 594-595.
- 12. Зефиров А.Л. Холестерин в экзоцитозе синаптических везикул / А.Л. Зефиров, **А.М. Петров**, А.Р. Гиниатуллин, М.Р. Касимов // Материалы всероссийской научной конференции с международным участием «Физиологические механизмы адаптации растущего организмы». Казань, 2010. С. 78-79.
- 13. Петров А.М. Островки холестерина и сфинголипидов в нервно-мышечных синапсах / **А.М. Петров**, А.Л. Зефиров // Материалы всероссийской научной конференции с международным участием «Физиологические механизмы адаптации растущего организмы». Казань, 2010. С. 136-137.

- 14. Тараканова О.И. Эффекты холестеролоксидазы на рециклирование синаптических везикул / О.И. Тараканова, М.Р. Касимов, К.Е. Кудряшова, Ю.Г. Одношивкина, **А.М. Петров** // Сборник статей международной конференции «Рецепторы и внутриклеточная сигнализация». Пущино, 2011. Т.1 С. 206-211.
- 15. **Петров А.М.** Окисление мембранного холестерина и цикл синаптических везикул в двигательных нервных окончаниях / **А.М. Петров**, М.Р. Касимов, А.Л. Зефиров // Научные труды III съезда физиологов СНГ. Ялта, 2011. С. 36-37.
- 16. **Петров А.М.** Влияние окисления мембранного холестерина на экзоцитоз и транспорт синаптических везикул / **А.М. Петров**, М.Р. Касимов // Материалы VI Всероссийской научно-практической конференции «Молодые ученые в медицине». Казань, 2011. С. 133.
- 17. **Петров А.М.** Роль холестерина в экзоцитозе синаптических везикул / **А.М. Петров** // Материалы международного молодежного научного форума «Ломоносов-2012». Москва, 2012. C. 257-258.
- 18. **Петров А.М.** Значение мембранного холестерина в кластеризации синаптических везикул / **А.М. Петров**, А.В. Яковлева // XVII Всероссийская научно-практическая конференция «Молодые ученые в медицине». Казань. 2012. С. 110.
- 19. **Петров А.М.** Холестерин регулирует соотношение между вызванным и спонтанным экзоцитозом синаптических везикул / **А.М. Петров**, А.В. Яковлева, А.Л. Зефиров // Труды VII Сибирского физиологического съезда. Красноярск, 2012. С. 414-415.
- 20. Зефиров А.Л. Холестерин и липидные плотики в функционировании возбудимых тканей / А.Л. Зефиров, **А.М. Петров** // Труды VII Сибирского физиологического съезда. Красноярск, 2012. С. 194-195.
- 21. **Петров А.М.** Роль холестерина в рециклировании синаптических везикул / **А.М. Петров** // Тезисы 8 международного конгресса «Нейронаука для медицины и психологии». Судак, 2012. С. 319-320.
- 22. Яковлева А.А. Удаление холестерина из плазматической мембраны усиливает спонтанный экзоцитоз синаптических везикул в двигательных нервных окончаниях / А.А. Яковлева, **А.М. Петров** // Тезисы III конференции молодых ученых «Экспериментальная и прикладная физиология». Москва, 2012. С. 51-52.
- 23. **Петров А.М.** Воздействие холестеролоксидазы на мембранный холестерин и стабильность липидных плотиков / **А.М. Петров** // Сборник статей международной научно-

- практической конференции "Молодежь. Наука. Будущее: технологии и проекты. Казань, 2012. Т. 1. С. 150-154.
- 24. **Петров А.М.** Влияние окисления мембранного холестерина на пресинаптический везикулярный цикл / **А.М. Петров**, М.Р. Касимов, А.Л. Зефиров // Материалы VI Всероссийской конференции молодых ученых-медиков, организуемой Воронежским, Курским и Казанскими медицинскими ВУЗами. Казань, 2012. С. 185-187.
- 25. **Петров А.М.** Холестерин и механизм освобождения нейромедиатора / **А.М. Петров**, А.Л. Зефиров // Тезисы IV съезд биофизиков России. Нижний Новгород, 2012. С. 115.
- 26. **Петров А.М.** Эффекты холестеролоксидазы на механизм освобождения медиатора из двигательных нервных окончаний лягушки / **А.М. Петров**, А.Л. Зефиров // Тезисы XI всероссийской конференция «Механизмы адаптации растущего организма к физической и умственной нагрузке». Казань, 2012. С. 115-116.
- 27. **Petrov A.M.** Membrane cholesterol oxidation and depletion effects on synaptic vesicle cycle in frog motor nerve terminals / **A.M. Petrov**, A.L. Zefirov // Federation of European biochemical societies congress, St. Petersburg, 2013. **FEBS Journal.** 2013. V. 280 (Suppl. 1). P. 199.
- 28. **Петров А.М.** Экзоцитоз синаптических везикул. Роль холестерина / **А.М. Петров**, А.А. Яковлева, А.Л. Зефиров // Тезисы XXII съезда физиологического общества им. И.П. Павлова. Волгоград, 2013. С. 410.
- 29. Зефиров А.Л. Холестерин и липидные рафты в мембранах возбудимых клеток: роль в клеточной коммуникации / А.Л. Зефиров, **А.М. Петров** // Тезисы XXII съезда физиологического общества им. И.П. Павлова. Волгоград, 2013. С. 182-183.
- 30. Касимов М.Р. 5α-холестан-3-он угнетает экзо-эндоцитозный цикл синаптических везикул в нервно-мышечных синапсах мыши / М.Р. Касимов, **А.М. Петров** // Тезисы XXII съезда физиологического общества им. И.П. Павлова. Волгоград, 2013. С. 215-216.
- 31. **Петров А.М.** Влияние окисления холестерина мембраны на пресинаптический везикулярный цикл / **А.М. Петров** // Материалы VIII Международной Пироговской научной медицинской конференции. **Вестник РГМУ**. 2013.- Спец. Вып. № 1. С. 149-150.
- 32. Яковлева А.А. Мембранный холестерин и регуляция спонтанного экзоцитоза синаптических везикул / А.А. Яковлева, **А.М. Петров** // Международная конференция молодых ученых «Экспериментальная и теоретическая биофизика». Пущино, 2013. С. 75.

- 33. **Петров А.М.** Сигнальные пути и молекулы, вовлеченные в эффекты истощения мембранного холестерина на спонтанный экзоцитоз синаптических везикул / **А.М. Петров**, А.Л. Зефиров // Научные труды IV Съезда физиологов СНГ. Сочи-Дагомыс, 2014. С. 85.
- 34. **Petrov A.M.** Cholesterol dependent regulation of the synaptic transmission at neuromuscular junction / **A.M. Petrov**, M.R. Kasimov, A.A. Yakovleva, A.L. Zefirov // Biological mobility: new facts and hypotheses. Pushino, 2014. -P. 208-212.
- 35. **Петров А.М.** Оксистеролы как регуляторы цикла синаптических везикул в нервномышечных синапсах лягушки / **А.М. Петров**, М.Р. Касимов, Г.Ф Закирьянова // Материалы XII международной научной конференции «Адаптация растущего организма». Казань, 2014. C. 85.
- 36. **Петров А.М.** 5альфа-холестан-3-он уменьшает размер функционально активного пула синаптических везикул / **А.М. Петров**, М.Р. Касимов // «Современные проблемы нейробиологии». Материалы научной конференции с международным участием, посвященной 70-летию Ярославской государственной медицинской академии. Ярославль, 2014. С. 38-39.
- 37. Касимов М.Р. Влияние 5α-холестан-3-она на синаптическую передачу в нервномышечном контакте мыши / М.Р. Касимов, **А.М. Петров** // Материалы X международной Пироговской конференции. **Вестник РГМУ**. Москва, 2015. №2. С. 452.
- 38. **Петров А.М.** Удаление холестерина усиливает спонтанный экзоцитоз в нервномышечном синапсе мыши через механизм зависимый от НАДФН-оксидазы / **А.М. Петров**, М.Р. Касимов, В.И. Сычев, А.Л. Зефиров // Труды 4-ой Международной конференции «Современные проблемы системной регуляции физиологических функций». Москва, 2015. С. 544-547.
- 39. **Петров А.М.** Механизм освобождения нейромедиатора: роль холестерина / **А.М. Петров** // Молодежная школа-конференция «Молекулярные механизмы регуляции физиологических функций». Москва, 2015. С. 23-24.